



**Faculté Des Sciences et de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie**



Thèse en vue de l'obtention d'un diplôme de Doctorat en Biologie

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et activité antidiabétique
de *Hammada scoparia* (Pomel), « Remth »**

Présenté par :

ZERRIOUH MERIEM

Jury

Mme <i>ATIK BEKKARA F.</i>	Présidente	Professeur, Université de Tlemcen
M. <i>BENALI M.</i>	Examineur	Professeur, Université de Sidi Bel-Abess
M. <i>BENMEHDI H.</i>	Examineur	Maître de conférences, Université de Béchar
Mme <i>BENDIMERAD N.</i>	Examinatrice	Professeur, Université de Tlemcen
Mme <i>MERGHACHE S.</i>	Encadreur	Professeur, Université de Tlemcen
M. <i>DJAZIRI R.</i>	Co-encadreur	Professeur, Université de Tlemcen

Année universitaire : 2014-2015

*A ma famille
A mes chers parents
Et mes chères sœurs*

Remerciements

J'exprime tout d'abord mes remerciements à mes directeurs de thèse, Mme Merghache Salima, professeur au département de Génie Biomédical, faculté de Technologie, université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen et Mr Djaziri Rabah, professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU, université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

Madame Merghache S., m'a honorée de sa confiance en acceptant la direction de cette thèse, et a fait preuve à mon égard de patience, d'indulgence et de bienveillance au laboratoire. Je lui reconnais cette grande qualité d'avoir toujours respecté et facilité mes initiatives. Je la remercie pour son aide variée, ses conseils, ses encouragements et sa lecture attentive du manuscrit. Qu'elle trouve dans cette thèse le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

J'exprime mes sincères remerciements à Mr Djaziri R., qui a permis le déroulement de ma thèse dans des meilleures conditions, je le remercie chaleureusement de sa contribution effective à ce travail, en veillant au bon déroulement de mes expériences.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mme Atik Bekkara Fouzia, professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, de me faire l'honneur de présider ce jury, de participer à l'évaluation de ce travail et de l'enrichir de sa haute compétence scientifique.

Je suis très honorée que Mr Benali Mahmoud, professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Djillali Liabes Sidi Bel-Abès, ait accepté d'examiner ce travail, qu'il trouve dans cette thèse, l'expression de ma profonde considération.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mr Benmehdi Houcine, maître de conférences au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Tahri Mohammed Béchar, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver Monsieur mes sincères expressions de respect.

Je remercie vivement Mme Bendimerad Nassima, professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, d'avoir accepté

d'évaluer ce travail et de l'intérêt qu'elle lui a accordé. Qu'elle trouve dans cette thèse, l'expression de ma profonde considération.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mr Selles Chaouki, maître de conférences au département de Chimie, faculté de Sciences, université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pour sa patience, ses encouragements et ses motivations à mon égard.

Je remercie également toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ; votre présence, votre aide, vos encouragements m'ont été très utiles, merci infiniment.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAD : Association Américaine du Diabète
ALAT (TGP) : Alanine Amino -Transférase
ARN : Acide ribonucléique
ASAT (TGO) : Aspartate Amino-Transférase
CCM : chromatographie sur couche mince
CCPA : Conseil Canadien de Protection des Animaux
DCCT : Diabetes Control and Complications Trial
DL₅₀ : Dose létale qui devrait tuer 50% de la population
DPP-IV : Dipeptidylpeptidase-IV
DT1 : Diabète de type 1
DT2 : Diabète de type 2
EA : Extrait aqueux
EAc : Extrait acétate d'éthyle
EAcS : Extrait acétate d'éthyle obtenu par soxhlet
EDs : Extrait dichlorométhane obtenu par soxhlet
EE : Extrait eau-éthanol
EH : Extrait hexane
EHS : Extrait hexane obtenu par le soxhlet
EM : Extrait eau-méthanol
EMs : Extrait méthanol obtenu par soxhlet
EnB : Extrait n-butanol
ESM : Erreur Standard de la Moyenne
F : fraction
GLP-1 : Glucagon Like peptide-1
HbA1C : Hémoglobine A1 glyquée
HLA : Human Leucocyte Antigen
IP : intrapéritonéale
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NGSP : National Glycohemoglobin Standardization Program
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
p.c : poids corporel
pH : potentiel d'Hydrogène
PPAR γ : Peroxisome Proliferator- Activated Receptor-Gamma
Rf : rapport frontal
STZ : streptozotocine
TTOG : Test de Tolérance Orale au Glucose
TZD : Thiazolidinediones

AVANT-PROPOS

Ce travail s'inscrit dans un axe pluridisciplinaire, qui concerne la valorisation de la flore locale en plantes médicinales. Nous nous sommes intéressés, plus particulièrement aux plantes utilisées dans le traitement du diabète sucré, dont *Hammada scoparia*. Les travaux qui ont fait l'objet de cette thèse, ont été réalisés dans le laboratoire des substances naturelles et activités biologiques (LASNABIO), université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, l'expérimentation sur les animaux, a été entretenue dans l'animalerie du département de Biologie, université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

Hammada scoparia, est une plante bien étudiée chimiquement, les structures des principales molécules ont été bien élucidées, de ce fait notre approche a consisté de reprendre initialement l'étude phytochimique par des techniques simples non coûteuses, dans un but de confirmer la présence des métabolites secondaires déjà identifiées, et surtout pour caractériser chimiquement les extraits destinés à l'étude biologique. Une fois la fraction la plus active isolée, des analyses phytochimiques plus avancées seront ainsi entrepris.

ملخص

تمثل النباتات الطبية الآن مصدرا أساسيا لاكتشاف جزيئات علاجية جديدة وفعالة ضد العديد من الأمراض، تحت هذا السياق تدرج دراستنا هذه التي قمنا من خلالها بدراسة نبات الحمادة المعروف بالرمث و المشهور بتأثيره الايجابي على عدة أمراض. قمنا بدراسة التركيب الكيميائي لهذه النبتة، السمية الحادة وكذلك نشاطها المضاد لمرض السكري عند فئران الويستر.

كشفت الدراسة الكيميائية لنبتة الحمادة عن وجود البولي فينول ما يعادل 36.54 ملغ مكافئ حمض الغاليك/ غ، ممثلة في الفلافونيدات (الفلافونول ثلاثي السكريات وفلافون)، و أحماض الفينول (حمض coumaric، حمض cinnamic وحمض caffeoylquinic) الفينول البسيط (الكاتيكول) والعفص. من ناحية أخرى قدرت كمية alkaloides بنسبة 5.2٪، والتي تنتمي أساسا إلى أسر isoquinolines، indoles، و isoquinolones و-β carbolines. وعلاوة على ذلك يحتوي الرمث على 5.07٪ من السكريات الكلية و 5.4٪ من saponosides من مؤشر رغوّة يقدر ب500.

لم تظهر اختبارات السمية الحادة عند نبات الحمادة أن المستخلص المائي و مستخلص الماء مع الميثانول المقدمة إلى الفئران عن طريق الفم أي سمية قاتلة و ذلك حتى جرعة 2000 ملغ/كغ، فقط لوحظت بعض الاضطرابات العابرة خاصة مع المستخلص الكحولي. بالمقابل سُجلت أعراض التسمم مع وفاة بعض الفئران بعد حقنها بالمستخلص (ماء-ميثانول)، قدرت الجرعة القاتلة ل 50% من المجموعة ب 588.84 ملغ/كغ.

تم استخدام ثلاث إجراءات لدراسة النشاط المضاد للسكري لعدة مستخلصات مائية و عضوية، لنبتة الرمث، مقدمة عن طريق الفم للفئران العادية و الفئران المصابة بداء السكري بعد حقنها ب 60 ملغ/كغ من مادة الستربتوزوتوسين.

تمثل الإجراء الأول في اختبار تأثير المستخلصات النباتية على سكري الصائم و على المدى القصير عند الفئران العادية. خضعت الحيوانات من خلال الإجراء الثاني لاختبار تحمل الجلوكوز بعد تغذيتها بمختلف المستخلصات النباتية. في حين أن الإجراء الثالث تمثل في اختبار المستخلصات على الفئران العادية و المصابة بداء السكري بعد علاجها اليومي بهذه المستخلصات (7 أو 21 يوما). أظهرت النتائج أن للإجراء الثاني تأثيرا خافضا لسكر الدم (p < 0.05) لوحظ في فترة زمنية قدرت ب 30 إلى 60 دقيقة بعد التغذية بالجلوكوز. وكان هذا التأثير واضحا بشكل خاص مع مستخلصات الميثانول أو ثنائي كلورو ميثان. لم يظهر الإجراء الأول والثالث أي انخفاض في نسبة السكر في الدم، وأي تحسن في الاضطرابات التي تصاحب مرض السكري التجريبي ككثرة الأكل، العطش، وانخفاض وزن الجسم وتدهور القياسات البيوكيميائية.

من أجل تسليط الضوء على آلية العمل الممكنة لنباتنا، قمنا بإجراء فحص جرعات الجلبيكوجين في الكبد والعضلات عند الفئران المعالجة مسبقا بالمستخلص الكحولي. لم تظهر هذه التجربة أي تأثير إيجابي للمستخلص على تحسين مستوى نقل السكر في داخل الأنسجة (P > 0.05).

على ضوء هذه النتائج، يمكننا القول إن *H. scoparia*، نبات طبي ذو تأثير فعال على خفض نسبة السكر العالية في الدم و هذا ما تجلّى من خلال تجاربنا على الفئران العادية المشحونة بالجلوكوز عن طريق الفم. وتشير دراستنا أيضا أن الجزيئات الأكثر فعالية يُستبّه أنها تنتمي إلى أسر قلويدات، فلافونيدات و الصابونين و الأرجح أنه هناك تآزر بين هذه الأسر. هذا بالإضافة إلى أن الآلية الأكثر احتمالا لعمل المستخلصات النباتية لدينا هي قدرة هذه الأخيرة على تثبيط امتصاص الجلوكوز في الأمعاء، أو تحفيز إفراز الأنسولين أو تحسين الاستخدامات الهامشية للجلوكوز.

في الأخير نقول أننا بحاجة لدراسات أكثر تقدما و تعمقا لإبراز التأثير الايجابي للحمادة على مرض السكري و الأكثر من ذلك العثور على الجزيئات المسؤولة.

الكلمات المفتاحية: *Hammda scoparia*، قلويدات، فلافونيدات، سمية، تحمل الجلوكوز عن طريق الفم، السكري التجريبي.

RESUME

Les plantes médicinales représentent aujourd'hui une source incontournable pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, très efficaces contre de nombreuses maladies. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude de *Hammada Scoparia* connue sous le nom de « *Remth* », une plante réputée pour ces vertus curatives, nous avons ainsi étudié sa composition phytochimique, sa toxicité aiguë et son activité antidiabétique *in vivo* chez le rat.

L'étude de la composition phytochimique de *H. scoparia*, a révélé un taux de polyphénols égale à 36,54 eq mg d'acide gallique/g, représenté par des flavonoïdes (des flavonols triglycosides et un flavone), des acides phénols (l'acide coumarique, l'acide cinnamique et l'acide cafféoyl-quinique), des phénols simples (cathécol) et des tannins. D'autre part la quantité des alcaloïdes a été estimée à 5,2%, et qui appartiennent principalement aux familles des isoquinolines, des indoles, des isoquinolone et des β -carboline. De plus *H. scoparia* contient 5,4% de saponosides ayant un indice de mousse de 500, et 5.07% de sucres totaux.

Les tests de la toxicité aiguë de *H. scoparia*, ont montré que les extraits aqueux et eau-méthanol, administrés par voie orale ne présentent pas de toxicité mortelle chez les rats Wistar même à une dose de 2000mg/kg, à part quelques symptômes transitoires observés avec l'extrait alcoolique. Par contre des troubles de toxicité accompagnés par la mort de quelques rats ont été enregistrés lorsque l'extrait eau-méthanol a été injecté par voie intrapéritonéale, ainsi la dose létale qui devrait tuer 50% de la population est trouvée égale à 588.84 mg/kg.

L'étude de l'activité antidiabétique de *H. scoparia*, a été réalisée sur différents extraits aqueux et organiques administrés par voie orale, en utilisant trois procédures, chez des rats Wistar normaux et des rats rendus diabétiques par la streptozotocine (60mg/kg). La première procédure consiste à tester l'effet à court terme des extraits de la plante, sur la glycémie à jeun des rats normaux. Alors que dans la deuxième, les animaux ont subi un test de tolérance orale au glucose après le gavage des extraits. Tandis que dans la troisième l'effet des extraits a été testé chez des rats normaux et diabétiques, suite à un traitement quotidien (7 ou 21 jours). Les résultats, indiquent que seule la deuxième procédure, a montré un effet antihyperglycémiant significatif ($p < 0,05$) observé dans un intervalle de temps de 30 à 60 min après la charge glucidique. Cet effet a été évident, notamment avec des extraits épuisés par le méthanol ou le dichlorométhane. La première et la troisième procédure n'ont montré aucune diminution de la glycémie, et aucune amélioration dans les troubles qui accompagnent le diabète expérimental comme la polyphagie, la polydipsie, la chute du poids corporel et la détérioration des paramètres sanguins.

Dans un but de souligner le mécanisme d'action possible de la plante, un dosage du glyco-gène hépatique et musculaire a été réalisé chez des rats traités préalablement par un extrait alcoolique. Cette expérience n'a montré aucun effet positif de l'extrait sur l'amélioration du transport du glucose intra-tissulaire ($P > 0,05$).

A la lumière de ces résultats, nous pouvons dire que *H. scoparia*, est une plante médicinale à activité antihyperglycémiant remarquable, qui s'est manifesté dans nos expériences, par une diminution de l'hyperglycémie provoquée par une charge orale de glucose chez des rats normaux. L'étude présente indique aussi, que les molécules les plus soupçonnées appartiennent aux familles des alcaloïdes, des flavonoïdes et des saponosides et nous suggérons qu'elles agissent en synergie. De plus le mécanisme d'action le plus probable des extraits étudiés, peut être une inhibition de l'absorption intestinale du glucose, une stimulation de la sécrétion de l'insuline ou une amélioration de l'utilisation périphérique du glucose.

D'autres études plus avancées sont ainsi nécessaires pour mieux valoriser l'effet de *H. scoparia* contre le diabète sucré, et de trouver les molécules responsables.

Mots clés: *Hammada scoparia*, alcaloïdes, flavonoïdes, toxicité, tolérance orale au glucose, diabète expérimental.

ABSTRACT

Medicinal plants represent today unavoidable source for the discovery of new therapeutic molecules, which are very efficacious against many diseases. In this context, we have interested to study *Hammada scoparia*, called a « Remth », a plant renowned for their healing properties, so we have studied its phytochemical composition, its acute toxicity and its antidiabetic activity *in vivo* in rat.

Phytochemical study of *H. scoparia*, revealed a polyphenols level of 36,54 mg eq of gallic acid/g, which are represented by flavonoids (flavonol triglycosides and flavone), phenolic acids (coumaric acid, cinnamic acid and caffeoylquinic acid), simple phenols (catechol), and tanins. On the other hand, the proportion of alkaloids was found to be 5, 2%, and they mainly belong to groups of isoquinolines, indoles, isoquinolone and β -carboline. Furthermore, *H. scoparia* contained 5, 4% of saponins, with foam index of 500, and 5, 07 % of total sugars.

H. scoparia acute toxicity studies showed that aqueous and water-methanol extracts, given orally to Wistar rats, didn't exhibit lethal toxicity, even at the dose level of 2000 mg/kg, except some transitory symptoms observed with alcoholic extract. On the other hand, when water-methanol extract was given by intraperitoneal injection, toxicity troubles with death of some animals were recorded. Thus lethal dose that should kill 50 % of the population was found to be 588.84 mg/kg.

Antidiabetic study of *H. scoparia* was conducted on different aqueous and organic extracts given orally, to normal Wistar rats and streptozotocine-induced diabetic rats (60 mg/kg), using three procedures. The first procedure consisted of testing the acute effect of plant extracts on fasting glycemia of normal rats. While in the second, animals were subjected to oral glucose test, after the extracts administration. Finally, in the third procedure, plant extract effect was tested, in normal and diabetic rats, in daily treatment (7 or 21 days). The results indicated that only the second procedure, has showed significant antihyperglycemic effect ($p < 0, 05$), observed in time interval of 30 to 60 min after the glucose charge. The effect was evident mainly with methanol and dichloromethane extracts. The second and the third procedure didn't show any reduction of glycemia, or any enhancement of troubles that come with experimental diabetes, as polyphagia, polydipsia, body weight lost, and blood parameters deterioration.

In order to outline the possible mechanism of action of the plant, a determination of glycogen in the liver and muscle were carried out on rats previously treated by alcoholic extract. This experiment showed no positive effect of the extract on improving the intra-tissue glucose transport ($p > 0, 05$).

In the light of these results, we can say that *H. scoparia* is a medicinal plant with remarkable antihyperglycemic activity, which appeared in our experiments with a reduction of hyperglycemia, induced by oral glucose charge in normal rats. Our study indicates also that the most responsible molecules belong to the families of alkaloids, flavonoids, and saponins and we suggest that they react in synergy. Furthermore, the most probable mechanism of action of studied extracts is an inhibition of intestinal glucose absorption, stimulation of insulin secretion or improvement of peripheral glucose transport.

More advanced studies are necessary to more valorise the effect of *H. Scoparia* against diabetes mellitus, and to find the responsible molecules.

Keys words: *Hammada scoparia*, alkaloids, flavonoids, toxicity, oral glucose tolerance, experimental diabetes.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Les critères utilisés pour le diagnostic du diabète sucré.....	5
Tableau n°2 : Les principaux agents antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète de type 2.....	9
Tableau n°3 : Quelques plantes antidiabétiques testées chez des animaux de laboratoire et leur mécanisme d'action possible.....	13
Tableau n°4 : La composition chimique de <i>Hammada scoparia</i>	17
Tableau n°5 : Mode opératoire du dosage des polyphénols dans <i>H. scoparia</i>	20
Tableau n°6 : Méthode de révélation des flavonoïdes en CCM.....	21
Tableau n°7 : Méthode de révélation des alcaloïdes en CCM.....	23
Tableau n°8 : Mode opératoire du dosage des sucres totaux dans <i>H. scoparia</i>	26
Tableau n°9 : Caractéristiques de l'extrait de flavonoïdes, et analyse chromatographique...	32
Tableau n°10 : Caractéristiques de l'extrait brut en phénols et acides phénols, et analyse chromatographique.....	33
Tableau n°11 : Caractéristiques de l'extrait brut en alcaloïdes, et analyse chromatographique.....	34
Tableau n°12 : Hauteur de la mousse dans les différents tubes dilués à partir de l'extrait aqueux de <i>H. scoparia</i>	34
Tableau n°13 : Caractéristiques de l'extrait brut en saponosides, et analyse chromatographique.....	35
Tableau n°14 : Composition phytochimique de l'extrait aqueux (EA), l'extrait eau-éthanol (EE) et l'extrait eau-méthanol (EM).....	36
Tableau n°15 : Composition phytochimique des extraits hexane (EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B).....	37
Tableau n°16 : Composition phytochimique des extraits hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAc) et méthanol (EMs).....	38
Tableau n°17 : Etude phytochimique des différentes fractions (FA→FD) obtenues par fractionnement de l'extrait méthanol sur colonne de gel de silice.....	39
Tableau n°18 : Etude de la toxicité aiguë de <i>H. scoparia</i> chez le rat.....	46
Tableau n°19 : La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait aqueux (EA) chez le rat.....	48
Tableau n°20 : La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait eau-méthanol (EM) chez le rat.....	49
Tableau n°21 : La toxicité aiguë par voie intrapéritonéale (i.p), de l'extrait eau-méthanol (EM) chez le rat.....	50

Tableau n°22 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA), à court terme.....	55
Tableau n°23 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA), suite à un test de tolérance orale au glucose.....	55
Tableau n°24 : Répartition par lot des rats diabétiques utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA) administré pendant 7 jours.....	56
Tableau n°25 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits eau-éthanol (EE) et eau-méthanol (EM), à court terme.....	57
Tableau n°26 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits eau-éthanol (EE) et eau-méthanol (EM), suite à un test de tolérance orale au glucose.....	57
Tableau n°27 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B), soumis à un test de tolérance orale au glucose	58
Tableau n°28 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des différents extraits: Hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle(EAcs), méthanol (EMs), glibenclamide (Gliben) , suite à un test de tolérance orale au glucose.....	59
Tableau n°29 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits méthanol (EMs) et dichlorométhane (EDs), à court terme.....	60
Tableau n°30 : Répartition par lot des rats normaux et diabétiques utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanol (EMs) à long terme	61
Tableau n°31 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'effet de l'extrait méthanol (EMs) sur la glycémie postprandiale.....	62
Tableau n°32 : Mode opératoire du dosage du glucose libéré par hydrolyse acide du glycogène intra-tissulaire.....	64
Tableau n°33 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des différentes fractions (FA→FD), suite à un test de tolérance orale au glucose.....	65
Tableau n°34 : Paramètres sanguins dosés au 21 ^e jour, chez les rats normaux et diabétiques.....	83
Tableau n°35 : Quantités du glycogène hépatique et musculaire chez les rats normaux.....	86

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pathophysiologie de l'hyperglycémie et augmentation des acides gras dans le diabète de type 2.....	7
Figure 2 : Les différents sites d'actions des plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète sucré.....	11
Figure 3 : Les structures chimiques de quelques molécules à activité antidiabétique, isolées à partir de plantes.....	15
Figure 4 : <i>Hammada scoparia</i> (POMEL) ILJIN.....	16
Figure 5 : Courbe étalon de l'acide gallique ($\lambda=750\text{nm}$).....	31
Figure 6 : Courbe étalon du glucose ($\lambda=490\text{nm}$).....	35
Figure 7 : Variations du poids relatif des organes chez les rats normaux traités par l'extrait aqueux (EA) de <i>Hammada scoparia</i> et comparés aux rats témoins traités par le NaCl.....	49
Figure 8 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait aqueux (EA) de <i>Hammada scoparia</i> à différentes doses.....	69
Figure 9 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait aqueux (EA) de <i>Hammada scoparia</i> et soumis à un test de tolérance orale au glucose.....	70
Figure 10 : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de <i>Hammada scoparia</i> pendant 7 jours.....	71
Figure 11 : Variations du poids corporel chez les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de <i>Hammada scoparia</i> pendant 7 jours.....	72
Figure 12 : Quantité journalière de l'aliment prise par les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de <i>Hammada scoparia</i>	72
Figure 13 : Quantité journalière de l'eau prise par les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de <i>Hammada scoparia</i>	72
Figure 14 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait eau-éthanol (EE) et l'extrait eau-méthanol (EM) de <i>Hammada scoparia</i>	73
Figure 15 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait eau-éthanol (EE) et l'extrait eau-méthanol (EM) de <i>Hammada scoparia</i> et soumis à un test de tolérance orale au glucose.....	74
Figure 16 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par les extraits acétate d'éthyle (EAe) et n-Butanol (E-nB) de <i>Hammada scoparia</i> et soumis à un test de tolérance orale au glucose.....	75
Figure 17 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par différents extraits de <i>Hammada scoparia</i> et soumis à un test de tolérance orale au glucose.....	76

Figure 18 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par les extraits méthanol (EMs) et dichlorométhane (EDs) de <i>Hammada scoparia</i>	77
Figure 19 : Variations de la glycémie chez les rats normaux (N) et diabétiques (D) traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i> , pendant 21 jours.....	78
Figure 20 : Variations du poids corporel chez les rats normaux (N) et diabétiques (D) traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i> , pendant 21 jours.....	79
Figure 21 : Variations de la quantité d'aliment consommée chez les rats normaux traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i>	80
Figure 22 : Variations de la quantité d'aliment consommée chez les rats diabétiques traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i>	80
Figure 23 : Variations de la quantité de l'eau consommée chez les rats normaux traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i> pendant 21 jours.....	81
Figure 24 : Variations de la quantité de l'eau consommée chez les rats diabétiques traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i> pendant 21 jours.....	81
Figure 25 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i> et soumis à un test de tolérance orale au glucose au 14 ^e jour.....	84
Figure 26 : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i> et soumis à un test de tolérance orale au glucose au 14 ^e jour.....	84
Figure 27 : Variations de la glycémie postprandiale, chez les rats normaux traités par l'extrait méthanol (EMs) de <i>Hammada scoparia</i>	85
Figure 28 : Courbe étalon du glucose ($\lambda=540$ nm).....	86
Figure 29 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par les différentes fractions de <i>Hammada scoparia</i> , et soumis à un test de tolérance orale au glucose	87

TABLE DES MATIERES

Partie bibliographique

1. Introduction.....	1
2. Définition et diagnostic du diabète sucré.....	3
3. Epidémiologie du diabète sucré.....	4
4. Classification du diabète sucré.....	6
4.1. Diabète de type 1.....	6
4.2. Diabète de type 2.....	6
5. Traitement du diabète sucré.....	8
5.1. Traitement du diabète sucré par l'insuline et les antidiabétiques oraux.....	8
5.2. Traitement du diabète sucré par les plantes médicinales.....	10
6. <i>Hammada scoparia</i>	16
6.1. Position systématique.....	16
6.2. Phytochimie.....	16
6.3. Activité biologique.....	18

Chapitre 1 : Etude phytochimique de *Hammada scoparia*

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	19
2. Etude phytochimique de <i>Hammada scoparia</i>	19
2.1. Les composés phénoliques.....	19
2.1.1. Dosage des polyphénols par la méthode de Folin et Ciocalteu.....	19
2.1.2. Extraction et analyse des flavonoïdes.....	20
2.1.3. Extraction et analyse des phénols simples et des acides phénols.....	22
2.2. Extraction et analyse des alcaloïdes totaux.....	22
2.3. Les saponosides.....	24
2.3.1. Détermination de l'indice de mousse.....	24
2.3.2. Extraction et analyse des saponosides.....	24
2.4. Dosage des sucres réducteurs par la méthode du Dubois.....	25
3. Préparation des extraits.....	27
3.1. Préparation de l'extrait aqueux (EA).....	27
3.2. Préparation de l'extrait eau-éthanol (EE).....	27
3.3. Préparation de l'extrait eau-méthanol (EM).....	27
3.4. Préparation des extraits hexane (EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol(En-B).....	28

3.5. Préparation des extraits hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAc) et méthanol (EMs) par épuisement de la matière végétale au soxhlet.....	28
3.6. Fractionnement de l'extrait méthanol (EMs) par chromatographie sur colonne de gel de silice.....	28
4. Screening phytochimique.....	29
4.1. Flavonoïdes.....	29
4.2. Tannins.....	29
4.3. Quinones.....	29
4.4. Saponosides.....	29
4.5. Stéroïdes.....	29
4.6. Alcaloïdes.....	29
4.7. Sucres réducteurs.....	30
Résultats et interprétation	
1. Etude phytochimique de <i>Hammada scoparia</i>	31
1.1. Les composés phénoliques.....	31
1.1.1. Dosages des polyphénols (méthode de Folin et Ciocalteu).....	31
1.1.2. Caractérisation des flavonoïdes par CCM.....	31
1.1.3. Caractérisation des phénols et des acides phénols par CCM.....	32
1.2. Caractérisation des alcaloïdes par CCM.....	33
1.3. Les saponosides	34
1.3.1. Détermination de l'indice de mousse.....	34
1.3.2. Caractérisation des saponosides par CCM.....	34
1.4. Dosage des sucres réducteurs par la méthode du Dubois.....	35
2. Étude phytochimique et caractérisation des extraits aqueux (EA), eau-éthanol (EE) et eau-méthanol (EM).....	36
3. Étude phytochimique et caractérisation des extraits hexane (EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B).....	37
4. Étude phytochimique et caractérisation des extraits hexane (EHs) dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAc) et méthanol (EMs) obtenus par épuisement de la matière végétale par appareil de soxhlet	38
5. Étude phytochimique et caractérisation des différentes fractions (FA→FD) obtenues par fractionnement de l'extrait méthanol(EMs)par chromatographie sur colonne de gel de silice.....	39
Discussion	40

Chapitre 2: Étude de la toxicité aiguë de *Hammada scoparia*

Matériel et méthodes

1. Animaux.....	45
2. Etude de la toxicité aiguë des extraits de <i>H. scoparia</i> chez le rat	45
2.1. Etude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux (EA).....	46
2.2. Etude de la toxicité aiguë de l'extrait eau-méthanol (EM).....	47
2.3. Détermination de la DL ₅₀ de l'extrait eau-méthanol (EM).....	47

Résultats et interprétation

1. La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait aqueux (EA) et de l'extrait eau- méthanol (EM) ...	48
2. La toxicité aiguë par voie intrapéritonéale de l'extrait eau-méthanol (EM) et détermination de la DL ₅₀	49

Discussion	51
-------------------------	----

Chapitre 3: Etude *in vivo* de l'activité antidiabétique de *Hammada scoparia*

Matériel et méthodes

1. Induction du diabète expérimental.....	54
2. Etude de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA) chez des rats normaux et des rats diabétiques.....	54
2.1. Etude à court terme.....	54
2.2. Test de tolérance orale au glucose.....	54
2.3. Etude à long terme (7jours).....	55
3. Etude de l'activité antidiabétique de l'extrait eau-éthanol (EE) et de l'extrait eau-méthanol (EM) chez des rats normaux.....	56
3.1. Etude à court terme.....	56
3.2. Test de tolérance orale au glucose.....	57
4. Etude de l'activité antidiabétique de l'extrait acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B) chez des rats normaux	58
4.1. Test de tolérance orale au glucose	58
5. Etude de l'activité antidiabétique des extraits hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAc) et méthanol (EMs) chez des rats normaux.....	58
5.1. Test de tolérance orale au glucose des extraits EHs, EDs, EAc et EMs,.....	59
5.2. Test à court terme de l'EMs et de l'EDs.....	60
6. Etude à long terme de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanol (EMs) chez des rats normaux et des rats diabétiques.....	60
7. Etude de l'effet de l'extrait méthanol (EMs) sur la glycémie postprandiale, et sur les quantités du glycogène hépatique et musculaire chez des rats normaux.....	62

7.1. Effet de l'extrait méthanol (EMs) sur la glycémie postprandiale.....	62
7.2. Détermination de la quantité du glycogène hépatique et musculaire.....	62
7.2.1.Principe.....	62
7.2.2.Mode opératoire.....	63
a. Digestion des tissus et précipitation du glycogène.....	63
b. Hydrolyse acide du glycogène.....	63
c. Dosage du glucose libéré par la méthode de Nelson.....	63
8. Etude de l'activité antidiabétique des différentes fractions (A→D) chez les rats normaux.....	64
8.1. Test de tolérance orale au glucose des fractions (A→D).....	64
9. Dosages des paramètres sanguins.....	65
9.1. Dosage du glucose.....	66
9.2. Dosage de l'urée.....	66
9.3. Dosage de la créatinine.....	66
9.4. Dosage de la transaminase glutamate oxaloacétique (TGO)	67
9.5. Dosage de l'alanine amino-transférase (ALAT,TGP).....	67
10. Analyses statistiques.....	67

Résultats et interprétation

1. Effet antidiabétique de l'extrait aqueux (EA) chez les rats normaux et les rats diabétiques.....	69
1.1. Effet à court terme.....	69
1.2. Effet suite à un test de tolérance orale de glucose.....	69
1.3. Effet à long terme (7jours).....	70
2. Effet antidiabétique des extraits eau-éthanol (EE) et eau-méthanol (EM) chez les rats normaux.....	73
2.1. Effet à court terme.....	73
2.2. Effet suite à un test de tolérance orale au glucose.....	73
3. Effet antidiabétique des extraits acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B) chez les rats normaux.....	74
3.1. Effet suite à un test de tolérance orale au glucose.....	74
4. Effet antidiabétique des extraits EHs, EDs, EAcS, et EMs chez les rats normaux	75
4.1. Effet suite à un test de tolérance orale au glucose	75
4.2. Effet à court terme de l'EMs et de l'EDs.....	76
5. Effet antidiabétique de l'extrait méthanol (EMs) à long terme (21 jours) chez les rats normaux et les rats diabétiques.....	77
5.1. Effet de l'extrait EMs sur la glycémie.....	77
5.2. Effet de l'extrait EMs sur le poids corporel	78

5.3. Effet de l'extrait EMs sur les quantités de l'aliment et de l'eau consommées.....	79
5.4. Effet de l'extrait EMs sur les paramètres sanguins chez les rats normaux et diabétiques	82
5.5. Effet de l'extrait EMs suite à un test de tolérance orale au glucose, réalisé après 14 jours de traitement chez les rats normaux et diabétiques.....	83
6. Effet de l'extrait EMs sur la glycémie postprandiale, et les quantités du glycogène hépatique et musculaire chez des rats normaux	85
6.1. Effet de l'extrait EMs sur la glycémie postprandiale	85
6.2. Effet de l'extrait EMs sur les quantités du glycogène hépatique et musculaire.....	85
7. Effet des fractions (A→D), suite à un test de tolérance orale au glucose.....	86
Discussion.....	88
Conclusion générale et perspectives.....	97
Références bibliographiques.....	99

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

Depuis 1980, des scientifiques de partout dans le monde, se sont largement focalisés sur la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques d'origine naturelle. Cette tendance peut être largement expliquée par la nécessité urgente de nouveaux traitements, et cela pour plusieurs raisons, notamment l'augmentation des effets secondaires des médicaments synthétiques parfois graves (**Schlienger, 2014**).

Devant la multitude des sources naturelles disponibles, les chercheurs se sont intéressés tout d'abord aux plantes, et en particulier à celles fréquemment utilisées en médecines traditionnelles et réputées par leur efficacité au sein des malades. Le principal but a été de reproduire l'effet thérapeutique de ces remèdes naturels dans des conditions de laboratoire, et d'en tirer les extraits ou les molécules les plus efficaces, afin de les mettre à la portée des personnes malades.

Pour réaliser ce but, plusieurs étapes sont nécessaires, premièrement la sélection et l'identification des plantes qui ont une activité thérapeutique particulière, deuxièmement l'isolement des principes actifs les moins toxiques et la détermination de la meilleure méthode pour leur extraction et leur conservation, troisièmement la compréhension de leur mécanisme d'action, et enfin l'entreprise des essais cliniques. A savoir que ces grandes étapes nécessitent la collaboration de plusieurs scientifiques ayant différentes spécialités comme des biochimistes, des chimistes, des physiologistes, des botanistes, et des médecins.

Parmi les plantes qui ont pris un grand intérêt et qui ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche, ce sont les plantes à activité antidiabétique : des plantes douées d'un pouvoir de faire réguler la glycémie des patients diabétiques, dont le nombre ne cesse de croître. D'après les revues scientifiques, ces plantes appartiennent principalement aux familles suivantes ; *Leguminosae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Cucurbitaceae*, *Asteraceae*, *Moraceae*, *Rosaceae* et *Araliaceae*. De plus les plantes les plus actives sont *Allium sativum*, *Gymnema sylvestre*, *Citrullus colocynthis*, *Trigonella foenum graecum*, *Momordica charantia* et *Ficus bengalensis* (**Patel et al., 2012**).

Les mécanismes d'actions de ces plantes sont diverses, en générale, elles peuvent agir comme des insulino-mimétiques ou des insulino-sécrétagogues, ainsi leurs principes actifs sont de nature chimique très variable, et appartiennent surtout à des métabolites secondaires. Un exemple qui mérite d'être mentionné, et celui de la metformine, un antidiabétique oral issu par hémisynthèse à partir d'un alcaloïde la galéagine, isolée d'une plante *Galega officinalis* (Witters, 2001). La metformine est souvent considérée comme un médicament de premier choix pour le traitement du diabète sucré, et est utilisée par 120 millions de personnes autour du monde (Viollet et al., 2012), son principal mode d'action est principalement expliqué par une diminution de la production hépatique du glucose (Viollet et al., 2012).

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer l'activité antidiabétique de *Hammada scoparia*, une plante citée dans les études ethnopharmacologiques pour le traitement du diabète sucré, mais aucun travail n'a été réalisé pour bien cerner cette activité thérapeutique.

Le présent manuscrit, est entamé par une synthèse bibliographique, dans laquelle le sujet du diabète sucré est évoqué et ses traitements par les médicaments conventionnels et les plantes médicinales sont discutés. Une seconde partie est consacrée à la description botanique et chimique de *H. scoparia* et aussi à son utilisation thérapeutique.

Quant à la partie expérimentale, est consacrée à l'évaluation de l'activité anti-diabétique de *H. scoparia in vivo*, chez des rats normaux et diabétiques ainsi que de chercher les familles de molécules les plus actives et les moins toxiques. Pour cela nous avons suivi les étapes suivantes :

Dans un premier temps, nous avons étudié la composition chimique de *H. scoparia*. Cette étude a été réalisée sur des extraits préparés selon un protocole d'extraction sélective et spécifique pour une famille de métabolites secondaires bien particulière. Les tests phytochimiques ont été réalisés soit en utilisant des réactions de coloration ou de précipitation dans des tubes ou bien sur des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des réactifs chimiques spécifiques pour chaque famille de composés.

Dans un second temps, nous avons préparé des extraits destinés aux tests biologiques, en utilisant différentes méthodes d'extractions liquide-liquide et solide-liquide ainsi qu'à la chromatographie sur colonne afin d'obtenir des fractions plus ou moins purifiées. Le contenu de chaque extrait ou fraction a été déterminé par des tests phytochimiques.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux tests biologiques, que nous avons entamés par l'évaluation de la toxicité aiguë de *H. scoparia* sur des rats de laboratoire, en utilisant deux extraits et deux voies d'administration. Le principal but de cette étude est d'évaluer le comportement des rats vis-à-vis de doses élevées des extraits de notre plante et de déterminer les doses létales (DL_{50} et DL_{100}).

Enfin nous avons entrepris, des expériences pour évaluer l'activité antidiabétique de *H. scoparia* sur des rats de laboratoire. Chaque extrait préalablement préparé a été sujet à des expériences. Ces dernières, ont été basées sur trois tests : un test à court terme qui permet l'évaluation de l'effet hypoglycémiant ; un test de tolérance orale au glucose, afin d'évaluer l'effet antihyperglycémiant; et un test à long terme, qui permet d'évaluer l'activité antidiabétique dans les conditions d'un diabète expérimental.

En plus une autre partie a été consacrée à l'étude du mécanisme d'action possible de *H. scoparia*, nous avons testé son effet sur le stockage du glycogène hépatique et musculaire dans des conditions postprandiales.

La collecte des différents résultats et leurs interprétations, nous a mené à établir une discussion, suivie par une conclusion et des perspectives.

2. Définition et diagnostic du diabète sucré

Le diabète sucré est un désordre métabolique d'une étiologie multiple, caractérisé par une hyperglycémie chronique, qui touche le métabolisme glucidique, lipidique et protéique, et qui en résulte d'un défaut de la sécrétion de l'insuline, de l'action de l'insuline ou les deux conjuguées (**Alberti et Zimmet, 1998**).

Les symptômes du diabète sucré sont caractéristiques et se manifestent par une polyurie, une polydipsie, un amaigrissement, et parfois par une polyphagie et des troubles

de la vision (**ADA, 2014**). Si aucun traitement n'est administré, la situation peut se développer vers l'acidocétose, l'hyperosmolarité ou l'acidose lactique (**ADA, 2014**).

Souvent les symptômes du diabète sucré ne sont pas visibles, et l'hyperglycémie présente d'une façon permanente cause des perturbations progressives au niveau des vaisseaux capillaires, ainsi qu'à l'apparition de complications à long terme, qui touchent en particulier l'œil, les reins, les systèmes nerveux et cardiovasculaires (**Alberti et Zimmet, 1998**). Pour cette raison, un diagnostic de la maladie s'avère nécessaire pour un dépistage précoce et un établissement d'un traitement adéquat.

En fait, c'est en 1998, que l'organisation mondiale de la santé (OMS) et l'association américaine du diabète (AAD) ont revisité les critères utilisés pour le diagnostic du diabète sucré, et ont fixé un seuil de glycémie à jeun supérieur ou égal à 126 mg/dl, pour définir un état diabétique (**Peters et Schriger, 1998 ; Motta et al., 2007 ; ADA, 2014**). Dans son dernier rapport, le Comité d'Expert International, recommande aussi l'utilisation du test de l'hémoglobine glyquée ($HbA1C \geq 6.5\%$), comme critère pour le diagnostic du diabète sucré (tableau n°1) (**IEC, 2009**).

3. Epidémiologie du diabète sucré

Aujourd'hui il est bien clair que le nombre de personnes affectées par le diabète sucré est en croissance rapide dans le monde entier (**Danaei et al., 2011**). Ainsi la prévalence mondiale de la maladie est estimée de passer de 6.4% avec 285 millions de diabétiques en 2010, à 7.7% avec 439 millions en 2030 (**Shaw et al., 2010**). Cette augmentation concerne surtout les pays sous-développés, avec 69% de diabétiques adultes contre 20% dans les pays développés (**Shaw et al., 2010**). Dans les pays africains, le nombre de diabétique aussi ne cesse de croître et d'une façon alarmante (**Abubakari et al., 2009 ; Whiting et al., 2011**). La prévalence du diabète sucré dans ces pays a été estimée à 3.8% en 2010, et d'augmenter à 4.7% en 2030 (**Shaw et al., 2010**).

En Algérie, le nombre de diabétiques adultes calculé en 2010 est de 1.63 millions avec une prévalence de 8.5%, ce nombre est estimé d'augmenter à 2.85 millions avec une prévalence de 9.4% en 2030 (**Shaw et al., 2010**). Une étude réalisée dans la région de

Tlemcen, révèle une prévalence de 14.2% au sein de la population, et montre que les hommes (20.4%) sont plus touchés que les femmes (10.7%) (**Zaoui et al., 2007**).

Tableau°1 : Les critères utilisés pour le diagnostic du diabète sucré (**IEC, 2009**).

Hb A1C \geq 6.5%. Le test doit être performé dans un laboratoire qui utilise une méthode certifiée par NGSP, et standardisée pour un essai en DCCT.*
Ou
Glycémie à jeun \geq 126 mg/dl (7.0 mmol/l). Un état de jeune est défini comme abstention de la prise de calories pour au moins 8h.*
Ou
Glycémie de 2h \geq 200 mg/dl (11.1 mmol/l) durant un TTOG. Le test doit être réalisé comme décrit par l'organisation mondiale de la santé, en utilisant une charge en glucose équivalente à 75g de glucose anhydre dissocié dans l'eau.*
Ou
Chez les personnes avec des symptômes classiques de l'hyperglycémie, des accès de l'hyperglycémie ou une glycémie prise au hasard \geq 200 mg/dl (11.1 mmol/l).
*Dans l'absence d'une hyperglycémie certaine, les critères 1-3 doivent être confirmés par plusieurs tests répétés.

Plusieurs données expliquent que les principaux facteurs de risques responsables de la propagation du diabète sucré, sont l'urbanisation, le changement de mode de vie, l'inactivité physique, l'obésité, et le stress psychosociologique qui menace les individus jour après jour (**Whiting et al., 2011**).

Quel que soit les chiffres, il est évident de dire que le diabète sucré est un problème majeur de santé publique qui menace les individus et l'économie des nations. De sorte qu'une prise en charge du patient diabétique est nécessaire et doit comprendre un suivi médical continu et aussi une bonne éducation. Cette dernière est basée sur l'apprentissage des bonnes pratiques pour le contrôle de la maladie, et la prévention de ses complications aiguës et chroniques (**ADA, 2012**). En parallèle, les travaux scientifiques doivent s'accroître d'avantage sur la recherche de nouvelles thérapies moins coûteuses et plus efficaces.

4. Classification du diabète sucré

Selon Thomas et Philipson, il existe plusieurs classifications du diabète sucré, mais aucun schéma n'est idéal, et il y a souvent des incohérences et des lacunes, ce qui montre que la classification de la maladie va encore évoluer avec la compréhension de la pathogénèse des formes majeures (**Thomas et Philipson, 2015**).

Comme un exemple de classification adaptée par l'OMS et l'AAD, est basée sur deux critères, les stades cliniques et l'étiologie du diabète sucré, nous distinguons ainsi le diabète de type 1 (A : auto-immun et B : idiopathique), le diabète de type 2 : des « diabètes autres types » et le diabète gestationnel (**ADA, 2014**).

Dans ce qui en suit, nous allons décrire les deux formes de diabète dites essentielles, le diabète de type 1 et le diabète de type 2.

4.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT₁) est représenté par 5-10% des diabétiques (**ADA, 2014**). Il touche souvent les enfants et les adolescents, mais il peut aussi survenir à n'importe quel âge même chez des vieillards. Le DT₁ est une maladie issue d'une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Les anticorps responsables sont : des anticorps anti-îlots, des anticorps anti-GAD (glutamate acide décarboxylase), des anticorps anti-insuline et des anticorps anti-tyrosine phosphatase IA2 (**Verge et al., 1998 ; Burton et al., 2007 ; Pietropaolo et al., 2012**).

Le DT₁ est une maladie multifactorielle polygénique, en générale, les études ont montré que des gènes de la classe II codant des HLA-DR et HLA-DQ, et un ou plusieurs gènes additionnels dans la région HLA, sont les principaux facteurs génétiques de risques pour le diabète de type 1 (**Concannon et al., 2009**). Des gènes de la région non HLA peuvent aussi contribuer (**Concannon et al., 2009**).

4.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT₂) est plus fréquent, et compte pour 90-95 % des diabétiques (**ADA, 2014**). Il se caractérise par une insulino-résistance et souvent un déficit relative de la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatique (**ADA, 2014**).

L'hyperglycémie détectée est la résultante de la diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, notamment le muscle (Shulman, 2000 ; Shulman et al., 1990), et une augmentation de la production hépatique du glucose par le foie (Virally et al., 2007). Le taux des acides gras est aussi élevé, à cause de la lipolyse accentuée, (Roden et al., 1996 ; Kovacs et Stumvoll, 2005). (Figure1)

D'autre part des facteurs génétiques et environnementaux sont aussi à l'origine du DT₂, l'importance des facteurs génétiques est attestée par le degré élevé de concordance des jumeaux monozygotes de l'ordre de 90% (Barroso, 2005). De plus la prédisposition génétique est souvent très forte, mais les mécanismes responsables sont complexes et souvent non complètement bien définis (ADA, 2014).

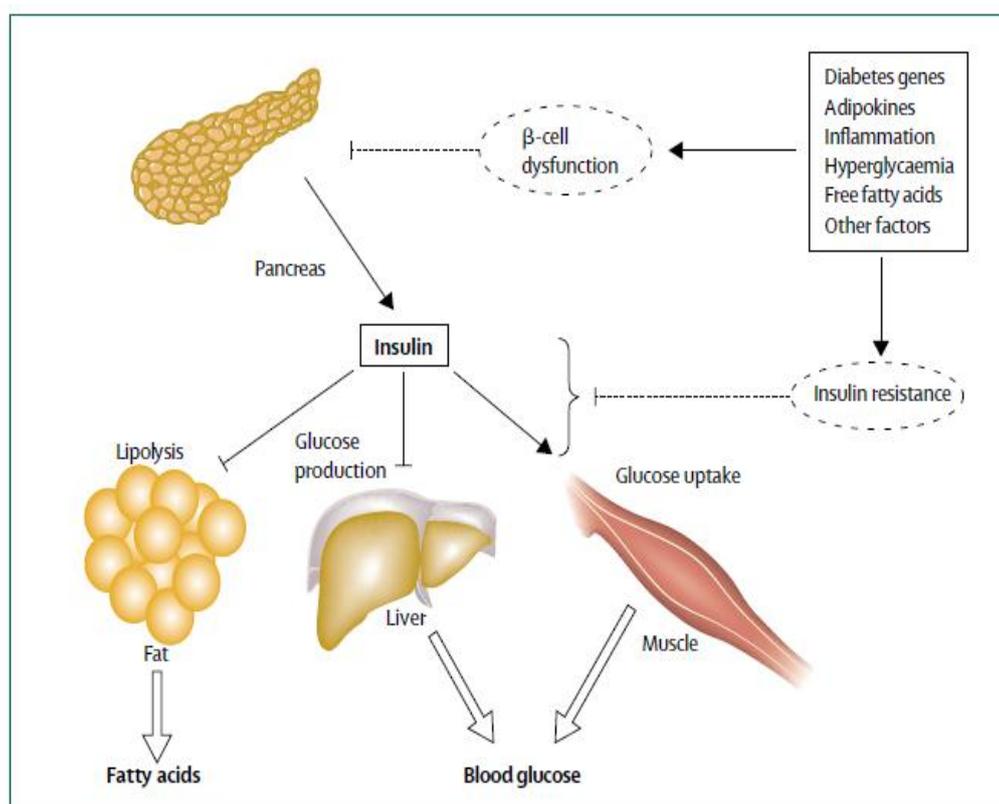


Figure 1 : Pathophysiologie de l'hyperglycémie et augmentation des acides gras dans le diabète de type 2.

L'action normale de l'insuline produite par le pancréas, s'exprime par la diminution de la production hépatique du glucose, l'augmentation de l'utilisation du glucose par le muscle squelettique, et la suppression de la libération des acides gras par le tissu adipeux. Les différents facteurs responsables de la pathogénèse du diabète de type 2, montrés dans la figure 1 affectent à la fois la sécrétion de l'insuline et l'action de l'insuline. La diminution de la sécrétion de l'insuline,

diminue aussi l'effet biologique de l'insuline dans les tissus cibles. L'insulinorésistance affecte la cascade de l'expression de l'insuline, en augmentant le taux des acides gras libres et en provoquant l'hyperglycémie caractéristique du diabète sucré. A leur tour les taux élevés des acides gras et du glucose agissent négativement sur la sécrétion de l'insuline et l'action de l'insuline (**Stumvoll et al., 2005**).

5. Traitement du diabète sucré

5.1. Traitement du diabète sucré par l'insuline et les antidiabétiques oraux

Le traitement du diabète sucré dépend du type du diabète et du degré du déficit en insuline. Pour le traitement du DT₁, l'insuline reste le moyen le plus efficace, et le plus disponible à fin d'obtenir une glycémie normale bien régulée. Le rôle de l'insuline administrée au malade d'une façon strictement contrôlée, consiste à remplacer l'insuline propre à l'organisme, les principaux effets attendus sur l'homéostasie du métabolisme sont ; une stimulation de l'utilisation périphérique du glucose et l'activation de la glycogénèse, de la glycolyse, de la lipogenèse et de la synthèse protéique. De plus l'insuline tente aussi à inhiber la gluconéogenèse et la lipolyse (**Kelley et al., 1990 ; Bailey, 1999**).

Le DT₂, peut être contrôlé dans les stades précoces de la maladie par un régime alimentaire et une activité physique, mais si la glycémie normale n'est pas atteinte, une prescription d'antidiabétiques oraux s'avère obligatoire, un recours à l'insuline peut aussi être nécessaire (**Koski, 2006**).

Les agents oraux disponibles pour le traitement du DT₂, peuvent être classés en cinq classes pharmacologiques. Les sulfonylurées, les dérivés de l'acide benzoïque (des agents hypoglycémiant), les biguanides, les inhibiteurs de α -glucosidases, et les thiazolidinediones (des agents antihyperglycémiant) (**Harrigan et al., 2001**). A souligner aussi le développement de nouveaux insulinosécrétagogues, les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs du DDP-IV(**Ahrén, 2007**). Les principaux points de différence entre ces classes pharmacologiques sont : le mécanisme d'action, la toxicité et les effets secondaires (tableau n°2).

Tableau n° 2 : Les principaux agents antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète de type 2.

Agents antidiabétiques	Exemples	Mode d'action	Effets secondaires	Références
Les sulfonylurées	Glibenclamide Gliburide Glimepiride Tolbutamide	Augmentation de la sécrétion pancréatique de l'insuline.	Hypoglycémie Prise de poids	Vicent et al., 1995. DeFronzo, 1999.
Les biguanides	Metformine	-Inhibition de la production hépatique du glucose. -Inhibition de l'absorption intestinale du glucose. -Effet possible sur le métabolisme lipidique.	Acidose lactique	Stumvoll et al., 1995. DeFronzo, 1999. Tiikkainen et al., 2004. Orban et al., 2006.
Les inhibiteurs des α-glucosidases	Acarbose	Inhibition de l'absorption intestinale du glucose.	Gastro-intestinaux	Josse, 1995. Baron, 1998.
Les thiazolidinediones	Rosiglitazone	Amélioration de l'action de l'insuline via l'activation des PPAR- γ .	Hépatotoxique	Elte et Blickle, 2007.
Les inhibiteurs des DPP-4 (Gliptines)	Sitagliptine Vildagliptine	-Diminution du taux du glucagon -Augmentation de la sécrétion de l'insuline.	Maux de tête Nausées Hypersensibilité	Ahrén, 2007.

5.2. Traitement du diabète sucré par les plantes médicinales

Selon le rapport de l'OMS, 80 % de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se traiter de diverses maladies. Ce taux remarquablement élevé, peut être expliqué par l'efficacité thérapeutique de ces remèdes naturels prouvée au sein de la population, et aussi par leur disponibilité et leur faible coût. Cette pratique médicale très ancienne, qui est fondée sur l'utilisation d'extraits de plantes et de principes actifs naturelles est connue sous le nom de la phytothérapie (**Schlienger, 2014**).

Une des remarquables applications de la phytothérapie, est l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement du diabète sucré. Ainsi plusieurs plantes sont utilisées par la population pour maintenir un taux de glucose sanguin dans les normes. Cette pratique a fasciné des chercheurs pour entreprendre des expériences afin de comprendre le mécanisme d'action de ces remèdes naturels et d'en tirer les principes actifs.

Une référence classique est à l'origine de l'émergence de plusieurs études réalisées sur l'activité antidiabétique des plantes médicinales, c'est celle de Marles et Farnsworth, ces deux auteurs reportent l'existence de 1123 espèces douées d'un pouvoir antidiabétique, appartenant à 725 genres et 183 familles, les familles les plus citées sont les Fabacées, les Astéracées, les Lamiacées, les Liliacées, les Poacées, et les Euphorbiacées (**Marles et Farnsworth, 1995**).

En effet, Marles et Farnsworth ont aussi trouvé que parmi ces plantes utilisées traditionnellement pour le traitement du diabète sucré, il y en a celles qui ont été testées expérimentalement, et 81% d'entre elles ont montré des résultats positifs, ce qui les a mené à constater que ces remèdes naturels représentent une source potentielle pour des nouveaux médicaments antidiabétiques (**Marles et Farnsworth, 1995**).

En Afrique 185 espèces sont aujourd'hui utilisées par la population contre le diabète sucré (**Mohammed et al., 2014**). D'autre part dans la région de l'ouest Algérien, nous avons recensé 60 espèces, qui appartiennent à 32 familles (**Azzi et al., 2012**), les plantes les plus citées sont : *Trigonella foenum-graecum* (56 citations), *Rosmarinus officinalis* (27 citations), *Citrullus colocynthis* (22 citations), *Tetraclinis articulata* (21 citations), *Artemesia herba alba* (20 citations), *Origanum compactum* (16 citations),

Punica granatum (16 citations), *Zygophyllum album* (15 citations) et *Artemisia absinthium* (12 citations) (Azzi et al., 2012). D'après Azzi et ces collègues, l'utilisation fréquente de ces plantes, peut être expliquée par leur faible coût, leur disponibilité mais aussi par leur efficacité.

Ainsi, les chercheurs et les scientifiques se sont vivement intéressés, à étudier ces plantes médicinales populaires à fin d'une part de prouver et de reproduire leur activité antidiabétique dans les conditions du laboratoire et d'autre part de cerner le (s) principe(s) actif(s), et d'expliquer son (leur) mécanisme d'action, dans un but de trouver de nouveaux médicaments antidiabétiques plus efficaces et avec peu d'effets secondaires, ainsi plusieurs sites d'actions ont été proposés (Figure 2).

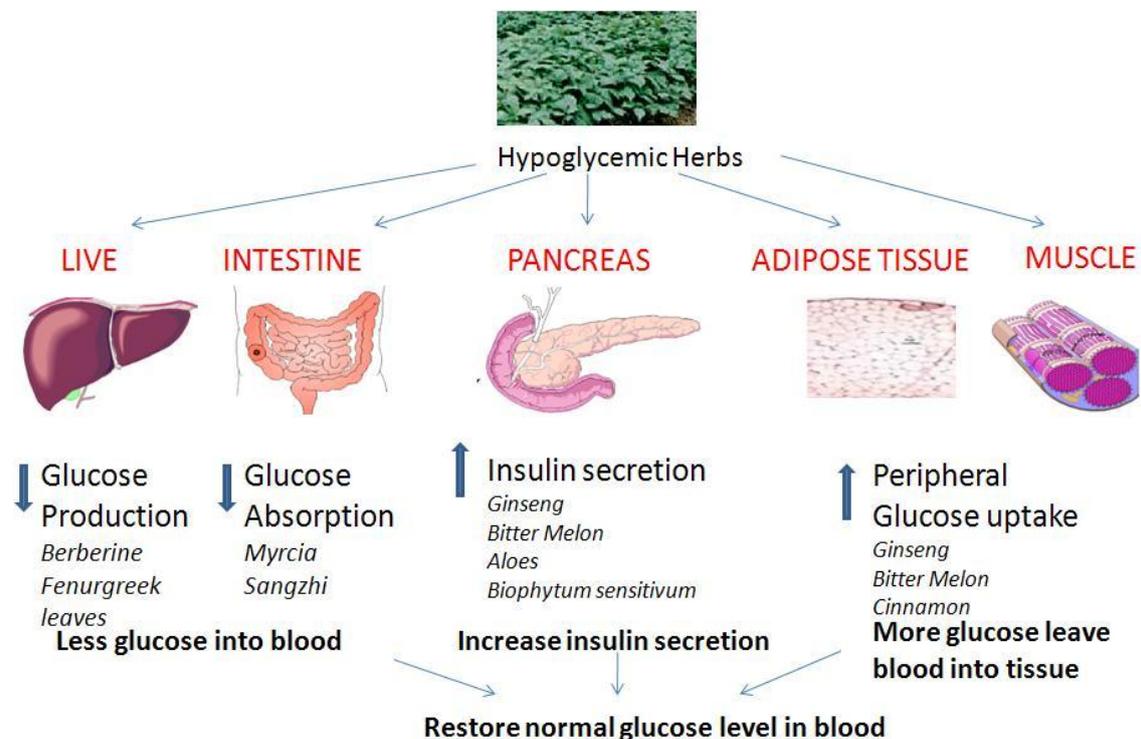


Figure 2 : Les différents sites d'actions de plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète sucré.

Le premier but dans le traitement du diabète sucré est la diminution du taux du glucose dans le sang. Pour atteindre ce but, les plantes peuvent agir selon trois modalités. La première consiste à la diminution de l'apport du glucose dans le sang, et cela est possible soit par l'inhibition de la production hépatique du glucose (origine endogène du glucose), soit par la diminution de l'absorption intestinale du glucose (origine exogène du glucose).

La deuxième modalité consiste à une augmentation de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques notamment le muscle. Enfin la troisième concerne la stimulation de la sécrétion de l'insuline (**Hui et al., 2009**).

Dans le tableau n°3 nous avons cité quelques travaux réalisés sur quelques plantes sélectionnées de l'étude ethnopharmacologique réalisée dans la région de l'ouest Algérien par Azzi et al., 2012. Différents extraits bruts ont été préparés à partir de ces plantes, et puis administrés à des doses bien appropriées, à des animaux notamment le rat et la souris. Un diabète expérimental a été induit à fin de reproduire l'état pathophysiologique des diabétiques. Le mécanisme d'action qui clarifie en partie l'activité antidiabétique de ces plantes est aussi cité.

Tableau n°3 : Quelques plantes antidiabétiques testées chez des animaux de laboratoire et leur mécanisme d'action possible.

Nom scientifique	Famille	Nom vernaculaire	Partie utilisée	Extrait (dose, voie, durée du traitement)	Les animaux utilisés	Mécanisme d'action possible	Références
<i>Trigonella foenum graecum L.</i>	<i>Leguminosae</i>	Halba	Graines	Extrait méthanol (0.5g/kg, PO, 28j)	Rats diabétiques (STZ, 65mg/kg i.p)	-Augmentation du glycogène hépatique. -Stimulation du transport du glucose dans l'adipocyte. -Diminution de la digestion des glucides.	Hannan et al., 2007.
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Yazir	Feuilles	Extrait éthanol (20mg/souris, 21jours)	Souris normales non diabétiques	Inhibition de l' α -glucosidase.	Koga et al., 2006.
<i>Citrullus colocynthis (L.) Schrad.</i>	<i>Cucurbitaceae</i>	Handal	Graines	Extrait aqueux (5ml/kg i.p, 14j)	Rats diabétiques (STZ , 65mg/kg i.p)	Action Insulinotropique.	Benariba et al., 2009. Benariba et al., 2013.
<i>Artemisia herba-alba Asso.</i>	<i>Astéraceae</i>	Chih	Feuilles	Extrait eau-éthanol (390mg/kg, PO, 60 jours)	Rats diabétiques (alloxane 120mg/kg.i.p)	Prévention de l'insulinorésistance.	Hamza et al., 2010. Awad et al., 2011
<i>Nigella sativa L.</i>	<i>Ranunculaceae</i>	Sanoudj	Graines	Extrait aqueux (2ml/kg, 5% i.p, 30 j) Thymoquinone (0.3mg/ml i.p, 30j)	Rats diabétiques (STZ , 50mg/kg i.p)	-Inhibition de la néoglucogénèse. - Amélioration de la structure cellulaire et subcellulaire des cellules β -pancréatiques.	Abdelmeguid et al., 2010.
<i>Zingiber officinale L.</i>	<i>Ginger Zingiberaceae</i>	Zenjabil	Rhizomes	Jus (4ml/kg, PO 6 semaines)	Rats diabétiques (STZ ,45m .i.v)	Augmentation de la sécrétion de l'insuline	Akhani et al., 2004.

De même beaucoup de travaux ont été réalisés sur des molécules purifiées issues de plantes à activité antidiabétique, les structures chimiques de ces molécules ont été bien déterminées. Pour élucider quelques exemples prenons tout d'abord le S-méthyle cystéine sulfoxyde (Figure 3) ; un acide aminé isolé de la pulpe d'*Allium cepa* L. Des expériences ont montré qu'une administration quotidienne de l'acide aminé à une dose de 200mg/kg, durant 45 jours, a significativement diminué l'hyperglycémie des rats rendus diabétiques par l'alloxane, cette diminution a été comparable à celle observée avec le glibenclamide et l'insuline chez les mêmes animaux (**Kumari et al., 1995**). D'autre part des travaux ont été menés sur l'étude du mécanisme d'action possible de l'acide aminé en question, ainsi Kumari et al. (1995) ont proposé que l'acide aminé agit en améliorant l'activité des enzymes hépatiques, notamment l'héxokinase et la glucose 6-phosphatase. Dans un autre travail plus récent, la même équipe a aussi proposé un effet sur l'amélioration de la sécrétion de l'insuline chez les animaux diabétiques (**Kumari et Augusti, 2002**).

Un autre acide aminé qui mérite aussi d'être mentionné, est celui qui a été isolé des graines de *Trigonella foenum graecum* L, le 4-Hydroxyisoleucine (Figure 3). Cet acide aminé a montré une action directe sur les îlots de Langerhans isolés du rat et de l'homme, en stimulant la sécrétion de l'insuline induite par le glucose (**Sauvaire et al., 1998**). Le même acide aminé a également montré une amélioration de la tolérance orale au glucose chez le rat et le chien (**Broca et al., 1999**). En outre des dérivés ont été préparés à partir du 4-hydroxyisoleucine et ont montré un effet dans la stimulation du transport du glucose dans les cellules musculaires squelettique L-6, chose remarquable, que cet effet a été plus important que celui du composé parental (**Korthikunta et al., 2015**).

De même d'autres mécanismes d'actions ont été proposés pour d'autres molécules isolées de plantes, par exemple l'acide ursolique (Figure 3), un triterpène isolé de *Rosmarinus officinalis* L, qu'est actif comme antidiabétique par l'augmentation de la translocation des vésicules de l'insuline, la sécrétion de l'insuline et l'augmentation du contenu du glycogène musculaire soléaire (**Castro et al., 2015**). Quant à leurs dérivés synthétiques, leur activité a été bien évidente dans l'inhibition de l' α -glucosidase et d'une façon plus importante que l'acarbose (**Wu et al., 2014**). Nous pouvons également citer la mangiférine (Figure 3), et son glycoside la mangiferin-7-O-beta-glucoside, isolés de *Anemarrhena asphodeloides* (Bunge), qui selon Ichiki et ces collaborateurs, ces deux

molécules peuvent agir en augmentant la sensibilité des tissus à l'insuline (**Ichiki et al., 1998**). Notons aussi le lophenol (Figure 3) un phytostérol isolé de *Aloe vera L.*, qui selon des travaux, il peut stimuler le catabolisme du glucose et supprimer la production de novo du glucose par la réduction des enzymes de la néoglucogenèse (**Misawa et al., 2012**). Enfin citons l'exemple de l'acide férulique (Figure 3) isolé de *syzygium cumini L.* et qui pourrait jouer un rôle dans la régénération des cellules β -pancréatiques (**Mandal et al., 2008**).

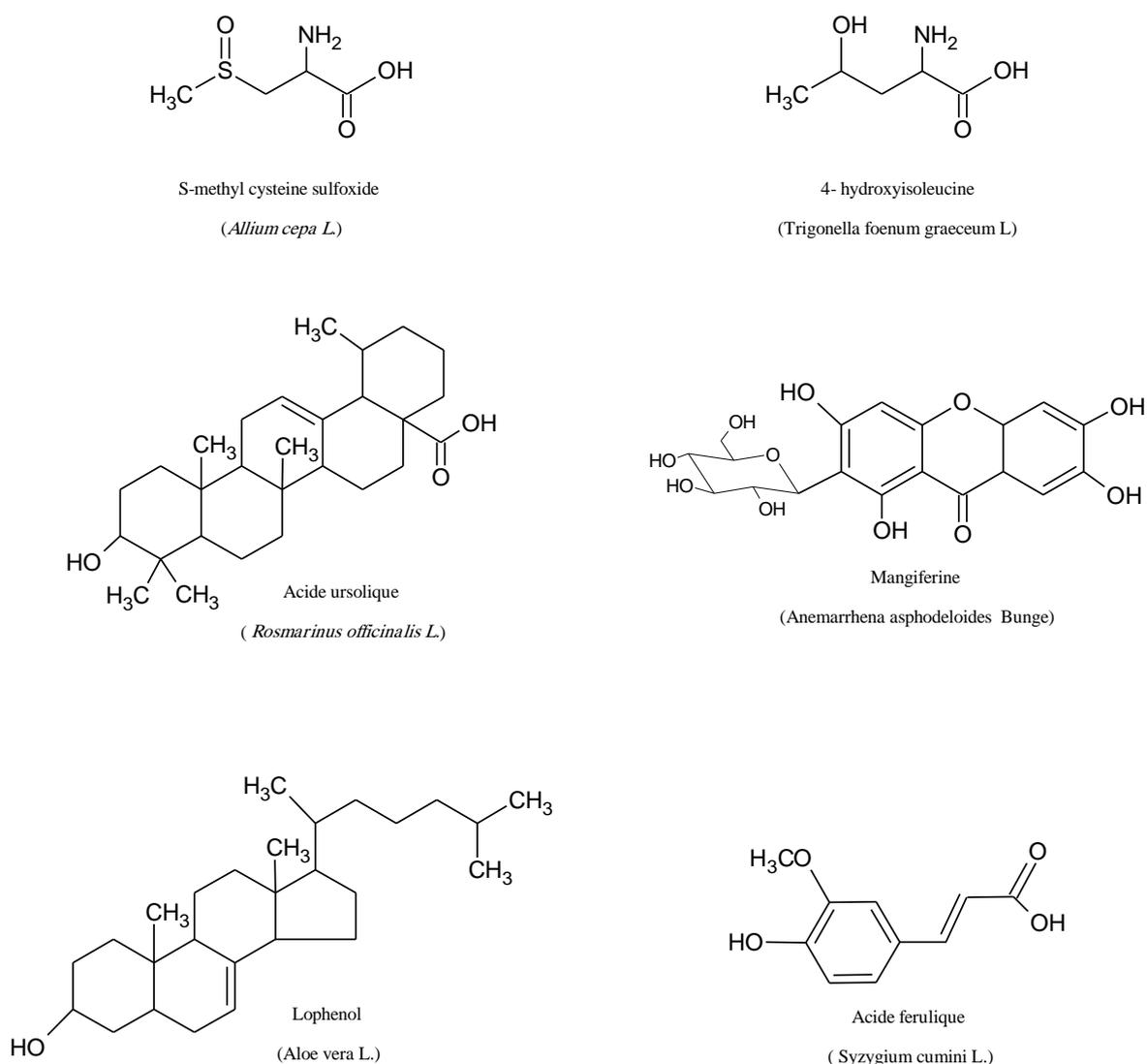


Figure 3 : Les structures chimiques de quelques molécules à activité antidiabétique, isolées à partir de plantes.

6. *Hammada scoparia*

6.1. Position systématique

Règne : Végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Ordre : Caryophyllales

Famille : Amaranthaceae

Genre : *Hammada*

Espèce : *H. scoparia*



Figure 4 : *Hammada scoparia* (POMEL) ILJIN

Hammada scoparia (POMEL) ILJIN = *Arthrophytum scoparium* (POMEL) ILJIN = *Haloxylon articulatum* subsp. *scoparium* (POMEL) BATT. = *Haloxylon scoparium* POMEL (*Chenopodiaceae*), appartient à la famille des *Amaranthaceae*, qui est composée de 800 espèces répartis sur 75 genres. C'est un arbrisseau à tiges grêles, très nombreuses, qui noircissent en séchant, avec des épis floraux courts, des fruits à ailes vivement colorées, souvent rose ou rouge. C'est une plante qui se trouve dans les régions arides et semi-arides de l'Algérie, et d'autres régions de la méditerranée, et aussi en proche orient.

6.2. Phytochimie

La composition chimique de *H. scoparia*, a été bien étudiée, les structures des principaux métabolites secondaires ont été identifiées. C'est une plante surtout très riche en alcaloïdes et en flavonoïdes. Les principales molécules isolées et identifiées sont montrées dans le tableau n°4.

Tableau n° 4 : La composition chimique de *Hammada scoparia*.

Métabolites secondaires	Classe	Nom chimique	Références
Alcaloïdes	Tétrahydroisoquinolines	- Carnéguine - N-méthylisosalsoline	Benkrief et al., 1989. El-Shazly, 2003.
	Isoquinolines	-Isosalsoline -Salsolidine -Dehydrosalsolidine	
	Indole	-Tryptamine -N-méthyltryptamine	
	Isoquinolone	N-méthylcorydaldine	
	β-carboline	2-Méthyl-1,2,3,4- tétrahydro-β-carboline	
Composés phénoliques	Flavonol triglycosides	Isorhamnetin 3-O-β -D-xylopyranosyl-(1'''→3''')-α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→6''')-β -D galactopyranoside	Ben Salah et al., 2002.
		Isorhamnetin 3-O-β-D-apiofuranosyl-(1'''→2'')[α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→6''')]-β -D-galactopyranoside	
		Isorhamnetin3-O-α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→2'') [α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→6''')]-β -D-galactopyranoside	
	Flavone	Chrysoeriol	Chao et al., 2013.
	Phénol simple	Catéchol	
	Acides phénols	-Acide coumarique -Acide cinnamique -Acide cafféoylquinique	

6.3. Activité biologique

Hammada scoparia appartient à un groupe de plantes appelées les halophytes. Ces plantes ont la capacité de croître dans des conditions de stress abiotique comme la haute salinité et la haute température. Cette capacité remarquable résulte du développement de mécanismes de défense et la synthèse de molécules conçues pour résister aux conditions extrêmes de l'environnement. De ce fait ces plantes sont très riches en molécules bioactives, et sont considérées comme une potentielle source de nouveaux médicaments (Ksouri et al., 2012).

H. scoparia est connue sous le nom vernaculaire de « Remth » en Algérie, Maroc et en Tunisie. C'est une plante utilisée en médecine traditionnelle comme remède pour le traitement des désordres de l'œil et de la vision, des maladies de la peau, du diabète sucré (Bellakhdar, 1997 ; Allali et al., 2008) et de l'hypertension (Eddouks et al., 2002), mais aussi pour le traitement du cancer, des hépatites, des inflammations, et de l'obésité. En revanche, plusieurs travaux ont été réalisés sur différents extraits de *H. scoparia*, et différentes activités biologiques ont été prouvées. Des extraits aqueux et méthanolique, administrés à des rats traités par l'éthanol, ont diminué d'une façon importante, le stress oxydative et l'altération hépatique engendrés par la toxicité de l'éthanol (Bourogaa et al., 2013 ; Bourogaa et al., 2014). Ces activités hépato-protective et antioxydante, ont été reliées à la présence de composés phénoliques dans la plante (Bourogaa et al., 2014). De plus dans un autre travail, l'équipe de Bourogaa a aussi démontré que *H. scoparia* est efficace contre les cellules leucémiques, et les molécules responsables sont les flavonols triglycosides (Bourogaa et al., 2011). D'autre part *H. scoparia* s'est révélée aussi puissante contre les mollusques, plusieurs extraits ont été testés, et leur activité molluscicide a été prouvée. Ces travaux ont aussi identifié la molécule ayant la plus importante activité, il s'agit d'un alcaloïde, le N- methylisosalsoline (Mezghani-Jarraya et al., 2009). Récemment un extrait éthanolique de *H. scoparia*, a montré une activité d'inhibition de la mélanogénèse *in vitro*, cette activité a été attribuée au catéchol et à des dérivés tétrahydroisoquinoliniques (Chao et al., 2013).

CHAPITRE 1 : Etude phytochimique

de Hammada scoparia

-Matériel et méthodes

-Résultats et interprétation

-Discussion

1. Matériel végétal

Hammada scoparia (Pomel), a été récoltée dans la région d'Ain Sefra en automne et identifiée par Madame Sakkal F.Z. Un voucher spécimen enregistré sous le numéro de LVE748, a été déposé au laboratoire d'écologie végétale, Es Senia, université d'Oran. La partie aérienne de la plante a été séchée au laboratoire à l'ombre, et a été broyée en fine poudre à l'aide d'un broyeur électrique et stockée soigneusement jusqu'à son utilisation.

2. Etude phytochimique de *Hammada scoparia*

2.1. Les composés phénoliques

2.1.1. Dosage des polyphénols par la méthode de Folin et Ciocalteu

▪ Principe

Le réactif de Folin et Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleu de tungsten (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), la coloration bleue (725 -760nm) est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits des végétaux (Singleton et al., 1999).

▪ Préparation de l'échantillon (extrait de plante)

0,5 g de la plante finement broyée ont été introduits dans 10ml d'un mélange méthanol-eau (80/20, V/V) à 40°C pendant 24h sous agitation. Après refroidissement la préparation a été centrifugée (4500 rpm /15 min). Le surnageant ainsi obtenu a été utilisé pour le dosage des polyphénols totaux.

▪ Mode opératoire

Le tableau n°5 résume le mode opératoire et les différentes étapes utilisées dans le dosage des polyphénols, qui sont :

- 1ml de l'échantillon est mélangé avec 5ml du réactif de Folin et Ciocalteu dilué au 1/10. Le mélange est bien agité, et laissé à la température ambiante pendant 4 min.
- 4ml d'une solution de carbonate de sodium ($NaCO_3$) à 7.5 % sont ensuite ajoutés au mélange avec agitation. Le mélange est laissé incubé à la température ambiante pendant 4h.

- La lecture de l'absorbance est réalisée à 750 nm contre un tube blanc.
- Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations croissantes (96, 192, 288, 384, et 480 µg/ml).

Tableau n° 5: Mode opératoire du dosage des polyphénols dans *H. scoparia*.

Concentration de l'acide gallique (µg/ml)	0	96	192	288	384	480	—
Volume de l'acide gallique (ml)	1	1	1	1	1	1	—
Volume de l'extrait (ml)	—	—	—	—	—	—	1
Réactif de Folin et Ciocalteu (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Incubation pendant 4 min à température ambiante							
Carbonate de sodium (NaCO ₃) à 7.5% (ml)	4	4	4	4	4	4	4
Incubation pendant 4 h à la température ambiante							
Mesure de la DO à 750 nm.							

- La concentration des polyphénols totaux présents dans notre extrait de plante, exprimée en mg équivalent d'acide gallique / g de la plante est calculée selon la formule suivante:

$$[\text{Polyphénols}] = 2 a f$$

a: concentration des polyphénols (µg/ml) déterminée à partir de la courbe étalon.

f: facteur de dilution.

2.1.2. Extraction et analyse des flavonoïdes

▪ Principe d'extraction

Les flavonoïdes sont des molécules principalement solubles dans l'eau, ils peuvent être extraits par les alcools. Dans des extractions par des solvants de lipides, ils restent dans la phase aqueuse (Harbone, 1998). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui contiennent des noyaux aromatiques conjugués, qui leur permettent d'avoir une absorption intense dans la région de l'ultraviolet et du visible, et de changer de couleur en présence de solution alcaline. (Harbone, 1998 ; Wagner et Bladt , 2009).

- **Méthode d'extraction**

10 g de la plante en poudre ont été macérés dans 100 ml d'un mélange méthanol – eau (80/20, V/V), pendant 24h. Après la filtration et l'évaporation du solvant organique, une série d'extraction liquide-liquide a été réalisée en utilisant différents solvants à polarité croissante : l'hexane, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les phases acétate d'éthyle et n-butanol susceptibles de contenir des flavonoïdes, ont été concentrées à sec au rotavapor, pour donner les extraits A_F (à partir de la phase acétate d'éthyle) et B_F (à partir de la phase n-butanol) (**Ben Salah, 2002**).

- **Analyse par chromatographie en couche mince (CCM)**

Après la confirmation de la présence des flavonoïdes dans les extraits A_F et B_F par le test de Shinoda (HCl + Mg⁺⁺). Une CCM a été réalisée sur une plaque de gel de silice fluorescent (254nm) et préalablement activé (1h 30min dans une étuve à 70°C). A noter que les extraits A_F et B_F ont été solubilisés dans le méthanol. Le système de migration utilisé était un mélange du n-butanol – eau – acide acétique, dans les proportions volumiques suivantes 4/1/5 (**Harbone, 1998**).

Après développement de la plaque, une révélation des taches a été réalisée en utilisant les propriétés des flavonoïdes d'absorber à l'UV et au visible, et leur réaction vis-à-vis des bases comme la soude (NaOH 5%), (tableau n°6), (**Harbone, 1998 ; Wagner et Bladt, 2009**).

Tableau n°6 : Méthode de révélation des flavonoïdes en CCM.

Révélation	Comportement des flavonoïdes	Références
UV 254 nm	Fluorescence (Quenching prononcé)	Harbone, 1998. Wagner et Bladt, 2009.
UV 365 nm	Fluorescence jaune sombre, verte ou bleue qui s'intensifie en présence des bases.	

A noter aussi que des acides phénols et des coumarines sont généralement extraits avec les flavonoïdes et ils donnent des fluorescences bleues (**Blad et Wagner, 2009**).

2.1.3. Extraction et analyse des phénols simples et des acides phénols

▪ Principe d'extraction

Les phénols et les acides phénols sont généralement étudiés ensemble, leur méthode d'extraction consiste à une hydrolyse acide ou alcaline du matériel végétal, afin de les libérer de leurs combinaisons avec les autres métabolites. Une fois libérés, ils peuvent être facilement extraits par l'éther diéthylique (**Harbone, 1998**).

▪ Méthode d'extraction

10 g de la plante en poudre ont été mis à reflux dans 100 ml de HCl (2M) pendant 30 min. La solution a été refroidie et filtrée, est ensuite le filtrat a été extrait par l'éther diéthylique. La phase organique ainsi obtenue a été évaporée à sec au rotavapor, pour donner un extrait riche en phénols et acides phénols (**Harbone 1998**).

▪ Analyse par chromatographie en couche mince

L'extrait riche en phénols et acides phénols ainsi obtenu a été solubilisé dans l'éther diéthylique et analysé par une CCM sur une plaque de gel de silice fluorescent préalablement activé (1h 30min dans une étuve à 70°C). Le système de migration utilisé a été un mélange d'acide acétique-chloroforme dans les proportions 1-9 (V/V) respectivement, (**Harbone, 1998**). Après développement de la plaque, une révélation des taches a été réalisée sous UV à 254nm et 365 nm (**Harbone, 1998**).

2.2. Extraction et analyse des alcaloïdes totaux

▪ Principe d'extraction

Les alcaloïdes sont des composés qui contiennent au moins un azote, le plus souvent associé à un cycle. En présence des acides minéraux, comme l'acide chlorhydrique, les alcaloïdes forment des sels solubles dans l'eau, après l'addition d'une base, comme l'ammonium, ils se libèrent de leurs combinaisons salines, et deviennent insolubles dans l'eau, et solubles dans les solvants organiques apolaires, avec lesquels seront extraits (**Bruneton, 1999**).

▪ Méthode d'extraction

10 g de la partie aérienne de la plante (en poudre) ont été laissés macérer toute la nuit dans 100 ml d'un mélange éthanol – eau (80 – 20; V/V). Après filtration, le filtrat obtenu a été concentré dans un rotavapor sous pression réduite à une température de 40 °C, jusqu'à un volume de 1/10, puis ce dernier a été acidifié par l'acide chlorhydrique HCl (0,1M) jusqu'à pH égal 3. La phase aqueuse acide ainsi obtenue a été extraite ensuite par le dichlorométhane qui permet d'enlever les composés lipidiques, puis elle a été alcalinisée par une solution d'ammoniaque (NH₄OH) à 34% jusqu'à pH égal 10. Enfin, cette phase aqueuse basique a été extraite par le dichlorométhane (El-Shazly et Wink, 2003). La phase dichlorométhane ainsi obtenue a été évaporée à sec e pour donner un extrait d'alcaloïdes totaux de la plante.

▪ Analyse par chromatographie sur couche mince

Afin d'étudier la composition chimique de l'extrait d'alcaloïdes totaux, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur une plaque de gel de silice fluorescent, et préalablement activé (1h 30min dans une étuve à 70°C). Le système de migration est composé d'un mélange de chloroforme – méthanol – NH₄OH (25%), dans les proportions 9 – 1 – 0.5 (V/V) respectivement, (El-Shazly et Wink, 2003).

A noter que l'extrait d'alcaloïdes, a été dilué dans le dichlorométhane à froid (4%, g/ml). Après développement de la plaque, une révélation des taches a été réalisée en utilisant les propriétés spectrales des alcaloïdes et leurs réactions vis-à-vis des différents réactifs chimiques (tableau n°7) et la comparaison avec les données bibliographiques.

Tableau n° 7: Méthode de révélation des alcaloïdes en CCM.

Révélation	Type d'alcaloïdes possibles	Références
Réactif de Dragendorff	Tous les alcaloïdes	Harbone, 1998
Réactif de Salkowski	Indoles	Merck, 1975
UV 254 nm	les indoles et les isoquinolines (Quenching prononcé)	Wagner et bladt, 2009

2.3. Les saponosides

2.3.1. Détermination de l'indice de mousse

▪ Principe

L'indice de mousse est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue qui, dans des conditions déterminées, donne une mousse persistante (ANSM, 1989).

▪ Préparation de l'échantillon (extrait de plante)

Une décoction à 1%, a été préparée à partir d'un échantillon finement broyé de *H. scoparia*. Après ébullition de 30 min la solution a été filtrée sous vide et a été ajustée à 100 ml dans une fiole jaugée.

▪ Mode opératoire

- Différentes dilutions de la solution aqueuse ainsi préparée sont réalisées dans des tubes à vis bien propres.

- Chaque tube est agité dans le sens de la longueur pendant 15 s, à raison de deux agitations par seconde, la mesure de la hauteur de la mousse est réalisée après 15 min de repos.

- Si la hauteur de la mousse est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est inférieur à 100.
- Si la hauteur de la mousse est de 1 cm dans l'un des tubes, la dilution de la drogue dans ce tube est l'indice de mousse cherché. $I = \frac{1000}{N}$ (N : le numéro du tube).
- Si la hauteur de la mousse est supérieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est supérieur à 1000. Il faut donc diluer le décocté et recommencer la détermination de l'indice de mousse. (ANSM, 1989).

2.3.2. Extraction et analyse des saponosides

▪ Principe d'extraction

Les saponosides sont des glycosides, qui sont des composés polaires facilement extraits par les alcools, de préférence après dégraissage de la poudre de la plante. Après extraction, les saponosides peuvent être précipités par l'éther diéthylique (Shaker et al., 2003).

- **Méthode d'extraction**

10 g de la poudre de la plante, ont été épuisés successivement dans un appareil de Soxhlet, par l'hexane, puis le méthanol. L'extrait méthanolique a été ensuite concentré puis additionné d'une quantité d'eau. Les saponosides sont ensuite extraits par le n-butanol, puis précipités par l'éther diéthylique (Shaker et al., 2003). Après, le précipité a été récupéré, et évaporé à sec pour donner un extrait de saponosides.

- **Analyse par chromatographie en couche mince**

L'extrait des saponosides ainsi obtenu a été solubilisé dans l'éther diéthylique, une CCM a été réalisée sur une plaque de gel de silice fluorescent préalablement activé (1h 30min dans une étuve à 70°C). Le système de migration utilisé était un mélange de chloroforme – méthanol – eau, dans des proportions de 13 – 7 – 2 (V/V) respectivement. La révélation des taches a été réalisée en utilisant les vapeurs d'iode et le réactif de Liebermann et Burchard (Van Atta et Guggolz, 1958).

2.4. Dosage des sucres réducteurs par la méthode du Dubois

- **Principe**

En milieu acide et à chaud, les liaisons glucosidiques des hydrocarbures sont hydrolysées et les oses simples sont ainsi libérés. Ces oses subissent une déshydratation intramoléculaire pour donner des dérivés furfuraux. La fonction aldéhyde des furfuraux se condense ainsi en milieu acide avec l'hydrolyse d'un composé phénolique pour donner des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent dans le visible (450 nm à 500 nm)(Dubois et al., 1956).

- **Préparation de l'échantillon (extrait de plante)**

5 g de la plante finement broyés ont été placés dans 100 ml d'eau distillée froide et agités pendant 30 min, puis laissés macérer pendant 24 h. A la fin les extraits ont été filtrés et laissés dans des flacons dans le réfrigérateur. Pour faire le dosage, une dilution de 1/20 de l'échantillon est nécessaire.

▪ Mode opératoire

Le tableau n°8, résume le mode opératoire et les différentes étapes utilisées dans le dosage des sucres totaux dans *H. scoparia*, qui sont:

- 1ml de l'échantillon sont mélangés avec 1ml de phénol à 5% et sont bien agités.
- 5ml d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) sont ensuite ajoutés, et le mélange est laissé incubé à l'obscurité pendant 30 min (dans ces conditions, la température atteint 110°C).
- La lecture de l'absorbance est réalisée à 490 nm contre un tube blanc. La DO obtenue est corrigée en éliminant l'absorbance de l'extrait.

Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant le glucose comme contrôle positif à différentes concentrations croissantes (0.05, 0.1, 0.10, 0.2, 0.25, 0.30, 0.35 et 100 mg/ml).

Tableau n° 8 : Mode opératoire du dosage des sucres totaux dans *H. scoparia*.

Concentration du glucose (mg/ml)	0	0.05	0.1	0.20	0.25	0.30	0.35	100	—
Volume du glucose ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	
Volume de l'extrait (ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Phénol à 5%(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ SO ₄ concentré (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité									
Mesure de la DO à 490 nm									

- Le pourcentage des sucres totaux contenus dans la partie aérienne de la plante est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Sucres totaux (\%)} = \frac{100}{5} a f$$

a: concentration des sucres réducteurs (mg/ml) déterminée à partir de la courbe étalon.

f: facteur de dilution.

100/5: facteur utilisé pour trouver la quantité des sucres dans 100 g de la plante.

3. Préparation des extraits

Afin d'évaluer l'activité antidiabétique de la partie aérienne de *H. scoparia*, l'approche utilisée consiste à faire des extractions différentes en utilisant des solvants de polarité différente. La première extraction consiste à une extraction solide-liquide, des décoctés et des macéras de la plante ont été préparés, l'extrait le plus actif a été aussi fractionné par une extraction liquide-liquide. Afin d'augmenter le rendement et l'efficacité des extractions, l'appareil de soxhlet a été utilisé. Enfin un fractionnement sur colonne de silice a été aussi réalisé, dans un but d'obtenir des fractions plus purifiées.

Chaque extrait (ou fraction) obtenu a été étudié par des tests phytochimiques et par une chromatographie en couche mince, dans un but de révéler leurs compositions chimiques possibles.

3.1. Préparation de l'extrait aqueux (EA)

10 grammes de la plante en poudre ont été épuisés à l'eau chaude sous reflux pendant 1 heure, après refroidissement le mélange a été filtré sous vide, le filtrat ainsi obtenu a été évaporé à sec à sec dans une étuve à une température de 40°C, pour donner un extrait aqueux (EA).

3.2. Préparation de l'extrait eau-éthanol (EE)

10 g de la plante en poudre ont été introduits dans un mélange eau-éthanol (20-80 ; V/V). L'ensemble a été laissé macérer toute la nuit à la température ambiante, après filtration, le filtrat a été évaporé à sec dans un rotavapor à 40°C, pour donner un extrait eau-éthanol (EE).

3.3. Préparation de l'extrait eau-méthanol (EM)

10 g de la plante en poudre ont été introduits dans un mélange eau-méthanol (20-80 ; V/V). L'ensemble a été laissé macérer toute la nuit à la température ambiante, après filtration, le filtrat a été évaporé dans un rotavapor à 40°C, pour donner un extrait eau-méthanol (EM).

3.4. Préparation des extraits hexane(EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B)

10 g de la plante en poudre ont été introduits dans un mélange eau-méthanol (20–80 ; V/V). L'ensemble a été laissé macérer toute la nuit à la température ambiante, après filtration, le filtrat a été concentré au rotavapor jusqu'à élimination du méthanol. La phase aqueuse ainsi obtenue a été épuisée successivement par une série d'extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante: l'hexane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les phases hexane, acétate d'éthyle et n-butanol ont été évaporées à sec au rotavapor, pour donner les extraits hexane (EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B) successivement.

3.5. Préparation des extraits hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAcs) et méthanol (EMs) par épuisement de la matière végétale au soxhlet

100 g de la plante en poudre, ont été placés dans une cartouche de cellulose préalablement pesée, l'ensemble a été introduit dans un soxhlet et la poudre a subi une série d'extractions successives en utilisant des solvants à polarité croissante: l'hexane (24h), le dichlorométhane (16h), l'acétate d'éthyle (12h) et le méthanol (24h). Chaque solvant a été évaporé à sec dans un rotavapeur, pour donner les extraits suivants: hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAcs) et méthanol (EMs).

« s, signifie des extraits obtenus par appareil de soxhlet.»

3.6. Fractionnement de l'extrait méthanol (EMs) par chromatographie sur colonne de gel de silice

L'extrait méthanol (EMs), obtenu par épuisement de la matière sèche dans l'appareil de soxhlet a été fractionné sur colonne ouverte de gel de silice (Kieselgel 60, 70-230 mesh). La phase mobile utilisée pour l'élution était un mélange de deux solvants, le dichlorométhane et le méthanol dans des proportions différentes. La collection des différentes fractions a été réalisée dans une série de tubes à essais. Le débit de la phase mobile et le volume des fractions ont été ajustés durant toute l'expérience. L'identification du contenu de chaque tube a été réalisée par chromatographie sur couche mince [gel de silice fluorescent F₂₅₄ 250µm, Whatman Backing], le solvant de migration utilisé est un

mélange à volume égaux de méthanol et du dichlorométhane. Les tubes qui ont montré des taches avec les mêmes Rf ont été réunis et évaporés à sec.

4. Screening phytochimique

4.1. Flavonoïdes

1ml de chaque extrait a été traité par quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques tournures de magnésium, l'apparition d'une coloration rouge, orange ou jaune indique la présence des flavonoïdes (**Malec et Pomilio, 2003**).

4.2. Tannins

10ml de chaque extrait a été traité par quelques gouttes de chlorure ferrique (1%), le développement de coloration bleu, bleu noir ou vert indique la présence de tannins (**Karumi, 2004**).

4.3. Quinones

1 ml de chaque extrait, a été traité par quelques gouttes d'une solution de soude à 10%, l'apparition d'une coloration jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones (**Oloyede, 2005**).

4.4. Saponosides

5ml de chaque extrait ont été dilués avec 5ml d'eau distillée, ensuite bien agités. L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponosides .

4.5. Stéroïdes

1ml de chaque extrait a été concentré dans une étuve, le résidu ainsi obtenu a été solubilisé dans 1ml anhydride acétique, puis quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutées. L'apparition d'une coloration bleu vert indique la présence des tri - terpènes et stéroïdes.

4.6. Alcaloïdes

Un volume d'extrait alcoolique est évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris par 5 ml d'HCl à 5N, et est chauffé dans un bain Marie. Après refroidissement et filtration,

le filtrat est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Wagner¹ l'autre par le réactif de Mayer². La formation de turbidité ou précipité indique la présence des alcaloïdes (Mojab, 2003).

¹**Réactif de Wagner** : 2 g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée.

²**Réactif de Mayer** : 5 g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

4.7. Sucres réducteurs

1 ml de chaque extrait a été traité par quelques gouttes de la liqueur de Fehing (A et B), après chauffage, la formation d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres réducteurs.

1. Etude phytochimique de *Hammada scoparia*

1.1. Les composés phénoliques

1.1.1. Dosage des polyphénols (méthode de Folin et Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols a été effectué par la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin et Ciocalteu, le résultat obtenu a été déduit à partir de la courbe étalon tracée dans la figure 5 et a été exprimé en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la plante (mg eq AG/ g de plante).

La partie aérienne de *H. scoparia* contient une quantité de polyphénols égale à 36,54 mg équivalent d'acide gallique par gramme de plante.

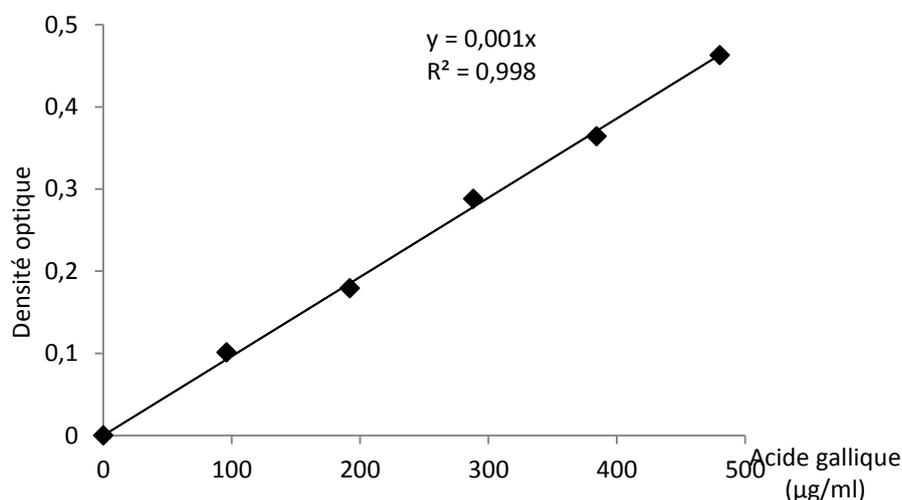


Figure 5 : Courbe étalon de l'acide gallique ($\lambda=750\text{nm}$)

1.1.2. Caractérisation des flavonoïdes par CCM

La partie aérienne de *Hammada scoparia*, contient un taux de 0.3 % (g/g) d'extrait d'acétate d'éthyle noté A_F et 3.88 % (g/g) d'extrait d'alcool butylique noté B_F . Les deux extraits sont solubles dans l'eau et le méthanol, et donne un test positif avec le réactif de Shinoda. L'analyse chromatographique en couche mince a révélé la présence de 6 taches à R_f différents (tableau n°9); A_{F1} , B_{F3} et B_{F4} représentent les caractéristiques des flavonoïdes (absorption sous UV et au visible, et changement de coloration suite à un traitement par une base). Le composé A_{F2} pourrait être un pigment, alors que les composés B_{F1} et B_{F2} sont probablement des acides phénols ou des coumarines, car ils sont fluorescents à 365 nm.

Tableau n°9 : Caractéristiques de l'extrait de flavonoïdes, et analyse chromatographique.

Fraction	Rendement (%)	Aspect physique	Test de Shinoda	Analyse chromatographique					
				Rf		Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	NaOH 5%
A _F	0.3	Poudre Jaune orange	+	A _{F1}	0.69	Rose-rouge	Abs	Mauve	+
				A _{F2}	0.78	jaune	-	-	-
B _F	3.88	Poudre jaune clair	+	B _{F1}	0.23	-	-	Bleu	-
				B _{F2}	0.44	-	-	Bleu	-
				B _{F3}	0.59	Jaune	-	Bleu foncé	+
				B _{F4}	0.68	jaune	Abs	mauve	+

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

1.1.3. Caractérisation des phénols et des acides phénols par CCM

Hammada scoparia contient 1% (g/g), de phénols et d'acides phénols. La chromatographie sur couche mince nous a permis de mettre en évidence 3 composés qui absorbent à 254 nm (tableau n°10), qui sont le plus probable des phénols simples ou des acides phénols (C₆-C₁), et 4 autres composés qui sont fluorescents (bleu et mauve) à 365 nm et qui sont le plus probable des acides phénols (C₆-C₃).

Tableau n°10: Caractéristiques de l'extrait brut en phénols et acides phénols, et analyse chromatographique.

Extrait	Rendement (g/g)	Aspect physique	Analyse chromatographique		
			Rf	UV 254nm	UV 365 nm
Phénols et acides phénols	1	Poudre Jaune vert	0.075	Abs	-
			0.10	-	Mauve
			0.16	Abs	-
			0.24	-	Mauve
			0.39	-	Bleu
			0.62	-	Bleu
			0.71	Abs	-

(-) Réaction négative.

1.2. Caractérisation des alcaloïdes par CCM

Hammada scoparia s'est révélée riche en alcaloïdes, avec un rendement de 5.2 % (g/g). Cet extrait a un aspect visqueux, de couleur rouge marron, et d'une odeur désagréable, qui témoigne de la présence des amines tertiaires. Le chromatogramme, nous a permis de révéler 5 taches à Rf différents (tableau n°11). Ces 5 taches ont réagi avec le réactif de Dragendorff, réactif universel des alcaloïdes, elles ont aussi donné un quenching prononcé à 254 nm, ce qui nous laisse à suggérer l'existence des indoles et des isoquinolines. A l'inverse de tous ces composés, le composé 1 a réagi positivement avec Salkowski, réactif spécifique des indoles.

En regroupant ces différentes données, nous pouvons conclure que l'extrait d'alcaloïdes, contient deux classes majeures en alcaloïdes, les isoquinolines et les indoles.

Tableau n°11 : Caractéristiques de l'extrait brut en alcaloïdes, et analyse chromatographique.

Extrait	Rendement %(g/g)	Aspect physique	Analyse chromatographique			
			Rf	UV 254nm	Réactif de Dragendorff	Réactif de Salkowski
Extrait brut d'alcaloïdes	5.2	-Résidu visqueux -rouge marron -Odeur désagréable	0.14	Mauve	+	Violet
			0.24	Mauve	+	-
			0.37	Mauve	+	-
			0.45	Mauve	+	-
			0.73	Bleu	+	-

(+) réaction positive. (-) réaction négative.

1.3. Les saponosides

1.3.1. Détermination de l'indice de mousse

A partir du tableau n°12, qui représente les différentes dilutions réalisées sur l'extrait aqueux de *Hammada scoparia*, et les hauteurs correspondantes, on a pu déduire l'indice de mousse de notre plante, qui est égal à 500. Ce résultat montre bien la richesse de *Hammada scoparia* en saponosides.

Tableau n° 12: Hauteur de la mousse dans les différents tubes dilués à partir de l'extrait aqueux de *H. scoparia*.

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dilution de la plante	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10
Hauteur de la mousse (cm)	0,3	0,7	1,5	1,7	2	2,2	2,4	2,4	2,4	3

1.3.2. Caractérisation des saponosides par CCM

L'extraction des saponosides, nous a permis d'obtenir un extrait en poudre de couleur jaune marron, avec un rendement de 5.4 % (g/g) de matière sèche. L'analyse sur chromatogramme, a révélé la présence de plusieurs taches, et qui peuvent être des stéroïdes ou des glycosides triterpéniques (tableau n°13).

Tableau n°13: Caractéristiques de l'extrait brut en saponosides, et analyse chromatographique.

Extrait	Rendement %(g/g)	Aspect physique	Analyse chromatographique		
			Rf	Vapeur d'iode	réactif Liebermann et Burchard
Extrait brut en Saponosides	5.4	Poudre Jaune marron	0.07	+	jaune
			0.11	+	Mauve
			0.14	+	Jaune
			0.49	+	Mauve

(+) Réaction positive.

1.4. Dosage des sucres réducteurs par la méthode du Dubois (1956)

Le dosage des sucres totaux a été effectué par la méthode du Dubois, qui utilise le phénol et l'acide sulfurique, le résultat a été déduit à partir de la courbe d'étalonnage tracé sur la figure 6. Il est exprimé en grammes de sucres totaux par 100 grammes de plante. *H. scoparia* contient une quantité de sucres totaux équivalente à 5,07 % de la matière sèche.

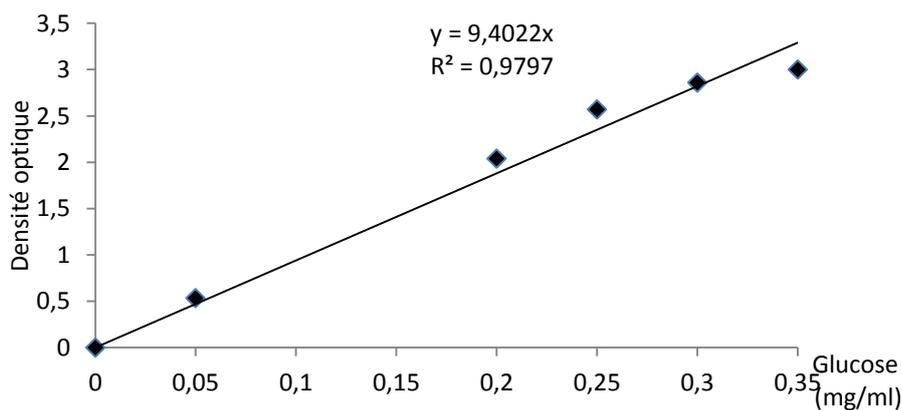


Figure 6 : Courbe étalon du glucose ($\lambda=490\text{nm}$).

2. Étude phytochimique et caractérisation des extraits aqueux (EA), eau-éthanol (EE) et eau-méthanol (EM)

La comparaison entre les extraits aqueux (EA), l'extrait eau-éthanol (EE) et l'extrait eau-méthanol (EM) illustrée dans le tableau n°14 montre bien le rôle de l'eau et de la chaleur dans l'augmentation du rendement de l'extraction exprimé en g d'extrait par 100 g de la plante en poudre. L'EA (pâte marron visqueuse) préparé à ébullition (100°C) montre un rendement de 27.9 % (g/g), presque deux fois plus important que celui de l'EE (pâte visqueuse marron vert) et de 1.5 fois plus important que celui de l'EM (pâte marron visqueuse), qui sont préparés à la température ambiante. Quant à la composition chimique en métabolites secondaires des trois extraits, deux différences sont observées, l'absence des flavonoïdes dans l'EA et l'absence des mucilages dans les deux extraits alcooliques (EE et EM).

Tableau n°14: Composition phytochimique de l'extrait aqueux (EA), l'extrait eau-éthanol (EE) et l'extrait eau-méthanol (EM)

Extraits	Aqueux (EA)	Eau-éthanol (EE)	Eau-méthanol (EM)
Rendement (%)	27.9	15.8	20.4
Aspect physique	Pate marron visqueuse	Pate visqueuse marron vert	Pate marron visqueuse
Solubilité optimale	Eau distillée	Tween 80 (0.8%)	Tween 80 (0.8%)
Tests phytochimiques			
Saponosides	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	+
Tannins	+	+	+
Flavonoïdes	-	+	+
Stéroïdes	+	+	+
Mucilages	+	-	-
Sucres réducteurs	+	+	+

(+)Présence. (-) Absence.

3. Étude phytochimique et caractérisation des extraits hexane (EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B)

La comparaison entre les extraits hexane (EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B) obtenus par extraction liquide-liquide illustrée dans le tableau n°15, montre bien que l'alcool butylique est plus efficace dans l'épuisement de la phase aqueuse en métabolites secondaires, le rendement de l'extraction (% , g/g) de l'En-B est 11 fois plus grand que celui de l'EAc, et 26 fois plus que celui de l'EH. La composition chimique montre bien que l'EH contient des stéroïdes et des quinones, l'EAc contient des alcaloïdes, des flavonoïdes et des sucres réducteurs, alors que l'En-B contient des saponosides, des alcaloïdes, des flavonoïdes et des sucres réducteurs.

Tableau°15: Composition phytochimique des extraits hexane (EH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B)

Extraits	Hexane (EH)	Acétate d'éthyle (EAc)	n-butanol (En-B)
Rendement (%) (g/g)	0.16	0.38	4.13
Aspect physique	Pate visqueuse verte	Poudre jaune	Poudre jaune marron
Solubilité optimale	Tween 80 (0.8%)		
Tests phytochimiques			
Saponosides	-	-	+
Alcaloïdes	-	+	+
Tannins	-	-	-
Flavonoïdes	-	+	+
Stéroïdes	+	-	-
Mucilage	-	-	-
Sucres réducteurs	-	+	+
Quinones	+	-	-

(+) Présence. (-) Absence.

4. Étude phytochimique et caractérisation des extraits hexane (EHs) dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAcS) et méthanol (EMs) obtenus par épuisement de la matière végétale par appareil de soxhlet

La comparaison entre les extraits hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAcS) et méthanol (EMs) obtenus par appareil de soxhlet est illustrée dans le tableau n°16. Les résultats montrent bien que le rendement de l'extraction est nettement très élevé avec EMs (16.6 ± 0.19 , g/g), qui est très riche en saponosides, alcaloïdes et flavonoïdes. L'EDs (2.92 ± 0.12 , g/g) contient des alcaloïdes et des stéroïdes, L'EHs (2.5 ± 0.36 , g/g) contient des stéroïdes et des quinones, et l'EAcS (1.9 ± 0.07 , g/g) contient des alcaloïdes et des sucres réducteurs.

Tableau°16 : Composition phytochimique des extraits hexane (EHs), dichlorométhane (EDs), acétate d'éthyle (EAcS) et méthanol (EMs).

Extraits	Hexane (EHs)	Dichlorométhane (EDs)	Acétate d'éthyle (EAcS)	Méthanol (EMs)
Rendement (%) (g/g)	2.5 ± 0.36	2.92 ± 0.12	1.9 ± 0.07	16.6 ± 0.19
Aspect physique	Pâte visqueuse verte	Poudre marron foncée	Pâte visqueuse vert marron	Poudre jaune marron
Solubilité optimale	Tween 80 (0.8%)			
Tests phytochimiques				
Saponosides	-	-	-	+
Alcaloïdes	-	+	+	+
Tannins	-	-	-	-
Flavonoïdes	-	-	-	+
Stéroïdes	+	+	-	-
Mucilage	-	-	-	-
Sucres réducteurs	-	-	+	-
Quinones	+	-	-	-

(+) Présence. (-) Absence.

5. Étude phytochimique et caractérisation des différentes fractions (FA→FD) obtenues par fractionnement de l'extrait méthanol (EMs) par chromatographie sur colonne de gel de silice

Le fractionnement de l'extrait EMs sur colonne de gel de silice, a donné 4 différentes fractions FA, FB, FC et FD. Les fractions FA (0.19 %, g/g), FB (3.87 %, g/g), FC (3.02%, g/g) et FD (1.42 %, g/g) contiennent principalement des flavonoïdes ; des saponosides et d'alcaloïdes ; des alcaloïdes et des saponosides respectivement (tableau n°17).

Tableau°17 : Etude phytochimique des différentes fractions (FA→FD) obtenues par fractionnement de l'extrait méthanol sur colonne de gel de silice.

Fraction	FA	FB	FC	FD
Rendement g/g (%)	0.19	3.87	3.02	1.42
Aspect physique	pâte Vert marron	Pâte marron	Pâte marron	Solide Jaune marron
Solubilité optimale	Tween 80 (0.8% dans l'eau)			
Saponosides	-	+		+
Alcaloïdes	-	+	+	-
Flavonoïdes	+	-	-	-

(+) Présence. (-) Absence.

Dans cette partie, nous allons commencer par discuter l'étude phytochimique réalisée sur *H. scoparia*, afin d'évaluer sa composition qualitative et quantitative en métabolites secondaires. Ensuite une discussion est menée sur les différentes méthodes d'extractions utilisées pour la préparation des extraits destinés à l'étude biologique.

Dans l'étude phytochimique de *H. scoparia*, la chromatographie sur couche mince, la détection en utilisant la méthode spectroscopique (UV- visible) et la détection chimique (réactifs spécifiques), ont été utilisées pour deux principaux buts : confirmer la présence de certaines classes de métabolites secondaires, et de détecter la présence d'autres métabolites non identifiés dans *H. scoparia*.

En fait, la chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse très utilisée pour l'étude chimique des extraits de plantes (**Wagner et Bladt, 2009 ; Harborne, 1998**). La CCM peut être performée dans des laboratoires sophistiqués ou de petits laboratoires, il s'agit d'une technique simple, rapide, peu coûteuse et efficace (**Marston, 2011; Zarzycki et al., 2011**).

Des extraits de plantes préparés par un épuisement de la matière végétale en contact de l'eau ou des alcools se révèlent très riches en une multitude de métabolites secondaires de polarité différente, des molécules polaires et apolaires sont présentes dans ces extraits. L'analyse chromatographique sur couche mince réalisée directement sur ces extraits peut être difficile et donne peu d'informations (**Harborne, 1998**). Pour pallier à ce problème, l'approche utilisée dans notre étude est la préparation d'extraits enrichis, en une famille bien particulière de métabolites secondaires, en suivant une procédure d'extraction plus ou moins sélective, et aussi en utilisant des systèmes de solvants spécifiques pour le développement des plaques de chromatographie.

Le taux de polyphénols de *H. scoparia* trouvé dans l'étude présente est égale à 36,54 mg eq d'acide gallique / g de la plante, une autre étude réalisée sur la même plante a donné un taux de 58.52 mg eq d'acide gallique / g de la plante (**Bourogaa et al., 2013**). Le taux de polyphénols chez *H. scoparia*, est à peu près cinq fois plus petit que celui trouvé dans *Haloxylon salicornicum*, une plante appartenant au même genre que *H. scoparia* (**Donia et al., 2012**). Les polyphénols sont représentés dans notre plante, par des flavonoïdes, des phénols simples, des acides phénols et des tannins.

La CCM des extraits enrichis en flavonoïdes, a révélé la présence de trois flavonoïdes de Rf différents, et ce résultat semble bien corrélé avec les données bibliographiques, Ben Salah et ces collaborateurs ont réussi à isoler et à identifier trois flavonoïdes de la partie aérienne de *H. scoparia*, et qui sont tous des flavonols triglycosides (**Ben Salah et al., 2002**). En revanche une étude récente a aussi confirmé la présence dans les parties aériennes de la plante d'un autre type de flavonoïdes, une flavone, le chrysoériol (**Chao et al., 2013**).

La CCM a aussi confirmé la présence de phénols simples, et des acides phénols dans l'extrait de *H. scoparia*. La comparaison des résultats à ceux donnés par la littérature, suggère que les phénols simples sont présentés uniquement par le catéchol (**Chao et al., 2013**) et les acides phénols sont des C₆C₃: l'acide coumarique, l'acide cinnamique et l'acide cafféoylquinique (**Chao et al., 2013**).

L'étude phytochimique a également montré que *H. scoparia* contient une quantité d'alcaloïdes égale à 5.2 % (g/g) de matière sèche, ce taux est relativement élevé par rapport à celui trouvé par El-Shazly pour la même plante, et qui a été de 4.02 % (**El-Shazly et Wink, 2003**). Les alcaloïdes sont répons dans le genre haloxylon dont appartient *H. scoparia*. *Haloxylon salicornicum*, par exemple contient 1.05 % (g/g) d'alcaloïdes (**El-Shazly et al., 2005**). D'autres chénopodiacées contiennent pourtant un taux plus élevé d'alcaloïdes, *Chenopodium album* par exemple contient 9.7% (g/g) (**Pandey and Gupta, 2014**).

La CCM de l'extrait enrichi en alcaloïdes, a révélé la présence des **isoquinolines**, en fait *H. scoparia* est une plante riche en cette famille d'alcaloïdes, les structures de plusieurs composés ont été déjà élucidées (**El-Shazly et Wink, 2003 ; Benkrief et al., 1989**). D'autre part la CCM, a aussi révélé la présence des **indoles**, dont aussi les structures chimiques présentes dans la plante ont été identifiées. (**El-Shazly et Wink, 2003 ; Benkrief et al., 1989**). D'autres travaux ont aussi mis en évidence d'autres types d'alcaloïdes dans *H. scoparia*, il s'agit d'un isoquinolone et un β -carboline (**El-Shazly et Wink, 2003 ; Benkrief et al., 1989**).

H. scoparia appartient à la famille des chénopodiaceae, qui sont connus par l'occurrence de saponosides (**Kuljanabhagavad et Wink, 2012**), des tri-terpénoïdes

saponines ont été isolés et leur structures ont été déterminées dans cette famille (**Kim et al., 2012**, **Yin et al., 2012**, **Shaker et al., 2003**), mais jusqu'à présent aucune étude n'a été réalisée pour identifier les saponosides de *H. scoparia*. Dans cette étude, nous avons estimé que *H. scoparia* contient un taux de 5.4%, (g/g) de saponosides, avec un indice de mousse de 500, d'autre part la CCM, a révélé la présence d'au moins quatre composés de la famille des saponosides et qui peuvent être des stéroïdes ou des glycosides triterpéniques.

La fraction saccharidique de la plante, a été aussi quantifiée. *H. scoparia* contient un taux de sucres totaux égal à 5.07% (g/g). Cette fraction contient tous les sucres solubles dans l'eau.

Certains métabolites secondaires ainsi identifiés dans *H. scoparia*, ont fait l'objet de quelques tests biologiques, et ont montré des activités intéressantes. Ainsi, les composés phénoliques, ont été responsables de l'activité antioxydante et hépato-protective de *H. scoparia* (**Bourogaa et al., 2014**). Les flavonols triglycosides, ont montré une puissante activité contre les cellules leucémiques (**Bourogaa et al., 2011**). Tandis que les alcaloïdes, ont prouvé une activité molluscicide avec le N- méthylisosalsoline (**Mezghani-Jarraya et al., 2009**), et une activité d'inhibition de la mélanogénèse *in vitro*, avec des dérivés tétrahydroisoquinoliniques (**Chao et al., 2013**).

Ces résultats démontrent bien la richesse, de *H. scoparia* en métabolites secondaires divers, ce qui est en concordance avec les travaux, qui approuvent que les plantes et d'autres produits naturels comme les microorganismes, représentent une source incontournable pour le développement de nouveaux médicaments (**Newman et Cragg, 2012**). Ces molécules naturelles montrent une grande diversité dans leurs structures chimiques et leurs activités biologiques, et il a été prouvé qu'elles sont, en moyenne, plus absorbées dans l'organisme vivant que les molécules synthétiques (**Harvey, 2008**). Malgré cet avantage, les produits naturels sont de structures chimiques très complexes, de source difficile à accéder et à gérer, et aussi nécessitent beaucoup de temps pour les étudier et les tester, ce qui a mené quelques grandes compagnies industrielles à diminuer leur utilisation et retourner à la chimie combinatoire (**Harvey, 2008**).

En générale, la composition phytochimique des extraits de *H. scoparia*, destinés pour l'étude biologique, révèle la présence de 7 familles de composés chimiques, les saponosides, les alcaloïdes, les tannins, les flavonoïdes, les stéroïdes, les mucilages et les sucres réducteurs.

L'extrait aqueux (EA) préparé sous reflux, a donné un rendement de 27,9 % (g/g), il contient des saponosides, des alcaloïdes, des tannins, des stéroïdes, des mucilages et des sucres réducteurs. Les extraits méthanol et éthanol (EM, EE) préparés par macération, ont donné des rendements de 20.4% et 15.8% (g/g) respectivement. A noter que la composition phytochimique des deux extraits est la même, avec la présence des saponosides, des alcaloïdes, des tannins, des stéroïdes, et des sucres réducteurs. La seule différence entre la composition phytochimique des extraits alcooliques et l'extrait aqueux, et l'absence dans ce dernier des flavonoïdes et la présence des mucilages. L'absence des mucilages des extraits alcooliques est bien attendue vue que ces molécules se précipitent en présence des alcools (**Harborne, 1998**).

Le fractionnement de l'extrait méthanol (EM), par extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter, en utilisant des solvants de polarité croissante, a permis de procéder à une sélection de métabolites secondaires de même nature, les composés lipidiques comme les stéroïdes et les quinones dans l'extrait hexane (EH), les composés polaires dans l'acétate d'éthyle (EAc) et le n-butanol (EnB). Les extraits du n-butanol et l'acétate d'éthyle ont montré une composition phytochimique identique, présence des alcaloïdes, des flavonoïdes et des sucres réducteurs, dans les deux extraits, sauf que l'extrait n-butanol se distingue par la présence des saponosides.

Le recours au soxhlet a permis d'améliorer les extractions, en fait à l'inverse de la macération, l'utilisation du soxhlet, est une méthode d'extraction plus exhaustive et sélective, et qui donne des rendements très importants, en un temps court et avec une consommation faible de solvants (**Sarker et al., 2005**). Ainsi quatre différents extraits ont été obtenus, les extraits hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, et méthanol. L'extrait hexane représente la fraction lipidique de la plante (2.5 ± 0.36 %), l'extrait dichlorométhane (2.92 ± 0.12) contient des alcaloïdes, et des stéroïdes, l'extrait acétate d'éthyle (1.9 ± 0.07), contient des alcaloïdes et des sucres réducteurs, et l'extrait méthanol (16.6 ± 0.19), contient des saponosides, des alcaloïdes et des flavonoïdes.

Enfin, le fractionnement de l'extrait méthanol (EMs) sur colonne, nous a permis d'obtenir, des fractions enrichies en alcaloïdes, en flavonoïdes et en saponosides. Ce qui nous a permis de tester l'activité biologique de chaque famille séparément.

CHAPITRE 2 : Etude de la toxicité aiguë
de Hammada scoparia

-Matériel et méthodes

-Résultats et interprétation

-Discussion

1. Animaux

Les animaux utilisés dans cette partie de l'étude de la toxicité aiguë et dans la partie de l'étude de l'activité antidiabétique, sont des rat « *Rattus norvegicus* » de souche "Wistar, âgés de 2 à 3 mois, et ayant un poids corporel (p.c) compris entre 180 à 350 g. L'élevage des animaux a eu lieu au sein de l'animalerie du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr-Belkaid (Tlemcen).

Tous les animaux sont traités et manipulés selon les normes dictées dans les manuels sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation (**CCPA, 1984 et Festing, 2011**). L'aliment du commerce et l'eau de robinet sont fournis à l'animal *ad libitum*.

L'aliment utilisé dans nos expériences est commercialisé sous le nom d'El ALF, et a la composition en nutriments suivante : 14% d'humidité, 49.5% de glucides, 14 % de protéines brutes, 3.5% de lipides, 5 % de cendres et 1% de complexe minéralo-vitaminique.

2. Etude de la toxicité aiguë des extraits de *H. scoparia* chez le rat

La toxicité aiguë de *H. scoparia* a été évaluée chez 83 rats femelles, soumises à un jeûne de 16 heures, et ayant un poids corporel compris entre 180 et 250 g. Deux extraits de la plante ont été testés : l'extrait aqueux (**EA**) et l'extrait eau-méthanol (**EM**), et deux voies d'administrations ont été utilisées la voie orale et la voie intrapéritonéale (tableau n°18). Les rats ont été suivis périodiquement durant 48 heures après l'administration des extraits, puis une fois par jour pendant 14 jours. Les signes de toxicité et la mort des rats ont été enregistrés.

Tableau n°18: Etude de la toxicité aiguë de *H. scoparia* chez le rat.

Extraits	EA	EM	EM
Doses (mg/kg p.c.)	300, 500,1000, 1500, 2000	500, 1000, 1500, 2000	500, 550, 600, 650
Voie d'administration	Orale	Orale	Intrapéritonéale
Paramètres déterminés chez les rats	-Signes de toxicité -Mort -Biométrie des organes	-Signes de toxicité -Mort	-Signes de toxicité -Mort -DL ₅₀

L'étude de la toxicité aiguë de *H. scoparia* a été réalisée sur deux extraits ; aqueux (**EA**) et eau-méthanol (**EM**), administrés à des rats femelles à des doses croissantes, en utilisant deux voies d'administration : la voie orale et la voie intrapéritonéale. Les rats ont été suivis durant 14 jours.

2.1. Etude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux (EA)

Cette étude a été réalisée sur 28 rats femelles à jeun (16 heures) répartis au hasard en cinq groupes, $n = \{5,6\}$, chaque groupe reçoit oralement, à l'aide d'une sonde intragastrique, une dose unique de l'**EA** à 300, 500, 1000, 1500 et 2000 mg/kg p.c. Les rats ont été suivis attentivement durant les premières heures, puis une fois par jour durant 14 jours, la mort des rats ou tout autre comportement anormal ont été enregistrés.

En parallèle, un groupe composé de 5 rats a été traité par 10 ml/kg p.c., du sérum physiologique NaCl (0,9%) et a servi de groupe témoin.

Au 14^{ème} jour, les rats traités par les doses 300 mg/kg p.c., et 2000 mg/kg p.c., et les rats témoins ont été anesthésiés, par injection intrapéritonéale d'une solution de chloral (0.8%), à 5 ml/kg p.c. Après ouverture de l'abdomen, les reins, le foie, la rate, les poumons, et le cœur, ont été récupérés et destinés à l'étude macroscopique et biométrique.

2.2. Etude de la toxicité aiguë de l'extrait eau-méthanol (EM)

La toxicité de l'extrait eau-méthanol (EM), a été évaluée chez des rats femelles par deux voies d'administration la voie orale et la voie intrapéritonéale. Ainsi 40 rats à jeun (16 heures) ont été répartis au hasard en 8 groupes. Quatre groupes (n=4), ont été traités par voie orale aux doses de 500, 1000, 1500 et 2000 mg/kg p.c., et les autres quatre groupes (n=6) ont été traités par voie intrapéritonéale aux doses de 500, 550, 600 et 650 mg/kg p.c.

Deux lots témoins chacun composé de 5 rats ont été traités par le sérum physiologique à 10 ml/kg p.c., un par voie orale et l'autre par voie intrapéritonéale.

Tous les rats ont été suivis attentivement durant les premières heures, et une fois par jour durant 14 jours, la mort des rats ou tous signes de toxicité doivent être mentionnés.

2.3. Détermination de la DL₅₀ de l'extrait eau-méthanol (EM)

Avec l'EM administré par voie intrapéritonéale aux rats femelles, aux doses allant de 500 à 650 mg/kg p.c., il y a eu la mort de quelques rats, ce qui nous a mené à calculer la dose létale qui devrait tuer 50 % des animaux, en utilisant la formule de Weil (Weil,1952).

• La formule suivante a été utilisée pour calculer la DL₅₀ :

$\text{Log DL}_{50} = \log D_a + d (f+1)$ pour $K=3$. (Weil,1952)

DL₅₀ : La dose la plus faible qui devrait tuer 50% des animaux qui la reçoivent.

D_a: La plus petite dose testée.

d= log R, avec R le facteur géométrique qui relie les doses testées.

f : facteur déduit de la table de Weil.

k: degré de liberté.

•L'intervalle de confiance à 95% de la DL₅₀ est calculé par la formule suivante:

$\text{Anti log} [\log \text{DL}_{50} \pm 2 \sigma_{\log m}]$ (Weil, 1952).

$\sigma_{\log m} = d \sigma_f$, σ_f facteur déduit de la table de Weil.

1. La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait aqueux (EA) et de l'extrait eau-méthanol (EM)

L'administration des deux extraits **EA** et **EM** à différentes doses croissantes par voie orale aux rats femelles à jeun, n'a été accompagnée d'aucune mort des animaux et cela durant les 14 jours de l'observation. Cependant quelques signes de toxicité (diminution de l'activité, agitation et gonflement abdominal) ont été repérés uniquement chez les rats traités par **EM** et ceci surtout à fortes doses (1000-2000 mg/kg p.c.). A noter que ces troubles n'ont pas duré plus que de deux heures après le gavage de l'**EM**, (tableaux n°19 et n° 20).

L'effet de l'**EA** aux doses de 300 et 2000 mg/kg p.c., sur le poids relatif des organes est illustré sur la figure 7. L'étude macroscopique et biométrique des organes n'a révélé aucune différence notable entre les rats témoins traités par le sérum physiologique et les rats expérimentaux traités par l'**EA**.

Tableau n°19 : La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait aqueux (**EA**) chez le rat.

Lots	Poids des rats (g)*	Nombre des rats	Dose orale (mg/kg p.c.)	Comportement des rats
Témoin	197.6 ± 6.87	5	NaCl (0.9%, 10ml /kg)	
Expérimentaux	214.6 ± 5.04	5	300	- Aucun signe de toxicité. -Aucune mort.
	202.18 ± 2.61	6	500	
	187.61 ± 10.18	6	1000	
	198.08 ± 4	6	1500	
	230 ± 8,74	5	2000	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

Tableau n°20 : La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait eau-méthanol (EM) chez le rat

Lots	Poids des rats (g)*	Nombre des rats	Dose orale (mg/kg p.c.)	Comportement des rats
Témoin	197.6 ± 6.87	5	NaCl (0.9%, 10ml/kg)	Aucun signe de toxicité
Expérimentaux	210.13 ± 8.54	4	500	
	217.58 ± 5.77	4	1000	Activité réduite et agitation durant les deux premières heures.
	222.92 ± 7.31	4	1500	
	200.26 ± 6.98	4	2000	Activité réduite et agitation durant les deux premières heures, avec gonflement abdominal.

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

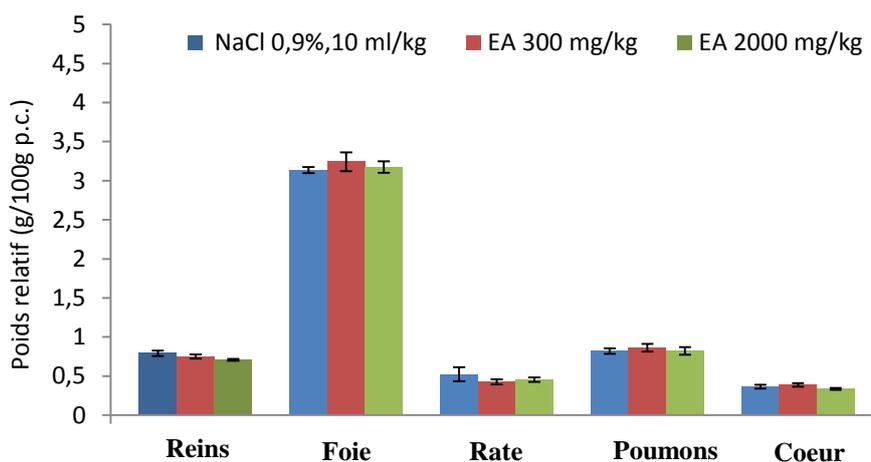


Figure 7 : Variations du poids relatif des organes chez les rats normaux traités par l'extrait aqueux (EA) de *Hammada scoparia*, et comparés aux rats témoins traités par le NaCl .

2. La toxicité aiguë par voie intrapéritonéale de l'extrait eau-méthanol (EM) et détermination de la DL₅₀

L'administration par voie intrapéritonéale de l'EM à des doses croissantes de 500 mg/kg à 650 mg/kg à des rats femelles à jeun, a été létale par rapport à son administration par voie orale, et a provoqué la mort de certains rats selon la dose administrée. A noter que les mêmes signes de toxicité enregistrés lors du gavage oral de l'EM ont été aussi

observés chez les rats : réduction de l'activité, agitation et gonflement abdominal. Les résultats de cette expérience, ont permis la détermination de la DL₅₀ (dose létale qui devrait tuer 50 % des animaux) de l'EM administré par voie intrapéritonéale, en utilisant la méthode de Weil (tableau n°21).

Tableau n°21: La toxicité aiguë par voie intrapéritonéale (i.p), de l'extrait eau-méthanol (EM), chez le rat.

Lots	Poids des rats (g)*	Nombre de rats initial	Doses mg/kg p.c., (i.p)	Comportement des rats	Nombre de rats morts	DL ₅₀ (intervalle de confiance)
Témoin	213.13 ± 3.62	5	NaCl (0.9%, 10ml/kg)	Aucun signe de toxicité	0	588.84 mg/kg (549.54 - 630.95)
Expérimentaux	209.62 ± 2.54	6	500	Réduction de l'activité juste après injection	0	
	202.07 ± 2.99	6	550	Agitation durant la première heure	1	
	196.47 ± 4.83	6	600	Réduction de l'activité juste après injection	4	
	212.8 ± 1.85	6	650	-Gonflement abdominal -Agitation	5	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité pour le traitement de plusieurs maladies. Cette pratique traditionnelle a été héritée d'une génération à une autre, et a permis de marquer l'efficacité thérapeutique de ces plantes par leur non toxicité, nombreux sont ceux qui croient que ces remèdes naturels sont non toxiques (**Larrey, 1997**). Cependant, plusieurs études ont montré que les plantes médicinales peuvent avoir comme les médicaments conventionnels des effets secondaires, Ginseng (*Panax ginseng*) par exemple, est une plante très populaire dans le monde entier (**Barnes et al., 2008**), elle est utilisée comme remède dans l'amélioration des capacités physiques et mentales des individus (**NTP, 2011**). Cette plante, pourtant n'est pas exempte de toxicité. Une étude réalisée sur 133 personnes, a montré que le Ginseng peut provoquer des effets secondaires inattendus, comme une excitation du système nerveux central, une hypertension, une éruption de la peau, et une insomnie (**NTP, 2011**). Plusieurs plantes se sont trouvées aussi hépatotoxiques (**Stickel et al., 2000 ; Teschke et al., 2014**).

Le principal but d'étudier la toxicité des plantes, est de connaître la nature et l'amplitude des effets secondaires des extraits ou des molécules à des doses bien appropriées, à fin de prévenir tout risque pour l'homme (**Ifeoma et Oluwakanyinsola 2013**). De plus l'identification de l'agent toxique, va permettre soit son élimination pour obtenir des extraits actifs non toxiques, ou soit la modification de sa dose, ou de sa structure chimique si lui-même est porteur de l'activité biologique (**Ifeoma et Oluwakanyinsola 2013**).

H. scoparia a été testée pour la première fois pour sa toxicité aiguë chez le rat *Wistar*, deux extraits bruts ont été utilisés, l'extrait aqueux (EA) et l'extrait eau-méthanol (EM) et deux voies d'administrations ont été envisagées la voie orale et la voie intrapéritonéale. A noter que pour l'étude de l'activité antidiabétique, la voie orale a été privilégiée, vu que c'est la majeure voie d'administration des préparations médicinales.

L'administration par voie orale de l'extrait aqueux à des doses uniques croissantes (300-2000 mg/kg), n'a montré aucun signe de toxicité et aucune mort des rats n'a été enregistrée durant les 14 jours d'observation, d'autre part l'étude biométrique et macroscopique des organes a aussi confirmé la non toxicité de l'extrait aqueux même à une dose de 2000 mg/kg. En fait, la comparaison des poids des organes des animaux traités et

des animaux témoins est souvent utilisée pour prédire l'effet toxique des substances, et aussi pour identifier les organes cibles possibles (**Wolfsegger et al., 2009**).

Cependant l'administration par voie orale de l'extrait eau-méthanol (500-2000 mg/kg) a montré quelques signes de toxicité ; une réduction de l'activité, un gonflement abdominal et une agitation des animaux. Cette différence dans la toxicité aiguë des deux extraits, aqueux et alcoolique, administrés par voie orale, peut-être expliquée par une différence qualitative ou quantitative dans leur composition en métabolites secondaires. Sachant bien que l'extraction par les alcools, peut faire sortir des métabolites que l'eau ne le peut pas, suite à une destruction des parois cellulaires de la plante (**Lapornik et al., 2005**).

A noter que la dose de 2000 mg/kg p.c., utilisée dans cette expérience, est considérée dans les guides de toxicité orale aiguë, comme maximale (**OECD, 2001**). Bien qu'une dose de 5000 mg/kg p.c., peut-être recommandée, mais seulement s'il y a des raisons bien évidentes (**OECD, 2001**).

D'autre part, l'administration de l'extrait eau-méthanol par voie intrapéritonéale a été plus toxique par rapport à son administration par voie orale, et à des doses allant de 500 jusqu'à 650 mg/kg p.c., l'extrait a provoqué la mort de quelques rats. Ceci peut être expliqué, par un taux d'absorption élevé des extraits, lorsqu'ils sont administrés par voie intrapéritonéale (**Néné-Bi et al., 2013**). La DL_{50} calculée dans ces conditions a été de 588.84 mg/kg p.c., une plante est considérée comme toxique si sa DL_{50} est égale ou inférieure à 500 mg/kg p.c., lorsqu'elle est testée chez les rongeurs par voie intrapéritonéale (**Marles et Farnsworth 1995**).

Nous constatons ainsi, que la toxicité aiguë de *H. scoparia*, est différente selon l'extrait en question et sa dose, et aussi selon la voie de son administration. D'autres études sont nécessaires pour mieux cerner la toxicité de *H. scoparia* et de connaître son origine.

En fait la toxicité des plantes médicinales peut être de deux origines, la présence de substances extrêmement toxiques dans la plante elle-même comme par exemple des alcaloïdes de type pyrrolizidine, ou le mal maintien de la qualité de la plante depuis son habitat jusqu'à sa formulation comme traitement (**Saad al., 2006**).

Beaucoup de facteurs peuvent influencer la qualité des plantes, ainsi leur toxicité ; les facteurs de croissance, le temps de la récolte (été, hiver...), l'âge de la plante au moment de la récolte et la partie de la plante utilisée (**Saad al., 2006**). D'autres agents sont aussi responsables, à citer par exemple des erreurs dans l'identification de la plante, un surdosage et une interaction avec d'autres principes actifs que soit naturels (autre plante par exemple) ou synthétiques (médicaments).

Enfin, la littérature scientifique sur la toxicité des plantes médicinales est manquante (**Dunnick et Nyska ,2013**). Les études les plus évidentes sont réalisées par le NTP (National Toxicology Program). Le NTP est une inter-agence Américaine, qui permet de donner des rapports techniques sur la toxicité de substances sélectionnées, chez des animaux de laboratoire (souvent le rat et la souris). La sélection primaire est basée sur l'utilisation par l'homme, le taux de production et aussi sur les structures chimiques (**NTP, 2011**). Les plantes qui ont été testées pour leur toxicité par le NTP, sont *Aloe vera*, *Ginkgo*, *Ginseng*, *Goldenseal*, *Kava kava*, *Milkthistle*, et *Turmericoleoresin* (**Dunnick et Nyska, 2013**).

CHAPITRE 3 : Etude de l'activité

antidiabétique de Hammada scoparia

-Matériel et méthodes

-Résultats et interprétation

-Discussion

Dans le but d'étudier l'activité antidiabétique de *H. scoparia*, proclamée par les enquêtes ethnobotaniques, nous avons envisagé plusieurs extraits, préparés de différentes façons : extraction à reflux, extraction par macération, extraction liquide-liquide, extraction par appareil de soxhlet, et fractionnement par chromatographie sur colonne. De plus, nous avons utilisé 210 rats repartis entre des rats normaux (non diabétiques) et des rats rendus diabétiques par la streptozotocine (diabète expérimental), et nous avons utilisé trois procédures : test à court terme, test de tolérance orale au glucose et test à long terme.

1. Induction du diabète expérimental

Des rats à jeun (16 heures) ont été traités par une dose intrapéritonéale unique de la streptozotocine (Flucka, $\geq 98.0\%$) à 60 mg/kg p.c., préparée juste avant l'injection dans un tampon citrate (0.01 M, pH 4.5). Après 72 heures de l'injection de la streptozotocine, les rats qui ont une glycémie supérieure ou égale à 300 mg /dl, sont considérés comme diabétiques et sont utilisés dans les expériences.

2. Etude de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA) chez des rats normaux et des rats diabétiques

Dans un but d'évaluer l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA) de *H. scoparia* chez des rats de laboratoire, trois procédures ont été utilisées; étude à court terme, test de tolérance orale au glucose et étude à long terme.

2.1. Etude à court terme

15 rats normaux à jeun ont été répartis en trois groupes (n=5), et ont été traités par voie orale par l'extrait EA aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg p.c. La glycémie a été mesurée à 0 min (avant le gavage), à 60, 120, 180, 240 et à 360 min, sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux. Un glucomètre Accu Check Active (Roche), a été utilisé pour les mesures. 5 rats ont servi de groupe témoin et ont été gavés avec une solution du sérum physiologique (NaCl à 0.9%, 10 ml/kg p.c.), (tableau n°22).

2.2. Test de tolérance orale au glucose

10 rats normaux à jeun ont été répartis en deux groupes (n=5), et ont été traités par voie orale par l'extrait EA à 100 et 500 mg/kg p.c., 60 min avant le gavage d'une solution

de glucose (2g/kg p.c.). La glycémie a été mesurée à 0 min (avant le gavage de l'extrait aqueux), à 60 min (avant le gavage du glucose), à 90,120,150, et à 180 min. 5 rats ont servi de témoins et ont été gavés par une solution de NaCl (0.9%,10 ml/kg p.c.), (tableau n°23).

Dans chaque groupe, la glycémie a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux, en utilisant le glucomètre.

Tableau n°22: Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA), à court terme.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	EA 100	5	180.45 ± 7.38	-0 min : gavage des extraits -0, 60, 120, 180, 240, 360 min : mesure de la glycémie.
	EA 250	5	182.82 ± 5.43	
	EA 500	5	240.08 ± 4.27	
Témoin	NaCl 0.9% (10ml/kg)	5	190.96 ± 8.35	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

Tableau n°23: Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA), suite à un test de tolérance orale au glucose.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	EA 100	5	234.70 ± 14.15	-0 min: gavage des extraits. -60min : gavage du glucose (2g/kg). -0, 60, 90, 120, 150,180 min : mesure de la glycémie.
	EA 500	5	340 ± 4.27	
Témoin	NaCl 0.9% (10ml/kg)	5	238.32 ± 12.30	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

2.3. Etude à long terme (7jours)

14 rats mâles diabétiques ont été répartis en deux groupes (n=7). L'extrait aqueux (EA) a été administré par voie orale, à une dose de 200 mg/kg p.c., par jour, pendant 7

jours à un groupe (expérimental), l'autre groupe est le groupe témoin, et a été traité en parallèle par du sérum physiologique (NaCl 0.9%, 10 ml/kg p.c.), (tableau n°24).

Dans les deux groupes la glycémie à jeun des rats, a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale le 1^{er} jour et le 7^e jour, le poids des rats, les quantités de l'aliment et de l'eau consommées ont été aussi mesurées.

Les résultats de la prise d'eau et d'aliment mesurés quotidiennement ont été exprimés en ml/100 g p.c. / jour et g/ 100 g p.c. / jour respectivement.

Tableau n°24: Répartition par lot des rats diabétiques utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux (EA) administré pendant 7 jours.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids initial (g)*	Suivi des rats
Expérimental	EA 200	7	223.45 ± 8.84	- Mesure de la glycémie à jeun et le poids corporel au 1 ^{er} et 7 ^e jour. - Mesure quotidienne des quantités de l'aliment et de l'eau consommées.
Témoin	NaCl 0.9% (10ml/kg)	7	243.81 ± 20.42	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

3. Etude de l'activité antidiabétique de l'extrait eau-éthanol (EE) et de l'extrait eau-méthanol (EM) chez des rats normaux

Dans un but d'évaluer l'activité antidiabétique des extraits eau-éthanol et eau-méthanol de *H. scoparia* chez des rats normaux, nous avons utilisé deux procédures, une étude à court terme et un test de tolérance orale au glucose.

3.1. Etude à court terme

10 rats normaux à jeun ont été répartis en deux groupes (n=5), un groupe a été traité par voie orale par l'extrait **EE** à 500 mg/kg p.c., et un groupe par l'extrait **EM** à 500 mg/kg p.c. La glycémie de tous les rats a été mesurée à 0 min (avant le gavage), 30, 60, 90, 120, 150 et 180 min. 5 rats ont servi de groupe témoin et ont été gavés avec une solution de NaCl (0.9%, 10 ml/kg p.c.), (tableau n°25).

Les mesures de la glycémie ont été réalisées sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux aux temps mentionnés.

Tableau n°25 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits eau-éthanol (**EE**) et eau-méthanol (**EM**), à court terme.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	EE 500	5	361.6 ± 4.49	-0min : gavage des extraits. -0,30, 60, 90, 120, 150, 180 (min) : mesures de la glycémie.
	EM 500	5	358.02 ± 11.28	
Témoin	NaCl 0.9% (10ml/kg)	5	317.24 ± 3.40	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

3.2. Test de tolérance orale au glucose

10 rats normaux à jeun ont été répartis en deux groupes (n=5), un groupe a été gavé oralement avec l'extrait **EE** à 500 mg/kg p.c., et l'autre groupe avec l'extrait **EM** à 500 mg/kg p.c. En parallèle, un groupe composé de 5 rats a été gavé avec une solution de NaCl à 0.9%, 10ml/kg p.c., et a servi de groupe témoin. Le gavage des solutions a été réalisé 60 min avant le gavage d'une solution de glucose (2 g/kg p.c.)

Dans chaque groupe la glycémie a été mesurée à 0 min (avant le gavage des extraits), à 60min (avant le gavage du glucose), à 90, 120, 150, et à 180min, sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux (tableau n°26).

Tableau n°26: Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits eau-éthanol (**EE**) et eau-méthanol (**EM**), suite à un test de tolérance orale au glucose.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	EE 500	5	362.88 ± 3.62	-0 min: gavage des extraits. -60min : gavage du glucose (2g/kg p.c.) -0, 60, 90, 120, 150, 180 (min) : mesure de la glycémie.
	EM 500	5	344.82 ± 11.58	
Témoin	NaCl 0.9% (10ml/kg)	5	316.06 ± 8.35	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

4. Etude de l'activité antidiabétique des extraits acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B) chez des rats normaux

4.1. Test de tolérance orale au glucose

10 rats normaux mâles et femelles à jeun (16 heures) ont été répartis en deux groupes (n=5), et ont été traités par voie orale par l'extrait **EAc** à 14 mg/kg p.c., (groupe 1) et l'extrait **En-B** à 100 mg/kg p.c., (groupe 2), 60 min avant le gavage d'une solution de glucose (2 g/kg p.c.).

La glycémie a été mesurée à 0min (avant le gavage des extraits), à 60min (avant le gavage du glucose), à 90,120, 150, et à 180 min. 5 rats ont servi de témoins et ont été gavés avec une solution de NaCl (0.9%, 10ml/kg p.c.), (tableau n°27).

La glycémie des rats des trois lots a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux.

Tableau n°27: Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits acétate d'éthyle (**EAc**) et n-butanol (**En-B**), soumis à un test de tolérance orale au glucose.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	EAc 14	5	367.25 ± 17.17	- 0 min: gavage des extraits. - 60min : gavage du glucose (2g/kg.) - 0, 60,90, 120, 150,180 min : mesure de la glycémie.
	En-B 100	5	359 ± 13.24	
Témoin	NaCl 0.9% (10ml/kg)	5	352.75 ± 14.54	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

5. Etude de l'activité antidiabétique des extraits hexane (EHs), dichlorométhane(EDs) acétate d'éthyle (EAcs) et méthanol (EMs) chez des rats normaux

Pour évaluer l'effet antidiabétique de chaque extrait (**EHs**, **EDs**, **EAcs** et **EMs**), nous avons utilisé un test de tolérance orale au glucose, puis avec les extraits qui ont montré un effet positif, nous avons réalisé un test à court terme.

5.1. Test de tolérance orale au glucose des extraits EHs, EDs, EAcs, EMs

35 rats normaux à jeun des deux sexes (16 heures de jeûne), ont été répartis en 7 groupes (n=5), chaque groupe a été traité par un extrait par voie orale ; le groupe 1 a été gavé par l'extrait **EHs** à une dose de 100mg/kg p.c., les groupes 2 et 3 ont été traités par l'extrait **EDs** aux doses de 100 mg/kg p.c., et 200 mg/kg p.c., respectivement, le groupe 4 a été traité par l'extrait **EAcs** à la dose 100 mg/kg p.c., les groupes 5 et 6 ont été traités par l'extrait **EMs** aux doses de 100 mg/kg p.c., et 300 mg/kg p.c., respectivement et le groupe 7 a été traité par le glibenclamide à la dose de 0.1mg/kg p.c. En parallèle, un huitième groupe composé de 5 rats a été traité par le tween 80 (0.8%, 10ml/kg p.c.), qui a servi de véhicule pour les extraits. Après 30 min de l'administration orale des différentes solutions, tous les rats de chaque groupe, ont été gavés par une solution de glucose (2g/kg p.c.).

La glycémie a été mesurée à 0 min (avant le gavage des extraits), 30min (avant le gavage du glucose) et à 60, 90, 120, 150,180 min sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux (tableau n°28).

Tableau n°28: Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des différents extraits: Hexane (**EHs**), dichlorométhane (**EDs**), acétate d'éthyle(**EAcs**), méthanol (**EMs**), glibenclamide (**Gliben**), suite à un test de tolérance orale au glucose.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	EHs100	5	176.6 ± 3.37	-0 min: gavage des extraits. -30min : gavage du glucose (2g/kg p.c.) -0,30, 60, 90, 120, 150,180 min : mesure de la glycémie
	EDs 100	5	187.2 ± 6.64	
	EDs 200	5	181.6 ± 9.66	
	EAcs 100	5	186.6 ± 7.24	
	EMs 100	5	164 ± 5.54	
	EMs 300	5	171 ± 9.55	
Témoins	Glibenc 0.1	5	237.16 ± 23.64	
	Tween 80 (0.8%, 10ml/kg)	5	160.4 ± 7.32	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

5.2. Test à court terme de l'EMs et de l'EDs

10 rats normaux à jeun des deux sexes ont été répartis en deux groupes (n=5), un groupe a été traité par voie orale par l'extrait **EMs** à la dose de 300mg /kg p.c., et l'autre groupe par l'extrait **EDs** à 200 mg/kg p.c., la glycémie a été mesurée à 0 min (avant le gavage), 60, 120, et 180 min après le gavage. 5 rats ont servi de groupe témoin et ont été gavés par 10 ml/kg p.c, d'une solution de tween 80 (0.8 %), (tableau n°29).

La glycémie a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale de chaque animal.

Tableau n°29 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits méthanol (**EMs**) et dichlorométhane (**EDs**), à court terme.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	EMs 300	5	178 ± 2.64	-0min : gavage des extraits. -0, 60, 120, 180 min : mesure de la glycémie.
	EDs 200	5	196.2 ± 6.90	
Témoin	Tween 80 (0.8%,10ml/kg)	5	185.2 ± 7.27	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

6. Etude à long terme de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanol (EMs) chez des rats normaux et des rats diabétiques

22 rats mâles ont été répartis au hasard en 4 groupes n= {5, 6}, les rats du groupe 1 et 2 sont des rats normaux tandis que les rats du groupe 3 et 4 sont des rats rendus diabétiques par la streptozotocine (60 mg/ kg p.c.) Les rats des groupes 1 et 3 ont été traités par voie orale par l'extrait EMs à une dose quotidienne de 300 mg/kg p.c., pendant 21 jours, de même les rats des groupes 2 et 4 ont été traités par une solution de tween 80 (0.8%) à 10 ml/kg p.c par jour, durant la même période (tableau n°30).

Au 1^e, 7^e, 14^e et 21^e jours la glycémie à jeun et le poids corporel de tous les rats ont été mesurés. Les quantités de l'aliment et de l'eau consommés ont été aussi considérées.

La glycémie à jeun des rats a été mesurée sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux.

L'évolution du poids corporel exprimée en variation (gain ou perte) durant la période de l'expérience, a été exprimée en g/semaine, les résultats de la prise d'eau et d'aliment mesurés quotidiennement ont été exprimés en ml/100g p.c. / jour et g/ 100g p.c. / jour respectivement.

Au 14^e jour du traitement, tous les rats des différents lots ont été soumis à un test de tolérance orale au glucose après un jeûne de 16 h, avec un gavage d'une solution de glucose à 2 g/kg, p.c., la glycémie a été mesurée durant 210 min, tous les 30 min.

Au 21^e jour, les rats des quatre groupes ont été anesthésiés par voie intrapéritonéale, par une solution de chloral à 0.8%, à 5ml/kg p.c., l'abdomen a été ouvert et une quantité de sang a été récupérée de l'aorte pour l'analyse des paramètres sanguins suivants : l'urée, la créatinine, transaminase glutamate oxaloacétique (TGO), alanine amino-transférase (TGP), (tableau n°30).

Tableau n°30 : Répartition par lot des rats normaux et diabétiques utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanol (EMs) à long terme.

Lots	Solution gavée (mg/kg)	n	Poids initial (g)*	Suivi des rats
Expérimental normal	EMs 300	6	303.17± 10.02	-1 ^e , 7 ^e , 14 ^e et 21 ^e j : Mesure de glycémie et du poids corporel. -Mesure quotidienne des quantités de l'aliment et de l'eau consommées. -14 ^e jour: TTOG (2g/kg). -21 ^e jour : Dosages sanguins: créatinine, urée, TGO et TGP.
Témoin Normal	Tween-80 (0.8%, 10ml/kg)	6	288.33± 15.53	
Expérimental diabétique	EMs 300	5	278.25± 9.86	
Témoin diabétique	Tween 80 (0.8%, 10ml/kg)	5	283± 402	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

7. Etude de l'effet de l'extrait méthanol (EMs) sur la glycémie postprandiale, et sur les quantités du glycogène hépatique et musculaire chez des rats normaux.

Pour tester l'effet de l'EMs sur la glycémie postprandiale des rats et sur les quantités intra-tissulaire du glycogène, nous avons suivi la procédure de Herling (**Herling, 2006**).

7.1. Effet de l'extrait méthanol (EMs) sur la glycémie postprandiale

17 rats mâles normaux ont été répartis au hasard en 2 groupes les rats du premier groupe (n=8) ont été traités (t= 0min) par voie orale avec 300 mg/kg p.c., de l'extrait EMs, tandis que les rats du deuxième groupe (n=9) ont été traités par voie orale par le tween-80 (0.8%, 10 ml/kg p.c.). La glycémie des rats des deux groupes à été mesurée à partir d'une goutte de sang prélevée de l'extrémité caudale aux temps suivants : 1, 2, 3, 5, et à 24 h.

A la fin des mesures de la glycémie, les rats ont été anesthésiés par voie intrapéritonéale avec une solution de chloral (0.8%, 5 ml/kg p.c.), puis l'abdomen a été ouvert, une quantité du muscle squelettique et du foie a été récupérée pour le dosage du glycogène intracellulaire (tableau n°31).

Tableau n°31 : Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'effet de l'extrait méthanol (EMs) sur la glycémie postprandiale.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimental	EMs 300	8	230.87 ± 5.06	-0h : gavage des extraits. -0, 1, 2, 3, 5 et à 24h : mesure de la glycémie -24 h: sacrifice des rats et récupération de tissus.
Témoin	Tween 80 (0.8% ,10ml/kg)	9	231.77± 6.44	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

7.2. Détermination de la quantité du glycogène hépatique et musculaire

7.2.1. Principe

La méthode chimique du dosage du glycogène, consiste à une digestion du tissu animal dans une solution concentrée d'hydroxyde de potassium, puis à une précipitation du glycogène par l'éthanol. Ensuite le polysaccharide obtenu par précipitation, est hydrolysé par un acide, le glucose ainsi libéré est dosé (**Hassib et Abraham, 1957**).

7.2.2. Mode opératoire

a. Digestion des tissus et précipitation du glycogène

- Une quantité d'approximativement 1 g du tissu animal (foie ou muscle squelettique), est déposée dans un tube de centrifugation pesé (p_0), contenant 3 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 30%.
- Après addition du tissu, le tube est pesé une deuxième fois (p_1), et le poids p du tissu ainsi ajouté est déterminé par différence ($p = p_1 - p_0$).
- Les tubes sont mis à bouillir dans un bain Marie pendant 20 à 30 min.
- Après refroidissement, 0.5 ml d'une solution de sulfate de sodium saturé est ajoutée à chaque tube.
- 1.1 à 1.2 volume de l'éthanol à 95% est aussi ajouté à chaque tube.
- Les tubes sont chauffés, et le glycogène est précipité.
- Le glycogène, peut être ainsi récupéré, par centrifugation à 3000 r. p.m.

b. Hydrolyse acide du glycogène

- 6 ml de HCl à 0.6N sont ajoutés à chaque tube contenant le glycogène précipité, les tubes sont laissés dans un bain Marie pendant 2 à 2.5 h.
- Les solutions acides ainsi obtenues sont refroidies et neutralisées par une solution de soude et sont prêtes à un dosage des quantités du glucose qui en contiennent. Pour cela la méthode de Nelson est utilisée.

c. Dosage du glucose libéré par la méthode de Nelson

▪ Principe

Les sucres réducteurs réduisent, à chaud et en solution alcaline, les ions cuivriques en oxyde cuivreux (liqueur de Fehling). En présence d'une solution d'arsenio-molybdique, l'oxyde cuivreux à froid forme un complexe coloré qui absorbe à 540 nm (Ashwell, 1957).

▪ Mode opératoire

Le tableau n°32, représente les différentes concentrations des extraits et des réactifs utilisées pour le dosage du glucose par la méthode de Nelson.

-1ml de l'échantillon contenant des sucres libres (préparé à partir des tissus hépatique et musculaire), est additionné de 0.5 ml de la liqueur de Fehling (A et B), et porté à

l'ébullition pendant 20 min, un précipité rouge brique se forme, qui témoigne de la présence des sucres réducteurs dans la solution.

- Ajouter à chaque tube refroidit, 1 ml du réactif molybdique, qui permet la dissolution du précipité.

- Faire une dilution, lire l'absorbance à 540 nm.

Une gamme étalon doit être réalisée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant le glucose comme contrôle positif à différentes concentrations croissantes (0, 100, 200, 300, 400, 500 mg/l).

-Pour la détermination de la quantité du glycogène dans le tissu, un facteur de 0.93 est pris en considération.

Tableau n°32: Mode opératoire du dosage du glucose libéré par hydrolyse acide du glycogène intra-tissulaire.

Glucose (mg/l)	0	100	200	300	400	500	-
Volume du glucose (ml)	1	1	1	1	1	1	-
Volume de l'extrait (ml)	-	-	-	-	-	-	1
Liqueur de Fehling A et B (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ebullition pendant 20 min							
Réactif molybdique (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Dilution et lecture de l'absorbance à 540 nm							

8. Etude de l'activité antidiabétique des différentes fractions (A→D) chez les rats normaux

8.1. Test de tolérance orale au glucose des fractions (A→D)

16 rats normaux ont été répartis au hasard en 4 groupes (n=4), les rats du groupe 1 ont été traités par voie orale par la fraction **FA** à 50 mg/kg p.c, ceux du groupe 2 par la fraction **FB** à 280 mg/kg p.c, ceux du groupe 3 par la fraction **FC** à 190 mg/kg p.c, et enfin ceux du groupe 4 par la fraction **FD** à 190 mg/kg, p.c. En parallèle, l'extrait méthanol non fractionné (**EMs**) a été aussi testé à une dose de 300mg/kg p.c., dans un

groupe composé de 4 rats. De plus quatre rats ont été traités par voie orale par le tween-80 (0.8%, 10ml), et ont servi de groupe témoin.

Après 30 min du gavage des extraits, tous les rats des 6 groupes, ont été gavés additionnement par une solution de glucose (2g/kg p.c.). La glycémie a été mesurée 0min (avant le gavage du glucose) et à 30, 60, 90, 120 et 180min durant toute l'expérience, à partir d'une goutte de sang prélevée de l'extrémité caudale de chaque animal (tableau n°33).

Tableau n°33: Répartition par lot des rats normaux utilisés dans le test de l'évaluation de l'activité antidiabétique des différentes fractions (FA→FD), suite à un test de tolérance orale au glucose.

Lots	Solution gavée (mg/kg p.c.)	n	Poids (g)*	Suivi des rats
Expérimentaux	FA 50	4	208.5 ± 5.66	-0 min: gavage des extraits. -30min : gavage du glucose (2g/kg.) -0,30, 60, 90, 120,180 min : mesure de la glycémie
	FB 280	4	228.75 ± 5.57	
	FC 190	4	210.6 ± 7.33	
	FD 190	4	212.75 ± 8.82	
	EMs 300	4	171 ± 9.55	
Témoin	Tween 80 (0.8%, 10ml/kg)	4	195.75 ± 8.35	

*Chaque valeur représente une moyenne ± ESM.

9. Dosages des paramètres sanguins

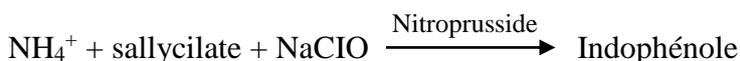
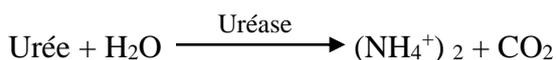
Du sang total a été utilisé pour le dosage de la glycémie en utilisant un glucomètre, alors que pour le dosage des autres paramètres sanguins, du sang a été récupéré dans des tubes contenant de l'héparine, puis centrifugé à 3000 r.p.m pendant 15min. Le plasma récupéré a fait l'objet du dosage de l'urée, la créatinine, la TGO, et de la TGP. Le principe de chaque méthode est donné ci- après.

9.1. Dosage du glucose

La mesure de la glycémie a été réalisée par électrochimie en utilisant un glucomètre à bandelettes réactives (accu-Check active, Roche). Sur la zone réactive de chaque bandelette on dépose une goutte de sang total qui se met en contact direct avec le glucose oxydase (GOD), cette dernière par double réaction assure l'oxydation du glucose en gluconolactone et la réduction du ferricyanure en ferrocyanure. Grâce au courant induit par le chrono ampèremètre du glucomètre, le ferrocyanure est ré-oxydé et libère des électrons qui sont ensuite captés par l'électrode de mesure. La mesure de la glycémie est ainsi directement proportionnelle au courant mesuré. Le courant électronique produit au cours de cette réaction électrochimique est transmis dans le moniteur où il est traduit en lecture à l'écran exprimé en mg/dl. Les résultats obtenus de la glycémie correspondent aux valeurs dans le plasma selon la fédération internationale de chimie clinique (**Dufaitre-Patouraux et al., 2003**).

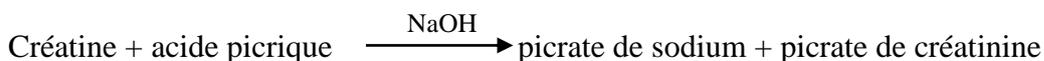
9.2. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par méthode enzymatique colorimétrique à l'uréase (Kit SPINREACT) selon la méthode de Berthelot. L'intensité de la coloration développée au cours de la réaction est proportionnelle à la concentration en urée exprimé en mg/dl. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 580 nm contre un blanc.



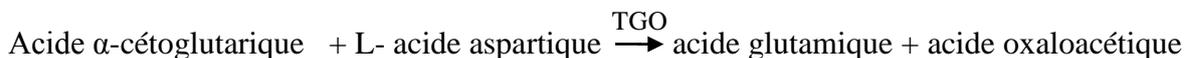
9.3. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine sérique a été réalisé par une méthode chimique colorimétrique et cinétique en milieu alcalin selon la méthode de Jaffé. L'absorbance du picrate de créatinine est mesurée au spectrophotomètre à 492 nm contre un blanc. Les résultats sont exprimés en mg/dl.



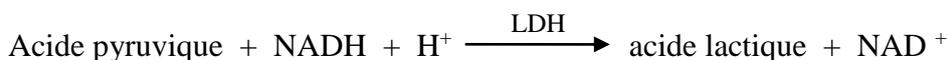
9.4. Dosage de la transaminase glutamate oxaloacétique (TGO)

Le dosage de la TGO a été réalisé par une méthode enzymatique colorimétrique (Kit SPINREACT). L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 340 nm contre un blanc et les résultats sont exprimés en UI /l.



9.5. Dosage de l'alanine amino-transférase (ALAT, TGP)

Le dosage de la TGP a été réalisé par une méthode enzymatique colorimétrique (Kit SPINREACT). L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm contre un blanc et les résultats sont exprimés en UI /l.



10. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes (m) accompagnées de leur indice de dispersion qui est l'erreur standard à la moyenne (ESM): $m \pm \text{ESM}$.

$$\text{Moyenne (m)} \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

$$\text{Ecart type } (\sigma) \quad \sigma_x = \sqrt{Vx}$$

$$\text{Erreur standard de la moyenne (ESM)} \quad \text{ESM} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Les analyses des variances ont été faites à l'aide du test bilatéral de *t* pour des échantillons indépendants. Des analyses de comparaisons post-test de Dunnett révèlent, avec les critères habituels, les valeurs de significances.

Les diverses analyses ont été faites grâce au logiciel InStat 3.00 de la compagnie GraphPad pour Windows©98, GraphPad Software, San Diego Californie USA.

La notation suivante est utilisée pour toute différence significative :

Peu significative (*) : $p < 0.05$,

Significative (**) : $p < 0.01$,

Très significative (***) : $p < 0.001$

Hautement significative (****) : $p < 0.0001$

1. Effet antidiabétique de l'extrait aqueux (EA) chez les rats normaux et les rats diabétiques

1.1. Effet à court terme

L'effet de l'extrait EA de *H. scoparia* à différentes doses (100, 250 et 500 mg/kg p.c.) administrées par voie orale, sur la glycémie à jeun des rats normaux, est montré sur la figure 8.

L'étude des différentes courbes qui représentent la variation de la glycémie à jeun en fonction du temps, montre qu'il n'y a aucune diminution significative de la glycémie chez nos rats traités par l'extrait EA, et cela malgré l'utilisation de trois doses croissantes (100 à 500 mg/kg p.c). Au contraire, une hyperglycémie statistiquement significative a été observée avec la dose de 500 mg/kg, à 180 min ($p < 0.01$) et à 240 min ($p < 0.05$).

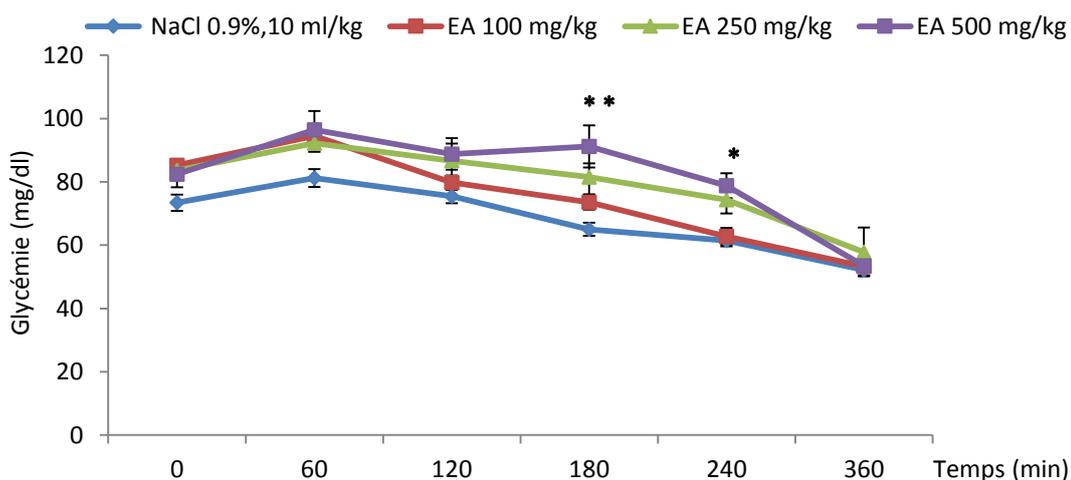


Figure 8 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait aqueux (EA) de *Hammada scoparia* à différentes doses. Moyenne \pm ESM, n=5. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

1.2. Effet suite à un test de tolérance orale de glucose

Les résultats de l'effet de l'EA de *H. scoparia* aux doses de 100 et 500 mg/kg, sur la glycémie des rats normaux soumis à un test de tolérance orale au glucose (TTOG), sont montrés sur la figure 9.

La courbe représentant la glycémie en fonction du temps, suite à une administration d'une solution de glucose aux rats préalablement traités par l'extrait EA (100 mg/kg p.c et 500

mg/kg p.c), suit le même profile que celle des rats traités par le NaCl (0.9 %,10 ml/kg) : une augmentation statistiquement significative de la glycémie ($p < 0.01$) 30 min après le gavage du glucose a été notée, puis une diminution progressive, qui tente à atteindre son taux initial à 180 min. A noter aussi que l'extrait EA à la dose de 500 mg/kg p.c., a provoqué une hyperglycémie statistiquement significative 60 min après son gavage ($p < 0.01$).

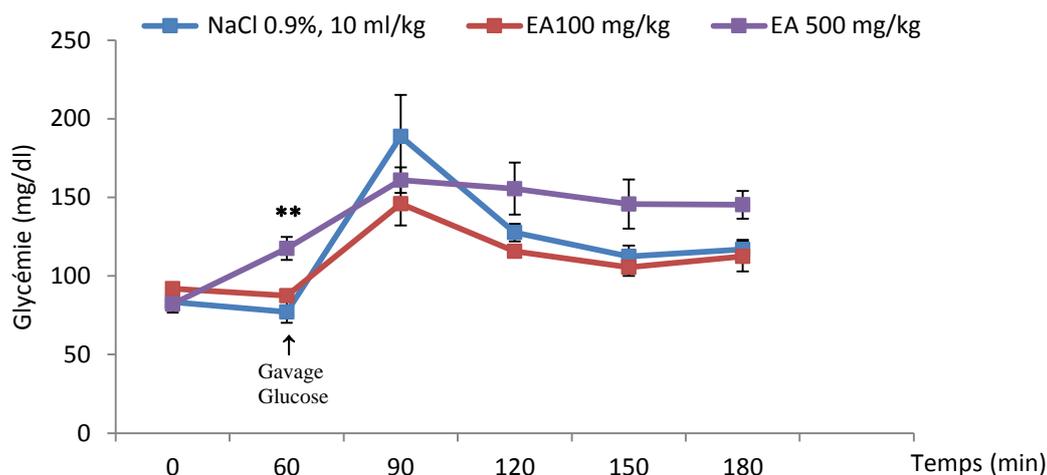


Figure 9 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait aqueux (EA) de *Hammada scoparia* et soumis à un test de tolérance orale au glucose.

Moyenne \pm ESM, n=5. **P < 0,01.

1.3. Effet à long terme (7jours)

Un lot de rats rendus diabétiques par la streptozotocine (60 mg/kg p.c.), a été gavé oralement par l'extrait EA à une dose de 200 mg/kg p.c., par jour, pendant 7 jours, et l'effet sur l'hyperglycémie a été suivi. Les résultats obtenus sont indiqués sur la figure 10.

Au premier jour du traitement, la glycémie à jeun des rats diabétiques du lot expérimental a été de 348.33 ± 11.35 mg/dl, puis elle est devenue de 293 ± 34.77 mg/dl au 7e jour. De même chez les rats du lot témoin, la glycémie a été de 368.66 ± 16.37 mg/dl au 1er jour, et de 318 ± 47.46 mg/dl au 7e jour. Ce résultat ne montre aucune différence significative entre le groupe expérimental et le groupe témoin, ce qui signifie l'inefficacité de l'extrait EA sur l'hyperglycémie des rats diabétiques.

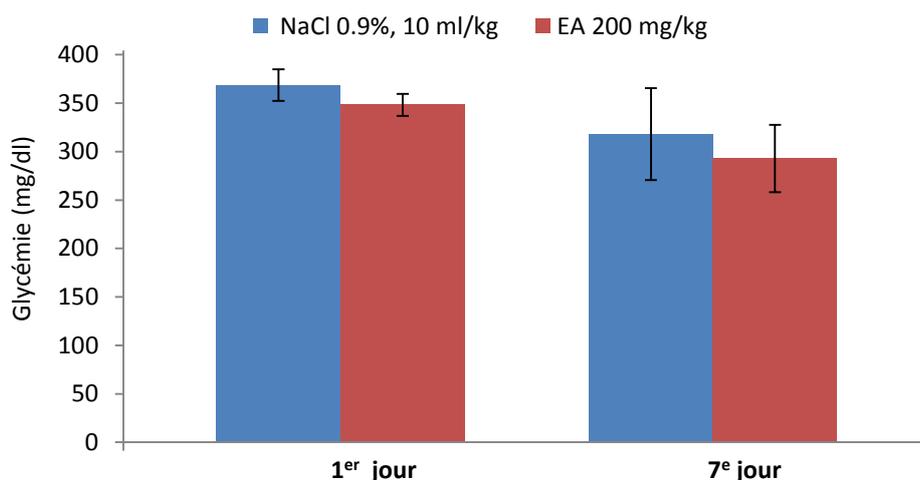


Figure 10 : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de *Hammada scoparia* pendant 7 jours. Moyenne \pm ESM, n=7.

Dans cette expérience nous avons aussi suivi l'effet de l'extrait EA, administré à une dose de 200 mg/kg/j, sur l'évolution du poids corporel et sur les quantités de l'aliment et de l'eau consommées par les rats diabétiques. Les résultats sont montrés dans les figures 11,12,13.

Dans la figure 11, la comparaison du poids corporel des rats diabétiques entre le premier jour et le dernier jour du traitement a montré une diminution statistiquement significative, que soit dans le lot traité par l'extrait EA ($p < 0.01$) ou le lot traité par le sérum physiologique ($p < 0.001$).

Les figures 12 et 13, indiquent qu'aucune différence significative n'a été mentionnée entre les rats diabétiques traités par l'extrait EA et ceux traités par le NaCl, et cela pour les deux paramètres ; la consommation de l'aliment et de l'eau.

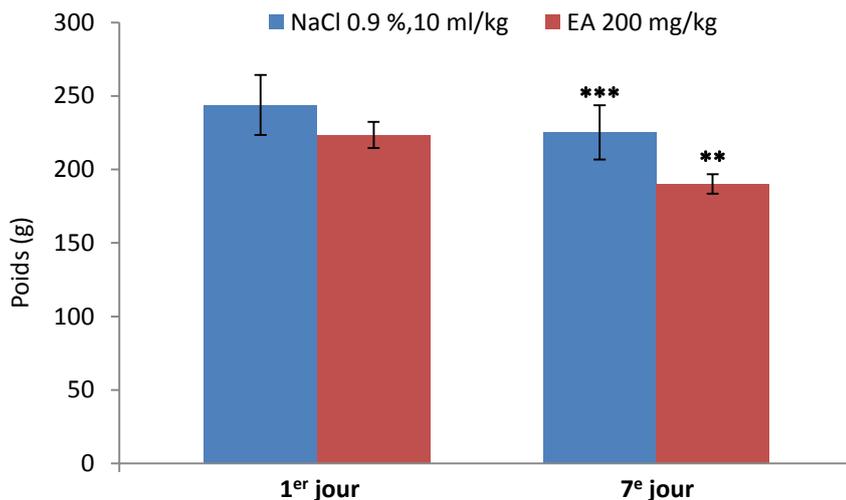


Figure 11 : Variations du poids corporel chez les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de *Hammada scoparia* pendant 7 jours. Moyenne ± ESM, n=7. ** p< 0,01 *** p< 0,001.

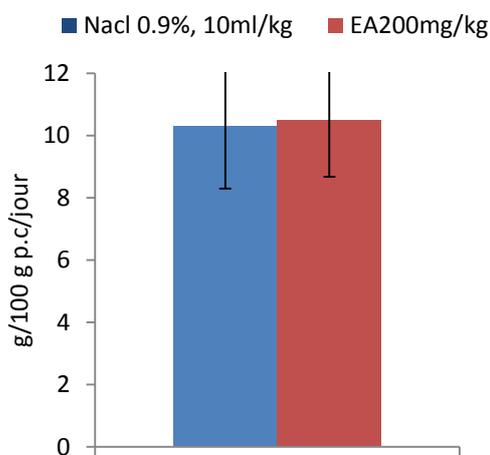


Figure 12 : Quantité journalière de l'aliment prise par les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de *Hammada scoparia*. Moyenne ± ESM.

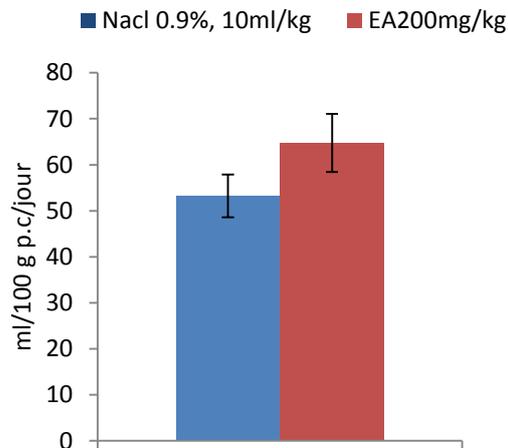


Figure 13 : Quantité journalière de l'eau prise par les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux (EA) de *Hammada scoparia*. Moyenne ± ESM.

✓ A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que l'extrait EA de *H. scoparia* administré par voie orale à des rats normaux, n'a montré aucun effet sur la glycémie des rats à jeun, ou sur l'hyperglycémie provoquée par une charge orale en glucose. De même l'extrait EA, n'a pas réussi à diminué l'hyperglycémie des rats rendus

diabétiques par la streptozotocine, ou de corriger les signes qui l'accompagnent (la chute du poids corporel, la polyphagie et la polydipsie).

2. Effet antidiabétique de l'extrait eau-éthanol (EE) et de l'extrait eau-méthanol (EM) chez les rats normaux

2.1. Effet à court terme

Les résultats obtenus dans le cas de la variation de la glycémie à jeun des rats normaux, suite au gavage oral de l'extrait **EE** à une dose de 500 mg/kg p.c., et de l'extrait **EM** à une dose de 500 mg/kg p.c., sont représentés sur la figure 14.

Une hyperglycémie statistiquement significative a été détectée chez les rats, 30 min après le gavage des extraits **EE** et **EM** et du NaCl ($p < 0.01$). Cette hyperglycémie tente à diminuer et à revenir à son taux basal initial dans les trois lots, sauf que chez les rats traités par l'extrait **EM**, cette diminution devient statistiquement significative à partir de 90 min ($p < 0.01$), et persiste avec la même signification jusqu'à 180 min.

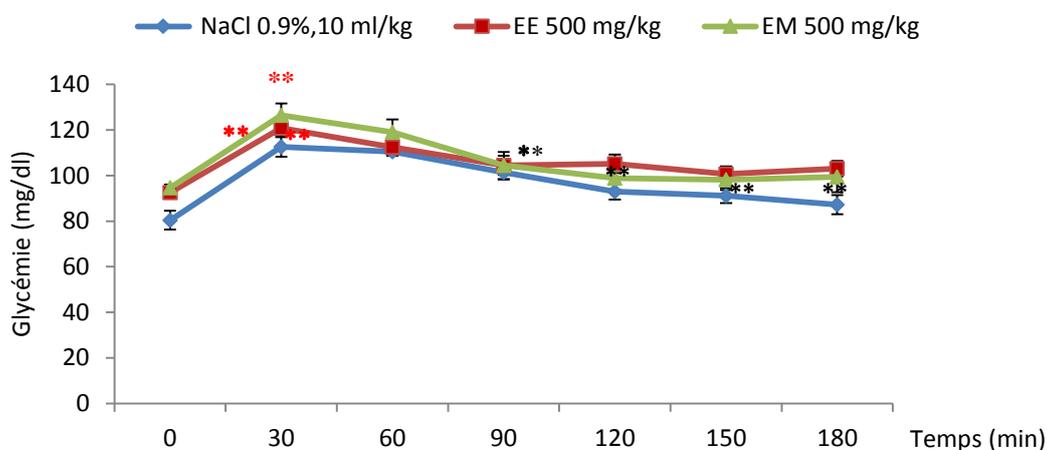


Figure 14 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait eau-éthanol(EE)et l'extrait eau-méthanol (EM) de *Hammada scoparia*.

(Moyenne \pm ESM, n=5. ** : $p < 0,01$.)

2.2. Effet suite à un test de tolérance orale au glucose

L'effet de l'extrait **EE** à une dose de 500 mg/kg p.c., et de l'extrait **EM** à une dose de 500 mg/kg p.c., sur la glycémie des rats normaux soumis à un test de tolérance orale au glucose, est montré sur la figure 15.

Après une charge orale de glucose, une hyperglycémie statistiquement significative a été observée à 30 min chez les rats traités par l'extrait **EE** ($p < 0.05$) et aussi chez les rats traités par le NaCl ($p < 0.001$). En revanche, ce pic n'a pas été détecté chez les rats traités par l'extrait **EM** qui à son tour a montré une diminution statistiquement significative de la glycémie à 30 min ($p < 0.01$).

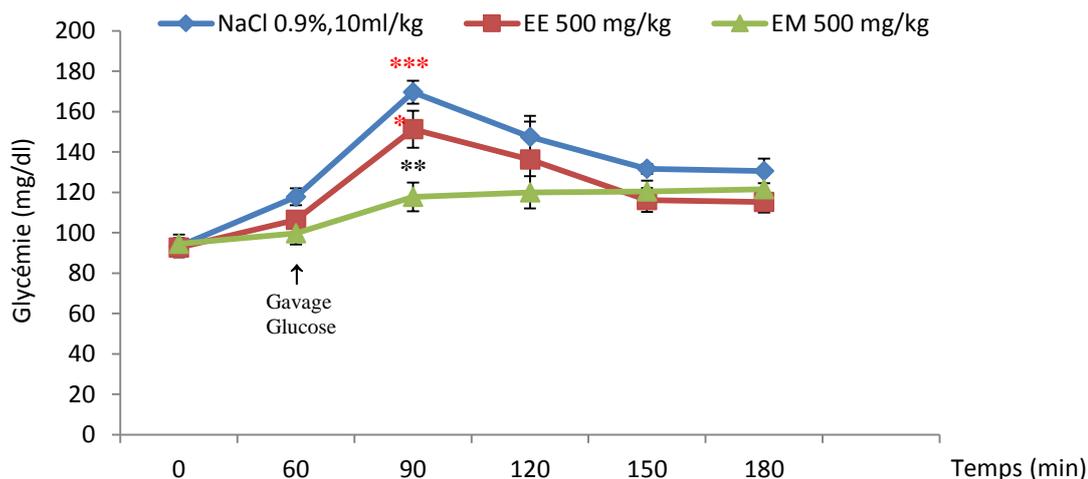


Figure 15 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait eau-éthanol (EE) et l'extrait eau-méthanol (EM) de *Hammada scoparia* et soumis à un test de tolérance orale au glucose. (Moyenne \pm ESM, $n=5$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

✓ Cette expérience réalisée sur des extraits alcooliques, montre bien qu'à l'inverse de l'extrait **EE**, l'extrait **EM** administré oralement à des rats normaux, tente de diminuer la glycémie à jeun et s'oppose parfaitement à l'hyperglycémie attendue suite au gavage oral du glucose.

3. Effet antidiabétique des extraits acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B) chez les rats normaux

3.1. Effet suite à un test de tolérance orale au glucose

L'extrait EM, a été fractionné par extraction liquide-liquide, et a donné deux extraits organiques l'extrait **EAc**, et l'extrait **En-B**. Les résultats obtenus, de l'effet de ces deux extraits, administrés par voie orale, sur la glycémie des rats normaux soumis à un test de tolérance orale au glucose, sont montrés sur la figure 16.

Les extraits **EAc** (14 mg/kg) et **En-B** (100 mg/kg) ont été efficaces et ont diminué significativement l'hyperglycémie observée chez les rats témoins à 90 min ($p < 0.05$) à 120 min ($p < 0.01$). Ce résultat, nous a permis de constater que *H. scoparia* possède un effet antihyperglycémiant, qui se manifeste avec des extraits de composition différente et même à faibles doses.

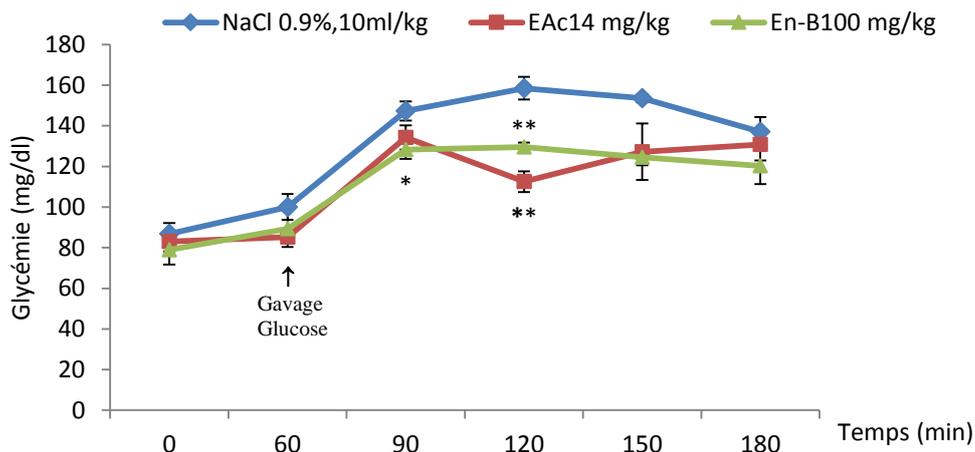


Figure 16 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par les extraits acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B) de *Hammada scoparia* et soumis à un test de tolérance orale au glucose. (Moyenne \pm ESM, n=5. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

4. Effet antidiabétique des extraits EHs, EAcs, EDs et EMs chez les rats normaux

4.1. Effet suite à un test de tolérance orale au glucose

L'extraction au soxhlet de la matière végétale, a permis d'obtenir différents extraits, qui ont été testés chez des rats à différentes doses ; l'extrait hexane (**EHs**) à 100mg/kg p.c., l'extrait dichlorométhane (**EDs**) à 100 et à 200 mg/kg p.c., l'extrait acétate d'éthyle (**EAcs**) à 100mg/kg p.c., et l'extrait méthanol (**EMs**) à 100 et à 300 mg/kg p.c.

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet de ces extraits organiques sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale (glucose, 2g/kg) chez des rats normaux sont donnés sur la figure 17.

A noter aussi l'utilisation d'un témoin positif; un antidiabétique oral, le glibenclamide (**Gliben**) à une dose de 0.1mg/kg p.c.

Les données de la figure 17 montrent un effet antihyperglycémiant statistiquement significatif de l'extrait **EMs** (300 mg/kg p.c.), et cela à 60 min et 90 min ($p < 0.01$), et aussi de l'extrait **EDs** à la dose de 100 mg/kg p.c., à 90 min ($p < 0.01$) et à la dose de 200 mg/kg p.c., à 90 min et à 120 ($p < 0.01$). Cet effet antihyperglycémiant observé avec les deux extraits, **EMs** et **EDs**, a été comparable à celui du glibenclamide (0.1mg/kg p.c.), qui a été efficace à 60 min et à 90min ($p < 0.01$). A noter aussi qu'aucune diminution de l'hyperglycémie n'a été observée chez les rats traités par les extraits **EHs** ou **EAcS**.

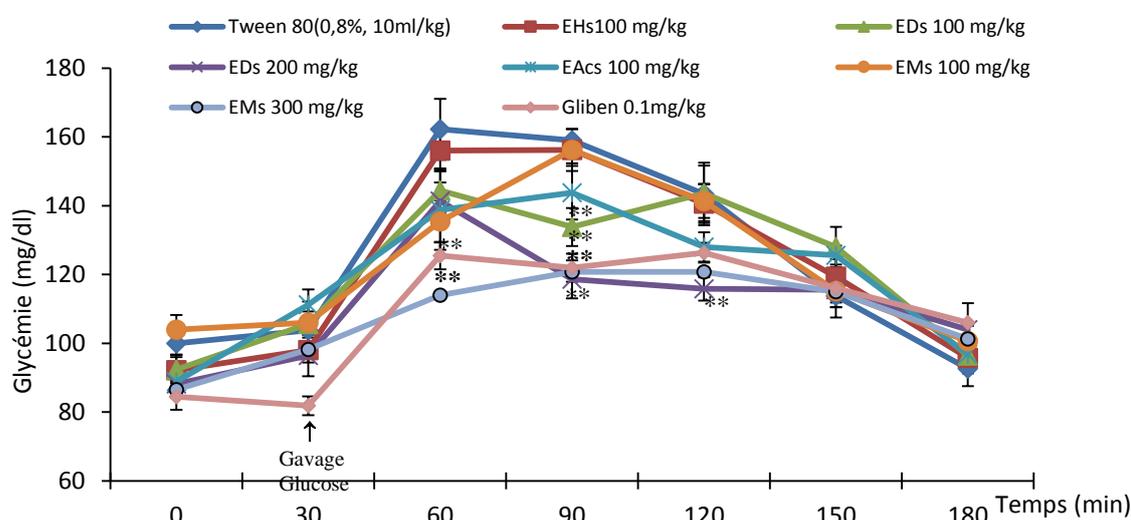


Figure 17: Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par les différents extraits de *Hammada scoparia* et soumis à un test de tolérance orale au glucose. (Moyenne \pm ESM, n=5. **P< 0,01).

4.2. Effet à court terme de l'EMs et de l'EDs

Dans cette expérience, les deux extraits organiques, **EMs** et **EDs**, qui ont montré un effet antihyperglycémiant significatif, ont été testés pour évaluer leurs effets sur la glycémie des rats à jeun normaux. Ainsi les résultats obtenus, sont montrés sur la figure 18.

Aucun effet sur la glycémie des rats à jeun, n'a été mentionné avec les deux extraits **EMs** à la dose de 300 mg/kg p.c., et **EDs** à la dose de 200 mg/kg p.c., le profil des courbes correspondantes a été semblable à celui de la courbe des rats témoins traités par le tween 80 (0.8%, 10 ml/kg p.c.).

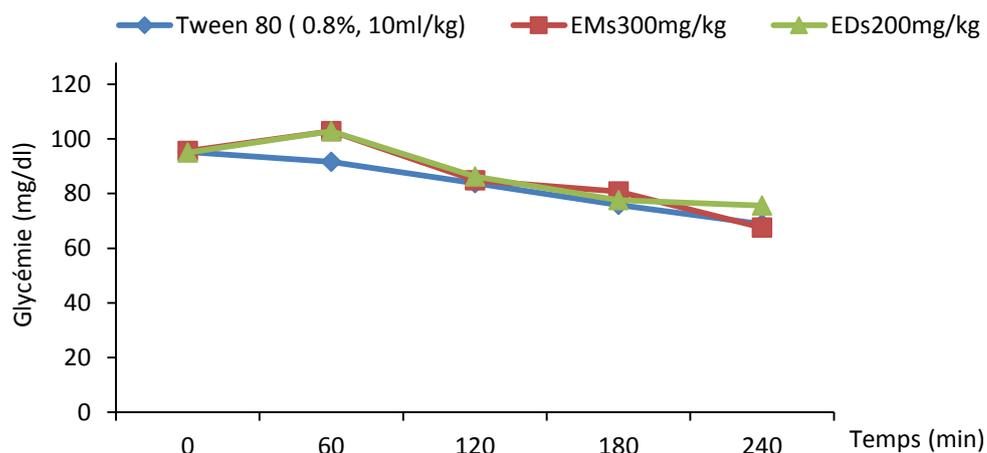


Figure 18 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par les extraits méthanol(EMs) et dichlorométhane (EDs) de *Hammada scoparia*. (Moyenne \pm ESM, n=5).

✓ D'après ces résultats, l'extrait **EMs** à 300 mg/kg p.c., et l'extrait **EDs** à 100 et à 200 mg/kg p.c., sont deux extraits de *H. scoparia* qui ont montré un effet important dans l'augmentation de la tolérance orale au glucose chez des rats normaux. Mais ces deux extraits n'ont montré aucun effet significatif sur la glycémie à jeun des rats normaux.

5. Effet antidiabétique de l'extrait méthanol (EMs) à long terme (21 jours) chez les rats normaux et les rats diabétiques

5.1. Effet de l'extrait EMs sur la glycémie

L'extrait **EMs** a été administré chez des rats normaux et des rats rendus diabétiques par la streptozotocine (60mg/kg p.c.), à une dose quotidienne de 300 mg/kg p.c., pendant 21 jours. Ainsi les résultats obtenus de leurs effets sur la glycémie à jeun sont montrés sur la figure 19.

Chez les rats normaux traités par l'extrait **EMs** et les rats témoins traités par le tween 80(0,8%), la glycémie à jeun a été stable durant les 21 jours du traitement, aucune différence significative n'a été observée, à noter une glycémie de 64.50 ± 1.93 mg/dl (n=12) au jour 1 et 78.33 ± 2.99 mg/dl au jour 7, puis 81.91 ± 3.38 mg/dl au jour 14 et enfin 74.60 ± 2.38 mg/dl au 21 jour.

Quant aux rats diabétiques, une hyperglycémie a été notée suite au traitement préalable des rats par la streptozotocine (60 mg/kg.p.c). Le traitement quotidien des rats par l'EMs n'a pas réussi à diminuer cette hyperglycémie, qui est restée persistante durant les 21 jours, et a gardé le même profil que soit chez les rats traités par l'extrait EMs ou le tween 80(0,8%). A noter une hyperglycémie de 311.62 ± 8.33 mg/dl (n=10) au jour 1, de 321.12 ± 12.07 mg/dl (n=10) au jour 7, puis 344.75 ± 30.25 mg/dl (n=10) au jour 14 et 408.43 ± 7.07 mg/dl (n=10) au 21 jour.

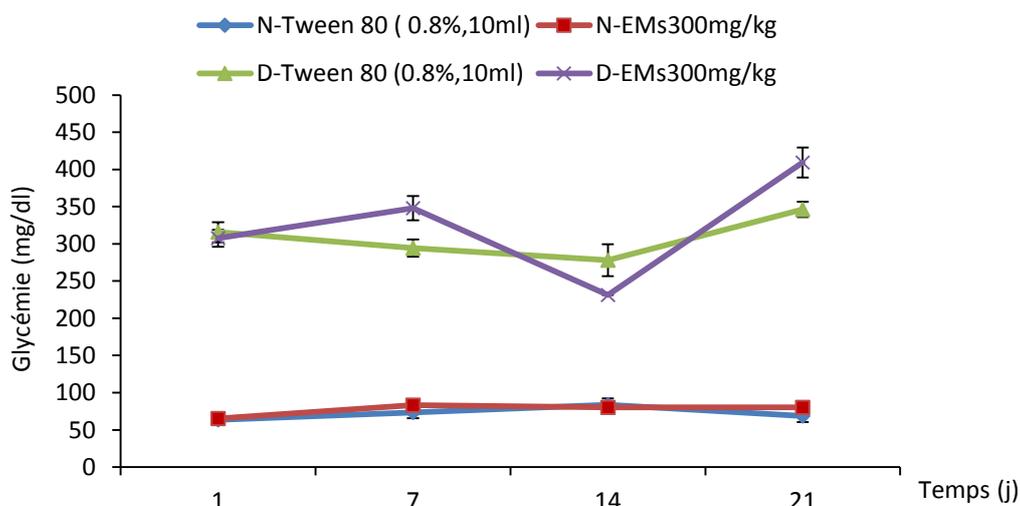


Figure19 : Variations de la glycémie chez les rats normaux (N) et diabétiques (D) traités par l'extrait méthanol (EMs) de *Hammada scopria*, pendant 21 jours . (Moyenne \pm ESM).

5.2. Effet de l'extrait EMs sur le poids corporel

L'effet de l'extrait EMs sur l'évolution du poids corporel des rats normaux et diabétiques, durant 21 jours de traitement est montré sur la figure 20.

Le poids des rats normaux traités par l'extrait EMs est resté stable durant les 21 jours du traitement, et il a suivi le même profil que les rats témoins, sans aucune différence significative. En revanche chez les rats diabétiques que soit ceux traités par l'extrait EMs ou le tween 80(0,8%), le poids des rats a significativement diminué au 7^e j (-9.49 ± 2.27 % ; $p < 0.01$) au 14^e jour (-20.64 ± 2.80 % , $p < 0.01$) et au 21 j (-24.64 ± 2.88 % ; $p < 0.01$) en suivant une courbe descendante, et cela témoigne d'un diabète expérimental persistant chez les rats, malgré le traitement envisagé par l'extrait EMs.

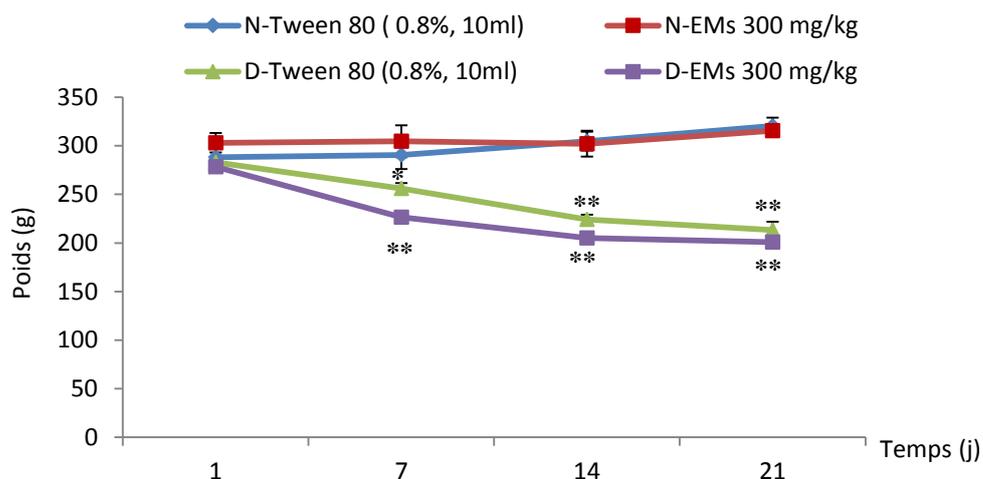


Figure 20 : Variations du poids corporel chez les rats normaux (N) et diabétiques (D) traités par l'extrait méthanol (EMs) de *Hammada scoparia*, pendant 21 jours. (Moyenne \pm ESM, n=5ou6.*p< 0,05; ** p<0,01).

5.3. Effet de l'extrait EMs sur les quantités de l'aliment et de l'eau consommées

Durant les 21 jours du traitement des rats normaux et diabétiques avec l'extrait **EMs**, nous avons fait des mesures quotidiennes des quantités de l'aliment et de l'eau consommées par les animaux, les résultats obtenus sont indiqués sur les figures 21 et 22.

Chez les rats normaux traités par le tween 80 (0,8%), une augmentation statistiquement significative ($P<0,01$) de la consommation de l'aliment a été observée au cours de la 2^e semaine et la 3^e semaine du traitement, par contre cette augmentation n'a pas été observée chez les rats normaux traités par l'extrait **EMs**, chez lesquels la quantité de l'aliment est restée stable d'une semaine à une autre (Figure 21).

D'une façon générale, chez les rats diabétiques, la consommation de l'aliment est devenue deux fois plus importante que celle observée chez les rats normaux, une conséquence directe de l'effet du diabète expérimental prononcé chez les rats.

Chez les rats diabétiques témoins, traités par le tween 80 (0,8%), une augmentation statistiquement significative dans la consommation de l'aliment a été observée au cours de la 2^e semaine du traitement. Par contre, chez les rats traités par l'extrait **EMs**, aucune variation significative n'a été observée ; la consommation de l'aliment est restée plus ou moins stable durant les trois semaines du traitement (Figure 22).

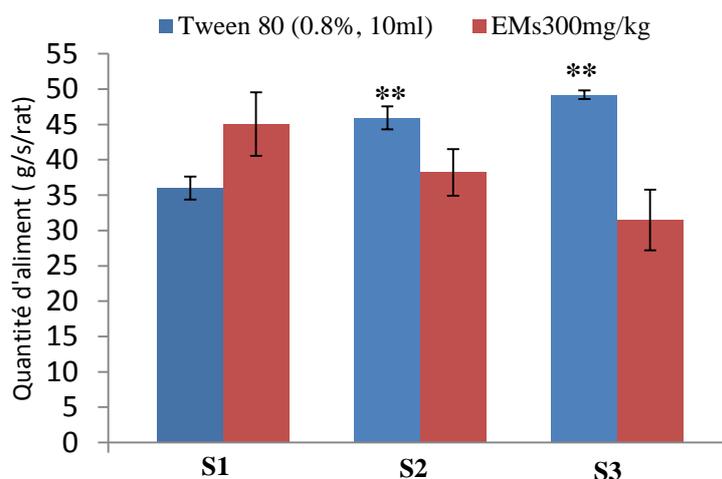


Figure 21 : Variations de la quantité d'aliment consommée chez les rats normaux traités par l'extrait méthanol (EMs) de *Hammada scoparia*. (Moyenne \pm ESM. **p < 0,01).

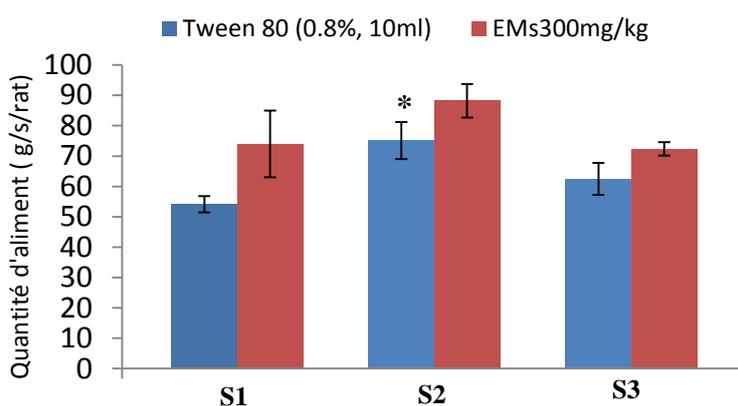


Figure 22 : Variations de la quantité d'aliment consommée chez les rats diabétiques traités par l'extrait méthanol (EMs) de *Hammada scoparia*. (Moyenne \pm ESM. *p < 0,05).

L'effet de l'extrait **EMs** sur la consommation de l'eau chez les rats normaux et diabétiques, durant 21 jours de traitement est montré sur les figures 23 et 24.

Chez les rats normaux traités par l'extrait **EMs** et les rats témoins la consommation de l'eau a été presque la même, la comparaison des résultats n'a détecté aucune différence statistique (figure 23.)

Chez les rats diabétiques traités par l'extrait **EMs** ou traités par le tween 80, la consommation de l'eau est devenue presque 4 fois plus importante que celle enregistrée chez les rats normaux, et aucune différence n'a été observée entre les groupes de diabétiques traités et les témoins (Figure 24.)

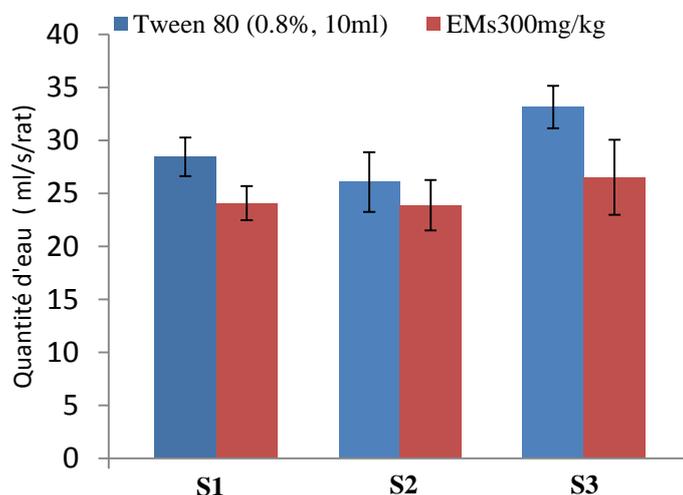


Figure 23 : Variations de la quantité de l'eau consommée chez les rats normaux traités par l'extrait méthanol (EMs) de *Hammada scoparia* pendant 21 jours. (Moyenne \pm ESM).

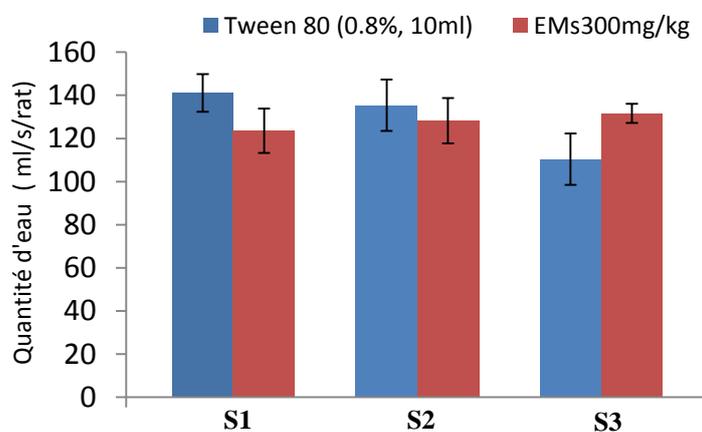


Figure 24 : Variations de la quantité de l'eau consommée chez les rats diabétiques traités par l'extrait méthanol (EMs) de *Hammada scoparia* pendant 21 jours. (Moyenne \pm ESM).

✓ A la lumière de ces résultats, il est bien clair que l'extrait **EMs** à 300 mg/kg p.c., administré oralement pendant 21 jours à des rats normaux ou des rats diabétiques, ne présente aucun effet antidiabétique significatif.

5.4. Effet de l'extrait EMs sur les paramètres sanguins chez les rats normaux et diabétiques

Après administration orale et quotidienne de l'extrait **EMs** à 300 mg/kg, pendant 21 jours, un prélèvement sanguin a été effectué chez tous les rats, et un dosage de quelques paramètres sanguins a été réalisé. Le but de cette expérience a été de voir l'effet de l'extrait sur le taux de l'urée, de la créatinine, de la transaminase glutamate oxalate (TGO) et de la transaminase glutamate pyruvate (TGP), les résultats obtenus sont montrés dans le tableau n°34.

L'interprétation des résultats indiquent une augmentation significative, de l'urémie, de la créatinémie, ainsi que des activités des enzymes, TGO et TGP, et ceci chez tous les rats diabétiques en comparaison avec les rats non diabétiques. Cette augmentation des paramètres sanguins est la conséquence de l'installation d'un diabète expérimental chez les rats.

Concernant les taux sanguins de l'urée et de la créatinine, mesurés au 21 jour chez les rats normaux traités par l'extrait **EMs**, ne montrent aucune variation significative en comparaison avec les taux mesurés chez les rats témoins traités par le tween 80. La même observation est notée chez les rats diabétiques, lorsque nous comparons le lot expérimental et le lot témoin. Nous constatons ainsi que l'extrait **EMs** est sans effet notable sur l'urémie et la créatinémie, des rats normaux et diabétiques.

Pour les résultats concernant les activités enzymatiques des TGO et TGP chez les rats normaux, nous avons noté une diminution significative ($P < 0,05$), dans l'activité de la TGO chez les rats traités par l'extrait **EMs** en comparaison avec les rats témoins. Par contre l'activité de la TGP est restée la même, sans aucune variation notable. En revanche, aucune variation significative n'a été observée, dans les activités des deux enzymes lorsqu'elles ont été mesurées chez les rats diabétiques expérimentaux et témoins.

Tableau n°34: Paramètres sanguins dosés au 21^e jour, chez les rats normaux et diabétiques.

Paramètres	Rats Normaux		Rats Diabétiques	
	Tween 80 (0,8%) 10ml/kg p.c.	EMs 300 mg/kg p.c.	Tween 80 (0,8%) 10ml/kg p.c.	EMs 300 mg/kg p.c.
Urée (mg/dl)	30 ± 0.83	32.8 ± 1.35	90.5 ± 3.30***	85 ± 5***
Créatinine (mg/dl)	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.69 ± 0.01**	0.72 ± 0.05**
TGO (UI/l)	106.12 ± 7.54	88 .24 ± 0.84*	132.45 ± 77.20**	157.5 ± 49.96**
TGP (UI/l)	39.98 ± 6,71	42.88 ± 1.61	161.20 ± 67.41***	161.77 ± 76.74***

Les rats ont été traités quotidiennement par une dose de 300 mg/kg de l'extrait EMs.

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM; n=5.

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

5.5. Effet de l'extrait EMs suite à un test de tolérance orale au glucose, réalisé après 14 jours de traitement chez les rats normaux et diabétiques

Après 14 jours de traitement des rats, un TTOG a été nécessaire pour évaluer la réponse des rats à une charge orale au glucose, les résultats obtenus chez les rats normaux et diabétiques sont représentés dans les figures 25 et 26 respectivement.

Chez les rats normaux, l'extrait **EMs** a été efficace et a diminué significativement ($p < 0.05$) le pic de l'hyperglycémie observé à 60 min chez les rats traités par le tween 80 (0,8%) (figure 25), ce qui confirme l'effet antihyperglycémiant de l'extrait. En revanche l'extrait **EMs** n'a pas été de la même efficacité chez les rats diabétiques, et le pic avait la même allure que soit chez les rats expérimentaux ou témoins (figure 26).

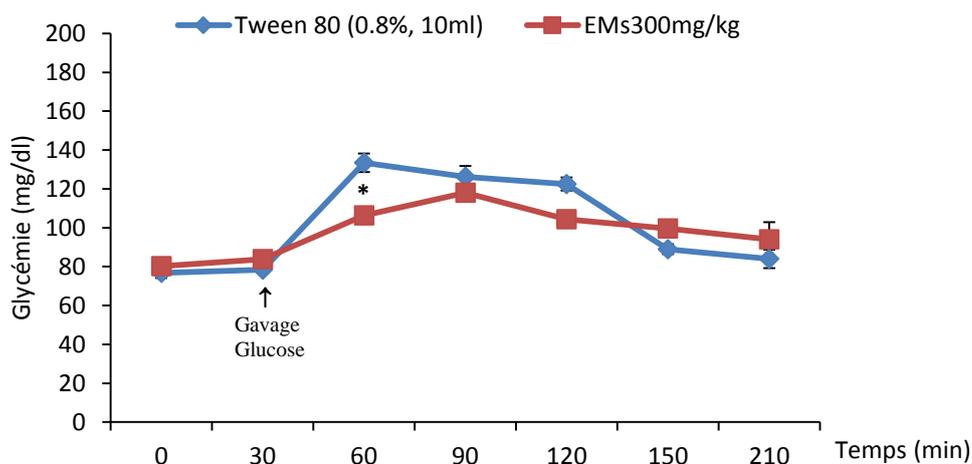


Figure 25 : Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extraits méthanol(EMs) de *Hammada scoparia* et soumis à un test de tolérance orale au glucose au 14^e jour. (Moyenne ± ESM, n=5. * p< 0,05).

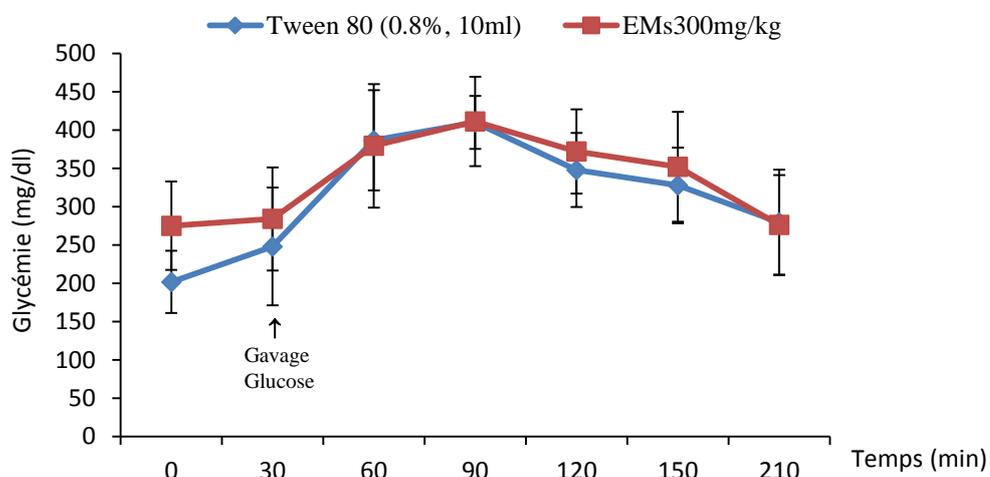


Figure 26 : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extraits méthanol (EMs) de *Hammada scoparia* et soumis à un test de tolérance orale au glucose au 14^e jour. (Moyenne ± ESM, n=5).

6. Effet de l'extrait EMs sur la glycémie postprandiale et les quantités du glycogène hépatique et musculaire chez les rats normaux

6.1. Effet de l'extrait EMs sur la glycémie postprandiale

L'effet de l'extrait **EMs** à 300 mg/kg p.c., sur la glycémie des rats normaux non à jeun est montré sur la figure 27.

La glycémie postprandiale des rats traités par l'extrait **EMs** suit le même profil que celle des rats traités par le Tween 80 (0,8%), et aucune différence significative n'est observée.

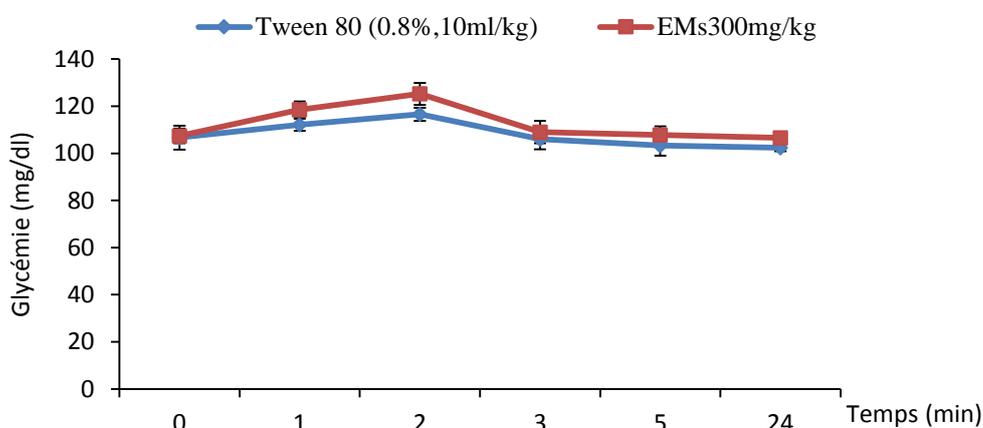


Figure 27 : Variations de la glycémie postprandiale chez les rats normaux traités par l'extrait méthanol (EMs) de *Hammada scoparia*. (Moyenne \pm ESM, n=5).

6.2. Effet de l'extrait EMs sur les quantités du glycogène hépatique et musculaire

Les résultats du dosage du glycogène musculaire et hépatique sont représentés dans le tableau n°35, et ont été déduits de la courbe d'étalonnage du glucose représentée sur la figure 28.

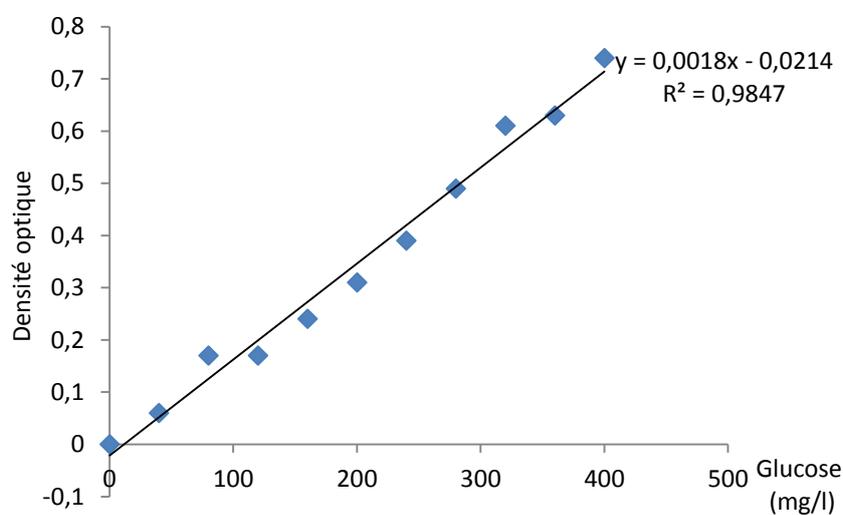
D'après ces résultats, les quantités du glycogène hépatique et musculaire sont presque les mêmes, que soit chez les rats expérimentaux traités par l'extrait **EMs** (300 mg/kg p.c) ou les témoins traités par le tween 80 (0,8%).

✓ A la lumière de ces résultats, nous pouvons dire que l'extrait **EMs** ne diminue pas la glycémie postprandiale chez les rats normaux, et ne favorise pas le stockage du glycogène hépatique et musculaire dans ces mêmes rats.

Tableau n°35: Quantités du glycogène hépatique et musculaire chez les rats normaux

Traitement des rats	glycogène hépatique % (g/100g de foie)	glycogène musculaire % (g/ 100g de muscle)
Extrait EMs 300 mg/kg p.c.	3,40 ± 0.36	0.31 ± 0.04
Tween 80 (0,8%, 10ml/kg p.c.)	4.13 ± 0.49	0.23 ± 0.01

Chaque valeur représente une moyenne ± ESM, n= 8.

**Figure 28 :** Courbe étalon du glucose ($\lambda=540$ nm).

7. Effet des fractions (A→D) suite à un test de tolérance orale au glucose

Dans un but de cerner la famille responsable de l'effet antihyperglycémiant observé avec l'extrait EMs, nous avons procédé à son fractionnement sur gel de silice. Différentes fractions ont été obtenues, et l'effet de chaque fraction sur l'hyperglycémie provoquée chez les rats normaux, a été testé. Les résultats sont montrés sur la figure n°29.

La comparaison des courbes glycémiques des quatre fractions ne montre aucune différence statistiquement significative, qui peut indiquer un effet sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale. Par contre un effet antihyperglycémiant a été encore démontré avec l'extrait **EMs** non fractionné, à 30min ($p<0.05$) et à 60 min ($p<0.01$). Ce résultat indique que le fractionnement de l'extrait **EMs** sur colonne de chromatographie, a masqué

son effet antihyperglycémiant, et ceci pourrait être dû à deux raisons, soit à un défaut dans les doses des différentes fractions, ou soit à une perturbation de l'effet synergétique de nos molécules antidiabétiques suite au fractionnement.

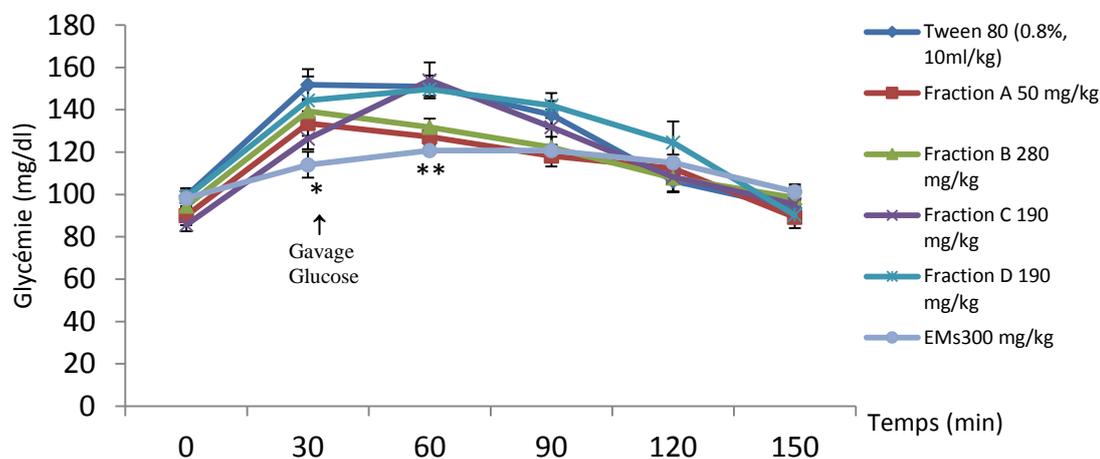


Figure 29: Variations de la glycémie chez les rats normaux traités par les différentes fractions de *Hammada scoparia*, et soumis à un test de tolérance orale au glucose.
(Moyenne \pm ESM. * P < 0,05, **P < 0,01).

Dans plusieurs laboratoires à travers le monde, les travaux sur les plantes médicinales représentent un domaine de recherche de grande importance, et ceci grâce à la richesse de ces remèdes naturels en molécules thérapeutiques, qui peuvent être à l'origine de nouveaux médicaments pour de nombreuses maladies.

Ainsi, plusieurs activités biologiques ont été prouvées pour les plantes médicinales, comme l'activité anticancéreuse (**Pezzuto, 1997 ; Cai et al., 2004 ; Shah et al., 2013**), l'activité antifongique (**Svetaz et al., 2010**) et l'activité antibactérienne (**Essawi et Srour, 2000; Hara-Kudo et al., 2004**). Nous nous sommes intéressés à l'activité antidiabétique, et cela à cause de l'ampleur que prend le diabète sucré comme maladie à l'échelle mondiale. Ce fléau impose l'accentuation des travaux de recherche, pour la découverte de nouvelles solutions thérapeutiques efficaces et moins coûteuses.

Le nombre des plantes connues par leur activité antidiabétique est très important, nous avons choisi *Hammada scoparia*, qui est une espèce, du genre *haloxylon* de la famille des chénopodiacées, connue sous le nom vernaculaire de « Remth ». *H. scoparia* est utilisée par la population dans nombreuses régions comme plante médicinale, à laquelle des scientifiques se sont largement intéressés, et plusieurs de ses activités biologiques ont été étudiées. Ainsi les activités hépato-protective et antioxydante (**Bourogaa et al., 2013 ; Bourogaa et al., 2014**), l'activité molluscicide (**Mezghani-Jarraya et al., 2009**), et l'activité de l'inhibition de la mélanogenèse, (**Chao et al., 2013**), ont été bien exploitées. Le présent travail étudié l'activité antidiabétique de *H. scoparia*, que selon nos connaissances actuelles, il n'ya pas d'expériences menées sur cette activité de la plante.

L'activité antidiabétique de *H. scoparia* a été évaluée *in vivo* chez des rats *Wistar* normaux et rendus diabétiques par la streptozotocine, différents extraits ont été testés, et trois procédures ont été suivies. La première procédure consiste à tester l'effet de la plante, sur la glycémie à jeun des rats normaux. Après un jeûne de 16 heures, l'animal se trouve dans un état post-absorptive, tout extrait ou molécule susceptibles de diminuer la glycémie dans ces conditions, doivent agir en inhibant la production hépatique et rénale du glucose soit directement, soit indirectement par la libération de l'insuline (**Shrayyef et Gerich, 2010**). La deuxième procédure teste l'effet de la plante sur l'hyperglycémie provoquée chez des rats normaux, suite à une charge orale en glucose ; ainsi tout extrait ou molécule capables de diminuer l'hyperglycémie, peuvent intervenir en inhibant l'absorption

intestinale du glucose, en favorisant l'utilisation du glucose par le muscle et le tissu adipeux, ou en stimulant la sécrétion de l'insuline par le pancréas (**Shrayyef et Gerich, 2010**). Tandis que la troisième procédure, teste l'effet de la plante suite à une administration quotidienne des extraits, à des rats normaux et des rats rendus diabétiques par la streptozotocine.

Chez les rats diabétiques, l'absence importante de l'insuline, crée une hyperglycémie permanente, dans ce cas toute molécule antidiabétique, doit imiter l'effet de l'insuline, en agissant par l'augmentation de l'absorption du glucose au niveau du muscle et du tissu adipeux, et par l'inhibition de la production hépatique du glucose et de la libération des acides gras libres (**Shrayyef et Gerich, 2010**).

Le diabète expérimental, est créé chez les rats par la streptozotocine, qui est une glucosamine nitroso-urée isolée pour la première fois à partir de *streptomyces sachromognèse* (**Herr et al., 1967**). C'est une molécule cytotoxique spécifique des cellules β -pancréatiques utilisée depuis longtemps pour l'induction du diabète expérimental chez l'animal. Nombreux sont les mécanismes de l'action diabétogénique de la streptozotocine proposés, principalement l'alkylation de l'ADN (**Murata et al., 1999; Bolzán et Bianchi, 2002**), et l'augmentation du taux des protéines O-glycosylées dans les cellules β -pancréatiques (**Konrad et al., 2001**). Ainsi toutes ces réactions mènent à la mort cellulaire, et à des altérations métaboliques liées en premier lieu à un déficit de l'insuline (destruction sélective des cellules β -pancréatiques sécrétrices), de plus le degré et la sévérité du diabète dépend surtout de la dose injectée.

La dose de la streptozotocine utilisée dans notre expérience a été efficace pour créer un état diabétique caractérisé par une hyperglycémie de 311.62 ± 8.33 mg/dl (n=10), après 72h de l'injection intrapéritonéale. Des expériences réalisées avec la même dose ont montré des résultats semblables. Ainsi l'injection de la STZ à 60 mg/kg par voie intrapéritonéale à des rats a provoqué un diabète après 24 à 48 heures, avec une glycémie de 440 ± 10 mg/dl (n=12) (**Rossini et al., 1977**). D'autre part, une injection de la STZ à 55 et 65 mg/kg par voie intraveineuse à des rats, a provoqué une hyperglycémie de 340 ± 79 mg/dl (n=6) et de 330 ± 37 mg/dl (n=8) respectivement après 24 heures (**Junod et al., 1969**). A noter que des doses supérieures (100 mg/kg) de la STZ, ont été responsables d'un diabète sévère chez des rats, caractérisé par la destruction de plus que 90% des cellules

pancréatiques, le seul traitement possible pour ces rats est l'insuline, sinon ils meurent dans 2 à 3 jours (**Junod et al., 1969**).

L'utilisation des solvants ayant des propriétés chimiques et physiques différentes, dans les procédés d'extractions, a permis l'obtention des extraits avec une composition en métabolites secondaires et des activités biologiques différentes. En ce qui en suit nous allons discuter l'effet de chaque extrait préparé à partir de *H. scoparia* sur la glycémie des rats selon la procédure expérimentale utilisée.

L'extrait aqueux (EA) de *H. scoparia*, a été testé chez les rats normaux et les rats diabétiques, dans un premier but de confirmer son effet antidiabétique proclamé dans les études ethnobotaniques (**Lamchouri et al., 2012 ; Allali et al., 2008**). Chez les rats normaux, l'administration orale de l'extrait EA à des doses croissantes de 100 mg/kg à 500 mg/kg, n'a montré aucune efficacité pour faire diminuer la glycémie à jeun, suivie pendant 360 min. Le même résultat a été observé, lorsque le même extrait à 100 mg/kg et à 500 mg/kg, a été testé lors d'une hyperglycémie temporaire, provoquée par voie orale par une charge en glucose (2g/kg). De même le gavage quotidien pendant sept jours de l'extrait EA à une dose de 200mg/kg p.c., chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine, n'a montré aucune correction de l'hyperglycémie, ou des signes habituels du diabète sucré ; la polyphagie, la polydipsie et la perte du poids corporels ont persisté durant toute l'expérience.

Bien que *H. scoparia*, est citée comme plante antidiabétique dans les études ethnobotaniques, nos résultats montrent l'inefficacité de l'extrait EA sur la glycémie des rats normaux et des rats diabétiques. Ceci peut être expliqué par la méthode de préparation de l'extrait EA, qui a été une décoction pendant une heure. En revanche, les principales études des activités biologiques de *H. scoparia* réalisées chez le rat, ont été prouvées avec des extraits alcooliques (**Bourogaa et al., 2013 ; Chao et al., 2013**), ou des macéras préparés pendant plusieurs heures (48 heures) (**Bourogaa et al., 2014**). Nous suggérons ainsi que les principes actifs de la plante sont plus épuisés en présence des alcools ou en macération dans l'eau pendant plusieurs heures.

Au contraire de ce qui a été souhaité, l'extrait EA a montré une hyperglycémie, chez les rats normaux, et cela principalement avec la dose de 500 mg/kg. Cela nous laisse à

suggérer que l'extrait aqueux pourrait avoir un effet hyperglycémiant. Cet effet peut être expliquée, par la présence de métabolites secondaires hyperglycémiant, en fait il existe des molécules non glucidiques capables d'augmenter la glycémie (**Luna et Feinglos, 2001**). D'autre part, une autre cause de l'hyperglycémie observée chez les rats, peut être le stress induit lors de leur manipulation. Des expériences réalisées sur des animaux exposés à un stress extérieur, ont montré l'apparition d'une hyperglycémie. L'origine de cette dernière, a été attribuée chez des chats à une augmentation du taux du lactate, qui a son tour active, la néoglucogenèse (**Rand et al., 2002**), et chez des rats à une augmentation du taux des corticostéroïdes (**Abel, 1993**).

Le test de l'activité antidiabétique de *H. scoparia*, à court terme chez les rats normaux à jeun, des deux extraits alcooliques EE et EM, à la dose de 500 mg/kg p.c., a été non significatif. Ce résultat montre encore une deuxième fois l'absence de l'effet de la plante sur la glycémie à jeun des rats normaux. D'autre part, après une charge de glucose, l'hyperglycémie observée chez les rats normaux témoins et les rats préalablement traités par l'extrait EE à 500 mg/kg, a été à l'inverse significativement atténuée chez les rats traités par l'extrait EM à la même dose. Ces données nous ont permis de suggérer que l'extrait EM est surtout caractérisé par une activité antihyperglycémiant. A noter que l'extrait EM se distingue de l'extrait aqueux par la présence des flavonoïdes et l'absence des mucilages.

D'autre part, le test de tolérance orale au glucose, des extraits EAc et EnB, obtenus à partir de l'extrait EM, montre l'existence de plusieurs molécules responsables de l'activité antihyperglycémiant de *H. scoparia*, et qui peuvent appartenir aux familles des alcaloïdes, des flavonoïdes et des saponosides. De plus l'effet peut également se manifester même à faible dose, 14 mg/kg pour l'extrait EAc.

L'utilisation de l'appareil de soxhlet, a permis une extraction plus sélective de molécules de même nature chimique. Ainsi quatre extraits ont été obtenus, EHs, EDs, EAc et EMs. Un test de tolérance orale au glucose réalisé chez des rats normaux traités préalablement par chaque extrait, montre bien que des quatre, deux sont antihyperglycémiant, l'extrait EMs à la dose de 300 mg/kg et qui est enrichi en alcaloïdes, flavonoïdes et saponosides, et l'extrait EDs aux doses de 100 mg/kg et 200 mg/kg et qui

enrichi en alcaloïdes et stéroïdes. Cet effet a été comparable à celui du glibenclamide, qui est un antidiabétique oral testé à 0,1mg/kg.

Toutes ces familles de métabolites secondaires, sont bien classées, parmi les molécules naturelles à pouvoir antidiabétique intéressant. Ainsi Marles et Farnsworth, ont pu recenser à partir de 150 plantes, 200 molécules purifiées capables de diminuer le taux du glucose sanguin. Parmi ces molécules les alcaloïdes prennent la deuxième position avec 38 structures chimiques après les glucides (66 structures chimiques), les terpénoïdes (17 structures chimiques) sont en quatrième position alors que les flavonoïdes (7 structures chimiques) et les stéroïdes (7 structures chimiques) sont en sixième position (**Marles et Farnsworth, 1995**). De plus ces molécules ont fait l'objet de plusieurs expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* et elles ont montré des mécanismes d'action très divers.

En ce qui concerne les alcaloïdes, la berbérine isolée de *Berberis vulgaris*, a montré une amélioration de la tolérance du glucose chez la souris db/db, et une augmentation de l'action de l'insuline chez des rats (**Lee et al., 2006**). D'autre part la trigonelline, qui est le principal alcaloïde isolé de *Trigonella foenum-graecum*, son effet antidiabétique s'explique par une régénération des cellules β -pancréatiques, et une augmentation de la sécrétion de l'insuline (**Zhou et al., 2012**). Des alcaloïdes stéroïdes isolés de *Veratrum nigrum*, ont été étudiés *in vitro*, et ont montré une amélioration du transport périphérique du glucose, dans des cellules du muscle squelettique (**Kang et al., 2015**).

Les flavonoïdes sont considérés comme des potentielles molécules pour le traitement du diabète sucré et de ses complications(**Chen et al., 2015**). L'epigallocatechine gallate un flavonoïde isolé du thé vert, a montré un effet dans la diminution du taux du glucose chez l'animal et plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés comme la diminution de la production hépatique du glucose, (**Waltner-Law et al., 2002**). En plus la quercétine et le kaempférol sont deux flavonoïdes, isolés de *Euonymus alatus*, et qui ont montré un effet antidiabétique expliqué par la stimulation du transport du glucose induit par l'insuline au niveau des adipocytes matures, et par leur effet comme des agonistes des PPAR (**Fang et al., 2008**).

Les saponosides sont aussi connus par leur activité antidiabétique, et ceux de nature triterpénoïdes sont considérés comme de potentielle molécules très prometteuse pour le développement de nouveaux médicaments antidiabétiques (**Li et al., 2004**). Le ginsenoside par exemple est un constituant majoritaire de *Panax ginseng*, son administration quotidienne pendant 12 jours, a rendu des souris ob/ob, normoglycémiques, avec une augmentation de leur tolérance au glucose (**Attele et al., 2002**). Des triterpènes pentacycliques, sont considérés par Wen et ces collaborateurs comme une classe de molécules prometteuses comme des agents hypoglycémiants, la même équipe a proposé qu'ils agissent en partie par l'inhibition de la glycogène phosphorylase, une enzyme clé dans l'hydrolyse du glycogène (**Wen et al., 2008**). Des saponosides isolés d'*Anabasis articulata*, une plante de la même famille que *H. scoparia*, ont montré un contrôle potentielle de la glycémie, qui peut être le résultat de l'augmentation de la sécrétion de l'insuline (**Metwally et al., 2012**).

Pour mieux exploiter l'effet antidiabétique de *H. scoparia* prouvé dans cette première partie, nous avons entrepris d'autres expériences avec l'extrait EMs et aussi avec ses fractions obtenues par colonne de chromatographie. A noter aussi, que l'extrait EDs mérite aussi des expériences ultérieures.

Le gavage oral quotidien pendant 21 jours, de l'extrait EMs à 300 mg/kg, à des rats normaux n'a été accompagné par aucun effet notable sur la glycémie à jeun, cette dernière est restée la même en comparaison avec celle des rats témoins. En revanche, une prise de poids statistiquement significative, a été observée chez les rats traités par l'extrait EMs. Cet effet positif peut être expliqué en partie par l'absence des effets nocifs de l'extrait. En fait le suivi du poids corporel, est un bon indicateur pour révéler les effets secondaires de l'utilisation de substances thérapeutiques (**Tofovic et Jackson, 1999 ; Raza et al., 2002**).

De même l'activité des transaminases, TGO et TGP, et le dosage de l'urée et de la créatinine, ont été mesurés chez les rats normaux, après 21 jours de traitement avec l'extrait EMs à 300 mg/kg/jour. Aucune différence n'a été mentionnée entre les paramètres trouvés chez les rats traités par l'extrait EMs ou les rats témoins. Le changement plasmatique du taux des enzymes, comme les transaminases, peut indiquer un dommage au niveau des tissus (**Kuete, 2014**), principalement le foie (**Kew, 2000**), par contre le changement des taux de l'urée et de la créatinine plasmatique indique des altérations

rénales. Ces résultats montrent bien que l'extrait EMs, n'a pas d'effet nocif sur le foie ou le rein.

Le traitement de rats diabétiques par l'extrait EMs pendant 21 jours, a montré l'absence de l'effet antidiabétique de *H. scoparia* chez les rats, ce ci a été constaté par une hyperglycémie persistante, une chute du poids corporel importante, une polyphagie et une polydipsie chez les deux lots de rats, que soit expérimentaux ou témoins. Ce résultat, nous laisse à suggérer, que la correction du diabète ne peut se faire qu'en présence de l'insuline, ou d'une molécule insulino-mimétique. Nous suggérons aussi que l'extrait EMs peut être efficace chez des rats ayant un diabète modéré. Cette condition expérimental peut être réalisée, puisque le diabète induit par la streptozotocine est dépendant de la dose injectée (**Junod et al., 1969**).

Le dosage des paramètres sanguins a montré un taux élevé de la TGO, TGP chez les rats diabétiques. Ceci est bien corrélé avec les complications qui résultent de l'action de la streptozotocine. Des études ont montré que les cellules hépatiques des rats diabétiques, traités par la streptozotocine, sont irréversiblement détruites, ce qui provoque la libération des enzymes TGO et TGP dans le sang (**Drotman et Lawhorn, 1978 ; Daisy et al., 2008**). De même les taux de l'urée et la créatinine sont élevés chez les rats diabétiques, et ceci est indicateur d'un dysfonctionnement rénale induit par l'hyperglycémie qui accompagne le diabète (**El-Demerdash et al., 2005**).

Il est bien clair que *H. scoparia* n'a pas réussi à corriger les troubles sanguins induits par la streptozotocine, au contraire de ce résultat plusieurs plantes ont montré un effet positif en diminuant les taux des TGO, TGP, de l'urée et de la créatinine chez des rats diabétiques , *Allium cepa* et *Allium sativum* (**El-Demerdash et al., 2005**), *Curcuma longa* (**Sharma et al., 2006**) *Punica granatum* (**Ankita et al., 2014**) sont des exemples.

L'effet de l'extrait EMs de *H. scoparia* a été aussi testé sur la glycémie des rats non à jeun, la glycémie postprandiale des rats traités par l'extrait EMs suit le même profil que celle des rats traités par le Tween 80. Aucune différence significative n'est observée, de plus le contenu du glycogène hépatique et musculaire, a été identique dans les deux lots. L'estimation du contenu du glycogène intracellulaire est un marqueur de l'activité insulino-mimétique (**Vats et al., 2003**). Le glycogène est la forme primaire du stockage du

glucose, et son niveau dans plusieurs tissus principalement le foie et le muscle squelettique est une réflexion direct de l'activité de l'insuline, qui régule le dépôt du glycogène par la stimulation de la glycogène synthase et l'inhibition de la glycogène phosphorylase (**Sharma et al., 2008**). Cette expérience, nécessite d'autres paramètres à doser, pour pouvoir mieux l'interpréter, comme le dosage des concentrations intramusculaires du glucose 6-phosphate et l'ATP, ainsi qu'un dosage des autres paramètres sanguins principalement l'insuline (**Herling, 2006**).

Le fractionnement de l'extrait EMs sur colonne de chromatographie, a permis d'obtenir quatre fractions plus ou moins purifiées, chaque fraction a été testée pour son effet possible sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale chez les rats normaux. Les tests phytochimiques, ont révélé la présence des flavonoïdes dans la fraction FA, des alcaloïdes et des saponosides dans la fraction FB, des alcaloïdes dans la fraction FC et des saponosides dans la fraction FD. Les résultats du test de tolérance orale au glucose, indique qu'au contraire de l'extrait EMs qui a été antihyperglycémiant, les fractions obtenues se sont montrées sans effet. Ce résultat peu être expliqué par l'existence d'une synergie entre les molécules antidiabétiques actives de l'extrait EMs. En fait cette propriété a été prouvée pour plusieurs molécules, comme la combinaison antihyperglycémiant d'un alcaloïde la berbérine avec un acide phénolique, l'acide férulique (**Chen et al., 2012**). D'autre part, l'équipe de Zhang est à la recherche, d'une de molécules antidiabétiques qui agissent en synergie en ciblant à la fois, la glycogène phosphorylase et la glucokinase, deux enzymes clés du métabolisme glucidique(**Zhang et al., 2012**). De plus l'existence de plusieurs formulations thérapeutiques composées de plusieurs plantes, indiquent que l'effet biologique de ces préparations est le résultat d'une synergie entre les composés actifs plutôt qu'à l'action d'une seul principe actif (**Wang et al., 2005**), et plusieurs formulations sont connues en médecines chinoises pour le traitement du diabète sucré (**Tao et al., 2007**).

D'après les résultats des expériences réalisées et leur discussion, nous suggérons que trois classes de métabolites secondaires peuvent être à l'origine de l'effet antihyperglycémiant observé avec l'extrait EMs de *H. scoparia* ; les alcaloïdes, les flavonoïdes et les saponosides et qu'elles agissent le plus probable en synergie. D'autre part ces molécules peuvent agir en inhibant le transport intestinal du glucose, ou en stimulant la sécrétion de l'insuline, ou en stimulant l'utilisation périphérique du glucose.

Il a été montré que les classes des métabolites secondaires, auquel appartiennent les principaux constituants phytochimiques de *H. scoparia*, sont des molécules antidiabétiques prometteuses. Ainsi les trois classes d'alcaloïdes isolés de *H. scoparia*, les tetrahydroisoquinolines, les indoles et les β - carbolines (**El-Shazly et Wink, 2003 ; Benkrief et al., 1989**) sont bien connues par leur effet antidiabétique. Les tetrahydroisoquinolines sont des molécules qui représentent une source prometteuse comme des antidiabétiques agissant comme des non thianozidines agonistes des PPARs (**Henry et al., 2006**). Les alcaloïdes indoles ont été reportés de stimuler le captage du glucose au niveau de l'adipocyte (**Shittu et al., 2010**), alors que les β - carbolines ont montré un effet dans le contrôle de l'expression PPARs, et dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (**Waki et al., 2007**). Trois flavonols glycosides ont été isolés de *H. scoparia* (**Benkrief et al., 1989 ; Salah et al., 2002**), cette classe de métabolites secondaires peut être efficace dans la diminution de l'hyperglycémie par sa partie glycosidique, qui peut agir avec les sucres digestives en inhibant leur hydrolyse ou par l'inhibition du transport intestinale du glucose (**Wenzel, 2013**).

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Avec l'ampleur que prend le diabète sucré à l'échelle mondiale comme maladie chronique en large propagation, la communauté scientifique est en travail continu pour la recherche de nouvelles thérapies plus efficaces, avec peu d'effets secondaires, et à la portée des malades, particulièrement ceux à faibles revenus. Dans ce contexte, les plantes médicinales représentent un champ d'expérimentation prometteur pour de nouvelles solutions.

Plusieurs travaux de recherche ont été réalisés sur *H. scoparia* à fin d'exploiter leurs différentes activités biologiques, ainsi les pouvoirs anticancéreux, antioxydant, antimalarique et molluscicide ont été bien étudiés. Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés au pouvoir antidiabétique de *H. scoparia*, une activité biologique de la plante non étudiée.

Les tests phytochimiques, sont en concordance avec les données bibliographiques, et confirment que *H. scoparia* est principalement riche en alcaloïdes, et contient des polyphénols, qui sont représentés surtout par des flavonoïdes et des acides phénols. Les structures chimiques de ces molécules sont bien élucidées. De plus nos résultats confirment la présence des saponosides avec une teneur considérable, et qui méritent d'être bien étudiés.

L'étude présente montre que la voie orale de l'administration des extraits préparés de *H. scoparia* est très peu toxique pour les animaux même à des doses élevées (2000 mg/kg pour les extraits EA et EM) ou à des doses journalières (300 mg/kg pour l'extrait EMs pendant 21 jours). De ce fait, d'autres études sont nécessaires pour mieux investir la toxicité aiguë et chronique de *H. scoparia*.

Les extraits efficaces de *H. scoparia*, EM, EMs et EDs ont montré une activité antihyperglycémiant significative, en améliorant la tolérance orale au glucose chez les rats normaux, cette propriété peut être expliquée par trois mécanismes d'action possibles ; une inhibition de l'absorption intestinale du glucose, une stimulation de la sécrétion de l'insuline, ou une amélioration du transport périphérique du glucose.

La dose de 60 mg/kg de la streptozotocine, utilisée dans nos expériences a créé un diabète expérimental sévère, que les extraits de *H. scoparia* ont été incapables de le

corriger, nous suggérons que ces extraits pourront être efficaces dans un modèle de diabète expérimental modéré.

Les molécules soupçonnées responsables de l'effet antihyperglycémiant observé avec les extraits de *H. scoparia*, appartiennent principalement aux familles des alcaloïdes des flavonoïdes et des saponosides. Nous avons constaté qu'il n'y a pas une seule molécule, mais plusieurs, et qui agissent le plus probable en synergie, ainsi un screening est essentiel pour isoler la fraction la plus active et d'étudier sa composition chimique.

Ce travail préliminaire focalisé sur la toxicité et les propriétés antidiabétiques de *H. scoparia*, ouvre la porte pour de nouvelles études, ainsi nous suggérons :

- Le fractionnement des deux extraits EMs et EDs, à fin d'obtenir des fractions plus purifiées, en quantité considérable, d'identifier leur composition phytochimique, et de tester leur activité antidiabétique à des doses non toxiques.
- Procéder à l'isolement de molécules pures à partir de *H. scoparia*, et tester leur effet antidiabétique à différentes doses, et d'étudier la relation structure – activité.
- Tester l'effet de la plante dans un type de diabète expérimental modéré comme celui induit chimiquement ou celui développé chez des animaux comme chez le rat des sables *Psammomys obesus* ou la souris mutée ob/ob.
- S'intéresser aux mécanismes d'actions des fractions et des molécules actives de *H. scoparia in vitro*, nous supposons ainsi l'étude de leur effet sur l'absorption intestinale du glucose, leur effet insulino-sécrétoire sur les cellules β -pancréatiques, et leur effet insulino-mimétique et insulino-sensible sur des cellules hépatiques ou musculaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelmeguid, N. E., Fakhoury, R., Kamal, S. M. & Al Wafai, R. J. (2010).** Effects of nigella sativa and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal Of Diabetes*, 2(4), 256-266.
- Abel, E. L. (1993).** Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiology & Behavior*, 54(2), 309-317.
- Abubakari, A.-R., Lauder, W., Jones, M., Kirk, A., Agyemang, C. & Bhopal, R. (2009).** Prevalence and time trends in diabetes and physical inactivity among adult west African populations: the epidemic has arrived. *Public Health*, 123(9), 602-614.
- Agence national de sécurité du médicament et des produits de santé. (1989).** Indice de mousse. Repéré à <http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Methodes-analytiques>.
- Ahrén, B. (2007).** Dpp-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 517-533.
- Akhani, S. P., Vishwakarma, S. L. & Goyal, R. K. (2004).** Anti-diabetic activity of zingiber officinale in streptozotocin-induced type I diabetic rats. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 56(1), 101-105.
- Alberti, K. G. M. M. & Zimmet, P. F. (1998).** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a who consultation. *Diabetic Medicine*, (15), 539-553.
- Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M., Tabti, B., Ghalem, S. & Benabadji, N. (2008).** Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 20(4), 2701-2710.
- American Diabetes Association (2012).** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 35 (supplement 1), S64-S71.
- American Diabetes Association (2014).** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(supplement 1), S81-S90.
- Ankita, P., Deepti, B. & Nilam, M. (2014).** Flavonoid rich fraction of Punica granatum improves early diabetic nephropathy by ameliorating proteinuria and disturbed glucose homeostasis in experimental animals. *Pharmaceutical biology* (0), 1-11.

- Ashwell G.(1957).** Colorimetric analysis of sugars. *Methods in Enzymology*. 3:73-105.
- Attele, A. S., Zhou, Y.-P., Xie, J.-T., Wu, J. A., Zhang, L., Dey, L., . . . Yuan, C.-S. (2002).** Antidiabetic effects of Panax ginseng berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*, 51(6), 1851-1858.
- Awad, N. E., Seida, A. A., Shaffie, Z. E.-K. N. & El-Aziz, A. M. A. (2011).** Hypoglycemic activity of Artemisia herba-alba (asso.) Used in egyptian traditional medicine as hypoglycemic remedy. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences* 2(3), 30-39.
- Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F. Z., Benmehdi, H. & Belkacem, N. (2012).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the north western and south western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (2012), 2041–2050.
- Bailey, C. J. (1999).** Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochemical Pharmacology*, 58(10), 1511-1520.
- Barnes, P. M., Bloom, B., Nahin, R. L., Statistics, N. C. F. H. (2008).** Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. *National health statistics reports*; no 12. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics.
- Baron, A. D. (1998).** Postprandial hyperglycaemia and α -glucosidase inhibitors. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 40, S51-S55.
- Barroso, I. (2005).** Genetics of type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 22(5), 517-535.
- Bellakhdar, J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle: médecine arabe ancienne et savoirs populaires-Saint-Etienne, Edit. Ibis Press.
- Ben Salah, H., Jarraya, R., Martin, M.-T., Veitch, N. C., Grayer, R. J., Simmonds, M. S. & Damak, M. (2002).** Flavonol triglycosides from the leaves of Hammada scoparia (Pomel) Iljin. *Chemical And Pharmaceutical Bulletin*, 50 (9), 1268-1270.
- Benariba, N., Djaziri, R., Hupkens, E., Louchami, K., Malaisse, W. J. & Sener, A. (2013).** Insulinotropic action of Citrullus colocynthis seed extracts in rat pancreatic islets. *Molecular Medicine Reports*, 7(1), 233-236.
- Benariba, N., Djaziri, R., Zerriouh, B. H., Boucherit, K., Louchami, K., Sener, A. & Malaisse, W. J. (2009).** Antihyperglycemic effect of Citrullus colocynthis seed

aqueous extracts in streptocotocin-induced diabetic rats. *Metabolic and Functional Research on Diabetes*, 2, 71-76.

Benkrief, R., Brum-Bousquet, M., Tillequin, F. & Koch, M. (1989). Alkaloids and flavonoid from aerial parts of Hammada articulata ssp. scoparia. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 48(4), 219-224.

Bolzán, A. D. et Bianchi, M. S. (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research*, 512(2), 121-134.

Bourogaa, E., Bertrand, J., Despeaux, M., Jarraya, R., Fabre, N., Payrastre, L., . . . El Feki, A. (2011). Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leukemia research*, 35(8), 1093-1101.

Bourogaa, E., Jarraya, R. M., Nciri, R., Damak, M. & Elfeki, A. (2014). Protective effects of aqueous extract of Hammada scoparia against hepatotoxicity induced by ethanol in the rat. *Toxicology And Industrial Health*, 30 (2), 113–22.

Bourogaa, E., Nciri, R., Mezghani-Jarraya, R., Racaud-Sultan, C., Damak, M. & El Feki, A. (2013). Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Hammada scoparia against ethanol-induced liver injury in rats. *Journal Of Physiology And Biochemistry*, 69(2), 227-237.

Broca, C., Gross, R., Petit, P., Sauvaire, Y., Manteghetti, M., Tournier, M., . . . Ribes, G. (1999). 4-hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties. *American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 277(4), E617-E623.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3^e éd.) Ed TEC et DOC.

Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., . . . Samani, N. J. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), 661-678.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157-2184.

Castro, A. J. G., Frederico, M. J. S., Cazarolli, L. H., Mendes, C. P., Bretanha, L. C., Schmidt, É. C., . . . Pizzolatti, M. G. (2015). The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between

calcium and kinases to regulate glucose balance. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba)-General Subjects*, 1850(1), 51-61.

Chao, H. C., Najjaa, H., Villareal, M. O., Ksouri, R., Han, J., Neffati, M. & Isoda, H. (2013). Arthrophytum scoparium inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in b16 melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 22(2), 131-136.

Chen, H.-Y., Ye, X.-L., Cui, X.-L., He, K., Jin, Y.-N., Chen, Z. & Li, X.-G. (2012). Cytotoxicity and antihyperglycemic effect of minor constituents from Rhizoma Coptis in HepG2 cells. *Fitoterapia*, 83(1), 67-73.

Chen, J., Mangelinckx, S., Adams, A., Wang, Z., Li, W. & De Kimpe, N. (2015). Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Natural product communications*, 10(1),187-200.

Concannon, P., Rich, S. S & Nepom, G. T. (2009). Genetics of type 1a diabetes. *New England Journal Of Medicine*, 360(16),1646-1654.

Conseil Canadien de Protection des Animaux. (1984). Chapitre XXI. Les rats d'expérimentation, Manuel du CCPA sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, volume 2. Repéré à http://www.ccac.ca/fr/_/normes/ligne_s_directrices/doc-supplementaires/vol2-rats.

Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., . . . Stevens, G. A. (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *The Lancet*, 378(9785), 31-40.

Daisy, P., Eliza, J., & Ignacimuthu, S. (2008). Influence of Costus speciosus (Koen.) Sm. Rhizome extracts on biochemical parameters in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of health science*, 54(6), 675-681.

Defronzo, R. A. (1999). Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals Of Internal Medicine*,131(4), 281-303.

Donia, A. E. R. M., Alqasoumi, S. I., Radwan, A. M., Bur, J. & Craker, L. E. (2012). Phytochemical screening and insecticidal activity of three plants from chenopodiaceae family. *Journal Of Medicinal Plants Research*,6(48), 5863-5867.

- Drotman, R. & Lawhorn, G. (1978).** Serum enzymes as indicators of chemically induced liver damage. *Drug and chemical toxicology* 1(2): 163-171.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. & Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*,28(3),350-356.
- Dufaitre-Patouraux, L., Vague, P. & Lassmann-Vague, V. (2003).** Technologie Et Fiabilité De l'autosurveillance Glycémique: Historique Et Etat Actuel. *Diabetes & Metabolism*,29(2), 2S7-2S14.
- Dunnick, J. K. & Nyska, A.(2013).** The toxicity and pathology of selected dietary herbal medicines. *Toxicologic Pathology*, 41(2), 374–386.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.-L. & Jouad, H. (2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal Of Ethnopharmacology*,82(2), 97-103.
- El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I. & El-Naga, N. I. A. (2005).** Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*,43(1), 57-63.
- El-Shazly, A., Dora, G., & Wink, M. (2005).** Alkaloids of *Haloxylon salicornicum* (Moq.) Bunge ex Boiss.(Chenopodiaceae). *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(12), 949-952.
- El-Shazly, A. & Wink, M. (2003).** Tetrahydroisoquinoline and β -carboline alkaloids from *Haloxylon articulatum* (Cav.) Bunge (Chenopodiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung. C*, 58,477-480.
- Elte, J. & Blickle, J. (2007).** Thiazolidinediones for the treatment of type 2 diabetes. *European Journal Of Internal Medicine*,18(1), 18-25.
- Essawi, T. & Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*,70(3), 343-349.
- Fang, X.-K., Gao, J., & Zhu, D.-N. (2008).** Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life sciences*, 82(11), 615-622.

- Festing, M.F.W. (2011).** Experimental design and statistical analysis. In: Hau J, Schapiro SJ editors. Handbook of laboratory animal science: essential principles and practices (3rd ed., p. 370-99). Boca Raton : CRC Press.
- Hamza, N., Berke, B., Cheze, C., Agli, A.-N., Robinson, P., Gin, H. & Moore, N. (2010).** Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the c57bl/6j mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *Journal Of Ethnopharmacology*, 128(2), 513-518.
- Hannan, J., Ali, L., Rokeya, B., Khaleque, J., Akhter, M., Flatt, P. & Abdel-Wahab, Y. (2007).** Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. *british Journal Of Nutrition*, 97(3), 514-521.
- Hara-Kudo, Y., Kobayashi, I., Sugita-Konishi, Y. & Kondo, K. (2004).** Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. *Journal of Food Protection®*, 67(12), 2820-2824.
- Harborne, J.B. (1998).** Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis (3rd ed.) London: Chapman and Hall.
- Harrigan, R. A., Nathan, M. S. & Beattie, P. (2001).** Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology, toxicity, and treatment. *Annals Of Emergency Medicine*, 38(1), 68-78.
- Harvey, A. L. (2008).** Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, 13(19), 894-901.
- Hassib, W.Z., & Abraham. S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides (1957).** *Methods in Enzymology*. 3,34-50.
- Henry, J. R., Li, Y., Warshawsky, A. M., Brozinick, J. T., Hawkins, E. D., Misener, E. A., . . . Yumibe, N. P. (2006).** Tetrahydroisoquinoline PPAR γ agonists: design of novel, highly selective non-TZD antihyperglycemic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(24), 6293-6297.
- Herling, A.W. (2006).** Metabolism pharmacology. In: Gerhard Vogel H editor. Drug discovery and evaluation: safety and pharmacokinetic assays; with 125 tables (p.151-93). Berlin Heidelberg: Springer.

- Herr, R. R., Jahnke, H. K. & Argoudelis, A. D. (1967).** Structure of streptozotocin. *Journal Of The American Chemical Society*, 89(18), 4808-4809.
- Hui, H., Tang, G., Go & V. L. (2009).** Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. *Chinese Medicine*, 4(1), 1- 11.
- Ichiki, H., Miura, T., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y., Tanigawa, K. & Okada, M. (1998).** New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21(12), 1389-1390.
- Ifeoma, O. & Oluwakanyinsola, S. (2013).** *Screening of herbal medicines for potential toxicities*. Repéré à <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>.
- International Expert Committee (2009).** International expert committee report on the role of the a1c assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 32(7), 1327-1334.
- Josse, R. G. (1995).** Acarbose for the treatment of type II diabetes: the results of a Canadian multi-centre trial. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 28, S167-S172.
- Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W., Renold & A. E. (1969).** Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal Of Clinical Investigation*, 48 (11), 2129-2139.
- Kang, C., Han, J.-H., Oh, J., Kulkarni, R., Zhou, W., Ferreira, D., . . . Na, M. (2015).** Steroidal alkaloids from *Veratrum nigrum* enhance glucose uptake in skeletal muscle cells. *Journal of natural products*. 78(4), 803-810.
- Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugbuaja, V.O. (2004)** .Identification of active principles of *M.balsamina* (Balsam apple) leaf extract, *Journal of Medical Sciences*. 4, 179-182.
- Kelley, D. E., Reilly, J. P., Veneman, T. & Mandarino, L. (1990).** Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *American Journal of Physiology*, 258(6), E923-E929.
- Kew, M. C. (2000).** Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet* 355(9204), 591-592.
- Kim, Y. A., Kong, C.-S., Lee, J. I., Kim, H., Park, H. Y., Lee, H.-S., . . . Seo, Y. (2012).** Evaluation of novel antioxidant triterpenoid saponins from the halophyte *Salicornia herbacea*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(13), 4318-4322.

- Koga, K., Shibata, H., Yoshino, K. & Nomoto, K. (2006).** Effects of 50% ethanol extract from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on α -glucosidase inhibitory activity and the elevation of plasma glucose level in rats, and its active compound. *Journal Of Food Science*, 71(7), S507-S512.
- Konrad, R., Mikolaenko, I., Tolar, J., Liu, K. & Kudlow, J. (2001).** The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic β -cell o-glcnae-selective n-acetyl- β -D-glucosaminidase. *Biochemical Journal*, 356, 31-41.
- Korthikunta, V., Pandey, J., Singh, R., Srivastava, R., Srivastava, A. K., Tamrakar, A.K. & Tadigoppula, N. (2015).** In vitro anti-hyperglycemic activity of 4-hydroxy-isoleucine derivatives. *Phytomedicine*, 22(1), 66-70.
- Koski, R. R. (2006).** Practical review of oral antihyperglycemic agents for type 2 diabetes mellitus. *The Diabetes Educator*, 32(6), 869-876.
- Kovacs, P., Stumvoll, M. (2005).** Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4), 625-635.
- Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I. & Abdelly, C. (2012).** Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical Reviews In Biotechnology*, 32(4), 289-326.
- Kuete, V. (2014).** Toxicological survey of African medicinal plant. New York, NY, USA : Elsevier.
- Kuljanabhagavad, T. & Wink, M. (2009).** Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry Reviews*, 8(2), 473-490.
- Kumari, K. & Augusti, K. (2002).** Antidiabetic and antioxidant effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from onions (*Allium cepa* linn) as compared to standard drugs in alloxan diabetic rats. *Indian Journal Of Experimental Biology*, 40(9), 1005-1009.
- Kumari, K., Mathew, B. C. & Augusti, K. (1995).** Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium cepa* linn. *Indian Journal Of Biochemistry & Biophysics*, 32(1), 49-54.

- Lamchouri, F., Benali, T., Bennani, B., Toufik, H., Ibn Majdoub Hassania, L., Bouachrine, M. & Lyoussi, B. (2012).** Preliminary phytochemical and antimicrobial investigations of extracts of *Haloxylon scoparium*. *Journal of Materials and Environmental Science*, 3(4), 754-759.
- Lapornik, B., Prošek, M. & Golc Wondra, A. (2005).** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214-222.
- Larrey, D. (1997).** Hepatotoxicity of herbal remedies. *Journal of Hepatology*, 26, 47-51.
- Lee, Y. S., Kim, W. S., Kim, K. H., Yoon, M. J., Cho, H. J., Shen, Y., . . . Kim, C. T. (2006).** Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes*, 55(8), 2256-2264.
- Li, W. L., Zheng, H. C., Bukuru, J. & De Kimpe, N. (2004).** Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 1-21.
- Luna, B. & Feinglos, M. N. (2001).** Drug-induced hyperglycemia. *Journal of the American Medical Association*, 286(16), 1945-1948.
- Malec, L.S., Pomilio, A.B. (2003).** Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromuspictus*. *Molecular Medicinal Chemistry*. 1, 30-38.
- Mandal, S., Barik, B., Mallick, C. & Ghosh, D. (2008).** Therapeutic effect of ferulic acid, an ethereal fraction of ethanolic extract of seed of *Syzygium cumini* against streptozotocin-induced diabetes in male rat. *Methods And Findings In Experimental And Clinical Pharmacology*, 30(2), 121-128.
- Marles, R., Farnsworth, N. (1995).** Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2(2), 137-189.
- Marston, A. (2011).** Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal Of Chromatography A*, 1218(19), 2676-2683.
- Merck, E. (1975).** Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. E. Merck.
- Metwally, N. S., Mohamed, A. M. & ELSharabasy, F. S. (2012).** Chemical constituents of the Egyptian plant *Anabasis articulata* (Forssk) Moq and its antidiabetic effects

on rats with streptozotocin-induced diabetic hepatopathy. *Journal Applied Pharmaceutical Science*, 2, 54-65.

Mezghani-Jarraya, R., Hammami, H., Ayadi, A. & Damak, M. (2009). Molluscicidal activity of Hammada scoparia (Pomel) Iljin leaf extracts and the principal alkaloids isolated from them against Galba truncatula. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7),1035-1038.

Misawa, E., Tanaka, M., Nomaguchi, K., Nabeshima, K., Yamada, M., Toida, T. & Iwatsuki, K. (2012). Oral ingestion of Aloe vera phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in zucker diabetic fatty rats. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 60(11), 2799-2806.

Mohammed, A., Ibrahim, M. A. & Islam, M. S. (2014). African medicinal plants with antidiabetic potentials: A Review. *Planta Medica*, 80, 354-377.

Mojab, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N. & Vahidipour, H. R. (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 77-82.

Motta, M., Bennati, E., Ferlito, L., Passamonte, M. & Malaguarnera, M. (2007). Value and significance of new diagnostic criteria of diabetes mellitus in older people. *Archives Of Gerontology And Geriatrics*, 45(1), 103-108.

Murata, M., Takahashi, A., Saito I. & Kawanishi, S. (1999). Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology*, 57(8), 881-887.

National toxicology Program (2011). Toxicology and carcinogenesis studies of ginseng (cas no. 50647-08-0) in f344/n rats and b6c3f1 mice (gavage studies). *National Toxicology Program Technical Report Series*, (567), 1-149.

Néné-Bi, S., Soro, T., Zahoui, O. & Traoré, F. (2013). Effet d'une administration aiguë d'un extrait aqueux de Bridelia ferruginea Benth.(Euphorbiaceae) sur la fonction rénale chez le rat. *Phytothérapie*, 11(6), 359-364.

Newman, D. J. Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.

OECD, 2001. OECD guidelines for testing of chemicals. No 420: acute oral toxicity-fixed dose method. Organisation for economic co-operation and development, Paris.

- Oloyede, O.I. (2005).** Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition* 4,379-381.
- Orban, J., Ghaddab, A., Chatti, O. & Ichai, C. (2006).** [Metformin-associated lactic acidosis]. *Annales Francaises D'anesthesie Et De Reanimation*,25(10), 1046-1052.
- Pandey, S., Gupta, R. K. (2014).** Screening of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of *Chenopodium album* (bathua). *Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry*, 3(3), 1-9.
- Patel, D., Prasad, S., Kumar, R. & Hemalatha, S. (2012).** An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(4), 320-330.
- Peters, A. L., Schriger, D. L. (1998).** The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *The American Journal Of Medicine*, 105(1), 15s-19s.
- Pezzuto, J. M. (1997).** Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 53(2), 121-133.
- Pietro Paolo, M., Towns, R. & Eisenbarth, G. S. (2012).** Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), A012831.
- Rand, J. S., Kinnaid, E., Baglioni, A., Blackshaw, J. & Priest, J. (2002).** Acute stress hyperglycemia in cats is associated with struggling and increased concentrations of lactate and norepinephrine. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, 16(2), 123-132.
- Raza, M., Al-Shabanah, O. A., El-Hadiyah, T. M. & Al-Majed, A. A (2002).** Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica* 70(2): 135-145.
- Roden, M., Price, T. B., Perseghin, G., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Cline, G. W. & Shulman, G. I. (1996).** Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 97(12), 2859-2865.
- Rossini, A. A., Like, A. A., Chick, W. L., Appel, M. C. & Cahill, G. F. (1977).** Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 74(6), 2485-2489.

- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G. & Said, O. (2006).** Safety of traditional arab herbal medicine. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 3(4), 433-439.
- Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (2005).** Natural products isolation (2ed.)Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Sauvaire, Y., Petit, P., Broca, C., Manteghetti, M., Baissac, Y., Fernandez-Alvarez, J., . . . Gomis, R. (1998).** 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes*, 47(2), 206-210.
- Schlienger, J.-L. (2014).** Diabète et phytothérapie: les faits. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 8(1), 101-106.
- Shah, U., Shah, R., Acharya, S. & Acharya, N. (2013).** Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(1), 16-23.
- Shaker, K. H., Dockendorff, K. et Seifert, K. (2003).** Triterpenoid Saponins From *Atriplex Semibaccata*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 58(7/8), 485-489.
- Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R. & Roy, P. (2008).** Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*, 110(3), 697-705.
- Sharma, S., Kulkarni, S. K. & Chopra, K. (2006).** Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 33(10), 940-945.
- Shaw, J. E., Sicree, R. A. & Zimmet, P. Z. (2010).** Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 87(1), 4-14.
- Shittu, H., Gray, A., Furman, B. & Young, L. (2010).** Glucose uptake stimulatory effect of akuammicine from *Picralima nitida* (apocynaceae). *Phytochemistry Letters*, 3(1), 53-55.
- Shrayef, M. Z., Gerich, J. E. (2010).** Normal glucose homeostasis. In: Poretzky L, editor. *Principles of Diabetes Mellitus* (p. 19-35). New York: Springer.
- Shulaman, G. (2000).** Cellular mechanism of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 171-176.

- Shulman, G., Rothman, D., Shulman, R. & Brindle, K. (1990).** ^{13}C NMR studies of glucose disposal in normal and non-insulin-dependent diabetic humans [and discussion]. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series A: Physical And Engineering Sciences*, 333(1632), 525-529.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods In Enzymology*, 299, 152-178.
- Stickel, F., Egerer, G. & Seitz, H. K. (2000).** Hepatotoxicity of botanicals. *Public Health Nutrition*, 3(2), 113-124.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J. & van Haefen, T. W. (2005).** Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346.
- Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G. & Gerich, J. E. (1995).** Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal Of Medicine*, 333(9), 550-554.
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., . . . Zacchino, S. A. (2010).** Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 137-158.
- Tao, X., Wang, X. & Jia, W. (2007).** Using chinese natural products for diabetes mellitus drug discovery and development. *Expert opinion on drug discovery*, 2(7), 977-986
- Teschke, R., Wolff, A., Frenzel, C. & Schulze, J. (2014).** Review article: herbal hepatotoxicity—an update on traditional chinese medicine preparations. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 40(1), 32-50..
- Thomas, C. C., Philipson, L. H. (2015).** Update on diabetes classification. *Medical clinics of north america*, 99(1), 1-16.
- Tiikkainen, M., Häkkinen, A.-M., Korsheninnikova, E., Nyman, T., Mäkimattila, S. & Yki-Järvinen, H. (2004).** Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(8), 2169-2176.
- Tofovic, S. P., Jackson E. K. (1999).** Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 33(3): 360-366.

- Van Atta, G. R., Guggolz, J. (1958).** Forage constituents, detection of saponins and sapogenins on paper chromatograms by Liebermann Burchard reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(11), 849-850.
- Vats, V., Yadav, S. P. & Grover, J. K. (2003).** Effect of *T. foenumgraecum* on glycogen content of tissues and the key enzymes of carbohydrate metabolism. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2-3), 237-242.
- Verge, C. F., Stenger, D., Bonifacio, E., Colman, P. G., Pilcher, C., Bingley, P. J. & Eisenbarth, G. (1998).** Combined use of autoantibodies (Ia-2 autoantibody, gad autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: combinatorial islet autoantibody workshop. *Diabetes*, 47(12), 1857-1866.
- Vicent, D., Garcia-Martinez, J. A., Villanueva-Peñacarrillo, M. L., Valverde, I. & Malaisse, W. J. (1995).** Stimulation of insulin secretion and potentiation of glibenclamide-induced insulin release by the dimethyl ester of glutamic acid in anaesthetized rats. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 27 (1), 27-30.
- Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N. S., Leclerc, J., Foretz, M. & Andreelli, F. (2012).** Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science*, 122(6), 253-270.
- Virally, M., Blicklé, J.-F., Girard, J., Halimi, S., Simon, D. & Guillausseau, P.-J. (2007).** Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism*, 33(4), 231-244.
- Wang, M., Lamers, R.-J. A. N., Korthout, H. A. A. J., van Nesselrooij, J. H. J., Witkamp, R. F., van der Heijden, R., . . . van der Greef, J. (2005).** Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology. *Phytotherapy Research*, 19(3), 173-182.
- Wagner, H., Bladt S. (2009).** Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas (2d ed.) Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Waki, H., Park, K. W., Mitro, N., Pei, L., Damoiseaux, R., Wilpitz, D. C., . . . Tontonoz, P. (2007).** The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR γ expression. *Cell Metabolism*, 5(5), 357-370.
- Waltner-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., Hall, R. K., Nawano, M. & Granner, D. K. (2002).** Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 34933-34940.

- Weil, C. S. (1952).** Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD 50 Or ED 50) And Instructions In Their Use. *Biometrics*, 8(3), 249-263.
- Wen, X., Sun, H., Liu, J., Cheng, K., Zhang, P., Zhang, L., . . . Zographos, S. E. (2008).** Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure– activity relationships, and X-ray crystallographic studies†. *Journal of medicinal chemistry*, 51(12), 3540-3554.
- Wenzel, U. (2013).** Flavonoids as drugs at the small intestinal level. *Current Opinion In Pharmacology*, 13(6), 864-868.
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C. & Shaw, J. (2011).** IDF Diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 94(3), 311-321.
- Witters, L. A. (2001).** The blooming of the French lilac. *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1105-1107.
- Wolfsegger, M. J., Jaki, T., Dietrich, B., Kunzler, J. A. & Barker, K. (2009).** A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(1), 117-122.
- Wu, P.-P., Zhang, K., Lu, Y.-J., He, P. & Zhao, S.-Q. (2014).** In vitro and in vivo evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 80, 502-508.
- Yin, M., Wang, X., Wang, M., Chen, Y., Dong, Y., Zhao, Y. & Feng, X. (2012).** A new triterpenoid saponin and other saponins from *Salicornia europaea*. *Chemistry of natural compounds*, 48(2), 258-261
- Zaoui, S., Biémont, C. & Meguenni, K. (2007).** Approche épidémiologique du diabète en milieux urbain et rural dans la région de Tlemcen (Ouest Algérien). *Cahiers D'études Et De Recherches Francophones/Santé*, 17(1), 15-21.
- Zarzycki, P. K., Ślączka, M. M., Zarzycka, M. B., Włodarczyk, E. & Baran, M. J. (2011).** Application of micro-thin-layer chromatography as a simple fractionation tool for fast screening of raw extracts derived from complex biological, pharmaceutical and environmental samples. *Analytica chimica acta*, 688(2), 168-174.

Zhang, L., Chen, X., Liu, J., Zhu, Q., Leng, Y., Luo, X., . . . Liu, H. (2012). Discovery of novel dual-action antidiabetic agents that inhibit glycogen phosphorylase and activate glucokinase. *European journal of medicinal chemistry*, 58, 624-639.

Zhou, J., Chan, L. & Zhou, S. (2012). Trigonelline : a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Current medicinal chemistry*, 19(21), 3523-3531.