



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



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

Laboratoire :

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



Thèse en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Biologie

Option : Biochimie Appliquée

Présentée par : LAOUFI Hind

Thème

Contribution à l'étude de *Ononis angustissima* (Lam. subsp. polyclada Murb) sur l'hyperglycémie postprandiale chez le rat Wistar : effet sur la digestion et l'absorption intestinale de sucres

Devant le jury composé de :

Président	Pr. CHABANE SARI Daoudi	Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen
Directeur de thèse	Pr. DJAZIRI Rabah	Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen
Examineurs	Dr. NEMMICHE Sa d	Université Abdehamid Ibn Badis Mostaganem
	Dr. BENMEHDI Houcine	Université Mohammed Tahri Béchar
	Dr. AZZI Rachid	Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen

Année universitaire : 2016-2017

## DEDICACES

Je Dédie Cette Thèse à Ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de mon père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A toute ma famille

A cœur vaillant rien d'impossible

Quand il y a la soif d'apprendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein

Malgré les obstacles qui s'opposent

Les études sont avant tout

Ils représentent la lumière de notre existence

Comme un vol de gerfauts hors du charnier natal

Espérant des lendemains épiques

Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis

Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,

Fera signe de persévérance

A conscience tranquille tout est accessible

Tout vient à point à qui sait attendre

Tout devient facile pour arriver à nos fins

En dépit des difficultés qui s'interposent

Notre unique et seul atout

L'étoile brillante de notre réjouissance

Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal

Un avenir glorieux et magique

Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri

Nous prions dieu que cette soutenance

Et que nous serions enchantés

Par notre travail honoré

## Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier en premier lieu '**ALLAH**' le bon dieu, le Miséricordieux de nous avoir donné la force, Volonté, le pouvoir de raisonner et la patience d'achever ce modeste travail.

Mes remerciements les plus respectueux et les plus sincères s'adressent à mon directeur de thèse Monsieur **DJAZIRI Rabah**, Professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, d'avoir accepté la charge de m'encadrer, pour son bienveillance au laboratoire et pour l'intérêt qu'il a donné pour accomplir ce travail. Je le remercie pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils, sa compréhension, ses qualités pédagogiques et scientifiques. Veuillez trouver Monsieur, dans cette thèse, le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **CHABANE SARI Daoudi**, Professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse, d'évaluer ce travail et de l'intérêt qu'il lui accordé. Je le remercie également pour sa compréhension et son aide précieuse à la réalisation de cette soutenance.

Une grande part de ma reconnaissance s'adresse à Monsieur **NEMMICHE Sa d**, Maître de conférences Classe A à l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur **BENMEHDI Hocine**, Maître de conférences Classe A à l'Université Mohammed Tahri Béchar, pour l'honneur qu'il m'a fait d'être examinateur de cette thèse. Qu'il trouve dans cette thèse le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je suis très honoré que Monsieur **AZZI Rachid**, Maître de conférences Classe A au département de Biologie, faculté SNV/STU, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, ait accepté d'examiner et de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent à Mm **BOUCHERIT-OTMANI Zahia**, Professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

Ma profonde reconnaissance s'adresse à **Mm Benariba**, Maître de conférences Classe B au département de Biologie, faculté SNV/STU, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour

sa disponibilité malgré ses nombreuses occupations, et de son aide précieuse tout le long de la réalisation de ce travail. Je la remercie vivement pour ses conseils, ses encouragements, sa gentillesse et son aide moral et scientifique. Qu'elle trouve dans cette thèse l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu en travaillant au sein du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique» et j'en remercie l'ensemble des doctorants ainsi que les techniciens du laboratoire, pour leur amitié, leur bonne humeur et leur aide.

Je remercie tout particulièrement les membres de ma famille, pour leur présence constante, leur soutien et leur aide inestimable.

Aussi, mes remerciements s'adressent à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail.

Les travaux qui ont fait l'objet de cette présente thèse ont été réalisés dans le Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAPSAB), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen - Algérie.

Notre problématique s'inscrit dans un axe de recherche pluridisciplinaire qui concerne l'étude des activités biologiques et pharmacologiques des plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète sucré par la population diabétique en Algérie. La plante sélectionnée est étudiée pour son efficacité *in vitro* et *in vivo* chez le rat Wistar. L'étude phytochimique du matériel végétal est également entreprise en vue de déterminer leur composition en phytoconstituants, de révéler les substances actives et d'élucider leur mécanisme et site d'action.

لطالما ساهم الطب التقليدي كدوية جديدة عن طريق الفحص التجريبي الكيميائي والبيولوجي لمستخلصات النباتات الطبية. من بين هذه النباتات حنة اللبل (*Ononis angustissima* (L) لى عائلة الفوليات المستخدمة تقليديا السكري. الهدف من هذا طروحة هو الدراسة الكيميائية النباتية لبعض مستخلصات هذه النبتة وكذا تقييم خصائصهما المضادة للأ ( ) ( ) عند الجرذان ويستار.

ساسة المحصل عليها تخبرنا ان البوليفينولات و الفلافونيدات توجدان بكمية مرتفعة في المستخلصات العضوية بيتانول (n-BFT) -ميثانول (EMFT) و أسيتات يثيل (AcFT) للورق والسيقان، 70 72 (mg eq GA/g) البوليفينولات و 16 (mg eq Cat/g) 34 الفلافونيدات. هذه المستخلصات العضوية قدمت أكبر نشاطا مضادا للأكسدة DPPH (IC<sub>50</sub>) يتغير من 4 5 / ( FRAP (IC<sub>50</sub>) يتغير من 0,1 0,4 / ).

المخبرية التي أجريت الإنزيمي أميليزو جلوكوزيداز تيبين يعتمد EMFT تركيز 50% نريم IC<sub>50</sub> = 1,46 مغ/مل فيما يخص أميليزو المستخلص n-BFT يليه المستخلص EMFT فيما يخص جلوكوزيداز ب IC<sub>50</sub> = 0,94 0,99 / . الحي جميع المستخلصات تيبين مفعولا مضادا AcFT EMFT n-BFT العضوية الدم بنسبة تقليل 62,72 38,58 37,99% كبير / بتركيز 50% الدم بنسبة تقليل 62,72 23,26% AcFT مع السكروز و المالتوز، يقلل كبير O. angustissima كاتيشين (CT) حمض الغاليك (AG) (AcB) يؤدي لى تخفيض كبير في نسبة السكر في الدم بالمستخلصات EMFT AqFT AcFT (18,65 -26,79 -64,29) عطاءهم بشكل منفصل (30 دقيقة ق). % ( )

فيما يخص تأثير مستخلصات *O. angustissima* متصاص المعى للجلوكوز. تقييمه مخبريا (أكياس المعى الدقيق) و كذلك عن طريق الحقن المتواصل في المعى الدقيق لجرذ مخضر، يبين لنا أن بعض المستخلصات قادرة على منع مستوى النسيج الطلاني بال SGLT1. مخبريا أعلى نشاطا EMFT (94,64%). عليها خلال 60) AcFT n-BFT 67,49% (.) هذه الدراسة تكون واعدة فيما يخص النشاطات المضادة الأليات لعملها: تخفيض O. angustissima تسليط تثبيط مما يؤكد استخدامها التقليدي كنبئة مضادة للسكري. هذه المميزات تكون في كل مرة ذات أهمية أكبر العضوية على للمستخلصات المائية. هذه النتائج أولية و تستحق أن تعمق أكثر من أجل تحديد و تمييز المركبات المسؤولة عن هذه الأليات عملها دراجها في العلاج الدوائي ضد داء السكري.

أحية : *Ononis angustissima* الأميليز ، جلوكوزيد ، للسكري ، البوليفينول ، الفلافونويد ،

## Résumé

La médecine traditionnelle a toujours servi comme une base à la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening expérimental phytochimique et biologique des extraits de plantes médicinales. Parmi ces plantes *Ononis angustissima* (L.) Lam. subsp. *polyclada* Murb, appartenant à la famille des fabacées, traditionnellement utilisée pour traiter le diabète sucré. L'objectif de ce travail est consacré à l'étude phytochimique de quelques extraits de cette plante ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydante (*in vitro*) et antidiabétique (*in vitro*, *in situ* et *in vivo*) chez des rats Wistar.

Les principaux résultats ont montré une teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes dans les extraits organiques n-Butanol (n-BFT), eau-méthanol (EMFT) et acétate d'éthyle (AcFT) de feuilles et tiges, 72 à 70 (mg eq GA/g) de polyphénols et 16 à 34 (mg eq Cat/g) de flavonoïdes. Ces extraits organiques ont présenté une activité antioxydante importante sur le DPPH (IC<sub>50</sub> varie de 4 à 5mg/ml) et FRAP (IC<sub>50</sub> varie de 0,1 à 0,4mg/ml).

Les tests réalisés *in vitro* sur l'activité de l' -amylase et l' -glucosidase montrent un effet inhibiteur dose dépendant. L'activité inhibitrice la plus élevée est observée pour l'extrait EMFT avec une IC<sub>50</sub>=1,46 mg/ml pour l' -amylase et l'extrait n-BFT suivie par EMFT pour l' -glucosidase avec des IC<sub>50</sub> de 0,94 et 0,99 mg/ml respectivement. *In vivo* l'ensemble des extraits montrent un effet antihyperglycémiant important, en particulier les extraits organiques n-BFT, EMFT et AcFT à 50 mg/kg p.c, qui provoquent une diminution significative (p<0,05) de la charge glycémique provoquée par l'amidon à 66,24 ; 38,58 et 37,99 %, respectivement. L'administration de l'extrait AcFT avec le saccharose et le maltose, exerce un effet antihyperglycémiant significatif (p<0,05) avec un pourcentage de réduction de 62,72 et 23,26%, respectivement. La coadministration des différents extraits de *O. angustissima*, catéchine (CT), acide gallique (AG) ou acarbose (AcB) avec le glucose provoque une réduction significative de cette valeur par les extraits EMFT, AqFT et AcFT (-65,18 ; -64,29 et -26,79%, respectivement), comparativement à leur administration séparément (30 min avant).

En ce qui concerne l'influence des extraits de *O. angustissima* sur l'absorption intestinale de glucose, son évaluation *in vitro* (sacs d'intestin) et *in situ* (perfusion de l'intestin de rat vivant anesthésié) montre que certains extraits sont capables d'inhiber l'absorption de glucose au niveau de l'épithélium interférant avec les transporteurs de glucose en l'occurrence SGLT1. *In vitro*, l'activité inhibitrice la plus élevée est observée pour les extraits n-BFT et AcFT (66 et 67,49%, respectivement). *In situ*, l'activité inhibitrice la plus élevée est observée pour l'extrait EMFT (94,64%). Les résultats obtenus au cours de cette étude sont prometteuses concernant les activités antioxydante et antidiabétique des extraits de *O. angustissima* en mettant en évidence l'un de leur mécanisme d'action possible : réduction de l'hyperglycémie postprandiale par inhibition de la digestion des glucides et ralentissement voire inhibition de l'absorption intestinale de glucose, ce qui confirme son utilisation traditionnelle comme plante antidiabétique. Ces propriétés sont toutefois plus importantes pour les extraits organiques que les extraits aqueux. Ces résultats restent préliminaires et méritent d'être approfondis afin d'identifier et caractériser les composés responsables de ces activités et d'étudier leurs mécanismes d'action en vue de leur incorporation dans le système de soin.

**Mots clés :** *Ononis angustissima*, hyperglycémie postprandiale, -glucosidase, -amylase, activité antioxydante, activité antidiabétique, polyphénols, flavonoïdes, absorption intestinale.

## Abstract

Traditional medicine always served as a base in search of new active pharmacological agents via phytochemical and biological experimental screening of medicinal plants extracts. Among these plants *Ononis angustissima* (L.) Lam. subsp. *polyclada* Murb, belongs to the Fabaceae, traditionally used to treat diabetes mellitus. The aim of this work is devoted to phytochemical investigation of some extracts of this plant as well as the evaluation of their activities antioxidant (*in vitro*) and antidiabetic (*in vitro*, *in situ* and *in vivo*) in rats Wistar.

The principal results we show elevated content of polyphenols and flavonoids in organic extracts n-Butanol (n-BFT), water-methanol (EMFT) and ethyle acetat (AcFT) of leafs and stems, 72 to 70 (mg eq GA/g) of polyphenols and 16 to 34 (mg eq Cat/g) of flavonoids. These organic extracts show highly antioxidant activity upon DPPH (IC<sub>50</sub> varies from 4 to 5mg/ml) et FRAP (IC<sub>50</sub> varies from 0,1 to 0,4mg/ml).

The *in vitro* tests performed on the activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase show inhibitory effect dose dependent. The highest inhibitory activity is observed in EMFT extract with IC<sub>50</sub> of 1,46 mg/mL for the  $\alpha$ -amylase and n-BFT extract followed by EMFT extract for the  $\alpha$ -glucosidase with IC<sub>50</sub> 0,94 and 0,99 mg/mL respectively. *In vivo* whole extracts show an important antihyperglycemic effect especially, organic extracts n-BFT, EMFT and AcFT at 50 mg/kg p.c that induce a significant decrease (p < 0.05) of the glycemic load with starch at 66,24 ; 38,58 and 37,99 %, respectively. The lead of AcFT extract with sucrose and maltose, exert a significant antihyperglycemic effect (p < 0.05), with decreases rates of 62,72 and 23,26%, respectively. The coadministration of different extracts of *O. angustissima*, catechin (CT), gallic acid (AG) ou acarbose (AcB) with glucose induce a significant decrease of this value via EMFT, AqFT and AcFT extracts (-65,18 ; -64,29 and -26,79%, respectively), comparably with their apart administrate (30 min before).

Concerning the impact of the extracts of *O. angustissima* upon the intestinal absorption of glucose. It's evaluation *in vitro* (gut sac intestin) and *in situ* (perfusion in the intestine of anesthetized live rat) show that some extracts are able to inhibit the absorption of glucose in epithelium interfered with transporter of glucose in occurrence SGLT1. *In vitro*, the highest inhibitory activity is observed in n-BFT et AcFT extracts (66 et 67,49%, respectively). *In situ*, the highest inhibitory activity is observed in EMFT (94,64%). The results obtained during this study are promising regarding the antioxydant and antidiabetic activities of the extracts of *O. angustissima* highlighting one of their possible mechanisms of action: reduction of postprandial hyperglycaemia by inhibition of digestion of polysaccharides and slowing even inhibiting the intestinal absorption of glucose, which confirms its traditional use as an antidiabetic plant. However, these properties are more significant for organic extracts than aqueous extracts. These results remain preliminary and they deserve to be thorough in order to identify and characterize the compounds responsible for these activities and try to know their mechanisms of action for their incorporation in the care system.

**Keywords:** *Ononis angustissima*, postprandial hyperglycaemia,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, antioxydant activity, antidiabetic activity, polyphenols, flavonoids, intestinal absorption.

## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Généralité sur le diabète sucré</b> .....	6
1. Définition et diagnostic du diabète sucré .....	6
2. Epidémiologie .....	6
3. Classification .....	8
4. Complications .....	9
5. Traitement .....	10
6. Diabète sucré et l'hyperglycémie postprandiale .....	12
6.1 Les variations de la glycémie chez une personne saine .....	13
6.2 La physiopathologie du pré-diabète.....	14
6.3 L'hyperglycémie chez les diabétiques .....	15
7. Diabète sucré et stress oxydant .....	16
Stress oxydant et complications du diabète .....	17
<b>II. La digestion et l'absorption</b> .....	18
1. Digestion des glucides .....	19
La digestion de l'amidon .....	18
2. Absorption des glucides .....	21
<b>III. Plantes médicinales antidiabétiques</b> .....	22
1. Phytothérapie et diabète sucré .....	22
2. Les principes actifs des plantes antidiabétiques et leurs modes d'actions .....	24
3. La plante étudiée <i>Ononis angustissima</i> .....	30
3.1 Taxonomie et description botanique .....	30
3.2 Phytochimie .....	31
3.3 Données ethnopharmacologiques .....	32
<b>Chapitre I : Etude phytochimique de l'<i>ononis angustissima</i></b>	
<b>Matériel et méthodes</b>	
1 Matériel végétal .....	34
2. Extractions .....	34
2.1 Préparation de l'extrait aqueux de fleur (AqFl) .....	34
2.2 Préparation de l'extrait aqueux de feuille et tiges (AqFT) .....	34
2.3 Préparation de l'extrait hydro-méthanolique (EMFT) .....	34
2.4 Préparation de l'extrait acétate d'éthyle (AcFT) .....	35

2.5 Préparation de l'extrait n butanol (n-BFT) .....	35
3. Criblage phytochimique .....	37
4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux .....	39
4.1 Dosage de polyphénols totaux .....	39
4.1.1 Principe .....	39
4.1.2 Mode opératoire .....	39
4.2 Dosage de flavonoïdes totaux .....	40
4.2.1 Principe .....	40
4.2.2 Mode opératoire .....	40
5.1 Evaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de <i>O. angustissima</i> par la méthode de DPPH .....	42
5.1.1 Principe .....	42
5.1.2 Mode opératoire .....	42
5.2 Evaluation du pouvoir réducteur du fer des extraits de <i>O. angustissima</i> par la méthode de FRAP .....	43
5.2.1 Principe .....	43
5.2.2 Mode opératoire .....	43
Corrélation .....	44

### **Résultats et interprétation**

1. Caractéristiques des extraits de la partie aérienne d' <i>Ononis angustissima</i> .....	45
2. Criblage phytochimique .....	45
3. Dosage de composés polyphénoliques .....	47
3.1 Corrélation entre teneur en polyphénols et en flavonoïdes .....	49
4. L'activité antiradicalaire des extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	49
5. Le pouvoir réducteur du fer FRAP par les extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	50
5.1 Corrélation entre les teneurs en polyphénols, flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante des différents extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	51

### **Discussion**

## **Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique de *ononis angustissima***

<b>Introduction</b> .....	60
---------------------------	----

### **Matériel et méthodes**

1. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de <i>Ononis angustissima</i> : effet sur l'activité des enzymes digestives <i>in vitro</i> .....	61
1.1 Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase porcine .....	61
1.1.1 Réactifs et produits .....	61

1.1.1.1 Solution de l' $\alpha$ -amylase .....	61
1.1.1.2 Solution du substrat .....	62
1.1.1.3 Solutions de l'acarbose .....	62
1.1.1.4 Solution de catéchine et d'acide gallique .....	62
1.1.1.5 Solution des extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	62
1.1.1.6 Solution de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) .....	62
1.1.2 Mode opératoire .....	62
1.2 Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité d' $\alpha$ -glucosidases de l'intestin de rat .....	63
1.2.1 Préparation de l'extrait enzymatique brut d' $\alpha$ -glucosidases à partir de la muqueuse intestinale de rat .....	63
1.2.2 Réactifs et mode opératoire .....	64
1.2.2.1 Solution d' $\alpha$ -glucosidases .....	64
1.2.2.2 Solution du substrat .....	64
1.2.2.3 Solution de l'acarbose .....	65
1.2.2.4 Solution de catéchine d'acide gallique .....	65
1.2.2.5 Solution des extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	65
1.2.2.6 Solution de carbonate de sodium .....	65
1.2.2.7 Mode opératoire .....	65
1.2.2.8 Analyse statistique .....	66

### **Résultats et interprétation**

1. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de <i>Ononis angustissima</i> : effet sur l'activité des enzymes digestives <i>in vitro</i> .....	67
1.1 Effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase porcine .....	67
1.2 Effet des extraits sur l'activité d' $\alpha$ -glucosidases d'intestin de rat .....	68
1.3 Corrélation entre l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase et d' $\alpha$ -glucosidases et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux .....	69

### **Discussion**

#### **Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique de *ononis angustissima***

<b>Introduction</b> .....	75
---------------------------	----

#### **Matériel et méthodes**

2. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de <i>Ononis angustissima</i> : effet sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par différents sucres chez le rat .....	76
2.1 Animaux .....	76
2.2 Répartition des rats en groupes et lots .....	76

2.3 Prélèvement sanguin et mesure de la glycémie .....	77
2.4 Expression des résultats .....	77
2.5 Analyses statistiques .....	78

### **Résultats et interprétation**

2. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de <i>Ononis angustissima</i> : effet sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par différents sucres chez le rat .....	79
2.1 L'hyperglycémie provoquée par l'amidon (TTOM) .....	83
2.2 L'hyperglycémie provoquée par le saccharose (TTOS) .....	83
2.3 L'hyperglycémie provoquée par le maltose (TTOM) .....	83
2.4 L'hyperglycémie provoquée par le glucose (TTOG1) .....	83
2.5 L'hyperglycémie provoquée par le glucose (TTOG2 co-administration) .....	84

### **Discussion**

## **Chapitre III : Effet des extraits de *O. angustissima* sur le transport intestinal du glucose**

<b>Introduction</b> .....	91
---------------------------	----

### **Matériel et méthodes**

1. Evaluation de l'effet des extraits de <i>O. angustissima</i> sur le transport intestinal du glucose <i>in vitro</i> (sacs d'intestin) .....	94
1.1 Solutions .....	94
1.2 Mode opératoire .....	95
2. Evaluation de l'effet des extraits de <i>O. angustissima</i> sur le transport intestinal du glucose <i>in situ</i> .....	96
2.1 Solutions .....	96
2.2 Mode opératoire .....	97

### **Résultats et interprétation**

1. Effet des extraits de <i>O. angustissima</i> sur le transport intestinal du glucose <i>in vitro</i> (sacs d'intestin).....	98
2. Effet des extraits de <i>O. angustissima</i> sur l'absorption intestinal du glucose <i>in situ</i> .....	100

### **Discussion**

<b>Discussion générale</b> .....	109
<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	117
<b>Références bibliographiques</b> .....	120
<b>Annexe</b> .....	136
<b>Publication</b> .....	139

## Liste des tableaux

<b>Tableau n°01 :</b>	Caractéristiques des agents antidiabétiques oraux et insuline.....	11
<b>Tableau n°02 :</b>	Caractéristiques des enzymes majeurs de la digestion de glucides.....	20
<b>Tableau n°03 :</b>	Effets antihyperglycemiants de quelques plantes médicinales.....	26
<b>Tableau n°04 :</b>	Effets antihyperglycemiants de quelques plantes médicinales agissant au niveau intestinal : inhibition de la digestion enzymatique de glucide et absorption de glucose.....	28
<b>Tableau n°05 :</b>	Mode opératoire du dosage de polyphénols totaux dans les extraits de la partie aérienne de <i>Ononis angustissima</i> .....	40
<b>Tableau n°06 :</b>	Mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits de la partie aérienne de <i>Ononis angustissima</i> .....	41
<b>Tableau n°07 :</b>	Caractéristiques des extraits préparés de la partie aérienne de <i>Ononis angustissima</i>	45
<b>Tableau n°08 :</b>	Criblage phytochimique des extraits de la partie aérienne de <i>Ononis angustissima</i>	46
<b>Tableau n°09 :</b>	Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de la partie aérienne de <i>Ononis angustissima</i> .....	48
<b>Tableau n°10 :</b>	Pourcentage de réduction du DPPH et IC <sub>50</sub> des différents extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	49
<b>Tableau n°11 :</b>	Pourcentage de réduction du fer et IC <sub>50</sub> des extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	50
<b>Tableau n°12 :</b>	Coefficients de corrélation linéaire (r) entre l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>O. angustissima</i> .....	51
<b>Tableau n°13 :</b>	Pourcentages d'inhibition et IC <sub>50</sub> de l'activité de l' -amylase générés par les extraits de <i>Ononis angustissima</i> , les molécules de référence et l'acarbose .....	67
<b>Tableau n°14 :</b>	Pourcentages d'inhibition et IC <sub>50</sub> de l'activité d' -glucosidases de l'intestin de rat générés par les extraits de <i>Ononis angustissima</i> , les molécules de référence et l'acarbose.....	68
<b>Tableau n°15 :</b>	Coefficient de corrélation (r) entre l'activité inhibitrice de l' -amylase et -glucosidases et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	70
<b>Tableau n°16 :</b>	Répartition des lots de rats expérimentaux et témoins utilisés pour l'évaluation de l'effet des extraits de <i>Ononis angustissima</i> sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale .....	77
<b>Tableau n°17 :</b>	Valeurs de l'AUC 0-180 min, surface sous la courbe de l'évolution de la glycémie postprandiale durant 3h, chez les rats normaux après un test de tolérance oral à l'amidon (TTOA), au saccharose (TTOS), au maltose (TTOM) et au glucose (TTOG1) en présence et en absence d'extraits de <i>O. angustissima</i> et molécules de références et chez les rats témoins (AcB, sérum physiologique).....	80

**Tableau n°18 :** Pourcentages du glucose libéré dans la solution d'incubation (SS) des sacs d'intestin incubés en présence ou en absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence (40mg/ml), durant 30 min d'incubation..... 98

**Tableau n°19 :** Pourcentages de glucose absorbé par l'intestin perfusé *in situ* et pourcentages d'inhibition de l'absorption intestinale en présence ou absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence (40 mg/ml), durant 30 min, chez le rat..... 100

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Différentes parties de <i>O. angustissima</i> , A : la plante entière ; B : tiges et feuilles ; C et D : fleurs .....	30
<b>Figure 2 :</b> Schéma explicatif de la préparation des extraits aqueux et organiques de la partie de <i>O. angustissima</i> (fleurs, feuilles et tiges) .....	36
<b>Figure 3 :</b> Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage colorimétrique de polyphénols totaux (A), de catéchine pour le dosage de flavonoïdes totaux (B) .....	47
<b>Figure 4 :</b> Corrélation entre teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de <i>Ononis angustissima</i> .....	49
<b>Figure 5 :</b> Corrélation entre l'activité antioxydante : DPPH et teneur en polyphénols (A) et en flavonoïdes (B) ; FRAP et teneur en polyphénols (C) et en flavonoïdes (D) .....	52
<b>Figure 6 :</b> Corrélation entre l'activité inhibitrice de l' -amylase et la teneur en polyphénols (A) et en flavonoïdes (B) ; Corrélation entre l'activité inhibitrice de l' -glucosidase et la teneur en polyphénols (C) et en flavonoïdes (D).....	70
<b>Figure 7 :</b> Valeurs de l'AUC <sub>0-180 min</sub> , surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral à l'amidon et traités par les extraits de <i>O. angustissima</i> ou par les molécules de références (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.....	80
<b>Figure 8 :</b> Valeurs de l'AUC <sub>0-180 min</sub> , surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral au saccharose et traités par les extraits de <i>O. angustissima</i> ou par les molécules de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.....	81
<b>Figure 9 :</b> Valeurs de l'AUC <sub>0-180 min</sub> , surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux ayant été soumis à un test de tolérance oral au maltose et traités par les extraits de <i>O. angustissima</i> ou par les molécules de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.....	81
<b>Figure 10 :</b> Valeurs de l'AUC <sub>0-180 min</sub> , surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral au glucose et traités par les extraits de <i>O. angustissima</i> ou par les molécules de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.....	82
<b>Figure 11 :</b> Valeurs de l'AUC <sub>0-180 min</sub> , surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral au glucose (co-administration) et traités par les extraits de <i>O. angustissima</i> ou par les molécule de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.....	82
<b>Figure 12 :</b> Modele Cellulaire du cotransporteur Na <sup>+</sup> -glucose. SGLT1/2 : cotransporteur Na <sup>+</sup> -glucose ; GLUT2 : transporteur de glucose.....	93

**Figure 13 :** Pourcentages du glucose libéré dans la solution d'incubation des sacs d'intestin incubés en présence ou en absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence CT et AG (40mg/ml), durant 30 min d'incubation..... 99

**Figure 14 :** Pourcentages de glucose absorbé par l'intestin perfusé *in situ* chez le rat en présence ou absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence à 40 mg/ml, durant 30 min..... 101

## Liste des abréviations

---

<b>AcB</b> : l'acarbose (témoin positif)	<b>HbA1c</b> : Hémoglobine glyquée
<b>AcFT</b> : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles	<b>HGPP</b> : L'hyperglycémie postprandiale
<b>ADA</b> : Association américaine de diabète	<b>IDF</b> : International Diabetes Federation
<b>AG</b> : Acide gallique	<b>MODY</b> : Maturity-Onset Diabetes of the Young
<b>AGE</b> : Produits terminaux de glycation	<b>MSPRH</b> : Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière
<b>AJAA</b> : Algerian Journal of Arid Areas	<b>n-BFT</b> : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles
<b>AMPK</b> : Adenosine mono-phosphate-activated protein kinase	<b>NDDG</b> : National Diabetes Data Group
<b>AqFl</b> : Extrait aqueux de fleurs	<b>OMS</b> : Organisation mondiale de la santé
<b>AqFT</b> : Extrait aqueux de tiges et de feuilles	<b>PKC</b> : Protéine kinase C
<b>ATP</b> : Adénosine Triphosphate	<b>pNPG</b> : 4-nitrophenyl -D-glucopyranoside
<b>AUC</b> : Area under the curve	<b>PPA</b> : Amylase du pancréas de porc
<b>BHT</b> : Buthyl-hydroxy toluène	<b>SM</b> : solution à introduire dans le coté séreux
<b>CI50</b> : Concentration inhibitrice à 50%	<b>SGLTn</b> : Sodium-dependent Glucose Transporter
<b>CT</b> : Catéchine	<b>SS</b> : solution d'incubation représente le coté séreux
<b>DNSA</b> : Acide 3,5-dinitrosalicylique	<b>TCA</b> : Acide trichloracétique
<b>DPP-4</b> : Dipeptidyl-peptidase-4	<b>TTOA</b> : Test de tolérance orale à l'amidon
<b>DPPH</b> : 2,2-Diphényle-1-Picryl- Hydrazyl	<b>TTOG</b> : Test de tolérance orale au glucose
<b>EMFT</b> Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles	<b>TTOM</b> : Test de tolérance orale au maltose
<b>ERO</b> : Espèces réactives oxygénées	<b>TTOS</b> : Test de tolérance orale au saccharose
<b>ES</b> : erreur standard	<b>WHO</b> : World Health Organization
<b>FID</b> : Fédération Internationale du Diabète	
<b>FRAP</b> : Ferric ion Reducing Antioxidant Power	
<b>GLP-1</b> : Glucagon-like peptide-1	
<b>GLUTn</b> : Transporteurs de glucose	
<b>GOD-POD</b> : Glucose Oxydase-Peroxydase, kit commercial de dosage du glucose par la méthode oxidase	
<b>GPP</b> : glycémie postprandiale muqueux de l'intestin	

# **Introduction générale**

## Introduction générale

Le diabète constitue un problème de santé publique majeur et il est une des quatre maladies non transmissibles prioritaires ciblées pour une intervention par plusieurs pays du monde. On a assisté au cours des dernières décennies à une augmentation constante du nombre de cas de diabète et de la prévalence de la maladie. Sa prévalence a augmenté plus rapidement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire que dans les pays à revenu élevé. Le diabète sous toutes ses formes impose aux pays des coûts humains, sociaux et économiques inacceptables, quel que soit leur niveau de revenu [FID, 2013 (a) ; OMS, 2016]. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre d'adultes affectés par le diabète sucré est passé de 108 millions en 1980 à 422 millions en 2014 et atteindra 642 millions en 2040 dont 90% sont des diabétiques de type 2. La prévalence mondiale du diabète chez les adultes de plus de 18 ans est passée de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2014. En Algérie, les tendances de la prévalence du diabète sont passées de 5 % (1980) à 10,4% (2014) [Whiting et al., 2011 ; FID, 2015 ; OMS, 2016].

Le diabète sucré est une maladie métabolique chronique, endocrinienne, insidieuse, ubiquitaire et d'étiologie diverse [WHO, 2006 ; ADA, 2011 ; FID, 2013 (a)]. Cette maladie est complexe par ses mécanismes physiopathologiques et par son déterminisme génétique. Elle est caractérisée par sa chronicité et la sévérité de ses complications, invalidante et dont la prise en charge médicale est très coûteuse. L'obésité, la sédentarité ainsi qu'une alimentation malsaine conjugués à une prédisposition génétique sont les facteurs de risque majeurs du diabète [Jain et Saraf. 2010].

Le diabète sucré est caractérisé par une hyperglycémie chronique, résultant d'une déficience absolue ou relative de la sécrétion en insuline, d'action d'insuline, ou de ces deux anomalies associées. Cette hyperglycémie qui peut être permanente ou seulement postprandiale provoque des complications métaboliques aiguës et chroniques [WHO, 2006 ; ADA, 2011 ; FID, 2013 (a)]. L'hyperglycémie chronique est responsable notamment de la rétinopathie diabétique, l'insuffisance rénale, la cardiopathie, la neuropathie diabétique, l'ulcération des pieds et l'amputation [Sautou-Miranda et al. 2008]. Par ailleurs, une hyperglycémie prolongée conduit à une production excessive de radicaux libres, perturbant ainsi la défense antioxydante endogène, générant un stress oxydant, à l'origine de l'insulinorésistance du diabète de type 2 [Hokayem et al. 2012].

L'hyperglycémie postprandiale (HGPP) est une phase qui se caractérise par une forte, rapide et permanente augmentation du taux de glucose dans le sang à la suite d'un repas [Ceriello,

**2005**], résultante du mauvais contrôle de la glycémie postprandiale (GPP), première étape vers l'intolérance au glucose et le développement ultérieur du diabète type 2 [**ADA, 2001 ; Bonora et al., 2001 ; IDF, 2007 ; Santilli et al., 2010**].

Compte tenu de son rôle délétère potentiel, l'hyperglycémie postprandiale (HGPP) constitue un facteur de risque absolu générant des effets néfastes. Elle joue un rôle important dans le développement du diabète type 2 et ses complications micro- et macrovasculaires [**IDF, 2007 ; Giugliano, 2008 ; Zheng et al., 2010**]. Elle est associée à un risque accru de rétinopathie et cancer. Elle provoque un stress oxydatif, l'inflammation et un dysfonctionnement endothélial [**IDF, 2007 ; Giugliano, 2008 ; Node et Inoue, 2009**]. L'hyperglycémie postprandiale est associée à une diminution du volume et du flux sanguin myocardique ainsi qu'à une altération de la fonction cognitive chez les sujets âgés atteints de diabète de type 2 [**IDF, 2007 ; Giugliano, 2008 ; Rebolledo et Dato, 2005**].

De ce fait, le contrôle de l'HGPP est aussi important que le contrôle de la glycémie à jeun chez les diabétiques [**Giugliano, 2008**]. Outre les mesures diététiques, trois grandes approches pharmacologiques peuvent être envisagées pour mieux contrôler l'hyperglycémie post-prandiale : ralentir, voire inhiber, l'absorption intestinale des glucides alimentaires; assurer une meilleure imprégnation insulinique immédiatement après le repas; et diminuer la sécrétion et/ou l'action de glucagon [**Scheen et al., 2002**].

Une des approches thérapeutiques pour la réduction de l'HGPP et l'excursion glycémique après un repas consiste à l'inhibition des enzymes digestives ( -amylase et -glucosidases), responsables de l'hydrolyse des glucides alimentaires complexes en sucres simples et assimilables, retardant ainsi leur absorption au niveau de l'intestin grêle. Les agents antidiabétiques oraux appartenant à la classe des inhibiteurs d' -glucosidases qui sont conventionnellement employés dans le contrôle du diabète sont le miglitol, le voglibose et notamment l'acarbose. Ce dernier, le plus utilisé depuis une vingtaine d'année a montré une efficacité sur la réduction de l'HGPP. Cependant, ces inhibiteurs sont associées à des effets secondaires indésirables gastro-intestinaux liés à la fermentation par les bactéries intestinales des sucres non-absorbés, tels que la douleur abdominale, flatulence, ballonnements et diarrhée [**Bnouham et al., 2010 ; Standl et Schnell, 2012**].

Le contrôle du diabète sans effets secondaires reste un défi, c'est pourquoi la recherche de nouveaux agents thérapeutiques comme les inhibiteurs d' -glucosidases à partir de plantes médicinales ou autres ressources biologiques (microorganismes, algues, plantes aromatiques et

condimentaires) est devenue très importante comme moyen efficace et sans effets secondaires pour cette maladie [Odhav et al., 2010 ; Prabhakar et Doble, 2011]. Les plantes ont toujours été une source exemplaire de médicaments dont beaucoup, actuellement disponibles, dérivent directement ou indirectement de plantes [Odhav et al., 2010 ; Donga et al., 2011].

Par ailleurs, la recherche de nouvelles substances naturelles isolé à partir de plantes inhibant l'absorption intestinale de glucose réduisant ainsi l'HGPP a fait l'objet de nombreuses recherches et publications à l'exemple de la phlorizine, isolée du pommier (*Malus sp.*, *Rosaceae*), ainsi que dans d'autres espèces de *Rosaceae* et de *Symplocaceae*. Elle fût reproduite par synthèse en 1942. Son mécanisme d'action, fût élucidé à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle avec la découverte des cotransporteurs. Elle est reconnue en tant que inhibiteur de transporteur de glucose via sa structure, c'est un analogue aux molécules fixées sur ces transporteurs, faisant intervenir une inhibition compétitive du SGLT1 intestinale et SGLT2 rénale [Ehrenkranz et al., 2005 ; White et Pharm, 2010 ; Kilov et al 2013 ; Blaschek, 2017].

L'activité antidiabétique des plantes médicinales est attribuée à leur composition en métabolites secondaires, appelés aussi phytoconstituants, dont les composés phénoliques, flavonoïdes, coumarines, alcaloïdes, glycosides, saponines et huiles essentiels. Ils agissent seuls ou d'une manière synergique en modulant directement ou indirectement l'activité d'hormones, d'enzymes et de voies métaboliques impliqués dans le métabolisme et l'homéostasie glucidique [Prabhakar et Doble. 2008 ; Prabhakar et Doble. 2014].

Ces dernières années, une attention particulière a été accordée aux plantes médicinales utilisées comme remède traditionnel dans le traitement et le contrôle du diabète sucré. beaucoup d'efforts ont été faits pour identifier des inhibiteurs efficaces des  $\alpha$ -glucosidases à partir de ces ressources naturelles afin de développer de nouveaux composés antidiabétiques pour le traitement du diabète [Kumar et al., 2011 ; Saha et al., 2012].

De nombreuses études dans le monde se sont intéressées aux plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète du fait de leur usage populaire très répandu. Dans le but d'élucider leur mécanisme d'action potentiel et expliquer leur effet antihyperglycémiant notamment par leur action inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase au niveau du tube digestif et de déterminer et caractériser le (s) composé (s) actif (s). Citons à titre d'exemple, les études de Kumar et al., (2012) de plantes utilisées en médecine traditionnelle indienne, Ramirez et al., (2012) ; Mata et al., (2013) ; Sales et al., (2012) au Mexique, Andrew et al., (2013) ; Ezuruike et Prieto, (2014) au Nigeria, Kobayashi et al., (2003) en Mongolie, Kadir et al.,

(2012) ; **Kabir et al., (2014 (a))** au Bangladesh, **Nickavar et Yousefian, (2011) ; Salhi et al., (2013) ; Safamansouri et al., (2014)** en Iran, **Benalla et al., (2010)** au Maroc, **Bechiri et al., (2015)** en Algérie.

Selon la bibliographie, différentes enquêtes ethnobotaniques réalisées à travers le monde ont permis le recensement de plus de 800 plantes utilisées traditionnellement pour le contrôle du diabète sucré, dont 450 espèces ont prouvé leur effet antidiabétique suite à l'expérimentation scientifique, tandis que le mécanisme d'action a été élucidé pour 109 plantes seulement [**Prabhakar et Doble. 2011**]. Malgré les progrès en chimie organique de synthèse (chimie médicale) du vingtième siècle, plus de 25 % des médicaments tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes [**Newman et al., 2000**]. Les recherches scientifiques récentes montrent que différentes substances isolées à partir de plantes ont montré un effet hypoglycémiant important [**Benalla et al., 2010**].

Parmi les plantes étudiées et montrant une activité inhibitrice  $\alpha$ -glucosidasique figurent 47 espèces appartenant à 29 familles dont les Fabacées, Crassulacées, Hippocrateacées, Lamiacées et les Myrtacées. *Salacia reticulata* (Hippocrateacées) et *Morus alba* (Moracées) sont parmi les plus efficaces. **Benalla et al., (2010)** rapportent dans leur revue de plantes médicinales étudiées pour leur activité inhibitrice  $\alpha$ -glucosidasique que les composés naturels qui ont une forte activité inhibitrice sont : les acides phénoliques (l'acide chlorogénique, ac.betulinique, ac.syringique, ac.vanillique, ac.oleanolique ac.corosolique, ac.ellagique), les alcaloïdes, stilbenoides triterpènes, phytosterol, myoinositol, flavonoïdes, anthraquinones, anthrones, xanthones et d'autres.

Notre travail s'inscrit dans le cadre générale de l'étude des propriétés antidiabétiques des plantes médicinales de la flore locale dont nous nous sommes intéressés à *Ononis angustissima* (Lam. subsp. polyclada Murb), une espèce végétale de la famille des Fabaceae plante endémique du nord du Sahara, utilisée dans le traitement du diabète sucré par les populations autochtones.

Notre objectif principal est d'étudier les propriétés antidiabétiques présumées de cette plante et tenter d'élucider son mécanisme d'action potentiel, en évaluant son effet inhibiteur sur la digestion, l'absorption des sucres au niveau de l'intestin et sur l'hyperglycémie postprandiale chez le rat.

Pour ce faire, nous avons adopté la démarche suivante et réalisé ce qui suit :

- Une étude phytochimique de la partie aérienne de la plante qui consiste en la préparation de différents extraits aqueux et organiques. Ces extraits ont fait l'objet ensuite de tests phytochimiques qualitatifs de caractérisation de leurs principaux constituants, Leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux ont également été déterminé.
- Une étude des activités biologiques de *Ononis angustissima* incluant :
  - une étude de l'activité antioxydante des extraits et fractions de *Ononis angustissima*, *in vitro*, en utilisant le test de piégeage du radical libre DPPH et le test du pouvoir réducteur du fer.
  - Une évaluation de leur activité inhibitrice vis-à-vis des enzymes digestives des sucres alimentaires *in vitro* : l' -amylase pancréatique et les -glucosidases intestinales.
  - Une évaluation de leur effet sur l'hyperglycémie postprandiale induite chez les rats soumis à une hyperglycémie par différents sucres (amidon, saccharose, maltose et glucose), utilisant la catéchine, l'acide gallique et l'acarbose comme molécules de référence.
  - Une évaluation *in vitro* et *in situ* de leur activité inhibitrice de l'absorption intestinale de glucose.

# **Synthèse bibliographique**

## Synthèse bibliographique

### I. Généralités sur le diabète sucré

#### 1. Définition et diagnostic du diabète sucré

Le diabète sucré est une maladie métabolique chronique, endocrinienne, complexe insidieuse, ubiquitaire et d'étiologie diverse, caractérisée par une hyperglycémie chronique, résultant d'une déficience absolue ou relative de la sécrétion en insuline (apparaît lorsque les cellules du pancréas ne produisent pas suffisamment d'insuline), d'action d'insuline (inefficacité de l'insuline produite sur les cellules cibles), ou de ces deux anomalies associées. Cette hyperglycémie qui peut être permanente ou seulement postprandiale provoque des complications métaboliques aiguës et chroniques [OMS, 2006 ; ADA, 2011 ; FID, 2013 (b)].

Selon l'ADA et l'OMS, le diagnostic de diabète est établi selon certains critères, principalement : une glycémie plasmatique à jeun  $\geq 1,26$  g/l (7,00 mmol/l) ; une hyperglycémie symptomatique  $\geq 2$  g/L (11,1 mmol/L) est une glycémie aléatoire mesurée à tout moment de la journée, sans égard au moment du dernier repas avec présence de symptômes cliniques : polyurie, polydipsie, amaigrissement inexplicé, somnolence voir coma.; Une glycémie 2 h après une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale par l'ingestion de 75 g de glucose (HGPO)  $\geq 2,00$  g/l [Drouin et al., 1999 ; OMS, 1999 ; ADA, 2014]. Le diagnostic est plus commode par la mesure du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c  $\geq 6,5$  %), cette dernière est mesurée à tout moment de la journée, indiquant la glycémie moyenne au cours des trois derniers mois, ce qui permet d'éviter la variation quotidienne de la glycémie [Goldenberg et Punthakee, 2013 ; ADA, 2016].

#### 2. Epidémiologie

Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon très alarmante. Il touche plus de 280 millions de personnes dans le monde et pourrait atteindre plus du double d'ici l'horizon 2030 (soit une augmentation de plus de 122%) [Wild et al., 2004 ; Whiting et al., 2011]. Après qu'il a été estimé à 108 millions en 1980, 135 millions en 1995, 151 à 171 millions en 2000 [IDF, 2000 ; Wild et al., 2004 ; Whiting et al., 2011 ; OMS, 2016], 194 millions en 2003 [IDF 2003 ; Whiting et al., 2011 ; OMS, 2016], comparé à 246 millions entre 2006 et 2007 [IDF, 2006 ; Unwin et al., 2010 ; Whiting et al., 2011], 285 millions en 2010 (soit 6.4%), 422 millions en 2014 et à 300 millions en 2025 [IDF, 2009 ; Shaw et al., 2010 ; Unwin et al.,

**2010 ; Whiting et al., 2011 ; OMS, 2016**]. La prévalence mondiale du diabète chez les adultes de plus de 18 ans est passée de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2014 [**OMS, 2016**].

Au cours des 10 dernières années, la prévalence du diabète a augmenté plus rapidement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire que dans les pays à revenu élevé [**OMS, 2016**]. En 2012, la maladie a tué 1,5 million de personnes dans le monde, auxquels il faut ajouter 2,2 millions de décès causés par des maladies liées au diabète (maladies cardiovasculaires et d'autres affections), ce qui fait un total de 3,7 millions de décès. Sur ces 3,7 millions de décès, 43% surviennent avant l'âge de 70 ans. Le pourcentage de décès dus à l'hyperglycémie ou au diabète survenant avant l'âge de 70 ans est plus élevé dans les pays à revenu faible ou intermédiaire que dans les pays à revenu élevé [**Roglic et Unwin, 2010 ; OMS, 2016**].

En Algérie, les études concernant cette maladie sont encore peu nombreuses et très parcellaires malgré qu'elle est classée parmi les pays d'Afrique du Nord les plus touchés par cette pathologie [**Malek, 2008 ; Malek et al., 2013**]. Selon l'**OMS, (2016)** 10,2 % des diabétiques sont des hommes alors que les femmes représentent 10,7%. La maladie continue d'augmenter d'une manière particulièrement accélérée, en particulier dans certaines régions défavorisées du pays. le nombre des diabétiques est passé d'un million de personnes en 1993, à plus de 2,5 en 2007 soit une prévalence de 7,3% et à plus de 3 millions de personnes en 2011 soit 7,4% de la population algérienne et 6,9% de la population mondiale avec une prévision qui atteindra 8,9% en 2025 et plus de 9,3% de la population algérienne et 7,7% de la population mondiale en 2030 [**Malek et al., 2001 ; MSPRH, 2005 ; Malek, 2008 ; Shaw et al., 2010 ; Whiting et al., 2011**]. En raison de son caractère pernicieux et son évolution silencieuse et à défaut de dépistage systématique beaucoup de personnes diabétiques ignorent leur maladie, estimés à 10% de la population algérienne [**MSPRH, 2005 ; Eddouks et al., 2007**].

Sur la population algérienne dont l'âge est compris entre 20 et 75 ans l'estimation était de 8,4% de diabètes sucrés en 2007, dont 15,3% au niveau de Tlemcen et les hommes 20,4% étant plus touchés que les femmes (10,7%) ; 10,6% au niveau de Ain Taya, 8,9% à Sétif et 6,8% à Oran [**Unwin et al., 2001 ; OMS, 2005 ; Zaoui et al., 2007 ; Chibane et al., 2008 ; Malek, 2008**].

L'étude épidémiologique réalisée par **Zaoui et al., (2007)** a révélé que dans la région de Tlemcen (Ouest algérien) et sur un échantillon de 7 656 individus, la prévalence du diabète de type 2 est de 10,5 % et celle du diabète de type 1 de 3,7 %, soit un total de 15,3 % en milieu

urbain et de 12,9 % en milieu rural. Une autre étude épidémiologique a montré que le diabète est présent chez les deux sexes dans la communauté urbaine de Tlemcen 11,93% chez l'homme et 12,54 chez la femme [**Boukli Hacène et Meguenni, 2007**].

### 3. Classification

La classification étiologique des diabètes sucrés proposée par l'ADA et l'OMS s'actualise en permanence en fonction des données scientifiques récentes dont celles du National Diabetes Data Group (NDDG), selon lesquelles le diabète se manifeste sous quatre différentes formes, deux sont majoritaires, le diabète type 1 qui survient le plus souvent avant l'âge de 20 ans et correspond à une minorité de sujets (5 à 10% de cas). Le diabète type 2 qui survient le plus souvent après l'âge de 40 ans et représente environ 90 à 95 % des diabètes. Les autres formes sont beaucoup moins fréquentes : le diabète gestationnel, correspond à un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie diagnostiquée pour la première fois au cours de la grossesse, apparaissant entre la 24<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine de grossesse qui peut disparaître ou pas après l'accouchement ; les diabètes dits " d'étiologies spécifiques" sont secondaires à une maladie pancréatique, à une endocrinopathie, iatrogènes ou encore liés à des anomalies génétiques [**ADA, 2014 ; ADA, 2016**].

Le diabète de type 1 est remarquable par son début brutal : syndrome cardinal associant polyuropolydipsie, polyphagie, amaigrissement et asthénie chez un sujet jeune, mince, avec cétonurie associée à la glycosurie [**Grimaldi, 2000**]. Il en existe sous deux formes ; une forme auto-immune, qui correspond à une destruction de cellules pancréatiques, suite à une réaction auto-immune, par des anticorps dirigées contre elles, aboutissant à une carence absolue en insuline, l'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20 % de cellules fonctionnelles ; et une forme idiopathique qui apparaît le plus souvent dans des ethnies noires d'origines africaines subsahariennes [**Drouin et al., 1999 ; Grimaldi, 2000; Grimaldi, 2009**]. On ne retrouve d'antécédent familial que dans 1 cas sur 10. Il survient essentiellement avant 20 ans et il connaît un pic d'incidence vers 12 ans, son traitement repose donc sur les injections d'insuline qui sont vitales chez ces personnes [**Grimaldi, 2000 ; ADA, 2016**].

À l'opposé, le diabète de type 2 est de loin le plus fréquent se caractérise typiquement par la découverte fortuite d'une hyperglycémie chez un sujet de plus de 40 ans ayant souvent des facteurs de risques cardiovasculaire, dont le principal facteur est le surpoids (surcharge pondérale de prédominance abdominale), et des antécédents familiaux de diabète [**Drouin et al., 1999 ; Grimaldi, 2000**]. La survenue du diabète de type 2, associe dans des proportions variables, à une

insulinorésistance à composante génétique, favorisée par l'obésité abdominale et une insulinopénie relative. Ce trouble explique l'évolution du diabète de type 2 dans 50% des cas vers l'insulinorequérance [Drouin1999 ; Grimaldi, 2000].

C'est le diabète type 2 qui pose un problème de santé publique. Sa prévalence augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de l'obésité dans les populations des pays industrialisés. Cette maladie n'épargne pourtant pas les pays sous-développés où le diabète 2 atteint parfois une prévalence de 20 à 30 %, en raison d'une prédisposition génétique couplée à une modification rapide du mode de vie : urbanisation brutale, sédentarisation et habitudes alimentaires malsaines des populations [Grimaldi, 2000 ; ADA, 2016]. Le but du traitement de ce type de diabète est de prévenir au maximum l'apparition de ses complications [Drouin, 1999].

#### 4. Complications

Le diabète sucré peut être directement responsable de complications aiguës (métaboliques) et des complications chroniques (dégénératives). Les complications aiguës sont des urgences métaboliques (malaise voire comas), potentiellement mortelles, par hyperglycémie et acidocétose (insuline non prescrite ou insuffisamment dosée) qui apparaît chez le diabète de type 1 (tout âge), mais aussi par hypoglycémie (chez le diabète type 1 et 2 traité par l'insuline ou par sulfamide hypoglycémiant) résultante de l'administration de quantités inadaptées d'insuline. De plus, le coma hyperosmolaire non cétosique apparaît surtout chez le diabète de type 2 (95% des cas). Ces complications sont attribuables au déséquilibre métabolique associé à un diabète non contrôlé [Grimaldi, 2000 ; Orban et Ichai, 2008 ; Grimaldi, 2009 ; ADA, 2016].

Par contre, les complications chroniques et dégénératives du diabète surviennent à la suite d'une hyperglycémie à long terme, elles sont de deux types :

- les microangiopathies qui touchent les petits vaisseaux (la microcirculation), et comprennent : la rétinopathie diabétique qui est la principale cause de cécité et de troubles visuels, la néphropathie diabétique qui se manifeste au niveau des reins par une insuffisance rénale liée à la gravité et à la durée de la maladie et la neuropathie diabétique touchant les nerfs.

- les macroangiopathies diabétiques, sont l'atteinte des artères musculaires allant de l'aorte jusqu'aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200 µm qui sont destinés à irriguer le cœur, les jambes et le cerveau. Les macroangiopathies sont classés en : maladie coronarienne (risques cardiovasculaires), cérébrovasculaire (accidents cérébraux) et artériopathie. Cette dernière associe deux maladies artérielles distinctes, l'athérosclérose (s'accompagnant parfois

d'une médiocalcose) qui semble histologiquement identique à l'athérosclérose du non diabétique d'une part et d'autre part, l'artériosclérose, caractérisée par une prolifération endothéliale et une dégénérescence du média [Raccach, 2004 ; Grimaldi, 2009 ; ADA, 2016].

## 5. Traitements

Pour retarder voire prévenir la survenue et ralentir la progression de ces complications aiguës et chroniques, il existe plusieurs agents pharmacologiques qui sont utilisés en plus des mesures hygiéno-diététiques et la pratique de l'activité physique régulière dans le but d'obtenir un contrôle glycémique fiable et correct [Virally et al., 2008 ; Wherrett et al., 2013].

Le traitement du diabète de type 1 repose sur l'insulinothérapie, seul moyen de combler la carence insulinique, dans le but d'atteindre un équilibre glycémique. Des analogues d'insuline basale à action prolongée, des analogues d'insuline basale à action rapides et une perfusion sous cutanée continue d'insuline sont utilisés. Tandis que le traitement du diabète 2 nécessite non seulement de chercher à diminuer l'hyperglycémie, mais aussi à corriger les autres facteurs de risque vasculaire souvent associés [Sautou-Miranda et al., 2008 ; Virally et al., 2008 ; Wherrett et al., 2013].

Dans le cas d'un diabète de type 2 diagnostiqué, le premier recours consiste en un traitement non pharmacologique basé sur des règles hygiéno-diététiques (alimentation saine, équilibrée et bien adaptée) associées à une activité physique régulière. En cas d'échec, il faut alors opter pour un traitement médicamenteux, par une monothérapie orale, en premier lieu, utilisant les antidiabétiques oraux, qui sont classés selon leur mode d'action en trois principales catégories : les sulfamides hypoglycémisants, les biguanides et les inhibiteurs des alpha-glucosidases qui diffèrent par leur mode d'action ainsi que la cible physiopathologique (**tableau n°1**). Des associations médicamenteuse (bithérapie voire trithérapie) sont recommandés en cas d'échec de la monothérapie orale initiale [Ducobu, 2007 ; Sautou-Miranda et al., 2008 ; Villiot-danger, 2011].

Si un diabétique de type 2 demeure mal équilibré, le recours au traitement par l'insuline s'impose. L'insulinothérapie permet d'obtenir une amélioration nette du contrôle glycémique, si ce n'est pas toujours le cas, est alors associée à la prescription de biguanides qui en potentialisent l'action [Chamahi, 2008 ; Villiot-danger, 2011].

L'arsenal des antidiabétiques oraux de la pharmacopée moderne comprend les sulfamides, les

biguanides, les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases, les glinides, ainsi que de nouveaux médicaments tels que les analogues des glucagon-like peptide-1 (GLP-1), les inhibiteurs du cotransporteur de la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) et les inhibiteurs de cotransporteur sodium-glucose de type 2 intestinale ou rénale (SGLT). Ils permettent tous de traiter le diabète de type 2. Ces différentes classes pharmacologiques sont résumées dans le **tableau n°1** dans lequel les mécanismes d'action, la voie d'administration, les avantages ainsi que les inconvénients sont mentionnés.

**Tableau n° 1 : Caractéristiques des agents antidiabétiques oraux et insuline [Pillon et al., 2014].**

Classe pharmacologique	Exemple de molécules	Mécanisme d'action	Voie	Avantages	Inconvénients
<b>Sulfamides hypoglycémiantes</b>	Gliclazide, glipizide, glibépiride, glibenclamide	Augmentation de la sécrétion d'insuline	Orale	Bonne tolérance Faible coût	Hypoglycémie Augmentation du poids Nécessité de surveiller les glycémies Initiation du traitement de manière prudente (nécessité d'une titration)
<b>Biguanides</b>	Metformine	Effet antihyperglycémiant Diminution de l'insulinorésistance (effet extra-pancréatique)	Orale	Bonne tolérance à long terme Pas de prise de poids Faible risque d'hypoglycémie Faible coût	Diarrhées Possible lien avec la survenue d'une acidose lactique À éviter en cas d'insuffisance rénale
<b>Inhibiteurs des <math>\alpha</math>-glucosidases</b>	Acarbose, miglitol	Inhibition des $\alpha$ glucosidases intestinales : diminution de la dégradation de polysaccharides en monosaccharides absorbables	Orale	Pas de prise de poids Faible coût	Flatulences Diarrhées
<b>Glinides</b>	Répaglinide	Stimulation de la sécrétion d'insuline	Orale	Action hypoglycémiant rapide	Prise de poids à long terme Hypoglycémie Nécessité d'une surveillance des glycémies
<b>Analogues des glucagon-like peptide-1 (GLP-1)</b>	Exénatide, liraglutide	Augmentation de la sécrétion d'insuline et suppression de la sécrétion du glucagon	Sous-cutanée	Pas de prise de poids Faible risque d'hypoglycémie	Pancréatite À éviter en cas d'insuffisance rénale
<b>Inhibiteurs du cotransporteur de la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4)</b>	Sitagliptine, vildagliptine, saxagliptine	Augmentation des concentrations endogènes d'incrétines	Orale	Faible risque d'hypoglycémie	Pancréatite
<b>Inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2)</b>	Dapagliflozine	Réduction de la réabsorption du glucose au niveau du tubule contourné proximal	Orale	Perte de poids	Polyurie Insuffisance rénale fonctionnelle par déshydratation Hypotension artérielle Infections urinaires Mycoses vaginales À éviter en cas d'insuffisance rénale
<b>Insuline</b>		Active directement le récepteur à l'insuline de cellules cibles	Sous-cutanée	Bon équilibre glycémique comparativement aux autres médicaments	Prise de poids Hypoglycémies Nécessité d'une surveillance des glycémies

## 6. Diabète sucré et l'hyperglycémie postprandiale

L'incapacité des diabétiques à contrôler la variation rapide et répétée du taux de glucose dans le sang liée à l'état postprandiale constitue la source majeure de l'installation des complications du diabète [Piconi, 2006]. Le désordre glycémique contribue à la fois à l'hyperglycémie chronique (qui inclut l'hyperglycémie à jeun et l'hyperglycémie postprandiale) et à l'hyperglycémie aiguë (due aux fluctuations aiguës de la glycémie entre pics et nadirs) [Monnier et al., 2006 ; Bonomini et al., 2015]. Ces deux composantes conduisent aux complications du diabète à travers deux mécanismes : glycation excessive et accélérée de protéines et activation du stress oxydatif avec surproduction des espèces réactives oxygénées (ERO) [Bonomini et al., 2015].

L'exposition de la cellule à une fluctuation violente du taux de glucose (hyperglycémie oscillante) est plus dangereuse que l'exposition à un taux de glucose élevé (hyperglycémie stable) puisque ça augmente les ERO du stress oxydatif et influence la réponse antioxydante tout en conduisant la cellule à des dommages cellulaires et une apoptose [Ceriello et al., 1998 ; Piconi, 2006 ; Zheng et al., 2010].

D'après l'ADA, le mot postprandial veut dire après un repas, donc la glycémie postprandiale (GPP) est la concentration du glucose après un repas dont la hausse et la durée dépendent strictement de la quantité et la qualité des glucides, présence d'autres éléments nutritifs, temps de la digestion et de l'absorption, la quantité de monosaccharides absorbés et de la vitesse de leur absorption au niveau de l'intestin grêle. Chez l'individu sain, la glycémie est étroitement contrôlée, tant à l'état de jeûne que durant les périodes postprandiales [ADA, 2001 ; Rebolledo et Dato, 2005]. Cette régulation repose sur plusieurs facteurs déterminant le profil de la GPP : L'absorption de monosaccharides, la sécrétion de l'insuline et le glucagon et leurs effets coordonnés sur le métabolisme du glucose au niveau du foie (production et stockage du glucose) et tissus périphériques (l'utilisation du glucose) [ADA, 2001 ; Rebolledo et Dato, 2005 ; Giugliano, 2008].

L'organisation mondiale de la santé (OMS) et la fédération international du diabète (IDF) définissent la tolérance normale au glucose comme étant inférieure à 7,8 mmol/l (140 mg/dl) deux heures après l'ingestion d'une charge de 75 g de glucose lors d'un test oral de tolérance au glucose [WHO, 2006 ; IDF, 2007]. L'hyperglycémie postprandiale (HGPP) est définie comme un niveau de glycémie plasmatique supérieur à 7,8 mmol/l (140 mg/dl) deux heures après l'ingestion d'aliments [IDF, 2007]. Le pic est obtenu 1h après la prise de repas et revient

typiquement aux niveaux préprandiaux après 2 à 3h. Même si la concentration du glucose revient au niveau préprandial, l'absorption du monosaccharide continue au moins 5-6h après un repas [ADA, 2001 ; Giugliano, 2008 ; Raghavan et Garber, 2008]. Basé sur l'évaluation de l'HGPP 2 h après ingestion d'un repas, une personne est classée comme normale, avec une intolérance au glucose ou diabétique [Bonora et al., 2001].

L'hyperglycémie postprandiale est un phénomène très fréquent chez les personnes atteintes de diabète de type 1 et de type 2 [UKPDS, 1998 ; IDF, 2007].

### 6.1 Les variations de la glycémie chez une personne saine

Il apparaît ainsi que chez les personnes qui ne sont pas diabétiques et qui prennent 3 repas quotidiens à des heures relativement fixes, le nyctémère peut être divisé en 3 périodes qui correspondent aux états de jeûne, postprandiaux et post-absorptifs [Monnier, 2000 ; Monnier et Colette, 2008].

Les périodes postprandiales (4 heures chacune) couvrent donc un intervalle de temps de l'ordre de 12 heures, c'est à dire une demie journée. L'état de jeûne est limité uniquement à une période de 3 à 4 heures en fin de nuit. Par ailleurs, compte tenu des superpositions entre états postprandiaux et post-absorptifs, on peut considérer qu'une dizaine d'heures sont passées en période post-absorptive [Monnier et Colette, 2008].

L'état postprandial, dérivé du latin "postprandium", s'étale sur une période de 4 heures après ingestion d'un repas [Dinneen, 1992]. Pendant cette période, les glucides alimentaires (en majorité les amidons) sont progressivement hydrolysés par les enzymes du tube digestif. Les monosaccharides qui sont libérés par cette hydrolyse sont ultérieurement absorbés par l'intestin pour pénétrer dans la circulation sanguine. La conséquence est une montée de la glycémie qui peut être plus ou moins intense [ADA, 2001 ; Raghavan et Garber, 2008]. Le taux de glucose absorbé est plus que le double du taux de glucose produit et reste dépendant de la qualité et la quantité du repas. Une fois, le glucose est en absorption, la production de glucose est supprimée et son utilisation par le foie, le muscle et le système adipeux est accélérée [Giugliano, 2008]. Ainsi, chez le sujet normal, les montées glycémiques postprandiales restent limitées en durée et en amplitude [Monnier et Colette, 2008].

L'état post-absorptif qui suit l'état postprandial correspond à une période de 6 heures pendant laquelle, chez une personne non diabétique, la glycémie est dans la zone normale. Au cours de cette période, l'utilisation périphérique du glucose est compensée par une production équivalente

de glucose par le foie à partir de l'hydrolyse du glycogène qui a été stocké dans la glande hépatique au cours de la période précédente [ADA, 2001 ; Raghavan et Garber, 2008]. Une fois le glucose est assimilé les concentrations reviennent à la norme (l'état du jeûne) [Giugliano, 2008].

L'état de jeûne réel débute seulement à la fin de l'état post-absorptif c'est à dire approximativement 10 à 12 heures après le début du dernier repas. Pendant les états de jeûne et post-absorptifs, les glycémies restent stables et normales chez les personnes qui ne sont pas diabétiques cela indique que le taux de glucose produit et utilisé sont égaux [ADA, 2001 ; Giugliano, 2008]. Cette stabilisation est due au fait que la production hépatique de glucose passe progressivement de la glycogénolyse à la néoglucogenèse c'est à dire à la production de glucose à partir du lactate, d'alanine ou de glycérol.

Dans la mesure où nous passons la moitié de notre vie en période postprandiale, il semble important de s'intéresser aux variations glycémiques au cours de cette période. L'amplitude et la durée du pic de la glycémie plasmatique dépend de divers facteurs qui incluent le temps, la quantité et la composition du repas [ADA, 2001 ; Raghavan et Garber, 2008].

## 6.2 La physiopathologie du pré-diabète

Le passage de l'état normal au diabète et la perte graduelle de l'homéostasie glucidique se font par étapes successives :

La première qui va de l'état normal à l'intolérance au glucose est caractérisée par une dégradation du contrôle glycémique limitée à la phase postprandiale. L'intolérance au glucose est un état caractérisé par le maintien d'une glycémie à jeun inférieure à 1,26mg/dL (7 mmole/L) mais par une montée anormale de la glycémie en période postprandiale.

La deuxième qui va de l'intolérance au glucose au diabète (caractérisé par une augmentation permanente de la glycémie à jeun qui devient 1,26mg/dL et les excursions glycémiques postprandiales sont plus longues et plus intenses que chez le sujet sain) se traduit par l'apparition de désordres glycémiques en fin de nuit (phénomène de l'aube), par une dégradation progressive de la glycémie à jeun, et par une aggravation progressive et supplémentaire des désordres glycémiques dans les périodes qui suivent les repas. Cette évolution est expliquée par 3 anomalies désignées sous le terme de *triumvirat* biologique : un déficit progressif de l'insulinosécrétion endogène, un état d'insulinorésistance qui évolue au cours du temps et une exagération de la production hépatique du glucose qui est à son maximum en fin de nuit et dans la matinée [Monnier et al., 2007 ; Monnier et Colette, 2008].

### 6.3 L'hyperglycémie chez les diabétiques

Puisque les individus atteints du diabète type 1 sont privée d'une production endogène de l'insuline, l'amplitude et la durée des pics de la concentration d'insuline ainsi que le taux de glucose dépendent de la quantité, le temps, le type et le mode de l'administration de l'insuline [ADA, 2001 ; Rebolledo et Dato, 2005 ; Raghavan et Garber, 2008]. Pour les individus atteints du diabète type 2, le déclin progressif de l'action de l'insuline ainsi que son taux insuffisant ne permettent pas le contrôle adéquat de l'HGPP. Il semble que pour ces diabétiques (type 1 et 2) l'HGPP est supérieur, ainsi plus prolongée, comparée à celle d'un individu non diabétique puisque elle est apparentée à différents processus tel que la sécrétion de l'insuline et de glucagon, la captation de glucose par les cellule hépatiques, suppression de la production hépatique du glucose, et la captation de glucose par les tissus périphériques [ADA, 2001 ; Gagliardino, 2005]

L'hyperglycémie postprandiale est l'une des anomalies métaboliques précoces du déséquilibre de l'homéostasie du glucose associé au diabète type 2 qui précède son diagnostic. Elle persiste même à l'état de jeûne [ADA, 2001 ; Santilli et al., 2010]. C'est une phase qui se caractérise par une forte, rapide et permanente augmentation du taux de glucose dans le sang [Ceriello, 2005].

Compte tenu de son rôle délétère potentiel, l'hyperglycémie postprandiale (HGPP) constitue un facteur de risque absolu générant des effets néfastes. Elle joue un rôle important dans le développement du diabète type 2 et ses complications micro- et macrovasculaires [IDF, 2007 ; Giugliano, 2008 ; Zheng et al., 2010]. Elle est associée à un risque accru de rétinopathie et cancer. Elle provoque un stress oxydatif, l'inflammation et un dysfonctionnement endothélial [IDF, 2007 ; Giugliano, 2008 ; Node et Inoue, 2009]. L'hyperglycémie postprandiale est associée à une diminution du volume et du flux sanguin myocardique ainsi qu'à une altération de la fonction cognitive chez les sujets âgés atteints de diabète de type 2 [Rebolledo et Dato, 2005 ; IDF, 2007 ; Giugliano, 2008].

De ce fait le contrôle de l'HGPP est aussi important que le contrôle de la glycémie à jeun chez les diabétiques [Giugliano, 2008]. Outre les mesures diététiques, trois grandes approches pharmacologiques peuvent être envisagées pour mieux contrôler l'hyperglycémie post-prandiale : ralentir, voire inhiber, la résorption digestive des glucides alimentaires; assurer une meilleure imprégnation insulinique immédiatement après le repas; et diminuer la sécrétion et/ou l'action de glucagon [Scheen et al., 2002]

## 7. Diabète sucré et stress oxydant

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces réactives oxygénées (ERO) [**Gardès-Albert et al., 2003**]. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante (36 molécules d'ATP sont générées lors de la réduction de l'oxygène/molécule de glucose). D'autre part, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des ERO [**Haleng et al., 2007**]. Pour se protéger de leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un système de défense, mais lorsqu'il est dépassé par une quantité importante des ERO le stress oxydant s'installe [**Sies, 1991 ; Defraigne et Pincemail, 2008 ; Araki et Nishikawa 2010**]. Les ERO produites en permanence dans l'organisme ont aussi un rôle physiologique important, ils sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire, métabolisme, état redox pour l'expression de gènes). Dans cette perspective, les antioxydants sont alors des régulateurs de la production des ERO, dont ils préviennent les effets délétères potentiels [**Magder, 2006**].

Les espèces réactives de l'oxygène sont soit des radicaux libres, entités chimiques très instables et réactionnelles suite à la présence d'un électron libre dans leur structure (l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  et le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ ), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$  est un état métastable-cas excité- de la molécule de l'oxygène  $O_2$ ), Elles sont produites d'une manière accrue lors du stress oxydant et sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides membranaires...) pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires [**Araki et Nishikawa, 2010**]. Les radicaux hydroxyles sont les espèces les plus agressives et donc les plus dommageables du stress oxydant, tandis que les radicaux superoxydes semblent peu réactifs. Toutefois, ces derniers demeurent des espèces potentiellement toxiques via leurs réactions avec le peroxyde d'hydrogène ou le monoxyde d'azote, générant respectivement des radicaux hydroxyles et des anions peroxynitrites, tous deux très délétères vis-à-vis des matériaux biologiques [**Haleng et al., 2007**].

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose de deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoiqque; l'autre est

endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes [Haleng et al., 2007].

Le stress oxydant constitue un terrain favorable au développement de pathologies divers (diabète, athérosclérose, maladies neurodégénératives...) ou dans le développement de complications associées à celles-ci, ainsi que dans les processus de vieillissement [Defraigne et Pincemail, 2008]. De même, dans le diabète sucré, le stress oxydant provoqué par les concentrations anormalement élevées de glucose dans l'organisme joue un rôle très important, en particulier dans la survenue des complications diabétiques, qu'elles soient macro- ou microvasculaires [Bonnefont-Rousselot, 2002 ; Gardès-Albert et al., 2003].

### **Stress oxydant et complications du diabète**

Plusieurs mécanismes pathogéniques conduisent à une augmentation du stress oxydant et semblent être impliqués dans l'apparition des complications du diabète :

La voie des polyols : en situation d'hyperglycémie, l'hexokinase qui permet la phosphorylation du glucose et son utilisation dans les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates est saturée. En conséquence, le glucose est transformé en sorbitol puis en fructose, respectivement sous l'action de l'aldose réductase et de la sorbitol déshydrogénase. Suite à ces réactions, le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> s'élève, entraînant une inhibition de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et une accentuation de la formation des produits terminaux de glycation (*Advanced Glycated Ends* ou AGE). En outre, les taux cellulaires de NADPH, coenzyme nécessaire à l'activité de la glutathion réductase, diminuent avec pour conséquence une diminution des capacités antioxydantes [Rebolledo et Dato, 2005 ; Haleng et al., 2007 ; Araki et Nishikawa 2010].

La production de produits terminaux de glycation : la glycation est caractérisées par la fixation non enzymatique initiale de métabolites simples aux protéines (oses surtout le glucose, dérivés de l'urée, aldéhydes, lipides). Ces modifications conduisent, par des remaniements moléculaires ultérieurs, à des altérations structurales et fonctionnelles des protéines, expliquant leur participation à de nombreux dysfonctionnements cellulaires [Rebolledo et Dato, 2005 ; Gillery, 2006]. Ces produits, retrouvés en concentrations élevées dans la rétine et les glomérules

rénaux, jouent un rôle important dans le développement des complications du diabète [Selvaraj et al., 2006].

L'auto-oxydation du glucose : en présence de fer le glucose s'oxyde entraînant la génération d'ERO, mais aussi la production de la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine captant facilement le cuivre, ce qui provoque le déclenchement de réactions de type Fenton avec production de radicaux libres : il s'ensuit une augmentation de la peroxydation lipidique. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi le diabète est souvent associé à des complications cardio-vasculaires [Araki et Nishikawa, 2010].

L'activation de la protéine kinase C (PKC) : l'hyperglycémie intracellulaire entraîne l'activation de la PKC, contribuant ainsi aux anomalies des flux sanguins locaux [Haleng et al., 2007 ; Araki et Nishikawa, 2010].

## II. La digestion et l'absorption

La digestion et l'absorption des nutriments s'effectuent dans le tube digestif. L'intestin grêle est le siège principal de ces deux étapes. Sa longueur de 4 à 6 mètres et sa surface d'absorption, amplifiée par les villosités et les microvillosités formant des replis à la surface des entérocytes, permettent un contact prolongé avec les nutriments et les sécrétions gastriques, biliaires, intestinales et surtout pancréatiques, qui vont toutes contribuer à la digestion des nutriments. La digestion et l'absorption des glucides diffèrent selon leur nature. Ainsi, ils sont digérés puis absorbés suivant des mécanismes spécifiques nécessitant des enzymes et des systèmes de transport dédiés. L'absorption est principalement le fait du duodénum et jéjunum [Lecleire, 2008].

### 1. Digestion des glucides

La digestion est l'ensemble de processus de simplification moléculaire par lesquels les aliments complexes ingérés sont transformés en nutriments, molécules de petite taille, susceptibles d'être assimilées, ces molécules atteignent le flux sanguin pour qu'elles soient utilisées par les cellules de l'organisme [Goodman, 2010] soit sous forme d'énergie immédiate ou plus souvent après un stockage provisoire [Lecleire, 2008]. Ce processus associe deux types d'actions sur les aliments : des actions mécaniques (de fragmentation, de trituration et de mélange des aliments) et des actions chimiques (de dégradation des molécules contenues dans les aliments sous l'action des enzymes présentes dans les sucs digestifs). Les glucides sont la

source principale d'énergie rapide, à court terme, pour le corps; facile à digérer, à absorber et à transformer en énergie cellulaire. L'amidon (polysaccharide constitué de l'amylose et l'amylopectine) et les disaccharides (saccharose, lactose et maltose) sont les glucides les plus courants dans l'alimentation et constituent la majeure partie des glucides digestibles [Dahlqvist, 1961 ; Schneeman, 2002]. La digestion des glucides est une voie métabolique d'hydrolyse des polysides en oligosides, puis en oses simples, sous l'action des enzymes digestives (**tableau n°2**), initiée par les  $\alpha$ -amylases (les  $\alpha$ -amylases salivaire et pancréatique) est terminée par les  $\alpha$ -glucosidases (isomaltase, maltase, saccharase) [Schneeman, 2002 ; Barrett et al., 2010], enzymes de la bordure en brosse de la membrane luminale des entérocytes de l'intestin grêle [Dahlqvist, 1961].

### La digestion de l'amidon

La digestion pré-intestinale de l'amidon commence dès la mastication sous l'influence de l'  $\alpha$ -amylase salivaire (ptyaline) qui débute son hydrolyse à pH neutre [Fogel et Gray, 1973 ; Sibernagls et Despopoulos, 2001]. L'importance de cette enzyme n'est pas bien connue, car son activité est très vite inhibée par l'acidité du suc gastrique après la déglutition [Ganong, 1986 ; Barrett et al., 2010]. La digestion de l'amidon est donc essentiellement intestinale, effectuée au niveau de l'intestin grêle et passe par deux sites de digestion : digestion extracellulaire dans la lumière du tube digestif (intraluminale) par l'  $\alpha$ -amylase pancréatique, enzyme majeure du suc pancréatique, qui clive l'amidon au niveau des liaisons internes  $\alpha$ -(1,4) glucosidiques [Fogel et Gray, 1973 ; Whitcomb et Lowe, 2007] à l'exception des liaisons  $\alpha$ -(1,4) terminales et les liaisons  $\alpha$ -(1,4) à côté des branchements tout en épargnant les liaisons  $\alpha$ -(1,6). Par conséquent les produits finaux de cette digestion sont des oligosaccharides, des disaccharides (maltose), des trisaccharides (maltotriose) et  $\alpha$ -limite dextrine (quelques polymères de branchements avec une moyenne de 8 molécules de glucose liées par des liaisons  $\alpha$ -(1,6)) [Ganong, 1986 ; Barrett et al., 2010. Goodman, 2010]. L'activité de cette enzyme dans la lumière duodénale est si importante que l'amidon est majoritairement transformé dès les premières anses jéjunales, permettant à la digestion membranaire de poursuivre très tôt l'étape finale de la digestion complète de l'amidon grâce aux  $\alpha$ -glucosidases (disaccharidases) enzymes de la bordure en brosse de l'intestin [Barrett et al., 2010 ; Goodman, 2010]. Ces enzymes sont : la maltase, isomaltase , saccharase et lactase, principalement qui hydrolysent les produits de la digestion extracellulaire en monosaccharides : glucose, galactose et fructose [Fogel et Gray, 1973 ; Goodman, 2010].

Tableau n° 2 : Caractéristiques des enzymes majeurs de la digestion de glucides [Champ, 1985 ; Ganong, 1986 ; Barrett et al., 2010].

	Numéro d'identification	Enzymes	Sites de l'action	Sources	Types de liaisons glycosidique hydrolysée	Substrats	pH optimal	Produits
<b>-amylases</b>	<b>(EC 3.2.1.1)</b>	<b>salivaire</b>	La bouche	Glande salivaire	-(1,4) et non pas les liaisons -(1,6)	amidon	6,7	Maltose, maltotriose et
		<b>pancréatique</b>	L'intestin grêle	Sécrétion pancréatique	et les liaisons terminales -(1,4)	amidon	6,7 - 7,0	limites - dextrines
<b>-glucosidases</b>	<b>(EC 3.2.1.x)</b>	<b>Maltase (EC 3.2.1.20)</b>	L'intestin grêle	Cellules épithéliales de la bordure en brosse	-(1,4)	maltose, maltotriose	5,0 - 7,0	Glucose
		<b>Saccharase (EC 3.2.1.26)</b>			-(1,2)	saccharose	5,0 - 7,0	Glucose et fructose
		<b>Lactase (EC 3.2.1.23)</b>			-(1,4)	lactose	5,8 - 6,2	Glucose et galactose
		<b>dextrinase (isomaltase) (EC 3.2.1.11)</b>			-(1,6) et -(1,4)	- dextrine limites		Glucose

-amylase : 1,4- D-glucan-glucohydrolase; Lactase: -galactosidase; -D-galactoside galactohydrolase ; Maltase : -glucosidase : -D-glucoside glucohydrolase ; Saccharase ou invertase : -fructofuranosidase ; Dextrinase (isomaltase) : 1,6- D-glucan 6-glucohydrolase.

La maltase hydrolyse seulement la liaison  $\alpha$ -(1,4) glucosidiques celle qui se trouve entre deux molécules de glucose dans le maltose, et celle de l'extrémité non réductrice d'un polysaccharide [Goodman, 2010], l'isomaltase (enzyme débranchante ou limite dextrinase) hydrolyse la liaison  $\alpha$ -(1,6) glucosidiques au niveau des points de branchements dans les limites dextrine et la liaison  $\alpha$ -(1,4) glucosidiques au niveau du maltose et maltotriose. La saccharase hydrolyse la liaison  $\beta$ -(1,2) glucosidiques entre le glucose et le fructose dans le saccharose. La lactase hydrolyse la liaison  $\beta$ -(1,4) glucosidiques entre le glucose et le galactose dans le lactose [Lieberman et Marks, 2009 ; Goodman, 2010]. Une fois la digestion membranaire est terminée les monosaccharides peuvent être absorbés par les membranes d'entérocytes de la bordure en brosse pour se retrouver dans le flux sanguin [Shirazi-Beechey, 1990].

## 2. Absorption des glucides

L'absorption est un phénomène assez complexe du passage des nutriments dans le sang à travers la paroi du tube digestif. Ce phénomène, comme la digestion, s'effectue principalement dans l'intestin grêle [Marshall et Bangert, 2005 ; Lecleire, 2008 ; Lieberman et Marks, 2009]. Les glucides réduits en monosaccharides par la digestion (glucose, galactose et fructose), vont être immédiatement absorbés au niveau des entérocytes selon des mécanismes différents et spécifiques, pour atteindre la circulation sanguine et tous les tissus [Lecleire, 2008 ; Lieberman et Marks, 2009]. Étant des molécules très hydrophiles, les monosaccharides ne peuvent pas traverser librement les phases lipidiques des membranes cellulaires. Ils ont besoin de ce fait de transporteurs spécifiques présents dans la membrane cellulaire de la bordure en brosse, ces transporteurs sont soit des transporteurs SGLT : "sodium-glucose linked transporter" ou cotransporteur sodium-glucose qui assure un transport actif (secondaire) soit des GLUT : "glucose transporter" ou transporteur de glucose qui assure une diffusion facilitée (ne nécessite pas d'ATP) [Lieberman et Marks, 2009].

Le glucose (et le galactose) doit traverser une cellule de la couche cellulaire de surface de l'intestin avant de parvenir au sang. Il doit donc traverser une première fois la membrane de cette cellule pour y pénétrer, puis la traverser de l'autre côté pour en sortir. Puisque le glucose (et le galactose) peut être absorbé même lorsque sa concentration est très faible dans l'intestin, il doit donc y avoir un mécanisme de transport actif qui lui permet de passer à travers la membrane contre son gradient de concentration. Le glucose (et le galactose) franchit la membrane de l'entérocyte par l'intermédiaire d'une protéine spécifique : un co-transporteur  $\text{Na}^+$ -glucose

(galactose), appelé SGLT1 qui se trouve au niveau de la membrane apicale (côté luminal) **[Wright et al., 2003 ; Lieberman et Marks, 2009]**.

Le système de transport impliqué dans l'absorption du glucose (galactose), situé du côté luminal des cellules muqueuses de l'intestin est un co-transporteur actif secondaire couplé au sodium (SGLT1). C'est un système symport : déplacement dans le même sens du glucose (galactose) et  $\text{Na}^+$ , dans un rapport glucose (galactose)/ $\text{Na}^+$  = 1/1. L'énergie à cette entrée active secondaire du glucose provient du gradient électrochimique du  $\text{Na}^+$  (pour lequel la pompe  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$ -ATPase intervient à différents endroits de la cellule) **[Sibernagls et Despopoulos, 2001 ; Lieberman et Marks, 2009 ; Goodman, 2010]**. Ainsi le glucose (galactose) accumulé dans la cellule quitte, celle-ci, passivement, du côté sanguin, par diffusion facilitée assurée, par uniport, par un transporteur de glucose de type 2 (GLUT2), alors que le fructose, entre tout à fait passivement dans la cellule, est transféré par le GLUT5 **[Sibernagls et Despopoulos, 2001 ; Lieberman et Marks, 2009]**.

### **III. Plantes médicinales antidiabétiques**

Depuis des temps immémoriaux, les plantes ont servis comme source précieuse de médicaments pour l'homme. D'après l'OMS, 65% de la population mondiale utilise encore les plantes médicinales pour leur soin primaire ou incorporées dans leur système de santé **[Fabricant et Farnsworth, 2001 ; Prabhakar et Doble, 2011]**. Cette proportion est encore plus importante dans les pays en voie de développement, surpeuplés et pauvres **[Wadkar et al., 2008]**. L'utilisation des plantes médicinales à travers le monde est liée à leur efficacité, disponibilité, faible coût et moins d'effets secondaires **[Prabhakar et Doble, 2011 ; Prabhakar et al., 2014]**. Les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement de plusieurs maladies en Algérie, cette dernière caractérisée par un climat diversifié et une position géographique qui favorisent une diversité de plantes dans ses différentes régions (côtières, montagneuses et sahariennes). Ces plantes constituent des remèdes naturels potentiels qui peuvent être utilisés en traitement curatif et préventif **[Mahmoudi, 1989 ; Belouad, 1998]**.

#### **1. Phytothérapie et diabète sucré**

La phytothérapie, telle que définie par l'OMS, fait partie de la médecine traditionnelle regroupant une somme de connaissances, compétences et pratiques qui reposent sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres

humains en santé. Dans certains pays, les appellations médecine parallèle, alternative et douce sont synonymes de la médecine traditionnelle [OMS, 2000].

La phytothérapie, basée sur l'utilisation de plantes médicinales, continue à occuper une place de choix malgré le développement des médicaments de synthèse et le progrès de la pharmacologie [Fabricant et Farnsworth, 2001].

Malgré l'intérêt particulier porté sur l'étude des plantes médicinales par la recherche, le potentiel des plantes médicinales pour la découverte de nouveaux médicaments, reste largement inexploité en égard au nombre d'espèces de plantes supérieures (angiospermes et gymnospermes) sur la planète qui est estimé à 250 000. En effet, sur ce nombre, seulement 15 % ont été évaluées sur le plan phytochimique et 6% ont été testées pour leur activité biologique y compris l'activité antidiabétique [Fabricant et Farnsworth, 2001].

Selon la bibliographie, différentes enquêtes ethnobotaniques réalisées à travers le monde ont permis le recensement de plus de 800 plantes utilisées traditionnellement pour le contrôle du diabète sucré, dont 450 espèces ont prouvé leur effet antidiabétique suite à l'expérimentation scientifique, tandis que le mécanisme d'action a été élucidé seulement pour 109 plantes [Prabhakar et Doble, 2011].

Les études expérimentales et recherches menées sur les plantes médicinales empreintant l'approche ethnopharmacologique confirment de plus en plus leurs propriétés antidiabétiques [Grover et al., 2002]. Le contrôle du diabète sans effets secondaires reste un défi, c'est pourquoi l'investigation et la recherche de nouveau agent thérapeutique à partir de plantes médicinales est devenu très important (un moyen efficace et sans effets secondaires) pour cette maladie [Prabhakar et Doble, 2011]. Malgré les progrès en chimie organique de synthèse du vingtième siècle, plus de 25 % des médicaments tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes [Newman et al., 2000]. Des recherches scientifiques récentes montrent que différentes substances isolées à partir de plantes ont montré un effet hypoglycémiant important [Benalla et al., 2010].

Les plantes médicinales constituent une source de composés naturels qui présentent une grande diversité structurale et peuvent ainsi constituer un réservoir de molécules douées de vertus thérapeutiques [Oubre et al., 1997]. La première plante médicinale dont l'effet antidiabétique, clairement décrit était *Galega officinalis* L. (Fabaceae) prescrite en médecine traditionnelle européenne depuis le moyen âge pour traiter le diabète sucré. Son principe actif, la

galégine, a servi de modèle de synthèse de la metformine et d'autres médicaments antidiabétiques appartenant à la classe des biguanides [Oubre et al., 1997 ; Rios et al., 2015].

D'autres plantes intensivement étudiées pour mettre en valeur leur effet antidiabétique ont été rapportées dans de nombreuses études, parmi lesquelles : *Allium sativum* (Liliacées), *Azadirachta indica* (Meliacées), *Coccinia indica* (Cucurbitacées), *Gymnema sylvestre* (Asclépiadacées), *Mamordica charantia* (Cucurbitacées), *Olea europaea* (Oleacées), *Punica granatum* (Lythracées), *Citrullus colocynthis* (Cucurbitacées), *Trigonella foenum graecum* (Léguminosées) et *Vaccinium arctostaphylos* (Ericacées) [Arulselvan et al., 2014 ; Rios et al., 2015].

## 2. Les principes actifs des plantes antidiabétiques et leurs modes d'actions

Les plantes médicinales antidiabétiques peuvent agir par différents mécanismes d'action, elles peuvent exercer un effet direct sur le pancréas en stimulant la sécrétion voire l'inhibition du processus de dégradation de l'insuline, la régénération ainsi que la cytoprotection des cellules pancréatiques par la prévention du stress oxydant (piégeage de radicaux libres) qui peut être à l'origine de leur dysfonctionnement. L'effet antidiabétique peut être extra-pancréatique en contrôlant le métabolisme glucidique, tout en stimulant la captation du glucose et son métabolisme dans les cellules cibles à l'insuline, en inhibant la glycogénolyse hépatique et les enzymes intestinaux l' -amylase et les -glucosidases, en inhibant l'absorption intestinale du glucose ou le transport de glucose [Prabhakar et Doble, 2011; Prabhakar et al., 2014 ; Rios et al., 2015]. Les **tableaux 3** et **4** regroupent les effets antihyperglycémiques de quelques plantes médicinales.

Les principaux phytoconstituants actifs isolés de plantes médicinales antidiabétiques sont généralement des métabolites secondaires, substances chimiques de structures très diversifiées. Elles sont produites par les plantes pour se défendre contre les pathogènes microbiens et attirer les organismes utiles (pollinisateurs...), comme les polyphénols, alcaloïdes, flavonoïdes, saponines... [Prabhakar et Doble, 2011].

Certains polyphénols contrôlent le métabolisme glucidique et lipidique, atténuent l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline, améliorent le métabolisme du tissu adipeux, apaisent le stress oxydatif et les processus d'inflammation. Les polyphénols préviennent le développement de complications du diabète à long terme (maladies cardiovasculaires, neuropathie, rétinopathie et néphropathie) [Bahadoran et al., 2013].

Les flavonoïdes, se différencient en six sous classes : flavonols, flavones, flavanones, flavanols, anthocyanines et isoflavones, ils sont doués de propriétés hypoglycémiantes et antioxydantes. Ils contrôlent le métabolisme glucidique et oxydatif touché au cours du diabète sucré [Pandey et Rizvi, 2009 ; Prabhakar et Doble, 2011 ; Hussain et al., 2013]. Ils inhibent l'absorption de glucose, les enzymes digestives (  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase) et les transporteurs de glucose au niveau de l'intestin grêle [Wenzel, 2013]. Les flavonoïdes agissent comme agents antidiabétiques en diminuant le taux du glucose et aussi en réduisant significativement le taux du cholestérol, des triglycérides plasmatiques, en améliorant l'activité de la glucokinase hépatique, en stimulant la sécrétion d'insuline et la captation de glucose par les cellules cibles à travers la signalisation cellulaire [Hussain et al., 2013].

A leur tours, les saponines (steroides alkaloides ou triterpenoides) exercent leur effet hypoglycémiant par le bais de la restauration de la réponse d'insuline, l'amélioration de la signalisation d'insuline, l'augmentation du taux d'insuline plasmatique, l'induction de la libération d'insuline du pancréas [Prabhakar et Doble, 2011].

De même les alcaloïdes peuvent inhiber l'  $\alpha$ -glucosidase et diminuer le transport du glucose à travers l'épithélium intestinal [Bhushan et al., 2010].

**Tableau n° 3 : Effets antihyperglycémiant de quelques plantes médicinales.**

Plantes et composés actifs	Dose	Modèle d'essai	Résultats majeurs	Références
<i>Trigonella foenumgraecum</i> L.	Extrait éthanolique des graines (200-400 mg/kg p.c)	Rats normaux et d'autres rendues diabétiques par l'alloxane	- Réduit significativement le taux de glucose sanguin (dose dépendant). - Effet hypoglycémiant chez les rats diabétiques (dose dépendant)	[Ajbnoor et Tilimsany, 1988]
	Graines en poudre 25g /jour pendant 24 semaines	60 patients diabétiques (type 2)	- Réduction du taux de glucose sanguine basale et après test de tolérance orale au glucose. - Réduction de la glycosurie et de l'hémoglobine glyquée à 13% et 12,2%, respectivement chez 40 patients après 8 semaines de consommation de la poudre des grains de cette plante	[Sharma et al., 1996]
	Extrait aqueux 40mg/kg p.c	Sujets normaux (20 à 30 ans)	- Diminution significative de la glycémie 13,4 % 4h après l'ingestion	[Abdel-Barry et al., 2000]
	Extraits bruts	Rats rendues diabétiques par l'alloxane	- Diminution de la glycémie postprandiale.	[Marles et Farnsworth, 1994 ; Dey et al., 2002]
	100 g de graines en poudre dégraissées par jour pendant 10 jours	Patients diabétiques (type 1)	- Améliore la tolérance au glucose et démunie le taux de glucose sanguin basal avec une réduction concomitante de 50% de glucose urinaire excrété	[Srinivasan, 2006]
	Extrait éthanolique des graines (2g/kg, 1g/kg, 0.5g/kg et 0.1g/kg)	Rats rendues diabétique par l'alloxane	- La dose de 1g/kg p.c : la plus efficace extrait riche en : alcaloïdes, stéroïdes et sucres.	[Mowla et al., 2009]
	5,5 g	Personnes obèses	- Diminution de l'incrémental de la surface sous la courbe de la glycémie (AUC) par rapport au témoin et diminution de l'HGPP	[Robert et al., 2014]
	50 g de graines en poudre par semaine pendant 2 semaines	Rats rendues diabétiques par Nitrate	- Effets antidiabétiques réduction significative du taux de glucose et HbA1c.	[El-Wakf et al., 2015]
<i>Securigera securidacea</i> L cardenolide, (-)-14-methoxyhyrcanoside et cinq nouveau dérivées dihydrobenzofurane (securigran I à V)	Extrait aqueux de graines	Rats diabétiques	- Effet hypoglycémiant	[Ali et al., 1998]
<i>Otholobium pubescens</i> (Poir.) J.W. Grimes	bakuchiol, meroterpene	- Rats diabétiques	- Réduisent la glycémie de manière dose dépendant	[Krenisky et al., 1999]
<i>Retama raetam</i>	Extrait aqueux de la plante entière	Rats Wistar rendu diabétiques par streptozotocine	- Réduit significativement le taux de glucose sanguin	[Maghrani et al. 2005]
<i>Genista teneva</i> apegénine chrysoeriol, gensteine7-O-glucoside et rutine	4 mg/kg p.c /jour	Rats Wistar rendu diabétiques par streptozotocine	- Réduit significativement le taux de glucose sanguin. - Améliore la tolérance orale au glucose	[Rauter et al., 2010]

<p><i>Pterocarpus marsupium</i> Roxb (-)-Epi catéchine Marsupsin et pterostilbene</p>	<p>- Extrait aqueux à 250 mg/kg p.c</p> <p>- Extrait éthanolique à 0,25 g/kg p.c.</p> <p>- Extrait méthanolique de l'écorce 300 mg/kg.</p>	<p>- Rats rendues diabétiques par l'alloxane</p> <p>- Rats Wistar rendu diabétiques par streptozotocine.</p> <p>- Rats Wistar rendu diabétiques par streptozotocine.</p>	<p>- activité hypoglycémiques</p> <p>- induit la sécrétion d'insuline et la conversion de proinsuline en insuline <i>in vitro</i>.</p> <p>- restaure et protège les cellules chez des patients diabétiques</p> <p>- exerce un effet Anti-hyperglycémie.</p> <p>- effet Antidiabétique similaires à celui de metformine</p>	<p><b>[Manickam et al., 1997]</b></p> <p><b>[Patel et al., 2012]</b></p> <p><b>[Noor et al., 2013]</b></p>
<p><i>Lupinus termis</i> Forssk</p>	<p>Graines de lupin fraction enrichi en quinolizidine alcaloïdes</p>	<p>- Rats rendues diabétiques par l'alloxane</p>	<p>- Réduit significativement le taux de glucose sanguin</p>	<p><b>[Gaikwad et al., 2014]</b></p>
<p><i>Lycine max</i> (L.) Merr</p>	<p>Fraction enrichi en kaempferol glycoside et kaempferol des feuilles</p>	<p>- Rats diabétiques</p>	<p>- Réduction de l'AUC du test de tolérance orale au glucose (TTOG)</p>	<p><b>[Gaikwad et al., 2014]</b></p>

**Tableau n° 4 : Effets antihyperglycemiants de quelques plantes médicinales agissant au niveau intestinal : inhibition de la digestion enzymatique de glucide et absorption de glucose.**

Parties utilisées de la plante	Extraits	Effets biologiques	Références
Les graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> (fenugreek)	Extrait méthanolique (0,5 g/kg p.c)	- L'administration Orale de cet extrait aux rats normaux inhibe significativement ( $P<0,01$ ) l'activité de la sucrase. - Inhibition significative ( $P<0,05$ ) de la digestion et l'absorption des glucides durant la perfusion du glucose <i>in situ</i> .	[Hannan et al., 2007a]
l'écorce de <i>Plantago ovata</i>	Extrait aqueux (0,5 g/kg p.c)	- Réduction importante et significative ( $P<0,01$ ) de l'hyperglycémie par l'inhibition de l'absorption intestinale de glucose (2,5 g/10 ml/ kg p.c), utilisant la technique de perfusion dans l'intestin grêle ( <i>in situ</i> ). -L'administration orale de cet extrait améliore significativement ( $P<0,01$ ) la tolérance orale au glucose chez les rats normaux et diabétiques (type 1 et type 2). - Quand cet extrait est administré oralement avec le sucrose (2,5 g/kg p.c), il supprime l'hyperglycémie postprandiale et retarde l'absorption intestinale ( $P<0,01$ ).	[Hannan et al., 2007b]
Les feuilles, tiges et écorce de <i>Mangifera indica</i> Linn	Extrait éthanolique et aqueux (1.25 g/10 mL/kg p.c)	- Les résultats montrent que tous les extraits administrés par voie orale simultanément avec le glucose exercent un effet antihyperglycemiant significatif ( $p<0,05-0,01$ ; $p<0,005-0,001$ ) chez les rats diabétiques. - L'extrait éthanolique de tiges et écorce exercent un effet antihyperglycemic significatif ( $p<0,01$ ) lors qu'il est administré 30 min avant le glucose. - Cet extrait reduit l'absorption de glucose graduellement Durant toute la période de perfusion intestinale chez les rats diabétiques.	[Bhowmik et al., 2009]
La plante entière de <i>Spirulina platensis</i>	Extrait éthanolique (250 et 500 mg/kg p.c)	- L'extrait à 250mg/kg montre que l'absorption de glucose (2,5 g/kg) est inhibée significativement ( $p<0,05$ ) tout au long de l'intestin pendant 15 minutes de perfusion intestinale. - L'extrait à 500mg/kg inhibe significativement ( $p<0,05$ ) l'absorption du glucose au cours de 10 à 15 min de perfusion intestinale.	[Fayzunnessa et al., 2011]
Les racines de <i>Asparagus racemosus</i>	Extrait éthanolique (25 mg/ml), équivalent de 1,25 g/kg	- L'administration orale de cet extrait améliore la tolérance orale au glucose. Le pic de la glycémie est supprimé à 30 min ( $P<0,05$ ) et à 60 min ( $P<0,05$ ) chez les rats normaux et diabétiques. - Diminution significative ( $P<0,05$ à $P<0,01$ ) de la digestion et l'absorption intestinale de glucose (54 g/l) durant la période de perfusion.	[Hannan et al., 2012.]

Les racines de <i>Hemidesmus indicus</i>	Extrait éthanolique (250 mg/kg p.c)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cet extrait exerce un effet antidiabétique par inhibition significative (<math>p &lt; 0,05</math>) de la digestion et l'absorption de glucose.</li> <li>- Les résultats obtenus des deux techniques : perfusion intestinale <i>in situ</i> et sac intestins <i>in vitro</i> montrent que cet extrait est efficace pour le traitement du diabète.</li> </ul>	[Siraj et al., 2013]
La plante entière de <i>Centella asiatica</i>	Extrait éthanolique (1000 mg/kg.p.c)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une combinaison de tests <i>in-vitro</i>, <i>in-vivo</i> et <i>in-situ</i> confirme l'activité anti-hyperglycémiant de cet extrait.</li> <li>- l'administration orale de cet extrait améliore significativement (<math>P &lt; 0,05</math>) la tolérance orale au glucose (2,5 g/10 ml/kg p.c) à court et à long terme.</li> <li>- L'extrait à 1g/kg réduit significativement (<math>p &lt; 0,05</math>) l'absorption de glucose (54 g/l) <i>in-situ</i> durant toute la période de perfusion intestinale.</li> <li>- Il inhibe l'action des enzymes intestinales disaccharidase et -amylase ce qui est confirmé via la technique de six segments intestinaux, où la digestion de sucrose (2,5 g/kg) et l'absorption de glucose sont complètement inhibées tout au long de l'intestin grêle.</li> </ul>	[Kabir et al., 2014 (b)]
Les feuilles de <i>Alpinia nigra</i>	Extrait éthanolique (500 mg/kg et 800 mg/kg p.c)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'administration orale de cet extrait (800 mg/kg p.c) améliore significativement (<math>P &lt; 0,05</math>) la tolérance orale au glucose (2,5 g/10 ml/kg p.c) à court terme chez les rats normaux avec un pourcentage de réduction de 20,82% après 2h de l'administration de glucose.</li> <li>- L'extrait (500 mg/kg p.c) réduit significativement (<math>p &lt; 0,05</math>) l'absorption de glucose (54 g/l) <i>in-situ</i> durant toute la période de perfusion intestinal.</li> <li>- Cet extrait inhibe significativement l'activité de la disaccharidase intestinale ce qui est confirmé via la technique de six segments intestinaux, où la digestion de sucrose (2,5 g/kg) et l'absorption de glucose sont complètement inhibées tout au long de l'intestin grêle.</li> </ul>	[Kabir et al., 2016]

### 3. La plante étudiée *Ononis angustissima*

La plante qui a fait l'objet de cette étude est *Ononis angustissima* Lam. subsp. *polyclada* Murb [Dobignard, 2013 ; Benabderahmane et al., 2014], appelée la bugrane

#### 3.1 Taxonomie et description botanique

Selon Dobignard, 2013 la classification botanique de *Ononis angustissima* est la suivante :

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Rasales (Fabales)
Famille	Fabaceae
Sous Famille	Papilionacées
Tribus	Trifoleae
Genre	<i>Ononis</i>
Espèce	<i>angustissima</i>



**Figure 1** : Différentes parties de *O. angustissima*

A : la plante entière ; B : tiges et feuilles

C : fleur ; D : fleurs.

Le genre *Ononis* comprend 75 espèces très répandues à travers l'Europe, l'Asie, le Nord-Est de l'Afrique et le Nord de l'Amérique, largement distribué principalement dans les régions semi-arides et arides [Mezrag et al., 2013]. *O. angustissima* est de type biologique Chaméphyte [Bouheroum et al., 2009 ; AJAA, 2012], est connue sous le nom vernaculaire « Hennete el-bel et Tfiza » en Algérie [Chahma et Djebbar, 2008]. La variété *O. angustissima* Lam. subsp. *polyclada* Murb est spontanées et endémique du Sahara septentrional [Bouheroum et al., 2009 ; Mezrag et al., 2013]. Elle est inventoriée et se répartie suivant les différents types de parcours, dans les lits des oueds, dépressions, sols sableux et les hammadas (Ouargla, Guardaia, Ain Safra, Bechar, Biskra, Boussaâda, jusqu'à Beni Abbas) [Bouheroum et al., 2009 ; Cheriti et al., 2011 ; Benabderahmane et al., 2014].

C'est une plante herbacée pouvant se développer en petits buissons à tiges très ramifiées à la base [Chebli et al., 2001 ; Vanden Berghen, 2015]. Elle est caractérisée par des fleurs jaunes, sur des pédoncules allongés (qui se prolonge au-delà de l'insertion de la fleur) et réunis en grappes lâches; folioles étroites presque linéaires peu ou pas dentées. Elle est de taille : 30 cm à 1m, pourvue d'une longue racine pivotante ; de leur base ligneuse et tortueuse, partent des

rameaux, dressés et agglomérés pour former un dôme haut (**figure1**) [**Bouheroum, 2007 ; Vanden Berghen, 2015**], rameuse à nombreuses tiges dressées bien verte. La touffe est robuste, les rameaux sont persistants après la floraison et devenant un peu épineux. Les feuilles à trois folioles étroites quatre à cinq fois plus longues que larges, plus ou moins dentées. Elles sont munies de deux stipules engainantes à leur base, le pétiole des feuilles est court. Le fruit est une gousse cylindrique [**Ozenda, 1991 ; Bouheroum, 2007**]. Les gousses pendantes, linéaires, brièvement stipulées, mesurent moins de 3 cm de long et contiennent plusieurs graines d'environ 1,5 mm de diamètre courbées, brunes, tuberculisées. La floraison a lieu au mois de Mars ou elle est échelonnée durant cette période [**Chebli et al., 2001**], cette plante peut ainsi varier, dans le détail, d'une année à l'autre. *O. angustissima*, est considérée comme une espèce appartenant à un groupe écologique indicateur de la présence d'eau douce dans le sol, à une profondeur relativement faible (2 à 5 m) [**Vanden Berghen, 2015**].

### 3.2 Phytochimie

La famille des légumineuses extrêmement riche en flavonoïdes, et caractérisée par la présence d'isoflavones, de rotenoïdes, d'anthocyanines et de flavonols glycosylés [**John Ingham, 1982**]. Plusieurs espèces de *Ononis* produisent une substance cireuse dans ses racines nommée Onocerin, utilisée comme critère de classification taxonomique [**Kloda et al., 2008**].

Ce n'est que récemment que cette plante a été l'objet d'étude de sa composition phytochimique et différents flavonoïdes ont été isolés pour la première fois de cette espèce [**Bouheroum et al., 2009 ; Mezrag et al., 2013 ; Benabderahmane et al., 2014**].

L'étude de **Youcef et al., (2014)** effectuée pour la première fois concernant la détermination de la composition chimique des huiles essentielles de *O. angustissima* récolté à Mogheul à 40 km de Bechar au sud-ouest de l'Algérie. Le rendement de la distillation est de 0,73% (p/p) en relation avec le poids sec de la plante. Un total 24 constituants a été déterminé ce qui est l'équivalent d'environ 78,8% des huiles essentielles. Les composés majeurs sont : phytol (17,4%), valencene (5%), -cadinene (5,0%), -eudesmol (7,5%) et Z,Z-farnesol (8,8%).

Les travaux réalisés par **Djeridane et al., (2010)** montrent que la teneur d'*ononis angustissima* en composés phénoliques totaux est de 12,03 mg/g de matière sèche et les flavonoïdes (02,35 mg Rutine/g matière sèche). Ces derniers étaient dominants (4,24% équivalent de catéchine (p/p)) suivis par les dérivés hydroxybenzoïque (1,37% équivalent d'acide gallique (p/p)) et les dérivés hydroxycinnamiques (0,09% équivalent d'acide caféique (p/p)). Le potentiel antioxydant de l'extrait acétate d'éthyle de *O. angustissima* utilisant la

méthode de DPPH a donné une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $20,83 \pm 0,08$  mg/L. Ainsi sa partie aérienne est considérée comme une bonne source d'antioxydants dont les polyphénols et flavonoïdes [Djeridane et al., 2010 ; Ghribi et al., 2015].

L'investigation phytochimique approfondie des extraits et fractions méthanoliques, chloroformique et d'acétate d'éthyle des racines de *O. angustissima* L, a permis l'isolation de nouveaux isoflavones : 5-hydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (Alnetin) ; 5-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone (6,7-diméthoxybaicalein) ; 5,6-dihydroxy-7-méthoxyflavone (7-méthoxybaicalein) ; 5,7-dihydroxyflavone(chresin) [Bouheroum et al., 2009]. 2,4 -dihydroxychalcone ; 2 -hydroxychalcone ; 6-hydroxy-4 -méthoxyaurone [Mezrag et al., 2013]. 2, 3, 4-Trihydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one ou 2',3',4'-Trihydroxychalcone ; 6-Hydroxyaurone ; 2',4'-Dihydroxychalcone ; 5-Hydroxy,7-Méthoxyflavone (tectochrysin) [Benabderahmane et al., 2014]. ononin ; formononetin ; 3-(4-(glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-méthoxyphenyl)-7-hydroxy-4H-chromen-4-one ; (+)-puerol A-2'-O- -D-glucose ; (-)-puerol B-2'-O- -D-glucopyranose ((-)-sophoraside A) ; (+)-puerol A ; (-)-trifolirhizin ; (-)-trifolirhizin-6'-O-malonate ; (-)-maackiain et (-)-medicarpin [Ghribi et al., 2015]. (3S)-7-hydroxy-4'-méthoxy-isoflavone 3'- -D-glucopyranoside (1) ; kaempferol 3-O- -D-glucopyranoside-7-O-(2'''-acetyl)- -D-galactopyranoside (4) [Mezrag et al., 2016].

### 3.3 Données ethnopharmacologiques

Selon la bibliographie et les données ethnopharmacologiques plusieurs espèces du genre *Ononis* sont utilisées dans le traitement de la jaunisse, l'inflammations urinaire, les calculs du rein, diarrhée et rhumatisme [Abdel-Kader., 1997 ; Benabderahmane et al., 2014 ; Youcef et al., 2014 ; Ghribi et al., 2015]. *Ononis sessilifolia* Bornm, *Ononis basiadnata* Hub.–Mor et *Ononis macrosperma* Hub.–Mor) sont utilisées pour traiter et désinfecter les blessures. Le décocté de *Ononis* est utilisé comme remède pour plusieurs maladies : maladies de peau (eczéma et cancer de peau), affections rhumatismales et la goutte [Süntar et al., 2011 ; Tumova et al., 2011 ; Benabderahmane et al., 2014; Youcef et al., 2014 ; Ghribi et al., 2015] ; En outre des travaux scientifiques sur les membres de ce genre ont montré qu'ils possèdent de nombreuses activités pharmacologiques : antidiabétiques, antibiotiques (*Ononis viscosa* contre les bactéries à Gram positive) antifongique, antipyrétique, anti-inflammatoire, antiviral, cytotoxique, analgésique, diurétique (les racines de *Ononis spinosa* et *Ononis arvensis*), laxatif et antiseptique [Süntar et al., 2011 ; Tumova et al., 2011 ; Santoro et al., 2013; Youcef et al., 2014 ; Ghribi et al., 2015].

*O. angustissima* est fréquemment utilisée en Algérie dans la pharmacopée traditionnelle en décoction de sa partie aérienne. Cette plante présente un effet thérapeutique et propriétés hémostatiques dues aux métabolites secondaires spécifiques avec des caractéristiques chimiques et biologiques originales [Chahma et Djebbar, 2008 ; Chahma and Youcef, 2009]. Cette plante est utilisée aussi en Algérie dans la médecine traditionnelle pour le traitement du diabète [Khacheba et al., 2014].

# **Chapitre I : Etude phytochimique de**

*Ononis angustissima*

**Matériel et Méthodes**

## Matériel et Méthodes

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est la partie aérienne de *Ononis angustissima* Lam subsp. *polyclada* Murb (Fabaceae) récoltée à maturité durant la période de floraison au mois d'Avril 2012 et 2013 dans la région d'Ain Safra wilaya de Naâma (Algérie). Au sein du laboratoire, les différents organes de la plante feuilles et tiges sont récupérées ensemble, les fleurs sont récupérées séparément, l'ensemble est mis à sécher à température ambiante pendant quelques jours. Ils sont ensuite conservés à l'abri de l'humidité et la lumière jusqu'à leur utilisation.

### 2. Extractions

A partir des fleurs on a préparé l'extrait aqueux de fleurs. A partir des feuilles et tiges on a préparé l'extrait aqueux et l'extrait eau méthanol (**figure 2**). Tous les extraits une fois récupérés sont conservés hermétiquement jusqu'à leur utilisation ultérieure.

#### 2.1 Préparation de l'extrait aqueux de fleur (AqFl)

La préparation de cet extrait est réalisée comme suit :  
Extraction sous reflux à 50°C pendant 30 minutes de 50 g de fleurs séchées dans 750 ml d'eau distillée. Après refroidissement, la solution est ainsi séparée du marc, filtrée puis évaporée à sec à l'issue duquel l'extrait sec de fleurs AqFl est obtenu.

#### 2.2 Préparation de l'extrait aqueux de feuille et tiges (AqFT)

30 g de la partie aérienne séchée d'*Ononis angustissima* (feuilles et tiges) sont soumis à une extraction sous reflux dans 450 ml d'eau distillée pendant 30 minutes à 50 °C. La solution récupérée est filtrée, le filtrat récupéré est évaporé à sec. Le produit obtenu est AqFT

#### 2.3 Préparation de l'extrait hydro-méthanolique (EMFT)

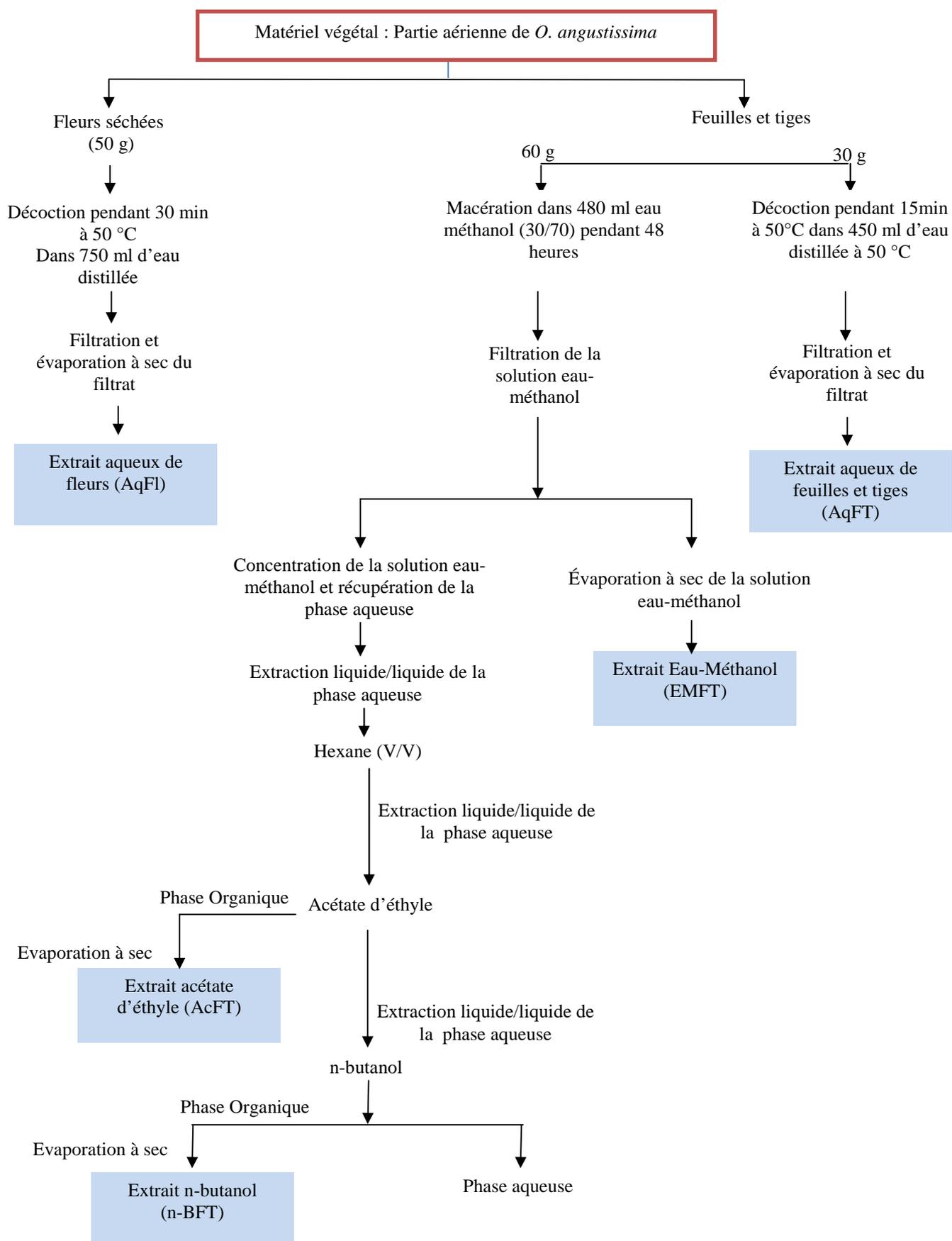
60 g du matériel végétal (feuilles et tiges) dans 480 ml du mélange eau/méthanol (30/70) sont mis à macérer pendant 48 heures à température ambiante, la solution est ainsi séparée du marc puis filtrée, le filtrat récupéré est ensuite évaporé à sec et le produit obtenu représente l'extrait EMFT.

## **2.4 Préparation de l'extrait acétate d'éthyle (AcFT)**

Cet extrait est préparé à partir de l'extrait EMFT, après élimination du méthanol dans le rotavapeur la phase aqueuse restante fait l'objet d'une extraction liquide-liquide par l'hexane (V/V) puis deux fois par l'acétate d'éthyle (V/V), la phase organique récupérée est évaporée à sec et le produit récupéré représente l'extrait AcFT.

## **2.5 Préparation de l'extrait n butanol (n-BFT)**

La phase aqueuse récupérée au cours de la préparation de l'extrait acétate d'éthyle (AcFT) est soumise à une extraction liquide-liquide en utilisant le n-butanol. Après évaporation à sec le produit récupéré est l'extrait n butanol (n-BFT).



**Figure 2** : Schéma explicatif de la préparation des extraits aqueux et organiques de la partie aérienne de *O. angustissima* (fleurs, feuilles et tiges)

### 3. Criblage phytochimique

Tous les extraits préparés (10 mg/ml) ont fait l'objet d'un criblage phytochimique par des tests qualitatifs basés sur des réactions spécifiques (coloration, précipitation) qui permettent de mettre en évidence certaines familles chimiques de métabolites secondaires, principalement : les tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, quinones libres, anthraquinones, coumarines, saponosides, terpénoïdes, composés réducteurs et amines dans un extrait végétal.

Nous nous sommes basés sur les méthodes classiques décrites précédemment par **Harborne, (1998), Trease et Evans, (1989)** et par **De et al., 2010**. Les extraits secs sont dissous au préalable dans l'eau distillée, le mélange eau méthanol ou bien utilisés à l'état sec.

#### - Flavonoïdes

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

10 gouttes de l'acide chlorhydrique HCl concentré et quelques copeaux de tournures de magnésium sont ajoutés à 1 ml de chaque extrait. La coloration rose ou rouge, après 3 min d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes.

#### - Tanins

Dans un tube à essai contenant 1 ml de chaque extrait ajouter 0,4 ml de la solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1%. Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, l'apparition de la couleur verte indique la présence de tanins catéchiques tandis que la couleur bleue-noirâtre révèle la présence de tanins galliques.

#### - Alcaloïdes

Deux réactifs sont utilisés, le réactif de Mayer et le réactif de Wagner. Un volume de 2 ml d'HCl 1% est ajouté à 1ml d'extrait, l'ensemble est incubé dans un bain marie pendant 10 min, puis on divise le mélange en deux fractions à volume égal, la première fraction est traitée par le réactif de Mayer, tandis que la seconde est traitée par le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc, brun ou orangé révèle la présence des alcaloïdes.

#### - Quinones libres

Les quinones libres sont détectées par l'addition de quelques gouttes de NaOH à 1% à 1 ml de chaque extrait, l'apparition d'une couleur rouge, jaune ou violette indique la présence des quinones libres.

**- Anthraquinones**

À 1 ml de chaque extrait on ajoute 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10% avec agitation. L'apparition de couleur violette indique un test positif.

**- Coumarines**

Une quantité de quelques milligrammes de chaque extrait est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et la deuxième est traitée avec 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10 %. L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette (225 ou 336 nm) et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.

**- Saponosides**

Les saponosides peuvent être caractérisées selon :

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

- Le test de Libermann-Burchard qui consiste à ajouter 1 ml d'anhydride acétique à 0,5 g d'extrait et 20 gouttes d'acide sulfurique concentré ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). L'ensemble est agité puis incubé pendant 30 min à température ambiante. L'apparition d'un anneau marron séparant deux phases, la couleur verte de la phase supérieure révèle la présence de saponosides stéroïdiennes et la couleur rouge de la phase inférieure révèle la présence de saponosides triterpéniques.

**- Terpénoïdes**

À 1 ml de chaque extrait, on ajoute 0,5 ml de chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) et 0,7 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré, la présence de terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

**- Composés réducteurs**

Leur détection consiste à traiter 1 ml d'extrait par 0,5 ml de liqueur de Fehling (0,250 ml liqueur de Fehling A et 0,250 ml liqueur de Fehling B), puis incubé l'ensemble 8 min dans bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs (oses, holosides et mucilages).

## - Amines

On applique sur du papier filtre une goutte de chaque extrait. Après séchage à 80 °C à l'étuve, le papier est pulvérisé avec une solution aqueuse de la ninhydrine à la concentration de 7,6 mg/ml. Ensuite le papier est séché une 2<sup>ème</sup> fois à l'étuve à 110 °C pendant 5 min. La présence des amines est révélée sous forme d'une tache jaune pour les amines secondaires ou violette pour les amines primaires.

## 4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

### 4.1 Dosage de polyphénols totaux

#### 4.1.1 Principe

La méthode utilisée pour le dosage de polyphénols dans les différents extraits de *O. angustissima* (feuilles, tiges et fleurs) est celle utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum comprise entre 700 et 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal [Peri et al., 1971 ; Boizot et al, 2006 ; Bonnaille et al., 2012].

#### 4.1.2 Mode opératoire

Le dosage de polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Vermerris et Nicholson, (2006).

0,1 ml de l'extrait étudié est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2 % fraîchement préparée, Après 5 min d'incubation, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (0,2 N) est ajouté au mélange, après que l'ensemble est incubé pendant 30 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 700 nm contre le blanc (tableau n° 5).

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique (Sigma, Aldrich) comme contrôle positif à différentes concentrations allant de 50 à 700 µg/ml.

Les résultats sont exprimés en µg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (µg GAE/mg).

**Tableau n° 5** : Mode opératoire du dosage de polyphénols totaux dans les extraits de *Ononis angustissima*

Volumes (ml)	Concentration de l'acide gallique (µg/ml)								Extraits (mg/ml)				
	50	100	200	300	400	500	600	700	AqFT	AqFl	EMFT	AcFT	n-BFT
<b>l'acide gallique</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-
<b>Extrait</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>NaCO<sub>3</sub></b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Incubation pendant 5 min à température ambiante													
<b>Folin Ciocalteu</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité													
Lecture au spectrophotomètre à 700 nm													

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

$$[\text{Polyphénols}] = a.f / c_i$$

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

**f** : Facteur de dilution (× 22) ;

**C<sub>i</sub>** : Concentration initiale de chaque extrait (10 mg/ml).

## 4.2 Dosage de flavonoïdes totaux

### 4.2.1 Principe

Le dosage de flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm [Zhishen et al., 1999 ; Ardestani et Yazdanparast, 2007].

### 4.2.2 Mode opératoire

Le dosage de flavonoïdes des différents extraits est réalisé comme suit :

- 500 µL de chaque extrait ou de catéchine est mélangé avec 2 ml d'eau distillée ;
- Addition de 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 15 % ;
- Incubation à température ambiante pendant 6 min ;
- Addition de 150 µl de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O) à 10 % ;
- Deuxième incubation à température ambiante pendant 6 min ;

- Addition de 2 ml d'hydroxyde de sodium à 4 % ;
- Le volume final de chaque tube est complété à 5 ml ;
- Agitation et incubation à température ambiante, pendant 15 min ;
- mesure de l'absorbance à 510 nm contre le tube blanc (**tableau 6**) ;

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine (Sigma, Aldrich) comme contrôle positif à différentes concentrations allant de 50 à 700 µg/ml. Les résultats sont exprimés en µg équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg CEq/mg).

**Tableau n° 6** : Mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits de *Ononis angustissima*

Volumes (ml)	Concentration de la catéchine (µg/ml)								Extraits (mg/ml)				
	50	100	200	300	400	500	600	700	AqFT	AqFl	EMFT	AcFT	n-BFT
<b>Catéchine</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-
<b>Extrait</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Eau Distillée</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1 <sup>ère</sup> Incubation (6 min) à température ambiante													
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
2 <sup>ème</sup> Incubation (6 min) à température ambiante													
<b>NaOH</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ajuster le volume final à 5 ml et incuber pendant 15 min à température ambiante													
Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 510 nm													

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

$$[\text{Flavonoïdes}] = \mathbf{a.f} / \mathbf{c_i}$$

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

**f** : Facteur de dilution (× 10) ;

**C<sub>i</sub>** : Concentration initiale de chaque extrait (10 mg/ml).

## 5.1 Evaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *O. angustissima* par la méthode de DPPH

### 5.1.1 Principe

Le DPPH (2,2 DiPhényle-1-picryl-hydrazyle) est un radical libre stable de couleur bleu-violacée dans le méthanol. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine sa couleur disparaît rapidement entraînant ainsi une décoloration en une couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires, Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

### 5.1.2 Mode opératoire

L'effet des extraits sur le radical DPPH est réalisé selon la méthode de **Popovici et al (2009)** avec quelques modifications.

Dans des tubes on a introduit 25 µl de chaque extrait à différentes concentrations 3 à 20 mg/ml (pour chaque concentration un tube blanc est préparé) et 975 µl de la solution méthanolique du DPPH (0,025 mg/ml) fraîchement préparée, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. La mesure de l'absorbance s'effectue à 517 nm contre le blanc de chaque concentration contenant 25 µl de l'extrait et 975 µl du méthanol. En ce qui concerne le témoin négatif (contenant uniquement le DPPH) ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 975 µl de la solution méthanolique du DPPH avec 25 µl méthanol, le blanc de ce tube est la solution du méthanol. Le control positif est l'acide ascorbique utilisé à différentes concentrations (0,005 à 0,1 mg/ml) dans les mêmes conditions expérimentales.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante [**Meddour et al., 2013 ; Ladoh et al.,2014**]

$$\% \text{ DPPH} = [(A_C - A_T) / A_C] * 100$$

**% DPPH** : pourcentage de réduction du radical DPPH.

**A<sub>C</sub>** : absorbance du contrôle.

**A<sub>T</sub>** : absorbance du test effectué.

Les valeurs  $IC_{50}$  (concentration inhibitrice nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH) sont déterminées graphiquement sur les graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés ( $I = f(C)$ ) en utilisant le logiciel de traitement des données Microcal Origin 5.0 (Microcal software, Inc. 1.0.0.1) [Shariffar et al., 2012 ; Ladoh et al., 2014].

## 5.2 Evaluation du pouvoir réducteur du fer des extraits de *O. angustissima* par la méthode de FRAP

### 5.2.1 Principe

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité du transfert des électrons qui peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

La méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) est basée sur la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) présent dans le complexe ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) dans un milieu acide où la couleur jaune de la solution change au vert bleu selon le pouvoir réducteur. L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [Badarinath et al., 2010]. L'acide ascorbique et le butylated hydroxyl toluene ou butylhydroxytoluène (BHT) sont utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions opératoires.

### 5.2.2 Mode opératoire

Le pouvoir réducteur du fer est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu 1986, Benzie et Strain 1996 et Pulido et al., 2000 avec de légères modifications.

Les solutions d'extraits et de BHT sont préparées aux concentrations suivantes : 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,45 ; 0,5 ; 1 mg/ml. La solution d'acide ascorbique est préparée aux concentrations : 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 ; 0,07 ; 0,08 ; 0,1 mg/ml.

100  $\mu$ l de chaque concentration de l'échantillon à tester : extrait ou standards (BHT ou acide ascorbique) sont mélangés avec 250  $\mu$ l de la solution tampon phosphate (0,2 M à pH 6,6) et 250  $\mu$ l de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%. Les tubes sont incubés à 50°C pendant 20 minutes puis refroidis à température ambiante. Ensuite, 250  $\mu$ l de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% est ajouté. Puis 500  $\mu$ l de ce mélange sont prélevés et ajoutés

à 500 µl d'eau distillée et 100 µl chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) à 0,1%. La mesure de l'absorbance s'effectue à 700 nm au spectrophotomètre contre le tube blanc où l'échantillon est remplacé par 100 µl de solution tampon. L'acide ascorbique et le BHT sont utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés en pourcentage de pouvoir réducteur de fer selon **Ghaisas et al., 2008** et **Medjoujda et Benlifa., 2014**, ou en IC<sub>50</sub> selon **Benhammou et al., 2009** ; **Ghribi et al., 2015**.

Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par la formule suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = \left[ \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100$$

**A<sub>0</sub>** : est l'absorbance de FeCl<sub>3</sub>.

**A<sub>1</sub>** : est l'absorbance de FeCl<sub>3</sub> solution en présence de l'extrait.

L'IC<sub>50</sub> est la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du ferricyanure de potassium. Elle est déterminée graphiquement en utilisant le logiciel de traitement des données Microcal Origin 5.0 (Microcal software, Inc. 1.0.0.1).

### Corrélation

La corrélation se définit comme étant la relation linéaire entre deux variables quantitatives, elle est calculée par la formule suivante :

$$r = \frac{\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2} \times \sqrt{\sum(Y - \bar{Y})^2}}$$

Par convention, on dira que la relation entre x et y est :

- nul si r = 0
- faible si r se situe entre 0 et 0,2.
- d'intensité moyenne si r se situe entre 0,2 et 0,5
- forte si r se situe entre 0,5 et 0,8
- très forte si r se situe entre 0,8 et 0,99
- parfaite si r = 1

**Chapitre I : Etude phytochimique de**  
*Ononis angustissima*  
**Résultats et interprétation**

## Résultats et interprétation

### 1. Caractéristiques des extraits de la partie aérienne de *Ononis angustissima*

Chaque extrait a été caractérisé par son aspect, sa couleur et le rendement de son extraction par rapport à la matière sèche. Ces éléments sont résumés dans le **tableau n°7**.

**Tableau n°7** : Caractéristiques des extraits préparés de la partie aérienne de *O. angustissima*.

Caractéristiques	masse (g)	aspect physique	couleur	solubilité	rendement d'extraction (%)
<b>AqFT</b>	1,89	poudre	marron	eau distillée	9,5
<b>AqFl</b>	1,06	poudre	marron doré	eau distillée	16,1
<b>EMFT</b>	0,73	poudre	marron foncé	eau-méthanol (30/70)	5
<b>AcFT</b>	1,02	pâteux	marron	méthanol	6,8
<b>n-BFT</b>	0,61	poudre	marron	eau distillée	4,1

**AqFT** : Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl** : Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT** : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT** : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles.

Selon les résultats consignés dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que la plupart des extraits sont récupérés sous forme de poudre à l'exception de l'extrait acétate d'éthyle (AcFT) qui présente un aspect pâteux et hygroscopique. L'extrait aqueux de fleurs (AqFL) présente un rendement d'extraction le plus élevé (16,1%), par rapport aux autres extraits suivi par l'extrait aqueux de tiges et feuilles (AqFT) (9,5%), l'extrait acétate d'éthyle (AcFT) (6,8%) et l'extrait eau-méthanol (EMFT) (5%). Par contre l'extrait n-butanol (n-BFT) présente le rendement d'extraction le plus faible 4 %. Le mode d'extraction, le solvant utilisé et la composition de la matière végétale font que les rendements obtenus soient variables. Tous les extraits se caractérisent par une solubilité totale soit dans l'eau distillée comme c'est le cas pour les extraits AqFT, AqFL et n-BFT, soit dans le méthanol pour les extraits EMFT et AcFT.

### 2. Criblage phytochimique

L'apparition d'une coloration, floculation voire précipitation plus ou moins intenses suite à l'addition de certains réactifs spécifiques révèle la présence de certaines familles de composés chimiques majeurs dans les extraits de *O. angustissima*. Les résultats de leur analyse phytochimique sont reportés dans le **tableau n°8**

**Tableau n°8** : Criblage phytochimique des extraits de la partie aérienne de *O. angustissima*.

Composés chimiques		AqFT	AqFl	EMFT	n-BFT	AcFT	
Flavonoïdes		+	+	+++	+++	+++	
Alcaloïdes	Réactif Mayer	-	-	+++	+	+++	
	Réactif Wagner	+	+	++	+++	+	
Tanins	Cathéchiqes	+	++	-	+++	-	
	Galliques	-	-	+++	-	+++	
Saponosides	Test de Libermann-Burchard	S. Stéroïdiens	++	++	-	++	-
		S. triterpéniques	-	-	+++	-	+++
	Test de mousse	Saponosides	++	+++	-	-	-
Terpénoïdes		+++	+++	+++	+++	+++	
Quinones libres		++	+	+++	++	+++	
Coumarines		++	++	+	+	-	
Anthraquinones		-	-	-	-	-	
Composés réducteurs		++	++	++	+	+	
Amines		+	+++	++	+++	+	

**AqFT** : Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl** : Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT** : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT** : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles ; +++ : fortement présent ; ++ : moyennement présent ; + : faiblement présent ; - : absence

Les résultats du criblage phytochimique sont préliminaires et qualitatifs et nous renseignent sur les phytoconstituants majoritaires des extraits de la partie aérienne de *O. angustissima*. Ces résultats indiquent la présence des principales familles de métabolites secondaires, à savoir : les flavonoïdes, tanins (catéchiqes et galliques), alcaloïdes, saponosides (Stéroïdiques et triterpéniques), coumarines, terpénoïdes, quinones libres, amines et l'absence des

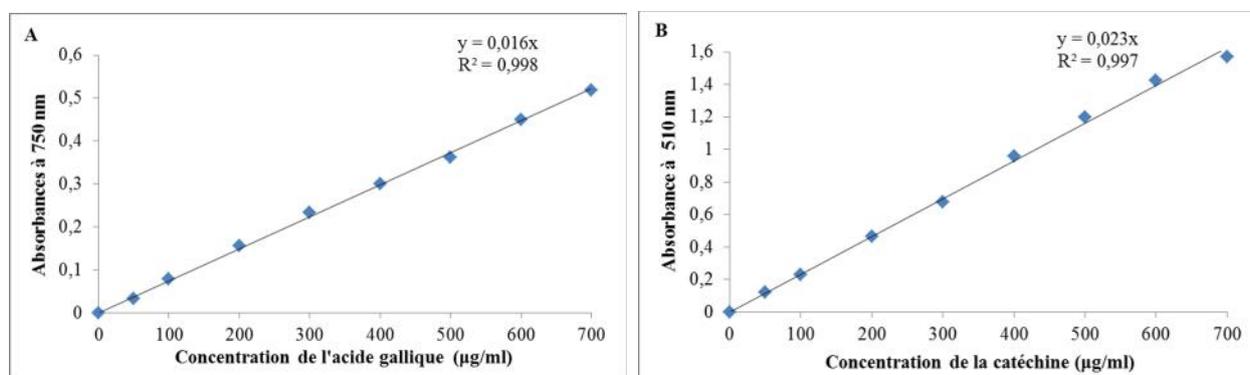
anthraquinones, répartis inégalement selon les extraits, la nature du solvant, le mode d'extraction et l'organe de la plante utilisé.

Les résultats consignés dans le tableau ci-dessus, ont permis de déceler une forte présence de terpénoïdes dans tous les extraits. Nous remarquons aussi que les flavonoïdes, les alcaloïdes ainsi que les tanins sont fortement présents dans les extraits EMFT, n-BFT et AcFT. Ces composés sont faiblement présents dans les extraits AqFT et AqFl. Les tannins catéchiques sont détectés seulement dans les extraits AqFT, AqFl et n-BFT tandis que les tannins galliques sont détectés uniquement et fortement dans les extraits EMFT et AcFT. Les saponosides stéroïdiens sont surtout présents dans les extraits AqFT, AqFl et n-BFT alors que les saponosides triterpéniques sont présents dans les extraits EMFT et AcFT. Les quinones libres sont détectées dans tous les extraits et fortement présents dans les extraits EMFT et AcFT. Les coumarines sont détectées dans tous les extraits à l'exception de l'extrait AcFT. Les composés réducteurs sont présents dans tous les extraits notamment AqFT, AqFl et EMFT. Les amines sont surtout présentes dans les extraits AqFl, n-BFT et à un degré moindre dans le reste des extraits.

### 3. Dosage de composés polyphénoliques

Le taux de polyphénols totaux dans les extraits de *O. angustissima*, exprimé en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg Eq AG/g), et représenté dans le **tableau n°9** à partir d'une équation linéaire du type  $y = 0,016x$ , de l'acide gallique comme étalon.

Le taux de flavonoïdes totaux dans chaque extrait est exprimé en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg Eq Cat /g) et représenté dans le **tableau n°9** à partir d'une équation linéaire du type  $y = 0,023x$ , de la catéchine comme étalon. La **figure 3** représente les courbes étalons de l'acide gallique et la catéchine respectivement.



**Figure 3 :** Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage colorimétrique de polyphénols totaux (A), de catéchine pour le dosage de flavonoïdes totaux (B).

**Tableau n°9** : Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de la partie aérienne de *Ononis angustissima*

Extraits	Polyphénols (mg Eq AG/g d'extrait)	Flavonoïdes (mg Eq Cat/g d'extrait)
<b>AqFT</b>	65,29±0,03	12,60±0,01
<b>AqFl</b>	59,43±0,00	11,18±0,00
<b>EMFT</b>	78,11±0,01	34,14±0,03
<b>n-BFT</b>	74,55±0,01	16,66±0,00
<b>AcFT</b>	72,21±0,04	32,01±0,01

**AqFT** : Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl** : Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT** : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT** : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles. Valeur moyenne de 6 essais ± erreur standard (ES).

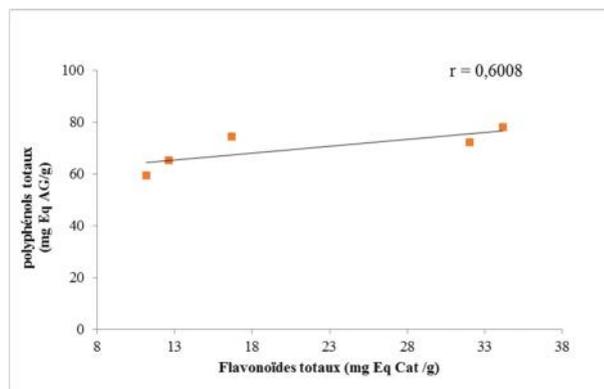
Nous remarquons que l'ensemble des extraits contiennent des proportions relativement importantes de composés phénoliques (**tableau n°9**), notamment les extraits hydrométhanoliques de feuilles et tiges et leurs fractions butanolique et d'acétate d'éthyle.

La teneur la plus élevée en polyphénols et flavonoïdes est notée dans l'extrait EMFT (78,11 mg Eq AG/g et 34,14 mg Eq Cat/g respectivement) suivie par les extraits n-BFT et AcFT qui renferment des teneurs comparables en polyphénols (74,55 et 72,21 mg Eq AG/g) mais des teneurs variables en flavonoïdes (16,66 et 32,01 mg Eq Cat/g), respectivement. Par ailleurs les extraits aqueux AqFT et AqFl, présentent des taux en polyphénols légèrement plus bas (65,29 et 59,43 mg Eq AG/g) et en flavonoïdes (12,6 et 11,18 Eq Cat/g) respectivement.

En effet, il paraît clairement que le mélange eau-méthanol (30/70) permet d'extraire le plus de composés phénoliques à partir de la matière végétale par rapport à l'eau distillée. L'extraction des phytoconstituants dépend de plusieurs facteurs : la polarité du solvant utilisé, leur degré de solubilité et leur interaction avec d'autres constituants. Par ailleurs le réactif de Folin-Ciocalteu utilisé pour le dosage des composés phénoliques ne leur est pas exclusivement spécifique mais interagit aussi avec les groupements hydroxyles d'autres composés tels que les protéines, sucres encore présents dans l'extrait. Ce qui entraîne en conséquence, une surestimation de leur taux.

### 3.1 Corrélation entre teneur en polyphénols et en flavonoïdes

Selon la **figure 4** nous notons une forte corrélation entre la teneur en polyphénols et flavonoïdes  $r = 0,6008$ . Ce coefficient de corrélation nous permet de constater que les composants dans la classe des polyphénols isolés de *Ononis angustissima* sont principalement les flavonoïdes.



**Figure 4 :** Corrélation entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de *Ononis angustissima*

### 4. L'activité antiradicalaire des extraits de *Ononis angustissima*

**Tableau n°10 :** Pourcentage de réduction du DPPH et  $IC_{50}$  des différents extraits de *Ononis angustissima*.

	Concentration de A.asb mg/ml									$IC_{50}$ (mg/ml)
	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,07	0,08	0,1	
	9,1±0,00	26,5±0,01	52,7±0,01	64,1±0,01	87,4±0,00	89,8±0,00	90,6±0,00	93,7±0,01	95,4±0,00	0,019±0,000
	Concentration des extraits mg/ml									$IC_{50}$ (mg/ml)
	3	6	6	10	12	14	16	18	20	
<b>AqFT</b>	19,3±0,00	35,3±0,00	49,0±0,01	51,5±0,01	68,6±0,00	74,8±0,01	83,7±0,01	87,0±0,01	91,2±0,00	8,37±0,01
<b>AqFl</b>	16,4±0,01	33,9±0,01	46,6±0,00	58,4±0,01	75,1±0,02	78,9±0,01	89,2±0,01	89,9±0,02	94,5±0,01	8,54±0,01
<b>EMFT</b>	32,6±0,00	57,4±0,00	69,3±0,01	87,9±0,00	91,8±0,00	92,2±0,00	92,5±0,00	92,7±0,00	93,1±0,00	5,12±0,00
<b>n-BFT</b>	36,3±0,02	54,4±0,01	68,9±0,01	79,9±0,03	90,4±0,02	94,4±0,01	95,6±0,01	90,8±0,01	91,7±0,01	4,9±0,01
<b>AcFT</b>	30,7±0,02	57,8±0,01	60,2±0,03	85,3±0,01	87,6±0,01	89,4±0,01	(90,8±0,01	91,6±0,00	96,3±0,00	5,15±0,01

**AqFT :** Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl :** Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT :** Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT :** Extrait n-butanol de tiges et de feuilles. **A.asb :** acide ascorbique. Pourcentage de réduction ± erreur standard.

Les résultats de l'effet des extraits de *Ononis angustissima* AqFT, AqFl, EMFT, n-BFT et AcFT, sur le piégeage du radical libre le DPPH sont représentés dans le **tableau n°10** comparé à l'acide ascorbique utilisé comme témoin positif (molécule de référence).

L'ensemble des extraits provoque la réduction du DPPH et possèdent une activité antiradicalaire variable et relativement faible par rapport à l'acide ascorbique. La concentration de 6 mg/ml des extraits organiques EMFT, n-BFT et AcFT réduit plus de 50 % du DPPH, tandis que les extraits aqueux AqFT et AqFl ne dépassent pas 40 % de réduction du radical. A forte concentration (20 mg/ml), les extraits organiques EMFT, n-BFT et AcFT et les extraits aqueux AqFT et AqFl présentent des pourcentages de réduction comparables environ 90 %.

En terme de valeur d'IC<sub>50</sub> obtenus (valeur inversement proportionnelle à l'activité antioxydante), l'extrait n-BFT présente la plus faible valeur 4,9 mg/ml, suivi par les extraits EMFT et AcFT (5 mg/ml). Tandis que les extraits aqueux AqFT et AqFl présentent des valeurs plus élevées 8 mg/ml par rapport aux extraits organiques. IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique (antioxydant standard) est la plus faible, elle est de l'ordre de 0,02 mg/ml.

## 5. Le pouvoir réducteur du fer FRAP par les extraits de *Ononis angustissima*

**Tableau n°11** : Pourcentage de réduction du fer et IC<sub>50</sub> des extraits de *Ononis angustissima*

	Concentration de A.asb mg/ml									IC <sub>50</sub> (mg/ml)
	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,07	0,08	0,1	
	-	9,0±0,01	67,7±0,01	69,1±0,00	78,8±0,04	82,3±0,04	86,7±0,00	87,9±0,01	90,0±0,01	0,017±0,010
	Concentration des extraits et BHT mg/ml									IC <sub>50</sub> (mg/ml)
	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,45	0,5	1	
<b>AqFT</b>	-	-	-	11,43±0,00	17,37±0,01	34,12±0,01	38,90±0,01	48,73±0,00	69,5±0,00	0,494±0,010
<b>AqFl</b>	-	-	-	26,5±0,01	27,6±0,00	41,9±0,00	48,1±0,01	55,2±0,00	74,68±0,00	0,464±0,000
<b>EMFT</b>	-	-	29,7±0,00	56,6±0,00	59,1±0,00	68,9±0,00	72,9±0,01	75,9±0,00	96,8±0,03	0,262±0,010
<b>n-BFT</b>	-	-	-	19,5±0,00	26,0±0,00	43,1±0,00	52,6±0,00	53,8±0,01	79,1±0,03	0,436±0,010
<b>AcFT</b>	-	48,2±0,01	65,6±0,02	65,7±0,00	77,2±0,00	81,0±0,01	82,7±0,00	83,2±0,00	89,8±0,01	0,109±0,010
<b>BHT</b>	-	34,98±0,00	83,85±0,02	85,13±0,01	85,42±0,00	91,66±0,01	91,46±0,03	92,69±0,04	95,09±0,00	0,131±0,010

**AqFT** : Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl** : Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT** : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT** : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles. **BHT** : Butylated Hydroxyl Toluene ou butylhydroxytoluène **A.asb** : acide ascorbique. Pourcentage de réduction ± erreur standard.

Les résultats sont exprimés en pourcentages de réduction du fer dans le **tableau n°11**. L'ensemble des extraits montrent un pouvoir réducteur du fer dose dépendant. L'extrait AcFT (0,4 mg/ml) présente un effet important jusqu'à 81 % de réduction par rapport aux autres extraits. Tandis que, à forte concentration (1 mg/ml) l'ensemble des extraits ne dépasse pas 80 % à l'exception des extraits AcFT et EMFT qui atteignent 89,8% et 96,8 % de réduction du fer, respectivement. Les contrôles positifs l'acide ascorbique et le BHT entraîne une réduction du fer de 95 % et 90 %, respectivement.

En ce qui concerne les valeurs d'IC<sub>50</sub>, la plus faible valeur est celle de l'acide ascorbique 0,017 mg/ml, alors que l'extrait AcFT présente une valeur de 0,109 mg/ml légèrement inférieure à celle du témoin positif le BHT (0,131 mg/ml), tandis que les autres extraits présentent des valeurs relativement élevées variant de 0,26 à 0,49 mg/ml. La valeur d'IC<sub>50</sub> la plus faible traduit un pouvoir réducteur plus élevé.

### 5.1 Corrélation entre les teneurs en polyphénols, flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante des différents extraits de *Ononis angustissima*

L'étude de l'influence des teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes des différents extraits de *Ononis angustissima* sur l'activité antioxydante évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH et le test de pouvoir réducteur du fer, a été réalisée en impliquant le test de corrélation en utilisant EXCEL. La détermination du coefficient de corrélation (r) permettant d'estimer la relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits de la plante. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau n°12**.

**Tableau n°12 :** Coefficients de corrélation linéaire (r) entre l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits de *O. angustissima*

	<b>Pouvoir du piégeage du radicale libre DPPH</b>	<b>Pouvoir réducteur du fer</b>
Polyphénols totaux	0,858	0,311
Flavonoïdes totaux	0,570	0,829

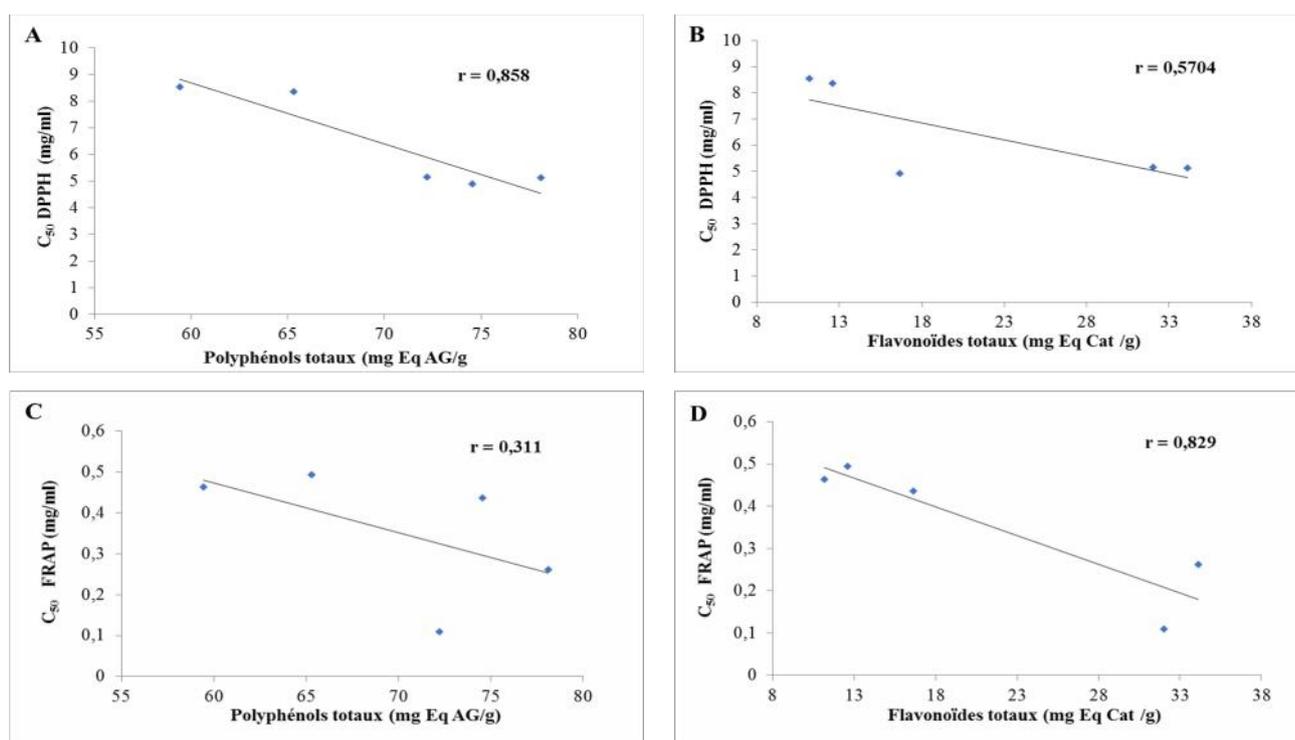
L'activité antioxydante des extraits semble être influencée par la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux.

L'analyse de la relation entre le piégeage du radical libre DPPH et la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux indique qu'il existe une très forte corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire et le taux de polyphénols (r=0,858) tandis que elle est moyenne avec le taux de

flavonoïdes ( $r=0,570$ ). Ces résultats nous indiquent que le pouvoir antioxydant des extraits est lié aux polyphénols principalement les flavonoïdes (**Figure 5**).

La corrélation entre le pouvoir réducteur du fer et la teneur en polyphénols totaux est moyenne ( $r=0,311$ ) par contre, la corrélation est forte entre cette activité et la teneur en flavonoïdes totaux avec un coefficient de corrélation  $r = 0,829$  (**Figure 5**).

La détermination de coefficient de corrélation entre la composition chimique et l'activité antioxydante a bien montré que les composés phénoliques notamment les flavonoïdes sont responsables de l'activité antioxydante, piégeage du DPPH et FRAP, des extraits de *O. angustissima*. La plupart des études précédentes convergent vers et confirment cette hypothèse, elles ont montré que parmi ces phytoconstituants, ce sont les composés phénoliques qui contribuent fortement à une activité antioxydante intéressante [Liu et al. 2009 ; Turumtay et al. 2014].



**Figure 5** : Corrélation entre l'activité antioxydante : DPPH et teneur en polyphénols (A) et en flavonoïdes (B) ; FRAP et teneur en polyphénols (C) et en flavonoïdes (D).

# **Chapitre I : Etude phytochimique de**

*Ononis angustissima*

**Discussion**

## Discussion

L'hyperglycémie postprandiale (HGPP) est reconnue comme facteur de risque important dans le développement du diabète de type 2 et la genèse de ces complications micro-et macrovasculaires [IDF, 2007 ; Giugliano, 2008 ; Zheng et al., 2010]. Elle provoque un stress oxydatif, l'inflammation et un dysfonctionnement endothélial. Ainsi, l'HGPP et le stress oxydatif sont étroitement liés [IDF, 2007 ; Giugliano, 2008 ; Node et Inoue, 2009].

Le stress oxydant induit par l'hyperglycémie génère des radicaux libres contribuant fortement au développement et l'évolution du diabète et ses complications. Il se produit suite à une formation excessive des espèces réactives oxygénés, (ERO) et d'autres nitrogénés (ERN). L'augmentation du stress oxydatif dans le diabète est attribuée à l'augmentation excessive du taux de glucose sanguin, qui après l'auto-oxydation génère des radicaux libres. Des taux anormalement élevés des radicaux libres provoquent des altérations de membrane cellulaire suite à la peroxydation des lipides membranaires et la glycation des protéines. Le déclin des mécanismes de défense antioxydant de l'organisme conduit à l'altération des cellules et des tissus [Sies, 1991; Ceriello, 2003 ; Oyenihini et al., 2014].

Les cellules du pancréas sont particulièrement sensibles aux effets délétères des espèces réactives oxygénées mitochondriales à cause de leur faible aptitude d'expression de gènes codant pour les enzymes antioxydants comparativement à d'autres cellules. En conséquence, une apoptose des cellules est induite suivie par la suppression de la biosynthèse de l'insuline [Ceriello, 2008 ; Oyenihini et al., 2014].

Le corps humain emploie des antioxydants endogènes enzymatiques et non enzymatiques pour lutter contre les attaques des ERO. Mais, une hyperglycémie prolongée et instable perturbe et altère cette défense antioxydante normale endogène durant le diabète [Hokayem et al. 2012 ; Oyenihini et al., 2014]. Améliorer l'index glycémique et/ou empêcher le stress oxydatif est une stratégie bénéfique pour le traitement du diabète sucré et ses complications. Actuellement, certains médicaments utilisés pour le traitement du diabète sont doués d'activité antioxydante en plus de leur activité pharmacologique primaire. A titre d'exemple l'aminoguanidine qui montre des propriétés antioxydantes, inhibe la peroxydation des lipides. La metformine et le pioglitazone réduisent les complications vasculaires grâce à leur capacité d'atténuer la production des ERO mitochondriaux à travers l'activation de la protéine kinase-AMP et par conséquent l'activation de la superoxide dismutase d'une part et d'autre part, ils contribuent à la biogénèse mitochondriale [Araki et Nishikawa, 2010].

Nombreux travaux expérimentaux et études cliniques ont montré que des composés naturels comme l'  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), coenzymes Q (CoQ) et l'acide lipo que possédant des effets bénéfiques contre les complications du diabète. D'ailleurs, l'acide lipo que est approuvé comme agent de traitement de la neuropathie diabétique en Allemagne [Nishikawa et Araki, 2013].

Parmi ces composés naturels possédant des propriétés antioxydantes, il y a Les composés phénoliques dont les acides phénoliques, flavonoïdes et procyanidines. Ce sont des composés ubiquitaires dans le règne végétal. Ils sont produits par les plantes pour leur survie en réponse aux stress biotique et abiotique, agression de l'environnement : lutter contre les UV solaire, le stress oxydatif engendré par la photosynthèse, les parasites, les herbivores et aussi attirer les insectes pollinisateurs pour assurer leur reproduction et leur pérennité. De ce fait ils sont caractérisés par leurs diversités structurales chimiques, très variés par leur couleur, odeur, goût (amers, astringents)... [Negrão et Faria, 2009].

Ces dernières années, un grand intérêt scientifique est accordé à ces composés possédant un large spectre d'activités biologiques : antimicrobienne, anti tumorale, antidiabétique, anti inflammatoire... [Negrão et Faria, 2009 ; Pandey et Rizvi, 2009]. Ils sont reconnus pour leurs propriétés protectrices contre les risques de nombreuses maladies chroniques, inflammatoires et dégénératives dont le stress oxydatif est le processus physiopathologique commun [Pandey et Rizvi, 2009 ; Jo et al., 2010 ; Adefegha et Oboh., 2012 ; Oyenih et al., 2014].

Les plantes médicinales peuvent exercer leur activités antidiabétiques par différents mécanismes et à différent niveau. Cette propriété est attribué à leur composition variée et diversifié en composés bioactifs, capable d'agir respectivement à différents voies métaboliques : transcription des gènes, effecteurs d'enzymes, d'hormone et processus biologiques multiples, contribuant en définitif à rétablir l'homéostasie glucidique perturbée par l'état diabétique [Oyenih et al., 2014]. En effet, selon Tabataei-Malazy et al., (2013) certaines plantes antidiabétiques agissent sur le fonctionnement des cellules du pancréas et sur la sécrétion de l'insuline via la suppression du stress oxydatif consécutif au diabète. Ce serait l'un des mécanismes d'action potentiel de plantes médicinales antidiabétiques.

La plupart des études précédentes confirment l'hypothèse que l'activité antioxydante des extraits de plantes est étroitement liée à leurs teneurs en phytoconstituants, dont les composés phénoliques, qui jouent un rôle prépondérant [Liu et al. 2009 ; Turumtay et al. 2014].

Les produits naturels issus de plantes médicinales possédant notamment cette propriété ont été démontrés jouant un rôle bénéfique protecteur contre le stress oxydatif. A titre d'exemple *Prosopis glandulosa* (Fabaceae) sélectionnée comme plantes médicinales antidiabétique, est douée de propriétés antioxydantes grâce à sa richesse en alcaloïdes, glycosides, flavonoïdes, composés phénoliques, stéroïdes et terpenoïdes [Oyenihi et al., 2014].

La fraction des flavonoïdes représentée majoritairement par l'épicatéchine isolée des écorces de *Pterocarpus marsupium* (Fabaceae), présente un effet insulino-trope (insulino-sécrétagogue) *in vitro* en stimulant la conversion de la proinsuline en insuline. Elle s'est avérée aussi bénéfique dans la protection des cellules pancréatiques contre le stress oxydant chez les sujets diabétiques [Saxena et Vikram. 2004 ; Modak et al. 2007].

En plus, nombreuses études ont démontré l'effet protecteur des flavonoïdes (extraits bruts ou molécules purifiées) vis-à-vis des effets délétères du diabète expérimental. Elles ont pu mettre en évidence l'effet antiradicalaire des flavonoïdes contre la peroxydation lipidique et la formation donc des radicaux libres chez le rat rendu diabétique [Coskun et al. 2005 ; Kebièche et al. 2011].

La quercétine est un flavonol doué d'une forte activité antioxydante démontrée par des études *in vitro* et *in vivo*. Elle améliore les dommages causés au niveau du tissu pancréatique du rat par le stress oxydatif directement par répression de la peroxydation des lipides et indirectement par l'amélioration de la production endogène des antioxydants. En outre, la quercétine augmente l'activité des enzymes antioxydants, protège contre les effets dommages du stress oxydatif et préserve l'intégrité des cellules pancréatiques [Pandey et Rizvi, 2009 ; Oyenihi et al., 2014]. Douée de propriétés antioxydantes, la quercétine contribue à la régénération des îlots pancréatiques et augmentent la sécrétion de l'insuline chez les rats rendus diabétique par la streptozotocine [Vessal et al., 2003 ; Coskun et al., 2005].

Les propriétés antioxydantes de la catéchine (flavanol ou flavan-3-ols, flavan-3,4-ols) étaient très bien documentées. Son mécanisme d'action peut inclure le pouvoir antiradicalaire, le pouvoir chélateur des ions métalliques en une forme inactive ainsi un transfert rapide des électrons aux ERO. Elle augmente la production des antioxydants endogènes, protège contre les effets délétères du stress oxydatif et réduit la peroxydation des lipides au niveau de plusieurs tissus chez le rat. L'effet de la catéchine sur le diabète sucré était investigué *in vitro* et *in vivo*, sur des rats diabétiques, la catéchine réprime les effets délétères du stress oxydatif sur les érythrocytes et sur leurs antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

L'acide cinnamique extrait de la cannelle (*Cinnamomum verum*) utilisée depuis longtemps comme épice, supprime l'insulino-résistance, réduit le taux de glucose dans le sang. Il est doué aussi de diverses propriétés pharmacologiques antioxydantes et antidiabétiques [Oyenihi et al., 2014].

Les polyphénols issus de pépins de raisin suppriment le stress oxydatif dont le resvératrol (stilbène) inhibe significativement le stress oxydant induit chez les rats diabétiques et supprime l'insulino-résistance [Pandey et Rizvi, 2009].

Dans cette étude notre choix s'est porté sur une plante appartenant à la famille des Fabacées, *Ononis angustissima*. Cette famille est connue pour sa richesse en flavonoïdes, isoflavones, flavonol glycosylés, rétinolides et anthocyanines [John Ingham 1982]. *Ononis angustissima* est une espèce végétale spontanée endémique du Nord du Sahara [Cheriti et al., 2011 ; Bouheroum, 2009 ; AJAA, 2012 ; Benabderahmane et al., 2014]. Cette plante appartient à l'arsenal thérapeutique traditionnel Algérien, et elle est réputée pour son effet bénéfique contre le diabète sucré [Khacheba et al., 2014]. Beaucoup de plantes appartenant au genre *Ononis* font partie de plantes médicinales et sont utilisées depuis longtemps pour le traitement de nombreuses maladies, elles sont douées d'activités biologiques et ethnopharmacologiques intéressantes, d'où l'intérêt de notre choix de cette plante, afin d'évaluer ses activités biologiques et vertus médicinales qui lui sont attribuées.

Tous récemment, des études phytochimiques utilisant des techniques chromatographiques performantes (HPLC couplée à des analyses spectrales de pointe, telles que la MS, RMN-1H, RMN-13C, IR, UV, etc...) ont permis l'identification et la caractérisation de 22 nouveaux flavonoïdes [Bouheroum., 2009 ; Mezrag et al., 2013 ; Benabderahmane et al., 2014 ; Ghribi et al., 2015 ; Mezrag et al., 2016].

Dans ce travail, nous avons étudié l'aspect phytochimique de cette plante par une analyse qualitative de ces extraits aqueux et organiques pour mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires. Les résultats préliminaires nous ont permis de noter la présence de polyphénols, flavonoïdes, tannin (catéchiques et galliques), alcaloïdes, saponosides (Stéroïdiques et triterpéniques), coumarines, terpénoïdes, quinones libres, amines et absence des anthraquinones. L'analyse quantitative des composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes totaux) nous a révélé des taux relativement élevés notamment dans les extraits hydrométhanoliques et davantage dans leurs fractions organiques (butanolique et acétate d'éthyle) par rapport aux extraits aqueux. En effet, les mélanges hydroalcooliques ont la capacité

d'extraire de nombreux composés à large gamme de polarité et de structure comparativement à l'eau seule [Sultana et al. 2009 ; Tiwari et al., 2011; Pietrzak et al. 2014], dont les composés phénoliques. Le n-butanol et l'acétate d'éthyle sont utilisés pour extraire sélectivement et obtenir des extraits enrichis en flavonoïdes glycosylés et aglycones, respectivement à partir d'extraits primaires [Andersen et Markham, 2006].

Les méthodes de dosage employées pour le dosage des polyphénols (méthode de Folin-Ciocalteu) et des flavonoïdes (méthode de chlorure d'aluminium) sont les plus communément utilisées et adoptées par la plus part des chercheurs bien qu'elles manquent de spécificité. En effet, le réactif Folin-Ciocalteu interagit aussi avec les groupements hydroxyles de protéines, sucres et pigments encore présents dans l'extrait, ce qui entraîne en conséquence une surestimation des composés ciblés. Toutefois, elles constituent une bonne base de comparaison de résultats issus de différents travaux de recherche.

La composition phytochimique des extraits et fractions de *Ononis angustissima*, révélée quantitativement, indique que les teneurs en polyphénols, et en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits et fractions. Les composés phénoliques et les flavonoïdes sont plus concentrés dans les extraits organiques obtenus par extraction sélective, que les extraits aqueux. Une forte corrélation entre les taux de polyphénols et de flavonoïdes avec un coefficient de 0,6008 assure que les polyphénols sont représentés majoritairement par les flavonoïdes. Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes [Dai et Mumper, 2010].

Tous récemment un intérêt particulier a été accordé aux flavonoïdes de cette plante, des travaux antérieurs qui sont intéressés à la composition en polyphénol de cette plante [Djeridane et al., 2010 ; Khacheba et al., 2014 ; Ghribi et al., 2015]. Nos résultats, montrent des teneurs élevées en polyphénols par rapport à celles obtenue par l'étude de Khacheba et al. (2014), cette étude rapporte que l'extrait aqueux de feuilles de *Ononis angustissima* récoltée dans la steppe de Laghouat (Algérie) possèdent une teneur totale en polyphénols et flavonoïdes 65 fois et 12 fois respectivement, moins que nos résultats ( $1,91 \pm 0,52$  mg GA/g MV et  $1,16 \pm 0,51$  mg RE/g MV, respectivement).

De même, les résultats de Djeridane et al., (2010) ont révélé dans l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Ononis angustissima* récoltée de la région de Sidi Makhoulf (Laghouat, Algérie) au mois de Septembre des teneurs relativement élevées en polyphénols 12,03 mg GA/g MV (nos résultats 4,91 mg/g MV). D'où on constate que les racines de *Ononis angustissima* sont plus

riches en polyphénols que la partie aérienne. Toutefois il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie puisque plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer l'analyse qualitative et quantitative des extraits de plante. Ces facteurs peuvent être liés à la plante tels que : son écologie, les conditions édaphiques et sa maturité, comme ils peuvent être liés aussi aux conditions expérimentales et mode opératoire : type, temps, température et le mode d'extraction ainsi la concentration et la polarité du solvant utilisé [Tiwari et al., 2011].

Le potentiel antioxydant des extraits de *Ononis angustissima* a été évalué par deux méthodes ayant pour principe respectivement : le piégeage du radical libre du DPPH ou le pouvoir réducteur du fer (FRAP). La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son  $IC_{50}$  est petite.

Comparativement à l'acide ascorbique ( $IC_{50} = 0,019$  mg/ml), les extraits organiques (EMFT, n-BFT et AcFT) dont leur valeur de  $IC_{50} = 5$  mg/ml sont 250 fois moins actifs. Ces extraits sont presque deux fois plus actifs que les extraits aqueux (AqFT et AqFl) dont l' $IC_{50} = 9$  mg/ml, leur activité antiradicalaire est bien plus importante à celles des extraits aqueux. Cela peut être attribué à la présence d'une quantité élevée de polyphénols dans les extraits organiques par rapport aux extraits aqueux ceci explique l'action des solvants organiques qui détruisent les parois cellulaires et fait libérer les polyphénols et inhibent l'activité de l'enzyme polyphénol-oxydase responsable de la dégradation des polyphénols. Cette enzyme est active dans les extraits aqueux [Tiwari et al., 2011].

Les travaux antérieurs concernant le pouvoir antioxydant de cette plante ont montré également que les racines de cette plante sont douées de potentiel antioxydant très élevé encore plus important à celui de la partie aérienne notamment l'extrait acétate d'éthyle et n-BFT des racines et que cette propriété est due à la quantité des polyphénols et flavonoïdes car les racines de *Ononis angustissima* sont plus riches en polyphénols que la partie aérienne [Djeridane et al., 2010 ; Ghribi et al., 2015].

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité antioxydante utilisant la méthode de FRAP, nous montrent que tous les extraits ont une activité dose dépendante.  $IC_{50}$  la plus faible est celle de l'acide ascorbique 0,017 mg/ml, alors que  $IC_{50}$  de l'extrait AcFT et le BHT est de l'ordre de 0,109 et 0,131 mg/ml respectivement, leur activité antioxydante est deux fois plus importante que celle de l'extrait EMFT (0,262 mg/ml) et quatre fois plus importante par rapport aux extraits aqueux AqFT, AqFL et n-BFT (0,494 ; 0,464 et 0,436 mg/ml respectivement). Selon Ghribi et al., (2015), les extraits acétate d'éthyle et n-butanol (dont les  $IC_{50}$  sont de l'ordre 0,063 et

0,141(mg/ml), respectivement) des racines sont dotés de pouvoir réducteur de fer plus important à celui de la partie aérienne de cette plante.

Les composés phénoliques peuvent exercer leur effet antioxydant par différentes voies, dont le mécanisme d'action peut être direct ou indirect, incluant : le piégeage et la neutralisation des radicaux libres, la chélation de certains ions métalliques de transition impliqués dans la formation de ces radicaux dont le mécanisme d'action est direct. L'inhibition d'enzyme responsable de la formation des radicaux libres et d'anions superoxyde, le blocage du processus de peroxydation par la réduction de radicaux alcoyl et peroxy et régénération des récepteurs membranaires pour les antioxydants tel que -tocophérol, constituent le mécanisme d'action indirect [Dugas et al. 2000 ; Negrão et Faria, 2009 ; Biesaga, 2011 ; Spiridon et al. 2011].

Il est connu que les polyphénols, comme les flavonoïdes, bloquent la production des ERO en inhibant leurs effets apoptotiques et cytotoxiques [Fiorani et al. 2003]. L'activité antioxydante de polyphénols dépend généralement de leurs structures chimiques, du nombre et de la distribution des groupements hydroxyles [Popovici et al. 2009]. L'effet antioxydant et/ou piègeur des radicaux libres est essentiellement lié à la configuration des groupements 3' et 4'-orthodihydroxyle sur le cycle B, la double liaison entre C2 et C3 conjuguée avec le groupement 4-carbonyle sur le cycle C, ainsi le groupement 3-OH et/ou 5-OH sur le cycle C déterminant le pouvoir antioxydant [Pyo et al. 2004 ; Wojdylo et al. 2007 ; Negrão et Faria, 2009]. Les polyphénols qui contiennent le noyau catéchol dans leur structure présente un pouvoir réducteur du fer élevé, cela est due à la participation des groupements OH liés au noyau catéchol [Degraft-Johnson et al. 2007].

Divers études *in vivo* ont été réalisées pour vérifier les effets des antioxydants sur des modèles diabétiques expérimentaux. Certains antioxydants naturels peuvent atténuer, inhiber ou retarder l'effet délétère du stress oxydant consécutif au diabète, ceci est l'un des mécanismes d'action prometteurs des plantes médicinales antidiabétiques [Oyenihi et al., 2014].

Il est important de noter cependant que la capacité antioxydante d'un composé ou extrait de plantes *in vitro*, ne peut être extrapolée à un organisme entier *in vivo*. En effet, l'efficacité de ces composés phénoliques dépend de leur biodisponibilité : perméabilité, absorption intestinale, stabilité, efficacité et excrétion, etc..., car ces derniers peuvent subir des changements structuraux et dégradation au niveau de l'intestin [Negrão et Faria, 2009 ; Pandey et Rizvi, 2009 ; Blaschek, 2017].

**Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique  
de *Ononis angustissima in vitro***

**Introduction**

## Introduction

Une des approches thérapeutiques importantes pour prévenir L'HGPP est le ralentissement de la digestion et l'absorption intestinale des glucides alimentaires après un repas par l'inhibition des  $\alpha$ -glucosidases [Ali et al., 2006].

Le terme générique  $\alpha$ -glucosidases désigne les enzymes dégradant les polysaccharides, oligosaccharides et disaccharides. Certains sont intracellulaires et interviennent dans la glycogénolyse ( exp : glycogène phosphorylase à activité  $\alpha$ -(1,4) glucosidase et la  $\alpha$ -(1,6) glucosidase. D'autres interviennent dans la digestion des glucides alimentaires tel que : les  $\alpha$ -amylases salivaires et pancréatiques et les  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse des entérocytes [Goodman, 2010].

Les  $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20) et  $\alpha$ -amylase (EC.3.2.1.1) appartiennent à la famille 13 des glycosides hydrolases. L'  $\alpha$ -amylase pancréatique est une enzyme clé, principale dans l'appareil digestif et catalyse l'étape initiale de l'hydrolyse d'amidon à un mélange d'oligosaccharides, de maltose, maltotriose, et d'un nombre de  $\alpha$ -(1,6) et de  $\alpha$ -(1,4) oligoglucans (dextrines limites). Les produits qui résultent de l'action d'  $\alpha$ -amylase sont destinés d'être dégradés par les  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal en glucose qui va être absorbé et passent dans la circulation sanguine [Goodman, 2010]. Concernant l'inhibition de  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidases, il a été suggéré que le mécanisme exercé est la formation d'un complexe entre l'agent inhibiteur et ces enzymes, limitant ainsi leurs activités. L'acrabose est parmi les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases les plus connus, il agit en mimant le substrat de ces enzymes [Sales et al., 2012].

Cette partie d'étude concerne la recherche de l'activité antidiabétique des extraits de *Ononis angustissima*, elle consiste en :

- L'évaluation de l'effet inhibiteur de ces extraits vis-à-vis des enzymes hydrolysant les glucides dans le tube digestif (  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidases), *in vitro*.
- *in vivo*, leur effet anti hyperglycémiant est évalué chez le rat, soumis à l'hyperglycémie provoquée par voie orale par les différents sucres simulant un état postprandial pour confirmer l'effet des extraits de cette plante sur la digestion de l'amidon par  $\alpha$ -amylase, le saccharose et le maltose par les  $\alpha$ -glucosidases (saccharase et maltase). L'utilisation du glucose dans les mêmes conditions que celles des autres sucres exclue l'action des enzymes digestives.

**Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique  
de *Ononis angustissima in vitro***

**Matériel et Méthodes**

## Matériel et méthodes

### 1. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de *Ononis angustissima*: effet sur l'activité des enzymes digestives *in vitro*

#### 1.1 Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase porcine

Cette partie expérimentale consiste à étudier l'effet des différents extraits de la partie aérienne de *Ononis angustissima* : AqFl, AqFT, EMFT, AcFT, n-BFT sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc qui est proche d'un point de vue structurale et cinétique de l' $\alpha$ -amylase humaine. L'acarbose (AcB) (Bayer), agent antidiabétique inhibiteur  $\alpha$ -glucosidasique, est utilisé comme témoin positif. La catéchine (CT) et l'acide gallique (AG) (Sigma Aldrich. Chimie GmBH, Germany) sont utilisés comme des molécules de référence. Ces molécules sont testées dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits.

Les produits formés après hydrolyse enzymatique de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase sont les sucres réducteurs (maltose, maltotriose et glucose), les oligosaccharides ( $\alpha$ -(1,4) et  $\alpha$ -(1,6) oligoglucanes) [Worthington, 1988]. Pour déterminer la quantité de produits formés, nous avons utilisé la méthode de dosage des sucres réducteur, cette dernière est basée sur le caractère réducteur des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (chromogène) de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur brune ou jaune orangée absorbant à 540 nm. L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présente dans le milieu réactionnel [Bernfeld, 1955]

#### 1.1.1 Réactifs et produits

##### 1.1.1.1 Solution de l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase porcine (E.C.3.2.1.1) du pancréas de porc (PPA) est fournie sous forme lyophilisée (Sigma-Aldrich Chimie GmH, Germany), avec un poids moléculaire de 13000Da et une activité spécifique de 13 UI/mg. L'optimum de son activité est obtenu à pH 6,9 à 37°C. La solution de travail est préparée comme suit : 3mg d' $\alpha$ -amylase porcine est solubilisée dans 10 ml de solution tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9), la solution obtenue contient une activité  $\alpha$ -amylasique de 3,9 UI/mL.

### 1.1.1.2 Solution du substrat

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre (Merck) préparé dans la solution tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9) à la concentration de 0,4 mg/ml. Sa solubilisation est facilitée par le chauffage et une agitation continue.

### 1.1.1.3 Solutions de l'acarbose

L'acarbose (AcB), (Glucobay®50, Bayer, Germany) est un antidiabétique oral agissant comme inhibiteur glucosidasique, il est utilisé dans cette expérience comme témoin positif aux concentrations : 0,12 ; 0,18 ; 0,75 ; 3 ; 4,5 et 8 mg/ml.

### 1.1.1.4 Solution de catéchine et d'acide gallique

Les solutions de catéchine (CT) et de l'acide gallique (AG) (Sigma-Aldrich, Germany) sont préparées dans du tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9) aux concentrations suivantes : 0,18 ; 0,75 ; 3 ; 4,5 ; 8 et 10 mg/ml.

### 1.1.1.5 Solution des extraits de *Ononis angustissima*

Les extraits secs de *Ononis angustissima* : AqFl, AqFT, EMFT, AcFT et n-BFT sont préparés dans du tampon phosphate (0,02 M, pH 6) aux concentrations suivantes : 0,18 ; 0,75 ; 3 ; 4,5 ; 8 et 10 mg/ml.

### 1.1.1.6 Solution de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Dans un Erlen Meyer, 1g de DNSA (Sigma-Aldrich) est solubilisé dans 40 ml d'eau distillée. A cette solution, 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 ml d'une solution de NaOH (2N) rend le réactif limpide avec une couleur orange. Le volume finale de la solution est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée, le réactif est conservé à l'abri de la lumière à +4°C.

## 1.1.2 Mode opératoire

- Introduire 200 µl d'échantillon à analyser : extrait, acarbose, catéchine ou acide gallique. Dans le tube contrôle (témoin) l'échantillon est remplacé par le tampon : il représente l'activité enzymatique totale (100 %), sans inhibiteur ; un tube blanc approprié est préparé simultanément pour chaque tube contenant l'échantillon sans l'enzyme. Puis ajouter 200 µl de la solution enzymatique et préincuber les tubes pendant 5 min à 37 °C dans un incubateur agitateur (120 cycles/min) ; Ensuite ajouter 200 µl de la solution d'amidon (0.4 mg/ml) dans

tous les tubes et incuber pendant 10 min à 37 °C dans un incubateur agitateur (120 cycles/min). Après incubation ajouter 600 µl de DNSA dans les tubes, ces derniers sont placés directement dans un bain marie bouillant pendant 7min. Pour provoquer un choc thermique déposer les tubes directement dans un bain d'eau glacée ce qui permet de stopper la réaction. Après cette étape ajouter 1 ml d'eau distillée dans chaque tube et homogénéiser à l'aide d'un vortex.

- L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm contre le blanc approprié et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, selon la formule suivante

$$I (\%) = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}} \times 100$$

**I :** Le pourcentage d'inhibition de l'échantillon.

**A<sub>contrôle</sub> :** Absorbance du tube de contrôle où l'activité enzymatique est totale (sans échantillon)

**A<sub>échantillon</sub> :** Absorbance du test effectué (avec l'échantillon).

La concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) ou la concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique. La valeur IC<sub>50</sub> est déterminée graphiquement : I = f (C) en utilisant le logiciel de traitement des données Microcal Origin 5.0 (Microcal software, Inc. 1.0.0.1).

## 1.2 Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité d'α-glucosidases de l'intestin de rat

Cette partie expérimentale consiste à étudier l'effet des différents extraits de la partie aérienne de *O. angustissima* sur l'activité de l'α-glucosidase de l'intestin de rats Wistar en utilisant le 4-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (pNPG) comme substrat et l'acarbose (AcB) comme témoin positif. La catéchine (CT) et l'acide gallique (AG) sont testés dans les mêmes conditions expérimentales. La dégradation de pNPG produit le p-nitrophenol de couleur jaune absorbant à 400 nm [Dahlqvist, 1964 ; Bergmeyer and Bernt, 1974 ; Jong-Anurakkun et al., 2007].

### 1.2.1 Préparation de l'extrait enzymatique brut d'α-glucosidases à partir de la muqueuse intestinale de rat

L'extrait brut d'α-glucosidases consiste en un mélange complexe contenant entre autres plusieurs disaccharidases : saccharase, maltase, isomaltase.... produites par la bordure en

brosse de l'épithélium intestinale hydrolysant les disaccharides du chyme alimentaire (saccharose, maltose, isomaltose...) en sucres simples.

Cet extrait brut d' $\alpha$ -glucosidases est préparé à partir de la muqueuse d'intestin grêle de rat Wistar soumis à jeun pendant 24 heures (intestin vidé de chyme alimentaire). On procède comme suit ;

Après anesthésie du rat par injection intrapéritonéale du chloral hydraté (8%), et l'incision de la cavité abdominale, on récupère une portion de l'intestin grêle allant du duodénum (10 cm après le pylore) jusqu'au jéjunum sur une longueur de 30cm. Le segment récupéré est lavé avec du sérum physiologique, fraîchement préparé, à l'aide d'une sonde de gavage, puis il est placé sur une plaque de verre déposée sur de la glace pillée. Ensuite l'intestin lavé est coupé sur sa longueur puis la muqueuse est récupéré dans du tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  (67mM ; pH 6,8) par grattage à l'aide d'un verre de montre. La suspension de muqueuse intestinale est récupérée dans un bécher, ce dernier est déposé dans de la glace, ensuite elle est homogénéisée par le sonicateur (ultrason), puis centrifugée à 5000 tr/min à 4°C pendant 20min. Enfin le surnageant récupéré représente l'extrait enzymatique brut d' $\alpha$ -glucosidases.

L'activité enzymatique de cet extrait brut a été déterminée selon la formule : une unité d'activité enzymatique (U) = quantité d'enzyme qui libère 1 $\mu$ mol de  $\alpha$  D-glucose à partir de pNPG (substrat) par min à pH 6,8 et à 37°C. Le taux de glucose a été déterminé selon la méthode GOD-POD (kit Spinreact). L'activité spécifique de l'extrait enzymatique est exprimée en U/mg de protéines. Le taux de protéines de l'extrait enzymatique étant déterminé par la méthode de **Lowry et al., (1951)**.

## **1.2.2 Réactifs et mode opératoire**

### **1.2.2.1 Solution d' $\alpha$ -glucosidases**

A partir de l'extrait enzymatique brut d'activité spécifique moyenne 0,94 U/mg de protéines, une solution de travail à 0,2 U/ml a été préparée par dilution de l'extrait enzymatique brut dans du tampon phosphate (67mM, pH 6,8).

### **1.2.2.2 Solution du substrat**

Le substrat utilisé est le 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG), substrat chromogénique, un glycoside de synthèse (Sigma Aldrich, Germany), préparé dans le tampon phosphate (67mM, pH6,8) à une concentration de 0,01 M (3g/l).

### 1.2.2.3 Solution de l'acarbose

Des solutions d'acarbose (AcB) sont préparées à différentes concentrations dans le tampon phosphate (67mM, pH6,8) : 0,010 ; 0,050 ; 0,100 ; 0,250 ; 0,500 et 1,000 mg/ml.

### 1.2.2.4 Solution de catéchine et d'acide gallique

Les solutions de la catéchine (CT) et de l'acide gallique (AG) (sigma Aldrich) sont préparée dans du tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9) aux concentrations : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 4,5 ; 8 et 10 mg/ml.

### 1.2.2.5 Solution des extraits de *Ononis angustissima*

À partir de chaque extrait sec dissout dans du tampon phosphate (67mM, pH 6,8), une série de solutions de concentration croissante a été préparée afin d'évaluer leur effet sur l'activité d' -glucosidases. Les concertations utilisées sont : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 4,5 ; 8 et 10 mg/ml. L'extrait EMFT et AcFT sont solubilisés dans du tampon phosphate (67mM, pH 6,8) plus un volume de DMSO à 1 %.

### 1.2.2.6 Solution de carbonate de sodium

Carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 0,1 M : solubilisation de 1,06g de carbonate de sodium dans 100ml d'eau distillée.

### 1.2.2.7 Mode opératoire

L'effet des extraits de *O. angustissima* sur l'activité -glucosidasique a été évalué selon la méthode de **Deguchi et Miyazaki, (2010)** adoptant le protocole suivant :

200  $\mu\text{l}$  d'échantillon à analyser (extrait, acarbose, catéchine ou acide gallique) est déposé, dans le tube témoin d'activité enzymatique totale (sans inhibiteur) l'échantillon est remplacé par le tampon phosphate (67mM, pH 6,8) ; ensuite ajouter 200  $\mu\text{l}$  de la solution d'enzyme et 300  $\mu\text{l}$  de la solution de substrat (pNPG 0.01M), dans les tubes blanc cette solution est remplacée par 300  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate (67mM, pH6,8) ; 1000  $\mu\text{l}$  de la solution de tampon phosphate (67mM, PH6,8) sont ajoutées. Mélanger le milieu réactionnel (vortex) et laisser incuber pendant 40 min à 37 °C dans un incubateur agitateur (120 cycles/min). La réaction enzymatique est enfin stoppée par l'addition de 3 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M dans chaque tube puis l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 400 nm contre le blanc (tube sans substrat). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition d' -glucosidases, selon la formule suivante :

$$I (\%) = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}} \times 100$$

**I :** Le pourcentage d'inhibition de l'échantillon.

**A<sub>contrôle</sub> :** Absorbance du tube de contrôle où l'activité enzymatique est totale (sans échantillon)

**A<sub>échantillon</sub> :** Absorbance du test effectué (avec l'échantillon).

La concentration de l'échantillon dans le milieu réactionnel (concentration finale) qui inhibe 50% de l'activité enzymatique (IC<sub>50</sub>), est déterminée graphiquement (I (%) = f (C)) en utilisant le logiciel de traitement des données Microcal Origin 5.0 (Microcal software, Inc. 1.0.0.1).

### 1.2.2.8 Analyse statistique

**1. Moyenne (m)** 
$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_1 X_1$$

**2. Corrélation (r)**

La corrélation se définit comme étant la relation linéaire entre deux variables quantitatives, elle est calculée par la formule suivante :

$$r = \frac{\sum(X - \bar{X}).(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2} \times \sqrt{\sum(Y - \bar{Y})^2}}$$

Par convention, on dira que la relation entre x et y est :

- nul si r = 0
- faible si r se situe entre 0 et 0,2.
- d'intensité moyenne si r se situe entre 0,2 et 0,5
- forte si r se situe entre 0,5 et 0,8
- très forte si r se situe entre 0,8 et 0,99
- parfaite si r = 1.

**Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique  
de *Ononis angustissima in vitro*  
Résultats et interprétation**

## Résultats et interprétation

### 1. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de *Ononis angustissima*: effet sur l'activité des enzymes digestives *in vitro*

#### 1.1 Effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase porcine

Afin de déterminer l'effet des extraits de *O. angustissima* et les molécules de référence sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*, nous avons testé l'effet de différentes concentrations sur l'activité de cette enzyme avec un substrat amidon à 0,4 g/l. Les résultats obtenus exprimés en pourcentage d'inhibition sont représentés dans le **tableau n°13**.

**Tableau n°13** : Pourcentages d'inhibition et IC<sub>50</sub> de l'activité de  $\alpha$ -amylase générés par les extraits de *O. angustissima*, les molécules de référence et l'acarbose.

	Concentration finales de l'AcB (C <sub>F</sub> g/ml)						IC <sub>50</sub> (mg/ml)
	0,04	0,06	0,25	1	1,5	2,67	
	47,52±0,01	71,32±0,01	84,83±0,02	91,96±0,01	95,93±0,01	100±0,01	0,044±0,01
	Concentration finales des extraits (C <sub>F</sub> g/ml)						IC <sub>50</sub> (mg/ml)
	0,06	0,25	1	1,5	2,67	3,33	
<b>AqFT</b>	1,64±0,01	10,00±0,02	22,55±0,01	31,60±0,01	45,62±0,02	59,48±0,01	2,88±0,02
<b>AqFl</b>	11,9±0,01	14,25±0,02	22,29±0,01	38,05±0,02	57,16±0,02	77,04±0,01	2,52±0,02
<b>EMFT</b>	1,79±0,02	7,43±0,02	32,45±0,01	51,33±0,01	66,56±0,01	74,19±0,01	1,46±0,01
<b>n-BFT</b>	8,81±0,01	14,95±0,00	19,72±0,01	36,31±0,01	50,59±0,03	66,39±0,01	2,58±0,02
<b>AcFT</b>	8,66±0,01	15,31±0,01	33,43±0,00	40,53±0,01	46,5±0,02	54,34±0,02	3,26±0,02
<b>CT</b>	24,67±0,01	57,59±0,02	76,46±0,02	81,85±0,01	88,97±0,02	100±0,00	0,21±0,02
<b>AG</b>	10,50±0,02	15,97±0,01	19,08±0,02	25,35±0,02	67,79±0,02	86,73±0,01	2,18±0,02

**C<sub>F</sub> (mg/ml)** : Concentrations finales dans le milieu réactionnel. **AqFT** : Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl** : Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT** : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT** : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles. **CT** : catéchine (molécule de contrôle). **AG** : l'acide gallique (molécule de contrôle). **AcB** : l'acarbose (témoin positif). Pourcentages d'inhibition ± erreur standard.

Les résultats relatifs à l'effet des extraits de *Ononis angustissima*, de molécules de référence et contrôle (catéchine, acide gallique et acarbose,) sur l'activité de  $\alpha$ -amylase sont indiqués dans le **tableau n°13** exprimés en pourcentage d'inhibition en fonction de concentrations croissantes dans le milieu réactionnel. Ce tableau comporte aussi la valeur IC<sub>50</sub>, concentration médiane inhibant 50% de l'activité enzymatique. Cette valeur permet la comparaison entre les différents échantillons analysés (extraits de plante, molécules de référence) par rapport à l'acarbose, agent inhibiteur des  $\alpha$ -glucosidases, utilisé comme témoin positif. IC<sub>50</sub> est inversement proportionnelle au potentiel inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase.

L'analyse de résultats nous montre que l'acarbose possède l'effet inhibiteur le plus important vis-à-vis de l'  $\alpha$ -amylase dont l' $IC_{50}$  est de 0,044 mg/ml, suivi de la catéchine ( $IC_{50}$  = 0,210 mg/ml) (cinq fois plus élevé environ), tandis que tous les extraits de *Ononis angustissima* étudiés et l'acide gallique montrent un faible effet inhibiteur par rapport à l'acarbose. Leur  $IC_{50}$  est variable, il est de 33 fois supérieur pour l'extrait EMFT ( $IC_{50}$  = 1,46 mg/ml), 74 fois pour l'extrait AcFT ( $IC_{50}$  = 3,26 mg/ml), par rapport à l' $IC_{50}$  de l'acarbose. Par ailleurs, l'ensemble des échantillons testés montrent un effet dose-dépendant.

## 1.2 Effet des extraits sur l'activité d' $\alpha$ -glucosidases d'intestin de rat

Les résultats de l'évaluation de l'activité inhibitrice des extraits et des molécules de contrôles vis-à-vis de l'  $\alpha$ -glucosidase sont exprimés en pourcentage d'inhibition et présentés dans le **tableau n° 14**.

**Tableau n°14** : Pourcentages d'inhibition et  $IC_{50}$  de l'activité d'  $\alpha$ -glucosidases de l'intestin de rat générés par les extraits de *Ononis angustissima*, les molécules de référence et l'acarbose.

	Concentration finales de l'AcB ( $C_F$ mg/ml)						$IC_{50}$ (mg/ml)
	0,001	0,006	0,012	0,029	0,059	0,118	
	28,73±0,02	36,92±0,01	38,47±0,01	45,52±0,01	53,48±0,02	59,30±0,00	0,046±0,01
	Concentration finales des extraits ( $C_F$ mg/ml)						$IC_{50}$ (mg/ml)
	0,06	0,12	0,18	0,53	0,94	1,18	
<b>AqFT</b>	14,41±0,01	16,60±0,01	14,71±0,02	22,67±0,01	34,15±0,01	35,70±0,01	non déterminée
<b>AqFl</b>	12,25±0,01	14,36±0,01	18,19±0,01	32,63±0,02	44,41±0,00	52,49±0,01	1,10±0,00
<b>EMFT</b>	08,35±0,01	09,55±0,00	13,61±0,00	30,18±0,00	45,35±0,01	66,73±0,01	0,99±0,01
<b>n-BFT</b>	9,45±0,00	13,94±0,01	14,38±0,00	32,19±0,00	50,16±0,01	60,38±0,00	0,94±0,00
<b>AcFT</b>	13,36±0,01	15,68±0,01	14,94±0,01	27,41±0,00	36,11±0,00	50,45±0,00	1,17±0,00
<b>CT</b>	13,79±0,00	12,42±0,01	12,98±0,01	15,89±0,01	23,79±0,01	22,34±0,02	non déterminée
<b>AG</b>	23,85±0,02	27,34±0,00	28,48±0,00	51,26±0,02	50,30±0,01	62,97±0,01	0,51±0,01

**$C_F$  (mg/ml)** : Concentrations finales dans le milieu réactionnel. **AqFT** : Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl** : Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT** : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT** : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles. **CT** : catéchine (molécule de contrôle). **AG** : l'acide gallique (molécule de contrôle). **AcB** : acarbose. Pourcentages d'inhibition  $\pm$  erreur standard.

Les résultats relatifs à l'effet des extraits de *O. angustissima*, de molécules de référence (acarbose) et contrôle (catéchine et acide gallique) sur l'activité  $\alpha$ -glucosidasique sont indiqués dans le **tableau n°14** exprimés en pourcentage d'inhibition en fonction de concentrations croissantes dans le milieu réactionnel. Ce tableau comporte aussi leurs valeurs d'IC<sub>50</sub> respectives.

L'analyse de résultats nous montre que l'acarbose possède l'effet inhibiteur le plus important vis-à-vis de  $\alpha$ -glucosidases dont l'IC<sub>50</sub> est de 0,046  $\mu$ g/ml suivie de l'acide gallique (IC<sub>50</sub> = 0,510  $\mu$ g/ml) (11 fois plus élevé environ), tandis que tous les extraits de *O. angustissima* étudiés montrent un faible effet inhibiteur par rapport à l'acarbose. Leur IC<sub>50</sub> respective est de l'ordre de 1 mg/ml, il est environ 20 fois supérieur à celui de l'acarbose. En revanche, l'extrait AqFT et la catéchine n'exercent aucun effet inhibiteur remarquable sur l'activité de  $\alpha$ -glucosidases. Par ailleurs, l'ensemble des échantillons testés présentent un effet dose-dépendant.

Ces résultats nous permettent de suggérer que les extraits bruts (aqueux et organiques) ainsi que leurs fractions organiques (n-butanol et acétate d'éthyle), dont le dosage des polyphénols et flavonoïdes montre leur richesse en ces composés, contiendraient des substances actives agissant comme inhibiteurs enzymatiques, faisant partie de la composition complexe et diversifiée des extraits de *O. angustissima* d'une part, d'autre part ces substances montrent une activité inhibitrice beaucoup plus importante (2 fois plus actives) vis-à-vis des  $\alpha$ -glucosidases (IC<sub>50</sub> environ 1 mg/ml) qu'avec l' $\alpha$ -amylase (IC<sub>50</sub> varie de 2 à 3 mg/ml).

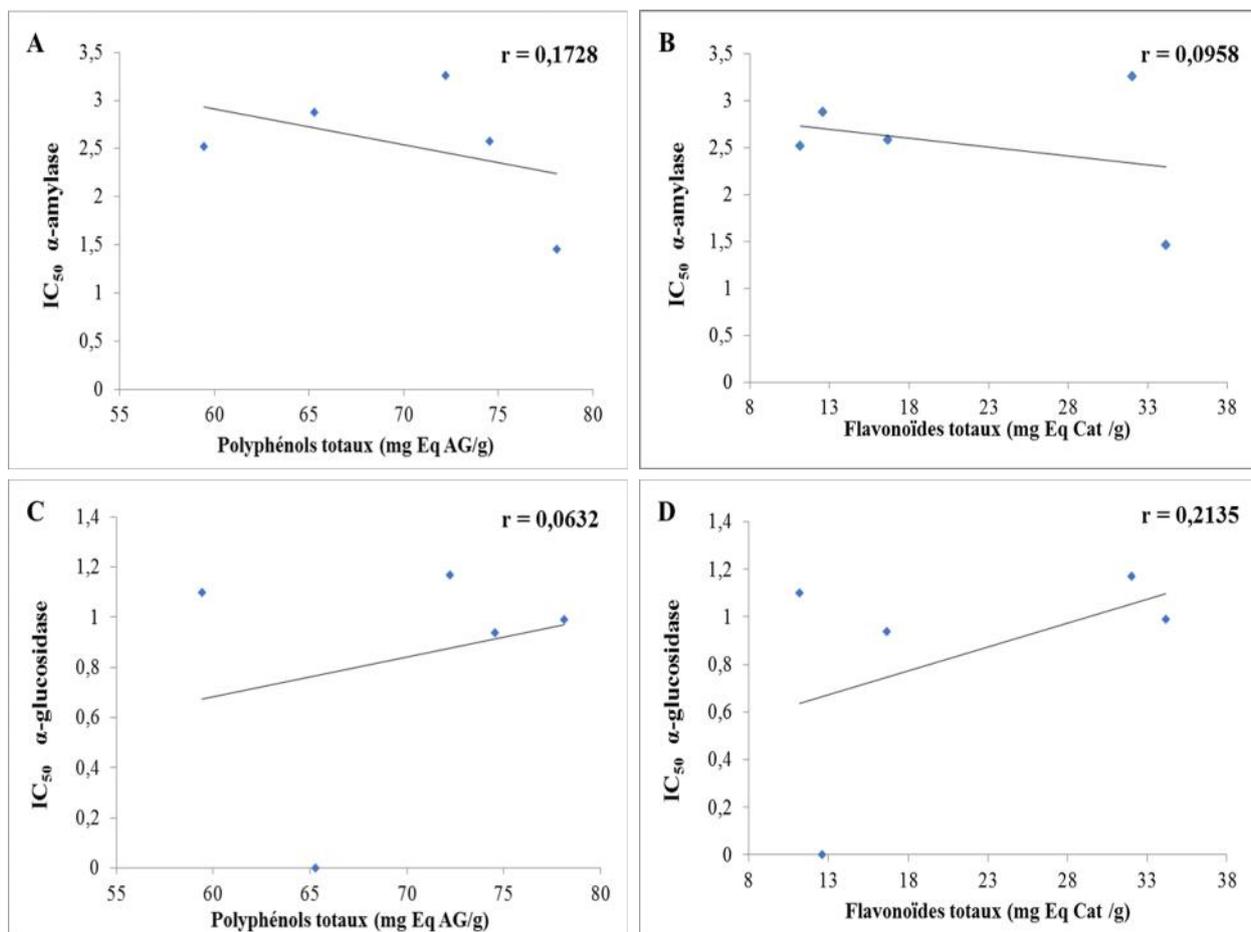
### **1.3 Corrélation entre l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase et d' $\alpha$ -glucosidases et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux**

L'étude de la corrélation entre l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase et la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux (**tableau n°15** et **figure 6**), indique une faible corrélation entre l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase et les polyphénols ( $r=0,1720$ ), ainsi que les flavonoïdes ( $r=0,0958$ ).

Il existe une faible corrélation entre l'activité inhibitrice des  $\alpha$ -glucosidases et la teneur en polyphénols ( $r=0,0630$ ), et une corrélation moyenne entre l'activité inhibitrice des  $\alpha$ -glucosidases et la teneur en flavonoïdes ( $r=0,2135$ ) (**tableau n°15** et **figure 6**).

**Tableau n°15** : Coefficient de corrélation (r) entre l'activité inhibitrice de l'  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidases et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits de *Ononis angustissima*

	IC <sub>50</sub> $\alpha$ -amylase	IC <sub>50</sub> $\alpha$ -glucosidases
<b>Polyphénols</b>	0,1720	0,0630
<b>Flavonoïdes</b>	0,0958	0,2135



**Figure 6** : Corrélation entre l'activité inhibitrice de l'  $\alpha$ -amylase et la teneur en polyphénols (A) et en flavonoïdes (B) ; Corrélation entre l'activité inhibitrice de l'  $\alpha$ -glucosidase et la teneur en polyphénols (C) et en flavonoïdes (D).

**Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique  
de *Ononis angustissima in vitro***

**Discussion**

## Discussion

Cette étude concerne les propriétés antidiabétiques de *Ononis angustissima* basée sur l'évaluation de l'effet inhibiteur de ces extraits sur l'activité des  $\alpha$ -glucosidases : enzymes hydrolysant les sucres alimentaires en sucres simples absorbables au niveau du tube digestif, comme mécanisme d'action potentiel, responsable de la réduction de l'hyperglycémie postprandiale. Nous avons adopté une démarche expérimentale impliquant des méthodes d'analyses complémentaires réalisées *in vitro* et *in vivo*, utilisant l'acarbose (AcB), connu et commercialisé comme agent antidiabétique inhibiteur d'  $\alpha$ -glucosidases, a été utilisé comme témoin positif.

les tests *in vitro*, consistent à l'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits de *O. angustissima* sur l'activité de l'  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidases en utilisant l'  $\alpha$ -amylase pancréatique porcine, proche structurellement et cinétiquement de l'  $\alpha$ -amylase humaine [Brayer et al., 1995], et d'un extrait brut de l'épithélium intestinal de rat comme source de l'  $\alpha$ -glucosidases. Cet extrait est un mélange complexe de multiples  $\alpha$ -glucosidases présentes dans la bordure en brosse de l'épithélium intestinale de rat. L'acarbose et d'autres molécules telles que la catéchine (CT) et l'acide gallique (AG) sont utilisés comme molécules de référence et qui sont testées dans les mêmes conditions expérimentales.

A la lumière des résultats obtenus (*in vitro*), il semble bien que les extraits de *O. angustissima* étudiés contiennent des substances capables d'inhiber, à divers degrés, l'  $\alpha$ -amylase et les  $\alpha$ -glucosidases (de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal) ralentissant ainsi la digestion des sucres alimentaires (polysaccharides, oligosaccharides et disaccharides) et l'absorption du glucose, principale produit, et par conséquent l'hyperglycémie.

Cette activité inhibitrice est toujours relativement faible comparativement à l'acarbose. En effet, les extraits préparés à partir de la partie aérienne de *O. angustissima* et ayant fait l'objet de cette étude, sont des extraits bruts (primaires et secondaires) contiennent de multitude de composés de structures chimiques différentes dont les composés actifs, dilués dans ce mélange complexe.

Les extraits de *O. angustissima* montrent une activité inhibitrice beaucoup plus importante (2 fois plus actifs) vis-à-vis des  $\alpha$ -glucosidases ( $IC_{50}$  environ 1 mg/ml) qu'avec l'  $\alpha$ -amylase ( $IC_{50}$  varie de 2 à 3 mg/ml). Certains auteurs suggèrent qu'une action inhibitrice plus forte vis-à-vis de l'  $\alpha$ -glucosidase que l'  $\alpha$ -amylase serait encore plus intéressante comme thérapie complémentaire

contre l'hyperglycémie postprandiale avec moins d'effets secondaires. En effet, une inhibition excessive de l'  $\alpha$ -amylase seule favoriserait la fermentation bactérienne dans le colon des sucres non digérés et provoquant par conséquent la flatulence, météorisme, distension abdominale [Kwon et al., 2006].

Par ailleurs, l'analyse des corrélations (activité inhibitrice-taux de polyphénols et de flavonoïdes) montre des corrélations relativement faibles à modérées ce qui laisse suggérer que les composés actifs potentiels sont de nature autres que les composés phénoliques à qui nous avons accordé un intérêt particulier dans cette étude.

Selon les données bibliographiques, parmi les plantes étudiées et montrant une activité inhibitrice  $\alpha$ -glucosidasique figurent 47 espèces appartenant à 29 familles dont les Fabacées, Crassulacées, Hippocrateacées, Lamiacées et les Myrtacées. *Salacia reticulata* (Hippocrateacées) et *Morus alba* (Moracées) sont parmi les plus efficaces. Benalla et al., (2010) rapportent dans leur revue de plantes médicinales étudiées pour leur activité inhibitrice  $\alpha$ -glucosidasique que les composés naturels qui ont une forte activité inhibitrice sont : les acides phénoliques (l'acide chlorogénique, betulinique, syringique, vanillique, oleanolique corosolique, ellagique), les alcaloïdes, stilbénoloïdes triterpènes, phytostérol, myoinositol, flavonoïdes, anthraquinones, anthrones, xanthones et d'autres.

L'Extrait éthanolique de la plante entière de *Centella asiatica* à 20 mg/ml exercent un effet anti-hyperglycémiant en inhibant l'action des enzymes intestinales disaccharidase et  $\alpha$ -amylase ce qui est confirmé via la technique des six segments de l'intestin de rat, où la digestion de saccharose (2,5 g/kg p.c) et l'absorption de glucose sont complètement inhibées tout au long de l'intestin grêle [Kabir et al., 2014 (b)].

Naquvi et al., (2011) citent quelques plantes médicinales appartenant à la famille des Fabaceae et douées d'activité inhibitrice de l'  $\alpha$ -glucosidase, telles que *Cassia fistula*, *Glycyrrhiza glabra* et *Trigonella foenum graecum*. D'autres études rapportent aussi que *Trigonella foenumgraecum* L. (Fabaceae) inhibe les enzymes digestives [Riyad et al, 1988 ; Zia et al, 2001 ; Nathiya et al., 2014].

EL-Abhar et Schaalán, (2014) ont montré que le Pycnogenol isolé à partir de *Pinus pinaster* (pin maritime) et les graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L., Fabaceae) empêchent l'activité des glucosidases intestinales chez les rats diabétiques.

Plusieurs études ont montré que les polyphénols des plantes réagissent comme un bon inhibiteur de beaucoup d'enzymes essentiels de nombreuses voies métaboliques (les enzymes digestives l' -amylase et l' -glucosidase) liées au diabète 2 [Jung et al., 2006 ; Rubilar et al., 2011 ; Adefegha et Oboh, 2012]. Ces composés phénoliques doués d'effets pharmacologiques, constituent la base scientifique de l'utilisation thérapeutique traditionnelle des plantes médicinales en médecine traditionnelle [N'Guessan et al., 2009].

Les flavonoïdes tel que : lutéoline, myricétine et quercétine sont de potentiels inhibiteurs de l' -glucosidase [Tadera et al., 2006]. Chez le rat, le theaflavin-3-O-gallate diminue significativement le taux de glucose sanguin en supprimant la production de glucose à partir de maltose à travers l'inhibition de l' -glucosidase intestinale (la maltase) [Matsui et al., 2007].

D'autres études rapportent que le kaempférol (flavonol) aglycone et glycosides exerce une inhibition significative de l'activité des disaccharidases. Selon l'étude de Pereira et al., (2011), la kaempferitrine à différentes concentrations induit une inhibition significative de l'activité de la maltase et sucrase duodénales *in vitro*. Un autre kaempférol glycoside, kaempferol-3-O-rutinoside, induit un potentiel effet inhibiteur vis-à-vis l' -glucosidase *in vitro*. Il était 8 fois plus puissant que l'acarbose, le kaempférol non glycosylé montre un effet synergétique en présence de l'acarbose [Habtemariam, 2011 ; Villers et Fougere, 2013]. Le kaempférol aglycone inhibe l'activité de la maltase du duodénum de rat *in vitro*, aucun effet sur l'activité de la sucrase et lactase au concentrations testées [Pereira et al., 2011]. Dans une autre étude Matsui et al., (2002) montre que ce composé inhibe à la fois les deux enzymes maltase et sucrase *in vitro*. Par ailleurs, l'étude de Wang et al. (2010) montre que le kaempférol isolé des feuilles de goyave (guava, Myrtacées), inhibe fortement les -glucosidases intestinales de rat (sucrase et maltase) et -amylase.

D'autres flavonoïdes étaient testés pour leurs effets inhibiteurs de l'activité de l' -glucosidase et -amylase. Tadera et al., (2006) ont testé 6 groupes de flavonoïdes sur l'activité de l' -glucosidase intestinale et l' -amylase porcine, parmi ces flavonoïdes figurent les anthocyanidines, isoflavones et flavonols qui ont inhibé fortement l' -glucosidase de levure avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> inférieur à 15µM, tandis que l' -glucosidase intestinale de rat était légèrement inhibée par des anthocyanidines et isoflavone. Kim et al., 2000 ont montré que le flavonol lutéoline, cependant inhibe 36% d' -glucosidase à une concentration de 0,5 mg/ml et son effet était plus puissant que l'acarbose. Ces deux groupes de chercheurs ont montré aussi que les flavonoïdes tel que lutéoline, myricétine et quercétine inhibent l' -amylase [Tadera et al.,

**2006 ; Kim et al., 2000**]. Chez les rats, theaflavin-3-O-gallate diminue significativement le taux de glucose sanguin en supprimant la production de glucose à partir de maltose à travers l'inhibition de l'  $\alpha$ -glucosidase intestinale [**Matsui et al., 2007**].

**Williamson, (2013)** a trouvé que les flavonols, flavine-ester-gallate, acide 5-caffeolquic et proanthocyanidines inhibent l'  $\alpha$ -amylase. Les produits d'oxydation des anthocyanidines et catéchine comme la théaflavine et théasensensus inhibent la maltase et sucrase, alors que la lactase est inhibée par la catéchine du thé. **Lo Piparo et al., (2008) et Williamson, (2013)** ont remarqué que l'inhibition de l'activité de ces enzymes augmente considérablement en fonction de l'augmentation de nombre d'hydroxyles liés au cycle B des flavonoïdes, leur effet est lié à leurs structures. Ces composés inhibent l'  $\alpha$ -glucosidase et l'  $\alpha$ -amylase par la formation de liaison hydrogènes entre ses groupements hydroxyles et les résidus du site de fixation (actif) de cette enzyme [**Sales et al., 2012 ; Villers et Fougere, 2013 ; Unnikrishnan et al., 2014**]. Cela est cohérent avec le mécanisme d'action de l'acarbose qui agit en mimant le substrat des  $\alpha$ -glucosidases [**Brownlee, 2005 ; Sales et al, 2012**].

# **Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique de *Ononis angustissima in vivo***

## **Introduction**

## Introduction

Le test de tolérance oral aux sucres mesure la capacité du corps à utiliser un type de sucre, généralement le glucose (TTOG). C'est un test de grande utilité, dont l'avantage est l'utilisation d'un sucre du plasma, en l'occurrence le glucose, d'un sujet à jeun comme essai pratique et déterminant pour simplifier et faciliter le diagnostic du diabète sucré. [Ernsberger et Koletsky., 2012 ; Ijeh et al. 2013 ; Chen et al., 2015].

Expérimentalement, le principe du TTOG appliqué au rat de laboratoire, est de déterminer les capacités de cet animal à normaliser sa glycémie lors de l'administration de glucose. Ceci définit donc sa tolérance au glucose. Cette procédure met en jeu essentiellement : la sécrétion de l'insuline, la production hépatique de glucose, l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et la stimulation du système nerveux autonome. Elle sert notamment à mesurer l'efficacité thérapeutique d'une molécule (médicament) ou de substances contenues dans un extrait végétal par exemple, sur l'état d'hyperglycémie. D'autres types de sucres (amidon, maltose, et saccharose) peuvent être utilisés pour provoquer cette hyperglycémie. Par ailleurs, leur administration par voie orale est privilégiée car plus naturelle, impliquant l'ensemble des mécanismes régulateurs physiologiques agissant sur l'homéostasie glucidique chez un organisme vivant [Ernsberger et Koletsky., 2012 ; Ijeh et al. 2013 ; Chen et al., 2015].

Cette partie d'étude concerne la recherche de l'activité antidiabétique des extraits de *Ononis angustissima in vivo*, leur effet anti hyperglycémiant est évalué chez le rat, soumis à l'hyperglycémie provoquée par voie orale par les différents sucres simulant un état postprandial pour confirmer l'effet des extraits de cette plante sur la digestion de l'amidon par  $\alpha$ -amylase, le saccharose et le maltose par les  $\alpha$ -glucosidases (saccharase et maltase). L'utilisation du glucose dans les mêmes conditions que celles des autres sucres exclue l'action des enzymes digestives. En plus son utilisation par coadministration permet de tester l'effet de ces extraits sur l'absorption intestinale de glucose.

**Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique  
de *Ononis angustissima in vivo***

**Matériel et Méthodes**

## 2. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de *Ononis angustissima* : effet sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par différents sucres chez le rat

### 2.1 Animaux

Cette étude a porté sur des rats albinos (*Rattus norvegicus*) de variété *Wistar*, mâles et femelles adultes, non diabétiques, âgés de 2 à 3 mois ayant un poids corporel de 150 à 230 g. Les rats ont accès libre à l'eau et à la nourriture de type EL ALF (glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse 2,5%, cellulose brute 3,9%, cendres (matière minérale) 4,9%, humidité 14%, CMV (complexe minérale vitaminé) 1,7%). L'eau et l'aliment leur sont fournis et renouvelés quotidiennement à l'exception du jour de l'expérimentation où les rats sont soumis à un jeun de 18 heures environ, avec accès libre à l'eau.

### 2.2 Répartition des rats en groupes et lots

Cent quatre-vingt rats adulte mâles et femelles ont été utilisés, répartis en 4 groupes de rats. Chaque groupe reçoit par voie orale un type de sucre afin de provoquer l'hyperglycémie. Ils sont répartis comme suit :

Groupe A reçoit l'amidon (A) ;

Groupe B reçoit le saccharose (S) ;

Groupe C reçoit le maltose (M) ;

Groupe D reçoit le glucose (G1) (glucose administré 30 min après l'administration orale de l'échantillon) ;

Groupe F reçoit le glucose (G2) (glucose et échantillon co-administrés) ;

Chaque groupe renferme 9 lots de rat dont 5 rats par lot. Les rats de chaque lot sont traités par les extraits de *O. angustissima*, la catéchine, acide gallique (échantillon), l'acarbose ou sérum physiologique (témoin). Ces solutions sont administrées par voie orale (gavage intragastrique à l'aide d'une sonde), à la dose de 50mg/kg.pc, 30 min avant l'administration de la solution d'un sucre : amidon (3 g/kg p.c) saccharose, maltose et glucose (2 g/kg p.c), à l'exception du groupe F le glucose et l'échantillon sont administré simultanément (co-administration). Ces deux derniers groupes (D et F) sont des témoins négatifs, excluant tout effet sur les enzymes digestives, permettant d'examiner les autres effets potentiels des échantillons testés sur l'hyperglycémie dont l'effet sur l'absorption intestinale de glucose. La répartition des lots de rats expérimentaux et témoins est indiquée dans le **tableau n°16**.

**Tableau n°16** : Répartition des lots de rats expérimentaux et témoins utilisés pour l'évaluation de l'effet des extraits de *Ononis angustissima* sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale.

	Lots	Solutions administrées	Doses administrées (50 mg/kg p.c.)	Effectifs
<b>Groupe *</b> <b>A : amidon</b> <b>B : saccharose</b> <b>C : maltose</b> <b>D : glucose1</b> <b>F : glucose2</b>	<b>Témoins (NT)</b>	NaCl 0,9 %	5 ml/kg p.c	5
	<b>Contrôle positif</b>	AcB	50	5
		AqFT	50	5
		AqFl	50	5
	<b>Expérimentaux</b>	EMFT	50	5
		n-BFT	50	5
		AcFT	50	5
		CT	50	5
		AG	50	5

AqFT : Extrait aqueux de tiges et de feuilles ; AqFl : Extrait aqueux de fleurs ; EMFT : Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles ; AcFT : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles ; n-BFT : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles ; CT : catéchine ; AG : Acide Gallique ; AcB : Acarbose ; \* : selon le type de sucre administré par voie orale ; glucose2 : coadministré.

### 2.3 Prélèvement sanguin et mesure de la glycémie

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de l'extrémité caudale des rats. Une goutte de sang est déposée sur une bandelette réactive et la glycémie est immédiatement mesurée au glucomètre (Accu-check, Roche) .

La glycémie a été mesurée au temps  $t_0$  (glycémie basale :  $G_0$ ), juste avant l'administration de l'extrait de la plante ou les molécules de référence, ensuite à 30 min suivie immédiatement par l'administration orale de la solution du sucre. D'autres mesure sont effectuées à 60, 120 et 180 min (glycémie au temps  $t$  :  $G_t$ ).

### 2.4 Expression des résultats

La teneur en glucose du sang total est exprimée en mg/dL et les variations de la glycémie sont exprimées en pourcentage par rapport à la glycémie basale et calculée comme suit :

Pourcentage de variation de la glycémie (%) =  $(G_t - G_0) \times 100 / G_0$ .

$G_0$  : glycémie basale (temps = 0 min).

$G_t$  : glycémie à temps  $t$ .

A partir de la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps : glycémie=f(t), la charge glycémique a été calculé en utilisant la surface sous la courbe : "area under the curve" (AUC), selon la formule suivante (règle des trapèzes), incrémentée (surface au-dessus de G<sub>0</sub>) et exprimée en g/L/h.

$$\text{AUC}_{0-180\text{min}} = 1/2 \text{ G}_{30} \times 0,5 + 1/2 (\text{ G}_{60} + \text{ G}_{30}) \times 0,5 + 1/2 (\text{ G}_{120} + \text{ G}_{60}) \times 1 + 1/2 (\text{ G}_{180} + \text{ G}_{120}) \times 1$$

## 2.5 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de valeurs moyennes accompagnées de l'erreur standard à la moyenne : m±ES.

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

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

**L'écart type (†)**  $\dagger_x = \sqrt{V_x}$

**L'erreur standard de la moyenne (ES)**  $\text{ES} = \frac{\dagger}{\sqrt{n}}$

### Test de Student

La signification statistique des différences observées entre les valeurs moyennes de la glycémie obtenues pour chaque lot d'animaux comparé au lot témoin a été évaluée par test de Student (t<sub>e</sub>). Pour comparer les moyennes des deux échantillons indépendants, on applique le test de Student à un degré de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon.

$$t_e = \frac{(m_1 - m_2)}{\sqrt{\dagger^2 \left[ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

La valeur de « t<sub>e</sub> » donne le degré de signification « P » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

Peu significative (\*) : P < 0,05.

Significative (\*\*) : P < 0,01.

Très significative (\*\*\*) : P < 0,001.

Hautement significative (\*\*\*\*) : P < 0,0001.

**Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique  
de *Ononis angustissima in vivo*  
Résultats et interprétation**

## 2. Etude de l'activité antidiabétique des extraits de *Ononis angustissima* : effet sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par différents sucres chez le rat

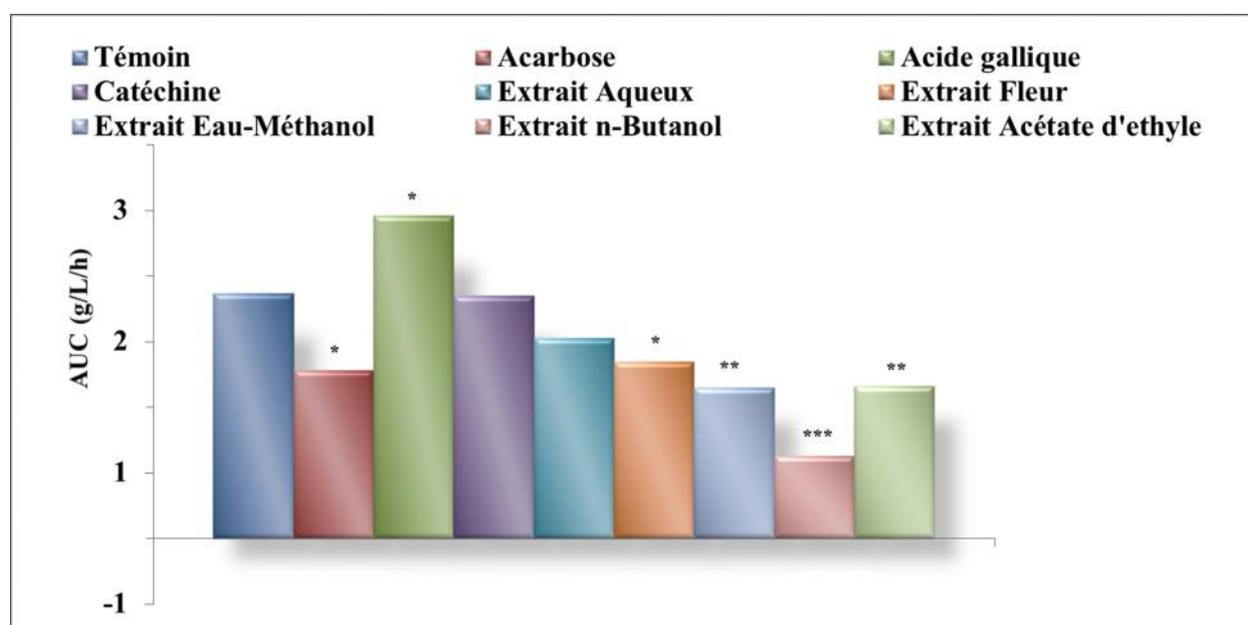
L'évolution de la glycémie chez les rats normaux a été suivie à court terme durant les 3 premières heures (0, 30, 60, 120, et 180 minutes) qui suivent l'administration orale de 50 mg/kg p.c des différents extraits de *Ononis angustissima* : AqFT, AqFl, EMFT, n-BFT et AcFT. Les rats contrôles sont traités par CT, AG et AcB (50 mg/kg p.c). L'hyperglycémie étant provoquée par les sucres : amidon, saccharose, maltose et glucose.

Les résultats de la variation de la glycémie postprandiale mesurée après l'administration des différents sucres avec ou sans les extraits de *O. angustissima*, CT, AG ou AcB, sont représentés sous forme de AUC (surface sous la courbe) dans le **tableau n°17**. Le calcul de l'AUC<sub>0-180 min</sub> permet la mesure de la cinétique d'évolution de la glycémie durant les trois heures qui suivent l'administration des différents sucres en présence et en absence des échantillons testés. Elle reflète aussi la charge glycémique (lorsqu'elle est rapportée à la quantité de sucre ingéré AUC /g sucre). C'est un effet global qui tient compte à la fois de l'amplitude et la durée de la glycémie. Elle constitue donc une bonne base de comparaison pratique des effets des extraits de *O. angustissima* sur l'hyperglycémie postprandiale entre les groupes de rats témoins et groupes de rats expérimentaux. L'évaluation de l'effet des extraits de *O. angustissima* sur l'hyperglycémie postprandiale utilisant l'AUC<sub>0-180 min</sub> est représenté dans les **figures 7, 8, 9, 10 et 11**.

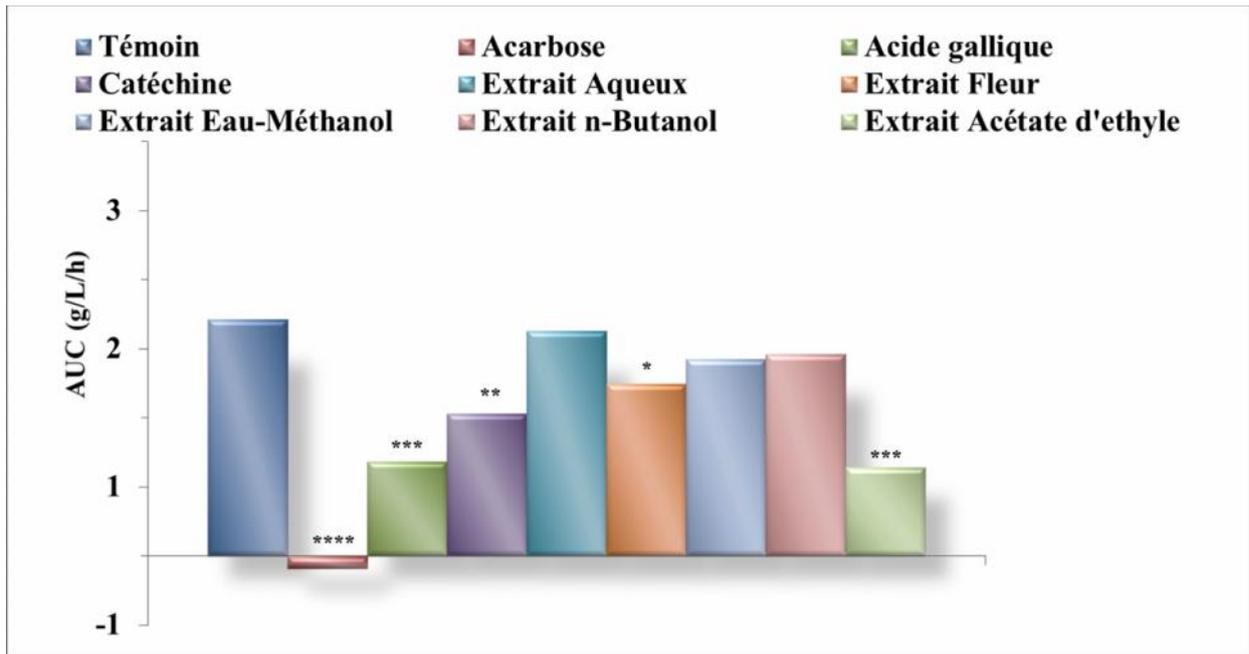
**Tableau n°17** : Valeurs de l'AUC<sub>0-180 min</sub>, surface sous la courbe de l'évolution de la glycémie postprandiale durant 3h et le pourcentage de variation de la glycémie, après un test de tolérance oral aux sucres en présence et en absence d'extraits de *O. angustissima* chez le rat.

Groupes de rats	AUC (g/L/ h) (pourcentage de variation de la glycémie %)				
	TTOA	TTOS	TTOM	TTOG1	TTOG2
Témoin	1,87±0,04	1,71±0,04	2,07±0,04	1,64±0,04	1,12±0,05
AcB	1,28±0,05 (-31,43)	-0,09±0,03 (-105,26)	1,41±0,04 (-31,95)	1,15±0,05 (-29,88)	0,19±0,05 (-83,04)
AqFT	1,53±0,08 (-18,18)	1,63±0,03 (-04,81)	2,06±0,05 (-00,29)	1,22±0,05 (-25,61)	0,40±0,06 (-64,29)
AqFl	1,35±0,07 (-27,93)	1,25±0,07 (-27,33)	2,01±0,03 (-02,88)	1,03±0,05 (-37,20)	0,87±0,04 (-22,32)
EMFT	1,15±0,05 (-38,58)	1,42±0,09 (-16,89)	2,21±0,04 (+06,96)	1,18±0,06 (-28,05)	0,39±0,05 (-65,18)
n-BFT	0,63±0,05 (-66,24)	1,46±0,04 (-14,61)	1,57±0,05 (-24,04)	1,55±0,04 (-05,49)	0,91±0,05 (-18,75)
AcFT	1,16±0,03 (-37,99)	0,64±0,06 (-62,72)	2,55±0,09 (+23,26)	1,35±0,03 (-17,68)	0,82±0,09 (-26,79)
CT	1,85±0,06 (-1,02)	1,03±0,03 (-39,99)	1,28±0,05 (-38,11)	1,47±0,04 (-10,37)	-0,15±0,05 (-113,39)
AG	2,46±0,07 (+31,78)	0,69±0,04 (-60,01)	1,08±0,05 (-47,76)	1,61±0,06 (-03,29)	0,66±0,05 (-41,07)

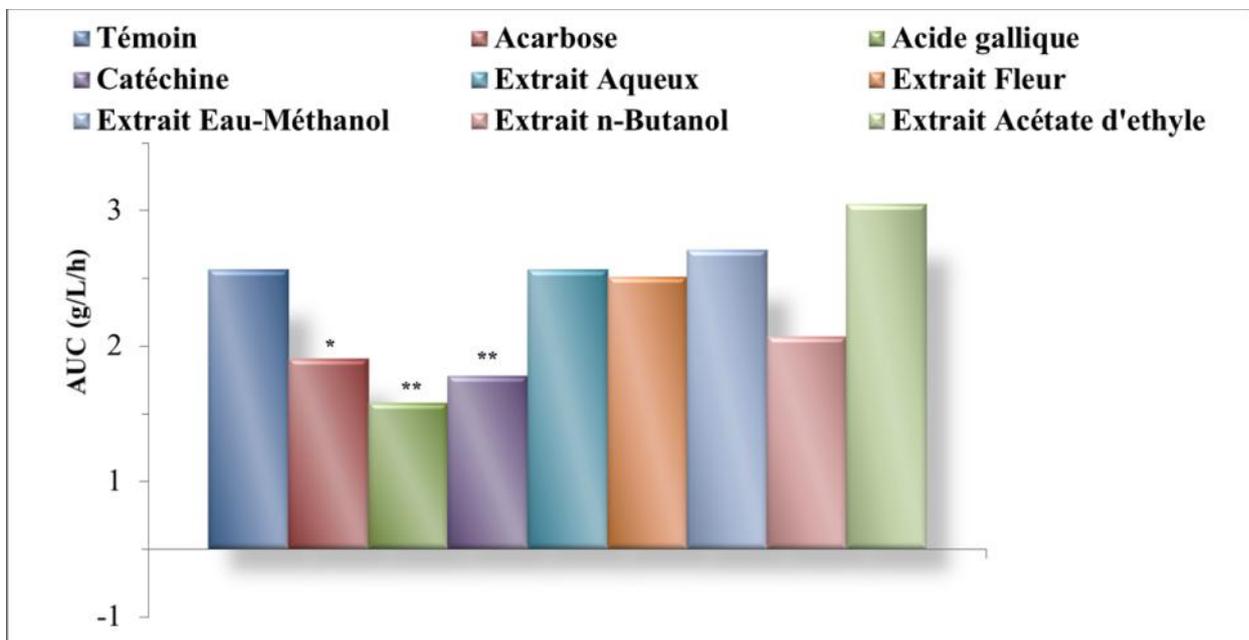
**TTOA** : test de tolérance oral à l'amidon, au saccharose (**TTOS**), au maltose (**TTOM**) au glucose (**TTOG1**) et au glucose co-administré (**TTOG2**). **AqFT** : Extrait aqueux de tiges et de feuilles. **AqFl** : Extrait aqueux de fleurs. **EMFT** Extrait eau-méthanol de tiges et de feuilles. **AcFT** : Extrait acétate d'éthyle de tiges et de feuilles. **n-BFT** : Extrait n-butanol de tiges et de feuilles. **CT** : catéchine (molécule de contrôle). **AG** : l'acide gallique (molécule de contrôle). **AcB** : l'acarbose (témoin positif). Valeur moyenne de 5 rats ± erreur standard (ES).



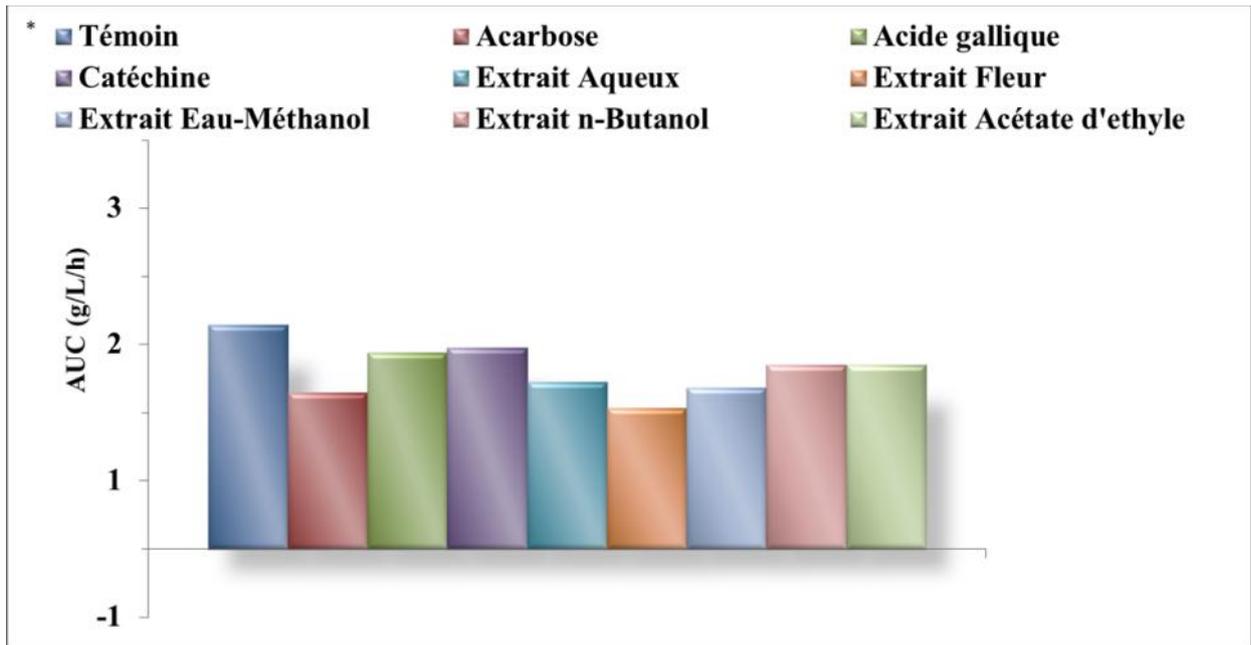
**Figure 7** : Valeurs de l'AUC<sub>0-180 min</sub>, surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral à l'amidon et traités par les extraits de *O. angustissima* ou par les molécules de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.



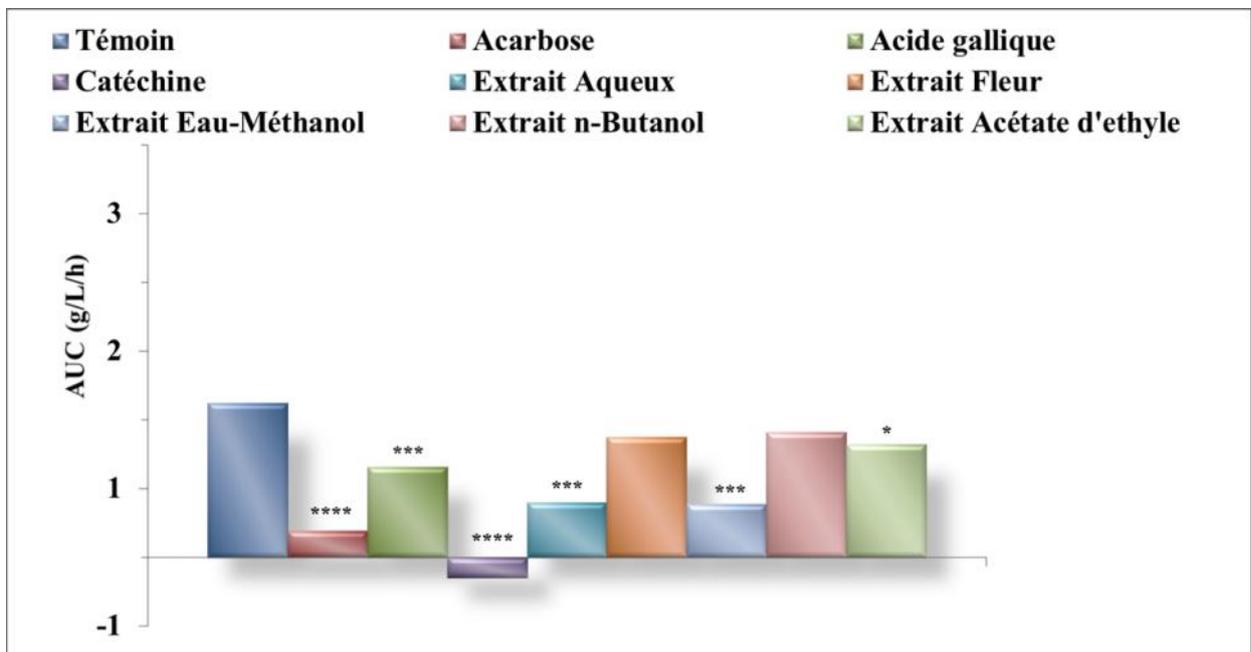
**Figure 8 :** Valeurs de l'AUC<sub>0-180 min</sub>, surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral au saccharose et traités par les extraits de *O. angustissima* ou par les molécules de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.



**Figure 9 :** Valeurs de l'AUC<sub>0-180 min</sub>, surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux ayant été soumis à un test de tolérance oral au maltose et traités par les extraits de *O. angustissima* ou par les molécules de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.



**Figure 10 :** Valeurs de l'AUC<sub>0-180 min</sub>, surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral au glucose et traités par les extraits de *O. angustissima* ou par les molécules de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.



**Figure 11 :** Valeurs de l'AUC<sub>0-180 min</sub>, surface sous la courbe d'évolution de la glycémie en fonction du temps, chez les rats normaux soumis à un test de tolérance oral au glucose (co-administration) et traités par les extraits de *O. angustissima* ou par les molécule de référence (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c.

### **2.1 L'hyperglycémie provoquée par l'amidon (TTOA)**

Lorsque l'amidon est utilisé pour provoquer l'hyperglycémie chez les rats, il donne une charge glycémique importante avec une surface de 1,87 g/L/h. Par contre, la présence des extraits de *O. angustissima* n-BFT, EMFT, AcFT ou l'acarbose AcB à 50 mg/kg p.c provoque une diminution de la charge glycémique à divers degré de signification avec des taux de 66,24 ( $p < 0.001$ ) ; 38,58 ( $p < 0.01$ ) ; 37,97 ( $p < 0.01$ ) et 31,43 ( $p < 0.05$ ) %, respectivement. Alors que l'AG provoque une augmentation peu significative ( $p < 0,05$ ) de l'hyperglycémie (31,78 %).

### **2.2 L'hyperglycémie provoquée par le saccharose (TTOS)**

L'aire sous courbe (AUC) chez les rats témoins est de 1,71 g/L/h, l'administration des différents extraits de *O. angustissima*, CT, AG ou AcB provoque une diminution importante de cette valeur. L'AcB inhibe significativement l'hyperglycémie ( $p < 0,0001$ ) avec un pourcentage de réduction de 105,26 %. Ainsi l'extrait AcFT, AG et CT réduisent significativement l'hyperglycémie avec des taux de 62,72 ( $p < 0.001$ ) ; 60,01 ( $p < 0.001$ ) et 39,99 ( $p < 0.01$ ) %, respectivement.

### **2.3 L'hyperglycémie provoquée par le maltose (TTOM)**

Lorsque le maltose est utilisé pour provoquer l'hyperglycémie chez les rats, il donne une charge glycémique importante avec une AUC de 2,07 g/L/h. L'AcB à 50 mg/kg p.c provoque une diminution significative de l'hyperglycémie ( $p < 0,05$ ) avec un pourcentage de réduction de 31,95 %. Par contre, la présence de l'AG la CT et l'extrait n-BFT à 50 mg/kg p.c provoque une diminution significative de la charge glycémique avec des taux de 47,76 ( $p < 0,05$ ) ; 38,11 ( $p < 0,05$ ) et 24,04 % respectivement. En revanche, les extraits AcFT et EMFT à 50 mg/kg p.c provoquent une augmentation non significative de l'hyperglycémie (23,19 et 6,76 % respectivement).

### **2.4 L'hyperglycémie provoquée par le glucose (TTOG1)**

L'aire sous courbe (AUC) chez les rats témoins traités par les extraits (ou molécule de référence) 30 min avant l'administration du glucose est de 1,64 g/L/h. L'administration des différents extraits de *O. angustissima*, CT, AG ou AcB provoque une faible diminution de cette valeur. L'AqFl inhibe l'hyperglycémie avec un pourcentage de réduction de 37,20 %. Ainsi l'AcB, l'extrait AqFT et l'extrait EMFT provoquent une réduction de 29,88 ; 28,05 et 25,61 % respectivement.

## 2.5 L'hyperglycémie provoquée par le glucose (TTOG2 co-administration)

Lorsque le glucose est administré simultanément avec les extraits ou les molécules de référence l'aire sous courbe (AUC) chez les rats témoins est de 1,12 g/L/h. La co-administration des différents extraits de *O. angustissima*, CT, AG ou AcB avec le glucose provoque une réduction significative de la glycémie comparativement à leurs administration 30 min avant le glucose. La catéchine et l'AcB inhibent significativement l'hyperglycémie ( $p < 0,0001$ ) avec un pourcentage de réduction de 113,39 et 83,04 % respectivement, alors que l'acide gallique atteint 41,07% de réduction. Les extraits EMFT, AqFT et AcFT réduisent la charge glycémique à divers degré de signification avec des taux -65,18 ( $p < 0,001$ ) ; -64,29 ( $p < 0,001$ ) et -26,79 ( $p < 0,001$ ) %.

**Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique  
de *Ononis angustissima in vivo***

**Discussion**

La démarche expérimentale adoptée dans ce travail pour l'étude de l'activité antidiabétique de *O. angustissima in vivo* consiste à l'évaluation de l'effet de ses extraits sur l'hyperglycémie postprandiale chez des rats Wistar, auxquels est administrée par gavage intragastrique une solution de sucres (amidon, saccharose, maltose ou glucose). L'acarbose (témoin positif), catéchine et l'acide gallique sont également testés dans les mêmes conditions expérimentales.

L'effet antidiabétique est recherché chez des rats normaux recevant les extraits de *O. angustissima* (AqFT, AqFl, EMFT, n-BFT et AcFT), le sérum physiologique ou la CT, AG ou AcB par voie orale, Ces rats sont suivis à court terme durant les trois premières heures (0, 30, 60, 120, et 180 min) qui suivent l'administration orale de 50 mg/kg p.c de l'échantillon. Chez les animaux d'expérimentation, nous avons évalué l'effet des extraits de cette plante sur les variations de la glycémie et la tolérance orale au glucose.

Cette étude montre que le prétraitement des rats avec les extraits de *O. angustissima* réduit l'HGPP après la charge orale avec l'amidon, saccharose, maltose ou glucose. Cet effet réducteur de l'HGPP est observé particulièrement dans le cas de l'extrait n-BFT réduisant significativement l'hyperglycémie induite par l'amidon (66,24%), l'extrait AcFT sur l'hyperglycémie induite par le saccharose (62,72%) et l'extrait n-BFT sur l'hyperglycémie induite par le maltose (24,04 %). Par ailleurs, lorsque l'hyperglycémie est provoquée par le glucose, excluant ainsi l'action inhibitrice sur les  $\alpha$ -glucosidases par les extraits, seul l'extrait AqFl suivi de EMFT et AqFT exercent un effet inhibiteur sur l'hyperglycémie mais de manière non significative.

Les principaux résultats obtenus ont révélé que l'ensemble des extraits de *O. angustissima* montrent un effet antihyperglycémiant variable. L'augmentation de la glycémie induite par les différents sucres (amidon, saccharose et maltose) peut être atténuée spécifiquement par l'un ou l'autre des différents extraits de *O. angustissima* à 50 mg/kg p.c. Ce qui laisse supposer que cette action inhibitrice d'  $\alpha$ -glucosidases serait en relation avec la composition chimique propre à chaque extrait et pourrait être attribuée à leur teneur spécifique en métabolites secondaires.

L'analyse phytochimique de ces extraits montre qu'ils sont caractérisés par leur richesse en polyphénols et flavonoïdes inhibant de manière significative l'hyperglycémie provoquée par voie orale chez les rats normaux. Ce qui laisse supposer que les extraits agissent sur l'hyperglycémie postprandiale et qu'ils inhiberaient l'activité des  $\alpha$ -glucosidases et retardent la digestion des

sucres dans l'intestin grêle réduisant ainsi le taux de glucose sanguin après une charge orale aux sucres.

En utilisant le glucose seul pour provoquer l'hyperglycémie, aucune action significative des extraits sur cette hyperglycémie. Ça nous permet de conclure que l'action des extraits est localisée principalement au niveau de l'intestin par l'inhibition des enzymes hydrolytiques des sucres. Dans le cas du TTOG2, le glucose est administré simultanément avec les extraits. L'état d'hyperglycémie provoquée se trouve réduite significativement, par la CT, l'AcB et l'AG (113,39 ; 83,04 et 41,07 %, respectivement), et par les extraits EMFT, AqFT et AcFT (64,29 ; 65,18 et 26,79%), comparativement aux extraits ou molécules de référence administrés 30 min avant le glucose.

Ces résultats nous laissent suggérer que les constituants actifs de ces extraits ou les molécules de référence (AcB, CT et AG) interfèrent avec les transporteurs intestinaux de glucose (SGLT1 et GLUT) et réduisent ainsi son absorption et par conséquent l'hyperglycémie.

Les travaux de **Hirsh et al., (1997)**, ont pu montrer que l'acarbose outre son rôle d'inhibiteur -glucosidasique réduit aussi significativement le taux de glucose absorbé similairement à la phlorizine (inhibiteur spécifique des SGLT1) au niveau du jéjunum. Il limite spécifiquement l'entrée du glucose à travers la membrane des cellules de la bordure en brosse des entérocytes, mais n'agit pas directement sur les transporteurs SGLT1.

De nombreux auteurs, sur la base des connaissances ethnobotaniques à travers le monde se sont intéressés aux plantes médicinales ayant un effet inhibiteur de la digestion des sucres dans le tube digestif comme mécanisme d'action potentiel de leur effet antidiabétique.

**Kwon et al., (2006)**, ont étudié des plantes appartenant à la famille des Lamiaceae universellement connus pour leur vertus médicinales, aromatiques ou condimentaires telle que le romarin (*Romarinus officinalis*), la mélisse (*Melissa officinalis*), la sauge (*Salvia officinalis*), la menthe chocolatée (*Mentha piperata*) et l'origan (*Origanum vulgare*) vis-à-vis de leur propriétés inhibitrice de l' -amylase et -glucosidase. Ces auteurs ont pu observer que la plupart extraits aqueux de ces plantes possèdent une forte activité inhibitrice d' -glucosidase. Cette activité est corrélée à leur teneur en composés phénoliques et aussi à la nature de leur phytoconstituants. En effet, la catéchine possède l'activité inhibitrice de l' -glucosidase la plus élevée (99,6% à la concentration de 1 mg/mL (pH ajusté à 6,5-7,5) suivie de l'acide cafféique (91,6%), l'acide

romarinique (85,1%), le resveratrol (71,1%), catechol (64,4%), acide protocatéchique (55,7%) et la quercitine (36,9%).

Ces auteurs concluent que cet effet est attribuable à la richesse de ces plantes de la famille des Lamiaceae en substances actives. Leur action inhibitrice plus forte vis-à-vis de l'  $\alpha$ -glucosidase que l'  $\alpha$ -amylase serait encore plus intéressante comme thérapie complémentaire contre l'hyperglycémie postprandiale avec moins d'effets secondaires. En effet, une inhibition excessive de l'  $\alpha$ -amylase seule favoriserait la fermentation bactérienne dans le colon des sucres non digérés et provoquant par conséquent la flatulence, météorisme, distension abdominale.

**Sudha et al., (2011)** ont étudié l'activité des plantes utilisées dans la médecine ayurvédique Indienne. Sur 126 extraits appartenant aux 17 plantes seulement 3 extraits isopropanolique présentent une inhibition vis-à-vis de l'  $\alpha$ -amylase porcine à divers degrés (de 10 à 60,5%). Parmi les plus importantes figurent *Ocimum tenuiflorum* (Lamiaceae) avec  $IC_{50}$  de 8,9  $\mu$ g/ml suivie de *Linum usitatissimum* (Linaceae) (graines de lin) ( $IC_{50}$  de 540  $\mu$ g/ml) et *Morus alba* (Moraceae) ( $IC_{50}$  =1440  $\mu$ g/ml) comparativement à l'acarbose (contrôle positif) ( $IC_{50}$  =10,2  $\mu$ g/ml). L'analyse phytochimique de ces extraits isopropanoliques de *O. tenuiflorum* révèle la présence d'alcaloïdes, tannins et flavonoïdes tandis que l'extrait de *L. usitatissimum* contient des alcaloïdes, stéroïdes, saponines et glycosides cardiaques. L'extrait de *M. alba* contient des tannins, saponines, flavonoïdes et glycosides cardiaques.

**Ramírez et al., (2012)**, ont examiné l'effet inhibiteur d'  $\alpha$ -glucosidases des extraits hydro-ethanolique de 23 plantes médicinales utilisées en Amérique centrale (Mexique) pour le traitement du diabète sucré. Ces extraits ont été testés sur les  $\alpha$ -glucosidases obtenus à partir de la muqueuse intestinale de rat. Les résultats montrent que *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (le thé), *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P. H. Raven (Onagraceae) et *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. Ex Hemsl. (Asteraceae), présentent l'activité la plus élevée avec des  $IC_{50}$  de 299  $\mu$ g/mL, 202  $\mu$ g/mL et 509  $\mu$ g/mL respectivement. Leurs composés majoritaires sont des cathéchines, flavonoles, flavones, des dérivés de cafféoyl.

**El-Abhar et Schaalán, (2014)**, dans leur revue rapportent une compilation de plantes médicinales dont leurs composés actifs (inhibiteurs d'  $\alpha$ -glucosidases) ont été identifiés. Parmi ces plantes figurent : *Adathoda vasica* (Acanthaceae) (noix de Malabar) contenant la vasicine et vasicinol puissants inhibiteurs de la sucrase. L'andrographolide (déterpénoïde) de *Andrographie*

*paniculata* (Acanthaceae) inhibe  $\alpha$ -amylase porcine *in vitro*, avec un  $IC_{50} = 11,3 \mu\text{g/mL}$  et *in vivo* chez les rats diabétiques.

**Bechiri et al., (2015)**, ont évalué l'activité antidiabétique des extraits aqueux de 13 plantes utilisées dans la médecine traditionnelle Algérienne et préparés selon la méthode traditionnelle. Ces extraits étaient investigués pour leur effet antidiabétique vis-à-vis des enzymes glycolytiques digestives ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase) *in vitro* et *in vivo* chez le rat soumis à une hyperglycémie post prandiale induite par l'amidon ou le glucose. Parmi les plantes étudiées figurent *Phylleria angustifolia* et *Micromeria inodora*, elles inhibent l' $\alpha$ -amylase, avec des  $IC_{50}$  de 0,61 ; 0,66 mg/mL respectivement. Alors que *Salvia officinalis* et *P angustifolia* inhibent fortement l' $\alpha$ -glucosidase avec des  $IC_{50}$  de 10,14 ; 35,48 $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Chez les rats soumis à un TTOA, les extraits aqueux de *P angustifolia*, *Ajuga iva*, *S officinalis* à une dose de 250mg/kg p.c et l'acarbose à 50 mg/kg p.c provoquent une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la charge glycémique avec des taux de l'ordre de 58,66 , 56,00 , 48,22 , 34,14 respectivement. Chez les rats soumis à un TTOG, l'extrait de *A. iva* à une dose de 250mg/kg p.c et le glibenclamide à une dose de 10mg/kg p.c inhibent l'hyperglycémie significativement avec des pourcentages de réduction de la charge glycémique de 86% et 82% par rapport aux témoins.

De nombreux travaux de recherche se sont intéressés aux propriétés des Fabacées et tentaient d'élucider leur mécanisme d'action et effet hypoglycémiant *in vitro* et *in vivo*.

L'extrait aqueux des graines de *Mucuna pruriens* induit une hypoglycémie chez les rats normaux et rats diabétiques. L'extrait aqueux, éthanolique et hexanique de *Pterocarpus santalinus* L. testés sur des rats normaux et diabétiques induisent un effet hypoglycémiant. L'activité antihyperglycémiant et hypoglycémiant de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Pterocarpus santalinus* (Fabaceae) à la dose de 250 mg/kg p.c était plus efficace comparé au glibenclamide. Cette activité est due au composé active (-)-épicatechine -sitostérol et lupéol [**Pandeya et al., 2010**].

L'extrait aqueux de *Retama raetam* à la dose de 20 mg/kg réduit significativement ( $P < 0,005$ ) la glycémie lorsqu'il est administré oralement chez les rat normaux. Cet effet est accentué chez les rats diabétiques ( $P < 0,001$ ) [**Pandeya et al., 2010**]. D'après **Algandaby et al., (2010)** les fruits *Retama raetam* utilisés en médecine traditionnelle en Arabie Saoudite pour le traitement du diabète. Son étude avait comme objet d'évaluer le potentiel et le mécanisme de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique de cette plante chez des rats rendus diabétique par

streptozotocine. Ils ont pu montrer que l'extrait méthanolique de *R. raetam* administré oralement à la dose de 250 et 500 mg/kg p.c/jour pendant quatre semaines diminue significativement le taux de glucose sanguin à courte (30 et 60 minutes après la charge orale) et à longue durée (la première et la troisième semaine du traitement). En outre, l'administration de cet extrait à 500 mg/kg/jour pendant quatre semaines successives augmente significativement la sécrétion de l'insuline.

Par ailleurs, les grains de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L., Fabaceae) inhibent les -glucosidases intestinales chez les rats diabétiques (ration alimentaire supplémentée de 20% de fenugrec) et possèdent en outre un effet inhibiteur sur les enzymes de la voie de néoglucogénèse contribuant ainsi à réduire l'hyperglycémie de ces animaux diabétiques [El-Abhar et Schaalán, 2014].

L'étude de Tasnuva et al., (2012) a évalué l'activité antihyperglycémique de l'extrait méthanolique des tiges de *Mimosa pigra* (Fabaceae) à travers le test de tolérance oral au glucose. Les résultats ont montré que l'administration oral de cet extrait à 50, 100, 200 et 400 mg/kg p.c induit une réduction significative dose dépendante de la glycémie à des taux de réduction de : 37,84 ; 39,83 ; 42,39 et 50,50% respectivement. Le glibenclamide, à 10 mg/kg p.c réduit la glycémie de 56,33%, activité antihyperglycémique comparable à celle de l'extrait de *Mimosa pigra* à 400 mg/kg p.c.

En définitif, de nombreux auteurs s'accordent à dire que les produits naturels issus de différentes sources : végétaux supérieurs, plantes médicinales, condimentaires, microorganismes, algues, contiennent des substances actives susceptibles d'agir au niveau de tube digestif en inhibant la digestion des sucres alimentaires et l'absorption du glucose. Ils seraient un moyen efficace de lutter contre l'HGPP et la survenue du diabète et ses complications d'une manière non invasive et sans interférer dans le processus physiopathologique de la maladie.

Ces substances appartiennent aux différentes classes de métabolites secondaires telles que les : alcaloïdes, composés phénoliques, phytostérols, anthraquinones, anthrones, glycosides, terpenoïdes, gomme galactomannanes, polysaccharides, glycopeptides peptidoglycanes, guanidine etc... [Sales et al., 2012 ; Benalla et al., 2010].

Ces résultats de l'étude de l'activité antidiabétique de *ononis angustissima* réalisés *in vitro* et *in vivo*, nous laissent suggérer que l'un des mécanismes d'action potentiel sur l'hyperglycémie exercé par les extraits testés, serait donc l'inhibition des enzymes digestives hydrolysant les glucides, ralentissant ainsi l'absorption du glucose produit au niveau de l'intestin et réduisant l'excursion glycémique postprandiale en conséquence.

**Chapitre III : Effet des extraits de *Ononis angustissima* sur le transport intestinal du glucose  
*in vitro* et *in situ***

**Introduction**

## Introduction

Le co-transporteur  $\text{Na}^+$ -glucose est une protéine de transport clé responsable de l'absorption d'ion sodium ( $\text{Na}^+$ ) couplé au glucose au niveau de la lumière intestinale et leur réabsorption au niveau du tubule contourné proximal du néphron [Sibernagls et Despopoulos, 2001 ; Wright et al., 2003 ; Lieberman et Marks, 2009; Goodman, 2010 ; Gorboulev et al., 2012].

A l'origine, c'est **Robert K. Crane** le premier à avoir décrit le modèle cellulaire de l'absorption du  $\text{Na}^+$  et glucose et introduira l'hypothèse d'un mécanisme de co-transport couplé, en 1960. Depuis plus de 50 ans après, cette hypothèse fut mainte fois validée et confirmée par de nombreux travaux. En 1987, Wright et al réussirent à cloner le co-transporteur à partir de l'intestin de lapin, cette protéine clonée fut appelée SGLT1 (sodium glucose co-transporteur 1), engendrée et produite par le gène SLC5A [Wright et Turk, 2004]. Le modèle classique de l'absorption du glucose par les cellules épithéliales de l'intestin grêle développé à partir du modèle initiale de Crane est montré dans la **figure 12**.

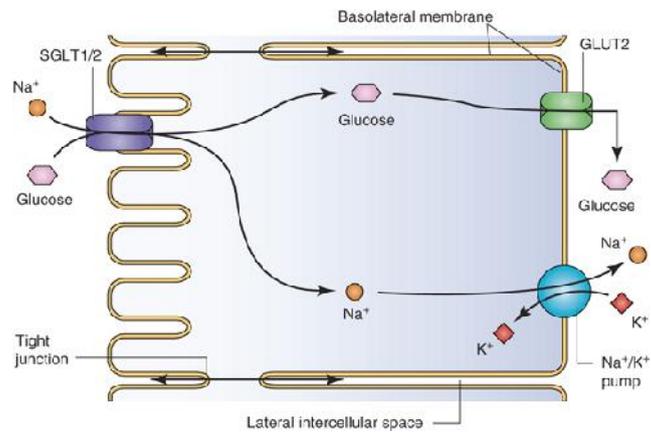
L'entrée du glucose se fait à partir de la membrane apicale des cellules épithéliales de la bordure en brosse renfermant les SGLT1. C'est un transport actif secondaire, car l'énergie nécessaire provient du gradient électrochimique des ions  $\text{Na}^+$  aboutissant à une accumulation de glucose à l'intérieur de la cellule au-delà de sa concentration d'équilibre. Le gradient électrochimique des ions  $\text{Na}^+$  est généré et entretenu par la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  présente au niveau de la membrane basolatérale. L'échange de  $3\text{Na}^+$  contre  $2\text{K}^+$  consomme de l'énergie fournie par l'ATP. Le glucose quitte ensuite ces cellules à travers la membrane basolatérale grâce aux GLUT2, protéines de transport facilité transportant aussi le galactose et le fructose (GLUT5). Ce transport est dépendant uniquement du gradient de concentration de sucres à travers la membrane basolatérale des cellules épithéliales (**figure 12**) [Sibernagls et Despopoulos, 2001 ; Scheepers et al., 2004 ; Lieberman et Marks, 2009].

L'une des retombées thérapeutique importante de cette découverte est son application dans le traitement des déshydratations, suite aux pertes d'eau excessives par le corps (diarrhée du nourrisson en particulier), par les sels de réhydratations orales contenant à la fois du chlorure de sodium (2,6 g/L) et du glucose (13,5 g/L).

La phlorizine est une substance naturelle de structure glucosidique dont l'aglycone, la phlorétine, est une dihydrochalcone . Elle est découverte dès 1835 dans l'écorce de racine du pommier (*Malus sp.*, *Rosaceae*), isolée ensuite dans d'autres organes (feuilles) de pommiers,

ainsi que dans d'autres espèces de *Rosaceae* et dans des *Symplocaceae*. Elle fût reproduite par synthèse en 1942. Elle est utilisée depuis cette époque pour le traitement de la fièvre, les infections et la malaria. il a été observé également qu'une dose élevée de ce traitement provoque une glycosurie par suite d'un blocage de la réabsorption du glucose au niveau du rein. Son administration chronique provoque plusieurs symptômes similaires à ceux observés chez un diabétique (polyurie, glucosurie et perte de poids). Son mécanisme d'action, fût élucidé à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle avec la découverte des cotransporteurs. Elle est reconnue en tant que inhibiteur de transporteur de glucose via sa structure, c'est un analogue aux molécules fixées sur ces transporteurs, faisant intervenir une inhibition compétitive du SGLT1 (intestinale) et SGLT2 (rénal).

Non utilisée en thérapeutique, la phlorizine a constitué, pendant de nombreuses années, un outil de premier choix pour l'étude de la physiologie rénale et diabétique (création d'un modèle expérimental de diabète animal en 1900). Toutefois, la phlorizine n'a pu continuer un traitement contre le diabète pour diverses raisons. Cette substance n'est que faiblement absorbé par l'intestin grêle et inhibe les deux types SGLT (1 et 2) d'une part et d'autre part, elle est hydrolysable par les enzymes du tube digestif (lactase) en phloretine, très peu absorbable (moins biodisponible) et potentiellement toxique. La connaissance de la structure et du mécanisme d'action de la phlorizine a été à l'origine de la conception et la synthèse d'une nouvelle classe d'antidiabétiques oraux, les inhibiteurs spécifiques du SGLT2 (gliflozine), dont plusieurs représentants (dapagliflozine, canagliflozine, ipragliflozine, empagliflozine...) sont actuellement utilisés en thérapeutique ou en cours d'évaluation clinique. Ce qui offre une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement du diabète tout en normalisant le taux de glucose postprandiale et à jeun et en traitant l'insulinorésistance [Ehrenkranz et al., 2005 ; White et Pharm, 2010 ; Kilov et al 2013 ; Blaschek, 2017]. Actuellement, la recherche d'un effet inhibiteur combiné intéressant de SGLT1 et SGLT2, ainsi la combinaison de sotagliflozine à l'insuline pour le traitement du diabète type1 [Blaschek, 2017].



**Figure 12** : Modèle Cellulaire du cotransporteur  $\text{Na}^+$ -glucose. SGLT1/2 : cotransporteur  $\text{Na}^+$ -glucose ; GLUT2 : transporteur de glucose [Bakris et al., 2009].

Cette partie d'étude concerne l'évaluation de l'effet des différents extraits de la partie aérienne de *Ononis angustissima* : AqFl, AqFT, EMFT, AcFT, n-BFT sur l'absorption intestinale du glucose au niveau de l'intestin grêle de rat, elle consiste en :

- L'évaluation de l'effet de ces extraits sur l'absorption intestinale du glucose *in vitro* en utilisant la technique de sac d'intestin.
- L'évaluation de leur effet sur l'absorption intestinale du glucose chez le rat *in situ*, par perfusion de l'intestin de rat vivant anesthésié.

**Chapitre III : Effet des extraits de *Ononis angustissima* sur le transport intestinal du glucose  
*in vitro* et *in situ***

**Matériel et Méthodes**

## Matériel et méthodes

### 1. Evaluation de l'effet des extraits de *O. angustissima* sur le transport intestinal du glucose *in vitro* (sacs d'intestin)

Cette étude a pour but d'évaluer l'effet des différents extraits de la partie aérienne de *Ononis angustissima* : AqFI, AqFT, EMFT, AcFT, n-BFT sur l'absorption intestinal du glucose au niveau de l'intestin grêle de rat, *in vitro*. La catéchine (CT) et l'acide gallique (AG) (Sigma-Aldrich) sont utilisés comme molécules de référence dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons utilisé la technique de sac d'intestin. Cette dernière est basée sur le principe qui consiste à introduire de petits volumes d'échantillons à tester (extraits ou molécules de référence) additionnés au glucose dans des fragments d'intestin confectionnés en sacs ou boudins scellés des deux bouts, puis placés dans une solution d'incubation sans glucose et sans échantillon. L'absorption du glucose commence permettant au glucose de passer à travers la paroi intestinale du côté muqueux (intérieur du sac) vers le côté séreux (extérieur du sac). Ainsi la quantité de glucose absorbé peut être mesurée dans le milieu d'incubation extérieur.

#### 1.1 Solutions

- Solutions d'extraits de *O. angustissima* : aqueux de feuilles (AqFI), aqueux de fleurs (AqFT), eau-méthanol (EMFT), acétate (AcFT) et n-butanol (n-BFT), préparés à la concentration de 40mg/ml dans de l'eau distillée à l'exception de l'extrait EMFT et AcFT auxquels est rajouté DMSO à 1%.

- Solutions de catéchine et d'acide gallique préparées à la concentration de 40mg/ml dans de l'eau distillée.

- Solution d'incubation composée de :

Solution I : 12,975g de NaCl et 4,765g de Hepese (Acide N-tris (hydroxyméthyl) pipérazine N-Z éthane sulfonique) dissout dans 500 ml d'eau distillée.

Solution II: 4,032g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,745g de KCl et 0,4065 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O solubilisés dans 500 ml d'eau distillée.

Solution III: 0,294g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O dissout dans 500 ml d'eau distillée.

Solution d'incubation est préparée en mélangeant les trois solutions I, II et III à volume égale. Le pH du mélange est ajusté à 7,4 puis cette solution est gazée avec de l'oxygène pendant 1 minute. L'albumine à 0,1% est ajoutée sous agitation lente.

La solution à introduire dans le sac d'intestin (coté muqueux SM) a la même composition que celle de la solution d'incubation (coté séreux SS) mais contient en plus le D-glucose et l'échantillon. Ce dernier est remplacé par l'eau distillée pour le témoin, aux proportions suivantes : 3 volumes solution d'incubation (avec glucose) + 1 volume échantillon à tester (extraits, CT et AG) à 40mg/ml ou H<sub>2</sub>O. Le glucose est utilisé à différentes concentration : 0,5 ; 1 ou 2M.

## 1.2 Mode opératoire

Cette technique réalisée selon **Wilson et Wiseman (1954)** et modifiée par **Ghadyale et al., 2012 et Hamilton et Grant Butt (2013)**, a été effectuée comme suit :

2 rats à jeun (24 h environ) sont sacrifiés après dislocation cervicale, puis l'intestin grêle est récupéré après une laparotomie : 10cm après pylores (élimination du duodénum) sur une longueur de 80cm (jéjunum). Le fragment d'intestin grêle récupéré est lavé avec du sérum physiologique froid, sa lumière est nettoyée à l'aide d'une sonde de gavage afin d'éliminer d'éventuelles restes de chyme alimentaire, ensuite découpé en plusieurs segments (5 à 6 segments) de 5cm de long environ.

La confection des sacs d'intestin nécessite de nouer une extrémité de chaque fragments à l'aide d'un fil puis introduire 300 µl de solution (SM). L'autre extrémité est fermée à son tour par un autre nœud. Les sacs ainsi préparés sont introduits chacun dans une fiole contenant 12ml de solution d'incubation (SS dépourvue de glucose et d'échantillon). 25µl du milieu d'incubation des sacs d'intestin est prélevé (0 min). Ensuite les fioles son incubées dans un incubateur-agitateur (80 cycles/min) à 37°C pendant 30min. Au cours de l'incubation, des prélèvements de 25µl du milieu d'incubation des sacs d'intestin (milieu extérieur) sont réalisé à : 10, 20 et 30min. A la fin d'incubation (30min), 20µl du milieu intérieur des sacs d'intestin (coté muqueux) est prélevée. Ces prélèvements servent à la détermination de la concentration du glucose par la méthode enzymatique glucose oxydase GOD-POD (kit Spinreact). Les résultats sont exprimés en pourcentage de glucose absorbé ou transporté du coté muqueux (intérieur du sac) vers le coté séreux (extérieur du sac). Il est calculé par différence entre la quantité de glucose au début de l'expérience et celle du moment de prélèvement.

## **2. Evaluation de l'effet des extraits de *O. angustissima* sur le transport intestinal du glucose *in situ***

Cette partie d'étude a pour but d'évaluer l'effet des extraits de cette plante sur l'absorption intestinale du glucose chez le rat *in situ*. La catéchine (CT) et l'acide gallique (AG) (Sigma-Aldrich) sont utilisés comme molécules de référence dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons utilisé la technique de perfusion, Cette dernière est basée sur le principe qui consiste à introduire un volume d'échantillons à tester (extraits ou molécules de référence) additionnés au glucose dans le côté gastrique de l'intestin (duodénum) de rat vivant et inconscient utilisant une pompe péristaltique à vitesse réglable. L'absorption du glucose commence permettant au glucose de passer à travers la paroi intestinale du côté muqueux vers le côté séreux. Le perfusât recueilli de l'iléon (côté caecum) chaque 10 minutes durant 30 minutes permet de calculer la quantité de glucose absorbé. Sa concentration est déterminée par la méthode enzymatique glucose oxydase GOD-POD (kit Spinreact),

### **2.1 Solutions**

- Solution d'extraits de *O. angustissima* : aqueux de feuilles (AqFl), aqueux de fleurs (AqFT), eau-méthanol (EMFT), acétate (AcFT) et n-butanol (n-BFT), préparés à la concentration de 40mg/ml dans de l'eau distillée à l'exception de l'extrait EMFT et AcFT auxquels est rajouté DMSO à 1%.

- Solutions de catéchine et d'acide gallique préparées à la concentration de 40mg/ml dans de l'eau distillée.

- La solution à introduire dans l'intestin composée de :

Solution I : 12,975g de NaCl et 4,765g de Hepese (Acide N-tris (hydroxyméthyl) pipérazine N-Z éthane sulfonique) dissouts dans 500 ml d'eau distillée.

Solution II: cette dernière est préparée en solubilisant 4,032g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,745g de KCl et 0,4065 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O dans 500 ml d'eau distillée.

Solution III: 0,294g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O solubilisés dans 500 ml d'eau distillée.

La solution à introduire dans l'intestin est préparée en mélangeant les trois solutions I, II et III à volume égale. Le pH du mélange est ajusté à 7.4 puis gazée avec de l'oxygène pendant 1minute. L'albumine à 0,1% est ajoutée sous agitation lente. Ensuite le D-glucose et l'échantillon sont ajoutés aux proportions suivantes : 3 volumes solution d'incubation (avec

glucose) + 1 volume échantillon à tester (extraits, CT et AG) à 40mg/ml ou H<sub>2</sub>O. Pour le témoin l'échantillon est remplacé par l'eau distillée. Le glucose est utilisé à 2M.

## 2.2 Mode opératoire

L'absorption du glucose au niveau de l'intestin grêle est évaluée *in situ* selon la méthode de **Doluisio et al., (1969)** avec de légères modifications

Au préalable, des rats Wistar mâles et femelles ayant un poids de 220 à 380g, destinés à expérimentation, sont soumis à un jeun de 24 heures environ avec accès libre à l'eau.

On procède comme suit :

Le rat est anesthésié par le chloral hydraté (8%, 1 ml/kg p.c), puis placé sur une table de dissection thermique pour une incision abdominale médiane verticale permettant l'accès à l'intestin grêle. Ses deux extrémités : le duodénum (coté gastrique) et l'iléon (coté caecum) sont repérées. Une petite incision est effectuée dans chaque extrémité et un cathéter y est placé. Ces extrémités communiquent avec l'extérieur à l'aide de deux canules adaptables aux cathéters de travail. L'intestin est d'abord nettoyé d'éventuels restes de chyme alimentaire, avec du sérum physiologique à 37°C, injecté dans sa lumière à l'aide d'une pompe péristaltique à vitesse réglable. Laissé sur place dans la cavité abdominale, l'intestin est manipulé avec prudence, il est couvert avec un coton imbibé de solution physiologique à 37°C pour éviter son dessèchement et la chute de température du rat. Une fois ce système est mis en place, la solution de perfusion est introduite avec un débit de 0,5ml/min utilisant la pompe péristaltique dont le premier prélèvement débute 10 minutes après la perfusion et le perfusât est recueilli chaque 10 minutes durant 30 minutes.

La concentration de glucose de chaque prélèvement est mesurée par la méthode enzymatique glucose oxydase GOD-POD (kit Spinreact) et les résultats de l'absorption du glucose sont exprimés en taux de glucose absorbé. Ce dernier est calculé par différence entre la quantité de glucose au début de l'expérience et celle du moment de prélèvement du perfusât.

**Chapitre III : Effet des extraits de *Ononis angustissima* sur le transport intestinal du glucose  
*in vitro* et *in situ***

**Résultats et interprétation**

## Résultats et interprétation

### 1. Effet des extraits de *O. angustissima* sur le transport intestinal du glucose *in vitro* (sacs d'intestin)

Selon les résultats préliminaires de tests réalisés sur des sacs d'intestin témoins contenant une solution d'incubation en présence de glucose aux concentrations de : 0,5 ; 1 ; et 2M, la concentration de glucose choisie est de 2M (360g/l). Elle est équivalente à la concentration utilisée dans le test de TTOG (2 g/kg p.c qui vaut 400g/l) d'une part et d'autre part pour assurer une concentration suffisante en glucose dans le milieu d'incubation.

Les extraits de la partie aérienne de *O. angustissima* et molécules de référence (CT, AG) exercent un effet inhibiteur variable sur l'absorption intestinale de glucose. Afin de déterminer l'effet de ces extraits et molécules de référence sur le transport de glucose à travers la paroi intestinale, nous avons effectué des prélèvements (coté serreux) à 10, 20 et 30 min durant l'incubation des sacs d'intestin. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous en quantité de glucose absorbé et en pourcentage d'inhibition de son absorption.

**Tableau n°18 :** Pourcentages du glucose libéré dans la solution d'incubation (SS) des sacs d'intestin incubés en présence ou en absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence (40mg/ml), durant 30 min d'incubation.

	Pourcentages de glucose absorbé <sup>a</sup>		
	(pourcentage d'inhibition de l'absorption intestinale %)		
	10 min	20 min	30 min
Témoin	16,62±0,04	41,72±0,29	72,42±0,25
	-	-	-
AqFT	9,77± 0,09 (41,19)	16,60±0,14 (60,20)	26,05±0,21 (64,03)
AqFI	5,63± 0,02 (66,13)	30,58±0,09 (26,71)	44,50±0,08 (38,60)
EMFT	14,88±0,15 (10,45)	30,99±0,28 (25,73)	46,14±0,20 (36,29)
n-BFT	10,97±0,09 (34,02)	10,14±0,32 (75,70)	23,54±0,37 (67,49)
AcFT	10,89±0,22 (34,45)	22,71±0,45 (45,56)	24,62±0,32 (66,00)
CT	10,27±0,10 (38,22)	11,78±0,13 (71,77)	19,46±0,19 (73,13)
AG	09,48±0,10 (42,95)	18,27±0,16 (56,21)	23,41±0,16 (67,67)

a : Pourcentages de glucose absorbé par les sacs d'intestin et libéré dans la solution d'incubation (SS) exprimé en %.

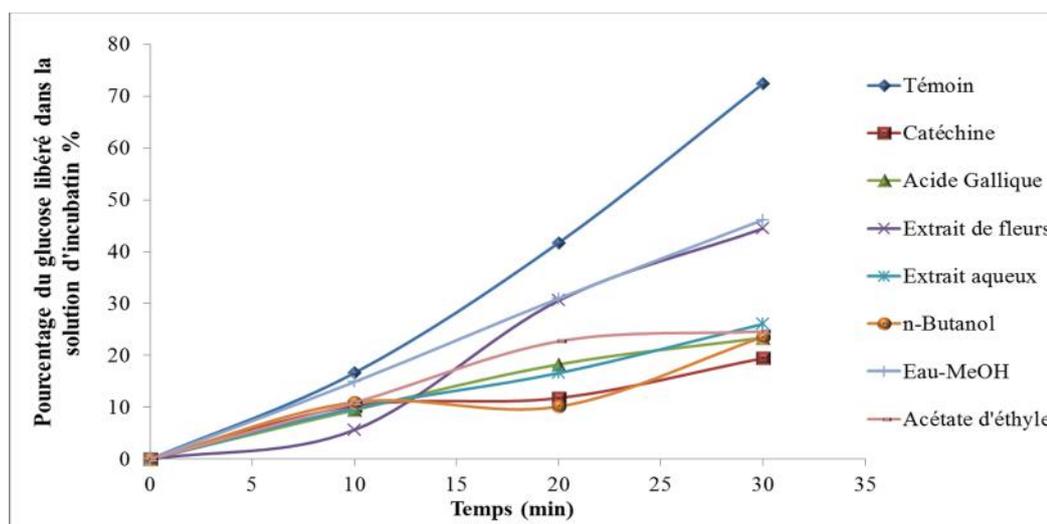
Les résultats relatifs à l'absorption du glucose par la muqueuse intestinale en présence ou en absence d'extraits de *O. angustissima* dans la solution d'incubation (ou transport du glucose du coté muqueux vers le coté séreux), sont présentés dans le **tableau n°18** et **figure 13**.

Le profil d'évolution de l'absorption de glucose chez le témoin (condition normale) a l'allure d'une courbe sigmoïde qui se traduit par une augmentation ou progression graduelle de la quantité de glucose absorbé au cours du temps. La présence de l'échantillon à tester (extrait, CT, AG) à la concentration de 40 mg/ml ralentit cette absorption à divers degrés.

Nous constatons que le glucose présent à la concentration de 2M dans la solution SM à l'intérieur du sac d'intestin (coté muqueux) est absorbé progressivement durant 30 min d'incubation et passe dans la solution d'incubation SS (coté séreux), atteignant un taux d'absorption de 72,42% dans les sacs d'intestins témoins contenant le glucose seul.

La présence d'extraits ou de molécules de référence (à 40 mg/ml) dans la solution SM (à l'intérieur du sac d'intestin) entraîne une réduction de l'absorption du glucose dans le côté luminal. L'effet inhibiteur de transport de glucose le plus important est produit par la catéchine dont le taux d'inhibition est de 73,13% suivie de l'acide gallique (67,67%), puis des extraits n-BFT (67,49%), AcFT (66,00%) et AqFT (64,03%), respectivement.

Ces résultats nous montrent que la majorité des extraits aqueux et organiques de la partie aérienne de *O. angustissima* et molécules de référence (CT et l'AG) exercent *in vitro*, à divers degrés, un effet inhibiteur sur l'absorption intestinale du glucose au niveau du sac d'intestin. Cet effet est probablement lié à leurs constituants chimiques qui interfèrent avec les transporteurs de glucose au niveau intestinal (SGLT1 et/ou GLUT).



**Figure 13 :** Pourcentages du glucose libéré dans la solution d'incubation des sacs d'intestin incubés en présence ou en absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence CT et AG (40mg/ml), durant 30 min d'incubation.

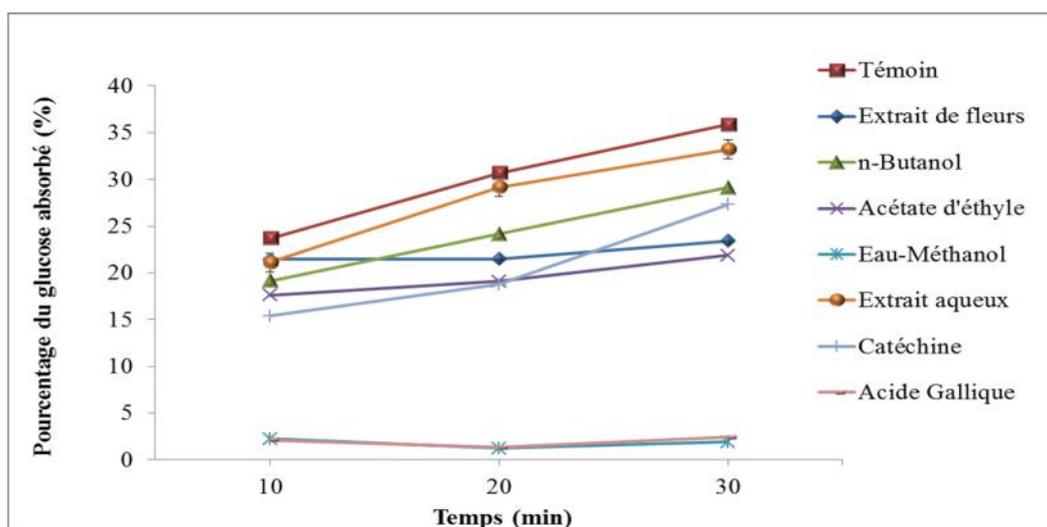
## 2. Effet des extraits de *O. angustissima* sur l'absorption intestinal du glucose *in situ*

Les extraits de *Ononis angustissima* et molécules de référence (CT et AG) exercent un effet inhibiteur variable sur l'absorption intestinale du glucose chez le rat, *in situ*. Afin de déterminer l'effet de ces extraits et contrôles sur le transport de glucose, nous avons effectué des prélèvements chaque 10 min pendant de 30 min. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 19** et **figure 14** où la quantité de glucose absorbée est exprimée en pourcentage (proportion de glucose absorbée par rapport à la quantité de glucose perfusée).

**Tableau n°19** : Pourcentages de glucose absorbé par l'intestin perfusé *in situ* et pourcentages d'inhibition de l'absorption intestinale en présence ou absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence (40 mg/ml), durant 30 min, chez le rat.

Pourcentages de glucose absorbé <sup>a</sup>			
(pourcentage d'inhibition de l'absorption intestinale %)			
	10 min	20 min	30 min
<b>Témoin</b>	23,70±0,03	30,68±0,05	35,87±0,02
	-	-	-
<b>AqFT</b>	21,10±0,03 (10,98)	29,16±0,02 (4,97)	33,21±0,02 (7,41)
<b>AqFl</b>	21,44±0,03 (9,54)	21,48±0,05 (30,00)	23,44±0,02 (34,65)
<b>EMFT</b>	2,23±0,03 (90,57)	1,22±0,02 (96,02)	1,92±0,03 (94,64)
<b>n-BFT</b>	19,13±0,02 (19,30)	24,15±0,04 (21,27)	29,11±0,02 (18,84)
<b>AcFT</b>	17,62±0,04 (25,65)	19,11±0,02 (37,71)	21,89±0,04 (38,97)
<b>CT</b>	15,70±0,03 (33,74)	19,06±0,04 (37,88)	27,59±0,04 (23,07)
<b>AG</b>	1,83±0,05 (92,27)	1,02±0,06 (96,68)	2,42±0,01 (93,25)

a : Pourcentages de glucose absorbé par les sacs d'intestin et libéré dans le coté séreux exprimé en %.



**Figure 14 :** Pourcentages de glucose absorbé par l'intestin perfusé *in situ* chez le rat en présence ou absence d'extraits de *O. angustissima* ou molécules de référence à 40 mg/ml, durant 30 min.

Les résultats obtenus au cours de cette étude, montrent que les extraits de *Ononis angustissima* et les contrôles perfusés dans l'intestin exercent, *in situ*, une inhibition de l'absorption intestinale du glucose. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition variant d'un extrait à un autre.

L'évolution de la quantité de glucose absorbé chez les rats normaux a été suivie à court terme durant 30 minutes de perfusion de 40 mg/ml de chacun des extraits de *O. angustissima* : AqFT, AqFI, EMFT, n-BFT et AcFT ou molécules de référence (CT et AG). La présence de l'échantillon à tester (extrait, CT, AG) à la concentration de 40 mg/ml réduit cette absorption à divers degrés. Le phénomène de l'absorption ne semble pas être altéré ni bloqué par la présence des échantillons mais seulement atténué. Cela montre que les propriétés fonctionnelles de l'intestin ne sont pas perturbées durant la perfusion.

Chez le témoin, le taux de glucose absorbé à travers l'intestin, perfusé durant 30 min par une solution contenant le glucose à la concentration de 2M atteint 35,87%.

L'ajout d'extraits ou de molécules de référence (à 40 mg/ml) à la solution de perfusion, semble influencer différemment l'absorption intestinale du glucose. En effet, l'extrait EMFT et l'AG provoquent une diminution hautement significative ( $p < 0,0001$ ) (pourcentage de réduction de l'ordre de 90%). Les extraits l'AcFT, AqFL provoquent aussi une diminution moins importante de 38,97 et 34,65 % respectivement. En revanche, l'absorption de glucose n'est que faiblement influencée par les extraits n-BFTet AqFT et la CT.

Ces résultats nous permettent de suggérer que l'effet inhibiteur de l'absorption intestinale de glucose au niveau de l'intestin grêle dépend de la composition des extraits de *O. angustissima* en métabolites secondaires et de leur nature chimique, susceptible d'interférer avec les transporteurs de glucose au niveau de l'épithélium intestinal.

**Chapitre III : Effet des extraits de *Ononis angustissima* sur le transport intestinal du glucose  
*in vitro* et *in situ***

**Discussion**

L'importance de l'intestin grêle comme premier organe qui introduit et fait passer les nutriments et médicaments au reste du corps fait que plusieurs systèmes expérimentaux ont été développés pour l'étude de la digestion et l'absorption à son niveau. Parmi ces systèmes, figure le système d'expression de gènes qui procure directement les informations sur la participation des transporteurs individuels ou enzymes, le système de segments membranaires intestinaux, cellules intestinales isolées, sacs d'intestin de rat et sacs d'intestin inversés de rat, perfusion *in situ*, chambre de Usiner, cellules CaCo 2/15 (lignée de l'adénocarcinome humaine ; cellules exprimant les caractéristiques fonctionnelles d'entérocytes différenciées. Elles expriment plusieurs type de transporteurs de glucose dont les GLUT2 et SGLT1) etc... [Acra et Ghishan, 1991 ; Mahraoui et al., 1994 ; Pang, 2003 ; Mohd Aftab Alam et al., 2011]. Leur domaine d'application comme modèle d'études précliniques est très large. Ils sont utilisés pour étudier l'absorption, la perméabilité, le transport, l'interaction de médicaments, excipients, nutriments, composés naturels etc... à travers la paroi intestinale et leurs effets avant leurs utilisation par l'homme [Lennernäs, 1998 ; Doherty et Pang, 2000 ; Cong et al., 2001 ; Kisielinski et al., 2002 ; Pang, 2003]. Plus d'intérêt s'est porté sur l'étude de l'absorption intestinale vis-à-vis le rôle crucial de transporteurs de glucose au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales (SGLT1) dans le cadre des recherches biomédicales en relation avec le diabète et l'obésité notamment [Gee et al., 2000; Chang et al., 2005 ; Wright et al., 2011].

L'étude de l'absorption intestinale du glucose *in situ* chez le rat de laboratoire, par perfusion est une méthode qui présente l'avantage de pouvoir assurer un renouvellement en continu du milieu intraluminal, et de favoriser ainsi la réalisation d'une interface perfusat-cellules absorbantes ayant une composition proche de celle du perfusat initial, d'une part et d'autre part permet le maintien des conditions physiologiques : l'irrigation mésentérique innervation, capacité métabolique, etc... Cette technique semble pertinente pour indiquer si le mécanisme d'absorption est passif ou réalisé par un transporteur. De ce fait, ce modèle expérimental est largement appliqué [Phan et Abdellah, 1980 ; Kuneš et al., 2005 (a) ; Kuneš et al., 2005 (b)].

L'absorption intestinale de glucose est un des facteurs qui augmente la glycémie. Le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale, à travers la digestion et/ou l'absorption des glucides, est important pour prévenir et traiter le diabète du type 2.

Les inhibiteurs oraux de SGLT (tel que le dapagliflozine) diminuent le taux de glucose sanguin en permettant son excrétion par urine. Une inhibition sélective de SGLT2 combinée à celle de SGLT1, est préférée dans la thérapie du diabète sucré [Ho et al., 2001].

Dans le cas du TTOG2 (le glucose est administré simultanément avec les extraits). L'état d'hyperglycémie provoquée se trouve réduite significativement, Les résultats des tests *in vitro*, *in vivo* (TTOG2) et *in situ* nous laissent suggérer que l'effet inhibiteur de l'absorption intestinale de glucose au niveau de l'intestin grêle dépend de la composition des extraits de *O. angustissima* en métabolites secondaires et de leur nature chimique, susceptible d'interférer avec les transporteurs de glucose au niveau de l'épithélium intestinal (SGLT1 et GLUT).

Les travaux de **Hirsh et al., (1997)**, ont pu montrer que l'acarbose outre son rôle d'inhibiteur -glucosidasique réduit aussi significativement le taux de glucose absorbé similairement à la phlorizine (inhibiteur spécifique des SGLT1) au niveau du jéjunum. Il limite spécifiquement l'entrée du glucose à travers la membrane des cellules de la bordure en brosse des entérocytes, mais n'agit pas directement sur les transporteurs SGLT1. **Veyhl et al., (1993)** et **Wright, (1993)** suggèrent auparavant qu'il existe une autre protéine exprimée sur la membrane d'entérocytes qui régule l'activité de ces transporteurs et l'effet inhibiteur de l'absorption du glucose par l'acarbose est exercé à travers une régulation par cette protéine ou par un système de second-messager qui phosphoryle un site du SGLT1. Il en est de même des travaux de **Ramaswamy et al., (1974)** et **Ugolev et al., (1986)** qui ont postulé qu'il existe une liaison entre SGLT1 et les disaccharidases à la surface des membranes d'entérocytes qui explique les effets exercés par l'acarbose sur l'absorption de glucose à ce niveau.

Des recherches scientifiques récentes montrent que différentes substances isolées à partir de plantes ont montré un important effet hypoglycémiant agissant comme inhibiteur de l'absorption intestinale du glucose réduisant ainsi les effets secondaires de traitement conventionnel [**Benalla et al., 2010**].

**Baldea et al., (2010)**, ont étudié des plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle utilisées dans le traitement du diabète par les populations autochtones de James Bay, une région du Québec (Canada) où l'incidence du diabète sucré est très élevée. Des extraits hydrométhanoliques brutes de 17 plantes ont été testés pour leurs propriétés inhibitrices de l'absorption intestinale du glucose, *in vitro*, utilisant les cellules CaCo 2/15 (lignée de cellules cancéreuses de l'adénocarcinome humaine, exprimant les transporteurs GLUT2 et SGLT1 similaires aux entérocytes différenciées) et le glucose marqué (<sup>3</sup>H-deoxyglucose) et *in vivo* utilisant le TTOG (par co-administration extrait-glucose) chez des rats normo-glycémiques.

Les résultats de cette étude montrent que les extraits de 13 plantes parmi les 17 testées provoquent une inhibition significative de la captation du glucose par les cellules CaCo 2/15 en

culture. Parmi ces 13 extraits, 7 montrent une action inhibitrice supérieure au témoin positif la phlorizine et la phlorétine (molécules standards). Certains de ces résultats sont confirmés par le TTOG chez le rat.

Beaucoup d'attention a été accordé aux plantes comestibles et condimentaires utilisées dans l'alimentation et dont les constituant sont susceptibles d'interférer avec l'absorption intestinale de glucose et réduire ainsi l'HGPP sans intervention médicamenteuse. Selon **Schulze et al., (2014)**, un extrait de pomme (*Malus domestica* Borkh. Rosaceae) contenant 12mg quercetine, 6mg acide chlorogénique et 16mg phlorizine par 100mg de matière sèche, en capsule de 2,8g de cet extrait, prise 30 min avant un test de tolérance orale au glucose par des hommes sains, réduit significativement leur glycémie postprandiale et augmente considérablement le taux de glucose sécrété par les urines. Cet extrait inhibe significativement les SGLT1 humaines et celles de souris. L'inhibition des SGLT1 par l'acide chlorogénique était non significatif alors que la quercetine et la phlorétine exercent une inhibition modérée ( $IC_{50}=0,6mM$  et  $0,3mM$ , respectivement) et plus forte par la phlorizine ( $IC_{50} = 0,5 \mu M$ ).

Par ailleurs, un extrait d'oignon (*Allium cepa* L.) contient la quercetine-4-O-glucoside, quercetine 3,4-O-diglucoside et quercetine (9,5 ; 5,4 et 5,4 mg, respectivement par 100mg matière sèche) comme flavonoïdes majoritaires. **Schulze et al., (2015)**, ont étudié leur effet sur l'inhibition de SGLT1 et GLUT2, ainsi leur effet antihyperglycémiant chez les souris et chez des volontaires humains. Les SGLT1 humains étaient inhibés réversiblement par l'extrait d'oignon ( $IC_{50} = 325 \mu g/mL$ ). La quercetine-4 O-glucoside exerce une forte inhibition ( $IC_{50} = 0,17 mM$ ), tandis que la quercetine montre une inhibition modérée ( $IC_{50} = 0,62 mM$ ) et la quercetine-3,4-glucoside ne montre aucune inhibition.

*Alstonia macrophylla* Wall. (Apocynaceae) contient deux alcaloïdes type picraline : 10-methoxy-N(1)-methylburnamine-17-O-veratrate et allstiphyllanine D, dont l'inhibition des SGLTn est importante à faible concentration. Les  $IC_{50}$  des SGLT1 sont ;  $4,0$  et  $5,0 \mu M$ , respectivement ; et des SGLT2  $0,5$  et  $2,0 \mu M$ , respectivement [**Arai et al., 2010**].

Plusieurs plantes appartenant aux Fabacées ont été étudiées pour leur effet sur l'absorption intestinale de glucose. *Pterocarpus marsupium* (Fabaceae) est une plante médicinale antidiabétique utilisée en médecine traditionnelle Indienne. L'extrait concentré de l'écorce et bois de cette plante est testé sur des patients diabétiques (type 2), 2 à 4 g/jour, il diminue la glycémie à jeun ( $\sim 30 mg/dL$ ), la glycémie postprandiale ( $\sim 45 mg/dL$ ) et l'hémoglobine A1c (0,4 %). Testé sur un modèle animal, cet extrait affecte l'absorption intestinale de glucose, améliore

la fonction des cellules et exerce un effet analogue à celui de l'insuline. Ses constituants bioactifs inclus l'épicatéchine (flavonoïde), marsupsine, ptérosupine et liqueritigénine [Manickam et al., 1997].

Les graines de fenugrec (*Trigonella foenumgraecum* L.), plante médicinale et culinaire très connue, sont traditionnellement utilisées pour stimuler l'appétit et pour le traitement de blessures, inflammation, la goutte, les désordres gastro-intestinaux et diabète. Parmi ses constituants bioactifs figurent les saponines (fenugreekine, diosgénine), alcaloïdes (trigonelline, gentianine et carpaine), coumarines, fibres de mucilage (glactomannane), acides nicotique, vitamines, minéraux et acides aminés. Des études cliniques ont montré que l'effet hypoglycémiant des graines de *Trigonella foenumgraecum* est dû en partie aux fibres de mucilage qui inhibent l'absorption intestinale du glucose. Testées sur des patients diabétiques (type 1 et 2), elles diminuent la glycémie à jeun de 30 %, la glycémie postprandiale de 20 à 25 % et l'hémoglobine A1c de 12 %. La consommation de 80 g/ jour de ces fibres augmente la captation et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques [Madar et al., 1988 ; Sharma et al., 1990 ; Sharma et al 1996 ; El-Abhar et Schalalan., 2014]. Des études antérieures ont démontré que *Trigonella foenumgraecum* L. (Fabaceae) (fibres et graines) interfère avec l'absorption intestinale par un mécanisme non encore déterminé [European Medicines Agency, 2010 ; El-Abhar et Schalalan., 2014].

L'étude de Eidi et al., (2007), montre l'effet ou le mécanisme d'action de quelques molécules responsables de l'activité hypoglycémiant des graines de *Trigonella foenumgraecum* telles que : 4-hydroxyisoleucine (un acide aminé non conventionnel) qui stimule la sécrétion d'insuline et améliore la tolérance orale au glucose chez les rats diabétiques. Les alcaloïdes inhibent l'absorption de glucose *in vitro*, tandis que la trigonelline et les saponines stéroïdiennes inhibent l'absorption de glucose *in vivo*.

L'étude de Algardaby et al., (2010), sur les sacs d'intestins a montré que l'extrait méthanolique de *Retama raetam* (Fabaceae) à 500 µg/ml inhibe significativement l'absorption de glucose à 30, 60 et 120 min avec des pourcentages de réduction de 7,9%, 17,8% et 36,4% respectivement par rapport au contrôle.

*R. raetam*, exerce son effet hypoglycémiant par différents mécanismes, les plus probables sont l'inhibition de la réabsorption de glucose rénale (SGLT2) et l'augmentation de son excrétion urinaire, stimulation de la captation de glucose par le muscle et tissu adipeux, correction de la résistance de l'insuline, l'inhibition de la production endogène de glucose ou

activation de glycogénogenèse dans le foie et le muscle. Cette plante est constituée essentiellement de flavonoïdes qui sont responsables de l'activité hypoglycémiant chez les rats normaux et diabétiques [**Pandeya et al., 2010**].

Les graines de *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub. (Fabaceae), utilisée en médecine traditionnelle en Asie pour le traitement du diabète, sont riches en gomme galactomannane, et est utilisées en industrie pharmaceutique car elles réduisent l'hyperglycémie postprandiale en inhibant l'absorption intestinale du glucose [**Gaikwad et al., 2014**].

Les travaux de **Harish et al., (2014)**, ont montré que les extraits aqueux des feuilles et écorce de *Butea monosperma* (Fabaceae) favorisent la captation de glucose par les cellules par rapport au contrôle. L'extrait d'écorce de *B. monosperma* inhibe significativement ( $p < 0,05$ ) le transport de glucose à travers la membrane des cellules de levures.

Les flavonoïdes peuvent inhiber les transporteurs SGLT1 des cellules humaines sans être transporté par ces SGLT1. Les plus puissants inhibiteurs de SGLT1 sont les O-glycosides avec un glucose attaché à la position 4 comme la luteolin-4-O-glucoside et la quercetin-4-O-glucoside ( $IC_{50} = 0,10$  et  $0,17$  mM, respectivement), mais aussi les C-glycoside comme l'apigenine-6-C-glucoside ( $IC_{50} = 0,55$ mM). Leur aglycone : luteoline, naringenine et quercetine montrent aussi une appréciable inhibition de SGLT1 ( $IC_{50} = 0,22$  ;  $0,53$  et  $0,62$  mM, respectivement) [**Kottra et Daniel, 2007**]. **Jorge et al., (2004)**, ont isolé le flavonoïde glycosilé, kaempferol-3,7-O- -1-dirhamnoside (Kaempferitrine) à partir des feuilles de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). L'effet hypoglycémiant à long terme de kaempferitrine chez des rats diabétiques revient à la contribution de kaempferitrine à inhiber le transport intestinale de glucose. Il stimule la captation de glucose efficacement comme l'insuline chez des rats normaux.

Deux dérivés de flavanone isolés de racines de *Sophora flavescens* Ait. (Fabaceae), kurarinone et sophoraflavanone, montrent une bonne inhibition de SGLT (SGLT1 :  $IC_{50} = 10,4$  et  $18,7\mu$ M, respectivement ; SGLT2 :  $IC_{50} = 1,7$  et  $4,1 \mu$ M, respectivement) [**Sato et al., 2007**]. Il en est de même pour deux autres isoflavones glycosides de cette plante, montrant une inhibition de SGLT2 comparable à la précédente [**Yang et al., 2015**].

La quercetine réduit l'absorption intestinal de glucose en inhibant GLUT 2 dans les cellules intestinales [**Kwon et al., 2007** ; **Oyenihi et al., 2014**], L'étude de **Manzano et Williamson, (2010)**, concernant l'effet de polyphénols, acides phénoliques et tannins des extraits de pommes et de fraises sur le transport intestinal du glucose utilisant les cellules intestinales, a montré une

plus forte inhibition des GLUT2 que des SGLT1. En outre, la quercétine-3-O-rhamnoside ( $IC_{50}=31\mu M$ ), phlorizine ( $IC_{50}=146\mu M$ ) et l'acide 5-cafféoylquinique ( $IC_{50}=2570\mu M$ ) contribuent à 26,52 et 12% respectivement à l'activité inhibitrice de l'extrait de pomme alors que pelargonidine-3-O-glucoside ( $IC_{50}=802\mu M$ ) contribue 26% à l'inhibition totale de l'absorption par l'extrait de fraises vis-à-vis des GLUT2 [Manzano et Williamson, 2010].

Concernant le kaempférol (aglycone et ses glycosides et métabolites), différents travaux ont démontré que ce flavonol influence le métabolisme de glucose en agissant comme antihypoglycémiant. Le Kaempférol aglycone et/ou glycosidiques stimule la captation de glucose et la synthèse de glycogène dans le muscle squelettique et inhibe l'absorption intestinale de glucose [Villers et Fougere, 2013]. Aussi le kaempférol 3-O- -rhamnoside selon l'étude de **Rodríguez et al., (2010)**, inhibe l'absorption intestinale du glucose *in vitro*. **Rodríguez et al., (2010)**, reportent que le kaempférol 3-O- -rhamnoside exerce un effet inhibiteur compétitif du cotransporteur SGLT1 lorsqu'il est utilisé seul. L'effet de la phlorizine est amélioré en la combinant au kaempferol 3-O- -rhamnoside. Concernant le mécanisme d'action de ce flavonoïde sur l'absorption intestinale de glucose les résultats montrent qu'il agit comme inhibiteur intestinal compétitif du SGLT1 cela est confirmé par son effet additif à celui de la phlorizine l'inhibiteur classique du SGLT1, et il augmente significativement le  $K_m$  de l'absorption intestinal de glucose [Villers et Fougere, 2013]. Le kaempférol glycosylé naturellement acétylé, multiflorine A, inhibent fortement l'absorption intestinale du glucose chez le rat **Shirosaki et al., 2012 (a, b)**

Le tiliroside (flavonoïde glycosidique) induit une réduction de l'absorption intestinale du glucose et montre une inhibition de SGLT1 et GLUT2 humains *in vitro* [Goto et al., 2012]. Les flavonoïdes kurarinnone et sophoraflavanone des plantes médicinales traditionnelles Chinoises, sont de potentiels inhibiteurs sélectifs de SGLT2 ( $IC_{50}$  est de 1,7 et 4,1  $\mu M$ , respectivement). La naringénine inhibe aussi la réabsorption de glucose au niveau rénale [Unnikrishnan et al., 2014].

La berbérine (alcaloïde) agit comme un agent antihyperglycémiant en inhibant l'activité de disaccharidases dans les cellules Caco-2. Elle diminue l'activité de la sucrase après 72 h d'incubation avec ces cellules. Toutefois, elle ne présente pas d'effet significatif sur la gluconéogenèse et l'utilisation de glucose. L'effet antihyperglycémiant exercé par la berbérine est dû à l'inhibition de l'alpha-glucosidase et à l'inhibition du transport de glucose à travers l'épithélium intestinal [Pan et al., 2003 ; Gaikwad et al., 2014].

## **Discussion générale**

Notre travail s'inscrit dans le cadre générale de l'étude des propriétés antidiabétiques des plantes médicinales de la flore locale, nous nous sommes intéressés particulièrement, à une espèce végétale appartenant à la famille des Fabaceae (*Ononis angustissima* Lam. subsp. polyclada Murb), à l'évaluation de l'effet de ses différents extraits sur l'hyperglycémie postprandiale et leur activité antioxydante.

Cette présente thèse a pour objectif d'étudier la composition phytochimique, le pouvoir antioxydant ainsi que les propriétés antidiabétiques d'extraits de *Ononis angustissima* *in vitro*, *in situ* et *in vivo* chez le rat Wistar. Ce travail a été réalisé en deux parties expérimentales complémentaires : une étude phytochimique de *Ononis angustissima*, en plus de l'évaluation de ses activités biologiques dont l'activité antioxydante et antidiabétique.

*Ononis angustissima* Lam. subsp. polyclada Murb [Dobignard, 2013 ; Benabderahmane et al., 2014], appelée la bugrane. *O. angustissima* est de type biologique Chaméphyte [The Algerian Journal of Arid Areas, 2012 ; Bouheroum, 2009], est connue sous le nom vernaculaire « Hennete el-bel et Tfiza » en Algérie [Chahma et Djebbar., 2008]. La variété *O. angustissima* Lam. subsp. polyclada Murb est spontanées et endémique du Sahara septentrional (Ouargla, Guardaia, Ain Safra, Bechar, Biskra, Boussaâda, jusqu'à Beni Abbas) [Bouheroum, 2009 ; Cheriti et al 2011 ; Mezrag et al 2013 ; Benabderahmane et al., 2014].

C'est une plante herbacée pouvant se développer en petits buissons à tiges très ramifiées à la base [Chebli et al., 2001 ; Vanden Berghen., 2015]. Elle est de taille : 30 cm à 1m, pourvue d'une longue racine pivotante [Bouheroum., 2007 ; Vanden Berghen., 2015], rameuse à nombreuses tiges dressées bien verte. Les feuilles à trois folioles étroites quatre à cinq fois plus longues que larges, plus ou moins dentées. Le fruit est une gousse cylindrique [Bouheroum., 2007 ; Ozenda, 1991]. La floraison a lieu au mois de Mars ou elle est échelonnée durant cette période [Chebli et al., 2001]. L'*Ononis angustissima*, est considérée comme une espèce appartenant à un groupe écologique indicateur de la présence d'eau douce dans le sol, à une profondeur relativement faible (2-5 m) [Vanden Berghen., 2015].

La famille des légumineuses extrêmement riche en flavonoïdes, et caractérisée par la présence d'isoflavones, de rotenoïdes d'anthocyanines et de flavonols glycosylés [John Ingham, 1982]. Concernant *O. angustissima* certains flavonoïdes sont mieux connus actuellement exemple : ononin ; formononetin ; 3-(4-(glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-methoxyphenyl)-7-hydroxy-4H-chromen-4-one ; (+)-puerol A-2'-O- -D-glucose ; (-)-puerol

B-2'-O- -D-glucopyranose ((-)-sophoraside A); (+)-puerol A; (-)-trifolirhizin; (-)-trifolirhizin-6'-O-malonate; (-)-maackiain et (-)-medicarpin [Ghribi et al., 2015]. 5-hydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (Alnetin); 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone (6, 7-dimethoxybaicalein); 5,6-dihydroxy-7-methoxyflavone (7-methoxybaicalein); 5, 7-dihydroxyflavone (chresin) [Bouheroum., 2009]. 2,4 -dihydroxychalcone; 2 -hydroxychalcone; 6-hydroxy-4 -methoxyaurone [Mezrag et al., 2013]. 2, 3, 4-Trihydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one ou 2',3',4'-Trihydroxychalcone; 6-Hydroxyaurone; 2',4'-Dihydroxychalcone; 5-Hydroxy,7-Methoxyflavone (tectochrysin) [Benabderahmane et al., 2014]. (3S)-7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone 3'- -D-glucopyranoside (1) ; kaempferol 3-O- -D-glucopyranoside-7-O-(2'''-acetyl)- -D-galactopyranoside (4) [Mezrag et al., 2016].

En se basant sur les recommandations de l'OMS, la valorisation et la standardisation des plantes antidiabétiques utilisées en médecine traditionnelle semble très importante, car le règne végétal est, à l'évidence, un gisement de molécules ayant une authentique action hypoglycémiant et dont l'isolement pourrait conduire à la mise au point de nouveaux agents antidiabétiques [Arulselvan et al. 2014 ; Schlienger, 2014].

Dans ce sens, l'OMS au cours de sa 31ème assemblée, a recommandé l'inventaire des plantes médicinales utilisées par les populations des différentes régions du monde, l'évaluation de leur efficacité, leur innocuité, ainsi que la standardisation de leur emploi en vue de les intégrer dans les systèmes de soins [OMS. 2000]. En effet, il est estimé que 65% de la population mondiale, davantage dans les continents Africain et Asiatique, pour des raisons socio-économiques et culturelles ont recours à la médecine traditionnelle pour leur soin primaire [Fabricant et Farnsworth. 2001].

Les informations ethnobotaniques recueillies dans plusieurs régions du monde indiquent que plus de 800 espèces végétales sont utilisées traditionnellement pour leur vertu antidiabétique, dont 410 plantes environ ont été étudiées expérimentalement. Mais le mécanisme d'action cellulaire et moléculaire est élucidé seulement chez 109 plantes [Prabhakar et Doble. 2008]. Parmi les composés naturels impliqués figurent des métabolites I<sup>ère</sup> et II<sup>aires</sup> dont les polysaccharides, peptides, alcaloïdes, glycopeptides, triterpénoïdes, acides aminés, stéroïdes, xanthone, flavonoïdes, lipides, phénols, coumarines, iridoïdes, disulphides alkyles, guanidines et les ions inorganiques [Grover et al., 2002 ; Pulok et al., 2006]. Ils agissent seuls ou d'une manière synergique et complémentaire en modulant directement ou

indirectement l'activité d'hormones, d'enzymes et de voies métaboliques, systèmes organiques impliqués dans le métabolisme et l'homéostasie glucidique [**Prabhakar et Doble, 2008 ; Kebièche et al. 2011 ; Hossain et al., 2016**].

Les plantes médicinales peuvent agir par différents mécanismes au niveau de l'organisme de sujets diabétiques et rétablir l'homéostasie glucidique par :

Stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules  $\beta$  et/ou induisent également leur régénération,

Réduisant la résistance à l'insuline et mimant son action,

Action par l'apport d'éléments nécessaires (calcium, zinc, magnésium) au fonctionnement des cellules  $\beta$ , et également la revitalisation et/ou l'hyperplasie de ces cellules,

Prévenir le stress oxydatif lié au dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques du au diabète [**Esmaeili et al., 2004 ; Jarald et al., 2008 ; Mukherjee et al., 2006**],

Action sur les enzymes hépatiques en stimulant la glycogénogenèse et/ou l'inhibition de la glycogénolyse [**Jarald et al., 2008 ; El-Abhar et al., 2014**],

Modification de l'expression des gènes et l'activité d'hormones impliquées dans la digestion telle que l'adiponectine, le resistine, et l'incrétine [**Rios et al., 2015**],

Inhibition de la réabsorption de glucose au niveau des reins [**Jarald et al., 2008**],

Action inhibitrice sur les enzymes digestives tels que l'  $\alpha$ -amylase et les  $\alpha$ -glucosidases, ce qui réduit la dégradation de l'amidon et les oligosaccharides, par conséquent, elles agissent par ralentissement et réduction de l'absorption du glucose au niveau intestinal,

Inhibition des transporteurs du glucose au niveau de la barrière intestinale limitant ainsi l'absorption intestinale du glucose, ou par stimulation de la captation du glucose par les adipocytes ou les cellules musculaire [**Edwin et al., 2008 ; Jarald et al., 2008 ; Chang et al., 2013**].

De nombreuses études dans le monde se sont intéressées aux plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète du fait de leur usage populaire très répandu dans le but d'élucider leur mécanisme d'action potentiel et expliquer leur effet antihyperglycémiant notamment par leur action inhibitrice de l'  $\alpha$ -amylase et l'  $\alpha$ -glucosidase au niveau du tube digestif et de déterminer et caractériser le (s) composé (s) actif (s). Citons à titre d'exemple, les études de **Kumar et al., (2012)** de plantes utilisées en médecine traditionnelle indienne, **Ramírez et al., (2012)** au Mexique, **Andrew et al., (2013)** ; **Ezurike et Prieto, (2014)** au Nigeria, **Kobayashi et al., (2003)** en Mongolie, **Kadir et al., 2012** ; **Kabir et al., (2014 a)** au

Bangladesh, **Nickavar et Yousefian, 2011 ; Salhi et al., 2013 ; Safamansouri et al., 2014** en Iran, **Benalla et al., 2010** au Maroc, **Bechiri et al., 2015** en Algérie.

Divers travaux scientifiques ont permis de démontrer expérimentalement l'intérêt des plantes médicinales dans l'amélioration du dysfonctionnement métabolique provoqué par le diabète sucré, contribuant notamment au maintien de l'homéostasie glucidique. L'exemple de *Galega officinalis* est éloquent, historiquement connue pour ses vertus antidiabétiques depuis le Moyen Age en Europe, contient la galéguine, un guanidine. Ce dernier est à l'origine de l'hémisynthèse de la metformine (biguanides) agent antidiabétique moins toxique et plus efficace, utilisé dans la pharmacopée moderne [**Fabricant and Fransworth, 2001**]. La connaissance de la structure et du mécanisme d'action de la phlorizine isolée de l'écorce de racine ou feuilles du pommier (*Malus sp., Rosaceae*), ou de d'autres espèces de *Rosaceae* et de *Symplocaceae*, a été à l'origine de la conception et la synthèse d'une nouvelle classe d'antidiabétiques oraux, les inhibiteurs spécifiques du SGLT2 (gliflozine), dont plusieurs représentants (dapagliflozine, canagliflozine, ipragliflozine, empagliflozine...) sont actuellement utilisés en thérapeutique ou en cours d'évaluation clinique. Ce qui offre une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement du diabète tout en normalisant le taux de glucose postprandiale et à jeun et en traitant l'insulinorésistance [**Ehrenkranz et al., 2005 ; White et Pharm, 2010 ; Kilov et al 2013 ; Blaschek, 2017**].

Les polyphénols suscitent un grand intérêt scientifique actuellement car ils sont considérés comme de puissant antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique et anticancéreux.

Les polyphénols peuvent être classés en différents groupes en fonction du nombre de noyau phénol ainsi à la base de l'élément structurel qui li ces cycles les uns aux autres. Les plus importants groupes sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, stilbènes et lignanes. Les flavonoïdes, la principale classe, à leur tour se différencient en flavones, flavonols flavanols, flavanones, isoflavones et anthocyanins. Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire [**Pandey et al., 2009**].

Les composés phénoliques ainsi que les flavonoïdes possèdent un large spectre d'activités biologique y compris les propriétés de piégeage du radical libre qui diminuent l'incidence des maladies liées au stress oxydatif comme le diabète (propriétés antioxydantes et propriétés hypoglycémiques) [**Jo et al., 2010 ; Adefegha et Oboh., 2012**].

Les extraits de *Ononis angustissima* et molécules de référence exercent, *in vitro*, une inhibition des enzymes digestives :

- d'une part, sur l'activité de l'  $\alpha$ -amylase, l'analyse de résultats nous montre que l'acarbose possède l'effet inhibiteur le plus important vis-à-vis de l'  $\alpha$ -amylase dont l'IC<sub>50</sub> est de 0,044 mg/ml, suivi de la catéchine (IC<sub>50</sub> = 0,210 mg/ml) (cinq fois plus élevé environ), tandis que tous les extraits de *Ononis angustissima* étudiés et l'acide gallique montrent un faible effet inhibiteur par rapport à l'acarbose. Leur IC<sub>50</sub> est variable, il est de 33 fois supérieur pour l'extrait EMFT (IC<sub>50</sub> = 1,46 mg/ml), 74 fois pour l'extrait AcFT (IC<sub>50</sub> = 3,26 mg/ml), par rapport à l'IC<sub>50</sub> de l'acarbose. Par ailleurs, l'ensemble des échantillons testés montrent un effet dose-dépendant.

- d'autre part, sur l'activité de l'  $\alpha$ -glucosidase, l'analyse de résultats nous montre que l'acarbose possède l'effet inhibiteur le plus important vis-à-vis de  $\alpha$ -glucosidases dont l'IC<sub>50</sub> est de 0,046  $\mu$ g/ml suivie de l'acide gallique (IC<sub>50</sub> = 0,510  $\mu$ g/ml) (11 fois plus élevé environ), tandis que tous les extraits de *O. angustissima* étudiés montrent un faible effet inhibiteur par rapport à l'acarbose. Leur IC<sub>50</sub> respective est de l'ordre de 1 mg/ml, il est environ 20 fois supérieur à celui de l'acarbose. En revanche, l'extrait AqFT et la catéchine n'exercent aucun effet inhibiteur remarquable sur l'activité de  $\alpha$ -glucosidases. Par ailleurs, l'ensemble des échantillons testés présentent un effet dose-dépendant.

Ces résultats nous permettent de suggérer que les extraits bruts (aqueux et organiques) ainsi que leurs fractions organiques (n-butanol et acétate d'éthyle), dont le dosage des polyphénols et flavonoïdes montre leur richesse en ces composés, contiendraient des substances actives agissant comme inhibiteurs enzymatiques, faisant partie de la composition complexe et diversifiée des extraits de *O. angustissima* d'une part, d'autre part ces substances montrent une activité inhibitrice beaucoup plus importante (2 fois plus actives) vis-à-vis des  $\alpha$ -glucosidases (IC<sub>50</sub> environ 1 mg/ml) qu'avec l'  $\alpha$ -amylase (IC<sub>50</sub> varie de 2 à 3 mg/ml). L'avantage d'une telle action inhibitrice simultanée sur les  $\alpha$ -glucosidase du tube digestive, modérée sur l'amylase et plus importante sur l'  $\alpha$ -glucosidase de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin, est la réduction de la fermentation bactérienne des sucres non digérés dans le colon et par conséquent les effets secondaires liés aux inhibiteurs  $\alpha$ -glucosidasiques (flatulence, météorisme, douleurs abdominales, etc...).

La variation de la glycémie postprandiale mesurée chez les rats normoglycémiques montre que l'administration des extraits de *O. angustissima*, CT, AG ou AcB avec les différents sucres (amidon, saccharose et maltose), inhibe les différentes enzymes digestives (amylase, saccharase et maltase) à divers degrés. Les résultats obtenus *in vitro* utilisant l'amylase pancréatique porcine (PPA) et les glucosidases de la muqueuse intestinale, se trouvent confirmés *in vivo* chez le rat soumis à l'hyperglycémie provoquée par les différents sucres simulant un état postprandial. Ces résultats révèlent aussi que l'effet antihyperglycémiant observé n'est pas le fait seulement de l'inhibition des enzymes digestives comme unique mécanisme d'action. Lorsque l'hyperglycémie est provoquée par le glucose (Co-administration TTOG2), excluant l'action des enzymes digestives, tous les extraits de *O. angustissima* exercent un effet antihyperglycémiant significatif et potentiel tel que l'extrait AqFT et EMFT (-64,29 et -65,18%, respectivement). Ces observations laissent supposer que les extraits agissent aussi au niveau d'autres cibles et sites entraînant une inhibition de l'hyperglycémie postprandiale. Il s'agit d'une action multiple due à la composition complexe de ces extraits.

Les extraits de la partie aérienne de *O. angustissima* et molécules de référence (CT, AG) exercent, *in vitro*, un effet inhibiteur variable sur l'absorption intestinale de glucose. L'adjonction d'extraits (aqueux et organiques de la partie aérienne de *O. angustissima*) ou de molécules de référence (à 40 mg/ml) dans la solution d'incubation (SM) entraîne une réduction variable de l'absorption de glucose par le segment d'intestin grêle. L'effet inhibiteur de transport de glucose le plus important est produit par la catéchine dont le taux d'inhibition est de 73,13% suivie de l'acide gallique (67,67%), suivi des extraits n-BFT 67,49%), AcFT (66,00%) et AqFT (64,03%) respectivement. Ces résultats nous montrent que la majorité des extraits exercent *in vitro*, à divers degrés, un effet inhibiteur sur l'absorption intestinale de glucose au niveau du sac d'intestin. Cet effet est probablement lié à leurs constituants chimiques qui interfèrent avec l'absorption du glucose.

Les extraits de *O. angustissima* et les molécules de référence perfusés dans l'intestin exercent, *in situ*, une inhibition de l'absorption intestinale. L'adjonction d'un échantillon (extraits de *O. angustissima* ou de molécules de référence) à la concentration de 10 mg/ml à la solution de perfusion, semble influencer différemment l'absorption intestinale du glucose. En effet, l'extrait EMFT et l'AG provoquent une diminution hautement significative ( $p < 0,0001$ ) (pourcentage de réduction de l'ordre de 90%). Les extraits l'AcFT, AqFL provoquent aussi une diminution mais moins importante de 38,97 et 34,65 % respectivement. En revanche,

l'absorption de glucose n'est que faiblement influencée par les extraits n-BFTet AqFT et la CT.

Ces résultats nous laissent suggérer que l'effet inhibiteur de l'absorption intestinale de glucose au niveau de l'intestin grêle dépend de la composition des extraits de *O. angustissima* en métabolites secondaires et de leur nature chimique, susceptible d'interférer avec les transporteurs de glucose au niveau de l'épithélium intestinal.

Les substances que contiennent les extraits organiques de *O. angustissima* seraient responsables de ses activités pharmacologiques. En effet, ces substances telles que les polyphénols dont les flavonoïdes sont généralement reconnues comme ayant des effets hypoglycémisants [Mangambu et al., 2014 ; Kim et al., 2006 ; Huang et al., 2004]. Ainsi, l'effet antidiabétique d'extraits de plantes est attribué à la composition variée et diversifiée en composés bioactifs, capable d'agir séparément ou de façon synergique à différents niveaux ou voies métaboliques : transcription des gènes, effecteurs d'enzymes, d'hormone et processus biologiques multiples, contribuant en définitif à rétablir l'homéostasie glucidique perturbée par l'état diabétique comme il a été avancé par **Marles et Farnsworth, 1995**.

Outre leur effet individuel propre à chaque composé, ils peuvent agir donc d'une manière complémentaire ou synergique dont les effets s'ajoutent et s'additionnent pour aboutir à un effet antidiabétique global final. Cette observation rejoint l'opinion de nombreux ethnopharmacologues, qui soutiennent que le traitement par les plantes qu'est une approche holistique de la santé en tant que médecine traditionnelle qui consiste à traiter l'individu dans sa globalité à la différence de la médecine allopathique conventionnelle basée sur des traitements ciblés (cible thérapeutique) à l'aide de molécule pure (chimiothérapie).

En définitif, de nombreux auteurs s'accordent à dire que les produits naturels issus de différentes sources : végétaux supérieurs, plantes médicinales, condimentaires, microorganismes, algues, contiennent des substances actives susceptibles d'agir au niveau de tube digestif en inhibant la digestion des sucres alimentaires et l'absorption du glucose. Ils seraient un moyen efficace de lutter contre l'HGPP et la survenue du diabète et ses complications d'une manière non invasive et sans interférer dans le processus physiopathologique de la maladie.

Cette plante peut être sélectionnée comme ressource naturelle de base afin d'isoler de composés antidiabétiques nouveaux à la base de la production de nouveaux médicaments

originaux efficaces et moins toxiques, qui peuvent servir, en outre, comme complément ou adjuvant dans le traitement du diabète sucré améliorant ainsi la prise en charge des patients diabétiques.

A la lumière de cette étude consacrée aux propriétés antidiabétiques des extraits de *O. angustissima*, il serait souhaitable de poursuivre cette étude par des analyses bioguidées, aborder l'aspect pharmacotoxicologique (évaluer la toxicité potentiel des plantes, puisque leur utilisation n'est pas inoffensive ou indemne de risques [Kelber et al., 2015]), l'approfondir afin de déterminer les composés actifs responsables de ces activités, et évaluer leur efficacité, leur innocuité et leur synergie potentielles.

## **Conclusion générale et perspectives**

La phytothérapie constitue une alternative intéressante pour améliorer l'état de santé de sujets diabétiques qui ont toujours recours aux plantes médicinales pour se soigner malgré l'existence des traitements conventionnels du diabète.

Ce travail est une contribution à l'étude phytochimique d'extraits et fractions de *Ononis angustissima*, ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydante *in vitro* et antidiabétique *in vitro*, *in vivo* et *in situ* chez le rat Wistar.

Les fleurs, feuilles et tiges de *O. angustissima* sont utilisés comme matériel végétal pour préparer les extraits aqueux et organiques. Nous avons pu mettre en évidence par l'étude phytochimique qualitative et quantitative de ces extraits, la diversité structurale des phytoconstituants représentés essentiellement par les terpénoïdes, les composés réducteurs, les amines et les quinones libres qui sont présents dans tous les extraits, les flavonoïdes, les alcaloïdes ainsi que les tanins dans les extraits organiques. Les saponosides stéroïdiens ou triterpéniques sont présents dans tous les extraits. Les coumarines sont détectées dans tous les extraits à l'exception de l'extrait AcFT. Par ailleurs, les extraits organiques renferment des teneurs plus élevées en polyphénols et flavonoïdes par rapport aux extraits aqueux. Il existe une corrélation forte entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes ( $r=0,6008$ ), ainsi les polyphénols dosés dans les différents extraits seraient majoritairement des flavonoïdes d'après ce coefficient.

Les extraits organiques montrent une activité antioxydante importante selon les tests de piégeage du radical libre DPPH et de réduction du fer (FRAP), par rapport à celle des extraits aqueux. Cet effet antioxydant est intimement lié à leurs taux élevés de polyphénols et flavonoïdes. La relation entre la composition chimique et l'activité antioxydante révélée par le test de corrélation a montré que les composés phénoliques ainsi que les flavonoïdes présentent une bonne corrélation avec les deux méthodes évaluant l'activité antioxydante (DPPH, FRAP), ce qui laisse supposer que l'activité antioxydante est due aux composés phénoliques et aux flavonoïdes. Car ces derniers possèdent une structure chimique idéale contenant des groupements hydroxyles très réactifs.

Les résultats relatifs à l'effet *in vitro* des extraits de *O. angustissima*, de molécules de référence (acarbose) et contrôle (catéchine et acide gallique) sur l'activité  $\alpha$ -amylasique et  $\alpha$ -glucosidasique indiquent que l'ensemble des échantillons testés montrent un effet inhibiteur dose-dépendant vis-à-vis ces deux enzymes et par conséquent inhibent la digestion des glucides. Aussi bien les extraits bruts (aqueux et organiques) que leurs fractions organiques

(n-butanol et acétate d'éthyle), dont le dosage des polyphénols et flavonoïdes montre leur richesse en ces composés, contiendraient des substances actives agissant comme inhibiteurs enzymatiques, faisant partie de la composition complexe et diversifiée des extraits de *O. angustissima* d'une part, d'autre part ces substances montrent une activité inhibitrice beaucoup plus importante vis-à-vis des  $\alpha$ -glucosidases qu'avec l' $\alpha$ -amylase. L'analyse des corrélations montre qu'il existe une faible corrélation entre la teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits de la plante étudiée et l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase avec un coefficient de corrélation de 0,1720 et 0,0958 respectivement. Elle est faible à moyenne entre la teneur en polyphénols ( $r = 0,0630$ ) et en flavonoïdes (0,2135) et l'activité inhibitrice des glucosidases.

Les extraits de *O. angustissima* montrent bien des propriétés antidiabétiques chez le rat. Les résultats de leurs effets *in vivo* sur la variation de la glycémie postprandiale mesurée après l'administration des différents sucres simples ou complexes (amidon, saccharose, maltose et glucose). Leur effet antidiabétique respectif est variable et dépend de leur composition et richesse en métabolites secondaires (phytoconstituants).

Concernant l'influence des extraits de *O. angustissima* sur l'absorption intestinale de glucose. Son évaluation aussi bien *in vitro* (sacs d'intestin) qu'*in situ* (perfusion de l'intestin de rat vivant inconscient) nous montre que certains extraits sont capables d'inhiber l'absorption de glucose au niveau de l'épithélium interférant avec les transporteurs de glucose (SGLT1 et GLUT2). Cette action est attribuée à la présence de certains composés spécifiques dans ces extraits.

En définitif, les propriétés antidiabétiques de *O. angustissima* pourraient être attribuée à certains de ces constituants, dont les composés phénoliques qui agissent à la fois sur les enzymes digestives des sucres alimentaires (les  $\alpha$ -glucosidases), inhibant leur dégradation en glucose et notamment empêchant son absorption intestinale. Par cette double action, elle réduit en conséquence la charge glycémique après un repas et l'hyperglycémie postprandiale chez les sujets diabétiques. Ainsi à l'issue de cette étude, ayant adopté l'approche ethnopharmacologique, nos résultats confirment l'usage traditionnel de *O. angustissima* pour le traitement du diabète.

En raison de la complexité de la composition des extraits bruts primaires qui caractérisent les extraits de plantes, pouvant contenir une multitude de composés différents par leur nature, leur structure chimiques, il est nécessaire d'approfondir cette étude par un fractionnement

bioguidé des extraits de *O. angustissima*, notamment ceux montrant une activité antioxydante et antidiabétique importante, dans le but d'identifier, caractériser et isoler le (s) composé (s) actif (s) responsable (s) de ces activités, évaluer leurs efficacité, leur innocuité (toxicité) et leur synergie potentiel, puis approfondir l'étude de leur mécanisme d'action propre.

## **Chapitre bibliographie**

## Chapitre bibliographie

## 1. Ouvrages consultés

**Andersen et Markham, 2006.** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Ed: *CRC PRESS : Taylor et Francis* : 1-247.

**Barrett K.E., Brooks H.L. Boitano S., Barman S.M. 2010.** Ganong's Review of Medical Physiology. Twenty-Third Edition. *a LANGE medical book* : 438.

**Belouad A. 1998.** Plantes médicinales en Algérie. *Office des publications nationales, Algérie* : 273.

**Bergmeyer H.U., Bernt E. 1974.** Methods of enzymatic analysis. 2<sup>nd</sup> ed. *Academic Press. New York*, 1205-1215.

**Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Editions TEC. Et DOC., Paris ; *Editions médicales internationales* : 1120.

**Ganong W.F. 1986.** Review of medical physiology. Twelfth edition. *Lange Medical*, Chapitre 25 : 384-393.

**Grimaldi A. 2009.** Traité de diabétologie. *Flammarion médecine-sciences*.

**Harborne J.B. 1998.** Phytochemical method, A Guide to Modern technique of Plant Analysis. 3<sup>rd</sup> Edition. *Chapman and Hall. New York* : 198.

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

**Lieberman M, Marks AD. 2009.** Basic Medical Biochemistry : a Clinical Approach. Baltimore. MD: *Lippincott, Williams and Wilkins*.

**Marshall W.J., Bangert S.K. 2005.** Biochimie Médicale Physiopathologie Et Diagnostic. 5<sup>ème</sup> Édition Originale. *Elsevier*.

**Ozenda P. 1991.** Flore et végétation du Sahara. 3<sup>ème</sup> édition, complétée. Paris. *CNRS editions*.

**Raghavan A., Garber A.G. 2008.** Postprandial Hyperglycemia In : Type 2 Diabetes Mellitus, contemporary Endocrinology. *Humana Press* : 97-114.

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

**Scriban, R ; 1993.** Biotechnologie. 4<sup>ème</sup> édition. *Lavoisier Technique et Documentation*.

**Silbernagls et Despopoulos, 2001.** Atlas de poche de physiologie. 3<sup>ème</sup> édition française. *Médecine Sciences Flammarion*,

**Trease G.E., Evans M.C. 1989.** Text book of Pharmacognosy. 13<sup>th</sup> Edition. *Bailiere Tindall London*,: 200-201.

**Worthington C.C. 1988.** Worthington enzyme manual : enzymes and related biochemicals. *Worthington Biochemical Corporation*.

## 2. Références bibliographiques

**Abdel-Barry J.A., Abdel-Hassan I.A., A.M Jawad.,Al-Hakiem M.H.H. 2000.** Hypoglycaemic effect of aqueous extract of the leaves of *Trigonella foenum-graecum* in healthy volunteers. *Eastern Mediterranean health journal*, 6 (1) : 83-88.

**Abdel-Kader M.S. 1997.** Two New Norphenylpropanoid Glucosides and Hemipholin from the Flowers of *Ononis vaginalis*. *J. Braz. Chem. Soc*, 8 (6) : 637-639.

**Acra S.A, Ghishan F.K. 1991.** Methods of investigation intestinal transport. *J ParenterEnteral Nutr*, 15 : 93S-98S.

- ADA (American Diabetes Association). 2001.** Postprandial blood glucose (Consensus Statement). *Diabetes Care*, 24 (4) : 775-778.
- ADA (American Diabetes Association). 2011.** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 34 (1) : S62-S69.
- ADA (American Diabetes Association). 2014.** Standards of Medical Care in Diabetes-2014. *Diabetes Care*, 37(1) : S14-S80.
- ADA (American Diabetes Association). 2016.** Standards Of Medical Care In Diabetes-2016. *The Journal Of Clinical And Applied Research And Education*, 39(1) : S1- S112.
- Adefegha S.A., Oboh G. 2012.** *In vitro* inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (10) : 774-781.
- AJAA (Algerian Journal of Arid Areas). 2012.** Journal Algérien des Régions Arides. *Revue Scientifique Internationale*, N° 09/10/11.
- Ajbnour M.A., Tilimsany A.K. 1988.** Effet of *Trigonella foenum-graecum* on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacologie*, 22 (1) : 45-49.
- Algandaby M.M., Alghamdi H.A., Ashour O.M., Abdel-Naim A.B., Ghareib S.A., Abdel-Sattar E.A., Hajar A.S. 2010.** Mechanisms of the antihyperglycemic activity of *Retama raetam* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, xxx : 1-6.
- Ali A.A., Mohamed M.H., Kamel M.S. 1998.** Studies on *Securigera securidacea* (L.) Deg. Et Dprfl. (Fabaceae) seeds, an antidiabetic Egyptian folk medicine. *Pharmazie*, 53 : 710-715.
- Ali H., Houghton P.J., Soumyanath A. 2006.** -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of ethnopharmacology*, 107 (3) : 449-455.
- Andrew O., Yusuf S., Jangabe L. M., Lawal B. S., Adamu A.A. 2013.** -Glucosidase inhibitory potential of selected antidiabetic plants used in North-Western Nigeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (12) : 2010-2018.
- Arai H., Hirasawa Y., Rahman A., Kusumawati I., Zaini N.C., Sato S., Aoyama C., Takeo J., Morita H. 2010.** Alstiphyllanines E-H, picraline and ajmaline-type alkaloids from *Alstonia macrophylla* inhibiting sodium glucose cotransporter. *Bioorg Med Chem*, 18 : 2152-2158.
- Araki E., Nishikawa T. 2010.** Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation*, 1 (3) : 90-96.
- Ardestani A., Yazdanparast R. 2007.** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycooxidation, 45 (12) : 2402-2411.
- Arulselvan P., Ghofar H.A.A, Karthivashan G., Halim M.F.A., Ghafar M.S.A., Fakurazi S. 2014.** Antidiabetic therapeutics from natural source: A systematic review. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4 (4) : 607-617.
- Bahadoran Z., Mirmiran P., Fereidoun A. 2013.** Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes et Metabolic Disorders*, 12 (43) : 1-9.
- Bakris G.L., Fonseca V., Sharma K., Wright E. 2009.** Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int*, 75 : 1272-1277.
- Baldea L.A.N., Martineau L.C., Benhaddou-Andaloussi A., Haddad P.S. 2010.** Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 132 (2) : 473-482.
- Bechiri A., Chekroun E., Azzi R., Djaziri R. 2015.** *In vitro* evaluation of -amylase inhibitory activity of some medicinal plants used in treatment of diabetes mellitus in Algeria and their effect on postprandial hyperglycemia in normal rats. *International journal of phytomedicine*, 7 : 171-175.
- Benabderahmane W., Mezrag A., M., Benayache F., Mosset P. 2014.** The chemical investigation of the chloroformic extract of *Ononis angustissima* Lam. Var. species. *Der Pharmacia Lettre*, 6 (3) :88-91.

- Benalla W., Bellahcen S., Bnouham M. 2010.** Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current diabetes reviews*, 6 (4) : 247-254.
- Benhammou N., Atik Bekkara F., Coustard J.M. 2009.** Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* de Noë and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara. *Advance in Food Science*, 31 (4) : 194-201.
- Benzie I.F.F. Strain J.J. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 : 70-76.
- Bernfeld P. 1955.** [17] Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in enzymology*, 1 : 149-156.
- Bhowmik A., Ali Khan L., Akhter M., Begum R. 2009.** Studies on the antidiabetic effects of *Mangifera indica* stem-barks and leaves on nondiabetic, type 1 and type 2 diabetic model rats. *Bangladesh J Pharmacol*, 4 : 110-114.
- Bhushan M.S, Rao C.H.V, Ojha S.K., Vijayakumar M., Verma A. 2010.** An analytical review of plants for antidiabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action. *Int J Pharm Sci Res*, 1 (1) : 29-46.
- Biesaga, M. 2011.** Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218 (18) : 2505-2512.
- Blaschek W. 2017.** Review : Natural Products as Lead Compounds for Sodium Glucose Cotransporter (SGLT) Inhibitors. *Planta Med*, 83 : 985-993.
- Bnouham M., Merhfour F., Ziyat A., Legssyer A., Aziz M., Mekhfi H. 2010.** Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Human and Experimental Toxicology*, 29 (10) : 865-871.
- Boizot N., Charpentier J.P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, *Le Cahier des Techniques de l'Inra* : 79-82.
- Bonnaillie C., Salacs M., Vassilova E., Saykova I. 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 7 : 35-45.
- Bonnefont-Rousselot D. (2002).** Glucose and reactive oxygen species, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 5 (5) : 561-568.
- Bonomini F., Rodella L.F., Rezzani R. 2015.** Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging and Disease*, 6 (2) : 109-120.
- Bonora E., Calcaterra F., Lombardi S., et al. 2001.** Plasma glucose levels throughout the day and HbA1c Interrelationships in Type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 24 : 2023-2029.
- Bonora E., Corrao G., Bagnardi V., Ceriello A., Comaschi M., Montanari P et al. 2006.** Prevalence and correlates of post-prandial hyperglycaemia in a large sample of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 49 (5) : 846-854.
- Bouheroum M., 2007.** Etude Phytochimique des plantes Médicinales Algériennes *Rhantherium adpressum* et *Ononis angustissima*. Thèse de Doctorat d'Etat En Chimie Organique, Option : Phytochimie. Université Mentouri de Constantine. Faculté des Sciences Exactes. Département de Chimie.
- Bouheroum M., Zaiter L., Benayache S., Benayache F., Bermejo J., Leon F., Garcia V. 2009.** Four flavonoides from the aerial part of *Ononis angustissima* species. *Chemistry of Natural Compounds*, 45 (6) : 874-875.
- Boukli Hacène L., Meguenni K. 2007.** Facteurs de risque cardiovasculaire dans la communauté urbaine de Tlemcen(Algérie). *Cahiers Santé*, 17 (3) :153-158.
- Brayer G., Luo D.Y., Withers S.G. 1995.** The structure of human pancreatic  $\alpha$ -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*, 4 (9) : 1730-1742.
- Brownlee M. 2005.** The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*, 54 : 1615-1625.

- Ceriello 2005.** Perspectives in Diabetes Postprandial Hyperglycemia and Diabetes Complications Is It Time to Treat? *DIABETES*, 54 (1) : 1-7.
- Ceriello A. 2003.** New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes care*, 26 (5) : 1589-1596.
- Ceriello A. 2008.** Cardiovascular effects of acute hypoglycemic pathophysiological under pinnings. *Diabetes Vase Dis Res*, 5 : 260-268.
- Ceriello A., Bortolotti N., Motz E., Crescentini A., Lizzio S., Russo A., Tonutti L., Taboga C. 1998.** Meal-Generated Oxidative Stress in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 21 (9) : 1529-1533.
- Chamahi S. 2008.** Les antidiabétiques Oraux : les nouvelles molécules. Société Tunisienne de médecine interne Soins-Infirmiers. *Chem*, 51 : 7292-7295.
- Champ M. 1985.** Digestion des glucides chez le monogastrique. *Reproduction Nutrition Développement*, 25 (4B) : 819-842.
- Chang Q., Zuo Z., Chow M.S.S., Ho W.K.K. 2005.** Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59 : 549-555.
- Chebli B., Hassani L.M.I., Hmamouchi M. 2001.** Acides gras et polyphénols des graines d'*Ononis natrix* L. (Fabaceae) de la région d'Agadir, Maroc. *Acta Bot. Gallica*, 148 (4) : 333-340.
- Cehma A., Djebar M.R. 2008.** Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien: distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Revue des sciences et de la technologie : Synthèse*, 17 : 36-45.
- Cehma A., Youcef F. 2009.** Variations saisonnières des caractéristiques floristiques et de la composition chimique des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Sécheresse*, 20 (4) : 373-381.
- Chen C.L., Pan T.M. 2015.** Effects of red mold dioscorea with pioglitazone, a potentially functional food, in the treatment of diabetes. *Journal of Food and Drug Analysis*, XXX : 1-10.
- Cheriti, A., Talhi, M. F., Belboukhari, N., Taleb, S. 2011.** Copper ions biosorption properties of biomass derived from Algerian Sahara plants. *Expanding Issues in Desalination. INTECH Open Access Publisher* : 319-338.
- Chibane A., Attif M.L., Makhlof L., Lanasri N., Biad A. 2008.** Prévalence du diabète de type 2 dans une banlieue d'Alger. *Diabetes metab*, 34 (3) : A74.
- Cong D., Fong A.K.Y., Lee R., Pang K.S. 2001.** Absorption of benzoic acid in segmental regions of the vascularly perfused rat small intestine preparation. *Drug Metab Dispos*, 29 : 1539-47.
- Coskun O., Kanter M., Korkmaz A., Oter S. 2005.** Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pâncreas. *Pharmacology Research*, 51 : 117-23.
- Dahlqvist A. 1964.** Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem*, 7 : 18-25.
- Dai J., Mumper R.J. 2010.** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15 (10) : 7313-7352.
- De S., Dey Y. N., Ghosh A. K. 2010.** Phytochemical Investigation And Chromatographic Evaluation Of The Different Extracts Of Tuber Of *Amorphaphallus Paoniifolius* (Araceae). *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research (IJPBR)*, 1 (5) : 150-157.
- Defraigne J.O., Pincemail J. 2008.** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège*, 63 (10) : 10-19.
- Degraft-Johnson J., Kolodziejczyk K., Krol M., Nowak P., Krol B., Nowak D. 2007.** Ferricreducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: Implication for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic & Clinical pharmacology & Toxicology*, 100 : 345-352.
- Dey lucey M.D., Anoja S., Attele D.D.S., Chun-Su Yuan M.D. 2002.** Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review*. 7 (1) : 45-58.

- Dinneen S., Gerich J.E., Rizza R. 1992.** Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 327 : 707-713.
- Djeridane A., Yousfi M., Michel Brunel J., Stocker P. 2010.** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem. Toxicol*, 48 : 2599-2606.
- Dobignard A. Ononis angustissima Lam. 2013.** Tela Botanica Base de Données Nomenclaturale Afrique du Nord, <http://www.telabotanica.Org>.
- Doherty M.M., Pang K.S. 2000.** Route-dependent metabolism of morphine in the vascularly perfused rat small intestine preparation. *Pharm Res*, 17 : 291-298.
- Doluisio J.T., Billups N.F., Dittert L.W., Sugita E.T., Swintosky J.V. 1969.** Drug absorption. I. An *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci*, 58 (10) : 1196-1200.
- Donga J.J., Surani V.S., Sailor G.U., Chauhan S.P., Seth, A.K. 2011.** A systematic review on natural medicine used for Therapy of diabetes mellitus of some Indian Medicinal plants. *An international journal of pharmaceutical sciences. Pharma Science Monitor*, 2 (1) : 0976-7908.
- Drouin P., Blickle J.F., Charbonnel B., Eschwege E., Gguillausseau P.J., Plouin P.F., Daninos J.M., Balarac N., Sauvanet J.P. 1999.** Diagnostique et classification du diabète sucré : les nouveaux critères. *Diabetes & Metabolisme*, 25 : 72-83.
- Ducobu J. 2007.** Les antidiabétiques oraux en 2003. *Médecine*, 35 (4) : 155-157.
- Dugas A.J., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C. 2000.** Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure- activity relationships. *J Nat Prod*, 63 : 31-327.
- Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A. 2007.** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, 5 (4) : 194-203.
- Ehrenkranz J.R., Lewis N.G., Kahn C.R., Roth J. 2005.** Phlorizin : a review. *Diabetes Metab.Res.Rev*, 21(1) : 31-38.
- Eichler H.G., Korn A., Gasic S., Pirson W., Businger J. 1984.** The effect of a new specific  $\alpha$ -amylase inhibitor on post-prandial glucose and insulin excursions in normal subjects and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 26 (4) : 278-281.
- Eidi A., Eidi M., Sokhteh M. 2007.** Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds on serum parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res*, 27 : 728-733.
- El-Abhar H.S., Schaal M.F. 2014.** Phytotherapy in diabetes: review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes*, 5 (2) : 176-197.
- El-Wakf A.M., Hassan H.A., Mahmoud A.Z., Habza M.N. 2015.** Fenugreek potent activity against nitrate-induced diabetes in young and adult male rats. *Cytotechnology*, 67 : 437-447.
- Ernsberger P., Koletsky R.J. 2012.** The Glucose Tolerance Test as a Laboratory Tool with Clinical Implications. licensee InTech (open science/open minds). Case Western Reserve University School of Medicine. Department of Nutrition, Cleveland, OH, USA 1-14.
- Esmacili M.A., Yazdanparast, R. 2004.** Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology*, 95 (1) : 27-30.
- European Medicines Agency. 2010.** Assessment report on *Trigonella foenum-graecum* L., semen. *Science Medicines Health* : 2-42.
- Ezuruike U.F., Prieto J.M. 2014.** The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. *Journal of ethnopharmacology*, 155 (2) : 857-924.
- Fabricant D.S., Farnsworth N.R. 2001.** The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109 (1) : 69-75.

- Fayzunnessa N., Morshed M.A., Uddin A., Parvin A., Saifur R. 2011.** *In vivo* study on the efficacy of hypoglycemic activity of *Spirulina plantesis* in long evan rats. *International Journal of Biomolecules and Biomedicine (IJBB)*, 1 (1) : 27-33.
- FID (Fédération Internationale du Diabète). 2009.** Education au diabète. Bruxelles, Disponible sur le site: [www.idf.org/worlddiabetesday/2009-2013/diabetes-education](http://www.idf.org/worlddiabetesday/2009-2013/diabetes-education).
- FID (Fédération Internationale du Diabète). 2013 (a).** ATLAS du DIABÈTE de la FID. Sixième édition : 1-159.
- FID (Fédération Internationale du Diabète). 2013 (b).** Directive Pour La Gestion De La Glycémie Post-Prandiale.
- FID (Fédération Internationale du Diabète). 2015.** ATLAS du DIABÈTE de la FID. Septième édition : 1-139.
- Fiorani M., Accorsi A., Cantoni O. 2003.** Human red blood cells as a natural flavonoids reservoir. *Free Radical Research*, 37 : 1331-1338.
- Fogel M.R., Gray G.M. 1973.** Starch hydrolysis in man: an intra-luminal process not requiring membrane digestion. *J Appl Physiol*, 35 : 263-267.
- Gagliardino J.J. 2005.** Physiological endocrine control of energy homeostasis and postprandial blood glucose levels. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 9 : 75-92.
- Gaikwad S.B., Mohan G.K., Rani M. S. 2014.** Phytochemicals for Diabetes Management. *Pharmaceutical Crops*, 5 (Suppl 1: M2) : 11-28.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. 2003.** Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques. *L'actualité chimique* : 91-96.
- Gee J.M., DuPont M.S., Day A.J., Plumb G.W., Williamson G., Johnson I.T. 2000.** Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *Journal of Nutrition*, 130 : 2765-2771.
- Ghadyale V., Takalikar S., Haldavnekar V., Arvindekar A. 2012.** Effective Control of Postprandial Glucose Level through Inhibition of Intestinal Alpha Glucosidase by *Cymbopogon martinii* (Roxb.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* : 1-6.
- Ghaisas M.M., Navghare V.V., Takawale A.R., Zope V.S., Deshpande A.D. 2008.** In-Vitro Antioxidant Activity Of *Tectona Grandis* Linn. *Pharmacologyonline*, 3 : 296-305.
- Ghribi L., Waffo-Téguo P., Cluzet S., Marchal A., Marques J., Mérillon J. M., Ben jannet H. 2015.** Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25 : 3825-3830.
- Gillery P. 2006.** Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus. *Ann Biol Clin*, 64 (4) : 309-314.
- Giugliano D., Ceriello A., Esposito K. 2008.** Glucose metabolism and hyperglycemia. *American Journal Clinical Nutrition*, 87(suppl) : 217S-222S.
- Goldenberg R., Punthakee Z. 2013.** Définition, classification et diagnostic du diabète, du prédiabète et du syndrome métabolique. *Canadian Journal of Diabetes. Can J Diabetes*, 37 : S369-S372.
- Goodman B. E. 2010.** Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education*, 34 : 44-53.
- Gorboulev I.S.V., Schürmann A., Vallon V., Kipp H., Jaschke A., Klessen D., Friedrich A., Scherneck S., Rieg T., Cunard R., Veyhl-Wichmann M., Srinivasan A., Balen D., Breljak D., Rexhepaj R, Parker H.E., Gribble F.M., Reimann F., Lang F., Wiese S., Sabolic I., Sendtner M., Koepsell H. 2012.** Na<sup>+</sup>-D-glucose Cotransporter SGLT1 is Pivotal for Intestinal Glucose Absorption and Glucose-Dependent. *Diabetes*, 61 : 187-196.

- Goto T., Horita M., Nagai H., Nagatomo S., Nishida N., Matsuura Y., Nagaoka S. 2012.** Tiriliroside, a glycosidic flavonoid, inhibits carbohydrate digestion and glucose absorption in the gastrointestinal tract. *Mol Nutr Food Res*, 56 : 435-445.
- Grimaldi A. 2000.** Diabétologie. Questions d'internat. CHU-PS : 15-23 Université Pierre et Marie Curie. Faculté de médecine : 1-142.
- Grover J.K., Yadav S., Vats V. 2002.** Medicinal plants of India with antidiabetic potential. *J Ethnopharmacol*, 81: 81-100.
- Habtemariam S. 2011.** A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. *Natural Products Communication*, 6 2 : 201-203.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. 2007.** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62 (10) : 628-638.
- Hamilton K.L., Grant Butt A. 2013.** Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. *Adv Physiol Educ*, 37: 415-426.
- Hannan J.M.A., Ali L., Khaleque J., Akhter M., Flatt P.R., Abdel-Wahab Y.H.A. 2012.** Antihyperglycaemic activity of *Asparagus racemosus* roots is partly mediated by inhibition of carbohydrate digestion and absorption, and enhancement of cellular insulin action. *British Journal of Nutrition*, 107 : 1316-1323.
- Hannan J.M.A., Ali L., Khaleque J., Akhter M., Flatt P.R., AbdelWahab Y.H.A. 2007 (a).** 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 : 514-521.
- Hannan J.M.A., Ali L., Khaleque J., Akhter M., Flatt P.R., AbdelWahab Y.H.A. 2007 (b).** Aqueous extracts of husks of *Plantago ovata* reduce hyperglycaemia in type 1 and type 2 diabetes by inhibition of intestinal glucose absorption. *British Journal of Nutrition*, 96 : 131-137.
- Hirsh A.J., Yao S.Y.M., Young J.D., Cheeseman C.I. 1997.** Inhibition of Glucose Absorption in the Rat Jejunum: A Novel Action of a-D-Glucosidase Inhibitors. *Gastroenterology*, 113 (1) : 205-211.
- Ho L.T., Kulkarni S., Lee J.C. 2011.** Development of sodium-dependent glucose co-transporter 2 inhibitors as potential anti-diabetic therapeutics. *Curr Top Med Chem*, 11 (12) : 1476-1512.
- Hokayem M., Bisbal C., Lambert K., Avignon A. 2012.** Quelle place pour les antioxydants dans la prévention du diabète de type 2?. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 6 (4) : 327-331.
- Hossain M.K., Abdal Dayem A., Han J., Yin Y., Kim K., Saha S.K., Yang G.M., Choi H.Y., Cho S.G. 2016.** Review: Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *Int. J. Mol. Sci*, 17, 569 : 2-32.
- Huang D.J, Lin C.D, Chen H.J, Lin Y.H, 2004.** Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. *Botanical Bulletin- Academia Sinica*, 45 : 179-186.
- Hussain A.I., Rathore H.A., Sattar M.Z.A., Chatha S.A.S., Ahmad F., Ahmad A., Johns E.J. 2013.** Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. *Ind Crops Prod*, 45 : 416-422.
- IDF (International Diabetes Federation). 2000.** Diabetes Atlas, 1<sup>st</sup> ed., Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
- IDF (International Diabetes Federation). 2003.** Diabetes Atlas, 2<sup>nd</sup> ed., Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
- IDF (International Diabetes Federation). 2006.** Atlas, 3<sup>rd</sup> edition.
- IDF (International Diabetes Federation). 2007.** Guideline for Management of Postmeal Glucose. Lesaffre printers, Belgium : 1-31.

- Ijeh I.I., Amadi I.P., Ejike C.E.C.C. 2013.** Improvement of glucose tolerance in rats fed with diets containing *Vernonia amygdalina* leaves. *Biokemistri An International Journal of the Nigerian Society for Experimental Biology*, 25: (1) 1–5.
- Jain S., Saraf S 2010.** Review on type 2 diabetes mellitus, its global prevalence and therapeutic strategies. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 4 (1) : 48-56.
- Jarald E., Joshi B.S., Jain D.C. 2008.** Diabetes and Herbal Medicines. *Iranian Journal of Pharmacology and therapeutics*, 7 : 97-106.
- Jenkins D.J.A., Taylor R.H., Goff D.V., Fielden H., Misiewicz J.J., Sarson D.L., Bloom S.R.K., Alberti G.M.M. 1981.** Scope and Specificity of Acarbose in Slowing Carbohydrate Absorption in Man. *Diabetes Nov*, 30 (11) : 951-954.
- Jo S.H., Ka E.H., Lee H.S., Apostolidis E., Jang H.D. Kwon Y. 2010.** Comparison of Antioxidant Potential and Rat intestinal  $\alpha$ -Glucosidases inhibitory Activities of Quercetin, Rutin, and Isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2 (4) : 52-60.
- John Ingham .L. 1982.** Printed in Great Britain. Phytoalexin Production by Ononis Species *Biochemical Systematics and Ecology*, 10 (3) : 233-237
- Jong-Anurakkun N., Bhandari M.R., Kawabata J. 2007.**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*). *Food Chemistry*, 103 (4) : 1319-1323.
- Jorge A.P., Horst, H., de Sousa E., Pizzolatti M.G., Silva F.R. 2004.** Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on  $^{14}$ Cglucose uptake in rat soleus muscle. *Chem-Biol Interact*, 149 : 89-96.
- Jung U.J., Lee M.K., Park Y.B., Kang M.A., Choi M.S. 2006.** Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 38 (7) : 1134-1145.
- Kabir A.U.I, Samad M.B., D’Costa N.M., Akhter F., Ahmed A., Hannan J.M.A. 2014 (b).** Anti-hyperglycemic activity of *Centella asiatica* is partly mediated by carbohydrase inhibition and glucose-fiber binding. *Complementary and Alternative Medicine* : 2-14.
- Kabir M.H., Hasan N., Rahman M.M., Rahman M.A., Khan J. A., Hoque N.T., Rahmatullah M. 2014 (a).** A survey of medicinal plants used by the Deb barma clan of the Tripura tribe of Moulvibazar district, Bangladesh. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 10 (1) : 1-28.
- Kabir M.S.H., Nasir Uddin M.M., Zahid Hosen S.M. 2016.** Investigation on hypoglycemic effects of ethanol extract of *Alpinia nigra* (Gaertn.) in animal model. *J Intercult Ethnopharmacol*, 5 (2) : 131-136.
- Kadir M.F., Sayeed M.S.B., Shams T., Mia M.M.K. 2012.** Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Bangladeshi traditional health practitioners in the management of diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, 144(3) : 605-611.
- Kebière M., Lakroun Z., Mraïhi Z., Soulimani R. 2011.** Effet antidiabéto-gène et cytoprotecteur de l’extrait butanolique de *Ranunculus repens* L et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, 9 (5) : 274-282.
- Kelber O., Abdel-Aziz H., Schrenk. 2015.** Herbal medicinal product : Synergy in pharmacology and toxicology. *Planta Med*, 81.
- Khacheba I., Djeridane A., Yousfi M. 2014.** Twenty Traditional Algerian Plants Used in Diabetes Therapy as Strong Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase Activity. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* : 1-12.
- Kilov G., Leow S., Thomas M. 2013.** SGLT2 inhibition with dapagliflozin - A novel approach for the management of type 2 diabetes. *Aust.Fam. Physician*, 42 (10) : 706-710.
- Kim J.S., Kwon C.S., Son K.H. 2000.** Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64 : 2458-2461.
- Kim S.H., Hyun S.H, Choung S.Y. 2006.** Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 104 (1-2) : 119-123.

- Kisielinski K., Willis S., Prescher A., Klosterhalfen B., Schumpelick V. 2002.** A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clin Exp Med*, 2 : 131-135.
- Kloda J.M., Dean P.D.G., Maddren C., MacDonald D.W., Mayes S. 2008.** Original Article : Using principle component analysis to compare genetic diversity across polyploidy levels within plant complexes: an example from British Restharrow (*Ononis spinosa* and *Ononis repens*). *Heredity*, 100 : 253-260.
- Kobayashi K., Baba E., Fushiya S., Takano F., Batkhuu, J., Dash, T., ... Yoshizaki, F. 2003.** Screening of mongolian plants for influence on amylase activity in mouse plasma and gastrointestinal tube. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26 (7) : 1045-1048.
- Kottra G., Daniel H. 2007.** Flavonoid glycosides are not transported by the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther*, 322: 829-835.
- Krenisky J.M., Luo, J., Reed M.J., Carney J.R. 1999.** Isolation and antihyperglycaemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a Peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. *Biol. Pharm. Bull*, 22 : 1137-1140.
- Kumar S., Kumar V., Rana M., Kumar D. 2012.** Enzymes inhibitors from plants: an alternate approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Communications*, 2 (2) : 18-33.
- Kumar S., Narwal S., Kumar V., Prakash O. 2011.** -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5 (9) : 19-29.
- Kuneš M., Kv tina J., Svoboda Z., Herout V. 2005 (a).** Study of the mechanisms of intestinal absorption of xenobiotics using *in situ* perfusion of rat intestine, *Biologia*, 60 : 89-92.
- Kuneš M., Kv tina J., Svoboda Z., Kv tina J., Herouta V., Herinka J., Bajgarb J. 2005 (b).** Intestinal Single-Pass *In Situ* Perfusion Technique In Rat: The Influence Of L-Carnitine On Absorption Of 7-Methoxytacrine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149 (2) : 433-435.
- Kwon O., Eck P., Chen S., Corpe C.P., Lee J.H., Kruhlak M., Levine M. 2007.** Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. FASEB, Research Communication*, 21 : 366-377.
- Kwon Y.I.I., Vattem, D.A., Shetty K. 2006.** Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia pacific journal of clinical nutrition*, 15 (1) : 107-118.
- Ladoh Yemeda C.F., Dibong S.D., Nyegue M.A., Djembissi Talla R.P., Lenta Ndjakou B., Mpondo Mpondo E., Yinyang J., Wansi J.D. 2014.** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur Citrus sinensis. *Journal of Applied Biosciences*, 84 : 7636-7643.
- Lecleire S. 2008.** Digestion Et Absorption Des Nutriments. *Cah. Nutr. Diét*, 43 (1) : 45-50.
- Lennernäs H. 1998.** Human intestinal permeability. *J Pharm Sci*, 87 : 403-410.
- Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H., Zeng X. 2009.** Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chemistry*, 112 (1) : 35-41.
- Lo Piparo E., Scheib H., Frei N., Williamson G., Grigorov M., Chou C.J. 2008.** Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human -Amylase. *J. Med. Chem*, 51 : 3555-3561.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1) : 265-275.
- Madar Z., Abel R., Samish S., Arad J. 1988.** Glucose lowering effect of Fenuqreek in non insulin dependent diabetics. *Eur J Clin Nutr*, 42 : 42-51.
- Magder S. 2006.** Review : Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical Care*, 10 (1) : 1-8.
- Maghrani M., Michel J.B., Eddouks M., 2005.** Hypoglycaemic activity of *Retama raetam* in rats. *Phytotherapy Research*, 19 : 125-128.

- Mahmoudi Y. 1989.** La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Blida, *Edition ANES Palais du livre* Imprimerie Mohli. Algérie, 01 : 105.
- Mahraoui L., Rodolosse A., Barbat A., Dusaulx E., Zweibaum A., Rousset M., Laroche E.B. 1994.** Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J*, 298 : 629-633.
- Malek R. 2008.** Épidémiologie du diabète en Algérie : revue des données, analyse et perspectives. *Médecine des maladies Métaboliques*. Vol 2 - N°3.
- Malek R., Belateche F., Laouamri S., Hamdi-Cherif M., Touabti A., Bendib W., et al., 2001.** Prevalence of type 2 diabetes mellitus and glucose intolerance in the Setif area (Algeria), *Diabetes Metab*, 27 (2 Pt 1) : 164-171.
- Malek R., Nechadi A., Rezig MF., Abdelaziz S., Mallem N., Bouferroum A., Houhou M. 2013.** Dépistage de masse du diabète de type 2 en Algérie: quels enseignements? *Médecine des Maladies Métaboliques*, 7 (6) : 557-562.
- Mangambu M.J.D., Mushagalusa K.F., Kadima N.J., 2014.** Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, R.D.Congo). *Journal of Applied Biosciences*, 75 : 6211-6220.
- Manickam M., Ramanathan M., Jahromi M.A., Chansouria J.P., Ray A.B. 1997.** Antihyperglycaemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *J. Nat. Prod*, 60 : 609-610.
- Manzano S., Williamson G. 2010.** Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54 : 1773-80.
- Marles R.J., Farnsworth N.R. 1995.** Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2 : 137-189.
- Marles R.J., Farnsworth N.R., 1994.** Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res*, 6 : 149-187.
- Mata R., Cristians S., Escandón-Rivera S., Juárez-Reyes K., Rivero-Cruz I. 2013.** Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of  $\alpha$ -glucosidases. *Journal of natural products*, 76 (3) : 468-483.
- Matsui T., Kobayashi M., Hayashida S., Matsumoto K. 2002.** Luteolin, a flavone, does not suppress postprandial glucose absorption through an inhibition of  $\alpha$ -glucosidase action. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 66 (3) : 689-692.
- Matsui T., Tanaka T., Tamura S., Toshima A., Tamaya K., Miyata Y. 2007.**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J Agric Food Chem*, 55 (1) : 99-105.
- Mezrag A., Bouheroum M., Beghidja N., Khalfaoui A., Zaiter L., Benayache S., Benayache F. 2013.** More Flavonoids From The Ethyl Acetate Extract Of *Ononis angustissima* Species. *Chemistry of Natural Compounds*, 49 (4): 749-750.
- Mezrag A., Malafrente N., Bouheroum M., Travagglino C., Russo D., Milella L., Severino L., De Tommasi N., Braca A., Dal Piaz F. 2016.** Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts : isolation of two new flavonoids. *Journal of Natural Product Research :Formerly Natural Product Letters*, 31 (5) : 507-514.
- Modak M., Dixit P., Londhe J., Ghaskadbi S., Paul A., Devasagayam T. 2007.** Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *J Clin Biochem Nutr*, 40 (3) : 163-173.
- Mohd Aftab Alam, Al-Jenoobi F.I., Al-mohizea A.M. 2012.** Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 64 : 326-336.
- Monnier L. 2000.** Is postprandial glucose a neglected cardiovascular risk factor in type 2 diabetes? *Eur J Clin Invest*, 30 (suppl 2) : 3-11.
- Monnier L., Colette C. 2008.** Glycemic variability. Should we and can we prevent it? *Diabetes Care*, 31(2) : S150-S154.
- Monnier L., Colette C., Dunseath G.J., Owens M.D.R. 2007.** The Loss of Postprandial Glycemic Control Precedes Stepwise Deterioration of Fasting With Worsening Diabetes. *Diabetes Care*, 30 (2) : 263-269.

- Monnier L., Mas E., Ginet C et al. 2006.** Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA*, 295 : 1681-1687.
- Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 : 270-276.
- Mowla A., Alauddin M., Rahman M.A., A. Kabir. 2009.** Antihyperglycemic Effect Of *Trigonella Foenum-Graecum* (Fenugreek) Seed Extract In Alloxan-Induced Diabetic Rats And Its Use In Diabetes Mellitus: A Brief Qualitative Phytochemical And Acute Toxicity Test On The Extract. *Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines (Afr. J. Trad. CAM)*, 6 (3) : 255-261.
- MSPRH (Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière). 2005.** Organisation mondiale de la santé. Algérie Enquête STEPS 2003, tech. rep. Ministry of Health Algeria, World Health Organization; 2005.
- Mukherjee P.K., Maiti K., Mukherjee K., Houghton P.J. 2006.** Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of Ethnopharmacology*, 106 (1) : 1-28.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G.N., Traoré D., Aké-Assi L. 2009.** phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6 (1) : 1 – 15.
- Naquvi K.J., Ahamad J., Mir S.R., Ali M., Shuaib M. 2011.** Review On Role Of Natural Ipha-Glucosidase Inhibitors For Management Of Diabetes Mellitus. *International Journal of Biomedical Research* : 374-380.
- Nathiya S., Durga M., Devasena T. 2014.** Therapeutic role of *Trigonella foenum-graecum* [Fenugreek] - A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 27 (2) : 74-80.
- Negrão R., Faria A. 2009.** Natural Polyphenols as Anti-Oxidant, Anti-Inflamatory and Anti-Angiogenic Agents in the Metabolic Syndrome. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111 : 147-180.
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. 2000.** The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Report*, 17 : 215-234.
- Nickavar B., Yousefian N. 2011.** Evaluation of -amylase inhibitory activities of selected antidiabetic medicinal plants. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6 (2) : 191-195.
- Nishikawa T., Araki E. 2013.** Mechanism-based antioxydant therapies promise to prevent diabetic complications?. *Journal of Diabetes Investigation*, 4 (2) : 105-107.
- Node K., Inoue T. 2009.** Review : Postprandial hyperglycemia as an etiological factor in vascular failure. *Cardiovascular Diabetology* : 1-10.
- Noor A., Bansal V.S., Vijayalakshmi M.A. 2013.** Current update on anti-diabetic biomolecules from key traditional Indian medicinal plants. *Current Science*, 104 (6) : 721- 727.
- Odhav B., Kandasamy T., Khumalo N., Baijnath H. 2010.** Screening of African traditional vegetables for their alpha-amylase inhibitory effect. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (14) : 1502-1507.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). 2000.** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. Genève : 1-77.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). 2006.** A response to the need for comprehensive consistent and comparable information on health risks at global and regional level. Genève.
- OMS, Rapport de l'approche Step Wise – Algérie. 2005.** Mesures de facteurs de risque des maladies non transmissibles dans deux zones pilotes (Approche Step Wise). Direction de la prévention.
- Orban J.C., Ichai C. 2008.** Complications métaboliques aiguës du diabète. Acute metabolic complications of diabetes mellitus. *Réanimation*, 17 : 761-767.
- Oubre A.Y., Carlson T.J., King S.R., Reaven G.M. 1997.** From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40 : 614-617.

- Oyaizu M. 1986.** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 : 307-315.
- Oyenihi A.B., Brooks N.L., Oguntibeju O.O., Aboua G. 2014.** Antioxidant -Rich Natural Products and Diabetes Mellitus. *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*, 317-345.
- Pan G.Y., Huang Z.J., Wang G.J., Fawcett J.P., Liu X.D., Zhao X.C., Sun J.G., Xie Y.Y. 2003.** The antihyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta Med*, 69 : 632-636.
- Pandey K.B., Rizvi S.I. 2009.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2 (5) : 270-278.
- Pandeya S. N., Kumar R., Kumar A., Pathak A.K. 2010.** Antidiabetics Review on Natural Products. *Research J. Pharm. and Tech*, 3 (2) : 300-318.
- Pang K.S. 2003.** Modeling Of Intestinal Drug Absorption: Roles Of Transporters And Metabolic Enzymes (For The Gillette Review Series). *Drug Metabolism And Disposition*, 31 (12) : 507-519.
- Patel D.K., Prasad S.K., Kumar R., Hemalatha S. 2012.** An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2 (4) : 320-330.
- Pereira D.F., Cazarolli L.H., Lavado C., Mengatto V., Figueiredo M.S.R.B., Guedes A., Pizzolatti M.G. Silva F.R.M.B. 2011.** Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, 27 (11-12) : 1161-1167
- Peri C., Pompei C. 1971.** Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts, short communication, *phytochemistry*, 10 : 2187-2189.
- Phan H.H., Abdellah R. 1980.** Effets des débits de perfusion sur l'absorption intestinale des glucides. *Reprod. Nutr. Dévelop*, 20 (4b) : 1361-1368.
- Piconi L., Quagliaro L., Assaloni R., Da Ros R., Maier A., Zuodar G., Ceriello A. 2006.** Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. Diabetes/Metabolism Research And Reviews Research Article. *Diabetes Metab Res Rev*, 22: 198-203.
- Pietrzak W., Nowak R., Olech M. 2014.** Effect of extraction method on phenolic content and antioxidant activity of mistletoe extracts from *Viscum album* subsp. *abietis*. *Chemical Papers*, 68 (7) : 976-982.
- Pillon F., Tan K., Jouty P., Frullani Y. 2014.** Le traitement médicamenteux du diabète de type 2. Suivi du diabétique de type 2 à l'officine. Elsevier Masson SAS. *Actualités pharmaceutiques*, 541 : 23-28.
- Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revu de génie industriel*, 4 : 25-39.
- Prabhakar P.K., Doble M. 2008.** A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Curr Diabetes Rev*, 4 : 291-308.
- Prabhakar P.K., Doble M. 2011.** FEATURE ARTICLE. Mechanism of Action of Natural Products Used in the Treatment of Diabetes Mellitus. *The Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 17(8) : 1-14.
- Prabhakar P.K., Doble M. 2014.** Mechanism of Action of Medicinal Plants Towards Diabetes Mellitus - A Review. *Phytopharmacology & Therapeutic Values IV*, 22 : 181-204.
- Pulido R., Bravo L., Saura Calixto F. 2000.** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem*, 48 : 3396-3402.
- Pulok K.M., Kuntal M., Peter JH. 2006.** Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J Ethnopharmacol*, 106 : 1-28.
- Pyo Y.H., Lee T.C., Logendra L., Rosen R.T. 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85 : 19-26.
- Racciah D. 2004.** Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*, 1 : 29-42.

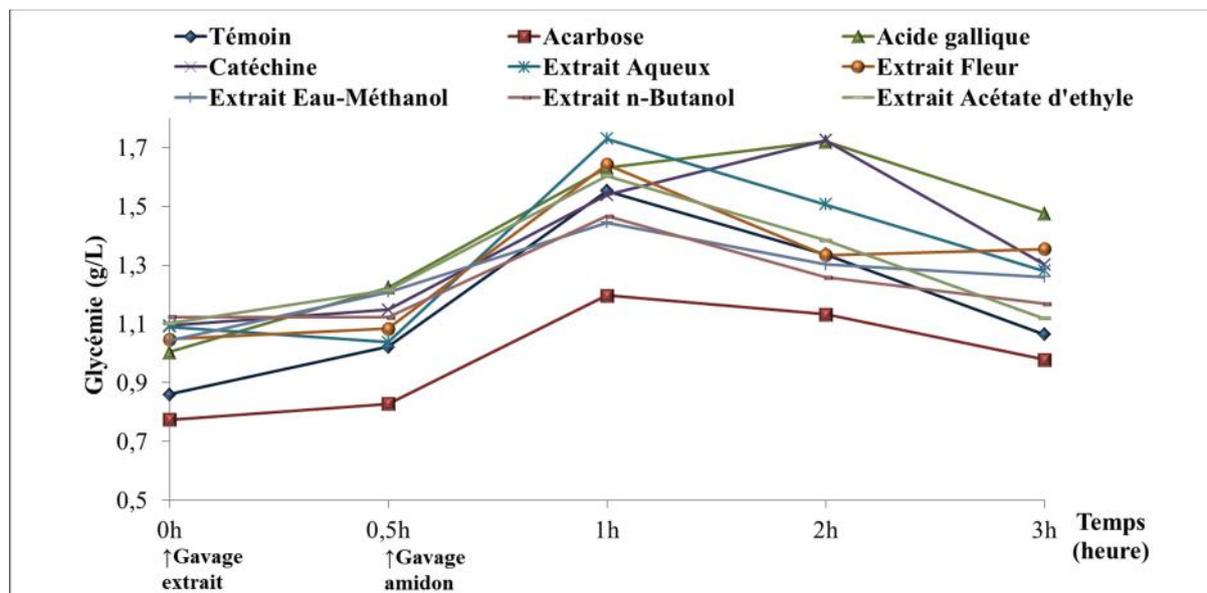
- Ramaswamy K., Malathi P., Caspary W.F., Crane R.K. 1974.** Studies on the transport of glucose from disaccharides by hamster small intestine in vivo. Characteristics of the disaccharidase-related transport system. *Biochem Biophys Acta*, 345 : 39-48.
- Ramírez G., Zavala M., Pérez J., Zamilpa A. 2012.** *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 : 1-6.
- Rauter A.P., Martin A., Borger C., Motafllipe H., Printo R., Sepodes B., Justino J. 2010.** Antihyperglycemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin induces diabetic rats. *phytotherapy research*, 24 (S2) : 133-138.
- Rebolledo O.R., Actis Dato S.M. 2005.** Postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia-generated glycoxidative stress: its contribution to the pathogenesis of diabetes complications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 9 : 191-208.
- Rios J.L., Francini F., G.R. Schinella. 2015.** Natural Products for the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med*, 81 : 975-994.
- Riyad M.A., Abdul-Salam S.A., Mohammad S.S. 1988.** Effect of fenugreek and Lupin seeds on the development of experimental diabetes in rats. *Planta Med*, 54 : 286-290.
- Robert S.D., Ismail A.A.S., Wan Rosli W.I. 2014.** *Trigonella Foenum-Graecum* Seeds Lowers Postprandial Blood Glucose in Overweight and Obese Individuals. *Journal of nutrition and metabolism* : 1-5.
- Rodriguez P., González-Mujica F., Bermúdez J., Hasegawa M. 2010.** Inhibition of glucose intestinal absorption by kaempferol 3-O- $\alpha$ -rhamnoside purified from *Bauhinia megalandra* leaves. *Fitoterapia*, 81 : 1220-1223.
- Roglic G., Unwin N. 2010.** Mortality attributable to diabetes: Estimates for the year 2010. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87 : 15-19.
- Rubilar M., Jara C., Poo Y., Acevedo F., Gutierrez C., Sineiro J., Shene C. 2011.** Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae Turcz.*): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/  $\alpha$ -Amylase Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 : 1630–1637.
- Safamansouri H., Nikan M., Amin G., Sarkhail P., Gohari A.R., Kurepaz-Mahmoodabadi M., Saeidnia S. 2014.**  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some traditionally used medicinal species of *Labiatae*. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13 : 114 : 2-5.
- Saha S., Verma R. 2012.** Inhibitory potential of traditional herbs on  $\alpha$ -amylase activity. *Pharm Biol*, 50 (3): 326-331.
- Salehi P., Asghari B., Esmaeili M.A., Dehghan H., Ghazi I. 2013.**  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (6) : 257-266.
- Sales P.M., Souza P.M., Simeoni L.A., Magalhães P.O., Silveira D. 2012.**  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15 (1) : 141-183.
- Santilli F., Formoso G., Sbraccia P. Averna M., Miccoli R., Di Fulvio P., Ganci A., Pulizzi N., Lattanzio S., Ciabattoni G., Consoli A., Lauro R., Patrono C., Davi G. 2010.** Postprandial hyperglycemia is a determinant of platelet activation in early type 2 diabetes mellitus. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8 : 828-837.
- Santoro D., Passantino A., Ricciardi C.A., Savica V., Bellinghieri G. 2013.** Diuretics in the “Istituzioni di Materia Medica e Terapeutica” (1862-1864) by Giovanni Pagano of Naples. *JNEPHROL*, 26 (Suppl 22) : S139-S142.
- Sato S., Takeo J., Aoyama C., Kawahara H. 2007.** Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter (SGLT) inhibitory flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Bioorg Med Chem*, 15 : 3445-3449.
- Sautou-Miranda V., Chopineau J., Somda F., Tauveron I. 2008.** Traitement du diabète sucré 21: troubles métaboliques et hydro-électrolytiques. *Pharmacie clinique et thérapeutique (3<sup>e</sup> édition entièrement revue)* : 417-442.
- Saxena A., Vikram N.K. 2004.** Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. *J Altern Complement Med*, 10 (2) : 369-378.
- Scheen A.J., Letiexhe M.R., Geronooz I., Paquot N., Jandrain B. 2002.** L'hyperglycémie Post-Prandiale II. Approches thérapeutiques médicamenteuses. *Rev Med Liege*, 57 (4) : 196-201.

- Scheepers A., Joost HG., Schürmann A. 2004.** The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J.Parenter.Enteral.Nutr*, 28 (5) : 364-371.
- Schlienger J.L. 2014.** Diabète et phytothérapie: les faits. *Médecine des maladies Métaboliques*, 8 (1) : 101-106.
- Schneeman B.O. 2002.** Gastrointestinal physiology and functions. *British Journal of Nutrition*, 88 (2) : S159-S163.
- Schulze C., Bangert A., Kottra G., Geillinger K.E., Schwanck B., Vollert H., Blaschek W., Daniel H. 2014.** Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. *Mol Nutr Food Res*, 57 : 1795-1808.
- Schulze C., Bangert A., Schwanck B., Vollert H., Blaschek W., Daniel H. 2015.** Extracts and flavonoids from onion inhibit the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) *in vitro* but show no anti-hyperglycaemic effects *in vivo* in normoglycaemic mice and human volunteers. *J Funct Foods*, 18 : 117-128.
- Sharififar F., Mirtajadini M., Azampour M .J., Zamani E. 2012.** Essential Oil and Methanol Extract of *Zataria multiflora* Boiss with Anticholinesterase Effect. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15 (1) : 49-53.
- Sharma R., Raghuran T.C., Rao N.C. 1990.** Effect of Fenuqreek seeds on blood glucose and serum lipids in type 1 diabetes. *Eur J Clin Nutr*, 44 (4) : 301-306.
- Sharma R., Sarkar A., Hazara D., Mishra B., Singh J., Sharma S., et al. 1996.** Use of Fenuqreek seed powder in the management of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr*; 44 (4) : 301-306.
- Shaw J., Sicree R., Zimmet P. 2010.** Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practiced*, 87 : 4-14.
- Shirazi-Beechey S.P., Davies A.G., Tebbutt K., Dyer J., Ellis A., Taylor C.J., Fairclough P., Beechey R.B. 1990.** Preparation and properties of brushborder membrane vesicles from human small intestine. *Gastroenterol*. 98 : 676-685.
- Shirosaki M., Goto Y., Hirooka S., Masuda H., Koyama T., Yazawa K. 2012 (a).** Peach leaf contains multiflorin a as a potent inhibitor of glucose absorption in the small intestine in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35 (8) : 1264-1268.
- Shirosaki M., Koyama T., Yazawa K. 2012 (b).** Suppressive effect of peach leaf extract on glucose absorption from the small intestine of mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76 : 89-94.
- Sies H. 1991.** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91 (3) : S31-S38.
- Siraj M.A., Shams M.R., Hossain E., Salahuddin M., Tahsin F., Khalid A.A., Paul S.P. 2013.** Assay of antidiabetic activity of *Hemidesmus indicus* by gut perfusion and six segment methods on Long Evans rats. *Archives*, 3 : 81-87.
- Spiridon I., Bodirlau R., Teaca C.A. 2011.** Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Cent.Eur J Biol*, 6 (3) : 388-396.
- Srinivasan K. 2006.** Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food Rev Int*, 22 (2) : 203-24.
- Standl E., Schnell O. 2012 .** Alpha-glucosidase inhibitors 2012 – cardiovascular considerations and trial evaluation. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 9(3) : 163-169.
- Sudha P., Zinjarde S.S., Bhargava S.Y., Kumar A.R. 2011.** Potent -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC complementary and alternative medicine*, 11 (1) : 1-10.
- Sultana B., Anwar F., Ashraf M. 2009.** Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14 (6) : 2167-2180.
- Süntar I., Baldemir A., Coskun M., Keles H., Akkol E.K. 2011.** Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 135 : 63-70.
- Tabatabaei-Malazy O., Larijani B., Abdollahi M. 2013.** A novel management of diabetes by means of strong antioxidants' combination. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*, 7 : 25-30.

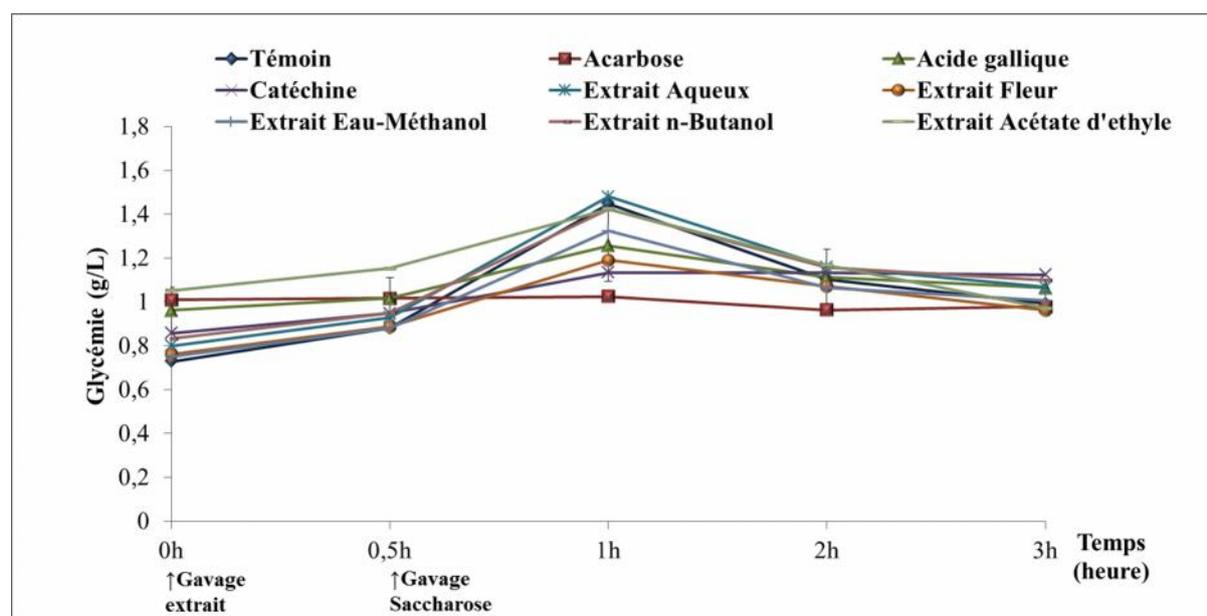
- Tadera T., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. 2006.** Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol*, 52 : 149-153.
- Tasnuva A., Khondokar Md. Sharif Uddin I., Shiblur R., Sadia-Moin M., Shahed-Choudhury Md., Mostafi-Jumrut M., Sharmin J., Shakhawat-Hossain Md., Rahmatullah M. 2012.** Antihyperglycemic and antinociceptive activity of Fabaceae family plants – an evaluation of *Mimosa pigra* L. stems *Advances in Natural and Applied Sciences*, 6 (8): 1490-1495.
- Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H. 2011.** Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1) : 98-106.
- Tumova L., Tuma J., Dolezal M. 2011.** Pyrazinecarboxamides as Potential Elicitors of Flavonolignan and Flavonoid Production in *Silybum marianum* and *Ononis arvensis* Cultures *In Vitro* . *Molecules*, 16 : 9142-9152.
- Turumtay E.A., Islamoglu F., Cavus D., Sahin H., Turumtay H., Vanholme B. 2014.** Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. caucasicus var. caucasicus). *Industrial Crops and Products*, 52 : 687-694.
- Ugolev A.M., Zaripov B.Z., Iezuitova N.N., Gruzdkov A.A., Rybin I.S., Voloshenovich M.I., Nikitina A.A., Punin M.Y.u., Tokgaev N.T. 1986.** A revision Glucosiof current data and views on membrane hydrolysis and transport in the mammalian small intestine based on a comparison of techniques of chronic and acute experiments: experimental reinvestigation and critical review. *Comp Biochem Physiol*, 85 : 593-612.
- UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) Group. 1998.** Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 352 : 837-853.
- Unnikrishnan M.K., Veerapur V., Nayak Y., Mudgal P.P., Mathew G. 2014.** Antidiabetic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of the Flavonoids. *Polyphenols in Human Health and Disease* : 143-161.
- Unwin N., Gan D., Whiting D. 2010.** The IDF Diabetes Atlas: Providing evidence, raising awareness and promoting action. *Diabetes research and clinical practice*, 87 : 2-3.
- Unwin N., Sobngwi E., Alberti K.G.M.M. 2001.** Type 2 diabetes : the challenge of preventing a global epidemic. *Diabetes international*, 11 : 4-8.
- Vanden Berghen C. 2015.** Observations Sur La Végétation De L'île De Djerba. (Tunisie m méridionale) Note 2 : Les Dunes Fixées. L'association à *Imperata cylindrica* et *Ononis agustissima*. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg* : 227-236.
- Vermerris W., Nicholson R. 2006.** Isolation and Identification of Phenolic Compounds. A pratical guide. Phenolic compound biochemistry. *Biochemistry*, published by *springer* : 151-196.
- Vessal M., Hemmati M., Vasei M. 2003.** Antidiabetic effects of quercetin in streptozocininduced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology*, 135 : 357-364.
- Veyhl M., Spangenberg J., Puschel B., Poppe R., Dekel C., Fritzsche G., Haase W., Koepsell H. 1993.** Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter. *J Biol Chem*, 268 : 25041-25053.
- Villers G., Fougere Y. 2013.** Metal Complexes of Kaempferol and Their Speciation in Human Plasma *Nova Science Publishers, Inc. New York* : 36-37.
- Villiot-Danger J.C. 2011.** Diabète et précautions kinésithérapiques : Special attention for physical therapy in the diabetic patient. *La revue de Kinésithérapie*, 11 (118) : 35-40.
- Virally M., Blicklé J.F., Girard J., Halimi S., Simon D., Guillausseau P.J. 2008.** Diabète de type 2: épidémiologie, physiopathologie, problèmes non résolus et perspectives thérapeutiques. *La revue de Médecine interne*, 29 (11) : 881-885.
- Wadkar K.A., Magdum C.S., Patil S.S., Naikwade N.S. 2008.** Antidiabetic Poential and Indian Medicinal Plants. *Herbal Medicine and Toxicology*, 2 (1) : 45-50.
- Wang H., Dub Y.J., Song H.C. 2010.**  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of *guava* leaves. *Food Chemistry*, 123 : 6-13.

- Wenzel U. 2013.** Flavonoides as drugs at the small intestinal level. *Current Opinion in Pharmacology*, 13 : 864-868.
- Wherrett D., Huot C., Mitchell B., Pacaud D. 2013.** Le diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents Comité d'experts des Lignes directrices de pratique clinique de l'Association canadienne du diabète. *Can J Diabetes*, 37 : S531-S541.
- Whitcomb D.C., Lowe M.E. 2007.** Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig Dis Sci*, 52:1-17.
- White J.R., Pharm D.P.A. 2010.** Apple Trees to Sodium Glucose Co-Transporter Inhibitors: A Review of SGLT2 Inhibition. *Clinical Diabetes*, 28 (1) : 5-10.
- Whiting D., Guariguata L., Weil C., Shaw J. 2011.** Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94 : 311-321.
- WHO (World Health Organization). 1999.** Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva : 1-59.
- WHO (World Health Organization). 2006.** Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation. 1-46. <http://www.who.int>.
- WHO (World Health Organization). 2016.** Global Report on Diabetes 2016. Geneva : World Health Organization.
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. 2004.** Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27 (5) : 1047-1053.
- Williamson G. 2013.** Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol.Nutr.Food Res*, 57 (1) : 48-57.
- Wilson T.H., Wiseman G. 1954.** The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*, 123 : 116-125.
- Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerys R. 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*, 105 : 940-949.
- Wright E.M. 1993.** The intestinal Na//glucose cotransporter. *Annu Rev Physiol*, 55 : 575-589.
- Wright E.M., Martin M.G., Turk E.M.D. 2003.** Intestinal absorption in health and disease sugars. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (6) : 943-956.
- Wright EM, Turk E. 2004.** The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflügers Arch*, 447 : 510-518.
- Wright EM., Loo D.D.F., Hirayama B.A. 2011.** Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews*, 91 : 733-794.
- Yang J., Yang X., Wang C., Lin Q., Mei Z., Zhao P. 2015.** Sodium-glucose-linked transporter 2 inhibitors from *Sophora flavescens*. *Med Chem Res*, 24 : 1265-1271.
- Youcef M., Chalard P., Figuéredo G., Marchioni E., Benayache F., Benayache S. 2014.** Chemical Composition of the Essential Oil of *Ononis angustissima* (Lam.) Batt. et Trab. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5 (5) : 1307-1310.
- Zaoui S., Biémont C., Meguenni K. 2007 .** Approche épidémiologique du diabète en milieux urbain et rural dans la région de Tlemcen (ouest Algérien). *Santé*, 17 :15-19.
- Zheng F., Lu W., Jia C., Li H., Wang Z., Jia W. 2010.** Relationships between glucose excursion and the activation of oxidative stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes or impaired glucose regulation. *Endocr*, 37 : 201-208.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. 1999.** The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 : 555-559.
- Zia T., Nazrul Hasnain S., Hasan S.K. 2001.** Evaluation of the oral hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum-graecum* L. in normal mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 75 : 191-195.

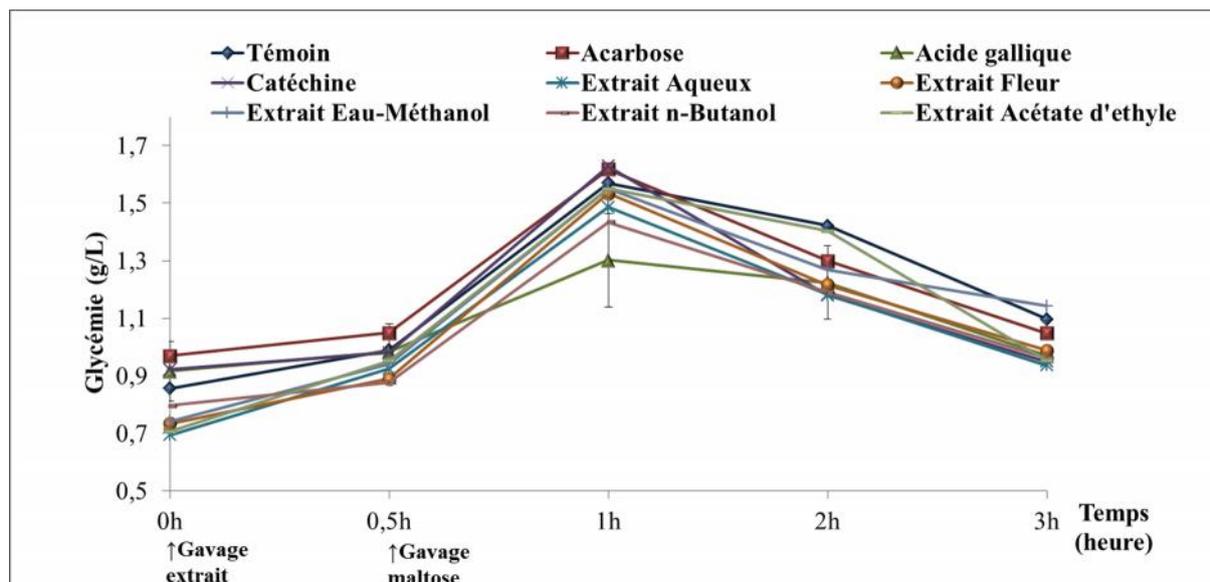
# **Annexes**



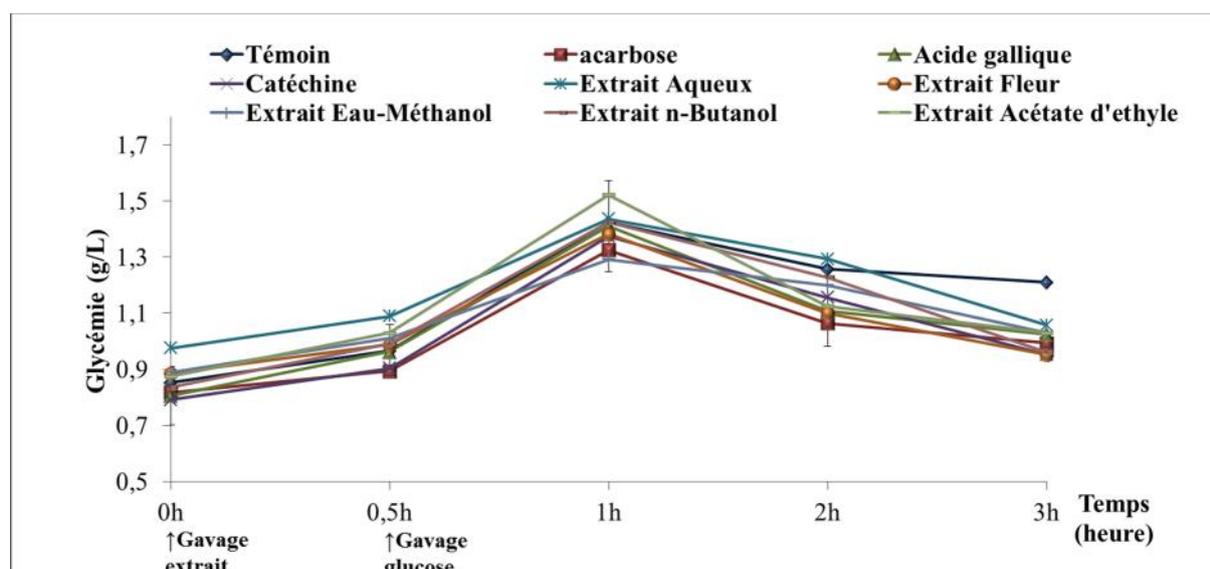
**Annexe 1 :** Effet des extraits de *O. angustissima* et molécules de références (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par l'amidon.



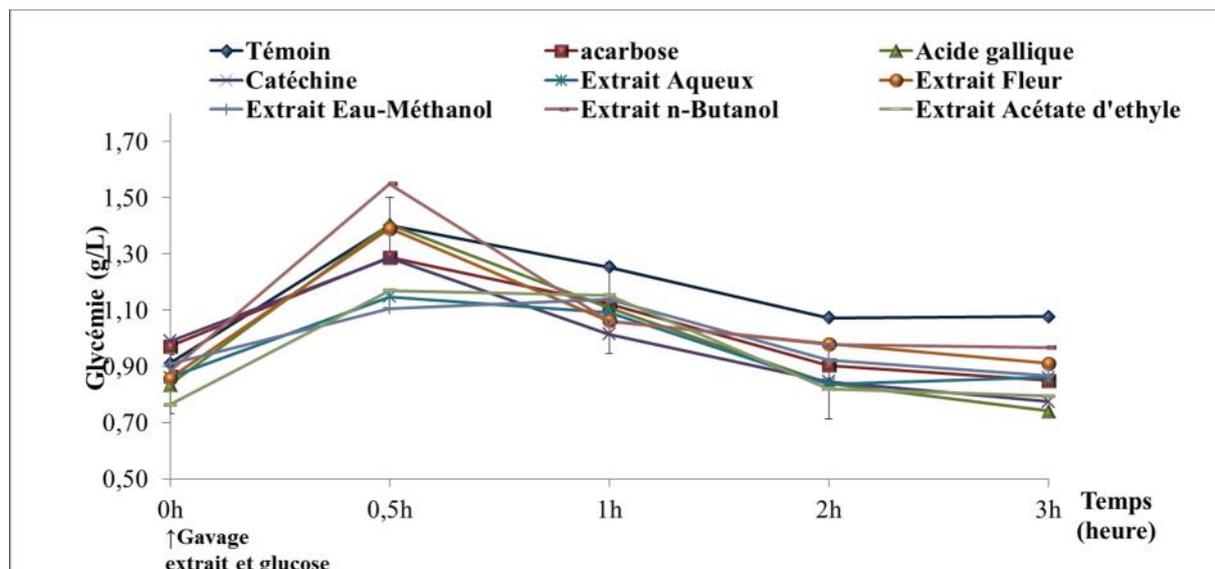
**Annexe 2 :** Effet des extraits de *O. angustissima* et molécules de références (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par le saccharose.



**Annexe 3 :** Effet des extraits de *O. angustissima* et molécules de références (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par le maltose.



**Annexe 4 :** Effet des extraits de *O. angustissima* et molécules de références (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par glucose



**Annexe 5 :** Effet des extraits de *O. angustissima* et molécules de références (acarbose, catéchine et acide gallique) à 50 mg/kg p.c sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale par glucose (co-administration)

**Publication**

## *In vitro* $\alpha$ -amylase and $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Ononis angustissima* extracts

Hind Laoufi, Nabila Benariba\*, Sara Adjdir, Rabah Djaziri

Laboratoire Antibiotique, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et activité Biologique. Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, Algeria.

---

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received on: 14/08/2016

Accepted on: 25/10/2016

Available online: 27/02/2017

#### Key words:

$\alpha$ -glucosidase inhibition,  $\alpha$ -amylase inhibition, Fabaceae, *Ononis angustissima*, polyphenols, flavonoids.

---

### ABSTRACT

The purpose of present study was to investigate the effects of extracts of *O. angustissima* a traditional medicinal plant, on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities *in vitro*. The air-dried aerial parts of *O. angustissima* flowers, leaves and stems were extracted with distilled water (AE) and aqueous methanol (MeOH-H<sub>2</sub>O); ethyl acetate (EtAOc) and n-butanol extracts (n-BuOH) were obtained from MeOH-H<sub>2</sub>O crude extracts per liquid/liquid extraction. The results of the both enzyme inhibition activity was found in a dose-dependent manner. The strongest activity in case of  $\alpha$ -glucosidase was shown by MeOH-H<sub>2</sub>O and n-BuOH extracts of *O. angustissima* with IC<sub>50</sub> value 0.94 and 0.99 mg/mL, respectively, whereas AE and EtOAc extract showed 1.10 and 1.17 mg/mL as IC<sub>50</sub> value respectively compared with the standard acarbose having IC<sub>50</sub> value 0.046 mg/mL. Whereas the higher activity in case of  $\alpha$ -amylase inhibition, was found in MeOH-H<sub>2</sub>O extract (IC<sub>50</sub> = 2.01 mg/mL) followed by AE (2.52 mg/mL) and n-BuOH extract (2.88 mg/mL) respectively, compared with acarbose having IC<sub>50</sub> value of 0.044 mg/mL. All extract from this plant possess moderate  $\alpha$ -amylase inhibition with potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity which may offer better therapeutic strategy to minimized postprandial hyperglycemia and its complications.

---

### INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM), a chronic metabolic disorder characterized by high blood glucose levels, continues to be a major medical concern worldwide due to its high prevalence and potential deleterious effects. One goal of therapy for diabetic patients, especially type 2, is the maintenance of normal blood glucose levels after meal (DeFronzo, 1999). Postprandial hyperglycemia plays an important role in the development of type 2 diabetes and its complications. One of the therapeutic approaches for decreasing of blood glucose rise after a meal is to retard the absorption glucose by inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes such as  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase (DeFronzo, 1999; Chiasson *et al.*, 2002). Due to its high prevalence and potential deleterious effects, type 2 diabetes

mellitus (T2DM) continues to be a major medical concern and major metabolic disorder and a multifactorial disease that is increasing worldwide (Zimmet, 2011). Recently, it has become one of the most common endocrine disorders and it has been reported that postprandial hyperglycemia is an important contributing factor for the development of diabetic complications (Monami *et al.*, 2013). Postprandial hyperglycemia is one of the earliest observable abnormalities of glucose homeostasis associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM) (Baron, 1998). It plays an important role in the development of Type 2 diabetes mellitus and its associated chronic complications, such as micro- and macro-vascular disorders (neuropathy, cardiovascular, and cerebrovascular diseases) (Boutati and Raptis, 2004). It has been established that postprandial hyperglycemia strongly depends on the absorbed monosaccharides and the velocity of absorption in the small intestine and it is mediated by carbohydrates hydrolyzing enzymes such as pancreatic  $\alpha$ -amylase and intestinal  $\alpha$ -glucosidase: two members of exo-acting glycoside hydrolase enzymes (glucosidase).

---

#### \* Corresponding Author

Nabila Benariba, Laboratoire Antibiotique, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et activité Biologique. Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, Algeria. Email: [benaribanabila@yahoo.fr](mailto:benaribanabila@yahoo.fr)

Postprandial glucose levels can be regulated through  $\alpha$ -glucosidase inhibition. Inhibition of these enzymes delay and in some cases halt carbohydrate digestion thus prolonging overall carbohydrate digestion time causing a reduction in the rate of glucose absorption and consequently reducing postprandial plasma glucose rise (Henfeld *et al.*, 2004).

Nowadays, alpha-glucosidase inhibitors like acarbose, miglitol and voglibose are oral blood glucose lowering drugs communally used. They are also the only drug class that does not target a pathophysiological object in T2DM. They decrease postprandial hyperglycemia without inducing insulin secretion; these compounds do not induce hypoglycemia and have a good safety profile, although gastrointestinal adverse effects may limit long-term compliance to therapy (Neuser, 2005).

The research for new group of agents from nature resources especially from traditional medicines became an attractive approach for the treatment of postprandial hyperglycemia.

These traditional medicines are relied upon for health care in many parts of the world (WHO, 1980). Several medicinal plants species have been used to control diabetes in the traditional medicinal systems of many cultures worldwide (Grover *et al.*, 2002; Bnouham *et al.*, 2006; Mentreddy, 2007; Sales *et al.*, 2012). A number of them are known to exert their antihyperglycemic activity via the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes. Therefore, natural inhibitors from plant sources can offer an attractive strategy for the effective control of postprandial hyperglycemia without or less unwanted secondary effects (Ali and Houghton, 2006; Tundis, 2010). The potential role of medicinal plants as inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase has been reviewed by several authors. A variety of plants has been reported to show an enzymatic inhibitory activity and so many are relevant to the treatment of type 2 diabetes (Benalla, 2010; Sudha, 2011; Sales, 2012).

Published research suggests that there is a direct relationship between of phenolic compound, flavonoids, and condensed tannin in the plant extract and the ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities (Tadera *et al.*, 2006; Adisakwattana and Chanathong, 2011). Many phenolic compounds such as flavonoids and anthocyanin have positive effects on diabetes, by inhibiting the two keys enzymes hydrolyzing carbohydrates in the digestive tract (Lo Piparo *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2010; Rubilar *et al.*, 2011; Sales 2012; Wongsang *et al.*, 2012)

*Ononis angustissima* Lam. subsp. polyclada Murb is perennial herbs and shrubs belongs to the Fabaceae (Dobignard, 2013; Benabderahmane *et al.*, 2014). *Ononis* is a genus (tribe Trifolieae) comprising 75 species occurring in the Canaries, the Mediterranean region, North of Africa, North of América and from Europe to Central Asia (Mezrag *et al.*, 2013).

Biological type of *O. angustissima*, identified as champhyte and the phytogeography type as Algerian endemic (Bouheroum, 2009; The Algerian Journal of Arid Areas, 2012) of the north of the septentrional area of the Sahara and hammadas

(Cheriti *et al.*, 2011; Benabderahmane *et al.*, 2014). It's reported to be a medicinal plant, It use as decoction for its hemostatic properties due to its specific secondary metabolites content with original chemicals and biological characteristics (Chahma and Djebbar, 2008; Chehma and Youcef, 2009). It was also used in the treatment of diabetes in traditional Algerian medicine (Khacheba *et al.*, 2014)

Recently, *O. angustissima* was studied for its phytochemical composition, several flavonoids were identified (Bouheroum, 2009; Mezrag, 2013) two compounds are new in the genus: 2, 3, 4-Trihydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one or 2', 3', 4'-Trihydroxychalcone and 6-Hydroxyaurone, thus they are isolated for the first time in this species (Benabderahmane *et al.*, 2014). It was also studied for its antioxidant activity (Djeridane *et al.*, 2010; Ghribi *et al.*, 2015).

The aim of this study is to investigate the inhibitory potential of aerial part extracts of *O. angustissima* on mammalian carbohydrate digesting enzymes. It evaluated *in vitro* inhibition of rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) and porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) activities by its crude aqueous and hydromethanolic extracts with its butanolic and ethyl acetate fractions, besides phytochemical analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and reagents

Porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) (PPA), 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNSA color reagent), Soluble potato starch, p-nitrophenyl-  $\alpha$  -D-glucopyranoside (p-NPG), catechin, Gallic acid were obtained from Sigma-Aldrich Chimie GmH, Germany. Acarbose from Glucobay (Bayer, Germany), Sigma-Aldrich Chimie GmH, Germany. All other chemical reagents used in this study were of analytical grade.

### Plant material

Fresh aerial parts (flowers, stems and leaves) of *O. angustissima* were collected from Ain Safra (western Algeria) during spring. The plant was authenticated by a taxonomist at the department of Ecology, University of Tlemcen, Algeria. Voucher specimen was deposited at the Herbarium of the department. In laboratory the Plant materiel were washed under running tap water and shade dried at ambient temperature. Thereafter dry up sample entirely broken manually, cut into small pieces and conserved sheltered from humid conditions until use.

### Preparation of extracts

#### Aqueous extract (AE)

The dried aerial part of *O. angustissima*: flowers, stems and leaves (30 g) were extracted under reflux in distilled water (450 mL) for 30 min at 50 °C. Aqueous extract (AE) was filtered and evaporated to dryness.

#### Hydromethanolic extract (MeOH-H<sub>2</sub>O)

60 g of *O. angustissima* dried aerial part (flowers, stems and leaves) were extracted by maceration in 480 mL H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH

mixture 30/70 (room temperature for 48 h); thereafter, the mixture was filtered and evaporated to dryness.

#### Ethyl acetate (EtAOc) and butanol (n-BuOH) extracts

Ethyl acetate and butanolic extracts were recovered from hydro-methanolic solution previously described (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH mixture 30/70). After extraction and concentration of MeOH-H<sub>2</sub>O; the aqueous phase underwent liquid-liquid extraction successively with chloroform and hexane, followed by a 2-fold extraction with ethyl acetate, this organic phase was evaporated to dryness. Then, the recovered aqueous phase was followed by extraction with n-Butanol; organic phase was evaporated to dryness.

#### Phytochemical screening

Phytochemical examinations were performed for all the extracts using standard methods. Alkaloids (Dragendorff and Mayer reagent), reducing compounds (Fehling reagent), coumarin, quinones, flavonoids (cyanidine reaction), tannins (iron chloride), saponin and terpenoids (Liebermann Burchard reaction) (Trease and Evans, 1989; Harbone, 1998).

#### Determination of total phenolic contents (TPC)

The amount of phenols in each extracts of *O. angustissima* was determined, with Folin-Ciocalteu reagent using the method of Vermerris *et al.*, (2006) with slight modifications. Samples were compared to each other. Briefly, 2 mL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2% w/v) was added to 0.1 mL of sample (extracts or standard) and 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent (0.2 N). The resulting mixture was incubated at room temperature for 30 min before absorbance measurement at 700 nm. Results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) in g of extract (mg GAE/g). Gallic acid was used as standard.

#### Determination of total flavonoids contents (TFC)

Total flavonoids content of the extracts was determined according to colorimetric method described by Zhishen *et al.*, (1999) with few modifications. 500 µL of each sample or catechin as standard was mixed with 2 mL of distilled water and 150 µL of sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub> 15%). After, addition of 150 µL of aluminum chloride (10%) and 2 mL of sodium hydroxide, the reaction mixture was incubated 15 min and then the absorbance was measured at 510 nm. The results are expressed in milligrams equivalent catechin per gram of extract (CEq mg/g) given in table 2 using the linear equation of the calibration curve of catechin.

#### In vitro porcine pancreatic α-amylase inhibition assay

The α-amylase inhibitory activity was determined by assay adapted from method of Bernfeld (1955). The reaction mixture contain: 200 µl of the tested extracts of *O. angustissima* (0.18-10 mg/mL), 200 µL of 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 6.9; 6.7 mM NaCl) containing 1.3 U/mL of porcine pancreatic α-amylase solution (PPA). The reaction medium was pre-incubated at 37 °C for 5 min, and then 200 µL of 0.4 % starch solution in the above buffer were added and incubated at 37 °C for 10 min. 600

µL of DNSA solution was added to the reaction and placed in a boiling water bath for 7 min, then cooled down in cold water. The reaction mixture was then diluted after adding 1 mL of distilled water and the absorbance was measured at 540 nm. To eliminate the absorbance produced by plant extract, appropriate extract controls with extract and except the enzyme were also included. Commercial inhibitor acarbose was used as a positive control at a concentration range of 0.040-2.670 mg/mL. As a blank buffer solution was used instead of substrate. The tube with enzyme solution but without plant extracts/acarbose served as the control with total enzyme activity. The enzyme inhibition rate expressed as percentage of inhibition was calculated using the following formula:

$$\text{Inhibition of } \alpha\text{-amylase activity (\%)} = ((\text{Abs C} - \text{Abs S}) / \text{Abs C}) * 100$$

Where Abs C is the absorbance of the control (100 % enzyme activity) and Abs S is the absorbance of the tested sample (plant extract or acarbose).

#### In vitro intestinal rat α-glucosidase inhibition assay

##### Preparation of the crude enzyme solution from small intestinal mucosa of rat

Inhibitory activities on α-glucosidase were measured using a crude extract obtained from small intestinal rat mucosa, as mammalian source of enzyme according to slightly modified method of Dahlqvist (1964). p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (p-NPG) was used as substrate which is hydrolyzed to p-nitrophenol, a colored product that can be monitored at 405 nm (Bergmeyer and Bernt, 1974).

##### Preparation of the crude enzyme solution

After 20 hours of fasting, rats are scarified under light anesthesia. Their small intestine (the 20 cm of jejunal portion about 10 cm below the pylorus) was removed, rinsed with ice-cold saline and the mucosa was delicately scraped off with a slide glaze. Mucosa from 5 rats was pooled and homogenized with 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) sonicated and centrifuged at 4 °C for 20 min at 5000 rpm. The supernatant was used for the assay of α-glucosidase. Its specific activity was determined (one unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmole of p-nitrophenol from p-NPG per minute at 37 °C at pH 6.8 per mg of protein. Protein content was determined using Lowry's method. The enzymatic solution (about 0.94 U/mg prot) was aliquoted in 1 mL cryotubes and stored at -20 °C until used.

##### α-glucosidase inhibitory assay

200 µL of a crude enzyme solution of rat intestinal α-glucosidase (adjusted to 0.2 U/mL as initial concentration in phosphate buffer 67 mM, pH 6.8) was mixed with 200 µL of the sample: plant extract (0.06-1.18 mg/mL) or acarbose, positive control, (0.001-0.118 mg/mL) solutions and 1 mL of phosphate buffer. The mixture was pre-incubated at 37 °C for 10 min after which 300 µL of p-NPG solution (10 mM) was added and the

reaction mixture further incubated at 37 °C for 40 min. The reaction was terminated by adding 3 mL of sodium carbonate Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mM) into the mixture to stop the reaction. The absorbance of the liberated p-nitrophenol was measured at 405 nm. As a blank, buffer solution was used instead of substrate. The tube with enzyme solution but without plant extracts/acarbose served as the control with total enzyme activity. The enzyme inhibition rate expressed as percentage of inhibition was calculated using the following formula:

Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity (%) = ((Abs C - Abs S)/Abs C)\*100

Where Abs C is the absorbance of the control (100 % enzyme activity) and Abs S is the absorbance of the tested sample (plant extract or acarbose).

### Statistical analysis

The experiments were performed in triplicates and the results were expressed as the mean values  $\pm$  SD. The IC<sub>50</sub> i.e. the concentration of extract/acarbose resulting in 50% inhibition of enzyme ( $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase) was calculated by logarithmic regression analysis using Microcal Origin 5.0 (Microcal software, Inc. 1.0.0.1).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Phytochemical screening

Table 1 provide the preliminary phytochemical screening of *O. angustissima* extracts, The results shows the wealth of MeOH-H<sub>2</sub>O, n-BuOH and EtAOc extracts on alkaloids, tannins and flavonoids, these latter components are weakly present in EA extract. Terpenoids were abundantly present in all extracts, while a low detection of coumarins, amino acids and reducing sugar was observed in all extracts. Phytochemicals in plant extracts depends on the plant material (leaves, stems, seeds, roots) and its origin (moist or arid region). Also, the solvent polarity and the method of extraction may influence the composition of each extract on chemical constituents.

**Table 1:** Phytochemical screening of *O. angustissima* aerial part extracts.

	AE	MeOH-H <sub>2</sub> O	n-BuOH	EtAOc
Flavonoids	+	+++	+++	+++
Alkaloids	+	+++	+++	+++
Tannins	+	+++	+++	+++
Saponins	++	+++	++	+++
Terpenoids	+++	+++	+++	+++
Quinones	++	+++	++	+++
Coumarins	++	+	+	-
Antraquinones	-	-	-	-
Reducing compounds	++	++	+	+
amino acid	+	++	+++	+

### Total polyphenol and flavonoid content

Table 2 includes the polyphenol and flavonoids content in *O. angustissima* extracts. The obtained results reveals a comparative rate of polyphenols in hydromethanolic MeOH-H<sub>2</sub>O, n-BuOH and EtOAc extracts, 78.11, 74.55 and 72.21 mg GAE/g,

respectively. In the aqueous extract EA, we determined 65.29 mg GAE/g.

Concerning flavonoids content (Table 2), hydromethanolic, and EtOAc extracts contain the highest level, about 32 mg CEq/g. However n-BuOH and AE extracts present lower concentration of flavonoids, ranging from 12 to 16 mg CEq/g of extract.

**Table 2:** Total polyphenols and flavonoids content of *O. angustissima* aerial part extracts.

Extracts	Polyphenols*	Flavonoids*
AE	65.29 $\pm$ 0,03	12.60 $\pm$ 0.01
MeOH-H <sub>2</sub> O	78.11 $\pm$ 0,01	34.14 $\pm$ 0.03
n-BuOH	74.55 $\pm$ 0,01	16.66 $\pm$ 0.00
EtOAc	72.21 $\pm$ 0.04	32.01 $\pm$ 0.01

\* mg gallic acid equivalent /g extract.

Further, the results of recent studies of Djeridane *et al.*, (2010) which have shown that the ethyl acetate extract obtained from roots of *O. angustissima* contain 12.03 mg GAE/g of dry matter and 02.35 mg rutin eq/g of dry matter. Khacheba *et al.*, (2014) determined the amount of the polyphenol and flavonoids of the aqueous extracts obtained from leaves of this plant (1.91  $\pm$  0.52 mg GAE/g dw of polyphenols, and 1.16  $\pm$  0.51 mg rutin eq/g dw of flavonoids). Plant extracts content on phytochemicals is dependent on used material, its origin, the harvest period and moisture. In addition, solvent with different polarities have significant effects on the phenolic content. According to some researchers, water and methanol are frequently used for extraction of polyphenolic compounds from different plants (Siddhuraju and Becker, 2003; Sultana *et al.*, 2009).

### In vitro $\alpha$ -amylase inhibition assay

The results in figure 1 showed the percentage inhibition of *O. angustissima* extracts and acarbose against  $\alpha$ -amylase. All of them demonstrated a significant dose-dependent reduction in  $\alpha$ -amylase activity. The most important inhibition appeared in the MeOH-H<sub>2</sub>O extract while the EtOAc extract present a weakest effect. Comparatively to acarbose, reference compound, using IC<sub>50</sub> values (resulting in 50% inhibition of enzyme activity) it is estimated to be 0.044 mg/mL for acarbose (Table 3) and 33 to 74 fold higher for plant extracts tested.

**Table 3:** IC<sub>50</sub> value for Inhibitory activity against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase and intestinal rat  $\alpha$ -glucosidase.

	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	
	$\alpha$ -amylase	$\alpha$ -glucosidase
Acarbose	0.044 $\pm$ 0.01	0.046 $\pm$ 0.01
EA	2.52 $\pm$ 0.02	1.10 $\pm$ 0.01
MEOH-H <sub>2</sub> O	1.46 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01
n-BuOH	1.17 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.01
EtOAc	3.26 $\pm$ 0.02	2.58 $\pm$ 0.02

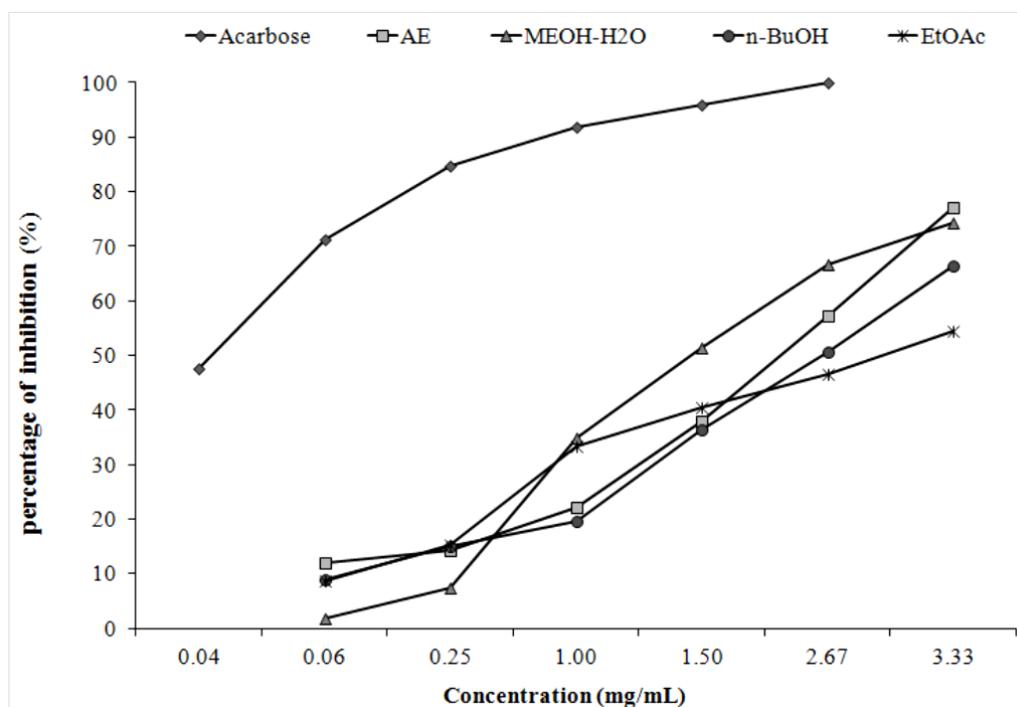
These results suggest that the bioactive exerting the inhibitory effect against  $\alpha$ -amylase may be present in all plant extracts at different concentration, diluted among other not active compounds. Phytochemical analysis revealed that the extracts are rich in polyphenolic components. MeOH-H<sub>2</sub>O extract showed the

higher amounts in comparison to other extracts, it contains 78.11 mg GAE/g extract of phenolic compounds and 34.14 mg CEq/g extract of flavonoids.

Previous studies concerning other plants from Fabaceae family were screened for  $\alpha$ -amylase activity and showed inhibitory activity. They been reported with  $\alpha$ -amylase inhibitory activity, namely: *Galega officinalis*, *Phaseolus vulgaris* and *Tamarindus indica* which shown respectively 35, 45-75, 90% inhibition of  $\alpha$ -amylase at concentration of 200 mg/mL (Sales *et al.*, 2012). Extracts from *O. angustissima* are more potent inhibitors of  $\alpha$ -amylase since they reached 77% at concentration of 3.3 mg/mL comparing to: *Galega officinalis* L. known for its antidiabetic property containing galegine (guanidine), as source of an oral antidiabetic drug, Metformine, acting by reduction of hepatic gluconeogenesis (Fabrican and Fransworth, 2001); while extract of *Trigonella foenum-graecum* have an  $IC_{50}$  value of 1.92 mg/mL (Nickavar and Yousefian, 2011) so close to  $IC_{50}$  of *O. angustissima* (1.46-3.26 mg/mL). It's well documented that polyphenols have  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity that depends on phenolic profile (Kwon *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2014). Flavonoids are a major group of polyphenolic compounds which have been reported to possess inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase (Kim *et al.*, 2000; Tadera *et al.*, 2006; Williams G, 2013). In relation to their structure, number and position of their hydroxyl groups in the molecule which

are determining factors for enzymes inhibition. The inhibitory activity increased considerably with an increase in the number of the hydroxyl group on the B ring (Tadera *et al.*, 2006). Baicalein, a flavone glycoside, inhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity by 41% and 57% at 1 mM ( $IC_{50}$ =192.67 mg/mL), respectively. Also, Myricetin (flavonol) inhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity by 36% and 48% at 1 mM ( $IC_{50}$ =327.77 mg/mL), respectively (Ng *et al.*, 2015). According to the author, the inhibitory activity of flavonoids was attributed to two interactions: the hydroxyl groups in the flavonoid molecular structure can form hydrogen bonds with the OH groups in active side chains of functional amino acids of the enzyme, and conjugated  $\pi$ -system is likely to be formed between the AC ring system and the indole Trp59 in the enzyme. Both the interactions can hinder the reaction between  $\alpha$ -amylase and starch which inhibits the starch digestion (Ng *et al.*, 2015).

Anthocyanins competitively inhibited porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, Cyanidin-3-glucoside have the highest inhibition activity with the  $K_i$  value of 0.014 mM, followed by cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3,5-glucoside, and peonidin-3-glucoside with the  $K_i$  value of 0.019, 0.020, and 0.045 mM, respectively (Sui *et al.*, 2016). By the molecular docking study, the author showed that anthocyanins occupied the active site of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase forming hydrogen bonds; GLU233 was found to be the common key side chain for imparting the inhibition activity.



**Fig. 1:** *In vitro* inhibitory activity of *O. angustissima* aerial part extracts against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (percentage of inhibition (%)  $\pm$  SD).

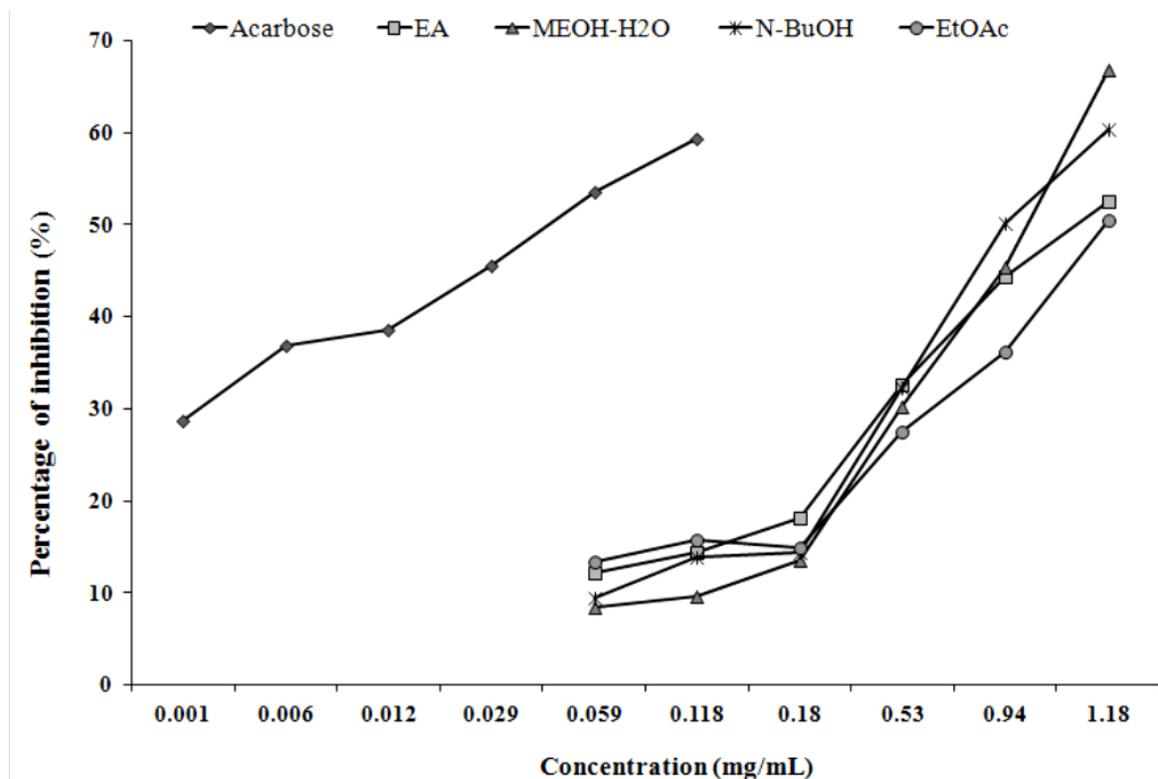


Fig. 2: *In vitro* inhibitory activity of *O. angustissima* aerial part extracts against intestinal rat  $\alpha$ -glucosidase (percentage of inhibition (%)  $\pm$  SD).

### *In vitro* $\alpha$ -glucosidase inhibition assay

The concentration-dependent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities and the  $IC_{50}$  values were estimated as indicated in figure 2 and table 3, respectively. The four plant extracts tested showed a concentration-dependent inhibitory activity with a similar evolution profile using graded concentrations. For comparison,  $IC_{50}$  values of samples are relatively close but higher than  $IC_{50}$  of acarbose (0.046 mg/mL). This last is about 20 fold lower than  $IC_{50}$  of plant extracts. This observation suggest that bioactive compounds inhibiting  $\alpha$ -glucosidase activity are present in all extracts and will be extracted by different solvents used in this study. When comparing the resulting  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase  $IC_{50}$  values, plant extracts showed a higher  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity than  $\alpha$ -amylase (Table 3).

When regard to the antidiabetic effect of acarbose, the use of this drug is reported to be associated with gastrointestinal side effects caused by the excessive inhibition of pancreatic  $\alpha$ -amylase resulting to abnormal bacterial fermentation of undigested carbohydrates in the large intestine (Bischoff *et al.*, 1985). It is supported that any bioactive composed having lower inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase and stronger inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase may be an effective therapeutic agent for the control of postprandial hyperglycaemia with fewer side effects than acarbose (Kwon *et al.*, 2008).

A systematic review of literature revealed that terpenes, alkaloids, flavonoids and phenols showed potent inhibitory activity toward  $\alpha$ -glucosidase (Yin *et al.*, 2014). Yeast  $\alpha$ -glucosidase was potently inhibited by members of the anthocyanidin, isoflavone

and flavonol subgroups with  $IC_{50}$  values below 15 mM, rat  $\alpha$ -glucosidase was only slightly inhibited by compounds belonging to the anthocyanidin and isoflavone subgroups (Wenzel, 2013). Similarly, quercetin possess high inhibitory effect. The  $IC_{50}$  values against yeast  $\alpha$ -glucosidase ( $K_i=8.5$  mol/L), rat intestinal sucrose, and amylase were 8.86 g/mL, 216 mol/L and 71 mol/L, respectively (Yin *et al.*, 2014). Likewise, rutin a glycosylated flavonoid, showed an acarbose-like inhibitory effect on maltase activity and this was highly specific to maltase (Pereira *et al.*, 2011). The activity is relative to the chemical structure of these compounds. In the flavonoid structure, the C5, C6 and C7 OH groups of the A-ring are essential elements for inhibitory activity (Ng *et al.*, 2015). Also, the 2,3-double bond, 5-OH, the linkage of the B ring at the 3 position, and the hydroxyl substitution on the B ring enhanced the inhibition, while 3-OH reduced it (Tadera *et al.*, 2006). In this work, we used mammalian source of digestive enzymes  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidases for *in vitro* inhibitory assay, which are structurally and mechanistically closely related to human enzymes (Bayer *et al.*, 1995). Porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase and yeast  $\alpha$ -glucosidases are usually used for anti-diabetes nutraceutical and medicinal investigations as a model for screening potential inhibitors, because they are readily available in a relatively pure form (McDongall and Stewart, 2005).

Intestinal  $\alpha$ -glucosidase is a key enzyme for carbohydrate digestion; it has been recognized as a therapeutic target for the modulation of postprandial hyperglycemia. However, mammalian  $\alpha$ -glucosidases crude extract from rat intestinal mucosa contains more than one enzyme activity, it is a mixture of sucrase, maltase,

isomaltase, glucoamylase (Jones *et al.*, 2011; Dhital *et al.*, 2013). pNPG, the chromogenic substrate is a common and non-specific substrate, which react indifferently with all these enzymes present in the mixture but inhibition reaction could be more specific and concern only a kind of these enzymes. This leads to an underestimated rate of inhibition activity. So it is more relevant and interesting when evaluating inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase to use specific substrate for each one, as maltose, saccharose, isomaltose for more accuracy and in an other hand, to be closer to physiological conditions, in the small intestine where the major carbohydrate are disaccharides.

## CONCLUSION

Obesity and the onset of diabetes are two closely linked medical complications prevalent globally. Postprandial hyperglycemia is one of the earliest abnormalities of glucose homeostasis associated with type 2 diabetes. Postprandial glucose levels can be regulated through  $\alpha$ -glucosidase inhibition. Medicinal plants constitute an important source of potential therapeutic agents for Type 2 Diabetes Mellitus. One vital therapeutic approach is the use of agents that can decrease postprandial hyperglycemia by inhibiting carbohydrate digesting enzymes resulting in a delay of carbohydrate digestion to absorbable monosaccharide. In this preliminary work, we attended to evaluate the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of some extracts of *O. angustissima* to clarify its traditional use as antidiabetic treatment. Obtained results of the both enzyme inhibition activity, found in a dose-dependent manner constitute the first report for this plant. Further, *in vitro* and *in vivo* researches are required to confirm the present results, isolate and determine active substances and phenolic components contained in the extract of this plant that may be responsible for improvements in health conditions by regulating digestive enzymes inhibitory activities. *In vivo* studies are necessary to recognize a potential substance for clinical use in the therapy of diabetes and related disorders, so it is desirable to optimize secondary metabolite production and purification of compounds for the pharmaceutical applications. Furthermore, other studies *in vitro* and *in vivo* are needed to confirm these findings and characterize and determine bioactive components responsible of this effect. The present study confirms the traditional use of *O. angustissima* to treat diabetes mellitus.

## ACKNOWLEDGMENT

This project was supported by Algerian academic research project CNEPRU F02020120097, Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) Algerian Government.

## REFERENCES

Algerian Journal of Arid Areas. Journal Algerien des Regions Arides. Revue Scientifique Internationale, 2012; N° 09/10/11.

- Ali H, Houghton PJ: Alpha amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes, with particular reference to *Phyllanthusamarus*. *J Ethnopharmacol*, 2006; 107:449-455.
- Baron AD. Postprandial hyperglycaemia and alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1998; 40(Suppl):51-55.
- Bayer GD, Cuo Y, Whithers SG. The structure of human pancreatic  $\alpha$  amylase at 1.8 Å resolution and comparison with related enzymes. *Protein Science*, 1995; 4: 1730-1742.
- Benabderahmane W, Mezrag A, Bouheroum M, Benayache F, Mosset P. The chemical investigation of the chloroformic extract of *Ononisangustissima* Lam. *Var. species. Der Pharmacia Lettre*, 2014; 6(3):88-91.
- Benalla W, Bellahcen S, Bnouham M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current Diabetes Reviews*, 2010; 6 (4): 247-254.
- Bermeyer HU, Bernt E. *Methods of enzymatic analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. New York, 1974; 1205-1215.
- Bernfeld P.  $\alpha$ -Amylase and  $\beta$ -Amylase. *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, 1955; 1:149-158.
- Bischoff H, Pulse J, Krause HP, Schitt H, Thomas G. Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAY M 1099 (miglitol) and BAYO 1248. *Diabetes Res Clin Pract*, 1985; Suppl(1):553.
- Bnouham M, Ziyat A, Mekhfi H, Tahri A, Legsseyer A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity- A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int J Diabetes and Metab*, 2006; 14:1-25.
- Bouheroum M, Zaiter L, Benayache S, Benayache F, Bermejo J, Leon F, Garcia V. Four flavonoides from the aerial part of *Ononisangustissima* species, *Chemistry of Natural Compounds*, 2009; 45(6):874-875.
- Boutati EI, Raptis SA. Post prandial hyperglycemia in type 2 diabetes: Pathophysiological aspect, teleological notions and flags for clinical practice. *Diabetes Res. Rev.*, 2004; 20:13-23.
- Chehma A, Djebar MR. Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien: distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Revue des sciences et de la technologie : Synthèse*, 2008 ; 17:36-45.
- Chehma A, Youcef F. Variations saisonnières des caractéristiques floristiques et de la composition chimique des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Sécheresse*, 2009; 20(4): 373-381.
- Cheriti, A., Talhi, M. F., Belboukhari, N., & Taleb, S. Copper ions biosorption properties of biomass derived from Algerian Sahara plants. 2011; INTECH Open Access Publisher.
- Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., & STOP-NIDDM Trial Research Group. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet*, 2002; 359(9323), 2072-2077.
- DeFronzo, R. A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*, 1999; 131(4), 281-303.
- Dhital S, Lin AH, Hamaker BR. Mammalian mucosal alpha-glucosidase coordinate with alpha-amylase in the initial starch hydrolysis stage to have a role in starch digestion beyond glucogenesis. *PLOS one*, 2013; 8(4): e62546.
- Disakwattana S, Chanathong B.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of *Moringaoleifera* leaf extract. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2011; 15:803-808.
- Djeridane A, Yousfi M, Michel Brunel J, Stocker P. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants, *Food Chem. Toxicol*, 2010; 48 : 2599-2606.
- Dobignard A. *Ononisangustissima* Lam. *Tela Botanica Base de Données Nomenclaturale Afrique du Nord*, 2013; <http://www.tela-botanica.org>.
- Ghribi L, Waffo-Téguo P, Cluzet S, Marchal A, Marques J, Mérillon JM, Ben jannet H. (). Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015; 25 : 3825-3830.

- Grover JK, Yadav S, Vats V: Medicinal plants of india with antidiabetic potential. *J Ethnopharmacol*, 2002; 81: 81-100.
- Hanefeld M, Cagatay M, Petrowitsch T. Acarbose reduces the risk for myocardial infarction in type 2 diabetic patients: meta-analysis of seven longterm studies. *Eur Heart J*. 2004; 25(1):10-16.
- Harbone JB. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall Thomson science (UK), 3eme ed, 1998; 203-234.
- Jo S H, Ka E H, Lee H S, Apostolidis E, Jang H D, Kwon Y I: Comparison of Antioxidant Potential and Rat intestinal  $\alpha$ -Glucosidases inhibitory Activities of Quercetin, Rutin, and Isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2010; 2(4):52-60.
- Jones K, Sin C, Mohan S. Mapping the intestinal alpha glucogenic enzyme specificities of starch digesting maltase-glucoamylase and sucrose-isomaltase. *Bioorg Med Chem*, 2011; 19(13):3929-3934.
- Kang BH, Racicot K, Pilkenton SI, Aporrolidis E. Evaluation of the in vitro antihyperglycemic effect of *Cinnamomum cassia* derived phenolic phytochemicals via carbohydrate hydrolyzing enzyme inhibition. *Plant Foods Hum Nutr*, 2014; 69:155-160.
- Khacheba I, Djeridane A, Yousfi M. Twenty Traditional Algerian Plants Used in Diabetes Therapy as Strong Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase Activity. Hindawi Publishing Corporation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2014;1-12.
- Kim JS, Kwon CS, Sou KH. Inhibition of alpha glucosidase and amylase luteolin, a flavonoid. *Bioscience Biotechnol Biochem*, 2000; 64: 2458-2461.
- KWON, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. Inhibitory potential of wine and tea against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal of Food Biochemistry*, 2008; 32(1), 15-31.
- Lo-Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou C J: Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human  $\alpha$ -Amylase. *Journal of Medicinal Chemistry J. Med. Chem*, 2008; 51(12): 3555-3561.
- McDongall GJ, Stewart D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 2005; 23: 189-195.
- Mentreddy SR. Medicinal plant species with potential antidiabetic properties. *J Sc Food Agric*, 2007; 87(5): 743-750.
- Mezrag A., Bouheroum M., Beghidja N., Khalfaoui A., Zaiter L., Benayache S., and Benayache F. More flavonoids from the ethyl acetate extract of *ononisangustissima* species. *Chemistry of Natural Compounds*, 2013; 49(4):749-750.
- Monami M, Adalsteinsson J E, Desideri C M., Raghianti B, Dicembrini I, Mannucci E: Fasting and post-prandial glucose and diabetic complication. A meta-analysis. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2013; 23: 591-598.
- Neuser D, Benson A, Brückner A, Goldberg R B, Hoogwerf B J, Petzinna D. safety and tolerability of Acarbose in the treatment of type 1 and 2 diabetes mellitus. *Clinical Drug Investigation*, 2005; 25(9):579-587.
- Ng K, Gu C, Zhang H, Patri CY. Evaluation of alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activity of flavonoids. *Int J NutrSci*, 2015; 2(6):1-6.
- Pereira D. F., Cazarolli L. H., Lavado C., Mengatto V., Figueiredo M. S. R. B., Guedes A., and Silva F. R. M. B. Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, 2011; 27(11), 1161-1167.
- Rubilar M, Jara C, Poo Y, Acevedo F, Gutierrez C, Sineiro J, Shene C: Extracts of Maqui (*Aristoteliachilensis*) and Murta (*UgnimolinaeTurcz.*): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/  $\alpha$ -Amylase Inhibitors. *J. Agric. Food Chem*, 2011; 59: 1630-1637.
- Sales PM, Souza PM, Simioni LA, Magalhães PDO, Damaris S.  $\alpha$ -amylase Inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2012; 15(1)142-183.
- Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant properties of various extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera lam.*) leaves. *J. Agric. Food Chem*, 2003; 51: 2144-2155.
- Sudha PZ, Injarde SP, Bhargava S, Kumar AR: Potent  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC complementary and alternative medicine*, 2011; 1-10.
- Sui, X., Zhang, Y., & Zhou, W. In vitro and in silico studies of the inhibition activity of anthocyanins against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Journal of Functional Foods*, 2016; 21, 50-57.
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, 2009; 14, 2167-2180.
- Tadera K, Minami Y, Takanatsu K, Matsuoka T. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *J. Nutr Sci Vitamol*, 2006; 52: 99-103.
- Trease GE, Evans WC. *A textbook of pharmacognosy* (13th edition) BacilleureThal Ltd, 1989; London.
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F: Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, 2010; 10(4):315-331.
- Wenzel, U. Flavonoids as drugs at the small intestinal level. *Current opinion in pharmacology*, 2013;13(6), 864-868.
- WHO (World Health Organization): Expert committee on diabetes mellitus, 2nd Report. Technical report series, 1980; 646 (9). World Health Organization, Geneva.
- Williams G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res*, 2013; 57:48-57.
- Wongsa P, Chaiwarit J, Zamaludien A: In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*, 2012; 131: 964-971.
- Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 2014; 3(3), 136-174.
- Youcef M, Chalard P, Figuéredo G, Marchioni E, Benayache F, Benayache S. Composition of the Essential Oil of *Ononis angustissima* (Lam.) Batt. Et Trab. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences Chemical RJPBCS*, 2014; 5(5): 1307-1310.
- Zhanga Z, Luoc A, Zhongc K, Huangd Y, Gaoc Y, Zhongc J, Gaoc H, Xua Z, Gaoa X.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity by the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Journal Of Functional Foods*, 2013; 5:1253 -1259.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming w. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chem*, 1999; 64:99-103.
- Zimmet P Z: The growing pandemic of type 2 diabetes a crucial need for prevention and improved detection. *Medicographia*, 2011; 33: 15-21.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. 2008. Isolation and identification of phenolic compounds. In *Phenolic compound biochemistry* (pp. 151-196). Springer Netherlands.

#### How to cite this article:

Laoufi H, Benariba N, Adjdir S, Djaziri R. In vitro  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Ononis angustissima* extracts. *J App Pharm Sci*, 2017; 7 (02): 191-198.

## Communications internationales

H. Laoufi, N. Benariba, The 19th International Congress PHYOPHARM, Bonn, GERMANY.  
21-24 juillet 2015.

Titre : «Effect of *Ononis angustissima* extracts on Glucose Uptake Across Non-Everted Rat Intestinal Sac Model»

H. Laoufi, 2nd Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, Antalya –  
TURKEY 22-25 Avril 2015.

Titre : «Inhibitory effects of *Ononis angustissima* extracts on  $\alpha$ -amylase activity»

سأهم الطب التقليدي ك  
الفوليات تخدمه تقليدياً  
دوية جديدة عن طريق الفحص التجريبي الكيماي والبيولوجي لمستخلصات النباتات الطبية. من بين ه  
هدف من هذ طروحة هو الدراسة الكيمايانية النباتية لبعض مستخلصات هذه التينة وكذا تقييم خصائصهما المضادة للآ  
( ) عند الجرذان ويستار.  
سأسية المحصل عليها تخبونا ان البوليفينولات و الفلافونيدات توجدان بكمية مرتفعة في المستخلصات العضوية بيتانول (n-BFT) -ميد (EMFT) وأسيتات بثيل (AcFT) للورق والسيقان  
72 70 (mg eq GA/g) البوليفينولات 16 34 (mg eq Cat/g) الفلافونيدات. هذه المستخلصات العضوية  
المخبرية التي أجريت ( / 0,4 0,1 ) .  
EMFT IC<sub>50</sub>FRAP يتغير 0,1 0,4 / ) .  
الإنزيم 1,46=IC<sub>50</sub> مغ/مل فيما يخص أميليزو المستخلص n-BFT يليه المستخلص EMFT فيما يخص جلوكوزيدازب 0,94=IC<sub>50</sub> / 0,99  
بالأخص المستخلصات العضوية n-BFT EMFT AcFT كيز 50 / الدم بنسبة تقليل 62,72 23,26 % كبير  
مع السكروز و المالتوز، يقل كبير AcFT مع السكروز و المالتوز، يقل كبير  
37,99 38,58 66,24 %  
O. angustissima كاتيشين (CT) الغاليك (AG) (AcB) يادي الى تخفيض كبير في  
عطاءهم بشكل منفصل (30 دقيقة قبل). فيما يخص تأثير مستخلصات O. angustissima  
( -26,79 -65,18 -64,29) AcFT AqFT EMFT كذلك عن طريق الحقن المتواصل في المعى الدقيق لجرذ مخضر، بين لنا أن بعض المستخلصات قادرة على منع امتصاص المعى للجلوكوز في مستوى النسيج  
للجلوكوز. تقييمه مخبريا (أكياس المعى الدقيق) كذلك عن طريق الحقن المتواصل في المعى الدقيق لجرذ مخضر، بين لنا أن بعض المستخلصات قادرة على منع امتصاص المعى للجلوكوز في مستوى النسيج  
مخبريا أعلى نشاطا SGLT1.  
EMFT (94,64%) . عليها خلال هذه الدراسة  
فيما يخص  
طريق منع هضم السكريات و بيط  
مما يؤكد ستخدامها التقليدي كنبذة مضادة للسكري. هذه  
المائبة. هذه النتائج هي أولية و تستحق أن تعمق أكثر من أجل تحديد و تمييز المركبات المسؤولة عن هذا  
EMFT (94,64%) . عليها خلال هذه الدراسة  
فيما يخص  
طريق منع هضم السكريات و بيط  
مما يؤكد ستخدامها التقليدي كنبذة مضادة للسكري. هذه  
المائبة. هذه النتائج هي أولية و تستحق أن تعمق أكثر من أجل تحديد و تمييز المركبات المسؤولة عن هذا

O. angustissima تسليط

الأميليزو جلوكوزيد

مفتاحية : Ononis angustissima

## Résumé :

La médecine traditionnelle a toujours servi comme une base à la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening expérimental phytochimique et biologique des extraits de plantes médicinales. Parmi ces plantes *Ononis angustissima* (L.) Lam. subsp. polyclada Murb, appartenant à la famille des fabacées, traditionnellement utilisée pour traiter le diabète sucré. L'objectif de ce travail est consacré à l'étude phytochimique de quelques extraits de cette plante ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydante (*in vitro*) et antidiabétique (*in vitro, in situ* et *in vivo*) chez des rats Wistar.

Les principaux résultats ont montré une teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes dans les extraits organiques n-Butanol (n-BFT), eau-méthanol (EMFT) et acétate d'éthyle (AcFT) de feuilles et tiges, 72 à 70 (mg eq GA/g) de polyphénols et 16 à 34 (mg eq Cat/g) de flavonoïdes. Ces extraits organiques ont présenté une activité antioxydante importante sur le DPPH (IC<sub>50</sub> varie de 4 à 5mg/ml) et FRAP (IC<sub>50</sub> varie de 0,1 à 0,4mg/ml). Les tests réalisés *in vitro* sur l'activité de l' -amylase et l' -glucosidase montrent un effet inhibiteur dose dépendant. L'activité inhibitrice la plus élevée est observée pour l'extrait EMFT avec un IC<sub>50</sub>=1,46 mg/ml pour l' -amylase et l'extrait n-BFT suivie par EMFT pour l' -glucosidase avec des IC<sub>50</sub> de 0,94 et 0,99 mg/ml respectivement. *In vivo* l'ensemble des extraits montrent un effet antihyperglycémiant important, en particulier les extraits organiques n-BFT, EMFT et AcFT à 50 mg/kg p.c, qui provoquent une diminution significative (p<0,05) de la charge glycémique provoquée par l'amidon à 66,24 ; 38,58 et 37,99 %, respectivement. L'administration de l'extrait AcFT avec le saccharose et le maltose, exerce un effet antihyperglycémiant significatif (p<0,05) avec un pourcentage de réduction de 62,72 et 23,26%, respectivement. La coadministration des différents extraits de *O. angustissima*, catéchine (CT), acide gallique (AG) ou acarbose (AcB) avec le glucose provoque une réduction significative de cette valeur par les extraits EMFT, AqFT et AcFT (-65,18 ; -64,29 et -26,79%, respectivement), comparativement à leur administration séparément (30 min avant). En ce qui concerne l'influence des extraits de *O. angustissima* sur l'absorption intestinale de glucose, son évaluation *in vitro* (sacs d'intestin) et *in situ* (perfusion de l'intestin de rat vivant anesthésié) montre que certains extraits sont capables d'inhiber l'absorption de glucose au niveau de l'épithélium interférant avec les transporteurs de glucose en l'occurrence SGLT1. *In vitro*, l'activité inhibitrice la plus élevée est observée pour les extraits n-BFT et AcFT (66 et 67,49%, respectivement). *In situ*, l'activité inhibitrice la plus élevée est observée pour l'extrait EMFT (94,64%). Les résultats obtenus au cours de cette étude sont prometteuses concernant les activités antioxydante et antidiabétique des extraits de *O. angustissima* en mettant en évidence l'un de leur mécanisme d'action possible : réduction de l'hyperglycémie postprandiale par inhibition de la digestion des glucides et ralentissement voire inhibition de l'absorption intestinale de glucose, ce qui confirme son utilisation traditionnelle comme plante antidiabétique. Ces propriétés sont toutefois plus importantes pour les extraits organiques que les extraits aqueux. Ces résultats restent préliminaires et méritent d'être approfondis afin d'identifier et caractériser les composés responsables de ces activités et d'étudier leurs mécanismes d'action en vue de leur incorporation dans le système de soin.

**Mots clés :** *Ononis angustissima*, hyperglycémie postprandiale, -glucosidase, -amylase, activité antioxydante, activité antidiabétique, polyphénols, flavonoïdes, absorption intestinale.

## Abstract :

Traditional medicine always served as a base in search of new active pharmacological agents via phytochemical and biological experimental screening of medicinal plants extracts. Among these plants *Ononis angustissima* (L.) Lam. subsp. polyclada Murb, belongs to the Fabaceae, traditionally used to treat diabetes mellitus. The aim of this work is devoted to phytochemical investigation of some extracts of this plant as well as the evaluation of their activities antioxidant (*in vitro*) and antidiabetic (*in vitro, in situ* and *in vivo*) in rats Wistar.

The principal results we show elevated content of polyphenols and flavonoids in organic extracts n-Butanol (n-BFT), water-methanol (EMFT) and ethyle acetate (AcFT) of leaves and stems, 72 to 70 (mg eq GA/g) of polyphenols and 16 to 34 (mg eq Cat/g) of flavonoids. These organic extracts show highly antioxidant activity upon DPPH (IC<sub>50</sub> varies from 4 to 5mg/ml) et FRAP (IC<sub>50</sub> varies from 0,1 to 0,4mg/ml). The *in vitro* tests performed on the activity of -amylase and -glucosidase show inhibitory effect dose dependent. The highest inhibitory activity is observed in EMFT extract with IC<sub>50</sub> of 1,46 mg/mL for the amylase and n-BFT extract followed by EMFT extract for the -glucosidase with IC<sub>50</sub> 0,94 and 0,99 mg/mL respectively. *In vivo* whole extracts show an important antihyperglycemic effect especially, organic extracts n-BFT, EMFT and AcFT at 50 mg/kg p.c that induce a significant decrease (p <0.05) of the glycemic load with starch at 66,24 ; 38,58 and 37,99 %, respectively. The lead of AcFT extract with sucrose and maltose, exert a significant antihyperglycemic effect (p <0.05), with decreases rates of 62,72 and 23,26%, respectively. The coadministration of different extracts of *O. angustissima*, catechin (CT), gallic acid (AG) ou acarbose (AcB) with glucose induce a significant decrease of this value via EMFT, AqFT and AcFT extracts (-65,18 ; -64,29 and -26,79%, respectively), comparably with their apart administrate (30 min before). Concerning the impact of the extracts of *O. angustissima* upon the intestinal absorption of glucose. It's evaluation *in vitro* (gut sac intestine) and *in situ* (perfusion in the intestine of anesthetized live rat) show that some extracts are able to inhibit the absorption of glucose in epithelium interfered with transporter of glucose in occurrence SGLT1. *In vitro*, the highest inhibitory activity is observed in n-BFT et AcFT extracts (66 et 67,49%, respectively). *In situ*, the highest inhibitory activity is observed in EMFT (94,64%). The results obtained during this study are promising regarding the antioxidant and antidiabetic activities of the extracts of *O. angustissima* highlighting one of their possible mechanisms of action: reduction of postprandial hyperglycaemia by inhibition of digestion of polysaccharides and slowing even inhibiting the intestinal absorption of glucose, which confirms its traditional use as an antidiabetic plant. However, these properties are more significant for organic extracts than aqueous extracts. These results remain preliminary and they deserve to be thorough in order to identify and characterize the compounds responsible for these activities and try to know their mechanisms of action for their incorporation in the care system.

**Keywords:** *Ononis angustissima*, postprandial hyperglycaemia, -glucosidase, -amylase, antioxydant activity, antidiabetic activity, polyphenols, flavonoids, intestinal absorption..