



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen

*Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de L'univers*  
*Département de Biologie*  
*Laboratoire Antibiotiques, Antifongique : Physico-chimie, synthèse et activité biologique*

*Thèse en vue de l'obtention d'un diplôme de Doctorat*  
*En Sciences*  
*Option: Biologie Moléculaire et Cellulaire*

### **Thème**

*Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique des  
extraits de graines de Citrullus colocynthis Chez le  
rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine*

Présenté par : **BENARIBA Nabila**

### **Jury :**

<b>Président:</b>	<b>Pr. Boucherit K.</b>	Centre Universitaire de Naâma
<b>Examineurs:</b>	<b>Pr. Malaisse Willy J.</b>	Université Libre de Bruxelles
	<b>Pr. Cheriti A.</b>	Université de Béchar
	<b>Pr. Chabane Sari D.</b>	Université de Tlemcen
<b>Directeur de thèse:</b>	<b>Pr. Djaziri R.</b>	Université de Tlemcen
<b>Co-directeur de thèse:</b>	<b>Pr. Sener A.</b>	Université Libre de Bruxelles

*Année Universitaire : 2012-2013*

*A ma famille  
A mes chers parents  
Et mes chers frères et sœurs*

## ***Remerciements***

---

Au terme de ce long parcours de préparation de la thèse tant de personnes m'ont accompagnée et m'accompagnent toujours avec leur contribution enrichissante sur le plan scientifique et humain. A ces personnes je voudrais exprimer ma reconnaissance et présenter mes sincères remerciements.

J'exprime tout d'abord mes remerciements à mes directeurs de thèse, Mr Djaziri Rabah, professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU, Université Abou bekr Belkaïde-Tlemcen, et à Mr Sener Abdullah, professeur à la faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles.

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

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Sener A. pour m'avoir gentiment accueillie dans son laboratoire et permis de réaliser dans les meilleurs conditions une partie de l'expérimentation. Je le remercie chaleureusement de sa contribution effective à ce travail, en veillant au bon déroulement de ma formation et permettant mon initiation aux sécrétions d'insuline par les îlots isolés.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mr Boucherit Kebir, professeur et directeur du Centre Universitaire de Naâma, de me faire l'honneur de présider ce jury, de participer à l'évaluation de ce travail et de l'enrichir de sa haute compétence scientifique. Je le remercie également pour ses encouragements et l'intérêt qu'il a toujours porté à cette recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mr Malaisse Willy J., professeur émérite à la Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, d'avoir accepté d'examiner ce travail, pour sa disponibilité malgré ses nombreuses occupations, et de son aide précieuse pour les publications des résultats dans des revues scientifiques et leur présentation dans des congrès. Je le remercie de sa gentillesse et la bonne ambiance de travail.

Je suis très honoré que Mr Cheriti Abdelkrim, professeur au département de Chimie, Université de Béchar et directeur du Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique (LPSO) ait accepté d'examiner ce travail. Je le remercie vivement de son aide inestimable dans la production d'un article scientifique. Qu'il trouve dans cette thèse l'expression de ma profonde considération.

Je remercie vivement Mr Chabane Sari Daoudi, professeur au département de Biologie, Faculté SNV/STU, Université Abou bekr Belkaïde, Tlemcen et directeur du Laboratoire de Produits Naturels (LAPRONA), d'avoir accepté 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. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes sincères remerciements d'adressent à Mm Boucherit Zahia, professeur au département de Biologie, faculté SNV/STU, Université Abou bekr Belkaïde, Tlemcen et directrice du Laboratoire Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAPSAB), pour sa patience, ses encouragements et ses motivations à mon égard.

Je tiens à remercier vivement Monsieur Tabti Boufeldja, professeur au département de chimie, directeur du Laboratoire des Substances Naturels et Bioactives (LASNABIO) et doyen de la Faculté des Sciences, Université Abou bekr Belkaïde, Tlemcen, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils à mon égard tout au long de cette thèse.

Je remercie également professeur Kadiata Marcel, Mr Louchami Karim, Maître de conférence, Mm Upkens Emeline, technicienne au Laboratoire Hormonologie Expérimentale, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, et Mr Nguidjoe Evrard Marcel, Maître de conférence au Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, pour leurs contributions, leur disponibilité et leur aide dans la réalisation de ce travail. Je les remercie également pour le climat de bonne entente, de convivialité et de complicité scientifique.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues les membres du laboratoire Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAPSAB), citant Mr Azzi Rachid, Maître de conférences et Melle Belkacem Nacéra, Maître assistante au département de Biologie pour leurs divers contributions à ce travail, ainsi que tout le personnel du laboratoire en particulier les techniciens, les doctorants et les étudiants en graduation.

Je tiens à remercier Mr le doyen de la faculté SNV/STU, son staff et le comité scientifique du département de Biologie pour l'attribution des stages de courts séjours et les congés scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Mes remerciements s'adressent à la Wallonie-Bruxelles International (WBI) pour avoir été favorable à l'attribution d'une bourse d'excellence de trois mois, qui ma permis d'achever cette thèse. Je remercie également l'ensemble du personnel, responsables, enseignants et employés de l'administration de la faculté SNV/STU et du département de biologie pour leur aide et leur sollicitude tout au long de la préparation de cette thèse.

C'est grâce au soutien des membres de ma famille, en particulier mes chers parents, mes frères et mes sœurs, à leur présence constante à leur aide sans limites, et leur dévouement que j'ai pu mener à terme ce travail. Qu'ils trouvent dans cette thèse l'expression de mes sincères remerciements et le témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie également mes amie du bureau de travail, pour la bonne compagnie, l'ambiance amicale et chaleureuse et pour avoir qui ont été toujours là pour moi, je vous dis un grand merci très chères, Fadela, Amel, Meriem, Nacera, Chahra, Tema, Lamia et à toute celles qui ne sont pas citées ici.

Enfin, ma profonde gratitude va à l'égard de toutes personnes qui ont aimablement contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Liste des abréviations

---

<b>ABC</b> : Complexe Avidine-Biotine	<b>LC<sub>50</sub></b> : Concentration Létale Moyenne
<b>AE</b> : Extrait acétate d'éthyle	<b>LC-SM</b> : Chromatographie liquide-Spectrométrie de Masse
<b>AMPK</b> : AMP activated protein Kinase	<b>LDH</b> : Lactate Déshydrogénase
<b>CAT</b> : Catalase	<b>LPL</b> : Lipoprotéines lipase
<b>CCl<sub>4</sub></b> : Tétrachlorure de carbone	<b>LPO</b> : Peroxydation lipidique
<b>CMI</b> : Concentration Minimale Inhibitrice	<b>MAPK</b> : Adenosine Mono-Phosphate-activated protein kinase
<b>DAB</b> : 3,3'-diaminobenzidine	<b>MDH</b> : Malate Déshydrogénase
<b>DOPA</b> : Dihydroxyphénylalanine	<b>MV</b> : Matière végétale
<b>DPPH</b> : 2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle	<b>MVS</b> : Matière végétale Séche
<b>DPP-IV</b> : dipeptidylpeptidase-IV	<b>NSF</b> : N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein
<b>EAc</b> : Extrait acétate d'éthyle des graines de la coloquinte	<b>OMS</b> : Organisation mondiale de la Santé
<b>EI</b> : Extrait brut aqueux des graines entières de la coloquinte non dégraissées	<b>PBS</b> : tampon phosphate salé
<b>EII</b> : Extrait brut aqueux des graines broyées et dégraissées de la coloquinte	<b>PI3</b> : Phosphatidyl Inositol-3-Phosphate
<b>EM</b> : Extrait hydrométhanolique des graines de la coloquinte	<b>POD</b> : Peroxydase
<b>En-B</b> : Extrait n-butanol des graines de la coloquinte	<b>PPAR<math>\gamma</math></b> : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma
<b>ERK1/2</b> : Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2	<b>RMN H<sup>1</sup></b> : Résonance Magnétique Nucléaire de Proton
<b>FID</b> : Fédération internationale du Diabète	<b>ROS</b> : Reactive Oxygen Species
<b>GIP</b> : Glucose-Dependent Insulin releasing Polypeptide	<b>SGLT1</b> : Sodium-dependent Glucose Transporter-1
<b>GK</b> : Glycérokinase	<b>SM</b> : Spectrométrie de Masse
<b>GLP-1</b> : Glucagon Like Peptide-1	<b>SNAP</b> : Soluble NSF Attachment Protein
<b>Glut</b> : Glucose Transporteur	<b>SNARE</b> : Soluble NSF attachment protein receptor ou SNAP receptor
<b>GPX</b> : Glutathion Peroxydase	<b>SOD</b> : Super Oxyde Dismutase
<b>GSH</b> : Glutathion réduit	<b>STAT</b> : Signal Transducteurs et Activateurs de la Transcription
<b>HbA1c</b> : Hémoglobine glyquée	<b>SUR</b> : Récepteur des sulfonyles
<b>HGPO</b> : Hyperglycémie Provoquée Par Voie Orale	<b>TBARS</b> : Substances Réagissant avec l'Acide Thiobarbiturique
<b>IC<sub>50</sub></b> : Concentration Inhibitrice Moyenne	<b>TGO (ASAT)</b> : Aspartate Amino Transférase
<b>IL</b> : Interleukine	<b>TGP (ALAT)</b> : Alanine Amino Transférase
<b>IPTTG</b> : Intra-Péritonéal Test de Tolérance au Glucose	<b>TNF</b> : Tumor Necrosis Factor
<b>IRS</b> : Substrat Recepteur Insulin	<b>TTOG</b> : Test de Tolérance Orale au Glucose
<b>K<sub>ATP</sub></b> : Potassium ATP dépendant	<b>TZD</b> : Thiazolidinediones
<b>KCN</b> : Cyanure de potassium	
<b>KRB</b> : Krebs Ringer Bicarbonate	
<b>K<sub>i</sub></b> : Constante d'Inhibition	
<b>Kir 6.2</b> : canal K <sup>+</sup> rectifiant entrant 6.2 (K <sup>+</sup> inward rectifier)	

## *Avant- propos*

---

Les travaux qui ont fait l'objet de cette présente thèse ont été réalisés dans le Laboratoire Antibiotique, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAPSAB), Faculté SNV-STU, Université A. Belkaïd, Tlemcen-Algérie, en collaboration avec le Laboratoire Hormonologie Expérimentale, Université Libre de Bruxelles (ULB) Belgique.

Notre problématique s'inscrit dans un axe de recherche pluridisciplinaire qui concerne l'étude des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète sucré. L'approche ethnopharmacologique est adoptée afin de recenser et inventorier les plantes utilisées pour les patients diabétiques du pays. Les plantes sélectionnées sont étudiées pour leur efficacité et leur toxicité chez le model expérimental de diabète, induit par la streptozotocine, corrélées à une analyse phytochimique du matériel végétal en vue de déterminer les substances actives et d'élucider leur mécanisme d'action.

## ملخص

علم الصيدلة النباتية هو منهج ينقسم بين الممارسة التقليدية والمختبرات التجريبية، هدف هذه الدراسات هو إثبات الآثار العلمية للنباتات الطبية المستخدمة منذ القدم في الطب التقليدي. من بين هذه النباتات الحنظل أو نبتة الحنظل تستخدم من قبل مرضى السكري، على شكل مطبوخ الفواكه أو البذور الجافة. ولهذا تهدف هذه الأطروحة إلى تقييم خصائص مستخلصات بذور الحنظل المضادة للسكري في الجسم الحي عند الجرذان المصابة بداء السكري بواسطة حقن ستراتوتوسين (STZ) (streptozotocine) وكذلك على جزر البنكرياس المعزولة من الفئران.

تم تحضير مختلف المستخلصات المائية والعضوية المستحضرة من بذور نبات الحنظل: المستخلص المائي الخام بدون دهون (EI) و المستخلص المائي الخام بالدهن (IEI)، المستخلص المائي-الكحولي (ME) hydro-methanolic، مستخلص خلات الإبيثيل (EAC) و مستخلص البوتانول (n-B). الكشف التحليل الكيميائي النباتي الأولي اثبت وجود العفص، الفلافونيدات، التيربينويدات، مع غياب المواد القلوية. و هذا وفقا لنوع المستخلص و المذيبات المستخدمة. تتميز المستخلصات EAC و EM بمستويات عالية نسبيا من مادة البوليفينول والفولافونويدات، 298.8، 238.8 ملغ مكافئ/AG و 219.1، 147.76 ملغ مكافئ/Cat. هذه المستخلصات تتميز كذلك بقوة الكسح الراديكالية المضادة للأكسدة على DPPH وأعطت النتائج التالية  $IC_{50} EAC = 350 \mu g/ml$  و  $IC_{50} EM = 580 \mu g/ml$ . اثبتت نتائج الكروماتوغرافيا على الطبقة الرقيقة وجود quercetin و merycitin في هذه المستخلصات.

عند الجرذان المصابة بداء السكري، اظهرت المستخلصات EI، EII و n-B خفض مستوى السكر في الدم على المدى القصير (سا3) في حين أن تأثير EM و EAC يظهر على المدى الطويل (3 أسابيع) ابتداء من اليوم 14. يتوافق مفعول هذه المستخلصات في خفض مستوى السكر في الدم مع تصحيح بعض المكونات الأيضية (الكولسترول الكلى، الدهون الثلاثية، اليوريا، وبعض الانزيمات الكبدية) و نسيجه كتجديد خلايا  $\beta$  البنكرياسيه وكذلك بعض اعراض السكري النهام، العطش (polyphagie, polydipsie) وانخفاض وزن الجسم التي يحدثها مرض السكري الناجم عن STZ. بالإضافة إلى ذلك فإن المعالجة المسبقة للفئران بمستخلص EI يظهر تأثير وقائي هام نحو الآثار السامة لستراتوتوسين STZ. المستخلصات المدروسة لم تظهر أي علامة واضحة السمية على الفئران.

في الدراسة المخبرية (*in vitro*) مستخلصات بذور الحنظل اظهرت تأثيرها على تحفيز جزر البنكرياس المعزولة من الفئران على افراز الأنسولين خاصة EM و EAC لهم تأثير كايح بشكل هام. المستخلص المائي-الكحولي (ME) اثبتت فعاليته في حماية جزر البنكرياس المعزولة ضد الآثار السامة لستراتوتوسين STZ.

سمحت لنا النتائج الأولية بتأكيد فعالية بذور الحنظل في معالجة مرض السكري التي تستحق دراسات بيولوجية كيميائية واسعة بغية تأكيد الاستخدام الصيدلاني لنبتة الحنظل.

**الكلمات المفتاحية:** بذور نبتة الحنظل، مضادة لمرض السكر، مضادات الأكسدة، افراز الأنسولين.

## Résumé

---

L'ethnopharmacologie, une discipline qui se partage entre la tradition et l'expérimentation aux laboratoires, a pour but d'argumenter scientifiquement les effets thérapeutiques des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle. Parmi ces plantes *Citrullus colocynthis* ou coloquinte, plante de la famille des cucurbitacées, anciennement utilisée par la population de diabétiques, sous forme d'infusion des graines ou du fruit entier pour traiter le diabète sucré. De ce fait, l'objectif de cette étude est consacré à l'évaluation des propriétés antidiabétiques des extraits de graines de cette plante *in vivo* chez des rats rendus diabétiques par la STZ et *in vitro* sur des îlots pancréatiques isolés de rat.

Différents extraits aqueux et organiques ont été préparés à partir des graines de *Citrullus colocynthis*: extrait brut aqueux non dégraissé (EI) et dégraissé (EII), extrait hydrométhanolique (EM), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B). L'analyse phytochimique a révélé la présence de tanins, flavonoïdes et de terpénoïdes principalement. Selon le type d'extrait ou le solvant utilisé, les extraits EAc et EM sont caractérisés par des teneurs relativement élevés en polyphénols et en flavonoïdes, dont les taux sont de 298,88; 238,8mg eq AG/g et 219,1; 147,76mg eq Cat/g respectivement. Ces flavonoïdes identifiés par CCM comme étant la quercétine et la mérycétine. Leur effet antioxydant comme effet antiradicalaire sur le DPPH, donne les résultats suivant  $IC_{50}$  EAc=350 $\mu$ g/ml et  $IC_{50}$  EM=580 $\mu$ g/ml.

Chez les rats diabétiques, les extraits EI, EII et En-B montrent un effet antihyperglycémiant significatif à court terme (3h), et un effet antidiabétique à long terme (3 semaines). Tandis que l'effet antidiabétique des extraits EM et EAc n'apparaît qu'à partir du 14<sup>ème</sup> jour. Cet effet à long terme est accompagné de la correction de certains paramètres métaboliques (cholestérolémie totale, triglycéridémie, urée, créatinine et transaminases), tissulaires (régénération des cellules  $\beta$ -pancréatiques) et autres syndromes diabétiques (polyphagie, polydipsie et chute de poids corporel) altérations provoquées par l'installation du diabète induit par la STZ. Par ailleurs, le traitement préalable des rats par l'extrait EI montre un effet protecteur de ce dernier vis-à-vis des effets toxiques de la STZ. Les extraits testés ne présentent aucun signe de toxicité apparente chez les rats traités.

L'étude *in vitro* de l'activité antidiabétique des extraits de graines de la coloquinte a montré, un effet insulinothérapeutique dose dépendant des extraits EM et EAc, et un effet inhibiteur de la sécrétion de l'insuline dose dépendant des extraits EI et En-B. L'extrait EM s'est révélé aussi une cytoprotection des îlots pancréatiques vis-à-vis de la toxicité de la STZ.

En conclusion, ces résultats préliminaires nous ont permis de mettre en évidence l'effet antidiabétique et insulinothérapeutique des extraits bruts non toxiques de la coloquinte, qui méritent des études chimiques et biologiques approfondies afin de confirmer l'utilisation pharmaceutique de la coloquinte.

**Mots clés:** *Citrullus colocynthis*, graines, activités antioxydantes, antidiabétique, insulinothérapeutique, effet cytoprotecteur

## Abstract

---

Ethnopharmacology, a discipline that is divided between traditional practice and experimenting laboratories, is to argue scientifically therapeutic effects of medicinal plants used in traditional medicine. Among these plants *Citrullus colocynthis* or colocynthis, plant of cucurbitaceae family, was formerly used by diabetic, as an infusion of seeds or whole fruit. Therefore, the aim of this study is concerns the evaluation of anti-diabetic properties of seeds extracts *in vivo* in STZ diabetic rats and *in vitro* in isolated pancreatic rat islets.

Different organic and aqueous extracts were prepared from the seeds of *Citrullus colocynthis*: aqueous crude extract-fat (EI) and defatted extract (EII), hydromethanolic extract (EM), ethyl acetate (EAc) and n-butanol (En-B). The phytochemical analysis revealed the presence mainly of tannins, flavonoids and terpenoids. According to the type of extract or the solvent used, EAc and EM extracts are characterized by relatively high levels of polyphenols and flavonoids, 298.8; 238.8 mg eq AG/g and 219.1; 147.76 mg eq Cat/g respectively. Flavonoids such as identified by TLC as merycitin and quercetin. Their antioxidant effect on DPPH radical scavenging effect, gives the following results EAC  $IC_{50} = 350\mu\text{g/ml}$  and  $IC_{50} \text{ EM} = 580\mu\text{g/ml}$ .

In diabetic rats, EI, EII and En-B extracts show a significant short-term antihyperglycemic effect (3h) and a long-term antidiabetic effect (3 weeks). While the antihyperglycemic effect of EM and EAc extracts appears only from the 14<sup>th</sup> day. The long term antihyperglycemic effect is accompanied by correcting some metabolic parameters (total cholesterol, triglycerides, urea, creatinin and transaminases), tissular (regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells) and other diabetic symptoms (polyphagia, polydipsia and falling body weight) caused by instatllation of diabetes induced by STZ. In addition, the pretreatment of rats with EI extract shows a protective effect towards the toxic effects of STZ. The extracts tested show no signs of apparent toxicity in rats.

The antidiabetic activity *in vitro* study of colocynthis seeds extracts showed a dose-dependent insulinotropic effect of EM and EAc extracts and an inhibitory dose dependent effect on insulin secretion of EI and En-B extract. EM extract has proved also pancreatic cytoprotection towards the toxicity of STZ.

In conclusion, these preliminary results allowed us to demonstrate the antidiabetic and insulinotropic effect of non-toxic crude colocynthis extracts, which deserve extensive chemical and biological studies in order to confirm a pharmaceutical use of colocynthis.

**Keywords:** *Citrullus colocynthis*, seeds, antioxidant, antidiabetic, insulinotropic, cytoprotective effect

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau n°1:</b> Mode opératoire du dosage de polyphénols dans les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	33
<b>Tableau n°2 :</b> Mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	35
<b>Tableau n°3 :</b> Mode opératoire de détermination de l'activité antiradicalaire des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur le DPPH.....	38
<b>Tableau n°4 :</b> Caractéristiques des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	39
<b>Tableau n°5 :</b> Screening phytochimique des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	40
<b>Tableau n° 6 :</b> Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	42
<b>Tableau n° 7 :</b> <i>R<sub>f</sub></i> des analyses de chromatographie sur couche mince des différents extraits de graines de la coloquinte.....	43
<b>Tableau n°8 :</b> Détermination d'IC <sub>50</sub> du pourcentage de réduction du DPPH par les extraits EI, EM et AE de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	45
<b>Tableau n°9 :</b> Répartition par lots des rats diabétiques et non diabétiques (expérimentaux et témoins) utilisés pour l'évaluation de l'effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> à court et à long terme.....	58
<b>Tableau n° 10 :</b> Répartition des lots de rats pour l'évaluation de l'effet préventif de l'extrait aqueux (EI) de <i>Citrullus colocynthis</i> sur la toxicité de la streptozotocine.....	63
<b>Tableau n°11:</b> Répartition des lots de rats pour l'évaluation de l'effet de l'usage externe de des extraits aqueux de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	64
<b>Tableau n°12 :</b> Répartition des lots de rats pour l'évaluation de l'effet antihyperglycémiant de la co-administration de glucose et l'extrait EI de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	64
<b>Tableau n°13 :</b> DL <sub>50</sub> de l'extrait aqueux EI des graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	69
<b>Tableau n°14 :</b> DL <sub>50</sub> de l'extrait aqueux EII des graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	69
<b>Tableau n°15 :</b> DL <sub>50</sub> de l'extrait EM de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	70
<b>Tableau n°16 :</b> DL <sub>50</sub> de l'extrait acétate d'éthyle (EAc) de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	70
<b>Tableau n°17 :</b> DL <sub>50</sub> de l'extrait n-butanol (En-B) de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	70
<b>Tableau n°18 :</b> Gain de poids corporel chez les rats diabétiques et non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	95
<b>Tableau n°19 :</b> Incubation des îlots en présence de différentes concentrations des extraits de la coloquinte et de glucose.....	129
<b>Tableau n°20 :</b> Incubation des îlots en présence de différentes concentrations des extraits de la coloquinte et de streptozotocine.....	130
<b>Tableau n°21:</b> Incubation des îlots en présence de différentes concentrations des extraits Aqueux de la coloquinte et de KCN.....	131

## Liste des figures

---

<b>Figure 1 :</b> Champ de <i>Citrullus colocynthis</i> , photo prise sur lieu de récolte région de Ain sefra.....	27
<b>Figure 2 :</b> Fruit et graines de <i>Citrullus colocynthis</i> . (a): différentes formes du fruit; (b): fruit et graines ; (c): graine.....	27
<b>Figure 3 :</b> Schéma explicatif de la préparation des extraits à partir des graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	30
<b>Figure 4 :</b> Réaction de réduction du PDDH par un antioxydant .....	37
<b>Figure 5 :</b> Courbe étalon de l'acide gallique ( $\lambda=750\text{nm}$ ).....	41
<b>Figure 6 :</b> Courbe étalon de la catéchine ( $\lambda=510\text{nm}$ ).....	41
<b>Figure 7 :</b> Variations à court terme de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	73
<b>Figure 8 :</b> Variations à court terme de la glycémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	74
<b>Figure 9 :</b> Variations à long terme de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	75
<b>Figure 10 :</b> Variations à long terme de la glycémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	76
<b>Figure 11 :</b> Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques soumis au TTOG et traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	78
<b>Figure 12 :</b> Variations de la glycémie chez les rats diabétiques soumis au TTOG et traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	79
<b>Figure 13:</b> Variations de cholestérolémie totale chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	82
<b>Figure 14:</b> Variations de cholestérolémie totale chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	83
<b>Figure 15:</b> Variations de triglycéridémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	84
<b>Figure 16 :</b> Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	85
<b>Figure 17 :</b> Variations de l'urémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	86
<b>Figure 18 :</b> Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	87
<b>Figure 19 :</b> Variations de la créatinémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	88
<b>Figure 20:</b> Variations de la créatinémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	89
<b>Figure 21 :</b> Variations du taux des TGO chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	91
<b>Figure 22 :</b> Variations de taux de TGO chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	91
<b>Figure 23 :</b> Variations du taux de TGP chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	91
<b>Figure 24 :</b> Variations de taux de TGP chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	91
<b>Figure 25 :</b> Variations du taux de P.A. chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	91
<b>Figure 26 :</b> Variations du taux de P. A. chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	91

<b>Figure 27</b> : Variations du poids corporel chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	93
<b>Figure 28</b> : Variations du poids corporel chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	94
<b>Figure 29</b> : Variations de poids relatif des organes (g/ 100g de p.c.) chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	96
<b>Figure 30</b> : Variations de poids relatif des organes (g/ 100g de p.c.) chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	96
<b>Figure 31</b> : Consommation d'aliment chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	98
<b>Figure 32</b> : Consommation d'aliment chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	99
<b>Figure 33</b> : Consommation d'eau chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	100
<b>Figure 34</b> : Consommation d'eau chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	101
<b>Figure 35</b> : Marquage de l'insuline dans le pancréas de rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par le sérum physiologique (gros.x400). <b>Pex</b> : pancréas exocrine. <b>Im</b> : insuline marquée.....	103
<b>Figure 36</b> : Marquage de l'insuline dans le pancréas de rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EI (90mg/kg p.c.) (gros.x400). <b>Pex</b> : pancréas exocrine. <b>Im</b> : insuline marquée.....	103
<b>Figure 37</b> : Marquage de l'insuline dans le pancréas de rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EII (90mg/kg p.c.) (gros.x400). <b>Pex</b> : pancréas exocrine. <b>Im</b> : insuline marquée.....	104
<b>Figure 38</b> : Marquage de l'insuline dans le pancréas de rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EM (100mg/kg p.c.) (gros.x400). <b>Pex</b> : pancréas exocrine. <b>Im</b> : insuline.....	104
<b>Figure 39</b> : Marquage de l'insuline dans dans le pancréas de rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EAc (70mg/kg p.c.) (gros.x400). <b>Pex</b> : pancréas exocrine. <b>Im</b> : insuline marquée.....	105
<b>Figure 40</b> : Marquage de l'insuline dans le pancréas de rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait En-B (70mg/kg p.c.) (gros.x400). <b>Pex</b> : pancréas exocrine. <b>Im</b> : insuline marquée.....	105
<b>Figure 41</b> : Marquage de l'insuline dans les îlots pancréatiques de rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EI (90mg/kg p.c.) (gros.x400). <b>Pex</b> : pancréas exocrine. <b>Im</b> : insuline marquée.....	105
<b>Figure 42</b> : Variations de la glycémie chez les rats prétraités par les extraits aqueux EI et EII des graines de la coloquinte et injectés par la streptozotocine (65 mg/kg) .....	106
<b>Figure 43</b> : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques au cours de l'usage externe des extraits aqueux de graines de la coloquinte.....	107
<b>Figure 44</b> : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques au cours de l'usage externe extraits aqueux de graines de la coloquinte.....	108
<b>Figure 45</b> : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par les extraits Aqueux EI et EII des graines de la coloquinte suite à une coadministration Orale extrait-glucose... ..	109
<b>Figure 46</b> : Effet des extraits de graines de la coloquinte sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline dans les îlots de Langerhans, milieu d'incubation contenant 2,8 mM du D-glucose. aqueux.....	132

<b>Figure 47</b> : Effet des extraits de graines de la coloquinte sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline dans les îlots de Langerhans, milieu d'incubation contenant 8,3 mM du D-glucose. ....	134
<b>Figure 48</b> : Effet des extraits de graines de la coloquinte sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline dans les îlots de Langerhans, milieu d'incubation contenant 16,7 mM du D- glucose. <i>A</i> : EI. <i>B</i> : EAc.....	134
<b>Figure 49</b> : Effet protecteur de l'extrait eau-méthanol (EM) de graines de la coloquinte sur $\beta$ -cytotoxicité de la streptozotocine. ....	135
<b>Figure 50</b> : Effet des extraits de graines de la coloquinte sur le taux de LDH libérée dans le milieu incubation des îlots de Langerhans à 8,3 mM du D-glucose. ....	136

## Table des matières

---

<i>Introduction générale</i> .....	1
<i>Synthèse bibliographique</i> .....	4
<i>Chapitre I: Etude phytochimique de la coloquinte.</i>	
<i>Introduction</i> .....	26
<b>Matériel et Méthodes</b>	
1. Matériel végétal.....	27
2. Préparation des extraits .....	28
2.1. Dégraissage du matériel végétal.....	28
2.2. Préparation de l'extrait brut aqueux non dégraissé (EI).....	28
2.3. Préparation de l'extrait brut aqueux dégraissé (EII).....	28
2.4. Préparation de l'extrait eau-méthanol (EM).....	29
2.5. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle (EAc).....	29
2.6. Préparation de l'extrait n-butanol (En-B).....	29
3. Screening phytochimique des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	30
4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux .....	32
4.1. Dosage de polyphénols .....	32
4.2. Dosage de flavonoïdes totaux .....	33
5. Fractionnement des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> par chromatographie sur couche mince (CCM).....	36
6. Fractionnement des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> par chromatographie sur colonne .....	36
7. Evaluation de l'activité antiradicalaire des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> (Piégeage du radical libre DPPH) .....	37
<b>Résultats et interprétation</b>	
1. Caractéristiques des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	39
2. Screening phytochimiques.....	39
3. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux.....	40
4. Fractionnement des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> par chromatographie sur couche mince (CCM).....	42
5. Fractionnement des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> par chromatographie sur colonne.....	44
6. Activité antiradicalaire des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> (Piégeage du radical libre DPPH).....	44
<b>Discussion</b>	
<i>Chap. II : Etude in vivo de l'activité antidiabétique de la coloquinte</i>	
<i>Introduction</i> .....	53
<b>Matériel et méthodes</b>	
1. Animaux.....	55
2. Induction du diabète expérimental chez les rats.....	55
3. Procédure expérimentale .....	55
3.1. Détermination de la DL <sub>50</sub> des extraits de la coloquinte.....	56
3.2. Evaluation de l'effet antidiabétique des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques.....	57
3.2.1. Evaluation de l'effet antidiabétique des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> : Etude à court terme.....	57

3.2.2. Evaluation de l'effet antidiabétique des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> : Etude à long terme .....	58
3.2.3. Evaluation de l'effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur l'hyperglycémie des rats diabétiques et non diabétiques soumis au TTOG.....	59
3.2.4. Evaluation de l'effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur l'évolution du poids corporel, la consommation d'eau et d'aliment chez les rats diabétique non diabétiques.....	59
3.2.5. Evaluation de l'effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur la biométrie des organes.....	60
3.2.6. Evaluation de l'effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur le pancréas: analyse immunohistochimique.....	60
3.3. Evaluation de l'effet protecteur des extraits aqueux de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> vis-à-vis de la toxicité de la streptozotocine .....	62
3.4. Evaluation de l'effet antihyperglycémiant de l'usage externe des extraits bruts aqueux (EI, EII) de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	63
3.5. Evaluation de l'effet antihyperglycémiant de la coadministration de glucose et l'extrait aqueux (EI) de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	64
3.6. Dosage des paramètres biochimiques sanguins.....	65
3.6.1. Dosage de glucose .....	65
3.6.2. Dosage du cholestérol total.....	65
3.6.3. Dosage des triglycérides.....	65
3.6.4. Dosage de l'urée.....	66
3.6.5. Dosage de la créatinine.....	66
3.6.6. Dosage de la phosphatase alcaline.....	67
3.6.7. Dosage de la TGO.....	67
3.6.8. Dosage de la TGP.....	67
3.7. Analyses statistiques.....	68
<b>Résultats et interprétation</b>	
1. Détermination de la dose létale moyenne DL <sub>50</sub> des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	69
2. Effet antidiabétique des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques.....	70
2.1. Effet à court terme des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques.....	71
2.2. Effet à long terme des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les Rats diabétiques et non diabétiques.....	72
2.3. Effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques soumis au Test de Tolérance Orale au Glucose (TTOG).....	77
2.4. Effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur certains paramètres Sanguins chez les rats diabétiques et non diabétiques.....	80
2.4.1. Effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques sur les variations de la cholestérolémie et triglycéridémie.....	80
2.4.2. Effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rat diabétiques et non diabétiques sur les variations de l'urémie et la créatinémie.....	81
2.4.3. Effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques sur les variations de TGO, TGP et phosphatase alcaline sériques.....	90
2.4.4. Effet des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques sur le poids corporel.....	92
2.4.5. Effet à long terme des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques sur la biométrie des organes.....	95
2.4.6. Effet à long terme des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez les rats diabétiques et non diabétiques sur la consommation d'eau et d'aliment.....	97
2.4.7. Effet à long terme des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> chez	

les rats diabétiques et non diabétiques sur l'histologie du pancréas.....	102
<b>2.5.</b> Evaluation de l'effet préventif des extraits bruts aqueux (EI, EII) de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> vis-à-vis la toxicité de la streptozotocine.....	106
<b>2.6.</b> Effet de l'usage externe des extraits bruts aqueux (EI, EII) de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	107
<b>2.7.</b> Effet antihyperglycémiant de la coadministration orale de glucose et l'extrait aqueux (EI) de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	108
<b>Discussion</b>	
<b>Chap. III : Etude in vitro de l'activité antidiabétique de la coloquinte</b>	
<b>Introduction</b> .....	126
<b>Matériel et méthodes</b>	
<b>1.</b> Evaluation de l'effet insulinosécrétoire des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> par les îlots de Langerhans.....	127
<b>1.1.</b> Prélèvement du pancréas .....	127
<b>1.2.</b> Digestion enzymatique .....	127
<b>1.3.</b> Isolation des îlots de Langerhans.....	128
<b>1.4.</b> Incubation des îlots.....	128
<b>1.5.</b> Dosage de l'insuline.....	129
<b>2.</b> Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait eau-méthanol de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> vis-à-vis de la $\beta$ -cytotoxicité de la streptozotocine.....	129
<b>3.</b> Evaluation de l'effet cytotoxique de l'extrait brut aqueux de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur les îlots de Langerhans.....	130
<b>Résultats et interprétation</b>	
<b>1.</b> Effet insulinosécrétoire des extraits de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur les îlots de Langerhans isolés.....	132
<b>2.</b> Effet protecteur de l'extrait eau-méthanol de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur $\beta$ -cytotoxicité De la streptozotocine.....	135
<b>3.</b> Effet cytotoxique de l'extrait brut aqueux de graines de <i>Citrullus colocynthis</i> sur les îlots de Langerhans.....	136
<b>Discussion</b>	
<b>Discussion général</b> .....	144
<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	149
<b>Références bibliographiques</b>	

## ***Introduction Générale***

L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une forme de médecine qui remonte aux temps les plus reculés de l'histoire de l'homme. De nos jours, pour divers raisons d'ordre socio-économiques, socio-culturelles ou autres, les gens ont toujours recours à la médecine traditionnelle pour se soigner et traiter des maladies aussi bien bénignes (rhume ou colopathies fonctionnelles) que sérieuses (cancer, alzheimer). La phytothérapie ou la thérapie par les plantes médicinales ayant des vertus thérapeutiques, en fait partie intégrante tel que définie par l'organisation mondiale de la santé (OMS). En effet, d'après les estimations de cette dernière plus de 80% de la population mondiale, surtout dans les pays sous développés, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires. Dans certains pays comme la Chine, les Corée du Nord et du Sud la médecine traditionnelle est intégrée dans la politique de santé nationale, alors que beaucoup de pays africains tardent à standardiser et à valoriser leurs richesses naturelles (**OMS 2002; Eddouks et al. 2007**).

Dans ce but, les recherches entreprises actuellement ont pour objectif la valorisation de la médecine traditionnelle à travers la découverte de nouvelles molécules et la formulation de médicaments accessibles et utilisables dans le traitement de maladies chroniques essentiellement le sida, le cancer, l'hypertension artérielle et le diabète sucré. Ce dernier est considéré comme une des maladies non transmissibles, la plus fréquente dans le monde et la plus traitée par la médecine populaire. Il est considéré actuellement comme un facteur majeur de surmortalité, réduisant l'espérance de vie des individus qui en sont atteints de 5 à 10 ans (**Böhme et al. 2006**). La prévalence du diabète à l'échelle mondiale progresse de façon alarmante, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la Fédération internationale du Diabète (FID), Chaque dix seconde une personne meurt du diabète directement ou indirectement par suite d'une complication, ce qui est à l'origine de près de quatre millions de décès par an (**FID 2008, Motala et al. 2010**).

Le développement de nouveaux médicaments s'appuie largement soit sur la chimie de synthèse, soit sur l'inventaire des ressources naturelles de plantes médicinales, qui sont la source la plus riche en molécules biologiquement actives utilisables en thérapeutique. Actuellement, plusieurs enquêtes ethnobotaniques sont réalisées à travers le monde, afin de recenser les plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré. Dans la région méditerranéenne, y compris l'Algérie, plusieurs études ont établi un inventaire d'une centaine de plantes réputées antidiabétiques; parmi ces plantes,

la coloquinte ou *Citrullus colocynthis* qui est fréquemment utilisée pour le traitement de l'hyperglycémie chez les diabétiques de type 2, sous forme d'infusion soit des graines soit des fruits en entier de cette plante, mais sans connaître scientifiquement son mécanisme d'action. Selon la fréquence d'utilisation traditionnelle de la coloquinte en phytothérapie; plusieurs études ont été réalisées pour la mise en évidence de l'effet antidiabétique dans des extraits de différentes parties de cette plante (fruits, pulpes, graines, feuilles et racines), chez des patients ainsi que des animaux de laboratoires normoglycémiques et rendus diabétiques, dont les résultats publiés sont prometteurs (Abdelhassan et al. 2000; Huseini et al. 2009; Khatibi et al. 2011; Khoshvaghti et al. 2011).

L'objectif de ce travail de thèse est consacré à l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*, *in vivo* chez des rats non diabétiques et des rats rendus diabétiques par la streptozotocine, ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'effet insulinothèque dans les îlots pancréatiques.

Le présent manuscrit, inclut une introduction générale et une synthèse bibliographique sur l'actualité du diabète sucré (épidémiologie, complications et traitement), les plantes antidiabétiques et sur la coloquinte; la partie expérimentale est structurée en trois chapitres complémentaires, dont chacun comporte sa partie matériel et méthodes, résultats et discussion.

Le premier chapitre concerne une étude phytochimique préliminaire de certains extraits de graines de *Citrullus colocynthis*: extrait brut aqueux non dégraissé (EI) et dégraissé (EII), extrait hydrométhanolique (EM), extrait acétate d'éthyle (EA) et extrait n-butanol (EB), elle comporte ;

- Une analyse quantitative des extraits: mise en évidence des familles chimiques en utilisant des réactifs spécifiques
- Une analyse chromatographique sur couche mince
- Dosage quantitatif de polyphénols et de flavonoïdes totaux
- Détermination de l'activité antiradicalaire sur le DPPH

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de l'activité antidiabétique *in vivo* des extraits de la coloquinte, chez des rats Wistar non diabétiques et des rats rendus diabétiques par la streptozotocine (65mg/kg p.c.) suivis à court (trois heures) et à long terme (trois semaines). L'influence du traitement par les différents extraits de la coloquinte chez les animaux expérimentaux et témoins est évaluée en mesurant les variations et l'évolution de:

- Leurs paramètres métaboliques sanguins: glycémie, cholestérol total, triglycérides, urée, créatinine, TGO, TGP et phosphatase alcaline
- Leurs poids corporels, consommation d'eau et d'aliment
- Leurs pancréas par analyse immunohistochimique (marquage de l'insuline)

Cette étude est précédée par l'évaluation de la toxicité aigues des extraits de la coloquinte: détermination de la dose létale (DL<sub>100</sub> et DL<sub>50</sub>) et la dose de travail (dose test: dose injectée).

L'effet protecteur de la coloquinte vis-à-vis de la cytotoxicité de la streptozotocine, a été également étudié chez les rats prétraités au préalable par les extraits aqueux.

Le troisième chapitre de cette étude, est consacré à l'évaluation de l'effet des extraits de graines de la coloquinte sur la sécrétion de l'insuline par les îlots pancréatiques de rat *in vitro*.

En fin, ce manuscrit se termine par une discussion générale des principaux résultats, suivie par une conclusion générale et des perspectives.

## ***Synthèse bibliographique***

Le diabète sucré, est une affection métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant, d'une déficience de sécrétion de l'insuline, et/ou d'une anomalie de l'action de l'insuline sur les tissus cibles. Il se définit par une glycémie au hasard supérieure à 2 g/l (11,1 mM) avec des symptômes de diabète, une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/l (7 mM) à deux reprises, ou une glycémie supérieure à 2 g/l (11,1 mM) 2 heures après une charge orale en glucose (**OMS 2006; Simon D. 2008**).

Par sa prévalence actuelle dans le monde et les projections faites, le diabète sucré constitue l'un des axes prioritaires de santé publique. Le nombre de patients a en effet doublé au cours des quinze dernières années et on s'attend raisonnablement à un nouveau doublement dans la prochaine décennie, en particulier dans les pays en voie de développement. La prévalence du diabète à l'échelle mondiale progresse de façon alarmante, les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont dénombré une prévalence de 5 à 7% de la population mondiale, soit un nombre de 220 millions de diabétiques en 2010, et environ 366 millions en 2030 (**FID 2008; Fagot-Campagna et al. 2010**). La prévalence du diabète en Europe est estimée à 4% de la population totale (**Wens et al. 2005**). Le monde arabe est frappé de plein fouet par ce fléau; Au Moyen-Orient 9,2% de la population en serait atteinte (**Bernheim 2008**). Le continent africain n'échappe pas à la montée en puissance du diabète dans le monde, déjà durement touché par le SIDA et le paludisme, il doit aujourd'hui faire face à un nombre croissant de diabétiques, quelques sept millions d'Africains sont actuellement porteurs du diabète sucré (**OMS 2007; Gning et al. 2007; Motala et al. 2010**). Aux pays du Maghreb, ils ne sont pas en reste, l'OMS estime qu'au moins 4,5% de plus de 20 ans y sont atteints de diabète de type 2, un pourcentage qui devrait monter à 6% voire 7% dès 2025 (**Bernheim 2008**). En Tunisie, la prévalence du diabète est beaucoup plus faible dans l'échantillon rural (4,4% chez les hommes et 5,7% chez les femmes) que dans l'échantillon urbain, 9,4% chez les hommes et 11,7% chez les femmes (**Bouguerra et al. 2007**). Au Maroc, c'est 8 % de la population qui souffrent, soit 8,7% ont plus de 30 ans et 11,5% plus de 40 ans (**Ramdani M. 2010**). En Algérie, ils sont près de deux millions (2,8 million) de diabétiques dont un million de personnes ignorent leur maladie, avec une prévalence de 1 à 3%, et 7,3% pour le diabète de type 2 (**OMS 2007; Ouadahi et al. 2009; Boudiba et al. 2008**). Dans la région de Tlemcen, l'étude épidémiologique réalisée par **Zaoui et al. (2007)**, sur un échantillon de population de 7656 personnes, a révélé une prévalence globale du diabète de 14,2%, les hommes (20,4%) étant plus touchés que les femmes (10,7%).

C'est essentiellement le mode de vie, le vieillissement et l'urbanisation qui sont responsables de cette évolution inquiétante de la prévalence du diabète. L'anarchie alimentaire avec ses excès caloriques et une consommation débridée de sucres raffinés et de lipides, associée à une sédentarité de plus en plus marquée font progressivement le lit de la surcharge pondérale, puis de l'obésité. Ces dernières mènent évidemment dès lors qu'il y a un terrain héréditaire, à l'insulinorésistance et au diabète essentiellement le diabète de type 2 (**Buyschaert 2003**). L'étiologie du diabète sucré définit différents types, dont deux sont majoritaires c'est le type 1 et le type 2. Il existe d'autres formes comme le diabète gestationnel, qui peut être transitoire car il est lié à une résistance à l'insuline pendant la grossesse mais peut également persister après la grossesse. Un diabète correspondant à une forme génétique identifiée de type Mody; ou des cas de diabète résultant de conditions spécifiques secondaires à la prise de corticoïdes, à une pancréatite, une hémochromatose ou une mucoviscidose (**Fagot-Campagna et al. 2010**).

Le diabète de type 1, anciennement appelé diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète juvénile, il représente 5 à 10% des cas et débute habituellement chez les enfants et les jeunes adultes (avant 30 ans). Il est caractérisé par la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques suite à une réaction auto-immune, survenant sur un terrain de susceptibilité génétique à la suite de facteurs déclenchant, provoquée par des lymphocytes T ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) qui détruisent sélectivement les cellules  $\beta$  insulinosécrétrices du pancréas, d'où l'incapacité de la personne atteinte à sécréter l'insuline (**Chatenoud 2006; Grimaldi 2009**). C'est pourquoi le diagnostic est souvent brutal et les injections d'insuline sont vitales chez ces personnes (**Chatenoud 2006**).

Le diabète de type 2, anciennement appelé diabète non insulino-dépendant (DNID), est caractérisé par l'association, à des degrés variables, d'une insulino-pénie et une insulinorésistance. C'est la forme la plus fréquente chez l'adulte après 50 ans, elle représente 80 à 90% de diabète avec 300 millions de personnes atteintes dans le monde, soit une augmentation de 7 millions chaque année (**Matola et al. 2010**). Ce type de diabète résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité, dont l'expression dépend de facteurs environnementaux, comme la consommation excessive de graisses saturées, de sucres rapides, la sédentarité et l'obésité. Le rôle de l'hérédité n'est pas négligeable puisque souvent des antécédents familiaux de diabète sucré sont retrouvés chez les ascendants (**Booth 2008; Holt et al. 2010**).

La gravité du diabète sucré est liée essentiellement à la sévérité de ses complications. Ils sont de deux formes aiguës et chroniques. Les complications métaboliques aiguës, le plus souvent l'acidocétose et le coma hyperosmolaire, sont très répandus chez les diabétiques de type 1. L'hypoglycémie représente la complication aiguë la plus fréquente, rarement mortelle chez le diabétique de type 1. L'hypoglycémie du diabétique de type 2 traité par l'insulinosécrétagogue est plus rare, mais elle peut être plus dangereuse en cas de coma prolongé. Nombreux sont les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui influencent la glycémie chez les diabétiques, ce qui rend difficile la prédictibilité et donc la prévention des hypoglycémies (**Radermecker 2005**).

Les complications organiques chroniques, secondaires à l'hyperglycémie apparaissent à long terme, ils entraînent des micro- et macroangiopathies (**Barnett 2009**). Les microangiopathies touchent les petits vaisseaux sanguins, elles se manifestent au niveau de l'œil, c'est la rétinopathie. Après 20 ans de diabète, 60% des diabétiques de type 2 ont une rétinopathie dont 2% perdent la vue. Au niveau des reins et des nerfs c'est la néphropathie et la neuropathie dont leurs fréquences est environ 20% et 50% respectivement (**Racciah 2004; OMS 2006**). Par opposition à la microangiopathie, la macroangiopathie diabétique touche les grosses artères destinées à irriguer tout particulièrement le cœur, les jambes et le cerveau. L'atteinte des artères coronaires et des artères cérébrales conduisent à des accidents cardio-vasculaires (infarctus du myocarde) et cérébraux, de même l'artérite constitue un risque de gangrène pouvant conduire à l'amputation (**Sachon et al. 2005**). Les complications dégénératives conséquentes d'une hyperglycémie chronique conduisent à un taux de mortalité élevé. L'hyperglycémie est le troisième facteur de risque mondial responsable de 5,8% de la mortalité totale (**OMS 2006, Grimaldi A. 2009**). Une personne mourant toutes les dix secondes, dont le nombre de décès annuel lié au diabète est estimé à près de quatre millions soit une prévalence de 6% dans le monde (**FID 2008, Matola et al. 2010**). Dans la majorité des cas la cause courante d'invalidité et de mortalité chez les personnes atteintes de diabète est l'accident cérébro-vasculaire et les complications rénaux (**Roglic et al. 2005; Dawson et al. 2008**).

De ce fait, une prise en charge médicale demeure indispensable aux diabétiques, dont l'objectif principal est de prévenir les complications aiguës (hypoglycémie, hyperglycémie), et éviter les macroangiopathies responsables de la mortalité cardio-vasculaire. Le traitement du diabète de type 1 associe habituellement un régime alimentaire

soigneusement calculé, de l'activité physique, ainsi qu'une auto surveillance de la glycémie et des injections d'insuline plusieurs fois par jour. Dans le cas du diabète de type 2 sa prévention repose en premier temps sur des mesures hygiéno-diététiques. Une fois déclaré, une polythérapie avec des médicaments à point d'impact complémentaire est souvent nécessaire pour obtenir un contrôle glycémique optimal (**Wens et al. 2005**).

Une prise en charge des diabétiques de type 2, doit commencer par des mesures nutritionnelles associées à un exercice physique régulier. Un régime alimentaire méditerranéen riche en légumes, fruits, céréales, fibres et poisson (oméga-3), assure une réduction de mortalité cardiovasculaire (**Hodge et al. 2011**). L'activité physique modérée ou intense est associée à d'importantes réductions de morbidité et de mortalité, chez les hommes et les femmes, en présence de diabète de type 1 ou de type 2 (**Ronald et al. 2008**). Si les objectifs glycémiques ne sont pas atteints au bout de deux à trois mois, il faut faire appel aux traitements pharmaceutiques actuels, représentés essentiellement par l'insuline et les antidiabétiques oraux.

Les antidiabétiques oraux constituent le troisième volet du traitement du diabète non insulino-dépendant après la diététique et l'activité physique. Cet arsenal thérapeutique comprend des agents stimulant la sécrétion de l'insuline (sulfamides hypoglycémisants, glitinides), des agents augmentant la sensibilité à l'insuline (metformine, thiazolidinediones) et une drogue limitant l'absorption intestinale des carbohydrates (acarbose) (**Roussel et al. 2004**). Les sulfamides hypoglycémisants appartiennent chimiquement à la famille des sulfonylurées. Ils stimulent la sécrétion de l'insuline sans influencer sa synthèse. Ces molécules se fixent sur leur récepteur spécifique SUR, Sulfonyl Urea Receptor (950 KDa), un octamère composé de quatre sous-unités formant la conductance potassique proprement dite protéine Kir6.2 (codée par le gène KCNJ11) et de quatre sous-unités régulatrices SUR1 (codées par le gène ABCC8). L'interaction des sulfamides avec leurs récepteurs au niveau de la membrane des cellules  $\beta$ -pancréatiques provoque la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  dépendant, ce qui entraîne une dépolarisation membranaire et l'ouverture secondaire des canaux calciques. L'afflux de calcium dans le cytoplasme des cellules  $\beta$  induit l'exocytose des vésicules contenant l'insuline d'une manière similaire à celle observée après stimulation par le glucose (**Gally . 2005 ; Kanetee et al. 2009; Derfoufi et al. 2010**). Outre les cellules  $\beta$  (Kir 6.2, SUR1), les canaux  $K_{ATP}$  sont exprimés dans les cellules du myocarde et du muscle lisse artériel (Kir 6.1, SUR2). En fonction de l'affinité de liaison au récepteur

SUR, on distingue deux groupes d'insulinosécrétagogues, le premier est  $\beta$ -sélectif (Tolbutamides, gliclazide), car il bloque que les canaux pancréatiques, le deuxième groupe est non  $\beta$ -sélectif (Glibenclamide, répaglinide), aux concentrations thérapeutiques il bloque aussi les récepteurs vasculaires et coronaires Kir6.2/SUR2. Cette action sur le myocarde peut être délétère et susceptible de supprimer le préconditionnement du myocarde à l'ischémie, mécanisme physiologique efficace de protection tissulaire contre l'ischémie. Et donc les insulinosécrétagogues non  $\beta$ -sélectifs à long terme peuvent augmenter le risque de mortalité lié à l'infarctus du myocarde (**Tielmans et al. 2007; Khalangot et al. 2009**).

Les sulfamides hypoglycémisants administrés par voie orale, sont totalement absorbés au niveau digestif, et fortement liés aux protéines plasmatiques, puis métabolisés dans le foie et excrétés principalement dans les urines, leur demi-vie d'élimination varie de 2,5 à 40 heures (**Tielmans et al. 2007**). L'administration prolongée (plus de trois mois) réduit l'hémoglobine glyquée (HbA1c) de 1 à 2%, ce qui permet de réduire significativement le risque de décès dû au diabète à 21%, d'infarctus du myocarde à 14% et à 37% le risque de complications microvasculaires (**Thissen et al. 2005 ; Ben Abdeljelil . 2009**). L'effet indésirable majeur des sulfamides est le risque d'hypoglycémie. Les hypoglycémies peu sévères sont fréquentes chez le diabétique de type 2, tandis que les hypoglycémies sévères plus rares mais elle peut être plus dangereuse en cas de coma prolongé (4% de décès) (**Radermecker R.P. 2005**). D'autres effets peuvent apparaître, comme, des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées et douleurs abdominales) et hématologiques (thrombopénie, anémie, leucopénie) ainsi qu'une prise de poids corporel. Le taux d'échec secondaire avec ces produits s'élève de 5 à 10 % par an (**Thissen et al. 2005**).

De nouveaux insulinosécrétagogues sont développés, les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs du DPP-IV. Le GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1) et le GIP (Glucose-Dependent Insulin Releasing Polypeptide) sont des hormones peptidiques produites par le tube digestif ayant un effet incrétine. Ce dernier se définit par une augmentation de l'insulinosécrétion en réponse au glucose administré par voie orale. Le GIP et GLP-1 sont sécrétés par les cellules K du duodénum et les cellules L de l'iléon et du côlon proximal en réponse au repas, ils potentialisent l'insulinosécrétion induite par le glucose, 50 à 60% de l'insuline sécrétée pendant un repas résulte de l'effet des incrétines. Le GIP et GLP-1 sont rapidement dégradés en métabolites inactifs par l'enzyme DPP-IV (dipeptidylpeptidase-IV). Les inhibiteurs du DPP-IV potentialisent les effets physiologiques des incrétines (**Gautier et al. 2008**;

**Derfoufi et al. 2010**). Parmi les produits ayant une application thérapeutique, Les analogues du GLP-1, disponibles seulement par voie injectable, et les inhibiteurs de la DPP-IV ou gliptines (sitagliptine et vildagliptine) administrés par voie orale journalière, peuvent réduire le taux de HbA1c de 0,6 à 1% avec une diminution de la glycémie postprandiale, mais ils sont souvent associée à des effets indésirables gastrointestinaux tels que nausées, vomissements et diarrhées (**Bösenberg et al. 2008, Galtier et al. 2008**).

En ce qui concerne les insulinosensibilisants, seule la famille des biguanides est responsable de cette action. Ils sont représentés sur le marché par la metformine, son absorption se fait principalement au niveau de l'intestin grêle, c'est une molécule hydrophile polaire, complètement ionisée au pH plasmatique. La demie vie de cette molécule est comprise entre 4 et 8 heures, son élimination est majoritairement urinaire (**Orban et al. 2006**). L'action de la metformine est essentiellement extrapancréatique, elle n'a aucun effet sur la sécrétion de l'insuline, mais elle nécessite sa présence pour agir. Sur le plan moléculaire, la mitochondrie est la première cible de la metformine; à ce niveau elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire ce qui provoque une augmentation du rapport AMP/ATP, l'augmentation de l'AMP active une protéine-kinase l'AMPK (**Guigas et al. 2008, Foretz et al. 2008**). Cette voie de signalisation permet la réduction de la glycémie basale et postprandiale en diminuant la production hépatique du glucose (9 à 30 %) par inhibition de la néoglucogénèse (lactate, pyruvate, acides aminés), elle amplifie la sensibilité à l'insuline par augmentation de la captation et l'utilisation périphérique du glucose, notamment au niveau musculaire, et elle retarde l'absorption intestinale du glucose (**Andrew et al. 2005 ; Zitouni Imounachen M. 2010**). La metformine est capable de réduire le taux d'HbA1c approximativement de 1% à 1,5%, elle améliore les perturbations du bilan lipidique en diminuant le taux des triglycérides, du cholestérol total et le LDL-cholestérol ; de plus, elle est associée à une réduction pondérale ou au moins à une stabilisation du poids corporel liée à une diminution de l'insulinémie (**Orban et al. 2006**). L'acidose lactique est réputée comme étant la complication la plus grave du traitement par la metformine avec une mortalité proche de 50%, dont la majorité des cas d'acidose lactique se produisent chez des diabétiques atteints d'une insuffisance hépatique, rénale, ou cardiaque. Les troubles digestifs: diarrhée, nausée, vomissement et anorexie sont fréquents et disparaissent avec la poursuite du traitement (**Tielmans et al. 2007**).

Une nouvelle classe thérapeutique de l'insulinorésistance est développée c'est les thiazolidinediones TZD (rosiglitazone et pioglitazone), ces molécules ont un mode d'action très original qui met en avant le rôle crucial du tissu adipeux dans l'homéostasie glucidique, elles sont capables de réduire l'insulinorésistance. Dans le muscle squelettique, les TZD augmentent le nombre des transporteurs de glucose Glut4 et leur translocation dans la membrane plasmique. Au niveau du tissu adipeux les TZD sont des ligands de PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma), ce dernier est un facteur de transcription qui après avoir formé un hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes, se lie à la région régulatrice d'un certain nombre de gènes et contrôle la transcription ainsi que l'expression des gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire. Les nouveaux adipocytes sous-cutané sont de petite taille et sont plus sensibles à l'insuline d'où la réduction de la concentration d'acides gras circulants. L'effet secondaire majoritaire des thiazolidinediones est limité à une toxicité hépatique (**Andrew et al. 2005, Kane et al. 2005 ; Gaborit et al. 2008**).

La troisième classe des antidiabétiques oraux est limitée aux inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases intestinales. Ces pseudotétracosaccharides d'origine bactérienne, qui forment des analogues structuraux des oligosaccharides alimentaires, inhibent de façon compétitive et réversible les  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse de l'intestin grêle (maltase, isomaltase et saccharase). Ces inhibiteurs jouant le rôle de faux substrat retardent l'hydrolyse enzymatique de poly-, oligo- et disaccharides en monosaccharides absorbables (glucose, fructose) dans l'iléon, et ils réduisent l'hyperglycémie postprandiale. Ils sont représentés par l'acarbose et le miglitol, dont l'acarbose n'est pas absorbé par le tractus digestif à la différence du miglitol (**Tielmans et al. 2007 ; Derfoufi et al. 2010**). L'efficacité hypoglycémiant de l'acarbose est moindre que celle des classes précédentes, elle ne provoque ni une hypoglycémie ni une prise pondérale. Pour toutes ces raisons elle est recommandée soit dans un diabète débutant et en monothérapie, notamment chez la personne âgée, soit dans un diabète plus sévère en association avec les sulfonylurées et la metformine voire l'insuline. Les effets secondaires de cette classe thérapeutique sont surtout de nature digestive, flatulence, ballonnement et diarrhées (**Thissen et al. 2005**).

Le diabète sucré est une maladie chronique, invalidante et coûteuse pour la population des diabétiques. Dans la région du Moyen-Orient et l'Afrique du Nord les coûts directs du traitement des maladies liées au diabète représentent 2,5 % à 15 % des budgets annuels de santé, alors que les principaux coûts indirects du diabète sont limités aux pertes de

productivité résultant des incapacités de travail et souffrances liées aux complications de cette maladie (**MENA 2010**). L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, la forte incidence des effets indésirables qui leur sont associés (particulièrement le risque d'hypoglycémie) et l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les pays en voie de développement, font qu'une large tranche de la population des diabétiques (environ 50%) dépend essentiellement de la médecine naturelle, complémentaire ou parallèle pour se soigner (**Gordon et al. 2002; Lawrance et al. 2009**). Devant ces conditions et outre les antidiabétiques oraux, la médecine traditionnelle ou la phytothérapie, constitue pour les diabétiques de type 2 une autre voie thérapeutique, en utilisant une variété de plantes médicinales à moindre coût et facilement accessibles pour traiter leur maladie (**Saravana et al. 2011; Dibong et al. 2011**).

Parmi les 250 000 espèces végétales sur terre, 80 000 présentent des propriétés médicinales, 15% sont étudiées pour leurs constitutions phytochimiques et seulement 6% pour leurs activités biologiques dont une fraction de ce pourcentage est consacrée au diabète sucré (**Fabricant et al. 2001; Prabhakar et al. 2008**). Les différentes enquêtes ethnobotaniques réalisées à travers le monde, ont montré plus de 800 plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré et ses complications, dont 410 espèces environ ont prouvé expérimentalement leur effet antidiabétique, alors que le mécanisme d'action a été déterminé pour 109 plantes seulement (**Prabhakar et al. 2008; Amala . 2006**). Certaines sont à l'origine de la mise au point de médicaments antidiabétiques, comme le biguanide (metformine), l'origine de cette molécule revient à la guanidine (galéine) isolé de *Galega officinalis* (fabacées), plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle européenne, durant la période médiévale pour le traitement du diabète sucré (**Grover et al. 2002; Andrade-Cetto et al. 2005**). D'autres plantes sont intensivement étudiées afin de mettre en valeur leur effet thérapeutique. Ces études s'intéressent souvent à tester chez les animaux de laboratoire l'effet des extraits de plantes (bruts ou purifiés) sur la glycémie, dans les conditions normales pour chercher un effet hypoglycémiant, sur un état d'hyperglycémie temporaire (HGPO) ou permanente (induite par agents diabéto-gènes: la streptozotocine ou alloxane) afin de mettre en évidence l'effet antihyperglycémiant de la plante, ou bien sur la glycémie postprandiale en vérifiant l'effet inhibiteur sur certaines enzymes ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase) impliquées dans l'absorption intestinale des glucides (**Goetz 2007**).

Les propriétés antidiabétiques des plantes peuvent s'exercer suivant différents modes d'action; soit par effet directe sur le pancréas en augmentant la taille et le nombre des îlots de Langerhans, et sur les cellules  $\beta$  pancréatiques en stimulant la sécrétion de l'insuline, la régénération cellulaire, ou une cytoprotection de ces cellules (**Amala . 2006 ; Wadkar et al. 2008**); soit par effet extrapancréatique en stimulant la captation du glucose et son métabolisme dans les cellules cibles à l'insuline, en inhibant la glycogénolyse hépatique ou l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase intestinales contribuant ainsi à rétablir l'homéostasie glucidique (**Jarald et al. 2008 ; Jung et al. 2006**).

**Prabhakar et al. (2008)** ont résumé le mécanisme d'action de plusieurs plantes antidiabétiques et leurs sites d'action. Certaines peuvent agir sur les enzymes clés de la glycolyse et du cycle de Krebs, à titre d'exemple *Aegle marmelose* (rutacées) et *Trigonella foenumgraecum* (légumineuses), elles stimulent le glucokinase responsable de la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate. *Mucuna pruriens* (fabacées) et *Panax quinquefolius* (araliacées) activent la phosphofructokinase responsable de la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate. Certaines enzymes du cycle de Krebs comme le malate déshydrogénase et le succinate déshydrogénase sont inhibées par certaines plantes telles que: *Catharanthus roseus* (apocynacées) et *Aegle marmelose* (Rutacées) (**Prabhakar et al. 2008**). Dans le cas de la néoglucogénèse, les enzymes clés sont influencés par *Ocimum sanctum* (lamiacées), *Eclipta alba* (asteracées) et *Momordica charantia* (cucurbitacées), qui inhibent la phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1,6-biphosphatase et glucose-6-phosphatase (**Prabhakar et al. 2008 ; Amala . 2006**). La conversion du lactate en pyruvate au cours de la glycolyse anaérobie est inhibée par *Allium sativum* (alliées), *Tinospora cordifolia* (ménispermées) et *Aconitum carmichaeli* (renonculacées) en inhibant la LDH. L'extrait aqueux des graines de *Trigonella foenumgraecum* (légumineuses), augmente *in vitro* la translocation des Glut4 dans les adipocytes 3T3-L1 et la captation du glucose suite à une phosphorylation des tyrosines au niveau du récepteur de l'insuline, de l'IRS1 et de la sous-unité p85 de la protéine PI3-K (**Vijayakumar et al. 2005**). La polymérisation du glucose en glycogène, est une réaction multi-étapes contrôlée principalement par le glycogène synthase au niveau hépatique, cette enzyme est affectée par certaines plantes antidiabétiques comme, *Momordica charantia* (cucurbitacées), *Curcuma longa* (zingibéracées) et *Piper betle* (bipéracées). Alors que la dépolymérisation de glycogène en glucose est influencée par *Aegle marmelose* (rutacées) et

*Ocimum sanctum* (Lamiacées) qui inhibent le glycogène phosphorylase (**Prabhakar et al. 2008**).

La sécrétion de l'insuline est sous la dépendance d'une production accrue d'ATP et une diminution du rapport ADP/ATP dans les cellules  $\beta$  conduisant, à la fermeture des canaux  $K^+$  ATP-dépendants ( $K_{ATP}$ ), la dépolarisation membranaire et l'ouverture de canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendant, l'influx de  $Ca^{2+}$  intracellulaire stimule la libération de l'insuline (**Ferré 2005**). Certaines plantes antidiabétiques peuvent agir au niveau du pancréas, soit directement sur les canaux  $Ca^{2+}$  dans les cellules  $\beta$  c'est le cas de *Pterocarpus marsupium* (fabacées) et *Panax quinquefolius* (araliacées) (**Prabhakar et al. 2008 ; Amala S. 2006**); soit sur l'amplification de la synthèse d'insuline et l'empêchement sa dégradation en inhibant l'insulinase et c'est les cas de *Achyranthes aspera* (amarantacées) et *Camellia sinensis* (théacées) (**Prabhakar et al. 2008**).

Un autre point d'action des plantes antidiabétiques se résume à l'inhibition ou ralentissement de l'absorption intestinale de glucose et autres monosaccharides suite à l'inhibition de l'hydrolyse enzymatique des glucides alimentaires par les  $\alpha$ -glucosidases, ce qui entraîne en conséquence une réduction de la glycémie post-prandiale. Parmi un certain nombre de plantes étudiées, l'extrait de feuilles de *Tamarindus indica* (léguminosées) et *Acacia pennata* (mimosacées) assurent *in vitro* une inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase supérieure à 90%. De même *Cassia auriculata* (léguminosées), *Taraxacum officinale* (composées) ainsi que le mélange d'acide ursolique et l'acide oléanolique (2:1) présentent des concentrations inhibitrices ( $IC_{50}$ ) sur cette enzyme de 23  $\mu$ g/ml, 38  $\mu$ g/ml et 2  $\mu$ g/ml respectivement (**Goetz 2007; Hasenah et al. 2006; WONGSA et al. 2012**). Certains polyphénols comme le cyanidine-3-sambubioside et l'acide 5-caféylquinique isolés du fruit de *Viburnum dilatatum* (adoxacées) sont de puissants inhibiteurs d' $\alpha$ -glucosidase ( $IC_{50}$  3, 19 et 0.77 mM), de saccharase (3,26 et 0,11 mM), maltase (3,85 et 1,83 mM), isomaltase (5,61 et 8,23 mM) et  $\alpha$ -amylase (0,96 et 83,44 mM) (**Iwai et al. 2006**). De même, l'épigallocatechine gallate à 246  $\mu$ g/ml inhibe *in vitro* à 50 % l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase (**Li et al. 2007**).

Les principaux phytoconstituants actifs isolés des plantes antidiabétiques, sont généralement des métabolites secondaires, représentés essentiellement par des alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines, glycosides, polysaccharides, stéroïdes, terpénoïdes, comme ils peuvent être des acides aminés ou des éléments minéraux (**Grover et al. 2002; Upendra et**

*al.* 2010 ; **Vikrant et al.** 2011). Ces molécules confèrent aux plantes leurs propriétés thérapeutiques. Les recherches consacrées aux plantes médicinales ont parmi d'élucider le mécanisme d'action de certains principes actifs à effet insulinothérapeutique ou insulino-mimétique.

Certains polyphénols comme, l'épigallocatechine gallate isolé du thé vert, la kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'acide gallique présentent un effet insulino-mimétique en stimulant *in vitro* la captation du glucose dans le muscle soléus et les adipocytes 3T3-L1 suite à une activation de IP3 kinase (**Jorge et al.** 2004; **Kumar et al.** 2009; **Vishnu Prasad et al.** 2010). Le ganoderane B isolé de *Ganoderma lucidum* (ganodermatacées) et l'aconitane A isolé de *Aconitum carmichaeli* (renonculacées) augmentent l'affinité des adipocytes à l'insuline (**Amala S.** 2006). Tandis que, la quercétine et la myricétine sont de puissants inhibiteurs de la protéine tyrosine kinase impliquée dans le processus post-interaction insuline-récepteur (**Prabhakar et al.** 2008). D'autres flavonoïdes, comme la quercétine et la vitéxine, isolées de l'extrait éthanolique d'*Argyrobolium roseus* (fabacées), présentent *in vitro* un effet insulinosécrétagogue dose-dépendant (**Prabhakar et al.** 2008 ; **Zabeer et al.** 2008). De même la quercétine potentialise la sécrétion de l'insuline gluco-dépendante et protège la viabilité ainsi que le fonctionnement des cellules  $\beta$  soumises à un stress oxydant (**Youl et al.** 2010a). C'est le cas également de l'épicatéchine et l'épigallocatechine-3-gallate qui protègent *in vitro* les cellules  $\beta$ -pancréatiques contre l'effet cytotoxique des IL-1 $\beta$  et de la streptozotocine (**Amala .** 2006 ; **Yun et al.** 2006). Selon **Johnston et al.** (2005) et **Kwon et al.** (2007), les polyphénols ont un effet régulateur sur l'absorption intestinale des glucides, car la myricétine affecte le transport intestinal du glucose et du fructose en inhibant les transporteurs Glut2 et Glut5 respectivement.

Récemment, il a été démontré que le 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, un alcaloïde isolé de *Angylocalyx pynaertii* (léguminosées), inhibe significativement le glycogène phosphorylase *in vivo* et *in vitro* (**Jung et al.** 2006). La berbérine stimule *in vitro* une sécrétion de l'insuline dose dépendante avec une augmentation de la captation de glucose dans les cellules en culture, les adipocytes 3T3-L1 et les myotubes L6 suite à une phosphorylation des MAPK (**Amala .** 2006; **Jun et al.** 2008; **Lee et al.** 2006). De même, la técomine isolé de *Tecoma stans* (bignoniacées) stimule *in vitro* la captation de glucose par les adipocytes (**Jung et al.** 2006). Les alcaloïdes peuvent agir sur l'absorption intestinale des glucides c'es le cas du casuarine 6-O- $\alpha$ -glucoside isolé des feuilles de *Syzygium malaccense*

(myrtacées) qui inhibe l' $\alpha$ -glucosidase intestinale avec une  $IC_{50}$  de 5,7  $\mu\text{g/ml}$  (**Jung et al. 2006**).

La momordicoside et ses dérivés aglycones sont des cucurbitacines glycosides isolés de *momordica charantia*, stimulent *in vitro* la translocation des Glut4 dans les cellules en culture, les myotubes L6 et les adipocytes 3T3-L1, cet effet est associé à une activation des MAPK impliquées dans la captation du glucose et l'oxydation des acides gras (**Tan et al. 2008**). Un diterpénoïde isolé des euphorbiacées, le phorbol ester, présente un effet insulino-mimétique expliqué par une stimulation du transport de glucose, une lipolyse et une captation des acides aminés au niveau des cellules cibles (**Prabhakar et al. 2008**). *In vivo*, la christinine-A, une saponine triterpénique, isolée des feuilles de *Zizyphus spina christi* (Rhamnacees) diminue significativement la glycémie et l'activité des phosphorylases et glucose-6-phosphatase hépatiques (**Amala S. 2006**). Deux autres tritérpeñoïdes isolés d'*Aesculus assamica* (Sapindacees), assamicine I et II stimulent *in vitro* la captation du glucose et inhibent la libération des acides gras dans les adipocytes 3T3-L1 traitées par l'épinéphrine (**Sakurai et al. 2002**). De même, l'acide oléanolique, un dérivé de terpénoïdes isolés de nombreuses plantes, et la charantine, une saponine stéroïdienne isolée de *Momordica charantia* (cucurbitacées), stimulent *in vitro* la sécrétion de l'insuline (**Prabhakar et al. 2008; Teodoro et al. 2008; Abo et al. 2008**). Le ginsenoside une saponine stéroïdienne, isolé de *Panax ginseng* (Araliacees) est caractérisée par l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose, activation de glucose-6-phosphatase avec une amélioration de l'insulinosensibilité (**Attele et al. 2002**).

Au cours de ces dernières années l'utilisation des plantes, bien ancrée dans les mœurs, a suscité un grand intérêt pour des études ethnobotaniques et ethnopharmacologiques, qui ont révélé une attention particulière à la phytothérapie. Environ 30 à 60% des diabétiques dans le monde utilisent la médecine traditionnelle (**Goguen J. 2005; Baby et al. 2011**). Au Canada et au Royaume-Uni, 17% de la population atteinte du diabète ont recours aux plantes médicinales (**Dunning 2002**). En Afrique, la phytothérapie est encore plus fréquente; en Guinée, environ 33 % utilisent les plantes antidiabétiques pour des raisons multiples, parfois associées à la croyance en l'efficacité des plantes (74%), une meilleure accessibilité à ce type de traitement (70%) et le faible coût des plantes (48%) (**Baldé et al. 2006**). 80% des Nigériens diabétiques utilisent les plantes, dont 42% se traitent par les légumineuses et 64% par les astéracées (**Abo et al. 2008; Upendra et al. 2010**).

Dans les régions méditerranéennes, connues par leur richesse en plantes médicinales (environ 985 espèces totale dont 406 présentent un usage médicinale), il est difficile d'estimer à quelle fréquence les personnes atteintes du diabète font appel à la phytothérapie (**González-Tejero et al. 2008**). Au Maghreb, peu de données informatives sont disponibles à l'exception du Maroc, où plusieurs études ethnobotaniques réalisées dans différentes régions du royaume, ont révélé un pourcentage d'utilisation qui varie entre 67% et 80% (**Jouad et al. 2001; Eddouks et al. 2007; Taharaoui et al. 2007**). L'utilisation des plantes est caractéristique d'une tranche d'âge de 30 à 60 ans, dont les hommes (37%) utilisent moins les plantes que les femmes (63%), et la majorité de la population étudiée appartient au milieu urbain (84%) avec un niveau socio-économique moyen (72%) (**Jouad et al. 2001; Bouxid 2012**). En Algérie très peu d'enquêtes ethnobotaniques sont publiées pour le recensement de plantes antidiabétiques. A Tlemcen, une étude réalisée sur 634 diabétiques, a révélé que 62% environ font appel à la médecine traditionnelle contre 38% qui se traitent par les antidiabétiques (**Allali et al. 2008**). Dans cette région les femmes qui habitent dans les régions urbaines (62%) sont les plus concernées (**Azzi et al. 2012**).

Selon la bibliographie, en Afrique la population des diabétiques utilise pratiquement la même gamme des plantes médicinales, estimée en nombre de 45 à 54 plantes au Maroc, 31 au Niger et environ 60 au nord-ouest algérien (**Jouad et al. 2001; Taharaoui et al. 2007; Allali et al. 2008; Azzi et al. 2012**). Dans la pharmacopée traditionnelle africaine, les plantes les plus utilisées pour le traitement du diabète sucré, regroupées en certaines familles botaniques notamment les lamiacées, liliacées, léguminosées, cucurbitacées, apocynacées, et les moracées, sont représentées essentiellement par *Trigonella foenum graecum* (léguminosées), *Momordica charantia* (cucurbitacées), *Citrullus colocynthis* (cucurbitacées), *Ficus bengalensis* (moracées), *Berberis vulgaris* (berbéridacées), *Globularia alypum* (globulariacées), *Allium sativum* (liliacées), *Allium cepa* (liliacées), *Olea europaea* (oléacées), *Nerium oleander* (apocynacées) et *Ajuga iva* (lamiacées) (**Bnouham et al. 2006; Taharaoui et al. 2007; Allali et al. 2008; Aboa et al. 2008; Vikrant et al. 2011**).

Parmi les plantes citées ci-dessus, la famille des cucurbitacées est la plus importante pour leurs fruit et graines comestibles. Appartenant à des genres comme *Cucurbita* (le potiron, les courges, la courgette), *Cucumis* (le melon, le cantaloup, le comcombre, le cornichon), *Citrullus* (la pastèque), *Benincasa* (la pastèque de Chine), et *Sechium* (la chayote). Les fruits séchés de *Lagenaria* (la calebasse) sont utilisés comme des poteries et les fruits secs

de *Luffa* constituent l'éponge végétale (Judd et al. 2002). Cette famille regroupe environ 120 genres et 900 espèces distribuées dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique, l'Asie, l'Australie et l'Amérique (Crase. 2011). ces espèces sont parmi les plantes médicinales les plus utilisées dans le traitement du diabète sucré dans ces régions (Taharaoui et al. 2007; Allali et al. 2008; Asyaz et al. 2010), dont les plus réputées sont *Bryonia alba*, *Citrullus colocynthis*, *Coccinia indica*, *Cucumis sativus*, *Cucumis trigonus*, *Cucumis metuliferus*, *Momordica charantia*, *Momordica cymbalaria*, *Momordica foetida*, *Momordica balsamina*, *Momordica dioïca*, *Tricosanthes dioïca*, *Luffa acutangula*, *Luffa tuberosa* (Balaraman et al. 2010; Dhiman et al. 2012). La fréquence d'utilisation de ces plantes varie d'une région à une autre en fonction de leur distribution géographique et leur disponibilité. Selon certaines enquêtes ethnobotaniques *Momordica charantia* et *Citrullus colocynthis* sont fréquemment utilisées en médecine populaire en Asie (Singh et al. 2007; Chaturvedi 2005; Handa et al. 2006; Baby et al. 2011). Tandis que *Citrullus colocynthis* est la employée dans les régions désertiques et subdésertiques de l'Egypte, du Soudan (Amala 2006; Aboa et al. 2008), de l'Iran (Mosaddegha et al. 2012), de l'Algérie (Didi et al. 2003; Allali et al. 2008; Azzi et al. 2012), de la Tunisie (Hammouda et al. 2005) et du Maroc (Jouad et al. 2001; Bnouham et al. 2006).

*Citrullus colocynthis* est connue sous plusieurs noms vernaculaires; handal, tator et hadaj en arabe, taberka et tadjellet en langue berbère, coloquinte et chicotin en français, colocynth et bitter cucumber en anglais (Hammouda et al. 2005). C'est une plante vivace herbacée à tige grimpante et entièrement hérissée de poiles raides, de 0,5 à 1,5 m de longueur, originaire des parties les plus tempérées de l'Asie et de l'Afrique. Elle se trouve en Arabie Saoudite, en Syrie, en Egypte et dans la région méditerranéenne, ainsi que dans les étendues arides et sablonneuses du nord-ouest, du centre et du sud de l'Inde (Chopra et al. 1960; Hammouda et al. 2005). Ses feuilles alternes, arrondies en cœur à leur base, de couleur verte vif, sont nettement échancrées en 3 ou 7 lobes de 5 à 10 cm de long. Les fleurs sont bisexuées, solitaires, de couleur jaune pâle, pédonculées, auxiliaires à 5 lobes. La coloquinte est à l'origine de fruits globulaires lisses intensivement amères de 8 à 10 cm de diamètre, ressemblant à de petites pastèques (de la grosseur d'une orange) appelés les péponides ou gourdes, recouverts d'une écorce dure et assez mince colorée de vert foncé ou de jaune selon la maturité, renfermant une pulpe blanche et spongieuse dans laquelle se trouvent de nombreuses graines, brunes, lisses, ovales, de 4 à 6 mm de long. La plante fleurie entre Avril-Mai et elle peut produire en été

environ 40 à 60 fruits chaque année, dont chacun peut contenir 200 à 300 graines (**Boullard 2001; Ozenda P. 2004; Hammouda et al. 2005; Chehma A. 2006**).

Selon la littérature, les graines de coloquinte renferment environ 17 à 21% de lipides totaux, dont 80 à 85% sont des acides gras insaturés essentiellement l'acide linoléique (73%) et l'acide oléique (44%), avec la présence de l'acide myristique (0,1%), palmitique (10%) et stéarique (6%) (**Abu-Nasr et al. 1953; Akoh et al. 1992; Schafferman et al. 1998; Gurudeeban et al. 2010**). Les graines contiennent également les fibres brutes (52%), l'eau (3%), les cendres (3%), les carbohydrates (8%), l'acide ascorbique (30,12mg), certains éléments minéraux Na, Mg, Fe (78,34 ; 33,35 ; 3,88 ppm respectivement) et des protéines totales (24% à 35%), dont le taux des acides aminés essentiels est de 52%, représenté essentiellement par phénylalanine (41%), leucine (76%), méthionine (2%), lysine (36%), isoleucine (32%), valine (37%), thréonine (23%), histidine (23%) et arginine (66%), également l'acide aspartique et l'acide glutamique se présentent à plus de 90%. Un acide aminé non conventionnel déterminé dans les graines à 7% c'est le  $\beta$ -pyrazol-1-yl-alanine, il est spécifique aux cucurbitacées (**Sawaya et al. 1986; Nmila et al. 2002; Giwa et al. 2010; Sultan et al. 2010; Ogundele et al. 2012**).

Plusieurs études phytochimiques et de chimie analytique réalisées sur différents extraits de différentes parties de la coloquinte: fruits, feuilles et racines, ont contribué à l'identification de certains composants chimiques de cette espèce. Les travaux de **Darwish et al. (1974)** ont révélé la présence de trois alcaloïdes  $C_{10}H_{15}NO_3$ ,  $C_{20}H_{32}NO$  et  $C_{16}H_{24}NO_7$  dans la plante entière: graines, pulpe, feuilles et racines. Par ailleurs, l'analyse du spectre SM et RMN  $H^1$  d'extrait d'éther de pétrole du fruit de la coloquinte, a révélé la présence de stérols dans cette plante, le n-octacosanol ( $n-C_{28}H_{58}O$ ) et 1,26-hexacosan-diol ( $n-C_{26}H_{54}O_2$ ) (**Hatam et al. 1990**). **Sultan et al. (2010)** ont déterminé dans de la plante entière (100 g) les taux de: 1,39 mg de flavonoïdes, 0,52 mg de saponosides, 1,64 mg d'alcaloïdes et 1,64 mg de composés phénoliques. L'extrait méthanolique du fruit de la coloquinte est riche en cucurbitacine I, E, L, J et T, ainsi que des cucurbitacines glucosides 2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyle-16 $\alpha$ -20R-dihydroxy-cucurbita-1,5,23E,25(26)tetraen3,11,22trione; le 2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyle-cucurbitacine B et le 2,25-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosyle cucurbitacine L (**Sonja et al. 2000; Nayab et al. 2006; Seger et al. 2005**). Trois nouveaux cucurbitacines glycosides ont été récemment identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle du fruit de la

coloquinte, il s'agit de colocynthine A ( $C_{36}H_{51}O_{11}$ ), B ( $C_{37}H_{55}O_{12}$ ) et C ( $C_{36}H_{51}O_{11}$ ) (Nayab et al. 2010).

Concernant les flavonoïdes, les travaux de Mahesh et al. (2008) ont révélé la présence de quercétine dans l'extrait acétate d'éthyle de la coloquinte (fruit, tige, feuille et racine). De même, Maatooq et al. (1997) et Delazar et al. (2006) ont isolé trois flavonoïdes glucosides à partir de l'extrait hydrométhanolique (70%) du fruit de la coloquinte; isovitexin, iso-orientin et iso-orientin-3'-méthyléther, pareillement la partie aérienne (feuille et tige) contient trois autres flavonoïdes dérivés du C-p-hydroxybenzyl: 8-C-p-hydroxybenzoylisovitexine, 6-C-p-hydroxybenzoylvitexine et 8-C-p-hydroxybenzoyl isovitexine 4'-O-glucoside. Récemment autres nouveaux flavonoïdes glycosides ont été identifiés à partir du fruit il s'agit de  $\beta$ -sitostérol, acid p-hydroxybenzoïque, 6-C-p-méthylbenzoylvitexine, dihydrocucurbitacine E, dihydro-*epi*-iso-cucurbitacine D et dihydroisocucurbitacine B-25-acétate (Miao et al. 2012). Le fruit de la coloquinte renferme deux nouveaux cucurbitacine-glycosides triterpéniques c'est le colocynthosides A et B (Yoshikawa et al. 2007). Les glycosides se trouvent en grande quantité dans la coloquinte, au niveau de la pulpe (0,22%), graines (0,18%), tiges (0,17%) feuilles (0,15%), dont le colocynthin ( $C_{56}H_{34}O_{23}$ ), le glycoside majoritaire responsable de l'amertume et des propriétés médicinales de la pulpe (Natiq et al. 1989; Darwish et al. 74).

La coloquinte un purgatif drastique, largement utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies, présente plusieurs activités thérapeutiques et thérapeutiques: diurétique, anti-inflammatoire, antihistaminique, anti-acétylcholine, anti-épileptique, anthelmintique, antibactérienne, acaricide, nématocide, herbicide et insecticide (Talole et al. 2011; Hammouda et al. 2005; Muniasamy et al. 2010). Elle est recommandée dans le traitement d'autres maladies comme l'asthme, l'aménorrhée, la jaunisse, le rhumatisme, la migraine, la leucémie et le cancer touchant certains organes: vessie, sein, colon, foie et la rate (Duke et al. 2002). Elle est également utilisée contre le diabète, l'hypertension artérielle, la goutte, les hémorroïdes, les désordres biliaires, urinaires, et contre les piqûres de scorpions (Duke et al. 2002; Hammouda et al. 2005; Boullard 2001). Certaines de ces activités biologiques ont été expérimentalement prouvées par de nombreuses études scientifiques.

Les travaux de **Torkey et al. (2009)**, ont démontré un effet insecticide de l'extrait éthanolique du fruit de la coloquinte testé contre *Aphis craccivora* (LC<sub>50</sub> 11003 ppm); de plus, l'extrait aqueux protège les feuilles des ouvrages contre l'attaque des insectes et des souris (**Boyaghchi 2008**). **Merzouk et al. (2009; 2010)**, ont évalué dans l'extrait aqueux de cette plante (Fruit et graines) un effet antibactérien contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (CMI 0,2mg/ml), et un effet antifongique contre *Candida albicans* (CMI 0,1mg/ml). Tandis que **Gacem et al. (2013)** ont révélé un effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de graines contre 4 souches d'aspergillus : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger*. De même, l'extrait éthanolique de cette plante présente un effet inhibiteur sur *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (**Memon et al. 2003; Najafi et al. 2010; khatibi et al. 2011**). Les huiles essentielles des graines sont efficaces contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (CMI 0,125mg/ml) et *Aspergillus niger* (CMI 1mg/ml) (**Doss et al. 2011**).

Les cucurbitacines glucosides E et B, isolés des feuilles de la coloquinte ont présenté *in vitro* (20µM) un effet inhibiteur sur la prolifération de lignées cellulaires du cancer du sein (ER<sup>+</sup> MCF-7 et ER<sup>-</sup> MDA-MB-231) en bloquant les cellules en phase G<sub>2</sub>/M. A l'échelle moléculaire cet effet est limitée à une inhibition de la protéine p34<sup>CDC2</sup> par phosphorylation sur les résidus Thr 14 et Tyr 15 d'où la réduction du taux du complexe p34<sup>CDC2</sup>/cycline B1, protéine clé régulatrice de la phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire. Ces cucurbitacines sont responsables de la désorganisation des microfilaments d'actine impliqués dans le changement de la forme cellulaire allongée à la forme arrondie au cours de la phase M (**Jian et al. 2005; Tannin-Spitz et al. 2007a**). Généralement les cucurbitacines, qui sont des triterpènes tétracycliques isolées principalement des cucurbitacées, sont réputées par leur propriété anti-inflammatoire, analgésique et cytotoxique *in vitro* et *in vivo* (**Merzouk et al. 2011; Merzouk et al. 2010b; Ayyad et al. 2012**).

Certaines cucurbitacines, tels que cucurbitacine I, Q et B induisent l'apoptose de certaines lignées de cellules cancéreuses en inhibant la phosphorylation de la STAT3 et l'expression des protéines p53 et p21 (**Jayaprakasam et al. 2003; Escandell et al. 2008**). De même l'extrait hydro-alcoolique (50mg/kg) de la pulpe de la coloquinte diminue significativement le taux de cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-6 et IL-10 associés à l'obésité chez la souris mâle BALB/c (**Sanadgol et al. 2011**). La fraction aqueuse de polysaccharides du fruit et l'extrait de protéine de graine de la coloquinte, présentent *in vitro*

une activité immunostimulante dose-dépendante sur les cellules de rate de souris et de lapin ( $IC_{50} = 60 \mu\text{g/ml}$ ) respectivement (**Bendjeddou et al. 2003; Daoudi et al. 2012**).

En dermatologie, les inhibiteurs de la tyrosinase devraient être cliniquement utiles pour le traitement de certaines maladies telles que le mélasma, les taches de vieillesse et les lésions actiniques associées à une hyperpigmentation mélanique. De ce fait, *in vitro* la cucurbitacine E (isolée du fruit), présente une forte inhibition de l'oxydation de la L-DOPA en dopaquinone par la tyrosinase ( $IC_{50} = 1,99\mu\text{M}$ ), cette enzyme est impliquée dans la synthèse de la mélanine suite à une hydroxylation de la tyrosine qui se transforme en DOPA (dihydroxyphénylalanine), dopaquinone puis en mélanine (**Fadimatou et al. 2010**). L'extrait éthanolique et éther de pétrole du fruit de la coloquinte, appliqués par voie topique sur la peau dénudée des rats albinos (2% à base de pommade), stimulent la poussée des cheveux chez ces animaux en activant à plus de 70% les follicules pileux contre 67% obtenu par le contrôle (minoxidil 2%) (**Roy et al. 2007; Dhanotia et al. 2011**). D'autres études en pharmacologie ont certifié que le fruit de la coloquinte (extrait hydroéthanolique 100 mg/ml) présente *in vitro* sur des tranches (slices) de foie de rat un effet hépatoprotecteur contre la toxicité de  $\text{CCl}_4$  en inhibant la peroxydation des lipides et la production des substances réactives de l'oxygène (ROS) dans les microsomes hépatiques (**Barth et al. 2002**), de même l'administration orale de l'extrait éthanolique du fruit (200mg/kg) chez les rats albinos révèle un effet cytoprotecteur du foie contre la toxicité du paracétamol (**Dar et al. 2012**). Selon la méthode de ligature du pylore, l'extrait méthanolique du fruit de la coloquinte (200 et 400mg/kg) présente un effet antiulcéreux chez le rat Wistar toute en diminuant à 71% le volume gastrique (**Gill et al. 2011; Reddy et al. 2012**).

D'autres recherches scientifiques réalisées sur la coloquinte sont consacrées à la mise en valeur de l'activité antidiabétique et antioxydante du fruit et des graines de cette plante. Les travaux de **Wasfi (1994)** ont révélé que l'administration intrapéritonéale de l'extrait chloroformique (5 ml/Kg) et l'extrait méthanolique (500mg/Kg) du fruit, ne provoque aucun changement significatif de la glycémie chez les rats normaux et les rats-streptozotocine suivies 4 heures après injection de l'extrait. Par contre, l'administration orale de l'extrait aqueux de l'écorce du fruit (300 mg/kg) diminue significativement l'hyperglycémie à court terme (3 heures et 6 heures) chez les lapins rendus diabétiques par l'alloxane (**Abdel Hassan et al. 2000**). Chez les rats non diabétiques l'administration quotidienne de l'extrait aqueux du fruit (50 et 100 mg/kg) pendant 28 jours ne présente aucun changement significatif de

quelques paramètres biochimiques TGO, TGP, LDH, Urée et créatinine ce qui élimine la toxicité de cet extrait (**Atole et al. 2009**).

**Dallak et al. (2009b)** et **Al-khateeb et al. (2009)** ont révélé que l'administration orale de l'extrait éthanolique (300 mg/kg) de la pulpe, est responsable de la réduction de l'hyperglycémie et l'augmentation de l'insulinémie à court terme (5 heures de suivi) chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane et les rats diabétiques soumis au Test de Tolérance Intra-Veineuse au glucose (IPGTT). De plus, cet extrait à la même dose et à long terme (30 jours de traitement) assure une diminution significative du taux de l'hémoglobine glyquée et une régulation de certaines enzymes de la glycolyse et la néoglucogenèse, en provoquant une diminution concomitante de glucose-6-phosphatase et fructose-1,6-bisphosphatase, associée à une augmentation du taux de l'insuline stockée dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, avec une faible stéatose hépatique (**Dallak et al. 2009a; Khalil et al. 2010**).

L'administration orale de l'extrait aqueux des graines diminue significativement le taux plasmatique de certains ions et paramètres biochimiques perturbés par l'injection intrapéritonéale de la streptozotocine chez les rats Wistar, comme LDH, TGO, TGP, K, Na et P (**Al Ghaithi et al., 2004**). L'injection intrapéritonéale de l'extrait aqueux des graines chez les rats streptozotocine (1,25 g/kg) provoque une faible diminution de l'hyperglycémie à court terme (4 heures) et une diminution significative à long terme (47 jours de traitement) (**Benmehdi et al., 2008**). De même, l'extrait aqueux des racines de *Citrullus colocynthis* (2g/kg) provoque une réduction significative de l'hyperglycémie (-58,70%) par rapport à l'extrait chloroformique (-34,72%) et éthanolique (-36,60%) chez les rats diabétiques (alloxane) (**Agarwal et al., 2012**).

**Delazar et al. (2006)** ont démontré que 200 mg/kg p.c.de l'extrait méthanolique du fruit diminue significativement l'hyperglycémie chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane et suivis pendant 6 heures. Une autre étude clinique, soutenue par l'université de Téhéran faculté des sciences médicales, portée sur 50 patients diabétiques de type 2 répartie en deux groupes dont un reçoit 3 fois par jour 100 mg/kg p.c.de la poudre du fruit sous forme de capsule, et le groupe témoin reçoit un placebo pendant deux mois de suivi. Cette étude a révélé une diminution significative de l'hyperglycémie, de l'hémoglobine glyquée et de triglycéridémie sans noter aucune affection gastro-intestinale dans les deux groupes (**Huseini et al. 2009**). Les lapins néo-zélandais, soumis à un régime alimentaire riche en cholestérol et

la poudre d'extrait hydrométhanolique (30/70 v/v) de graine et de pulpe de la coloquinte, aux concentrations 100 et 200 mg/kg p.c. révèlent une diminution du taux de quelques paramètres lipidiques (Triglycérides, cholestérol, HDL-cholestérol et LDL-cholestérol) (**Zamani et al. 2007**). De même, la prise orale de la poudre du fruit (100mg/kg) trois fois par jour pendant six semaines (sous forme de capsules), diminue significativement chez des patients hyperlipédimiants (non diabétiques) le taux du cholestérol et des triglycérides (**Rahbar et al. 2010**). Également l'administration orale d'un mélange d'extraits aqueux de graines (300 mg/kg) de trois plantes: *Citrullus colocynthis*, *Acacia modesta*, *Polygonum fagopyrum*, assure un effet hypoglycémiant significatif chez les lapins diabétiques accompagné d'une augmentation de l'insulinémie et une protection des cellules  $\beta$ -pancréatiques contre l'effet cytotoxique de l'alloxane (**Zaman 2011**).

L'effet antidiabétique a été également déterminé pour certains familles chimiques isolé de la coloquinte, les travaux de **Abdel Hassan et al. (2000)** ont révélé que l'administration orale, chez des lapins diabétiques (alloxane), des extraits de glycoside (50mg/kg), alcaloïdes (50mg/kg) et de saponosides (50mg/kg) isolés de l'épicarpe, sont capables de réduire significativement l'hyperglycémie à court terme au bout de 2 et 3 heures après administration de chaque extrait, dont l'extrait de saponosides semble le plus intéressant. De la même manière l'extrait brut de saponosides des graines de la coloquinte injecté par voie intrapéritonéale chez des rats-streptozotocine (20mg/kg) diminue significativement l'hyperglycémie au bout de 48 heures, cette diminution est maintenue durant plus de 4 semaines de suivi (**Benmehdi et al. 2011**).

Concernant le stress oxydatif, les travaux de **Jeyanthi et al. (2011)** ont certifié que l'extrait aqueux des graines de la coloquinte (300 mg/kg) chez les rats diabétiques présente un effet antidiabétique en diminuant l'hyperglycémie, l'hémoglobine glyquée, et un effet antioxydant limité à une augmentation significative du taux des enzymes antioxydantes plasmatiques et hépatiques (SOD, CAT, GSH, GPX, LPO). Pareillement, les travaux de **Dallak et al. (2010)** ont démontré que la prise orale de l'extrait aqueux de pulpe (300 mg/kg) pendant 30 jours, assure un effet antioxydant intéressant qui se résume à une augmentation du taux de SOD, de la catalase et une diminution des TBARS érythrocytaires. L'extrait hydroéthanolique (70%) de pulpe, administré quotidiennement par voie orale (50mg/kg) pendant 50 jours de traitement, présente un effet antioxydant intéressant et effet protecteur sur la fonction rénale, justifié respectivement par une augmentation significative du taux

plasmatique de SOD, GSH, GPx, et une amélioration du fonctionnement du glomérule qui constitue le site d'une néphropathie du diabétique (**Abd El-Baky et al. 2011**). Selon **Jayaraman et al. (2009)**, l'extrait éther de pétrole du fruit administré par voie orale chez les rats diabétiques pendant 14 jours, provoque un effet antihyperglycémiant et antioxydant dose-dépendant (300 et 500mg/kg) en diminuant l'hyperglycémie et le taux de TBARS (substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique).

D'autres études *in vitro* ont bien révélé l'activité antiradicalaire de la coloquinte. L'extrait méthanolique du fruit aux concentrations de 1 à 2,5 mg/ml assure une réduction de 88% du DPPH (**Kumar et al. 2008; Taghreed et al. 2010; Menghani et al. 2012**). De même, 10 mg/ml de l'extrait éthanolique de feuilles, réduit *in vitro* 82% du DPPH et augmente à 97% l'activité de la SOD sur la réduction des radicaux libres (**Thirunavukkarasu et al. 2010**). Tandis que l'extrait n-butanol du fruit (0,1 mg/ml) assure une faible réduction du DPPH environ 40% (**Al-Busafi et al. 2007**). **Asghar et al. (2011)** ont démontré que les extraits méthanolique et acétate d'éthyle de l'épicarpe de la coloquinte présentent *in vitro* une activité antiradicalaire sur le DPPH avec une IC<sub>50</sub> de 505 µg/ml et 215 µg/ml respectivement. Certains flavonoïdes isolés du fruit présentent un pouvoir antiradicalaire intéressant estimé par une IC<sub>50</sub> de 70 µg/ml, 0,5 µg et 3 µg/ml pour l'isoscoparin, isovitexin et isoorientin 3-O-méthyle éther respectivement (**Delazar et al. 2006**).

La coloquinte demeure fréquemment utilisée en médecine populaire pour de nombreuses indications thérapeutiques, malgré sa toxicité. **Dehghani et al. (2003; 2008)** ont démontré que l'administration orale de l'extrait hydroéthanolique du fruit est responsable d'une infertilité irréversible en diminuant, d'une manière dose dépendante (30, 60 et 120mg/kg), le taux de fertilité ainsi que le nombre des embryons chez la souris (BALB/c). L'administration intrapritonéale de l'extrait alcoolique de graines à différentes doses: 50, 100, 200 et 400mg/kg p.c.p.c., provoque une toxicité hépatique dose dépendante, en particulier les doses 200 et 400mg/kg p.c.p.c., limitée à une fibrose et une nécrose hépatique (**Dehghani et al. 2006; Khatibi 2012**). De plus, la prise orale du décocté de fruit de la coloquinte provoque une diarrhée, une hypotension, une hypoglycémie avec une augmentation du taux des transaminases sériques (**Rezvani et al. 2011; Barri et al. 1983**). Tandis que, la consommation chronique d'un régime alimentaire à base de graines de la coloquinte (25%, 50% et 75% p/p) chez les rats pendant 90 jours, ne montrent aucune lésion tissulaire au

niveau du foie, le pancréas et les testicules; par contre, le rein et l'intestin sont fortement touchés (**Ambi et al. 2007**). L'étude comparative de la toxicité de graines et de pulpe de la coloquinte réalisée par **Shafaei et al. (2012)** chez des lapins, recevant oralement l'extrait hydrométhanolique pendant 4 semaines à différentes doses 100 et 200mg/kg, a indiqué une forte toxicité de la pulpe sur le foie, le rein et l'intestin par rapport aux graines qui sont plus efficaces et non toxique, cette toxicité est liée à la richesse de la pulpe en cucurbitacines. De même, la toxicité la plus franche dans les extraits des fruits et des graines immatures (**Rahimi et al. 2012**). Une autre forme de toxicité accidentelle de la coloquinte est la toxicité cutanée observée lors de l'usage externe (topique) d'une décoction du fruit dans l'eau chaude, un mode d'utilisation traditionnel utilisé par la population des diabétiques qui consiste à tromper les pieds dans cette préparation; ce qui abouti à une carbonisation du pied de l'utilisateur et son amputation (**Fejjal et al. 2011**).

***Partie expérimentation et resultats :***

***Chap. I: Etude Phytochimique de la coloquinte***

***Chap. II: Etude in vivo de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte***

***Chap. III: Etude in vitro de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte***

***Chap. I : Etude Phytochimique de la coloquinte***

*Introduction*

La phytochimie est indispensable dans l'analyse et l'identification des composés naturels issues des plantes, et susceptibles d'être exploités dans de nombreux domaines: pharmaceutique (antioxydants, antitumoraux, antibiotiques), alimentaire (colorants, arômes), agroalimentaire (pesticides, insecticides) et cosmétique. Ces composés connus sous le nom de métabolites secondaires sont classés en trois groupes majeurs: les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpénoïdes, qui diffèrent par leurs structure, voie de biosynthèse, propriétés physico-chimiques et leurs rôle dans la plante.

L'isolement et la caractérisation de ces métabolites nécessite d'abord la préparation des extraits bruts à partir du matériel végétal (feuilles, tiges, racines, fruits) en utilisant des solvants et des méthodes d'extractions sélectifs. Ces deux derniers jouent un rôle important dans la sélection et la solubilisation de molécules à extraire. Cette solubilisation peut être effectuée par différentes méthodes: infusion, décoction, macération ou une hydrodistillation en choisissant le solvant (polarité, miscibilité): aqueux, alcoolique ou hydro-alcoolique. De même, La séparation et le fractionnement chromatographique sont essentiels pour la purification de ces extraits et leurs composants, tandis que les tests phytochimiques restent préliminaires et nécessitent une analyse chimique qualitative (LC-SM, RMN) qui détermine la structure chimique des phytoconstituants.

Selon la bibliographie, la majorité des études phytochimiques réalisées sur *Citrullus colocynthis* sont consacrés au fruit entier ainsi que les feuilles, les tiges et les racines. En ce qui nous concerne, nous nous sommes intéressés aux graines de fruit sec et mature. Pour ce faire, nous avons procédé à une étude phytochimique des extraits de graines de cette plante. Certains extraits aqueux et organiques, préparés à partir des graines: un extrait brut aqueux non dégraissé (EI) et dégraissé (EII), extrait hydrométhanolique (EM), extrait acétate d'éthyle (EAc) et un extrait n-butanol (En-B). Ces extraits ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques classiques, un dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux, des analyses de chromatographie sur couche mince et sur colonne. Nous avons également testé l'activité antioxydante des extraits préparés en mesurant leur pouvoir antiradicalaire sur le DPPH.

Cette première partie de notre travail, étude phytochimique, est répartie en: matériel et méthodes, regroupant le matériel et les techniques utilisés suivie par, interprétation et discussion des résultats.

***Chap. I : Etude Phytochimique de la coloquinte***

*Matériel et Méthodes*

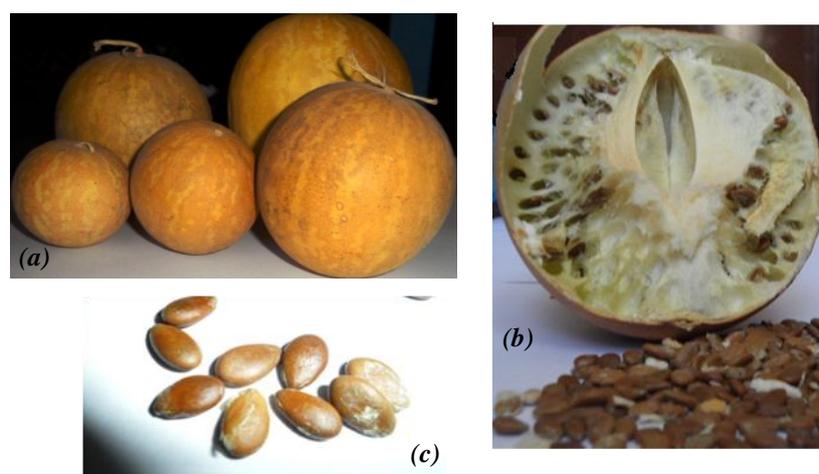
## Matériel et Méthodes

### 1. Matériel végétal

Après identification botanique de la plante, détermination de la famille, du genre et de l'espèce au niveau du département de biologie comme étant *Citrullus colocynthis*. Le matériel végétal utilisé dans ce travail est les graines de la coloquinte (**Figure 2c**). Le fruit est récolté à maturité en automne (entre le mois de Septembre et Novembre), dans une région qui s'étend entre Mechria et Aïn sefra, Wilaya de Naâma-Algérie (**Figure 1**). Au laboratoire les fruits sont séchés à l'ombre et à température ambiante, puis les graines sont récupérées et stockées soigneusement jusqu'au jour de l'utilisation (**Figure 2 a, b, c**).



**Figure 1** : Champ de *Citrullus colocynthis*, photo prise sur lieu de récolte région de Aïn sefra



**Figure 2** : Fruit et graines de *Citrullus colocynthis*. (a): différentes formes du fruit; (b): fruit et graines ; (c): graines.

## 2. Préparation des extraits

Les graines de la coloquinte ont été utilisées pour la préparation des extraits aqueux et organiques (**Figure 3**). La préparation de certains extraits nécessite un dégraissage du matériel végétal, afin d'éliminer, lipides, cires, pigments et autres substances lipophiles.

### 2.1. Dégraissage du matériel végétal

Les graines séchées (100g) et finement broyées (à l'aide d'un moulin), sont placées dans un sohxlet et dégraissées par l'hexane (150 ml) pendant trois heures. Après dégraissage, l'échantillon est séché à l'étuve (37°C) pendant 24 heures, puis stocké à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'au jour de l'utilisation.

### 2.2. Préparation de l'extrait brut aqueux non dégraissé (EI)

La préparation de cet extrait a été réalisée comme suit:

- 125 g des graines entières sont mises à infuser dans 225 ml d'eau distillée à 50°C pendant une heure;
- L'ensemble est porté à une extraction à chaud sous reflux pendant 15min ;
- Après refroidissement, les graines sont récupérées par filtration, l'extrait est en suite centrifugé;
- Le surnageant récupéré (solution limpide de couleur marron) est mis à évaporer à sec ;
- Le produit récupéré représente l'extrait aqueux non dégraissé **EI**.

### 2.3. Préparation de l'extrait brut aqueux dégraissé (EII)

Les graines entières (non broyées) récupérées de la première extraction (préparation de l'extrait EI) sont réutilisées pour préparer l'extrait brut aqueux dégraissé (EII).

- Les graines récupérées à l'issue de la première extraction sont mis à sécher à l'étuve à 37°C pendant 24h; puis sont finement broyées, et soumises à un dégraissage par l'hexane (120ml) dans le sohxlet pendant 3 heures;
- Les graines dégraissées (125g) sont mises en infusion pendant 1 heure à 50°C ;
- L'ensemble est porté à une extraction à chaud sous reflux pendant 15min ;
- Après refroidissement, la solution est filtrée puis centrifugée ;
- Le surnageant récupéré (solution limpide de couleur jaune) est évaporé à sec ;
- Le produit récupéré représente l'extrait aqueux dégraissé **EII**.

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

La préparation de l'extrait eau-méthanol est réalisée comme suit :

- Extraction trois fois sous reflux et à chaud pendant 3 heures, de 50 g de graines broyées et dégraissées dans 100 ml du mélange eau/méthanol (30/70);
- Centrifugation de la solution (15 min à 3000 tr/min) et filtration du surnageant;
- Récupération du filtrat et évaporation à sec;
- Récupération du produit dans les parois du ballon d'évaporation, c'est l'extrait **EM**.

## 2.5. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle (EAc)

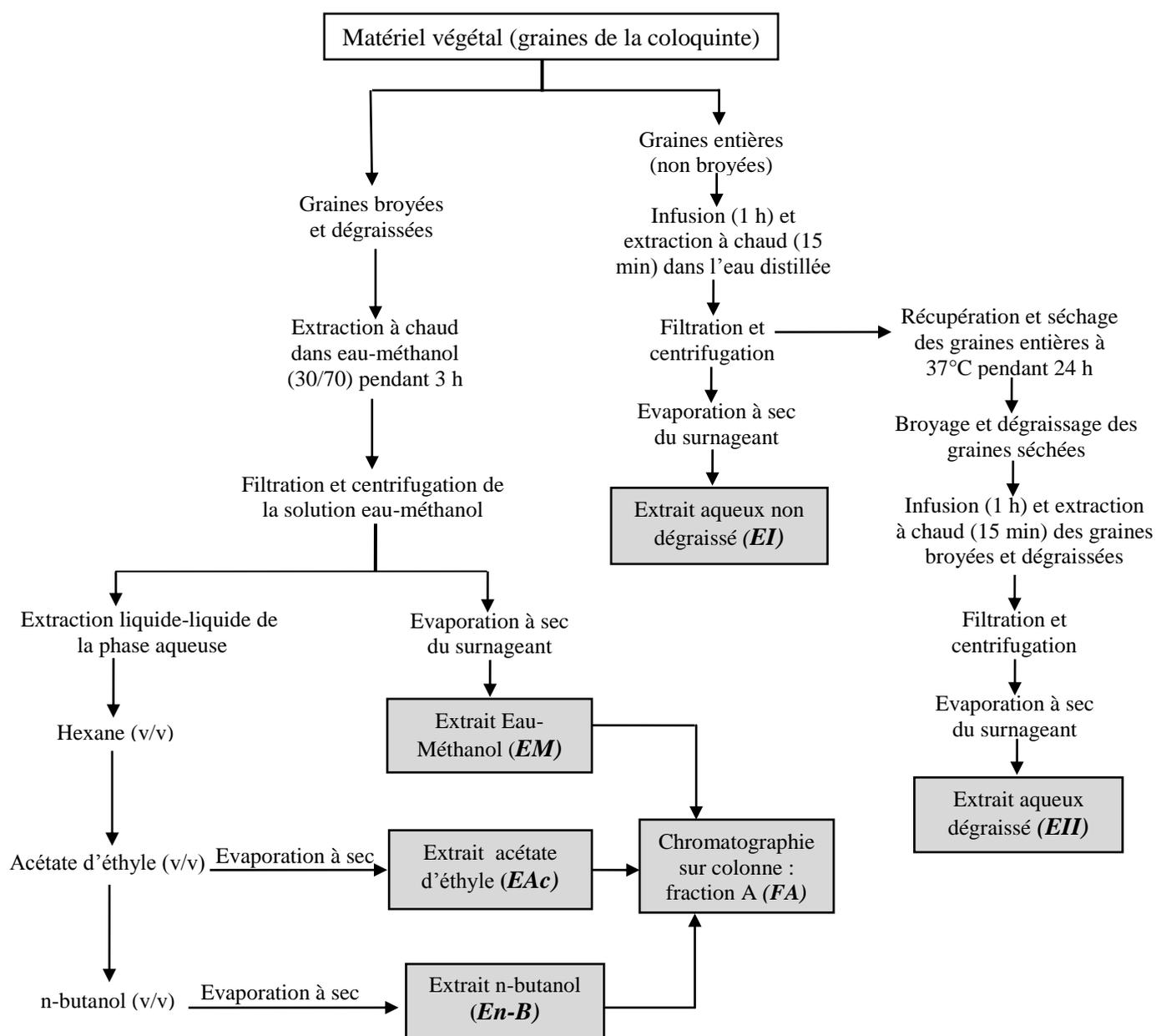
La préparation de cet extrait est réalisée comme suit :

- Extraction trois fois sous reflux et à chaud pendant 3 heures, de 50 g de graines broyées et dégraissées dans 100 ml du mélange eau/méthanol (V/V; 30/70) ;
- Centrifugation de la préparation (15 min à 3000 tr/min) et filtration de surnageant;
- Concentration du filtrat et récupération de la phase aqueuse ;
- Extraction liquide-liquide de la phase aqueuse par ;
- Hexane (v/v) pour éliminer le maximum de graisses restantes ;
- Acétate d'éthyle (v/v), extraction 3 fois, et évaporation à sec de la phase organique acétate d'éthyle
- Récupération, sur les parois du ballon d'évaporation, de l'extrait **EAc**

## 2.6. Préparation de l'extrait n-butanol (En-B)

La préparation de cet extrait est réalisée comme suit:

- Extraction trois fois sous reflux et à chaud pendant 3 heures de 50 g de graines broyées et dégraissées dans 100 ml du mélange eau/méthanol (v/v; 30/70) ;
- Centrifugation de la solution (15 min à 3000 tr/min) et filtration de surnageant;
- Concentration de la solution et récupération de la phase aqueuse ;
- Extraction liquide-liquide de la phase aqueuse par ;
- Hexane (v/v) pour éliminer le maximum de graisses restantes ;
- Acétate d'éthyle (v/v), extraction 3 fois ;
- n-butanol (v/v), extraction 3 fois, et évaporation à sec de la phase organique n-butanol ;
- Récupération, sur les parois du ballon d'évaporation, de l'extrait **En-B**.



**Figure 3:** Schéma explicatif de la préparation des extraits à partir des graines de *Citrullus colocynthis*

### 3. Screening phytochimique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

Les extraits bruts aqueux (EI, EII), extrait eau-méthanol (EM), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (n-B), ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques qualitatifs, à fin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines familles chimiques principalement: tanins, flavonoïdes, quinones, saponosides, terpénoïdes et alcaloïdes.

**Les tanins**

A 2 ml de chaque extrait, on ajoute 2 à 3 gouttes de la solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. Après quelques minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verte (tanins catéchiques) ou bleue noirâtre (tanins galliques).

**Les flavonoïdes**

Traiter 5 ml de chaque extrait avec 5ml d'HCl concentré. Ajouter quelques copeaux de tournures de magnésium. L'apparition d'une coloration rose-orangée (flavones) ou rose-violacée (flavanones) ou rouge (flavonols).

**Les terpénoïdes (Réaction de Libermann-Burchard)**

A 5ml de chaque extrait, on ajoute 5ml d'anhydride acétique et 20 gouttes d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. Les structures stéroïdiennes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert.

**Les coumarines**

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

**Les alcaloïdes**

Deux réactifs sont utilisés, le réactif de Mayer et le réactif de Wagner. A 0,2ml de chaque extrait, on ajoute 5ml d'HCl à 1 %, qui sont incubés au bain de marie pendant 10min, puis on divise la solution obtenue en deux parties. On ajoute dans un tube le réactif de Mayer et dans l'autre le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

**Les quinones libres**

A 1ml de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une coloration jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

### Les anthraquinones

A 10ml des extraits on ajoute 5ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10%, puis on agite. L'apparition de couleur violette indique un test positif.

## 4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

Pour ce dosage chacun des extraits est solubilisé dans du méthanol à une concentration de 1mg/ml.

### 4.1. Dosage de polyphénols

#### *Principe*

La méthode utilisée est celle utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). La coloration bleue produite dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (**Bonnaillie et al. 2012**).

#### *Mode opératoire (tableau n°1)*

Selon le protocole expérimental de **Miliauskas et al. (2004)** et **Ardestani et al. (2007b)**, on procède comme suite

- 0,1 ml d'échantillon (extrait) sont mélangés avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% ;
- Agitation des tubes ;
- 1<sup>ère</sup> incubation pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 100µl du réactif Folin Ciocalteu à 0,2N;
- 2<sup>ème</sup> incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- La lecture de l'absorbance se fait à 750 nm contre le blanc.

Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations croissantes (50, 100, 200, 300, 400, 500 et 600µg/ml).

**Tableau n°1:** Mode opératoire du dosage de polyphénols dans les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

Concentration de l'acide gallique ( $\mu\text{g/ml}$ )		0	50	100	200	300	400	500	600		
Volume de l'acide gallique (ml)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
Les extraits (ml)	Aqueux EI								0,1		
	Aqueux EII										
	Eau-méthanol (EM)								0,1		
	Acétate d'éthyle (EAc)								0,1		
	n-butanol (En-B)										
$\text{NaCO}_3$ (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>1<sup>ère</sup> Incubation pendant 5 min à température ambiante</i>											
Folin Ciocalteu ( $\mu\text{l}$ )		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>2<sup>ème</sup> Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité</i>											
<i>Mesure de DO au spectrophotomètre à 750 nm</i>											

La concentration des polyphénols totaux présents dans nos échantillons, exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalant d'acide gallique/ mg d'extrait ( $\mu\text{g EQ AG/mg}$  d'extrait) est calculée selon la formule suivante;

$$[\text{Polyphénols}] = a . f / C$$

a : concentration des polyphénols ( $\mu\text{g/ml}$ ) déterminée à partir de la courbe étalon.

f : facteur de dilution.

C : concentration initial de l'extrait (1mg/ml).

## 2. Dosage de flavonoïdes totaux

### Principe

La détermination du taux de flavonoïdes totaux est estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et la soude ( $\text{NaOH}$ ). Dans la solution méthanolique, le  $\text{NaOH}$  ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Le trichlorure d'aluminium, utilisé comme agent chromogène, forme un complexe avec les ortho-hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle des noyaux aromatiques A et B, le complexe formé de couleur jaune absorbe dans le visible à 510 nm (Mekkiou 2005; Chang et al. 2002).

**Mode opératoire (tableau n°2)**

Le dosage de flavonoïdes a été réalisé selon le protocole de **Miliauskas et al. (2004)** et **Kumar et al. (2008)**

- 500 µl de chaque extrait ou de catéchine, sont mélangés avec 2 ml d'eau distillée ;
- Ajouter 150 µl d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15 %.
- 1<sup>ère</sup> incubation 6 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 150 µl de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 10 % ;
- 2<sup>ème</sup> incubation 6 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 2 ml d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 4 % ;
- Le volume totale est complété à 5 ml avec l'eau distillée ;
- Agiter et incuber pendant 15 minutes à température ambiante;
- La lecture de l'absorbance se fait à 510 nm contre le blanc.

Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations croissantes (50, 100, 200, 300, 400, 500, 60µg/ml).

**Tableau n°2:** Mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

<i>Concentration de la Catéchine (µg/ml)</i>		0	50	100	200	300	400	500	600				
<i>Volume de la Catéchine (ml)</i>		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5				
<i>Les extraits (ml)</i>	<i>Aqueux EI</i>									0,5			
	<i>Aqueux EII</i>										0,5		
	<i>Eau-méthanol (EM)</i>											0,5	
	<i>Acétate d'éthyle (EAc)</i>												0,5
	<i>n-butanol (En-B)</i>												
<i>Eau distillé (ml)</i>		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
<i>NaNO<sub>2</sub> (ml)</i>		0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
<i>1<sup>ère</sup> Incubation pendant 6 min à température ambiante</i>													
<i>AlCl<sub>3</sub> (ml)</i>		0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
<i>2<sup>ème</sup> Incubation pendant 6 min d'incubation à température ambiante</i>													
<i>NaOH (ml)</i>			2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
<i>Compléter le volume à 5 ml et incubation pendant 15 min</i>													
<i>Mesure de DO au spectrophotomètre à 510 nm</i>													

La concentration des flavonoïdes présents dans les échantillons exprimée en µg équivalent de catéchine/ mg d'extrait (µg Eq cat/mg d'extrait) est calculée selon la formule suivante;

$$[\text{Flavonoïdes}] = a . f / C$$

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

f : facteur de dilution.

b : concentration initial de chaque extrait (1mg/ml).

## 5. Fractionnement des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les tests phytochimiques des extraits bruts, aqueux EI et EII, EM, EAc et En-B sont complétés par des analyses de chromatographie sur couche mince, ceci afin de procéder à un fractionnement de nos extraits, qui sont des extraits bruts de composition complexe.

Environ 5µl de chaque extrait (100 mg/ml) sont déposés sur plaques de gel de silice fluorescentes (0,2cm d'épaisseur, 60 F254, Fluka) plusieurs solvants d'élution ont été utilisés à différentes proportions;

- Méthanol: eau (60: 40, 70: 30, 80: 20, 90: 10)
- Chloroforme: MeOH: H<sub>2</sub>O (40: 60: 0.1)
- Acétate d'éthyle: Chloroforme: MeOH (80: 23; 5: 20; 90: 5: 5),
- Acétate d'éthyle: MeOH: H<sub>2</sub>O (100: 13.5: 10)

Certaines molécules standards sont utilisées: acide gallique (AG), catéchine (Cat), quercétine (QU) et myricétine (Myr) préparés dans du méthanol à 0,1%. Après migration et séchage de la plaque, la révélation des tâches a été effectuée sous lumière visible et UV (254 et 366nm). L'interprétation qualitative des plaques de chromatographie s'effectue par la détermination des facteurs de rétention  $R_f$ .

## 6. Fractionnement des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* par chromatographie sur colonne

Les extraits bruts acétate d'éthyle et n-butanol ainsi que l'extrait eau-méthanol, après séparation par chromatographie sur couche mince, ont révélé la présence d'une seule tâche majoritaire dans les trois extraits. Ces extraits ont été fractionnés par une chromatographie sur colonne (gel de silice G60, Fluka) en utilisant le système d'élution: Méthanol/eau (80/20) avec révélation des plaques sous lampe UV à  $\lambda = 254$  et 336 nm.

Après élution une seule tache à été récupéré c'est la fraction **A (FA)**. Cette fraction à été analysée par quelques tests phytochimiques (tannin, alcaloïdes, flavonoïdes et terpénoïdes) elle a fait aussi l'objet de quelques tests *in vitro* sur la sécrétion de l'insuline (recherche de l'effet insulinothéropique).



**Tableau n°3:** Mode opératoire de détermination de l'activité antiradicalaire des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur le DPPH.

Concentration de l'acide ascorbique ( $\mu\text{g/ml}$ )		0	1	2	4	6	8					
Acide ascorbique (ml)		1	1	1	1	1	1					
Les extraits (ml) à différentes [C] (0,5; 1; 1,5; 2) mg/ml	Aqueux EI							1				
	Aqueux EII							1				
	Eau-méthanol (EM)							1				
	Acétate d'éthyle (EAc)								1			
	n-butanol (En-B)									1		
Contrôle MeOH (ml)												1
Volume de DPPH (ml)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité												
Mesure des DO au spectrophotomètre à 517 nm												

En tenant compte de la moyenne des DO de trois mesures obtenues pour chaque concentration de chaque extrait, les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du DPPH (% DPPH) selon la formule suivante (Sharififar et al. 2007);

$$\% \text{ DPPH} = \frac{Do \text{ contr} - Do \text{ éch}}{Do \text{ contr}} \times 100$$

% DPPH: Pourcentage de réduction du DPPH.

DO contr: Densité optique du DPPH (tube contrôle).

DO éch: Densité optique de l'échantillon (extrait+DPPH).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire est principalement liée à deux paramètres, la détermination de la réduction du DPPH (% DPPH) et la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire (ou inhiber) 50% de DPPH<sup>•</sup> exprimé en IC<sub>50</sub>, ce paramètre est déterminé sur les graphes tracés pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés (Sharififar et al. 2007).

***Chap. I : Etude Phytochimique de la coloquinte***  
*Résultats et Interprétation*

## Résultats et interprétation

### 1. Caractéristiques des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

Le dégraissage de la poudre des graines de *Citrullus colocynthis* par l'hexane pendant 3 heures a permis l'extraction d'environ **21% de lipides**, sous forme d'huile.

Après évaporation à sec du solvant d'extraction, les différents extraits sont récupérés sous forme solide, le **tableau n°4** résume quelques caractéristiques de ces extraits.

**Tableau n°4:** Caractéristiques des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*.

<i>Extraits</i>	<i>Aspect physique</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rendement %</i>	<i>Solubilité</i>
<i>Aqueux (EI)</i>	Poudre	Marron-vert	0,9	Eau
<i>Aqueux (EII)</i>	Poudre	jaune	0,2	Eau
<i>Eau-méthanol (EM)</i>	Pâte hygroscopique	Rouge-orange	4,2	Méthanol/eau (70/30)
<i>Acétate d'éthyle (EAc)</i>	Poudre	orange	1,1	Méthanol /eau (70/30)
<i>n-butanol (E n-B)</i>	Poudre	marron	1,2	Eau
<i>Fraction A (FA)</i>	Pâte hygroscopique	marron	–	Méthanol /eau (70/30)

D'après les résultats consignés dans le tableau ci-dessus, la plupart des extraits sont récupérés sous forme de poudre, d'autres sous forme de pâte. Le rendement d'extraction est variable selon le mode et le solvant d'extraction utilisé. L'extrait eau-méthanol (EM) des graines dégraissées et broyées, donne un rendement de **4,2%** de la matière sèche, suivi par les extraits n-butanol (En-B) et acétate d'éthyle (EAc) qui présentent environ le même rendement **1,1%**, et l'extrait brut aqueux non dégraissé (EI) **0,9%**. Tandis que, l'extrait brut aqueux de graines broyées et dégraissées (EII) est récupéré en faible quantité **0,2%**.

### 2. Screening phytochimique

L'apparition d'une coloration, précipitation ou encore d'une floculation par l'intermédiaire de certains réactifs spécifiques affirment la présence de certaines familles de composés chimiques. Les résultats du screening phytochimique réalisé sur les extraits sont représentés dans **le tableau n°5**

**Tableau n°5:** Screening phytochimique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

	Aqueux (EI)	Aqueux (EII)	Eau- méthanol (EM)	Acétate d'éthyle (EAc)	n-butanol (E n-B)	Fraction A (FA)
<b>Tannins</b>	+++	–	+++	++	+	+++
<b>Flavonoïdes</b>	+	–	+++	+++	–	+++
<b>Terpénoïdes (Lieberman-Burschart)</b>	++	–	+	–	++	–
<b>Alcaloïdes</b>	–	–	–	–	–	–
<b>Sucres réducteurs</b>	–	–	–	–	–	–
<b>Anthraquinones</b>	–	–	–	–	–	–
<b>Quinones libres</b>	–	–	–	–	–	–
<b>Coumarines</b>	–	+	–	++	++	–

(++): Test positif; (+): Test faiblement positif; (–): Test négatif.

Le screening phytochimique réalisé dans les différents extraits de graines de *Citrullus colocynthis*, a révélé une forte présence de tanins catéchiques et de flavonoïdes dans les extraits EM et EAc. Ces composés sont faiblement présents dans les extraits aqueux EI, EII et En-B. Par contre les terpénoïdes sont fortement présents dans les extraits EI et En-B. On note également une absence d'alcaloïdes, de quinones libres, des anthraquinones et de sucres réducteurs dans tous les extraits. Tandis que les coumarines présentent une réaction positive pour les extraits EII, EM et EAc.

### 3. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux

Le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu et chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) respectivement. Les résultats obtenus, représentés dans *les tableaux n°6*, déterminés à partir de courbes étalons (**Figure 5 et 6**), sont exprimés en mg équivalent acide gallique par mg d'extrait (mg eq AG/mg extrait) pour les polyphénols, et en mg équivalente catéchine par mg d'extrait (mg eq Cat/mg extrait) pour les flavonoïdes. En tenant compte du rendement de chaque extrait, les résultats sont également exprimés en mg eq AG/100 g de matière végétale (MV) et mg eq Cat/100 gM.

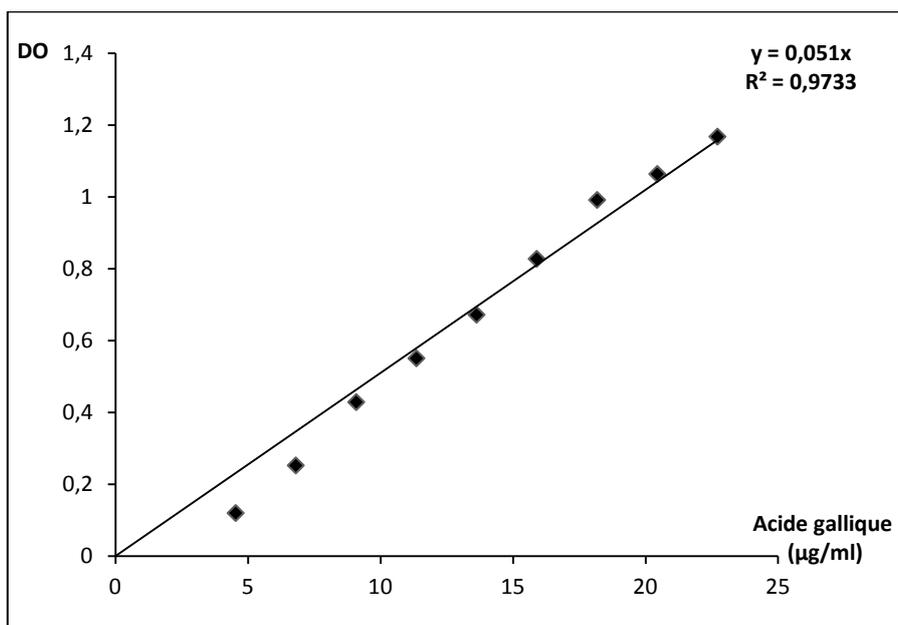


Figure 5: Courbe étalon de l'acide gallique ( $\lambda=750\text{nm}$ ).

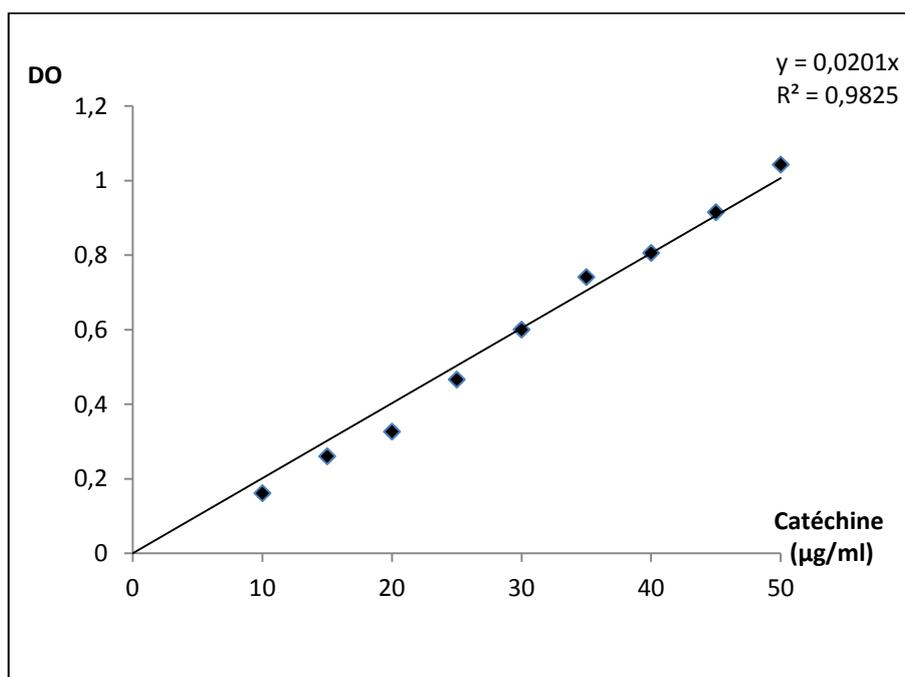


Figure 6: Courbe étalon de la catéchine ( $\lambda=510\text{nm}$ )

Les taux relatifs de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de graines de la coloquinte, EI, EII, EM, EAc et En-B sont représentés dans le **tableau n°6**.

**Tableau n°6:** Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

	<i>Polyphénols</i> (mg eq AG/ g extrait)	<i>mg polyphénols/</i> <i>100g de</i> <i>matière végétale</i>	<i>Flavonoïdes</i> (mg eq Cat/ g extrait)	<i>mg flavonoïdes/</i> <i>100g de</i> <i>matière végétale</i>
<i>Aqueux (EI)</i>	166,39	150	91,02	82
<i>Aqueux (EII)</i>	61,62	12,32	24,49	5
<i>Eau-méthanol (EM)</i>	238,8	1002	147,76	620
<i>Acétate d'éthyle (EAc)</i>	298,88	328,77	219,18	241
<i>n-butanol (En-B)</i>	154,06	185	78,37	94

Dans *le tableau n°6*, on remarque que les différents extraits renferment des concentrations variables de polyphénols et de flavonoïdes, exprimées en mg équivalent acide gallique (mg eq AG) /mg d'extrait et /100 g de matière végétale pour les polyphénols; et en mg équivalent catéchine (mg eq cat)/mg d'extrait et /100g de matière végétale pour les flavonoïdes totaux.

D'après ces résultats, les extraits EAc et EM contiennent par rapport aux autres extraits, les teneurs les plus élevées en polyphénols, 298,88 et 238,8 mg eq AG/mg d'extrait, ainsi qu'en flavonoïdes totaux 219,18 et 147,76 mg eq Cat/mg extrait respectivement. Ces teneurs rapportées à 100 g de matière végétale (MV), sont de l'ordre de 1002 mg eq AG/100 g de MV de polyphénols et 620 mg eq Cat/100 g de MV de flavonoïdes pour l'extrait EM contre 328,77 mg eq AG/100g de MV de polyphénols et 241 mg eq Cat/100 g de MV de flavonoïdes dans l'extrait EAc. Tandis que les extraits EI et En-B présentent des taux moins importants, 150 mg et 185 mg eq AG/100g de MV de polyphénols, 82 mg et 94 mg eq Cat/100 g de MV de flavonoïdes respectivement. Seule l'extrait EII renferme des taux très faible de ces composés, il contient environ 12,32 mg eq AG/100 g de MV de polyphénols et 5 mg eq Cat/100 g de MV.

#### **4. Fractionnement des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* par chromatographie sur couche mince (CCM)**

Dans le but de révéler les constituants susceptibles être présent dans les extraits EI, EM, EAc et En-B, une CCM plusieurs systèmes de migration ont été utilisés (*Tableau n°7*).

**Tableau n°7:** *R<sub>f</sub>* des analyses de chromatographie sur couche mince des différents extraits de graines de la coloquinte.

Système (V/V)	Extraits ( <i>R<sub>f</sub></i> )				Témoins ( <i>R<sub>f</sub></i> )			
	EI	EM	EAc	En-B	Cat	Myr	AG	QU
Eau/Méthanol (20/80)	–	0,9	0,9	0,9	0,85	0,88	0,82	0,82
Chloroforme/MeOH /H <sub>2</sub> O (40/60/0,1)	<b>0,82</b>	<b>0,82</b>	<b>0,82</b>	0,77	<b>0,92</b>	<b>0,88</b>	<b>0,82</b>	<b>0,88</b>
Acétate d'éthyle/Chloroforme/ MeOH (90/5/5)			0,27					
		0,25	0,31	0,30				
		0,25	0,29	0,38	0,38			
		0,30	0,30	0,47	0,47			
		0,37	0,37	<b>0,58</b>	0,67	0,82	<b>0,87</b>	<b>0,58</b>
		0,42	0,45	0,68	0,77			
		0,85	<b>0,58</b>	0,78	0,85			
		<b>0,87</b>	<b>0,87</b>					

**Cat** : Catéchine (Jaune à 254 nm)

**Myr**: Myricétine (Jaune à 254 nm)

**AG**: Acide gallique (couleur bleu-vert foncée à 254 nm)

**QU**: Quercétine (Jaune à 254 nm)

Le système eau-méthanol (20/80) après révélation de la plaque sous UV (254 nm), nous a permis de détecter trois bandes au même *R<sub>f</sub>* (**0,9**) dans les extraits EM, EAc, En-B et aucune tâche dans EI. Tandis que le système Chloroforme/MeOH /H<sub>2</sub>O (40/60/0,1) a permis de séparer deux tâches pour chacun des extraits, dont une tâche dans EI, EM et EAc ayant le même *R<sub>f</sub>* (**0,82**), correspondant à l'acide gallique utilisé comme témoin. La myricétine et la quercétine (autres témoins) avec ce système ont un *R<sub>f</sub>* identique de **0,88**, une seule tâche au même *R<sub>f</sub>* se présente seulement dans l'extrait AE. Le *R<sub>f</sub>* de la catéchine est de **0,92**, il correspond à deux produits qui apparaissent dans l'extrait EI et EM.

Un autre éluant acétate d'éthyle/chloroforme/ méthanol (90/5/5) a permis l'obtention de cinq tâches au niveau de l'extrait EI et six tâches au niveau de En-B, dont aucune tâche ne correspond à aucun témoin. Sept tâches au niveau de l'extrait EM, où une bande correspond à l'acide gallique au *R<sub>f</sub>* **0,58**, et une deuxième tâche présente le même *R<sub>f</sub>* que la myricétine et la quercétine **0,87**. De même, l'extrait EAc présente huit tâches, dont deux correspondent à l'acide gallique (**0,58**), myricétine (**0,87**) et quercétine (**0,88**) respectivement.

Suivant ces résultats préliminaires on constate que l'éluant acétate d'éthyle/chloroforme/ méthanol (90/5/5) a permis une meilleure séparation des extraits de

graines de la coloquinte, principalement l'extrait EM et EAc, peuvent contenir l'acide gallique, le composant majeur de la classe des polyphénols, ainsi que la myricétine et la quercétine qui font partie des flavonols, une sous classe très répandue de flavonoïdes.

### 5. Fractionnement des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* par chromatographie sur colonne

Au cours des analyses de CCM, le système eau-méthanol (20/80) a séparé une seule bande au même  $R_f$  (0,9) dans les extraits EM, EAc et En-B, et qui ne correspond à aucun témoin. Pour cela nous avons récolté ces tâches et effectuer un fractionnement par chromatographie sur colonne en utilisant le système eau/méthanol (20/80). Après élution et plusieurs analyses par CCM nous avons récupérés une seule tâche ayant un  $R_f$  de 0,9. Les fractions présentant cette tâche sont récoltées et évaporées à sec pour récupérer la fraction A (FA) sous forme de pâte hygroscopique de couleur marron.

### 6. Activité antiradicalaire des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* (Piégeage du radical libre DPPH)

En ce qui concerne l'évaluation l'activité antiradicalaire des extraits de la coloquinte EAc, EM et EI, sur le piégeage du radical libre le DPPH, les résultats obtenus sont représentés dans *le tableau n° 6*.

Après 30 min d'incubation, nous avons remarqué que ces trois extraits présentent un effet dose-dépendant, c'est-à-dire que le pourcentage de réduction du DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de chaque extrait. A la forte concentration 2000 µg/ml, le pourcentage de réduction du DPPH est de l'ordre de 88,8%, 74,5% et 66,2% dans le cas de l'extrait EAc, EM et EI respectivement, alors que l'acide ascorbique (contrôle) à une concentration de 80 µg/ml assure une réduction de 92,6%.

La détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire (ou inhiber) 50% du DPPH<sup>•</sup> exprimé en  $IC_{50}$ , est indispensable pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Ce paramètre est déterminé graphiquement sur les graphes tracés pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Les résultats d' $IC_{50}$ , représentés dans *le tableau n°8*, indiquent des valeurs élevées 580, 500 et 350 µg/ml pour les extraits EM, EI et EAc respectivement, alors que l'acide ascorbique assure une réduction de 50% du DPPH à faible concentration 1,1 µg/ml.

**Tableau n°8:** Détermination d'IC<sub>50</sub> du pourcentage de réduction du DPPH par les extraits EI, EM et AE de graines de *Citrullus colocynthis*

	Concentrations µg/ml (% d'inhibition DPPH)					IC <sub>50</sub>
						(µg/ml)
<b>A. ascorbique</b>	1 (49,0%)	2 (82,0%)	4 (89,5%)	6 (91,5%)	8 (92,6%)	1,1
<b>EI</b>	–	500 (50,0%)	1000 (62,0%)	1500 (64,5%)	2000 (66,2%)	500
<b>EM</b>	–	500 (46,5%)	1000 (60,5%)	1500 (67,6%)	2000 (74,5%)	580
<b>EAc</b>	300 (39,4%)	500 (67,4%)	1000 (82,0%)	1500 (86,2%)	2000 (88,8%)	350

***Chap. I : Etude Phytochimique de la coloquinte***

*Discussion*

*Citrullus colocynthis* est une plante de la région méditerranéenne, largement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier le diabète sucré. Dans cette première partie, l'objectif de notre étude est axé sur l'étude phytochimique de certains extraits de graines de *Citrullus colocynthis*, notamment un extrait aqueux non dégraissé (EI) et dégraissé (EII), extrait eau-méthanol (EM), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B). Les tests qualitatifs de caractérisation chimique, permettent de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines familles chimiques dans les différents extraits préparés.

Le dégraissage des graines de *Citrullus colocynthis* broyées par l'hexane, permis l'extraction de 21% de lipides, ce taux relativement élevé indique la richesse des graines oléagineuses de cette plante en lipides. **Abu-Nasr et al. (1953)** ont déterminé environ 18% de lipide dans les graines de la même plante récoltée en Algérie. **Schafferman et al. (1998)** ont déterminé 17 à 19% de lipides dans les graines de la coloquinte provenant de la région de Neguev; dans la région d'Arabi Saoudite. **Nehdi et al. (2013)** ont révélé également 23,16% de lipides dans les graines. Cette huile est riche en acides gras insaturés 80 à 85%, essentiellement acide oléique et linoléique, 13 % et 70 % respectivement. Ces acides gras jouent un rôle important dans la nutrition humaine (**Abu-Nasr et al. 1953, Nehdi et al. 2013**). Expérimentalement il a été observé chez les rats diabétiques (streptozotocine) soumis à un régime alimentaire supplémenté en huile de coloquinte assure une amélioration de l'insulinorésistance et une augmentation de la masse des cellules  $\beta$ -pancréatiques (**Sebbagh et al. 2009**).

Parallèlement à l'estimation du taux de lipides dans les graines de la coloquinte, nous avons procédé à des extractions chimiques de différents extraits. Après évaporation à sec la majorité des extraits sont récupérés sous forme de poudre avec des rendements variables, à l'exception de l'extrait EM récupéré sous forme de pâte hygroscopique et en quantité importante, 4,2% de la matière végétale. L'extrait brut aqueux EI et EII sont récupérés en faible quantité 0,9 et 0,2 % respectivement. **Gacem et al. (2013)** ont déterminé environ le même rendement pour l'extrait méthanolique de graines de la coloquinte (4,89%) tandis que leur rendement pour l'extrait aqueux est très élevé par rapport à notre rendement (2,72%). L'étude de **Hussain et al. (2013a)** a déterminé un rendement élevé dans l'extrait éthanolique de racines (14%) et de feuilles (17%) par rapport aux fruits (7%).

Les tests phytochimiques effectués sur les extraits EI, EII, EM, EAc et En-B ont révélé une forte présence de tanins catéchiques et de flavonoïdes dans les extraits EM, EAc et à un degré moindre dans EI. Ces composés sont faiblement concentrés dans l'extrait En-B, alors que les terpénoïdes sont fortement présents dans l'extrait EI et n-B, faiblement présent dans l'extrait EM mais complètement absent dans EII et EAc. En revanche, on assiste à une absence des alcaloïdes, quinones libres, anthraquinones et les sucres réducteurs dans tous les extraits.

Les résultats des tests phytochimiques sont préliminaires et qualitatifs, ils peuvent nous renseigner sur les phytoconstituants majoritaires présents dans les graines de la coloquinte. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Kaveri et al. (1986)**, qui ont déterminé au niveau des graines la présence de saponosides triterpéniques, des alcaloïdes et des tanins avec absence de flavonoïdes. L'extrait éthanolique (80%) du fruit de *Citrullus colocynthis*, est dépourvu d'alcaloïdes, anthraquinones et coumarines, mais il contient les flavonoïdes, saponosides triterpéniques sans contenir les tannins (**Koko et al. 2009**). Les extraits éthanoliques (80%) et aqueux de feuilles et du fruit de la coloquinte contiennent également des alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides ainsi que les saponosides (**Najafi et al. 2010**). De même, **Gacem et al. (2013)** ont noté dans les extraits aqueux et organiques de graines les alcaloïdes, flavonoïdes et les stérols. Cette légère différence entre nos résultats et la bibliographie est probablement liée à l'écologie de la plante car le climat et le sol jouent un rôle primordial dans la composition chimique, ainsi que la répartition des phytoconstituants dans les différents organes de la plante (feuilles, fruits, racines et graines), essentiellement les saponosides, tannins, flavonoïdes et alcaloïdes.

**Sultan et al. (2010)** ont déterminé dans 100g de la plante entière: 1,39mg de flavonoïdes, 0,52mg de saponosides, 1,64mg d'alcaloïdes et 1,64mg de composés phénoliques, avec la présence d'acide ascorbique (30,12mg). L'étude de **Gill et al. (2011)** a montré également la présence des alcaloïdes, stérols, terpénoïdes, flavonoïdes ainsi que les coumarines et les glycosides dans l'extrait méthanolique et hydrométhanolique (95%) des graines de *Citrullus colocynthis*. D'autres études phytochimiques réalisées sur différents extraits de différents organes de la coloquinte (fruit, feuilles, racines), ont révélé la richesse de la coloquinte en cucurbitacines I, E, L, J et T (**Lavie et al. 1964; Chandra et al. 1988; Sonja et al. 2000, Nayab et al. 2006**), en alcaloïdes (**Darwish et al. 1973**), stérols (**Hatam et al.**

1990), ainsi qu'en flavonoïdes (Maatooq *et al.* 1997; Delazar *et al.* 2006; Mahesh *et al.* 2008).

Parmi ces métabolites secondaires, les composés phénoliques ou les polyphénols, représentés majoritairement par les tannins et les flavonoïdes, suscitent un grand intérêt scientifique actuellement, car ils sont considérés comme de puissants antioxydants, anti-inflammatoires, antibactériens, antiviraux et anticancéreux (Coskun *et al.* 2005; Oliver Chen *et al.* 2008). De ce fait, il nous a semblé intéressant de déterminer dans nos extraits (EI, EII, EM, EAc et En-B) le taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux. Les résultats obtenus ont montré une forte concentration de polyphénols et de flavonoïdes dans l'extrait EAc et EM 298,88; 238,8mg eq AG/g et 219,1; 147,76mg eq Cat/g respectivement. Les extraits EI et En-B contiennent approximativement les mêmes taux: 166 et 154mg eq AG/mg d'extrait de polyphénols et 91 et 78mg eq Cat/g de flavonoïdes respectivement. L'extrait EII (préparé à partir des graines broyées et dégraissées) montre des teneurs moins faibles que l'extrait EI (61mg et 24mg/mg d'extrait). De ce fait, on suggère que les composés phénoliques et autres sont localisés dans les téguments externes de la graine que dans l'albumen, d'où leur extraction est meilleure à partir des graines entières non broyées. De plus un meilleur rendement d'extraction est obtenu avec les solvants et les mélanges de solvants: eau, méthanol, acétate d'éthyle ou eau-méthanol, qui sont les plus utilisés pour l'extraction en particulier de polyphénols et de flavonoïdes (Bruneton 1999). Les flavonoïdes moins polaires (isoflavones, flavanones et flavonols) sont récupérés généralement dans le chloroforme, dichlorométhane, éther diéthylique, et acétate d'éthyle, alors que les aglycones les plus polaire et les flavonoïdes glycosides sont récupérés dans les alcools ou le mélange eau-alcools (méthanol, éthanol) (Andrew *et al.* 2006).

L'étude de Kumar *et al.* (2008) effectuée sur l'extrait méthanolique du fruit de *Citrullus colocynthis* récolté dans la région d' Haryana en Inde, a déterminé une teneur de polyphénols et de flavonoïdes totaux de 740mg eq AG/100g de MV et 130mg eq cat/100g de MV respectivement. De même, Les travaux de Hussain *et al.* (2013a) ont révélé dans l'extrait éthanolique de feuilles, de racines et du fruit des teneurs élevées de polyphénols 1860, 635, 307mg eq AG/100g MVS et de flavonoïdes 1390, 252, 51mg eq cat/100g MVS respectivement.

Ces résultats sont comparables à ceux de notre extrait EAc et faiblement inférieur à ceux de l'extrait EM; qui sont de l'ordre de 328mg eq AG /100g MV et 241mg eq cat /100g de MV pour l'extrait EAc, et 1002mg eq AG/100g MV et 620mg eq cat/100g de MV pour l'extrait EM respectivement. De ce fait, on constate que le mélange eau-méthanol assure une meilleure extraction de polyphénols et de flavonoïdes à partir des graines de la coloquinte. De plus, au cours de la procédure d'extraction, la qualité d'un extrait peut être influencée par plusieurs paramètres, à savoir la partie de la plante utilisée, la polarité du solvant, ainsi que le temps, la température et le mode d'extraction (**Tiwari et al. 2011**).

Dans le but de connaître les phytoconstituants présents dans les extraits de plantes, plusieurs techniques d'analyses chimiques sont utilisées dont la plus courante est l'analyse chromatographique. Pour cela nous avons effectué quelques analyses de CCM dans les extraits: EI, EM, EAc et En-B. Plusieurs systèmes de solvants ont été utilisés, certains comme le système eau-méthanol (20/80) a permis de séparer dans les extraits EM, EAc et En-B une seule bande au même **Rf (0,9)**. Tandis que le système Acétate d'éthyle/Chloroforme/MeOH (90/5/5) a bien révélé la présence dans les extraits EM et EAc de l'acide gallique (**Rf 0,58**) le composant majeur de la classe des polyphénols; de la myricétine (**Rf 0,87**) et de la quercétine (**Rf 0,88**) qui font partie des flavonols, une sous classe très répandue de flavonoïdes. La catéchine (flavanol) est seulement présente dans les extraits EI et EM. Ce résultats se complète par les tests phytochimiques et le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux, qui ont montré une forte présence des tannins et de flavonoïdes dans les extraits EM et EAc par rapport aux autres extraits.

Les travaux de **Mahesh et al. 2008**, ont révélé la présence de quercétine (**Rf 0,82**) dans la fraction acétate d'éthyle et éther diéthylique récupérés à partir de l'extrait eau-méthanol (80%) de différents organes de la plante (fruit, tige, feuilles et racines). **Hussain et al. (2013a)** ont confirmé la richesse de l'extrait éthanolique des feuilles et des racines par rapport aux fruits de la coloquinte en: myricétine (racines: 25,81mg/100g MVS; feuilles: 381,7mg/100g MVS; fruit: 2,97mg/100g MVS), quercétine (racines: 7,05mg/100g MVS; feuilles: 579,9mg/100g MVS; fruit: 1,33mg/100g MVS), catéchine (racines: 65,31mg/100g MVS; feuilles: 95,45mg/100g MVS; fruit: 16,45mg/100g MVS), kaempférol (racines: 6,79mg/100g MVS; feuilles: 5,95mg/100g MVS; fruit: 2,37 mg/100g MVS) et en acide gallique (racines: 11,05mg/100g MVS; feuilles: 3,71mg/100g MVS; fruit: 2,71 mg/100g MVS).

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées alimentaires, ils pourraient s'avérer utiles dans le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé, le diabète sucré entre autre (**Kouamé et al. 2009**). Au cours de cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation du potentiel antioxydant des extraits de la coloquinte, par la mesure de leur capacité de piégeage du radical libre le DPPH. D'après nos résultats nous avons pu remarquer que ces trois extraits (EI, EM et EAc) montrent un effet dose-dépendant, c'est-à-dire que le pourcentage de réduction du DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de chacun des extraits. À la concentration 2 mg/ml le pourcentage de réduction du DPPH est de l'ordre de 88.8%, 74,5% et 66.2% pour EAc, EM et EI respectivement, alors que l'acide ascorbique (contrôle) à une concentration de 80µg/ml assure une réduction de 92,6%. Ces résultats sont en accord avec ceux des études, *in vitro*, qui ont bien révélé une activité antiradicalaire intéressante de la coloquinte. L'extrait méthanolique du fruit aux concentrations 1 et 2,5 mg/ml assure une réduction de 88% du DPPH contre 89,5% pour l'acide ascorbique à 50 µg/ml (**Kumar et al. 2008; Taghreed et al. 2010; Menghani et al. 2012**). De même, **Asghar et al. (2011)** ont montré que les extraits méthanolique et acétate d'éthyle de l'épicarpe du fruit présentent *in vitro* une activité antiradicalaire sur le DPPH avec une IC<sub>50</sub> de 505µg/ml et 215µg/ml respectivement. Tandis que l'extrait butanolique du fruit à 0,1mg/ml réduit environ 40% du DPPH (**Al-Busafi et al. 2007**). 10mg/ml de l'extrait éthanolique de feuilles, réduit *in vitro* 82% du DPPH et augmente à 97% l'activité de la SOD (**Thirunavukkarasu et al. 2010**). D'autres études réalisées *in vivo* chez des rats diabétiques ont montré un effet significatif des extraits de la coloquinte sur le stress oxydatif qui se résume à une augmentation significative du taux des enzymes antioxydantes sériques et hépatiques (SOD, CAT, GSH, GPX, LPO) avec une diminution des TBARS érythrocytaires (**Jayaraman et al. 2009; Dallak et al. 2010; Abd El-Baky et al. 2011; Jeyanthi et al. 2011**).

La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC<sub>50</sub> est petite. L'étude de **Delazar et al. (2006)** a déterminé IC<sub>50</sub> de l'activité antiradicalaire de certains flavonoïdes isolés de l'extrait méthanolique du fruit de la coloquinte; isosaponarin, isovitexin et isoorientin 3'-O-méthyl éther, ces produits présentent des valeurs de l'ordre de 7,13x10<sup>-2</sup>; 5,62x10<sup>-4</sup> et 3,47x10<sup>-3</sup>mg/ml respectivement, contre 2,78x10<sup>-5</sup>mg/ml de quercétine (contrôle) (**Mahesh et al. 2008**). De même **Hussaine et al. (2013a)** ont évalué l'activité antiradicalaire sur le DPPH de l'extrait éthanolique (10mg/ml) des feuilles (67,2%), des racines (56,8%) et

du fruit (58,1%) avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 5,97; 6,42 et 7,14µg/ml respectivement, ainsi l'activité des produits purs de polyphénols : quercétine (83,7% ; IC<sub>50</sub>=2,95µg/ml), myricétine (78,4% ; IC<sub>50</sub>=3,27µg/ml), catéchine (77,5% ; IC<sub>50</sub>=3,25µg/ml) et l'acide férulique (69,7% ; IC<sub>50</sub>=6,12µg/ml). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> déterminées pour nos extraits AE, EM et EI, 350, 580 et 500µg/ml respectivement sont relativement et nettement plus élevées que l'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique (1,1µg/ml). Contrairement à l'acide ascorbique, qui présente un effet antioxydant à faible concentration (80µg/ml), nos extraits (AE, EM et EI) agissent à forte concentration (2000µg/ml), ceci est lié principalement à leur composition chimique complexe renfermant plusieurs composés qui peuvent par leur effet synergique ou additif, assurer un effet global apparent. De ce fait, on constate que l'effet antiradicalaire noté dans les extraits EAc et EM est lié à leur richesse en polyphénols, essentiellement en flavonoïdes et particulièrement la quercétine et la myricétine, ce qui est confirmé également per les travaux de **Hussaine et al. (2013a)**.

Il existe une relation étroite entre les polyphénols et l'activité antioxydante. L'activité des flavonoïdes dépend généralement de leur structure chimique et la distribution des groupements hydroxyles (**Popovici et al. 2009**). L'effet «scavanger» des radicaux libres est essentiellement lié à la configuration des groupements 3',4'-orthodihydroxy sur le cycle B et le groupement 4-carbonyle sur le cycle C. le groupement 3-OH et/ou 5-OH sur le cycle C est très intéressant pour l'effet antioxydant. L'absence de la structure O-dihydroxy sur le cycle B donne une structure catéchol sur le cycle A qui peut largement compenser l'activité antioxydante des flavonoïdes. De plus, les flavonols: la quercétine, la myricétine et le kaempférol, qui présentent un groupement hydroxyle en C3 sur le cycle C, sont qualifiés comm étant puissant «scavanger» des radicaux libres (**Wojdyło et al. 2007; Pyo et al. 2004**).

Les terpénoïdes peuvent jouer un rôle important dans l'activité antioxydante, les travaux de **Tannin-Spitz et al. (2007b)** ont révélé que les cucurbitacines glucoside B et C isolés de *Citrullus colocynthis* présentent un effet antiradicalaire *in vitro*, basé sur leur capacité dose-dépendante à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>+</sup> de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS incolore par piégeage de proton. Ces cucurbitacines à 0,16 mM réduisent 55% du radicale cationique avec une IC<sub>50</sub> de 145µM contre 15 et 26µM pour l'acide ascorbique et le trolox respectivement. De même ces molécules inhibent significativement la production du radical hydroxyle OH<sup>•</sup> à 62 et 90% aux concentrations 0,5 et 1mM.

En fin, dans cette première partie d'étude, nous avons procédé à la préparation de quelques extraits à partir des graines de *Citrullus colocynthis*, dans les quels on a pu déterminer certains phytoconstituants ainsi que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans chaque extrait, relativement élevé dans les extraits EM et EAc. L'analyse chromatographique sur couche mince nous a révélé la présence de flavonols : la quercétine et la myricétine. Les extraits EM et EAc leur effet antioxydant, testé *in vitro* sur le piégeage du radical libre le DPPH 74,5% et 88,8% respectivement, est attribué principalement à la présence de flavonols cités ci-dessus.

***Chap. II : Etude in vivo de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte***

*Introduction*

Au cours des 50 dernières années, les recherches consacrées à la découverte de nouvelles molécules biologiquement actives d'origine végétale ou animale; ont subi d'énormes progrès dans les techniques chimiques et biologiques de l'analyse (**Phillipson David. 2007**).

Le monde végétal est un des domaines les plus exploités par la pharmacognosie, où l'importance des plantes médicinales réside dans leur potentiel thérapeutique. Les progrès scientifiques et industriels ont évalué de nombreux principes actifs en produisant de nouvelles molécules plus efficaces et plus constantes mais moins toxiques. Cette évaluation repose principalement sur des études pharmacologiques et toxicologiques qui visent la détermination des propriétés biologiques de ces molécules ainsi que leur mode d'action. Le succès de ces études, dépend essentiellement des résultats de l'étude ethnopharmacologique qui conduisent au choix d'un système adéquat d'évaluation biologique. Les tests réalisés devront être simples, rapides et fiables. De ce fait, les tests *in vivo* et *in vitro*, avantageusement complémentaires, demeurent indispensables pour mieux comprendre le mécanisme d'action des principes de plantes.

Les techniques *in vivo* sont particulièrement adaptées pour la mise en évidence d'un effet global. Dans le cas de l'évaluation des plantes antidiabétiques, et après le choix de la méthode d'administration, les tests sont généralement effectués chez des rats non diabétiques et des rats diabétiques; où le diabète peut être induit soit par des techniques chimiques, génétiques, chirurgicales ou alimentaires. Préférentiellement le model expérimental du diabète sucré, le plus utilisé dans ce domaine est chimique. Il est induit par l'alloxane ou la streptozotocine, qui exercent leur effet diabétogène en administration intrapéritonéale, intraveineuse, ou sous cutanée. Les animaux utilisés pour ce genre d'études sont souvent expérimentées à courts et à long terme, tout en suivant les variations de certains paramètres clés du diabète biochimiques (glycémie, insulïnémie, triglycéridémie) ou enzymatiques (glucose 6-phosphatase, phosphoénol-pyruvate carboxykinase, glycogène synthase), tissulaires (histologie, immunohistochimie) et toxiques (transaminases, LDH)

Cette partie d'étude (*chapitre II*) a pour but de chercher l'effet antidiabétique des extraits de graines de la coloquinte chez des rats normaux et rendu diabétiques par la streptozotocine. Ces animaux qui reçoivent les extraits de graines de la coloquinte par voie I.P. sont suivis à court et à long terme, trois heures et trois semaines respectivement. Chez les quels nous avons testé l'effet de la coloquinte sur les variations de la glycémie, de quelques

paramètres biochimiques (Triglycérides, cholestérol total, urée, créatinine, transaminases) ainsi que sur l'histologie du pancréas, la prise d'eau et d'aliment, la biométrie des organes et le poids corporel.

Nous avons également testé l'effet protecteur des extraits aqueux (administrés par voie I. P.) vis-à-vis de la toxicité de la streptozotocine sur l'homéostasie de la glycémie. Ainsi que l'évaluation de l'effet de la coadministration des extraits aqueux-glucose sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale, effectuée chez des rats normaux glycémiques et des rats rendus diabétiques par le streptozotocine.

La procédure de l'expérimentation animale de ce chapitre est bien détaillée dans la partie: matériel et méthodes. Les résultats obtenus sont bien interprétés et discutés dans résultats et discussion respectivement.

***Chap. II : Etude in vivo de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte***

***Matériel et Méthodes***

## Matériel et méthodes

### 1. Animaux

Cette étude est portée sur 293 rats, mâles et femelles, de souche « **Wistar** », âgés de 2 à 3 mois ayant un poids de 180 à 290 g. Ces animaux, élevés au sein de l'animalerie du département de Biologie, sont nourris avec un aliment du commerce: EL ALF (14% humidité, 49,5% glucides, 18,5% protéines bruts, 3,5% lipides, 5,7% cendres, cellulose 3% et 1% complexe minéralo-vitaminique)

### 2. Induction du diabète expérimental chez les rats

Le diabète expérimental est induit par une seule injection I.P. de la streptozotocine (Sigma Aldrich,  $C_8H_{15}N_3O_7$ ) chez des rats à jeun à une dose de 65mg/kg.p.c. (**Preston Alan, 1985**). La streptozotocine est fraîchement préparée dans un tampon citrate, pH=4,5 (0,1M). Les rats injectés reçoivent pendant 24 heures une solution de saccharose (10%) afin d'éviter le risque d'hypoglycémie.

72 heures après, les rats présentant les symptômes du diabète (polyphagie, polydipsie et polyurie) et une glycémie à jeun supérieure à 1,8g/l, sont considérés diabétiques et sont sélectionnés pour l'expérimentation.

### 3. Procédure expérimentale

Dans le but de rechercher l'effet antidiabétique des extraits préparés à partir des graines de la coloquinte (*chapitre I*), extraits aqueux EI, EII, EM, EAc et En-B. Notre expérimentation animale s'est déroulée sur des rats non diabétiques et des rats diabétiques dans le but de;

- Déterminer la dose létale moyenne ( $DL_{50}$ ) de chacun des extraits.
- Evaluer l'effet des extraits sur les variations de la glycémie chez des rats non diabétiques et diabétiques, suivis à court (0, 30, 60, 120 et 180min) et à long terme (7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour).
- Evaluer l'effet antihyperglycémiant chez les rats traités par les différents extraits pendant 21 jours, soumis au TTOG (Test de Tolérance Orale au Glucose)
- Evaluer l'effet protecteur des extraits aqueux EI et EII vis-à-vis de la toxicité de la streptozotocine chez les rats prétraités pendant 21 jours.

- Evaluer l'effet de la coadministration orale de l'extrait EI-glucose sur l'hyperglycémie des rats diabétiques soumis au TTOG.
- Evaluer l'effet de l'usage externe des extraits aqueux EI et EII sur la glycémie chez des rats diabétiques et non diabétiques.

### 3.1. Détermination de la DL<sub>50</sub> des extraits de la coloquinte

La détermination de la DL<sub>50</sub> permet d'évaluer la toxicité de la coloquinte. Les différents extraits ont été testés chez des rats femelles (à jeun), qui reçoivent par voie intrapéritonéale différentes concentrations de chaque extrait. Répartis en lot de 4 animaux chacun. Chaque lot de rattes reçoit une dose croissante d'extrait (administrée par voie I.P.). 24 heures après, les animaux sont suivis par observation de leur comportement. Le nombre de rats mort dans chaque lot est noté.

L'extrait aqueux EI a été testé pour sa toxicité sur 24 rats femelles ayant un poids **189,29 ± 5,4 g** maintenues à jeun pendant 16 h. des doses croissantes de cet extrait (200, 300, 500, 600, 800, 1000 mg/k) ont été testées sur 6 lots de rats.

L'extrait aqueux EII a été testé sur 16 rats femelles ayant un poids **186,19 ± 3,4g**, les doses 250, 350, 500, 900, et 1000 mg/k ont été administrées par voie I.P. chez 5 lots de rats.

L'extrait EM a été testé sur 28 rats femelles ayant un poids **176,85 ± 2,4g** aux doses 200, 300, 400, 450, 500, 800 et 900 mg/kg p.c. sur 7 groupes de rats.

L'extrait EAc a été testé pour sa toxicité sur 32 rats femelles ayant un poids **174,69±6,8g** maintenues à un jeun. Différentes doses d'extrait EAC (100, 200, 250, 300, 350, 400, 600, 800 mg/kg) sont administré par voie I.P. chez 7 lots de rats.

L'extrait En-B est testé aux doses 150, 180, 200, 400, 500, 800, 950mg/kg p.c. sur 7 lots de rats ayant un poids de **166,35 ± 3,4g**.

### 3.2. Evaluation de l'effet antidiabétique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques

Dans le but de rechercher l'effet antidiabétique, des extraits préparés à partir des graines de la coloquinte, nous avons utilisé des rats mâles Wistar, non diabétiques et diabétiques. Chez ces animaux deux types d'étude sont effectuées;

- Une étude à court terme: réalisée dans le but de déterminer l'effet antihyperglycémiant éventuel de chaque extrait en mesurant la glycémie des rats à 0, 30, 60, 120 et 180min.
- Une étude à long terme: a pour but de déterminer l'effet antidiabétique de chaque extrait, après 21 jours de traitement, en mesurant la glycémie et d'autres paramètres sanguins le premier jour de l'expérience et au 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour chez les rats diabétiques et non diabétiques.

#### 3.2.1. Evaluation de l'effet antidiabétique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*: Etude à court terme

Afin d'évaluer l'effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur les variations de la glycémie à court terme, nous avons utilisé 72 rats mâles, normaux et diabétiques répartis en 13 lots (*tableau n°9*). Les animaux de chaque lot sont injectés (I.P.) par l'un des extraits suivants: extrait aqueux EI (90 mg/kg), EII (90 mg/kg), EM (100 mg/kg), EAc (10 mg/kg) et En-B (70 mg/kg). Les rats témoins reçoivent le sérum physiologique (NaCl 0,9%) à 5 ml/kg. Le glibenclamide à 10mg/kg p.c.a été utilisé comme un témoin contrôle chez les rats diabétiques.

Les prélèvements sanguins, sont effectués à partir du sinus rétro orbital de l'œil, chez les rats maintenus à jeun, à l'aide d'une pipette Pasteur à t0min (représente la glycémie basale). D'autres mesures de la glycémie sont effectuées à partir de l'extrémité caudale durant les trois premières heures qui suivent l'injection des extraits à partir de l'extrémité caudale en utilisant un glucomètre accu-check active (Roche).

**Tableau n°9:** Répartition par lots des rats diabétiques et non diabétiques (expérimentaux et témoins) utilisés pour l'évaluation de l'effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* à court et à long terme.

<i>Lot</i>	<i>Solution injecté I. P.</i>	<i>Dose injectée (mg/kg)</i>	<i>Nombre de rats</i>
<b>Diabétiques</b>			
<i>Témoins</i>	Sérum physiologique	5 ml/kg	7
<i>Contrôle positif</i>	Glibenclamide	10	10
<i>Expérimentaux</i>	EI	90	5
	EII	90	5
	EM	100	5
	EAc	10	5
	En-B	70	5
<b>Non diabétiques</b>			
<i>Témoins</i>	Sérum physiologique	45 (5 ml/kg)	5
<i>Expérimentaux</i>	EI	90	5
	EII	90	5
	EM	100	5
	EAc	10	5
	En-B	70	5

### 3.2.2. Evaluation de l'effet antidiabétique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*: Etude à long terme

Les mêmes groupes de rats témoins et expérimentaux, diabétiques et non diabétiques utilisés lors de l'expérience précédente (à court terme), sont suivis à long terme pour une période de trois semaines, ceci afin d'évaluer l'effet antidiabétique de chaque extrait (*tableau n°9*).

Au cours de cette période les lots de rats sont traités par chacun des extraits suivants: extrait aqueux EI (90mg/kg), EII (90mg/kg), EM (100mg/kg), EAc (10 mg/kg) et En-B (70mg/kg). Ils sont injectés quotidiennement par I.P. Les rats témoins reçoivent le sérum physiologique (NaCl 0.9%) à 5ml/kg, le groupe de rats témoins contrôle reçoivent le glibenclamide à 10mg/kg. En effet les animaux sont suivis régulièrement par l'observation de leur comportement, l'évolution du poids corporel, la consommation d'eau et de nourriture, la biométrie des organes (au moment du sacrifice).

Des prélèvements sanguins sont effectués à partir du sinus rétro orbital de l'œil à t0, 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours chez les rats maintenus à jeun pendant 10 à 12 heures. Le sang recueilli dans des tubes secs, est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 min à 4°C. Le sérum récupéré est stocké dans des tubes Eppendorff à -20°C; à fin d'effectuer un dosage de

quelques paramètres biochimiques: cholestérol total, triglycérides, urée, créatinine, TGO, TGP et phosphatase alcaline.

### **3.2.3. Evaluation de l'effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur l'hyperglycémie des rats diabétiques et non diabétiques soumis au TTOG**

Un TTOG a été réalisé au 21<sup>ème</sup> jour chez les mêmes groupes de rats témoins et expérimentaux, diabétiques et non diabétiques, ayant reçus une I.P. quotidienne pendant 21 jours des différents extraits de graines de la coloquinte (extrait aqueux EI 90 mg/kg, EII 90 mg/kg, EM 100mg/kg, EAc 10 mg/kg p.c.et En-B 70 mg/kg). Les rats témoins et témoins contrôle reçoivent le sérum physiologique et le glibenclamide (10mg/kg) respectivement. Le but de cette expérience est de vérifier l'influence du traitement par les extraits de graines de la coloquinte pendant 21 jours sur la tolérance au glucose de ces animaux.

Pour ce faire, la glycémie des rats maintenus à jeun 10 à 12h, est mesurée directement à partir de l'extrémité caudale en utilisant le glucomètre Accku Check active à t0min (glycémie basale). A 30 min, après mesure de la glycémie tous les rats sont gavés par une solution du glucose (2 g/kg) à l'aide d'une sonde gastrique. Les autres mesures de la glycémie sont effectuées à 60, 120 et 180 min, sur le sang total de l'extrémité caudale en utilisant un glucomètre accku-check active (Roche).

### **3.2.4. Evaluation de l'effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur l'évolution du poids corporel, la consommation d'eau et d'aliment chez les rats diabétiques et non diabétiques**

Au cours de notre étude à long terme (21jours), nous avons suivi l'évolution du poids corporel ainsi que la consommation d'eau et de nourriture chez les rats diabétiques et non diabétiques traités par les différents extraits de graines de la coloquinte (EI 90 mg/kg, EII 90 mg/kg, EAc 10 mg/kg, EM 100mg/kg p.c.et En-B 70mg/kg), ainsi que chez les rats témoins (NaCl 0.9%) et témoins contrôle (glibenclamide 10mg/kg p.c).

Le poids corporel des animaux est relevé chaque semaine, l'évolution du poids corporel exprimée en variation (gain ou perte) durant la période expérimentale est exprimée en g/semaine. Les résultats de la prise d'eau et d'aliment mesurés quotidiennement sont exprimés en ml/jour et g/jour respectivement.

### 3.2.5. Evaluation de l'effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur la biométrie des organes

A la fin de l'expérimentation, au 22<sup>ème</sup> jour, les rats témoins et expérimentaux, diabétiques et non diabétiques maintenus à jeun environ 12 heures, sont anesthésiés par le chloral hydraté (8% w/v) puis sacrifiés. Certains organes sont prélevés et pesés pour un examen morphologique et biométrique comme le foie, le rein, les testicules, le muscle soleus, la graisse épидидymaire et le pancréas; ce dernier est rapidement fixé dans le formol (10%) pour son étude immunohistochimique.

### 3.2.6. Evaluation de l'effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur le pancréas: analyse immunohistochimique

Cette partie de travail a été réalisée dans le Laboratoire Hormonologie Expérimentale, Université Libre de Bruxelles. Dans cette étude nous avons procédé à un examen histologique du pancréas de rats diabétiques ayant subi un traitement par les différents extraits de graines de la coloquinte. Nous avons utilisé la technique standard d'immunohistochimie ABC-DAB (Hsu et al. 1981), en utilisant le kit Avidine-biotine (Vector Laboratories, USA). Cette technique consiste à localiser *in situ* l'insuline synthétisée et sécrétée par les cellules- $\beta$  pancréatiques, à l'aide d'anticorps anti-insuline. Le complexe formé est indirectement révélé par la peroxydase qui développe la diaminobenzidine comme chromogène de couleur brune. L'intensité du signal obtenu après marquage dépend du nombre de molécules colorées visibles.

Après un traitement de 21 jours des rats diabétiques par les extraits de la coloquinte et les témoins par le sérum physiologiques ou par le glibenclamide. Les rats sont sacrifiés et les organes sont rapidement fixés pendant 24 h dans le formol (10%) à température ambiante. Le marquage de l'insuline a été réalisé sur des coupes de pancréas, préparées suivant la procédure de fixation, de déshydratation et d'imprégnation des organes dans la paraffine pour l'histologie classique.

**Déshydratation:** Après rinçage dans du tampon PBS, la déshydratation des organes se fait par une succession de bains d'éthanol de concentrations croissantes: 70°, 90° et 100°.

**Imprégnation et inclusion:** l'imprégnation des échantillons se fait par des bains successifs de toluène, de xylène, et enfin l'imprégnation dans la paraffine (56°) pour conserver les organes et laisser se refroidir à température ambiante.

**Préparation des coupes histologiques:** les blocs de paraffine contenant les échantillons de pancréas, ont été coupés à l'aide d'un microtome en fines sections de 4 à 5µm d'épaisseur, déposées sur des lames histologiques

**Déparaffinage des lames:** Les lames préparées subissent un déparaffinage dans ;

- Le bain de toluène qui solubilise la paraffine
- Les bains de concentrations décroissantes d'éthanol; 100°, 90° et 70°, pour éliminer les traces de toluène et réhydrater les échantillons.

**Coloration des lames:** Après déparaffinage, les lames sont plongées dans des bains d'éosine suivie d'hématoxyline successivement pendant 5min.

**Incubation dans les solutions d'anticorps:**

- Après coloration, les sites antigéniques des coupes sont démasqués par un bain de trypsine à 0,5 mg/ml pendant 20 minutes.
- Afin de neutraliser l'activité peroxydase endogène les lames sont incubées pendant 20 minutes dans une solution PBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%).
- Les techniques d'immunohistochimie nécessitent un démasquage des anticorps tissulaires spécifiques, de ce fait, les lames sont incubées pendant 20 min à 37°C en présence de bloking serum, le sérum normal de chèvre (Normal goat serum PBS 5%, Vectors Lab, USA).
- Marquage de l'insuline est réalisé par incubation des lames 24h à 4°C en présence d'anticorps primaire anti-insuline de rat (Santa cruz, Biotechnology, USA) dilué au 1/500
- Après deux lavages dans le PBS pendant 5 min, l'anticorps secondaire anti-insuline biotinylé (Goat antirabbit biotinyll) dilué au 1/300 (Vectors Lab, USA), est appliqué sur les lames puis incubées 30 min à température ambiante.
- Après deux lavages dans le PBS pendant 5 min, le complexe ABC (Avidine- biotine- Traceur Complexe, Vectors Lab, USA) est ajouté aux lames durant 30min à température ambiante. Le complexe ABC est un réseau formé de plusieurs molécules de peroxydase liée à la biotine pontée par de l'avidine.

**Révélation de l'activité peroxydasique et montage des lames:**

- Après deux lavages avec du PBS pendant 5 min, la révélation de l'insuline est réalisée par une incubation des lames pendant 3 min dans une solution contenant le substrat de la peroxydase, c'est le chromogène DAP (3,3'-diaminobenzidine; Vector Labs), sa forme oxydée donne un produit brun en microscopie optique (le noyau positif est coloré en brun).
- Les lames sont ensuite contre colorées à l'hématoxyline de Harris puis lavées à l'eau courante. Elles subissent une déshydratation dans des bains à concentrations croissantes d'alcool puis dans du xylène.
- Les lames sont montées avec un milieu permanent et les coupes sont observées au microscope photonique (Leica microsystèmes, Suisse). Les images sont enregistrées avec une caméra intégrée (Carl Zeiss).

**3.3. Evaluation de l'effet protecteur des extraits aqueux de graines de *Citrullus colocynthis* vis-à-vis de la toxicité de la streptozotocine**

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'aspect préventif des extraits aqueux EI et EII à la dose 90mg/kg p.c. vis-à-vis de la toxicité de la streptozotocine (STZ). Pour réaliser ce travail nous avons utilisé 28 rats femelles répartis en quatre lots (**tableau n°10**).

Deux lots de rats expérimentaux, subissent quotidiennement pendant trois semaines un prétraitement (I.P.) par l'extrait brut aqueux EI (90mg/kg p.c.) ou l'extrait EII (90mg/kg p.c.), les rats témoins reçoivent le sérum physiologique (NaCl 0.9%). Après cette période de traitement les rats maintenus à jeun, pendant 10 à 12 heures, reçoivent une injection I.P. de la streptozotocine à 65mg/kg p.c.

Un deuxième lot de rats expérimental, a été également prétraité par une seule injection I.P. de l'extrait brut aqueux EI (90mg/kg) 24 heures avant l'injection de la streptozotocine (65 mg/kg). Cette expérience a été effectuée dans le but de vérifier si l'effet de l'extrait EI est immédiat ou à long terme.

Chez ces animaux, la glycémie a été mesurée dans le sang total à partir de l'extrémité caudale en utilisant un glucomètre Accu-check active, le premier jour de l'expérimentation, le 2<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour après l'injection de la streptozotocine.

**Tableau n°10:** Répartition des lots de rats pour l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait aqueux (EI) de *Citrullus colocynthis* vis-à-vis de la toxicité de la streptozotocine

Lot	Prétraitement (I.P.)	Dose injectée	nombre de rats	Induction du diabète	Mesure de la glycémie	Mesure de la glycémie
Témoins	Sérum physiologique	5 ml/kg	10			
	EI, I.P. quotidiennement pendant 21 jours	90 mg/kg	10			
Expérimentaux	Une seule I.P. de EI (24h avant I.P. STZ)	90 mg/kg	3	t=J0 I.P. STZ 65 mg/kg	t=J2 après I.P. de STZ	t=J7 après I.P. de STZ
	EII, I.P. quotidiennement pendant 21 jours	90 mg/kg	5			

### 3.4. Evaluation de l'effet antihyperglycémiant des extraits bruts aqueux de graines de *Citrullus colocynthis* en usage externe

Selon les enquêtes ethnobotaniques, le mode d'utilisation traditionnelle de la coloquinte par la population des diabétiques est typiquement en usage externe. Dans le but de reproduire ce mode d'utilisation, on a essayé de tester chez des rats non diabétiques et des rats rendus diabétiques, l'effet des extraits bruts aqueux EI et EII sur les variations de la glycémie pendant trois heures de suivi. Pour cela, nous avons utilisé des rats femelles diabétiques et non diabétiques répartis en 6 groupes (*tableau n°11*).

Après 10 à 12 heures de jeûne, les groupes de rats expérimentaux sont placés dans des cages en plexiglace, contenant environ 250 ml de solutions fraîchement préparées de l'extrait EI (500 g/l) ou l'extrait EII (500 g/l), alors que les rats témoins sont placés dans des cages contenant le même volume de sérum physiologique (NaCl 0,9%). Chez tous les rats, témoins et expérimentaux, la glycémie a été mesurée, à partir de l'extrémité caudale, à t0min (glycémie basale) puis à 30, 60, 120 et 180 min en utilisant un glucomètre accu-check active.

**Tableau n°11:** Répartition des lots de rats pour l'évaluation de l'effet de l'usage externe de des extraits aqueux de *Citrullus colocynthis*

Lot	Extrait	Volume dans la cage	Nombre de rats
<b>Diabétiques</b>			
Témoins	Sérum physiologique		5
Expérimentaux	EI	250 ml	5
	EII		5
<b>Non diabétiques</b>			
Témoins	Sérum physiologique		4
Expérimentaux	EI	250 ml	5
	EII		4

### 3.5. Evaluation de l'effet antihyperglycémiant de la coadministration de glucose et l'extrait aqueux de graines de *Citrullus colocynthis*

Le but principal de cette étude est d'examiner l'influence de l'extrait EI sur l'hyperglycémie post prandiale (absorption intestinale du glucose) qui ont résulte de l'administration orale d'un mélange glucose (2g/kg)-extrait EI (90mg/kg) l'absorption intestinal de glucose.

Pour cette expérience, nous avons utilisé des rats femelles répartis en 5 groupes (**tableau n°13**). Les rats expérimentaux maintenus à jeun pendant 10 à 12 heures, à 0 min après mesure la glycémie basale reçoivent par un gavage le mélange (v/v) d'une solution de glucose (2g/kg) et la solution de l'extrait EI (90mg/kg). D'autres mesures sont effectuées à 30, 60, 120 et 180min à partir de l'extrémité caudale à l'aide d'un glucomètre accu-check active. Chez les rats témoins, l'extrait est remplacé par du sérum physiologique (témoins) ou le glibenclamide 5mg/kg (témoins contrôle).

**Tableau n°12:** Répartition des lots de rats pour l'évaluation de l'effet antihyperglycémiant de la coadministration de glucose et l'extrait EI de graines de *Citrullus colocynthis*

Lot	Extrait+ glucose 2g/kg (v/v)	Dose	Nombre de rats
<b>Diabétiques</b>			
Témoins	Sérum physiologique	5 ml/kg	5
Témoins contrôle	Glibenclamide	5 mg/kg	10
Expérimentaux	Aqueux EI	90mg/kg	5
<b>Non diabétiques</b>			
Témoins	Sérum physiologique	90mg/kg	4
Expérimentaux	Aqueux EI	90mg/kg	5

### 3.6. Dosage des paramètres biochimiques sanguins

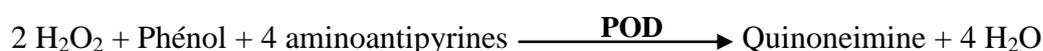
Chez les rats diabétiques et non diabétiques le sang récupéré dans des tubes secs et centrifugé à 3000 tr/min pendant 15min à 4 °C. Le sérum récupéré a fait l'objet de certains dosages sériques: Cholestérol total, triglycérides, urée, créatinine, phosphatase alcaline, TGO et TGP, à l'exception du glucose dosé sur du sang total. Le principe de chacun des méthodes est donné ci-après.

#### 3.6.1. Dosage de glucose (mesure de la glycémie sur le sang total)

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

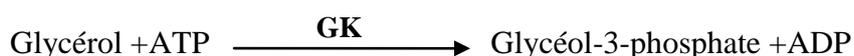
#### 3.6.2. Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total a été réalisé par une méthode enzymatique colorimétrique (Kit SPINREACT) basée sur la méthode de Fasce (1982). L'intensité de la coloration développée au cours de la réaction, citée ci-dessous, est proportionnelle à la concentration en cholestérol exprimé en g/l. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 505nm contre le blanc.



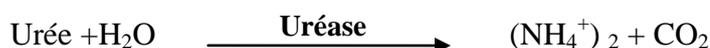
### 3.6.3. Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides a été réalisé par une méthode enzymatique colorimétrique (Kit SPINREACT) basée sur la méthode de Fossati et Prencipe (1982). L'intensité de la coloration développée au cours de la réaction est proportionnelle à la concentration en triglycérides exprimée en g/l. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 505nm contre le blanc.



### 3.6.4. Dosage de l'urée

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



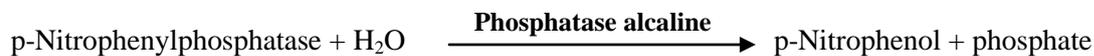
### 3.6.5. Dosage de la créatinine

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



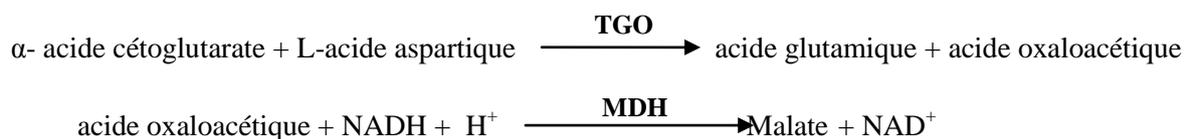
### 3.6.6. Dosage de la phosphatase alcaline

Le dosage de la phosphatase alcaline a été réalisé par un test enzymatique colorimétrique (Kit SPINREACT). L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 405nm contre le blanc. Les résultats sont exprimés en UI/l.



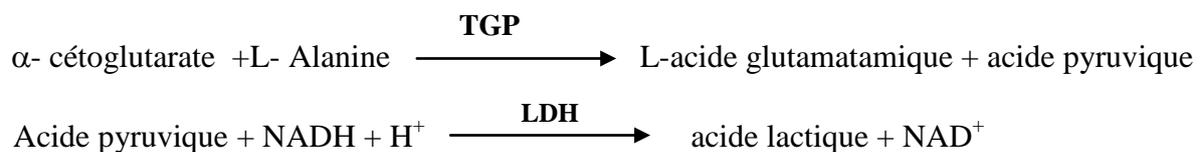
### 3.6.7. Dosage de la TGO (Transaminase Glutamate Oxaloacétique)

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



### 3.6.8. Dosage de TGP (Transaminase Glutamate Pyruvate)

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



### 3.7. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes accompagnées de leur indice de dispersion qui est l'erreur standard à la moyenne :  $m \pm ES$

**Moyenne (m)**  $\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$

**Ecart type ( $\sigma$ )**  $\sigma_x = \sqrt{V_x}$

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

La signification statistique des différences observées entre les valeurs moyennes obtenues pour chaque lot d'animaux a été évaluée par test de Student «  $t_e$  ». Pour comparer deux échantillons indépendants, on applique le test de Student à un degré de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon,  $ddl = n_1 + n_2 - 2$

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

La différence entre deux moyennes est :

Peu significative (\*):  $P \leq 0,05$

Significative (\*\*):  $P \leq 0,01$

Très significative (\*\*\*):  $P \leq 0,001$

Hautement significative (\*\*\*\*):  $P \leq 0,0001$

***Chap. II : Etude in vivo de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte***

*Résultats et interprétation*

## Résultats et interprétation

### 1. Détermination de la dose létale moyenne DL<sub>50</sub> des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

L'administration intrapéritonéale des différents extraits de la coloquinte (EI, EII, EM, EAc et En-B) à des doses croissantes, entraîne la mort d'un certain nombre de rat par lot au bout de 24h, dépendant de la dose reçu.

Comme indiqué dans les tableaux suivants, la valeur des doses létales (DL<sub>50</sub> et DL<sub>100</sub>) de chacun des extraits est comme suit:

La DL<sub>50</sub> de l'extrait EI est de 500 mg/kg p.c., et 800 mg/kg comme DL<sub>100</sub> (**tableau n°13**)

La DL<sub>50</sub> de l'extrait EII est de 900 mg/kg p.c., et 1000 mg/kg comme DL<sub>100</sub> (**tableau n°14**)

La DL<sub>50</sub> de l'extrait EM est de 450 mg/kg p.c., et 500 mg/kg comme DL<sub>100</sub> (**tableau n°15**)

La DL<sub>50</sub> de l'extrait EAc est de 350 mg/kg p.c., et 400 mg/kg comme DL<sub>100</sub> (**tableau n°16**)

La DL<sub>50</sub> de l'extrait EI est de 800 mg/kg p.c., et 950 mg/kg comme DL<sub>100</sub> (**tableau n°17**)

**Tableau n°13** : Doses létales de l'extrait aqueux EI de graines de *Citrullus colocynthis*

lot	1	2	3	4	5	6
<b>EI mg/Kg</b>	200	300	500	600	800	1000
<b>Nombre de rat total</b>	04	04	04	04	04	04
<b>Nombre de rats morts (Taux de mortalité)</b>	0 (0%)	0 (0%)	02 (50%)	03 (75%)	04 (100%)	04 (100%)

**Tableau n°14** : Doses létales de l'extrait aqueux EII de graines de *Citrullus colocynthis*

lot	1	2	3	4	5
<b>EII mg/Kg</b>	250	350	500	900	1000
<b>Nombre de rat total</b>	04	04	04	04	04
<b>Nombre de rats morts (Taux de mortalité)</b>	0 (0%)	01 (25%)	01 (25%)	02 (50%)	04 (100%)

**Tableau n°15 :** Doses létales de l'extrait EM de graines de *Citrullus colocynthis*

	1	2	3	4	5	6	7
<b>EM mg/Kg</b>	200	300	400	450	500	800	900
<b>Nombre de rat total</b>	04	04	04	04	04	04	04
<b>Taux de mortalité</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	02 (50%)	04 (100%)	04 (100%)	04 (100%)

**Tableau n°16:** Doses létales de l'extrait acétate d'éthyle (EAc) de graines de *Citrullus*

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>EAc mg/Kg</b>	100	200	250	300	350	400	600	800
<b>Nombre de rat</b>	04	04	04	04	04	04	04	04
<b>Taux de mortalité</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	02 (50%)	04 (100%)	04 (100%)	04 (100%)

*colocynthis*

**Tableau n°17:** DL<sub>50</sub> de l'extrait n-butanol (En-B) de graines de *Citrullus colocynthis*

	1	2	3	4	5	6	7	
<b>En-B mg/Kg</b>	150	180	200	400	500	800	950	
<b>Nombre de rat</b>	04	04	04	04	04	04	04	
<b>Taux de mortalité</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	02 (50%)	04 (50%)

## 2. Effet antidiabétique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques

L'évaluation de l'effet antidiabétique des extraits de graines de la coloquinte a été réalisée chez des rats non diabétiques recevant les extraits, aqueux EI 90 mg/kg p.c., EII 90 mg/kg, EM 100 mg/kg, Acétate d'éthyle 10 mg/kg p.c. et n-butanol 70 mg/kg. Les rats témoins et contrôles reçoivent le sérum physiologique et le glibenclamide (10mg/kg p.c.) au lieu de l'extrait.

Les animaux ainsi traités sont suivis à :

- Court terme afin d'évaluer l'effet des extraits sur la glycémie durant les trois premières heures après injection de chaque extrait (effet immédiat)

- Long terme (trois semaines) afin d'évaluer un effet globale des extraits de la coloquinte sur les perturbations métaboliques induits par le diabète, par le dosage de paramètres biochimiques sanguins: glycémie, triglycérides, cholestérol total, urée, créatinine et certains paramètres de toxicité hépatique TGO, TGP et PA ; avec la mesure du poids corporel, prise d'eau et d'aliment ainsi que la biométrie des organes.

### 2.1. Effet à court terme des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques

Les résultats obtenus chez les rats témoins et expérimentaux, non diabétiques et diabétiques sont représentés dans les *figure 7, 8 et 9* et dans *les figures 10, 11 et 12* respectivement.

Dans la *figure 7 (A, B, C, D, E)* on remarque que les rats traités par les extraits EI (90 mg/kg), EII (90 mg/kg) et EAc (100 mg/kg), EM (100 mg/kg) et En-B (70 mg/kg) n'entraînent aucune variation significative de la glycémie chez les rats non diabétiques. Et donc ils n'ont pas d'effet hypoglycémiant. Par contre, l'effet de ces mêmes extraits chez les rats diabétiques, représenté dans *la figure 8 (A, B, C, D, E, F, G)*, entraînent une réduction de l'hyperglycémie comparativement aux rats diabétiques témoins, le même effet est observé chez les rats contrôles (glibenclamide 10mg/kg p.c.).

Les rats traités par les extraits EI et EII ont subi une diminution significative de la glycémie ( $p \leq 0,001$ ). 30min après son administration I.P. l'extrait EM (100mg/kg) diminue l'hyperglycémie des rats diabétiques, par contre à 60, 120 et 180min on note une augmentation progressive de l'hyperglycémie. De même, l'extrait EAc (10mg/kg) ne provoque aucune variation significative de l'hyperglycémie à court terme. Tandis que l'extrait n-butanol (70mg/kg) diminue significativement ( $p \leq 0,001$ ) l'hyperglycémie chez les expérimentaux par rapport aux rats témoins. Les rats diabétiques traités par le glibenclamide (10mg/kg) présentent une diminution progressive de l'hyperglycémie qui devienne significative à 60min ( $p \leq 0,01$ ), 120min ( $p \leq 0,001$ ) et 180min ( $p \leq 0,001$ ).

Suivant ces résultats on constate que les extraits EI, EII et En-B présentent des effets antihyperglycémiant significatifs à court terme chez les rats diabétiques, tandis que les extraits EM et EAc ne présentent aucun effet remarquable. Chez les rats non diabétiques aucun effet hypoglycémiant n'a été observé pour ces extraits.

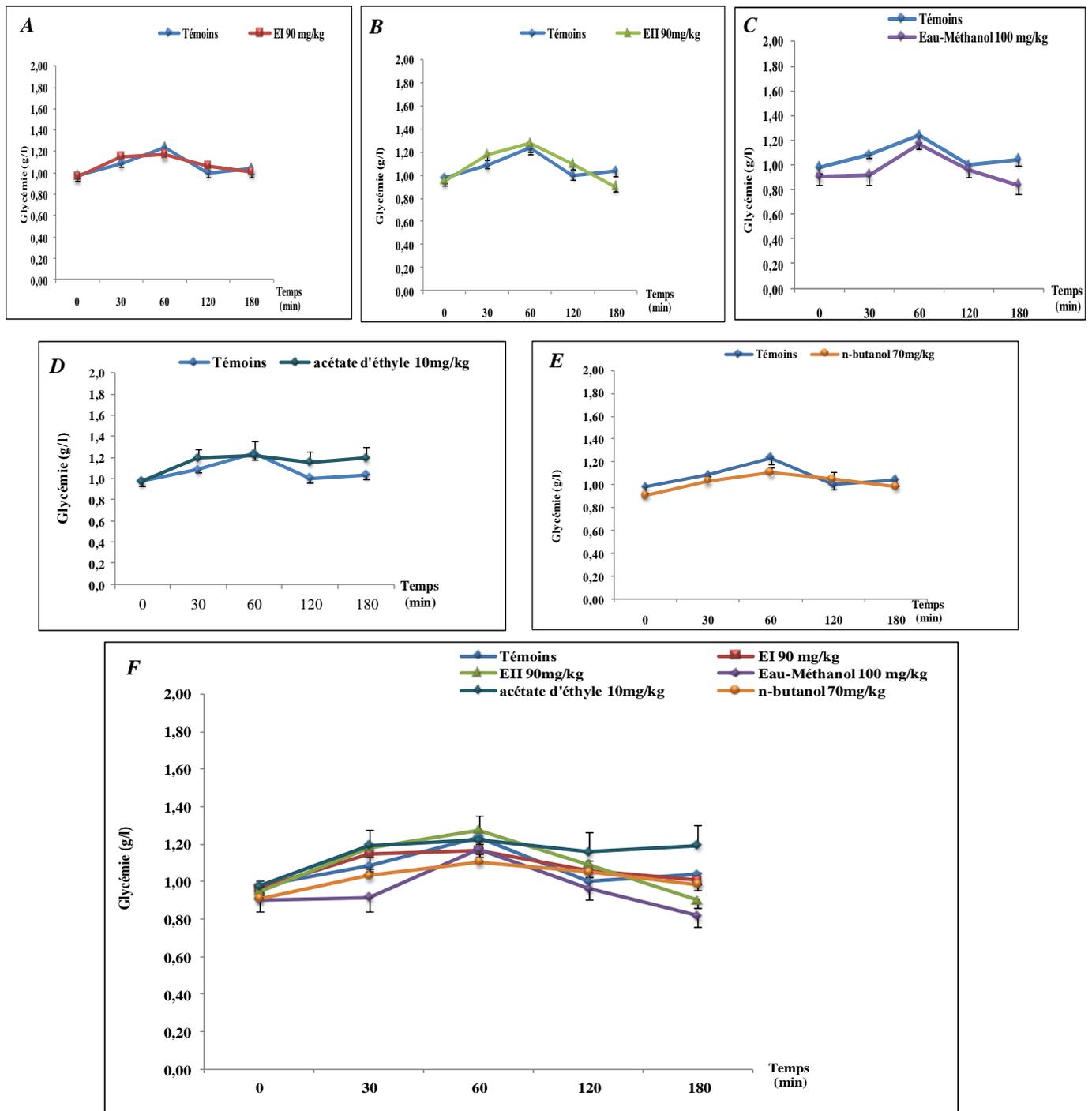
## 2.2. Effet à long terme des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur la glycémie chez les rats diabétiques et non diabétiques

Les résultats relatifs à l'effet de l'administration I.P. quotidienne des différents extraits de graines de la coloquinte sur la glycémie à long terme chez les rats diabétiques et non diabétiques sont représentés dans les *figures 9* et *10* respectivement.

Chez les rats non diabétiques (*figure 9 A, B, C, D, E, F*), on remarque que les différents extraits (EI 90 mg/kg, EII 90 mg/kg, EM 100 mg/kg, EAc 10 mg/kg p.c. et En-B 70 mg/kg) ne provoquent aucun changement significatif de la glycémie chez les différents groupes de rat par rapport aux rats témoins ( $p \geq 0,05$ ) durant toute l'expérimentation (7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour).

Chez les rats diabétiques (*figure 10 (A, B, C, D, E, F, G)*) l'injection I.P. de l'extrait EI provoque une diminution progressive et significative de la glycémie au 7<sup>ème</sup> et au 14<sup>ème</sup> jour ( $p \leq 0,01$ ), qui passe de 3,45 à 2,40g/l, elle devient très significative au 21<sup>ème</sup> ( $p \leq 0,001$ ). L'extrait EII (90 mg/kg) par contre, ne provoque aucun changement significatif de l'hyperglycémie durant les trois semaines de suivi. Concernant les extraits EM, EAc et En-B, ils provoquent une diminution significative de l'hyperglycémie ( $p \leq 0,001$ ) au 14<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> jour. L'administration du glibenclamide (10mg/kg) provoque une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) seulement au 14<sup>ème</sup> jour du traitement par rapport aux rats témoins (sérum physiologique).

A la lumière de ces résultats, on remarque que, l'effet des différents extraits de graines de la coloquinte administrés chez les rats diabétiques pendant trois semaines, devient significatif à partir du 14<sup>ème</sup> jour à l'exception de l'extrait EII qui ne présente aucune diminution durant toute la période de l'expérimentation. Ce qui illustre bien que les extraits de la coloquinte possèdent un effet antihyperglycémiant à long terme.

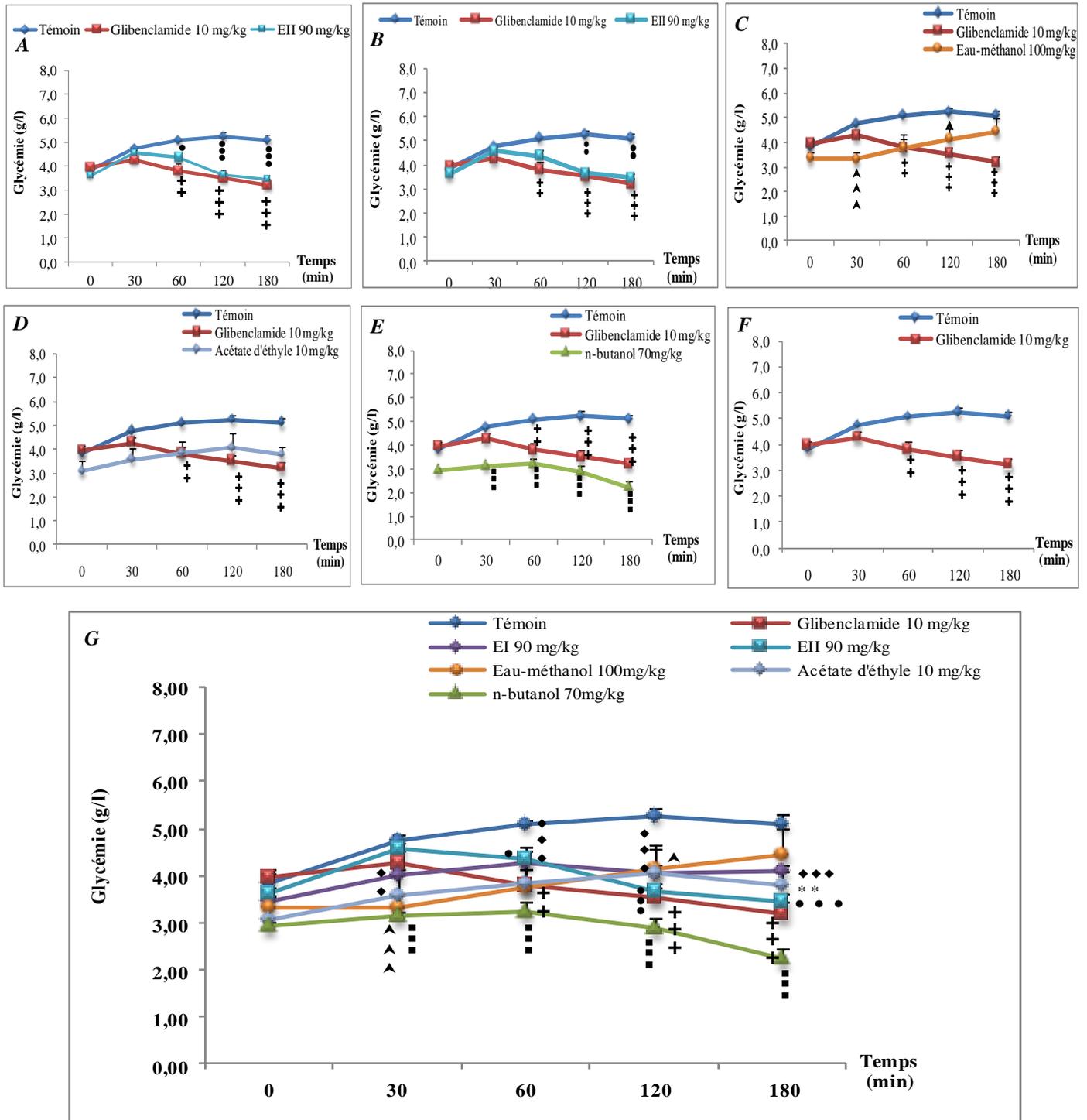


**Figure 7:** Variations à court terme de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de la glycémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

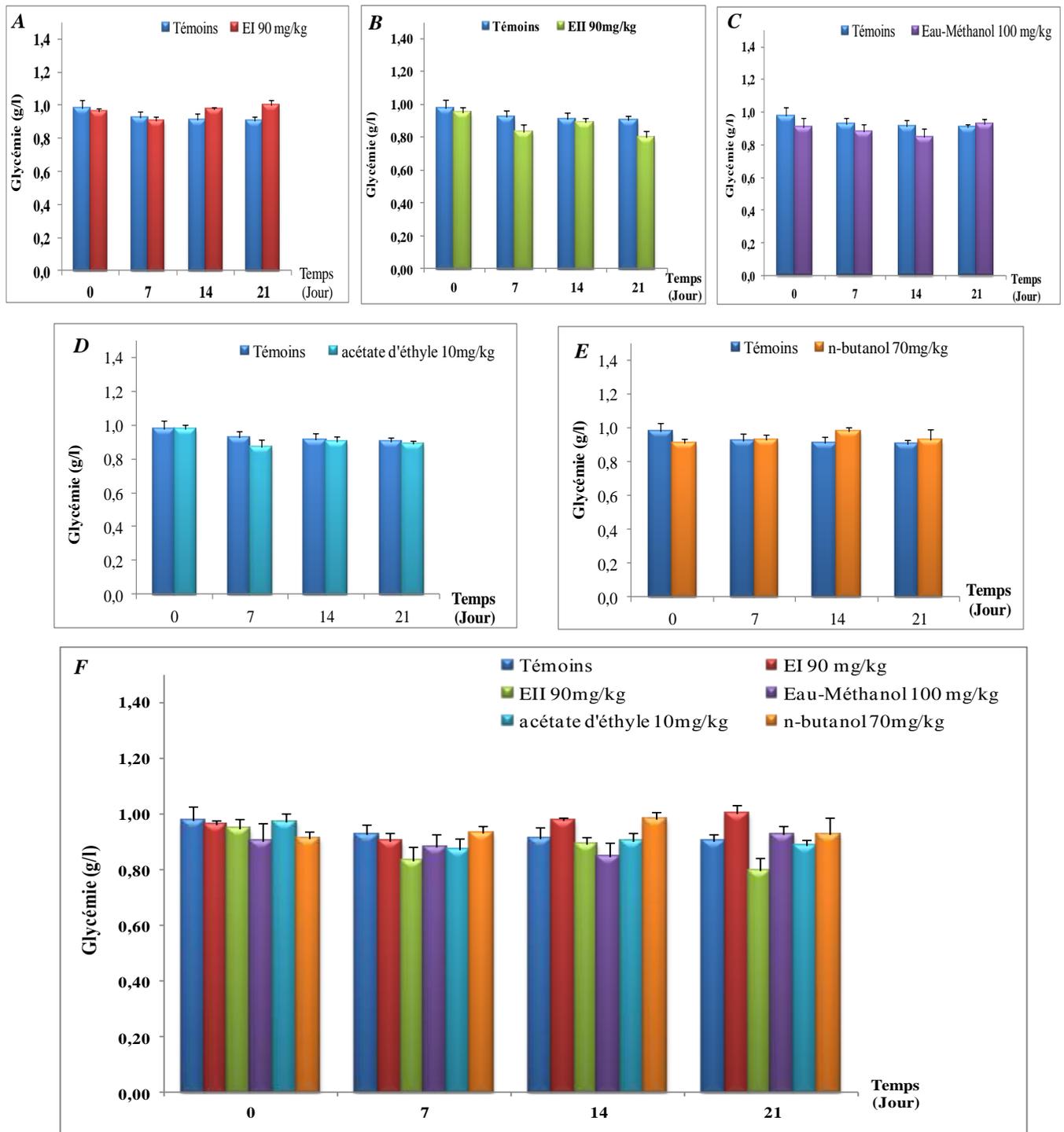


**Figure 8:** Variations à court terme de la glycémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg p.c.(contrôle positif)
- G : Variations de la glycémie chez les différents groupes de rats diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait n-butanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- ✦ Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait n-butanol et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

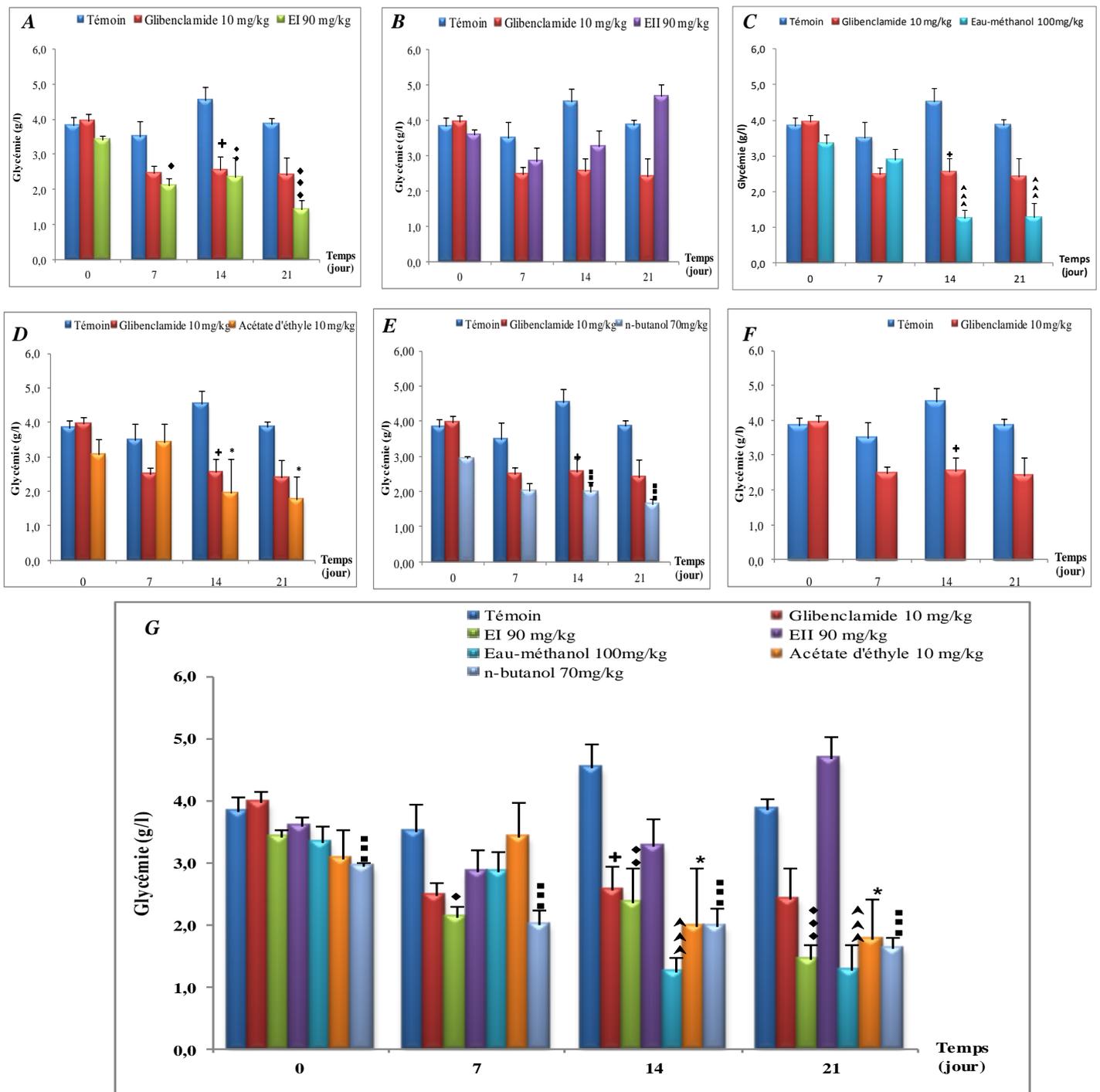


**Figure 9 :** Variations à long terme de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits deraines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg p.c.
- D : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg p.c.
- E : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg p.c.
- F : Variations de la glycémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg p.c d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg p.c. d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$



**Figure 10 :** Variations à long terme de la glycémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg p.c.(contrôle positif)
- G :** Variations de la glycémie chez les différents groupes de rats diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)
- ✦ Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

### 2.3. Effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques soumis au Test de Tolérance Orale au Glucose (TTOG)

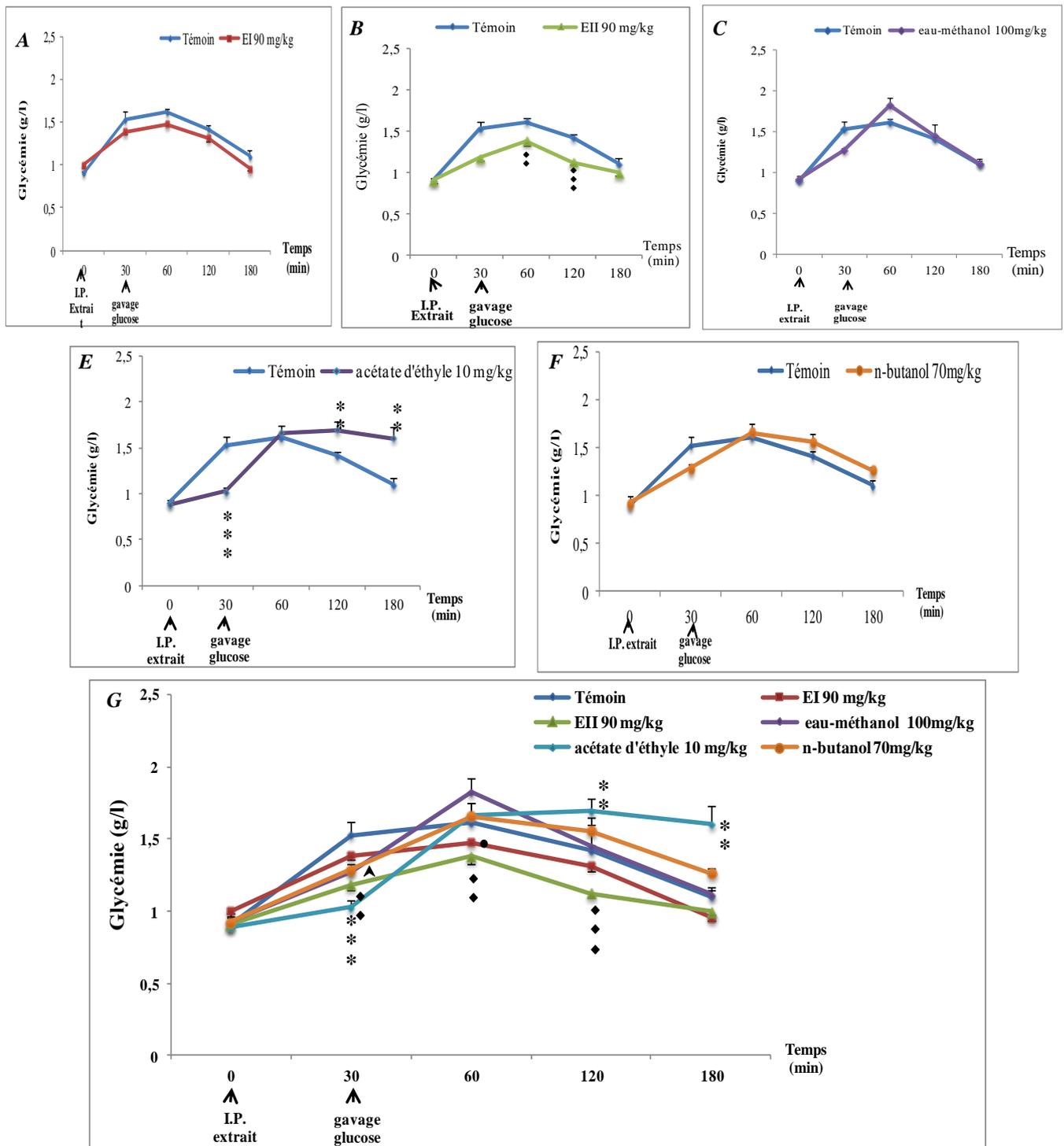
Chez les rats diabétiques et non diabétiques traités par les différents extraits pendant 21 jours. Ces animaux sont soumis à un TTOG le dernier jour de l'expérimentation ( $J_{21}$ ) après injection des extraits, Les résultats obtenus sont représentés dans *les figures 11 et 12*.

Dans la *figure 11 (A, B, C, D, E, F)* les rats non diabétiques traités par les extraits EI, EM et En-B, après gavage de la solution de glucose (2g/kg) à 30min, ne présentent aucun changement significatif de la glycémie. L'extrait EII montre un effet antihyperglycémiant semble atténuer l'apparition du pic d'hyperglycémie consécutif au gavage du glucose, provoquant ainsi une diminution significatif de la glycémie ( $p \leq 0.001$ ) à 120 min.

La réponse des rats diabétiques, traités par les extraits de la coloquinte au TTOG est représenté dans *la figure 12(A)*. Chez ces groupes de rats, en raison des écarts plus ou moins importants de la glycémie basale à  $t_0$ min (1,2 à 4,5g/l), et à fin de pouvoir comparer sa variation entre les différents lots de rats, celle-ci reste exprimées en taux de variation relatif à la glycémie basale. Les résultats sont indiqués dans *la figure 12. (B, C, D, E, F, G, H)*

D'après ces résultats, il paraît que l'extrait EI provoque une augmentation significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'hyperglycémie à 30, 60 et faiblement significatif à 120min. De même, les extraits EII et EAc provoquent une diminution non significative de l'hyperglycémie par rapport aux témoins, pendant que les extraits EM et En-B provoquent une augmentation à 60, 120 et 180min. les rats traités par le glibenclamide (témoin contrôle) révèlent une augmentation maintient la glycémie nettement inférieur à celle des rats témoins (NaCl 0,9%).

En fonction de ces résultats on constate, que l'administration I.P. à long terme des extraits de graines de la coloquinte, ne provoque aucun effet significatif sur la diminution de l'hyperglycémie chez les ras diabétiques et non diabétiques soumis au TTOG, au contraire certains extraits ont contribué à faire augmenter la glycémie des rats diabétiques.

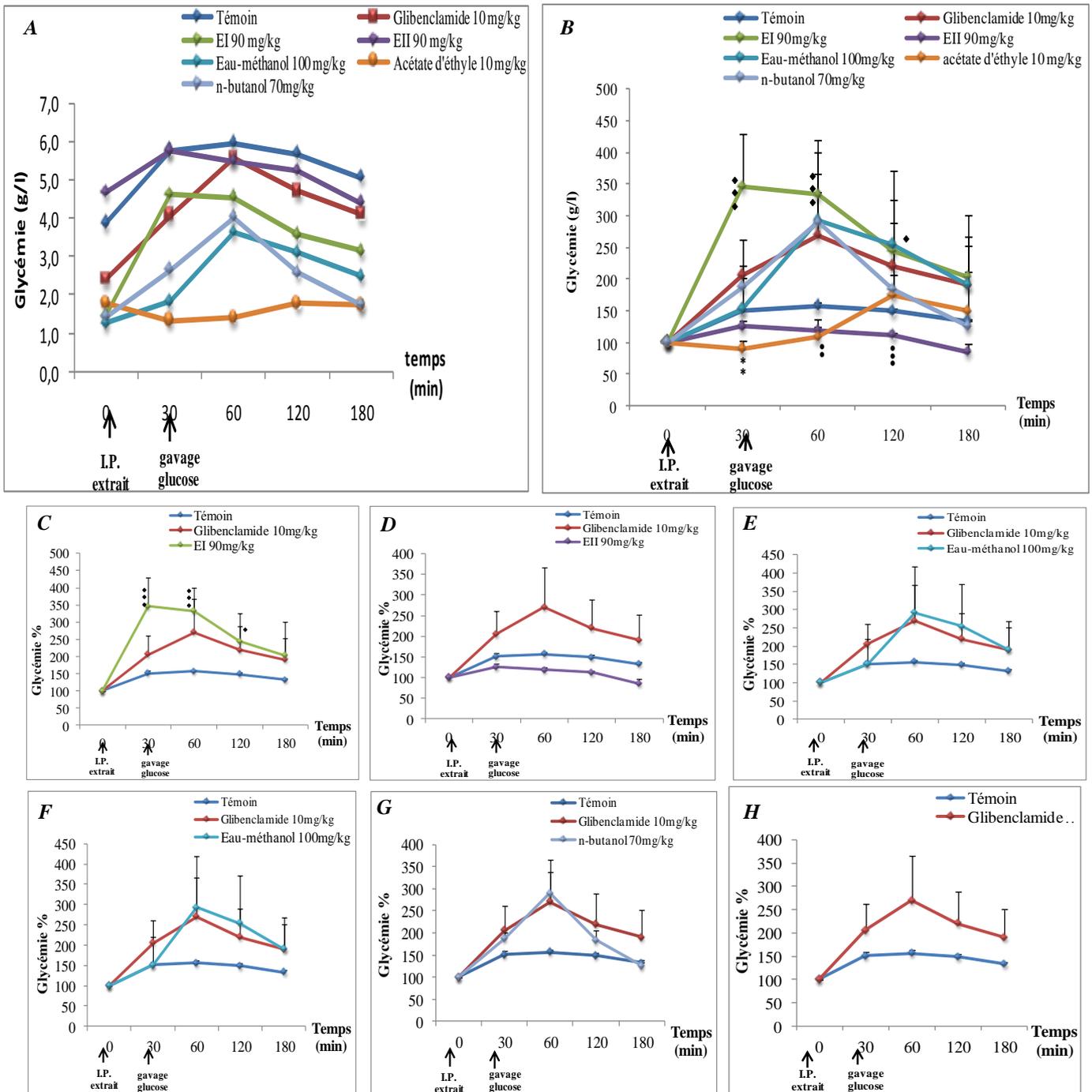


**Figure 11:** Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques soumis au TTOG et traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de la glycémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$



**Figure 12 :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques soumis au TTOG et traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

**A :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.

**B :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.

**C :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait (EM) 100mg/kg

**D :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait (EAc) 10mg/kg

**E :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait (En-B) 70mg/kg

**F :** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg p.c.

**G :** Variations de la glycémie chez les différents groupes de rats diabétiques expérimentaux et témoins

♦ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)

◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)

▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)

\* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)

† Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

‡ Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

**A :** Variations de la glycémie chez les différents groupes rats diabétiques expérimentaux et témoins représentées en valeurs absolues (g/l)

**B :** Variations de la glycémie chez les différents groupes rats diabétiques expérimentaux et témoins représentées en valeurs relatives à la glycémie basale(%)

## 2.4. Effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur certains paramètres sanguins chez les rats diabétiques et non diabétiques

Au cours de notre étude nous avons évalué l'effet de l'administration quotidienne I. P. des différents extraits de graines de la coloquinte, pendant trois semaines, sur les variations de certains paramètres biochimiques sanguins: cholestérol total, triglycérides, urée, créatinine, TGO, TGP et phosphatase alcaline. Les résultats obtenus chez les rats diabétiques et non diabétiques sont représentés dans *les Figure 13 à 26* respectivement.

### 2.4.1. Effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques sur les variations de la cholestérolémie et triglycéridémie

Les variations du taux de cholestérolémie total sérique, chez les rats normaux sont représentées dans *la figure 13 (A, B, C, D, E, F)*. Chez ces animaux, on observe que la majorité des extraits ne provoquent aucune influence sur ce paramètre durant toute l'expérimentation, à l'exception de l'extrait EI (90 mg/kg) qui a diminué significativement ( $p \leq 0,01$ ) le taux de l'hypercholestérolémie au 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour par rapport aux rats témoins.

Chez les rats diabétiques le taux de cholestérolémie, représenté dans *la figure 14 (A, B, C, D, E, F, G)* indique que la cholestérolémie augment chez les rats témoins (sérum physiologique) durant les 21 jours du traitement, par contre, elle demeure relativement stable chez les rats contrôle témoins (glibenclamide) au 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour. Par contre, chez les rats expérimentaux l'ensemble de groupes de rat à l'exception de l'extrait EAc montrent une diminution significative ( $p \leq 0,001$ ). Cette diminution progressive est notée au 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour principalement pour l'extrait EI et EM.

Concernant le taux de triglycéridémie chez les rats non diabétiques, représenté dans *la Figure 15 (A, B, C, D, E, F)*, on observe une diminution progressive et significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les rats traités par les différents extraits, principalement l'extrait EI au 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour par rapport aux témoins. Chez les rats diabétiques, dans *la figure 16 (A, B, C, D, E, F, G)* on observe chez les rats traités par les extraits EI, EII et EM, une diminution de ce paramètre ( $p \leq 0,01$ ) aux 7<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours. Le glibenclamide (10mg/kg) diminue la triglycéridémie seulement au 21<sup>ème</sup> jour. Tandis que, les extraits EAc et En-B, ne provoquent aucune diminution significative de ce paramètre.

En fonction de ces résultats on constate, que le traitement des rats (I. P.) à long terme par les différents extraits de graines de la coloquinte a tendance de diminuer le taux de

triglycéridémie et de cholestérolémie chez les rats diabétiques, alors que chez les rats non diabétiques, ces réductions ont diminué la triglycéridémie sans changer le taux du cholestérol total.

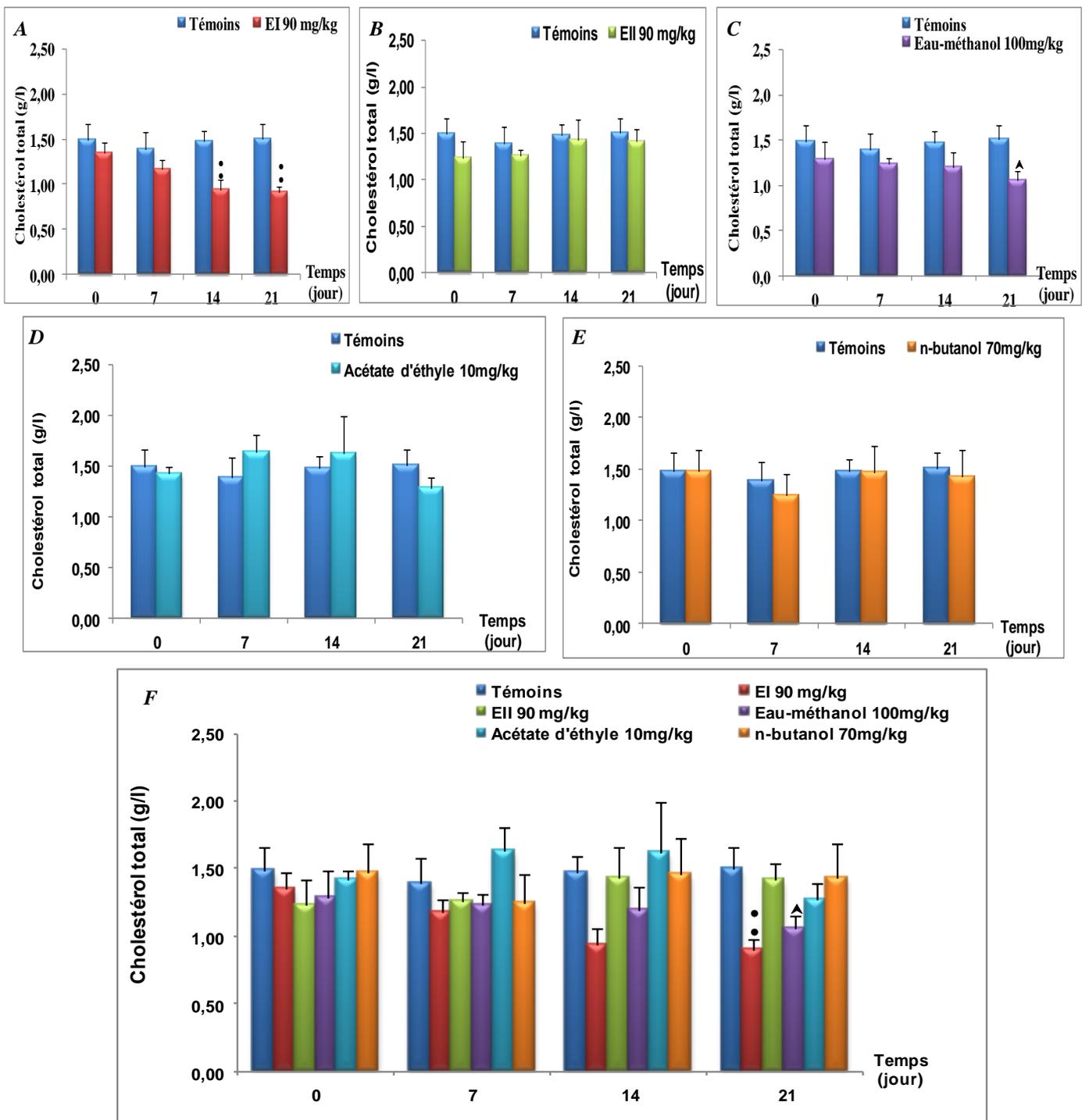
#### **2.4.2. Effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques sur les variations de l'urémie et la créatinémie**

Les résultats relatifs aux taux de l'urée plasmatique mesurés chez les rats non diabétiques et diabétiques sont représentés dans *les figures 17 (A, B, C, D, E, F) et 18 (A, B, C, D, E, F, G)* chez les rats non diabétiques et diabétiques respectivement.

Chez les rats non diabétiques on remarque que l'administration I.P. quotidiennes des différents extraits pendant trois semaines n'a provoqué aucun changement significatif de ce paramètre chez les différents groupes de rats témoins, témoins contrôle et expérimentaux. Chez les rats diabétiques également le taux de l'urée sanguine ne varie pas aussi bien chez les témoins et les expérimentaux.

Le taux de la créatinémie représenté dans *les figures 19 (a, b, c, d, e, f) et 20 (a, b, c, d, e, f, g)* montrent chez les rats non diabétiques (*figures 19*) de faibles variations non significatives chez les différents groupes expérimentaux par rapport aux rats témoins et témoins contrôles. De même chez les rats diabétiques des fluctuations négligeables de ce paramètre sont notés pour l'ensemble des extraits à l'exception de l'extrait EI et EAc, qui ont provoqué au 21<sup>ème</sup> jour une augmentation significative de la créatinine ( $p \leq 0,01$ ).

A la lumière de ce résultat, on constate que les doses administrées des extraits de graines de la coloquinte, pendant trois semaines chez les rats diabétiques et non diabétiques, ne sont pas toxiques chez ces animaux.

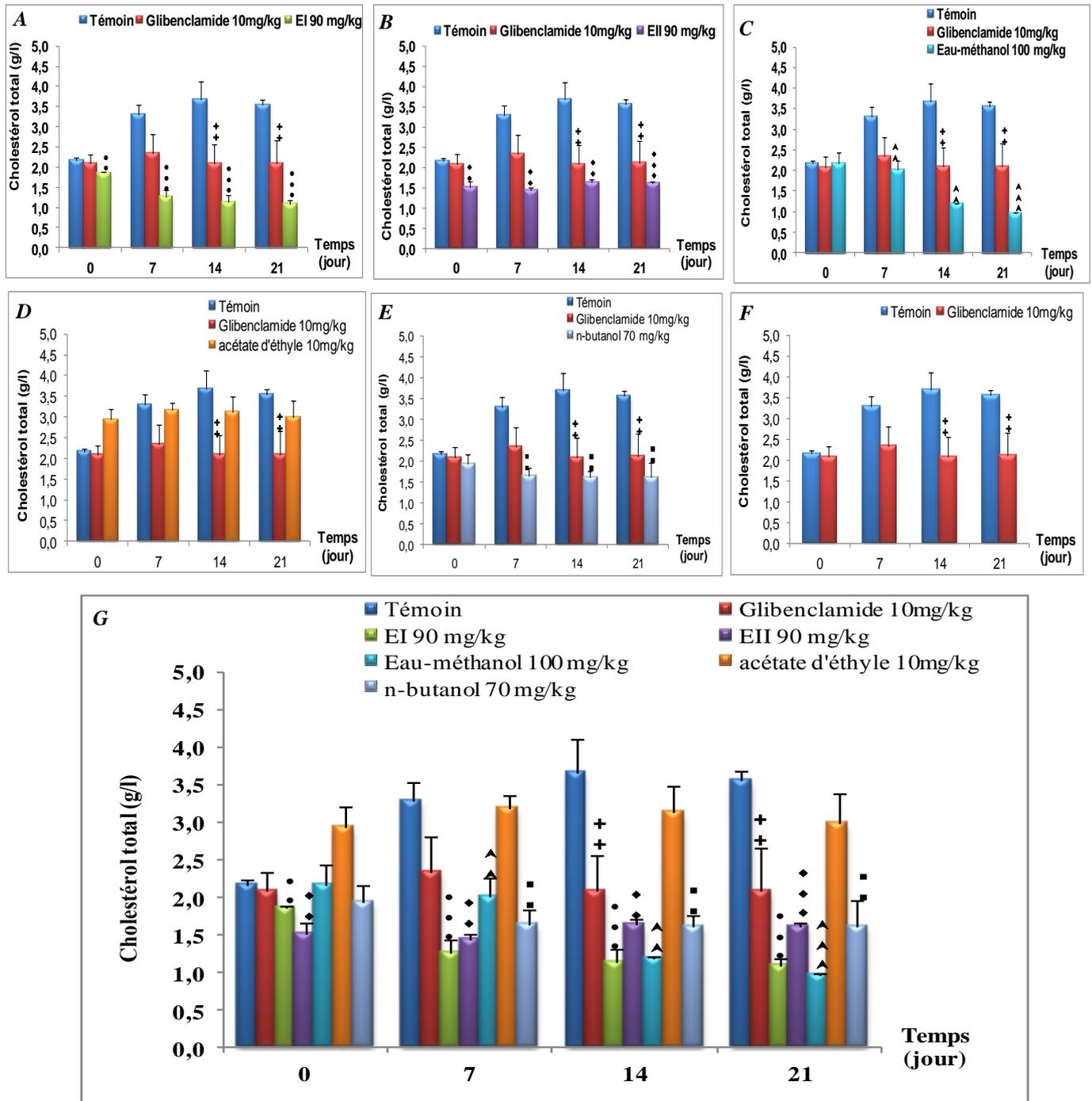


**Figure 13:** Variations de cholestérolémie totale chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de cholestérolémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de cholestérolémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de cholestérolémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de cholestérolémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de cholestérolémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de cholestérolémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins.

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- # Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

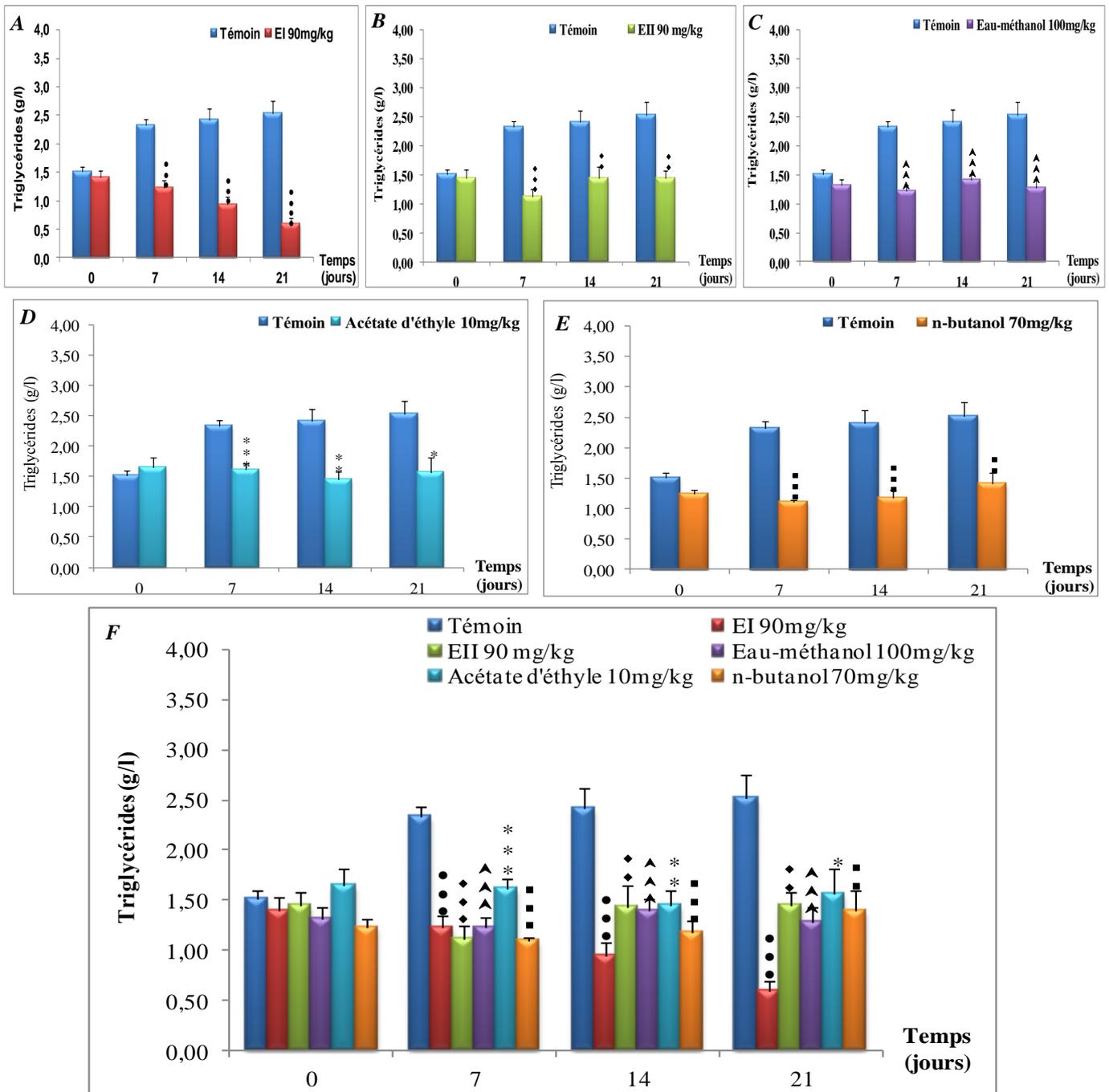


**Figure 14:** Variations de cholestérolémie totale chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- B :** Variations de cholestérolémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C :** Variations de cholestérolémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait (EM) 100mg/kg
- D :** Variations de cholestérolémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait (EAc) 10mg/kg
- E :** Variations de cholestérolémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait (En-B) 70mg/kg
- F :** Variations de cholestérolémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg p.c.
- G :** Variations de cholestérolémie chez les différents groupes de rats diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)
- ✦ Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

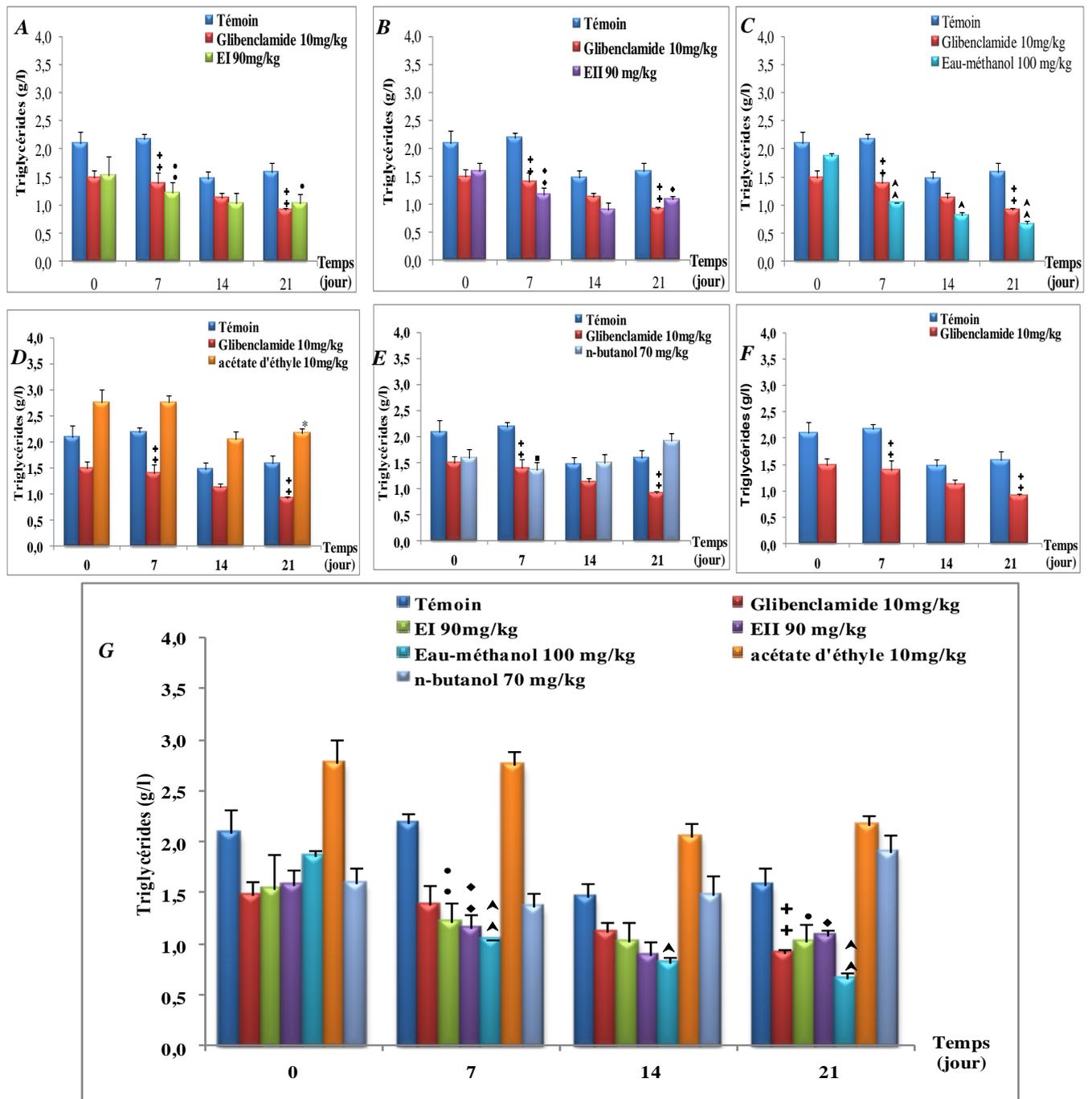


**Figure 15:** Variations de triglycéridémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de triglycéridémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de triglycéridémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de triglycéridémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de triglycéridémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de triglycéridémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de triglycéridémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

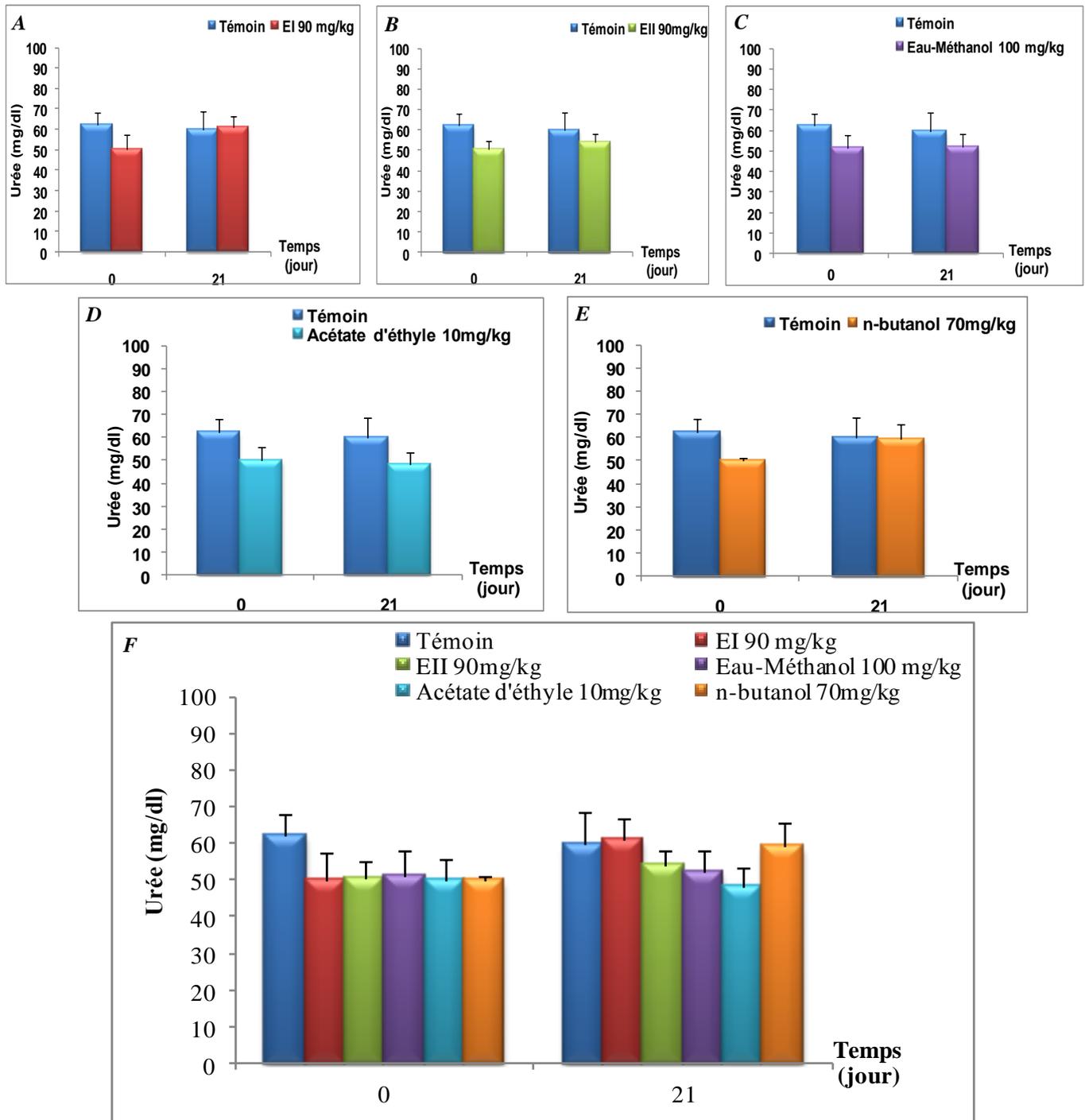
\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$



**Figure 16:** Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

A : Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.  
 B : Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.  
 C : Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol 100mg/kg  
 D : Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle 10mg/kg  
 E : Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol 70mg/kg  
 F : Variations de triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg  
 G : Variations de triglycéridémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait n-butanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- † Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

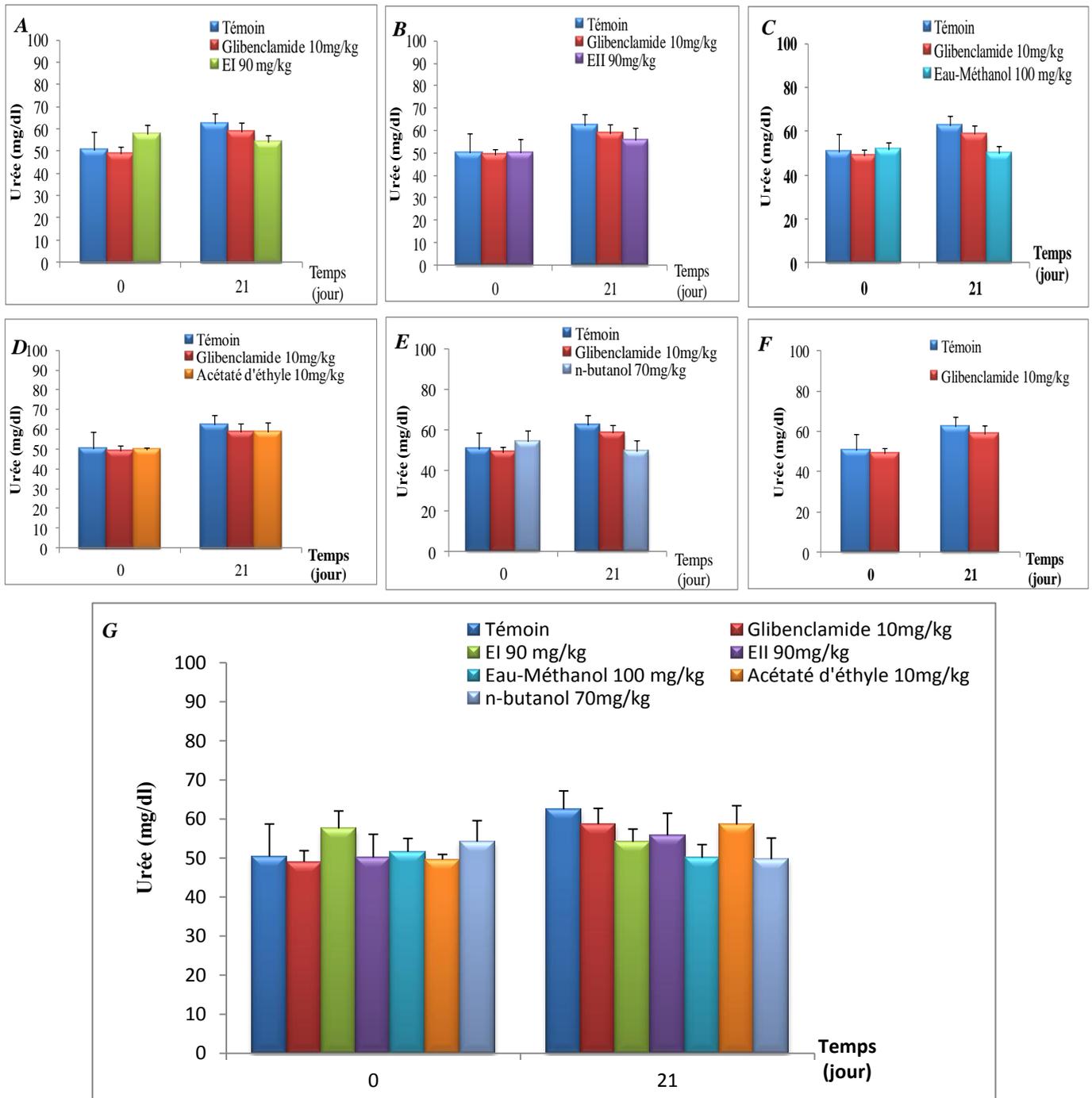


**Figure 17 :** Variations de l'urémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de l'urémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de l'urémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de l'urémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de l'urémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de l'urémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de l'urémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

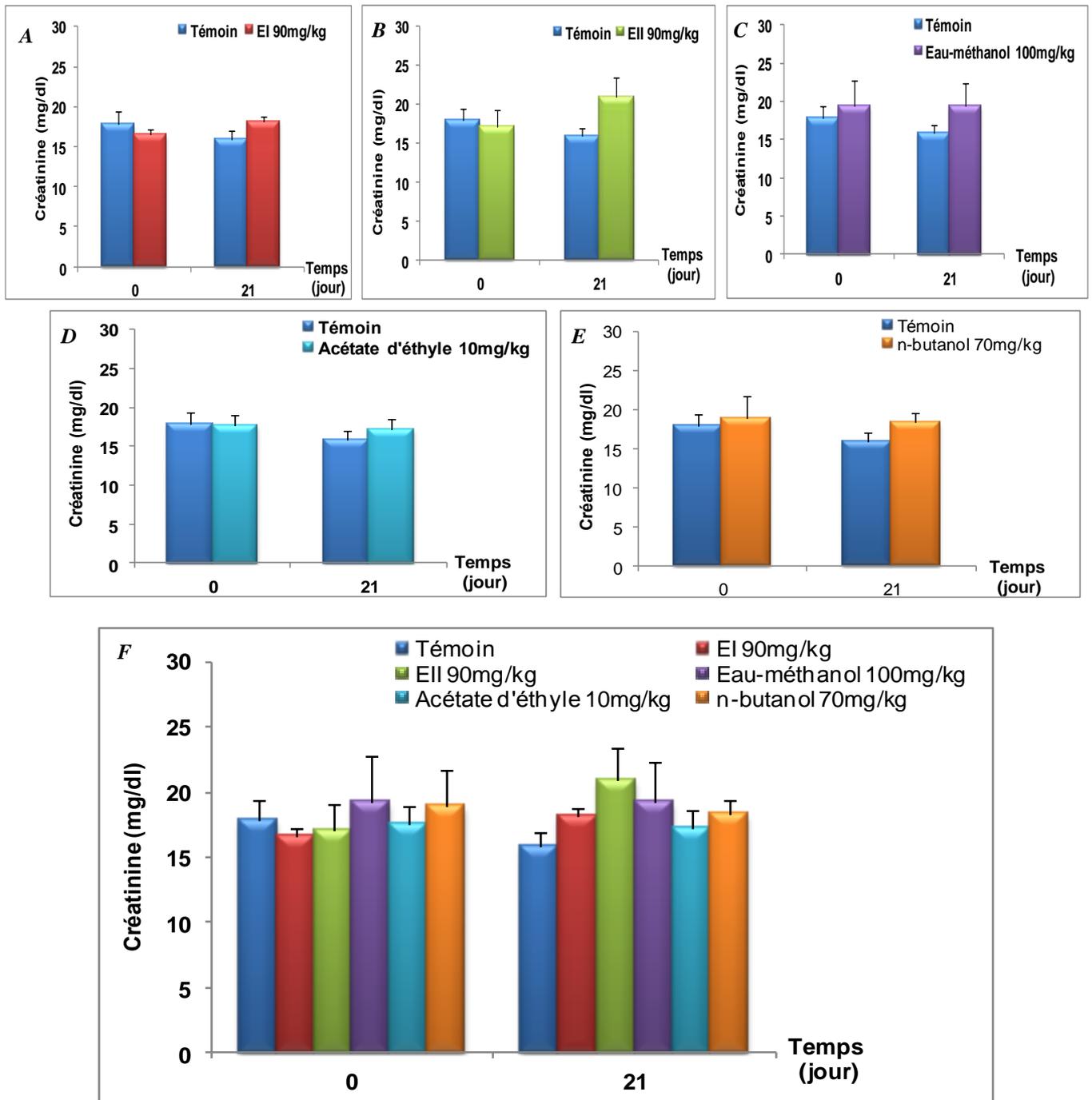


**Figure 18 :** Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A :** Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B :** Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C :** Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol 100mg/kg
- D :** Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle 10mg/kg
- E :** Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol 70mg/kg
- F :** Variations de l'urémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg
- G :** Variations de l'urémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait n-butanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- ✦ Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

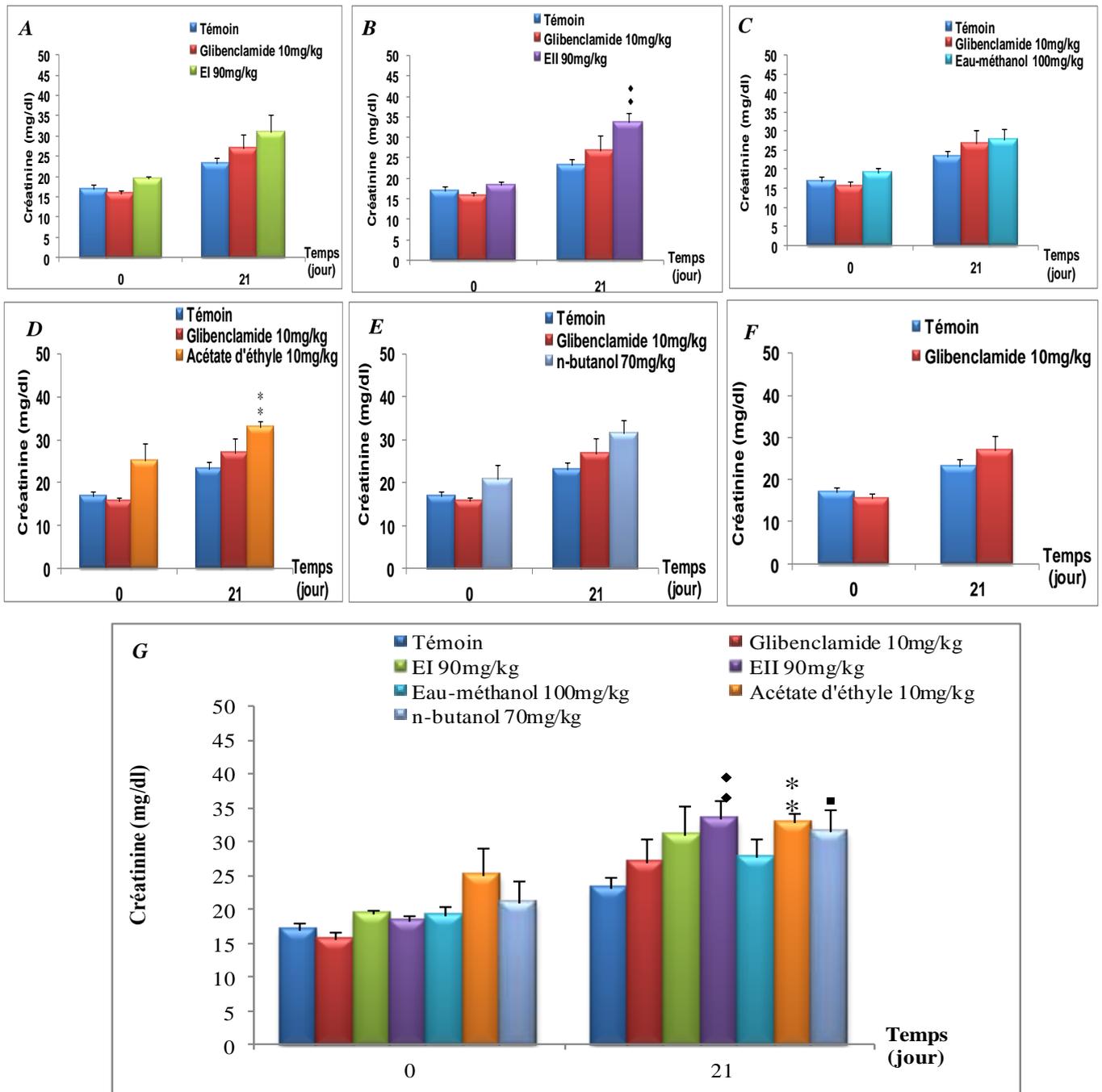


**Figure 19 :** Variations de la créatinémie chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de créatinémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de créatinémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de créatinémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de créatinémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de créatinémie chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de créatinémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$



**Figure 20:** Variations de la créatinémie chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de créatinémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de créatinémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de créatinémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol 100mg/kg
- D : Variations de créatinémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle 10mg/kg
- E : Variations de créatinémie chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol 70mg/kg
- F : Variations de créatinémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg
- G : Variations de créatinémie chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait n-butanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- ✦ Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

### 2.4.3. Effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques sur les variations de TGO, TGP et phosphatase alcaline sériques

Les résultats de l'effet des extraits de graines de coloquinte, administrés quotidiennement (I. P.) pendant trois semaines, sur les variations du taux des enzymes hépatiques, TGO, TGP et phosphatase alcaline (P.A.), sont représentés dans *les figures 21 à 26*. Ces paramètres sont dosés à  $J_0$  et  $J_{21}$  pour certains extraits chez les rats diabétiques et non diabétiques, extrait EI, EAc, et glibenclamide respectivement.

Concernant le taux de TGO (*figure 21*), au 21<sup>ème</sup> jour les rats non diabétiques traités par l'extrait EAc ne montrent aucune variation significative, contrairement à l'extrait EI qui a provoqué une diminution peu significative ( $p \leq 0,05$ ) de TGO par rapport aux rats témoins. Chez les rats diabétiques (*figure 22*), le taux de TGO demeure stable entre le début et la fin de l'expérimentation on constate une stabilité de ce paramètre entre le début et la fin de l'expérimentation chez les rats traités par les extraits EI, EAc et le glibenclamide.

Les variations du taux de TGP chez les rats non diabétiques et diabétiques sont représentées dans *les figures 23 et 24*. L'extrait EAc ne provoque aucune variation significative de ce paramètre à la fin de l'expérimentation chez les rats non diabétiques, tandis que l'extrait EI a diminué significativement ( $p \leq 0,05$ ) le taux de TGP par rapport aux rats témoins. Chez les rats diabétiques (*figure 24*) le taux de TGP diminue chez les rats traités par l'extrait EAc ( $p \leq 0,05$ ), il en est de même chez les rats traités par le glibenclamide.

En fin concernant la phosphatase alcaline *figure 25*, son taux n'est pas modifié chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI ( $p \leq 0,05$ ), contrairement à l'extrait EAc entre  $J_0$  et  $J_{21}$  provoque chez les rats non diabétiques une stabilité du taux de la phosphatase alcaline. Chez les rats diabétiques (*figure 26*) on note des variations non significatives ( $p \geq 0,05$ ) de la P. A. durant l'expérimentation ( $J_0$  et  $J_{21}$ ) chez les rats traités par les extraits EI, EAc et le glibenclamide.

En fonction de ces résultats on constate que, l'administration I. P. pendant trois semaines des extraits EI et EAc chez les rats diabétiques et non diabétiques ne provoque pas une toxicité hépatique, puis que, aucune variation significative des transaminases n'a été observée.

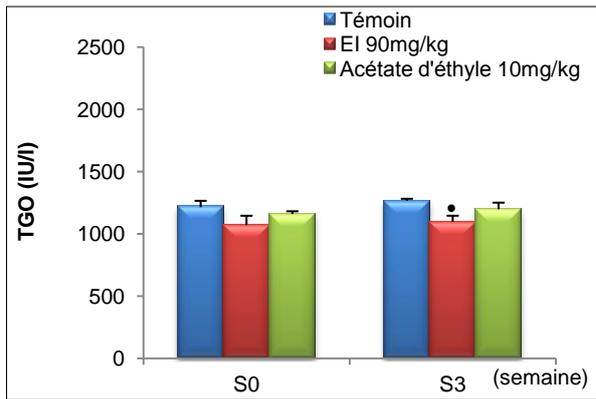


Figure. 21: Variations du taux de TGO chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

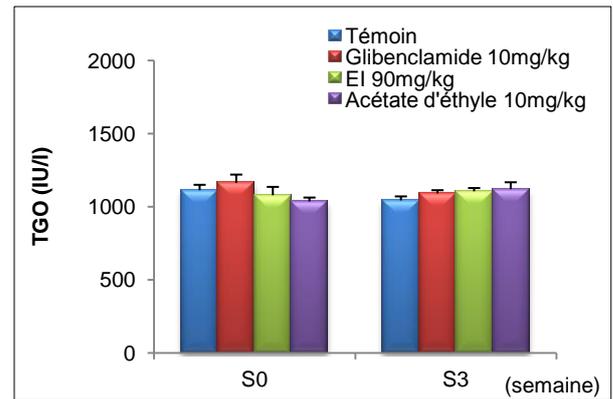


Figure. 22: Variations de taux de TGO chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

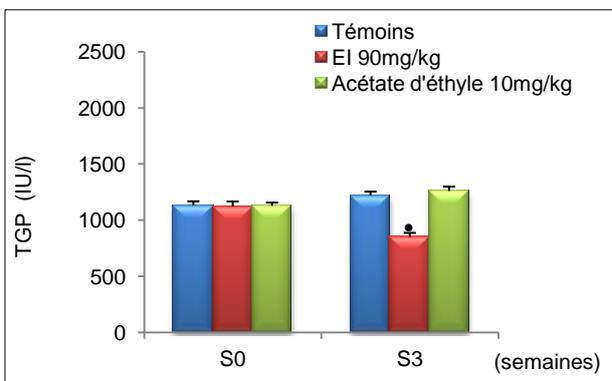


Figure. 23: Variations du taux de TGP chez le rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

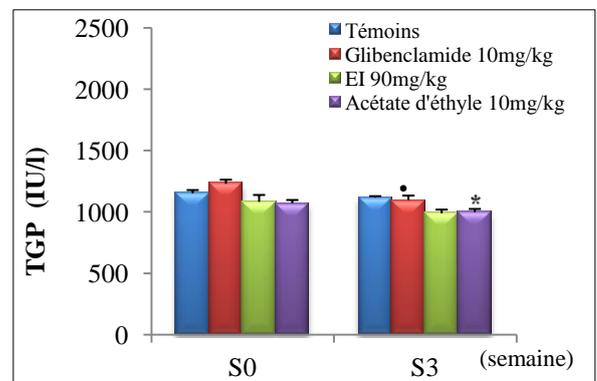


Figure. 24: Variations de taux de TGP chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

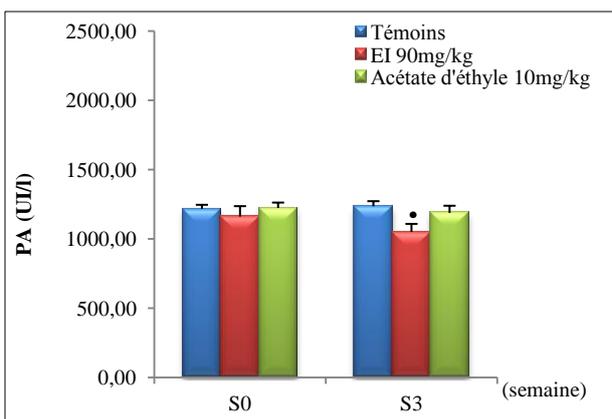


Figure. 25: Variations du taux de P.A. chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

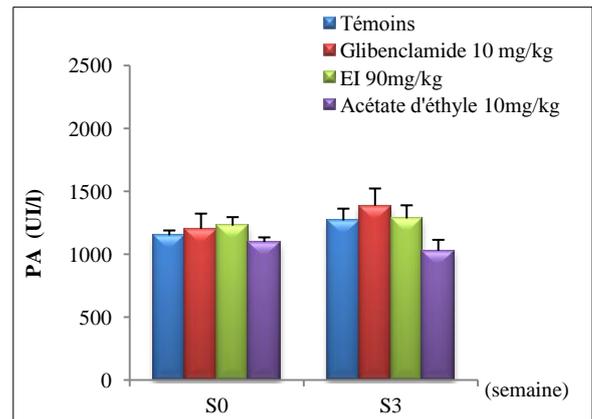


Figure. 26: Variations du taux de P. A. chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

#### 2.4.4. Effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques sur le poids corporel

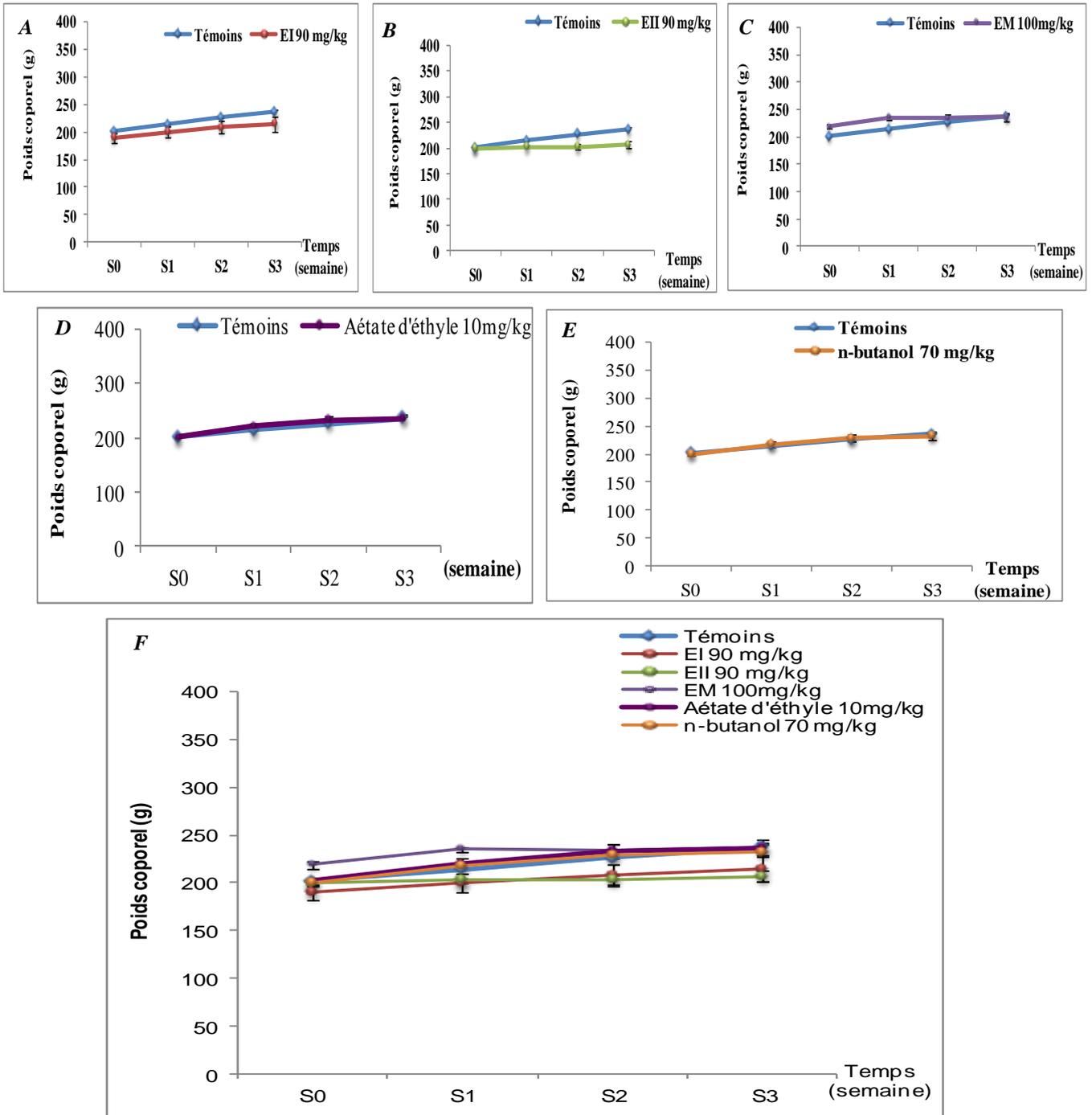
L'effet des extraits de graines de la coloquinte administrés par voie I.P. pendant trois semaines sur les variations du poids corporel chez les rats diabétiques et non diabétiques sont représentés dans *les figures 27 et 28*. Le gain ou perte de poids corporel (g/semaine) calculé chez les différents groupes de rats est représenté dans *le tableau n° 18*.

Chez les rats non diabétiques (*figure 27 A, B, C, D, E, F*), on remarque une évolution pondérale progressive et comparable aux rats témoins notamment chez les groupes de rats traités par les extraits EI, EM, EAc et En-B, tandis que l'extrait EII provoque une stabilité du poids corporel durant la période d'expérimentation. En terme de gains de poids corporel, on note une augmentation de ce gain chez l'ensembles des rats non diabétiques, la valeur la plus élevée est de +9,63, +15,75 et +17,36 g/semaine observé chez les rats traités par l'extrait EAc à S1, S2 et S3 respectivement, suivie par les extraits En-B: +8,78 (S1), +14,48 (S2) et +16,13 à S3 et EI: +5,11 (S1), +9,83 (S2) et +12,97 à S3. Contrairement aux précédents les animaux traités par l'extrait EM et EII présentent un très faible gain de poids, +7,38 (S1), +6,84 (S2) et +8,37 (S3), et +1,45 (S1), +1,78 (S2) et +3,76 (S3) respectivement.

Chez les rats diabétiques, *figure 28 (A, B, C, D, E, F, G)*, on note une chute de poids dès la première semaine chez l'ensemble des animaux. Elle est significative chez les rats témoins non traités ( $p \leq 0,001$ ), -16,37 (S2) et -26,35 g/s (S3). Toute fois, cette perte de poids est moins importante chez les rats traités par l'extrait EAc +0,65 (S1), -2,71(S2) et -3,68 à S3; et à un degré moindre l'extrait En-B (-7,37 à S3) et EI (-14,47). De même les extraits EM et EI présente un gain de poids corporel comparable aux rats témoins il est de l'ordre -9 g/s à S1, de -11 à -18 g/s à S2, et environ -25 g/s à S3.

Par ailleurs, les rats traités par les extraits EII et EM subissent une chute de poids corporel comparable à celle des rats témoins de -25,50 et -25,63 respectivement.

De ce fait, on remarque que les extraits de la coloquinte, notamment l'extrait EAc peuvent prévenir la chute du poids corporel chez les rats diabétiques consécutive à l'installation du diabète

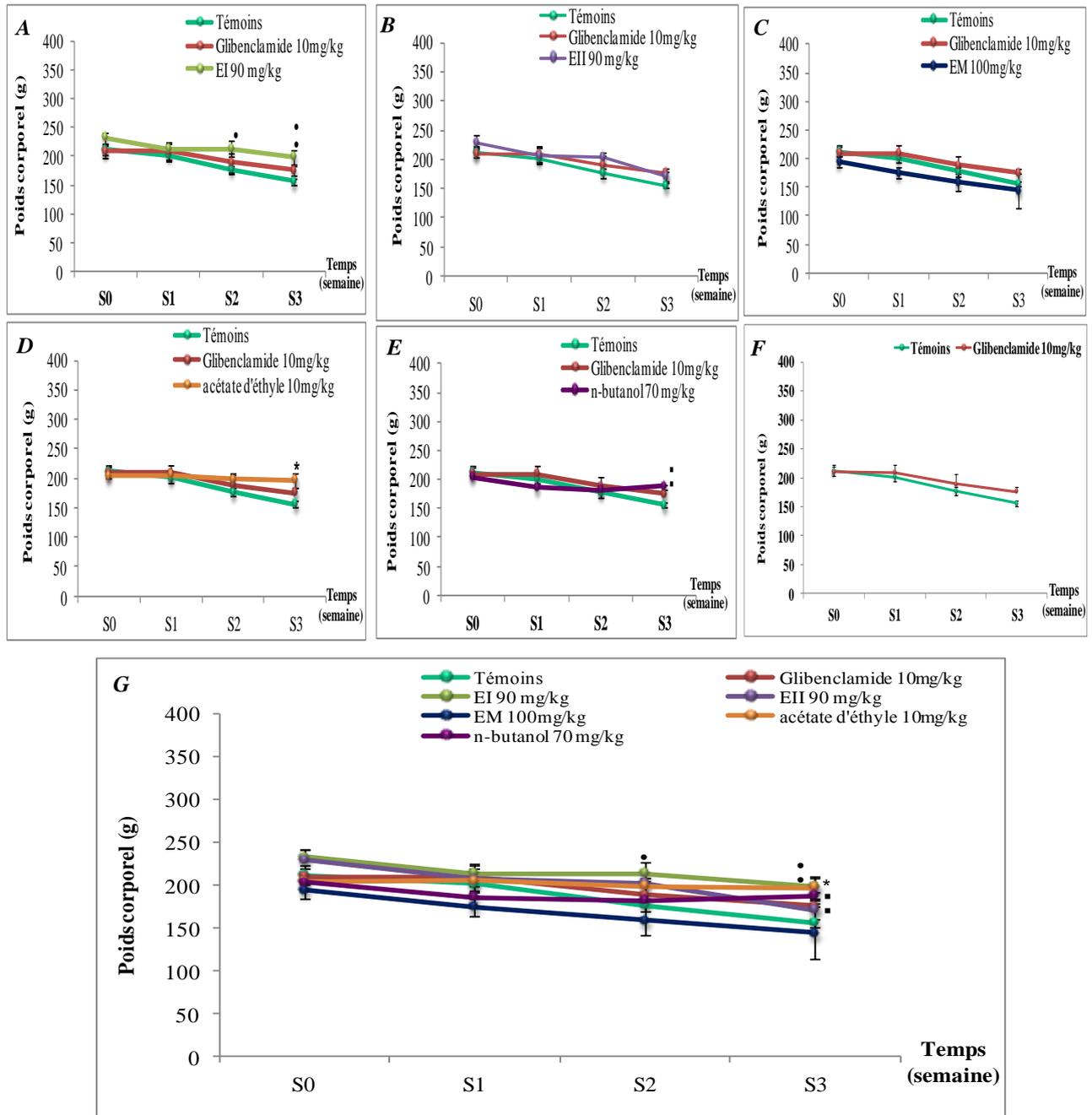


**Figure 27:** Variations du poids corporel chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de poids corporel chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de poids corporel chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de poids corporel chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D : Variations de poids corporel chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E : Variations de poids corporel chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F : Variations de poids corporel chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait EM et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait EAc et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait En-B et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$



**Figure 28:** Variations du poids corporel chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A :** Variations de poids corporel chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B :** Variations de poids corporel chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C :** Variations de poids corporel chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol (EM) 100mg/kg
- D :** Variations de poids corporel chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle (EAc) 10mg/kg
- E :** Variations de poids corporel chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol (En-B) 70mg/kg
- F :** Variations de créatinémie chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg
- G :** Variations de poids corporel chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 10mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait n-butanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- ✦ Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

**Tableau n°18:** Gain de poids corporel chez les rats diabétiques et non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

<i>Gain de poids corporel (g/semaine)</i>			
	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>
<i>rats non diabétiques</i>			
Témoin	+ 6,21	+ 12,30	+ 17,34
EI (90 mg/kg)	+ 5,11	+ 9,83	+ 12,97
EII (90 mg/kg)	+ 1,45	+ 1,78	+ 3,76
EM (100 mg/kg)	+ 7,38	+ 6,84	+ 8,37
EAc (10 mg/kg)	+ 9,63	+ 15,75	+ 17,36
En-B (70 mg/kg)	+ 8,78	+ 14,48	+ 16,13
<i>rats diabétiques</i>			
Témoin	- 4,72	-16,37	- 26,35
Glibenclamide (10 mg/kg)	- 0,34	- 9,81	- 16,34
EI (90 mg/kg)	- 8,27	- 8,32	- 14,47
EII (90 mg/kg)	- 9,85	- 11,68	- 25,50
EM (100 mg/kg)	- 10,09	- 18,25	- 25,68
EAc (10 mg/kg)	+ 0,65	- 2,71	- 3,68
En-B (70 mg/kg)	- 8,57	- 10,38	- 7,37

#### 2.4.5. Effet des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques sur la biométrie des organes

L'effet de l'administration I. P. des extraits de graines de la coloquinte sur la biométrie des organes chez les groupes de rats diabétiques et non diabétiques est représenté dans les figures 29 et 30. Chez les rats non diabétiques on ne remarque aucune variation significative du poids relatif (au poids corporel) du poids du foie, du pancréas, des reins, des testicules, du muscle et du tissu adipeux épидидymaire, pour l'ensemble des extraits à l'exception de l'extrait EI où on note une diminution significative ( $p \leq 0,01$ ) le poids du foie, des reins et de graisse, ainsi que l'extrait EM qui augmente ( $p \leq 0,01$ ) le poids du foie. Par contre chez les rats diabétiques (figure 30) on note une augmentation, peu significative ( $p \leq 0,05$ ) du poids de graisse chez les rats traités par les extraits EI et EII, et significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les rats traités par les extraits EM, EAc et En-B. De même, ces derniers extraits ainsi que l'extrait EII ont provoqué une augmentation significative ( $p \leq 0,01$ ) du poids du muscle. En ce qui concerne le poids relatif des testicules ainsi que du pancréas aucune variation significative n'est observée. Pareillement au poids du foie et des reins, pas de changement significatif est noté pour l'ensemble des extraits à l'exception de l'extrait En-B qui a diminué significativement ( $p \leq 0,01$ ) le poids du foie et des reins chez les rats expérimentaux par rapport aux témoins. Le glibenclamide n'a provoqué aucune variation significative pour l'ensemble des organes étudiés.

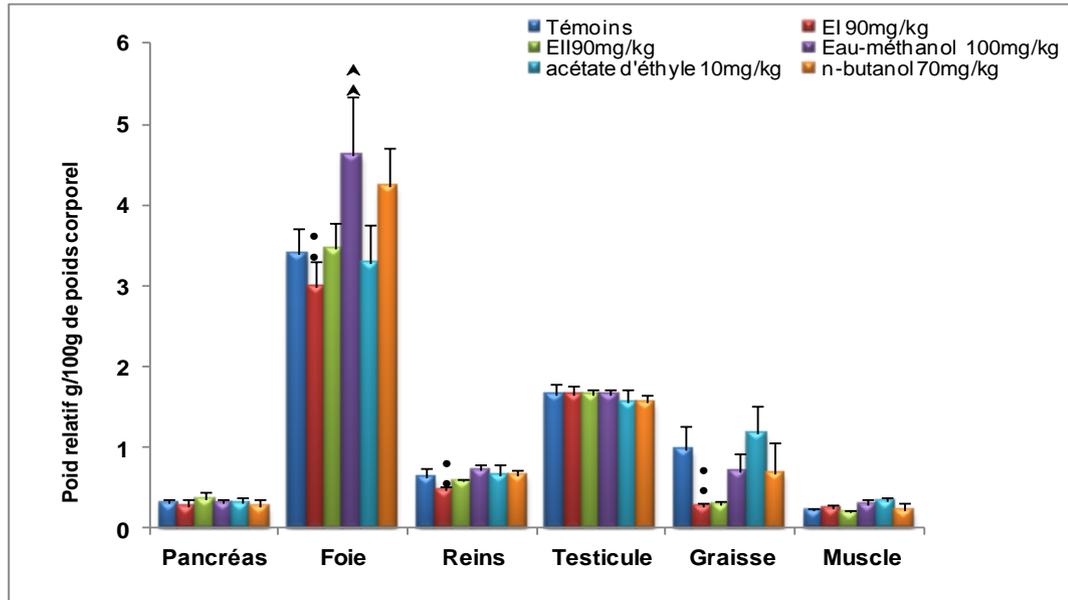


Figure 29: Variations de poids relatif des organes (g d'organe/ 100g de p.c.) chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

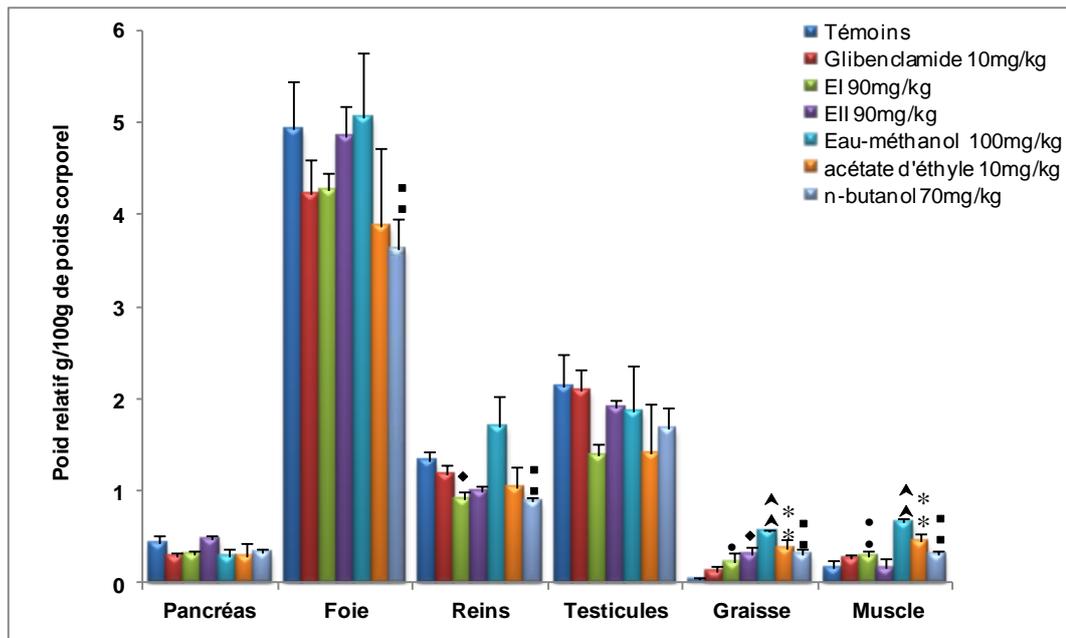


Figure 30: Variations de poids relatif des organes (g d'organe/ 100g de p.c.) chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)
- Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait n-butanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- † Comparaison entre rats traités par 10mg/kg de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

**Tableau n°18:** Gain de poids corporel chez les rats diabétiques et non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

	<i>Gain de poids corporel (g/semaine)</i>		
	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>
<i>rats non diabétiques</i>			
Témoin	+ 6,21	+ 12,30	+ 17,34
EI (90 mg/kg)	+ 5,11	+ 9,83	+ 12,97
EII (90 mg/kg)	+ 1,45	+ 1,78	+ 3,76
EM (100 mg/kg)	+ 7,38	+ 6,84	+ 8,37
EAc (10 mg/kg)	+ 9,63	+ 15,75	+ 17,36
En-B (70 mg/kg)	+ 8,78	+ 14,48	+ 16,13
<i>rats diabétiques</i>			
Témoin	- 4,72	-16,37	- 26,35
Glibenclamide (10 mg/kg)	- 0,34	- 9,81	- 16,34
EI (90 mg/kg)	- 8,27	- 8,32	- 14,47
EII (90 mg/kg)	- 9,85	- 11,68	- 25,50
EM (100 mg/kg)	- 10,09	- 18,25	- 25,68
EAc (10 mg/kg)	+ 0,65	- 2,71	- 3,68
En-B (70 mg/kg)	- 8,57	- 10,38	- 7,37

#### 2.4.6. Effet à long terme des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* chez les rats diabétiques et non diabétiques sur la consommation d'eau et d'aliment

Au cours de notre étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet à long terme des différents extraits de la coloquinte sur la prise d'eau et d'aliment chez les rats diabétiques et non diabétiques, témoins et expérimentaux. Les variations de la consommation hydrique et alimentaire sont représentées dans *les figures 31 et 32*.

##### ▪ Consommation d'aliment

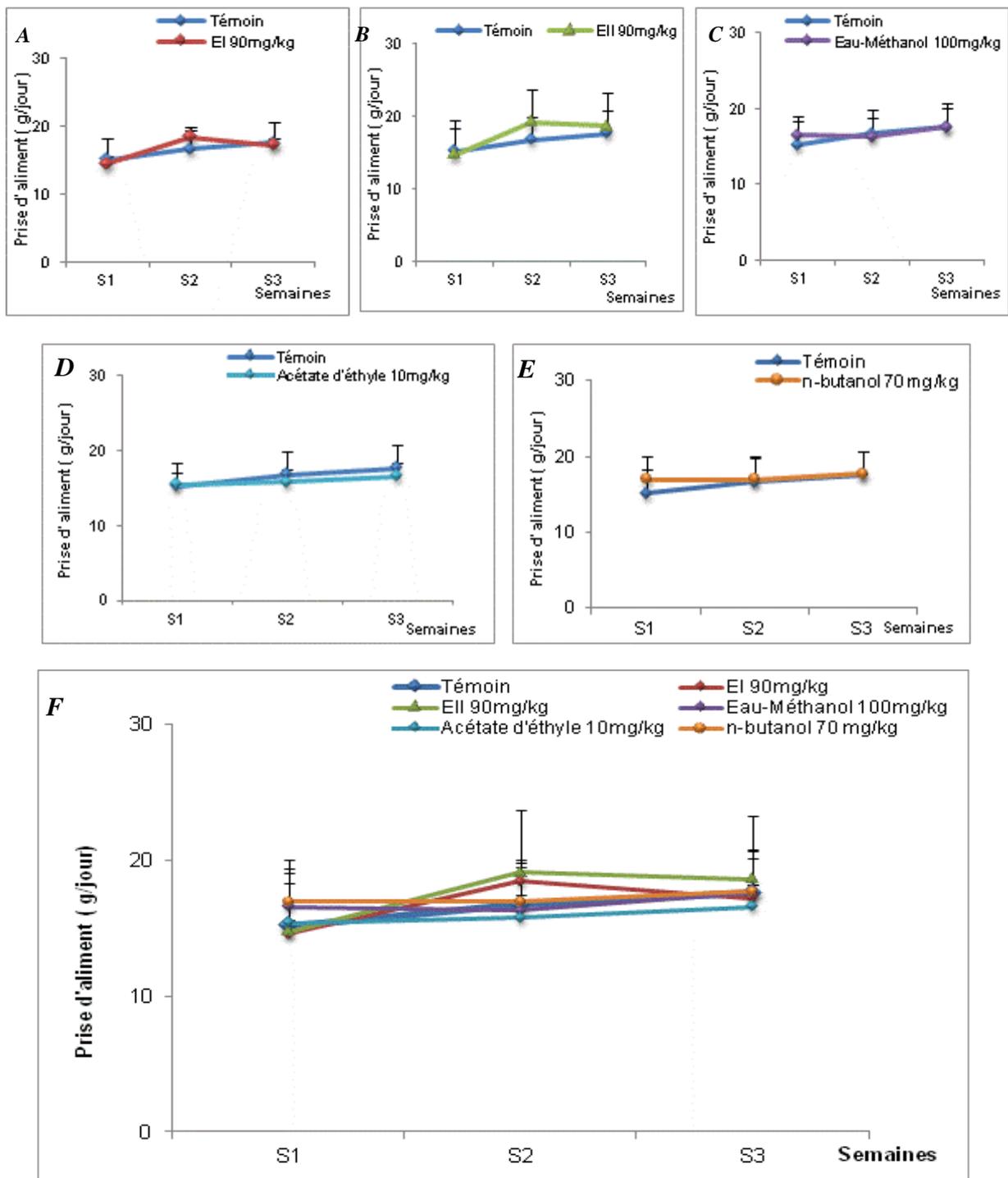
Dans la *figure 31 (A, B C, D, E, F)* on remarque chez les rats non diabétiques traités par les différents extraits de graines de la coloquinte une consommation d'aliment (exprimée en g/jour/rat) est comparable entre les rats expérimentaux et témoins, aucune différence significative n'est observée, la quantité d'aliment consommée varie entre 15 et 18 g/j/rat

Chez les rats diabétiques (*figure 32 A, B C, D, E, F, G*) on constate une augmentation de la consommation d'aliment chez les rats témoins (NaCl 0.9%) et témoins contrôles durant la période d'expérimentation (S1, S2, S3). En revanche, chez les rats expérimentaux traités par les extraits EI, EII, EM, EAc et En-B, cette consommation demeure stable et significativement ( $p \leq 0,001$ ) inférieure par rapport aux témoins à S1, S2 et S3.

##### ▪ Consommation d'eau

En ce qui concerne la prise d'eau, l'administration intrapéritonéale des différents extraits de graines de la coloquinte chez les rats non diabétiques (*figure 33 A, B C, D, E, F*) ne provoque aucune variation significative ( $p \geq 0,05$ ) chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins durant toute l'expérimentation. Par contre chez les rats diabétiques, dans la *figure 34 (A, B, C, D, E, F, G)* on remarque une diminution très significative de la prise d'eau ( $p \leq 0,001$ ) chez les expérimentaux par rapport aux rats témoins (NaCl 0,9%) et témoins contrôle, le glibenclamide (10mg/kg). Chez les rats traités par les extraits EI, EII, EM, EAc et En-B, on observe une stabilité de la prise d'eau à S1, S2 et S3, durant la période d'expérimentation.

A la lumière de ces résultats on constate que les extraits de graines de la coloquinte, qui n'influencent pas sur la consommation d'eau et d'aliment chez les rats non diabétiques, semblent capables d'atténuer la polyphagie et la polydipsie consécutives à l'installation du diabète.

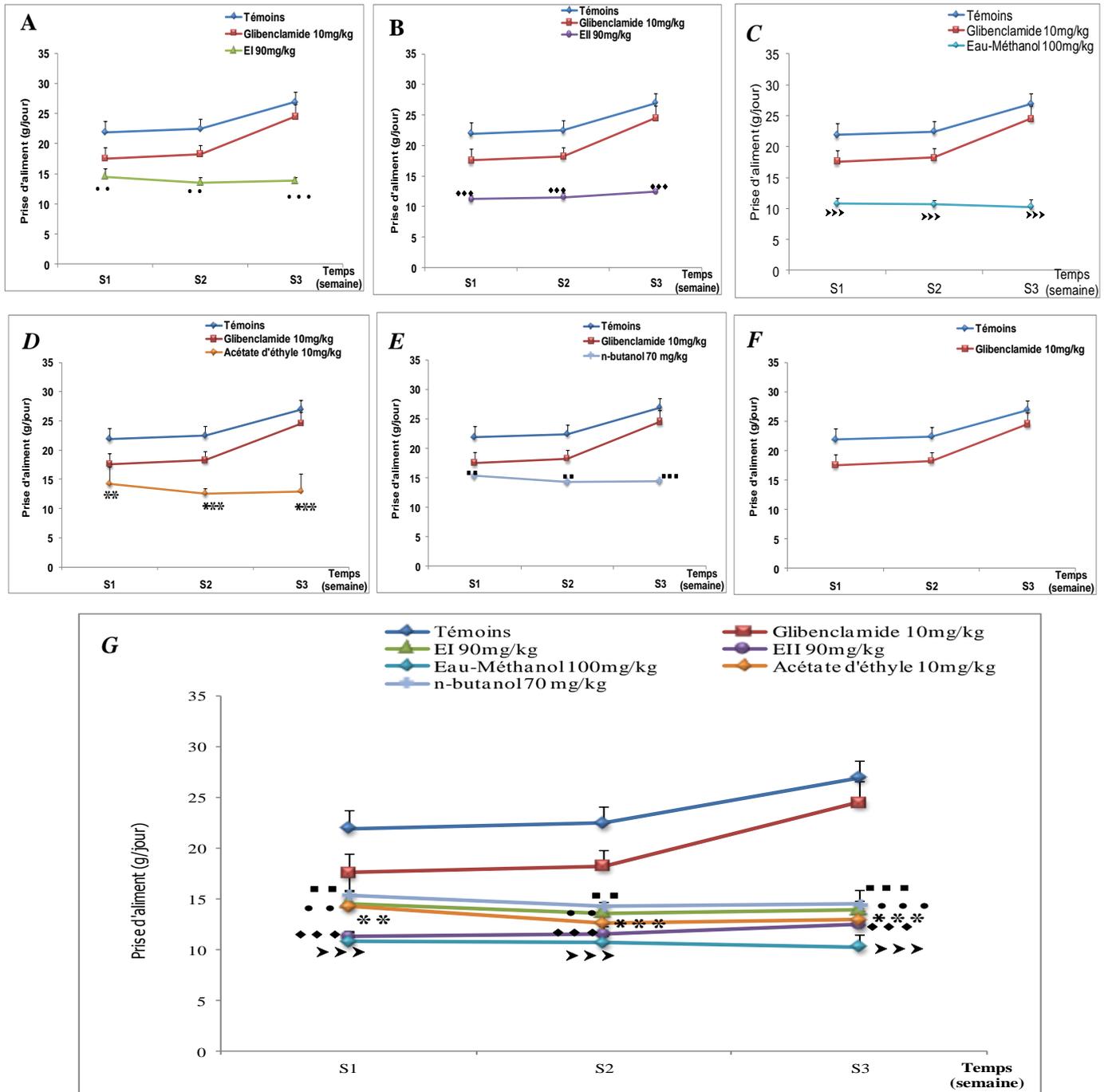


**Figure 31:** Consommation d'aliment chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de la prise d'aliment chez les rats non diabétiques par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de la prise d'aliment chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de la prise d'aliment chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol 100mg/kg
- D : Variations de la prise d'aliment chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle 10mg/kg
- E : Variations de la prise d'aliment chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol 70mg/kg
- F : Variations de la prise d'aliment chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

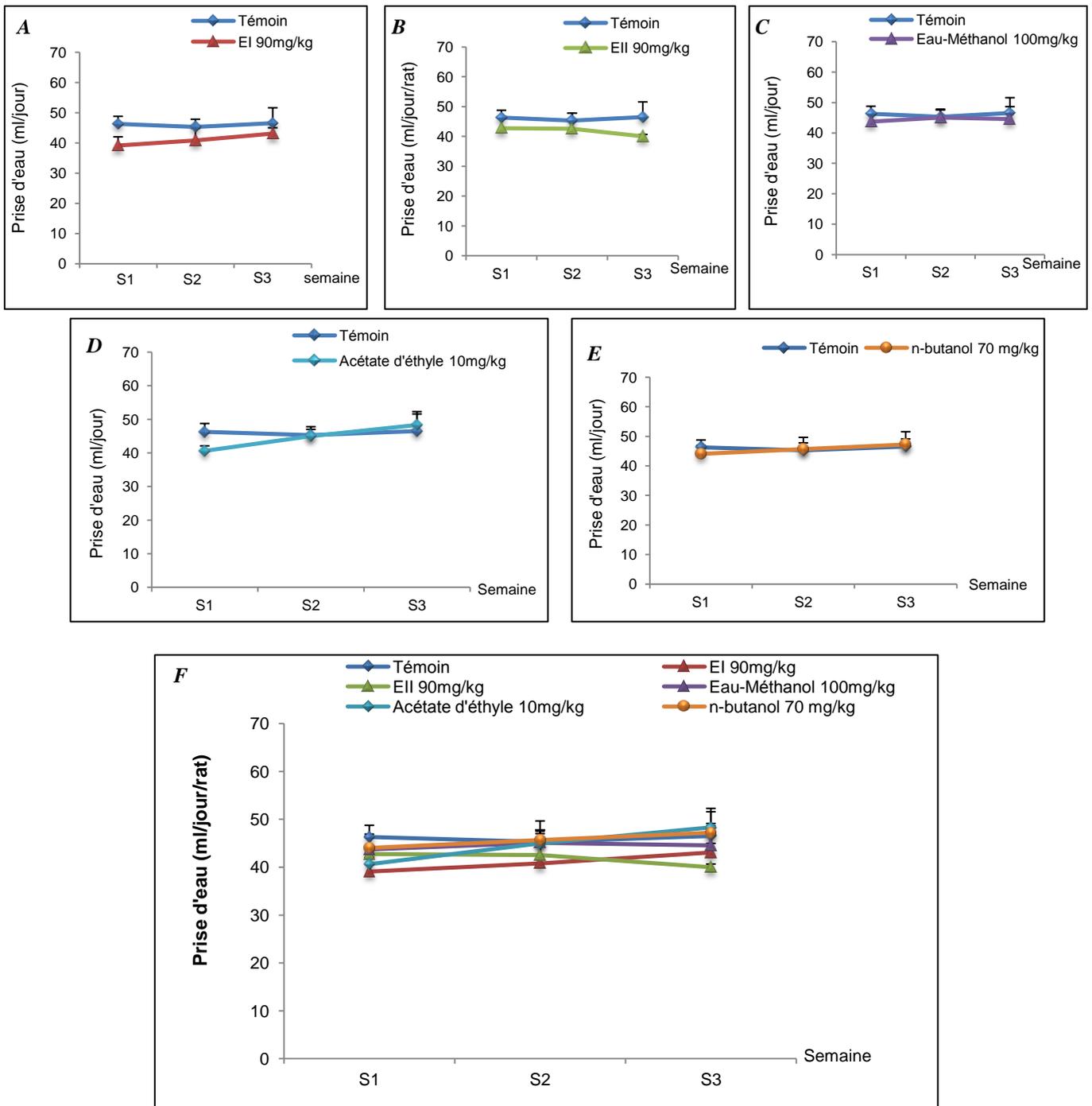


**Figure 32:** Consommation d'aliment chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de la prise d'aliment chez les rats diabétiques par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de la prise d'aliment chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de la prise d'aliment chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol 100mg/kg
- D : Variations de la prise d'aliment chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle 10mg/kg
- E : Variations de la prise d'aliment chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol 70mg/kg
- F : Variations de la prise d'aliment chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg
- G : Variations de la prise d'aliment chez les différents groupes de rats diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

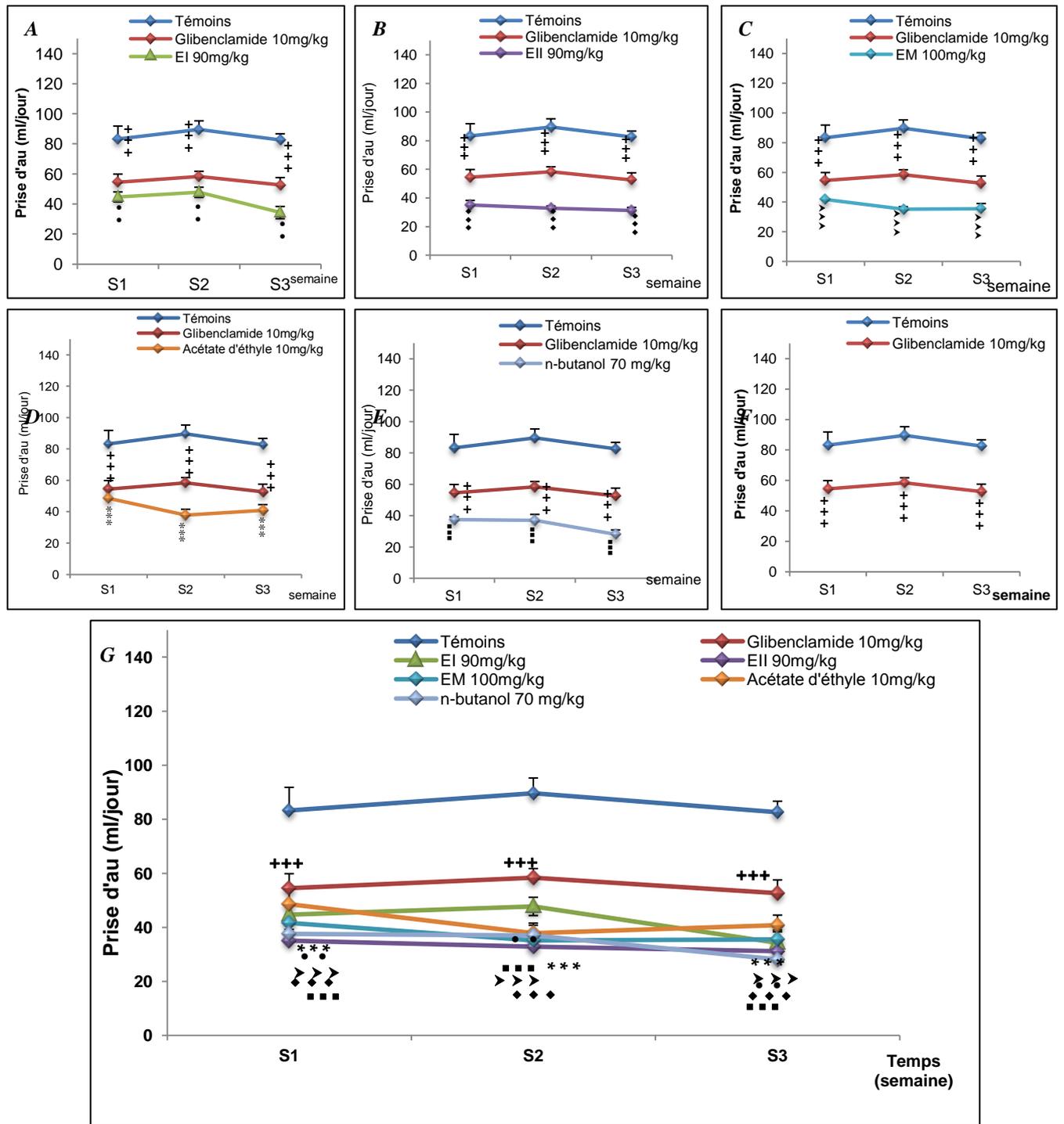


**Figure 33:** Consommation d'eau chez les rats non diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A :** Variations de la prise d'eau chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B :** Variations de la prise d'eau chez les rats non diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C :** Variations de la prise d'eau chez les rats non diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol 100mg/kg
- D :** Variations de la prise d'eau chez les rats non diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle 10mg/kg
- E :** Variations de la prise d'eau chez les rats non diabétiques traités par l'extrait n-butanol 70mg/kg
- F :** Variations de la prise d'eau chez les différents groupes de rats non diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ◆ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$



**Figure 34:** Consommation d'eau chez les rats diabétiques traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

- A : Variations de la prise d'eau chez les rats diabétiques traités par l'extrait EI 90mg/kg p.c.
- B : Variations de la prise d'eau chez les rats diabétiques traités par l'extrait EII 90mg/kg p.c.
- C : Variations de la prise d'eau chez les rats diabétiques traités par l'extrait Eau-méthanol 100mg/kg
- D : Variations de la prise d'eau chez les rats diabétiques traités par l'extrait acétate d'éthyle 10mg/kg
- E : Variations de la prise d'eau chez les rats diabétiques traités par l'extrait n-butanol 70mg/kg
- F : Variations de la prise d'eau chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide 10mg/kg
- G : Variations de la prise d'eau chez les différents groupes de rats diabétiques expérimentaux et témoins

- Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)
- ♦ Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)
- ▲ Comparaison entre rats traités par 100 mg/kg p.c.d'extrait eau-méthanol et les rats témoins (sérum physiologique)
- \* Comparaison entre rats traités par 70mg/kg d'extrait acétate d'éthyle et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

#### 2.4.7. Analyse immunohistochimique du pancréas de rats traités par les extraits de graines de *Citrullus colocynthis*

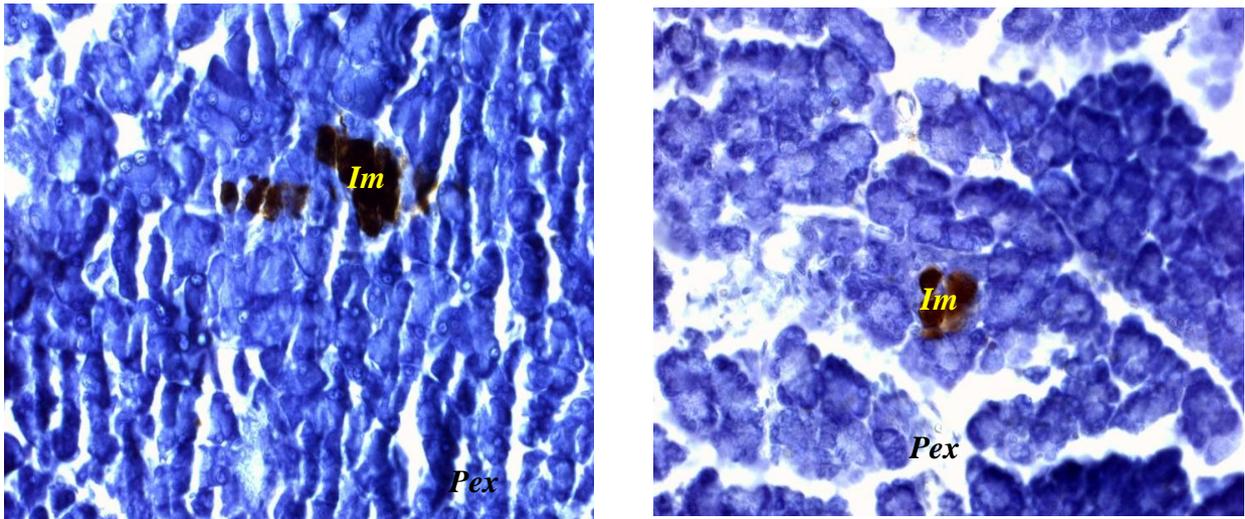
L'effet à long terme de l'administration I. P. quotidienne des extraits de graines de la coloquinte pendant trois semaines chez les rats diabétiques a été évalué sur l'histologie du pancréas, principalement sur les îlots pancréatiques. Les résultats de l'observation au microscope optique des coupes de pancréas de rats témoin et expérimentaux par immunomarquage de l'insuline sont représentés dans les *figures 35, 36, 37, 38, 39, 40 et 41*.

La coloration brune plus ou moins dense observée au niveau du tissu pancréatique est résultante de l'immunoréactivité de l'insuline avec les anticorps anti-insuline marqués à la peroxydase. La taille des îlots peut être également estimée.

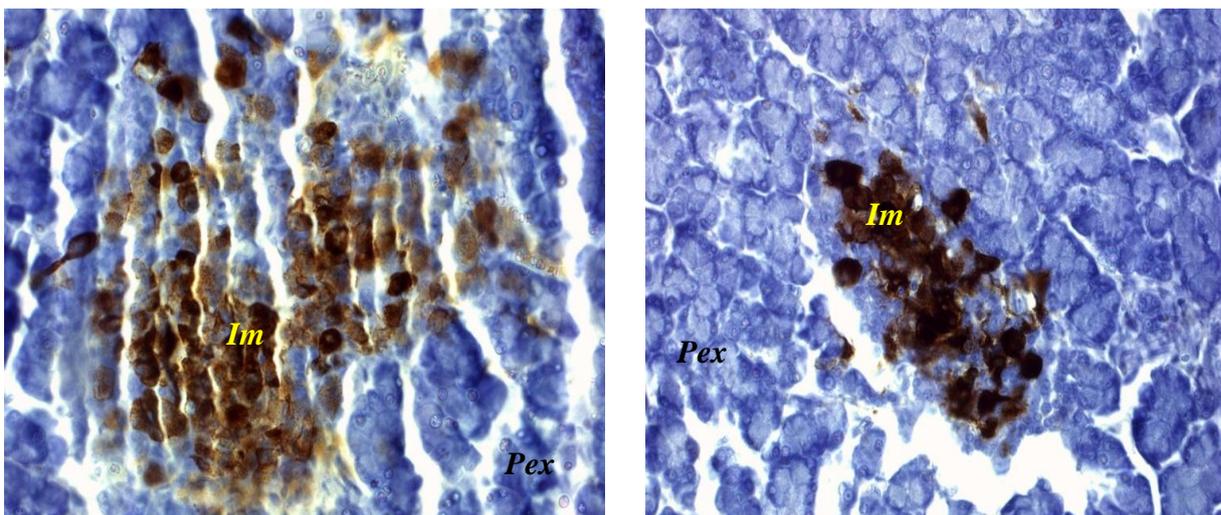
Chez les rats témoins rendus diabétiques par la streptozotocine (65 mg/kg), *figure 35* on remarque que la taille des îlots est nettement inférieure par rapport aux autres lots de rats. De même chez les rats diabétiques traités par le glibenclamide (*figure 41*) la taille des îlots est très faible par rapport aux rats expérimentaux, mais faiblement importante par rapport aux rats témoins (sérum physiologique). Chez les rats expérimentaux on remarque une différence importante concernant la taille des îlots pancréatiques comparativement aux rats témoins (sérum physiologique) et témoins contrôlés (glibenclamide).

Dans les *figures 36 et 38*, on observe la taille la plus intéressante des îlots chez les rats diabétiques traités par les extraits EI et EM respectivement. La taille des îlots est assez importante chez les rats traités par les extraits EAc et En-B (*figure 39 et 40*) mais qui reste faible par rapport aux extraits EI et EM. Tandis que chez les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux EII on remarque que la taille de ces îlots est comparable à celle des rats témoins diabétiques qui reçoivent le glibenclamide. En fonction de ces résultats on constate que l'administration I.P. à long terme pendant trois semaines a provoqué une augmentation de la taille des îlots pancréatiques, essentiellement chez les rats traités par les extraits EI, EM et EAc respectivement.

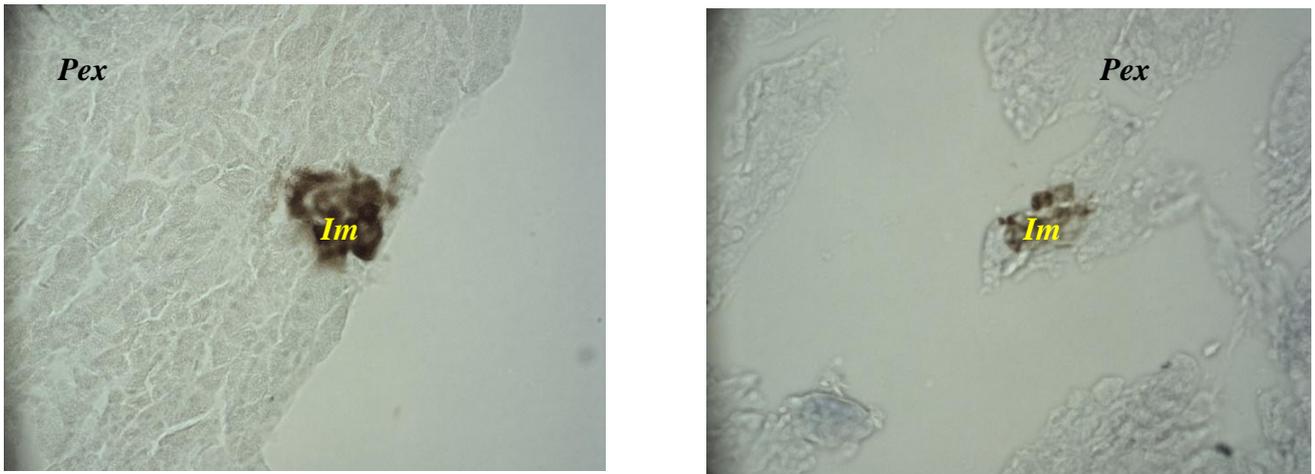
A la lumière de ces résultats, la taille des îlots, la surface de l'insuline marquée dans le pancréas des rats traités par les extraits de la coloquinte nous oriente vers l'hypothèse de la capacité de ces extraits, en particulier l'extrait EII et EM de la régénération des cellules  $\beta$  pancréatiques.



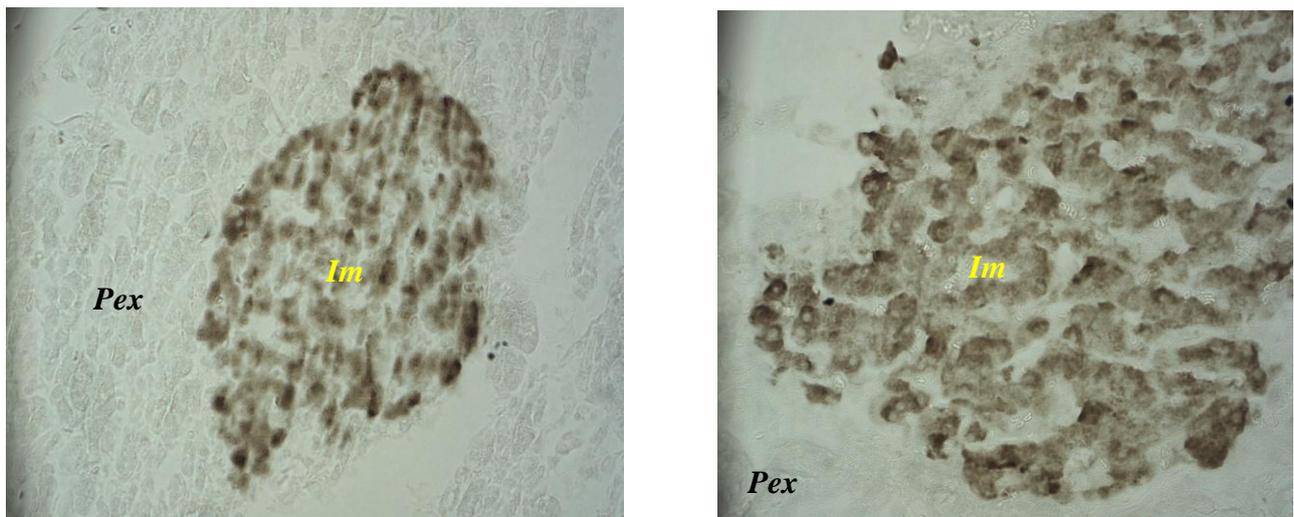
**Figure 35:** Marquage de l'insuline dans le pancréas des rats diabétiques témoins traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par le sérum physiologique (gros.x400). *Pex* : pancréas exocrine. *Im* : insuline marquée.



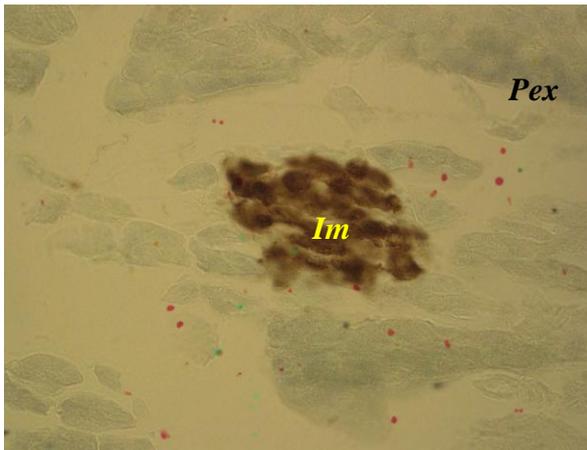
**Figure 36 :** Marquage de l'insuline dans le pancréas des rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EI (90mg/kg p.c.) (gros.x400). *Pex* : pancréas exocrine. *Im* : insuline marquée.



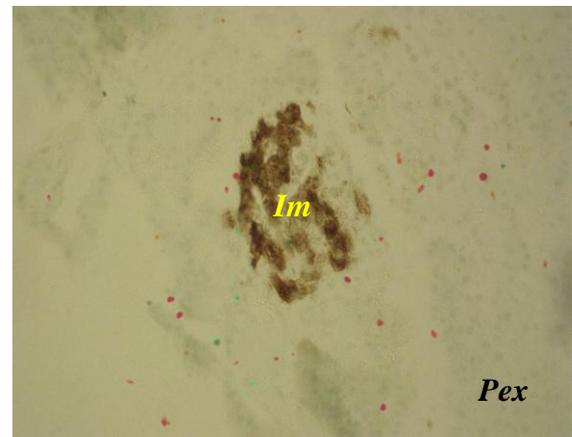
**Figure 37:** Marquage de l'insuline dans le pancréas des rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EII (90mg/kg p.c.) (gros.x400). *Pex* : pancréas exocrine. *Im* : insuline marquée.



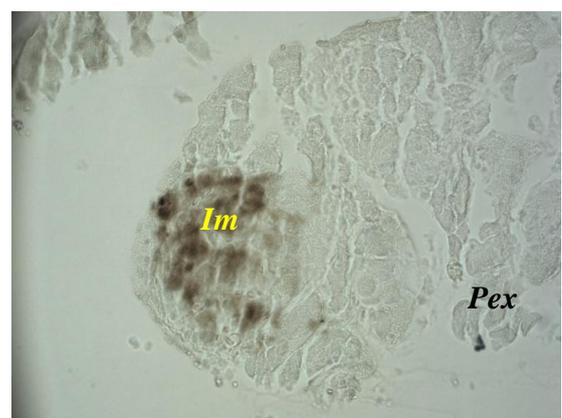
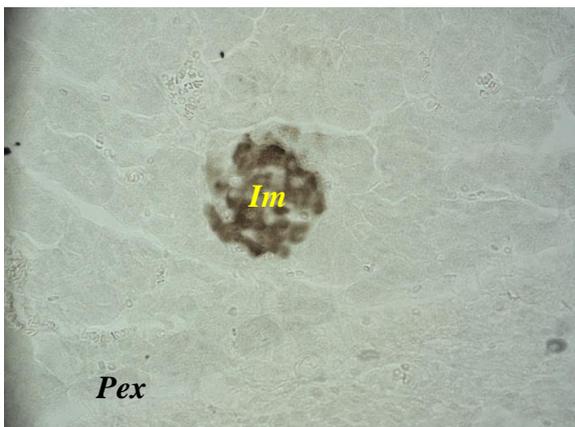
**Figure 38:** Marquage de l'insuline dans le pancréas des rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EM (100mg/kg p.c.) (gros.x400). *Pex* : pancréas exocrine. *Im* : insuline marquée.



**Figure 39 :** Marquage de l'insuline dans le pancréas des rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par l'extrait EAC (10mg/kg p.c.) (gros.x400). *Pex* : pancréas exocrine. *Im* : insuline marquée.



**Figure 40 :** Marquage de l'insuline dans le pancréas des rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par le l'extrait En-B (70mg/kg p.c.) (gros.x400). *Pex* : panréas exocrine. *Im* : insuline marquée.

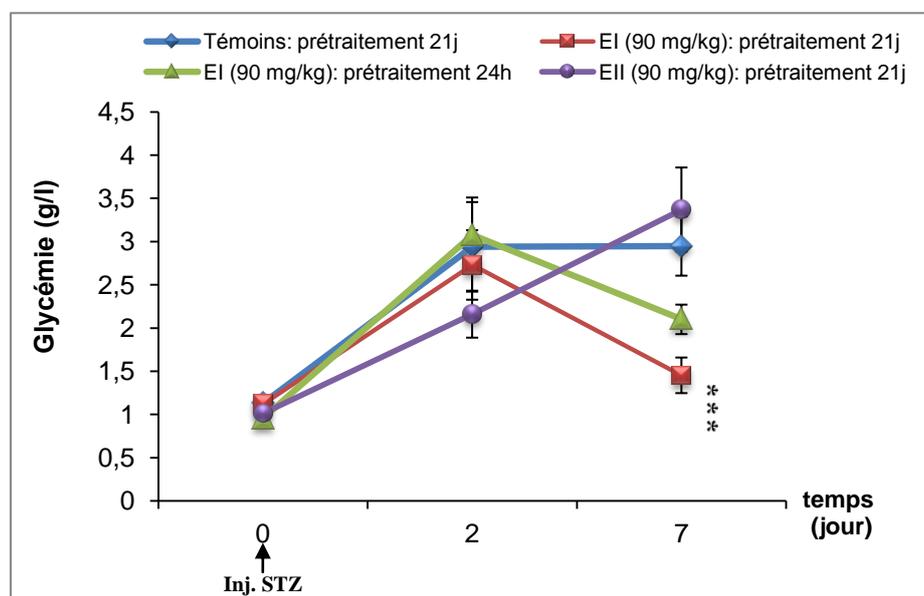


**Figure 41 :** Marquage de l'insuline dans le pancréas des rats diabétiques traités quotidiennement (I.P.) pendant trois semaines par le glibenclamide (10mg/kg p.c.) (gros.x400). *Pex* : pancréas exocrine. *Im* : insuline marquée.

## 2.5. Evaluation de l'effet préventif des extraits bruts aqueux (EI, EII) de graines de *Citrullus colocynthis* vis-à-vis la toxicité de la streptozotocine

L'effet du prétraitement des rats non diabétiques par les extraits aqueux des graines de la coloquinte (EI et EII, 90mg/kg), administrés par voie intrapéritonéale 24 heure ou 21 jours (trois semaines) avant l'injection de la streptozotocine (65 mg/kg), est représenté dans **la figure 42**. Dans cette figure on remarque deux jours après l'injection de la streptozotocine une augmentation de la glycémie chez tout les groupes de rats, témoins et expérimentaux, passant environ de 1 à 3g/l. Par contre au 7<sup>ème</sup> jour, on assiste à une diminution, non significative de la glycémie ( $p \leq 0.07$ ) chez les rats recevant l'extrait aqueux EI (90 mg/kg) 24 heures avant l'injection de la streptozotocine. Chez les rats prétraités quotidiennement pendant 21 jours la diminution est hautement significative ( $p \leq 0,004$ ). Tandis que chez les rats traités par l'extrait EII (90 mg/kg) on remarque une augmentation progressive de la glycémie au 2<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour après injection de la streptozotocin.

De ce fait, on constat que le prétraitement à long terme (21 jours) des rats par l'extrait aqueux EI diminue significativement l'hyperglycémie par rapport au court prétraitement (24 heure), ce qui reflète un effet protecteur de l'extrait de la coloquinte à long terme et non pas immédiat vis-à-vis de la cytotoxicité de la streptozotocine.



**Figure 42:** Variations de la glycémie chez les rats prétraités par les extraits aqueux EI et EII des graines de la coloquinte et injectés par la streptozotocine (65 mg/kg)

\* Comparaison entre rats traités par 90 mg/kg p.c.d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

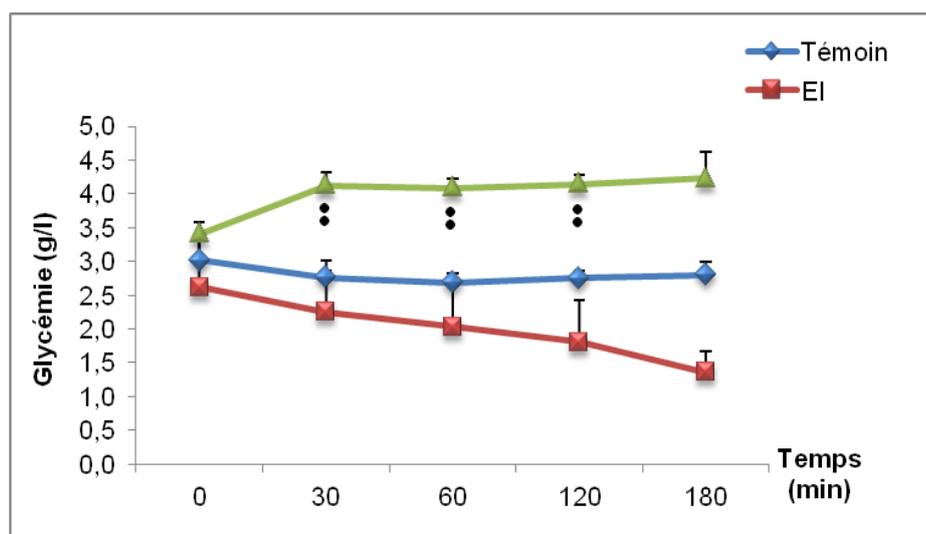
## 2.6. Effet de l'usage externe des extraits bruts aqueux (EI, EII) de graines de *Citrullus colocynthis* sur la glycémie

L'effet de l'usage externe des extraits aqueux de graines de la coloquinte chez les rats diabétiques et non diabétiques, est représenté dans les *figures 43 et 44* respectivement.

Les rats diabétiques mis en contact cutané avec l'extrait aqueux EI (*figure 43*) ont présenté une diminution non significative ( $p \leq 0,50$ ) de la glycémie durant l'expérimentation. En revanche, chez les rats exposés à l'extrait EII, on remarque paradoxalement une augmentation significative ( $p \leq 0,03$ ) de la glycémie par rapport aux rats témoins et expérimentaux.

Dans la *figure 44* on remarque, chez les rats non diabétiques, une diminution significative de la glycémie chez les expérimentaux par rapport aux témoins. Elle est hautement significative ( $p \leq 0,0003$ ) chez les rats exposés à l'extrait EI à 120 et 180 min respectivement. Il en est de même pour l'extrait EII qui diminue significativement la glycémie ( $p \leq 0,03$ ).

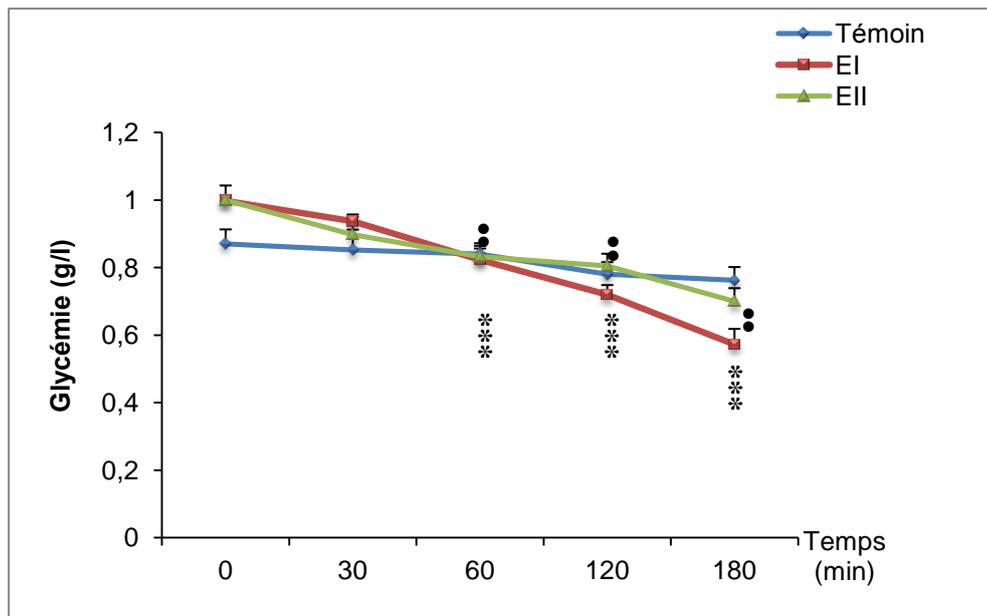
Cette observation laisse supposer qu'il existe des substances actives dans l'extrait EI, et à un degré moindre dans l'extrait EII, susceptibles de diffuser à travers la peau des rats et agir sur la glycémie.



**Figure 43:** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques au cours de l'usage externe des extraits aqueux de graines de la coloquinte.

- Comparaison entre rats traités par l'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0,05$  ; \*\* :  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$



**Figure 44:** Variations de la glycémie chez les rats non diabétiques au cours de l'usage externe des extraits aqueux de graines de la coloquinte.

\* Comparaison entre rats traités par l'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)

• Comparaison entre rats traités par l'extrait aqueux EII et les rats témoins (sérum physiologique)

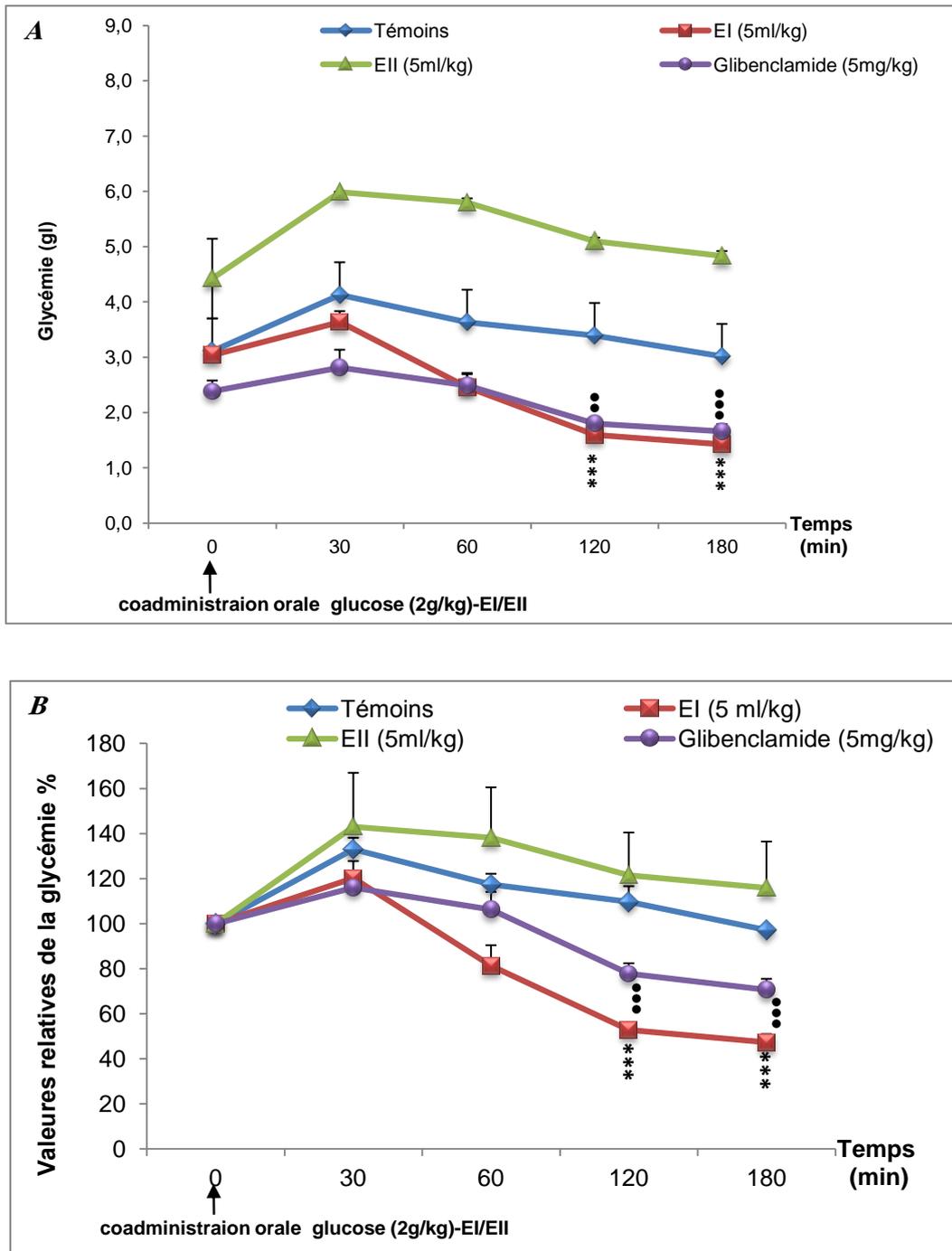
\* :  $p \leq 0,05$  ; \*\* :  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$

## 2.7. Effet antihyperglycémiant de la coadministration orale de glucose et l'extrait aqueux (EI) de graines de *Citrullus colocynthis*

L'effet de la coadministration orale des extraits aqueux des graine de la coloquinte EI ou EII (5ml/kg) et de glucose (2g/kg) chez les rats diabétiques, est représenté dans **la figure 45 (A, B)**. On remarque chez les rats recevant le mélange EI-glucose une diminution progressive de la glycémie, qui devient hautement significative ( $p \leq 0,0001$ ) à 120 et 180 min, passant de 3 à 1,5g/l. soit une réduction de 50% environ comparable à l'effet du glibenclamide.

En revanche, chez les rats traités par EII-glucose, l'hyperglycémie augmente d'avantage (surcharge glycémique). Leur profile d'évolution de la glycémie durant les 180min est comparable à celui des rats témoins (sérum physiologique-glucose).

Ces résultats nous montrent que l'extrait EI, extrait aqueux des graines entières de la coloquinte a un effet antihyperglycémiant chez les rats diabétiques lorsqu'il est administré simultanément avec du glucose. Par contre cet effet n'est pas observé dans le cas de l'extrait EII issu des graines broyées de la coloquinte.



**Figure 45:** Variations de la glycémie chez les rats diabétiques traités par les extraits aqueux EI et EI de graines de la coloquinte suite à une coadministration orale extrait-glucose. **A :** glycémie en valeurs absolue (g/l). **B :** glycémie en valeurs relative basale par rapport à la glycémie (%).

\* Comparaison entre rats traités par 5 ml/kg d'extrait aqueux EI et les rats témoins (sérum physiologique)

• Comparaison entre rats traités par 5 mg/kg p.c.de glibenclamide et les rats témoins (sérum physiologique)

\* :  $p \leq 0.05$  ; \*\* :  $p \leq 0.01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$

***Chap. II : Etude in vivo*** de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte

*Discussion*

Plusieurs travaux scientifiques publiés sur la coloquinte ont démontré les effets bénéfiques de cette plante, antidiabétique, antifongique, antimicrobien, anti-inflammatoire et anticancéreux. Cependant au cours de notre étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet antidiabétique de la coloquinte *in vivo* et *in vitro*. Dans ce but, nous avons testé plusieurs extraits aqueux et organiques des graines (extrait aqueux non dégraissé, aqueux dégraissé, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol) administrés par voie I.P. chez des rats non diabétiques et des rats rendus diabétiques par la streptozotocine, et qui ont été suivis à court et à long terme. Les principaux résultats obtenus, après détermination de la DL<sub>50</sub> de chaque extrait, sont prometteurs, chez les rats non diabétiques aucun effet hypoglycémiant n'a été observé. Par contre, les extraits EI, EII et En-B présentent un effet antihyperglycémiant significatif à court terme chez les rats diabétiques. L'effet à long terme, devient significatif à partir du 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour à l'exception de l'extrait EII qui ne présente aucune diminution durant l'expérimentation. D'autres résultats ont mis en évidence l'effet cytoprotecteur de la coloquinte vis-à-vis de la toxicité de la streptozotocine chez les rats diabétiques prétraités par les extraits aqueux, avec également l'observation d'un effet hypoglycémiant chez les rats non diabétiques au cours de l'usage externe de l'extrait aqueux EI.

Au cours de notre étude nous avons utilisé des rats rendus diabétiques par injection I.P. de la streptozotocine à une dose de 65mg/kg p.c. Selon la bibliographie la streptozotocine est une des molécules diabéto-gènes les plus utilisées pour provoquer un diabète expérimental chez les animaux de laboratoire (**Etuk 2010; Sharma et al. 2010**). C'est un dérivé nitrosé et analogue cytotoxique du glucose, responsable d'une destruction sélective des cellules  $\beta$ -pancréatiques suite à un transport intracellulaire via les Glut-2 (**Szkudelski 2001; Daisy Mythili et al. 2004**). Au niveau de ces cellules la STZ est rapidement décomposée en glucose et en méthylénitrosé responsable d'une hyperproduction de monoxyde d'azote (NO), ce dernier est l'élément principal de la cytotoxicité de la STZ en provoquant une alkylation d'ADN avec activation de la poly (ADP-ribose) synthétase et l'épuisement en NAD<sup>+</sup>, ce qui conduit à une dégénérescence des cellules  $\beta$  et un état d'hyperglycémie (**Arulmozhi et al. 2004; Lenzen . 2008**). La toxicité de la streptozotocine peut également toucher d'autres organes comme le rein, le cerveau et particulièrement le foie (**Mir Sajad et al. 2008; Zafar et al. 2009**). A l'échelle moléculaire la STZ est responsable d'une diminution de la fluidité membranaire des cellules hépatiques en modifiant l'activité Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ainsi l'augmentation de la phosphorylation des Glut-4 dans les adipocytes ce qui diminue leur captation du

glucose (**Sennoune et al. 2000; Begum et al. 1992**). Dans le laboratoire la manipulation de la STZ est limitée à certaines conditions physico-chimiques, comme la solubilité ainsi la dose et la voie d'administration, il est préférable de la solubiliser dans le tampon citrate (0,1M; pH 7,4) quelques minutes avant son administration est ceci afin de conserver son efficacité (**Povoski et al. 1993**). La voie d'administration couramment utilisée est intrapéritonéale ou intraveineuse à forte ou multiples faibles doses (**De la Garza-Rodea et al. 2010**), 30 à 40mg/kg p.c (I.P.) de STZ provoque une hyperglycémie modérée et qui dure environ trois semaines (**Akbarzadeh et al. 2007**), tandis que l'injection de 50 à 75mg/kg p.c. chez les rats provoque une hyperglycémie franche plus stable et plus permanente (**Islas-Andrade et al. 2000; Papaccio et al. 2000;** ). Un diabète non insulino-dépendant est généralement provoqué chez le rat par injection unique de 60mg/kg p.c. de STZ et 120mg/kg p.c. de nicotinamide (**Etuk 2010**). Les fortes doses de streptozotocine un volume urinaire important ainsi une prise d'eau et d'aliment (**Akbarzadeh et al. 2007**).

Parallèlement à l'induction du diabète expérimental, nous avons déterminé la dose létale moyenne (DL<sub>50</sub>) de l'administration I.P. des différents extraits de graines de la coloquinte chez les rats femelles (extraits EI, EII, EM, EAc et En-B). En toxicologie l'application de La DL<sub>50</sub> et DL<sub>100</sub> comme méthode d'étude de la toxicité aigüe a été développée dans les premières années du 20<sup>ème</sup> siècle lorsque de nombreux agents médicaux, extraits de matières d'origine biologique étaient disponibles comme mélanges souvent toxiques. Ce test qui nécessite un grand nombre de rats, chez les quels on administre des doses croissantes du produit jusqu'à la mortalité (50 ou 100%) des animaux ne fournit pas des informations précises concernant les effets mécaniques ainsi les organes cibles, mai il permet de déterminer la dose toxique qui pourrait théoriquement aider à évaluer la marge thérapeutique. Cette dose est généralement diluée au un-cinquième jusqu'au un dixième de la DL<sub>50</sub> pour éviter le risque de toxicité (**Fleurentin et al. 1990; Frank A. Barile 2008**). Selon **Elgerwi et al. (2013)** l'administration orale des doses diluées au un quart de la dose létale des extraits de pulpe de la coloquinte est intensivement toxique.

Les résultats obtenus concernant les doses létales des extraits de graines de la coloquinte (DL<sub>50</sub> et DL<sub>100</sub>) EI, EII, EM, EAc et En-B sont comme suit: 500, 900, 450, 350 et 500 mg/kg p.c. comme DL<sub>50</sub> et 800, 1000, 500, 400 et 950 mg/kg p.c. comme DL<sub>100</sub> respectivement. Peu de résultats sont publiés sur la dose létale des extraits de la coloquinte,

les travaux de **Benmehi et al. (2008)** ont déterminé une faible dose létale moyenne de l'extrait aqueux de graines de la coloquinte (I.P.) 12,5 g/kg de poids corporel. Tandis que chez le rat la DL<sub>100</sub> et DL<sub>50</sub> de l'extrait de saponosides de gaines est de 200-250mg/kg p.c. respectivement **Benmehi et al. (2011)**. De même l'étude de **Khoshvaghti et al. (2011)** a déterminé chez les chiens la dose létale médiane de l'extrait de la poudre des graines de la coloquinte qui est de 100mg/kg p.c. administrée oralement.

En fonction de ces résultats de DL<sub>50</sub> on constate que les extraits de graines de la coloquinte sont moins toxiques. De plus le sexe, l'âge des animaux ainsi que de la voie d'administration peuvent modifier les valeurs de la DL<sub>50</sub>, car l'administration orale de l'extrait aqueux de la pulpe provoque la mort de 50% de la population des souris à une dose de 4,14g/kg p.c., de même la DL<sub>50</sub> des extraits de glycosides de pulpe récoltés dans trois régions différents en Lybie, varie de 100 à 162,4mg/kg p.c. (**Daradka et al. 2007; Elgerwi et al. 2013**). Les valeurs les plus petites de DL<sub>50</sub>, correspondent aux substances les plus toxiques (**Fleurentin et al. 1990**). Sur cette base nous avons choisi pour chaque extrait la dose a injecté aux différents lots de rats, EI (90mg/kg p.c), EII (90mg/kg p.c), EM (100mg/kg p.c.), EAc (10mg/kg p.c) et En-B (70mg/kg p.c).

La toxicité de la coloquinte peut être également confirmée par certains paramètres biochimiques sanguins, comme les transaminases, l'urémie et la créatinémie. Les résultats de l'urémie, ont révélé que l'administration I.P. quotidiennes des extraits pendant trois semaines n'a provoquée aucun changement significatif de ce paramètre chez les différents groupes de rats: témoins, témoins contrôle et expérimentaux. De même, le taux de la créatinémie chez les rats diabétiques et non diabétiques ne présente aucune variation significative durant l'expérimentation pour l'ensemble des extraits à l'exception de l'extrait EI et EAc qui ont provoqué au 21<sup>ème</sup> jour une augmentation significative de taux de ce paramètre ( $p \leq 0,01$ ). Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Al Ghaithi et al. (2004)**, qui ont indiqué que l'administration orale de l'extrait aqueux de graines de la coloquinte (0,5; 1 et 1,5ml/kg p.c.) ne provoque aucune perturbation du taux de l'urée et de la créatinine chez les rats diabétiques. Selon l'auteur les doses administrées ne présentent pas une toxicité rénale. Par contre les travaux de **Wasfi. (1994)** ont démontré que la dose 800mg/kg p.c. de l'extrait éthanolique de graines de la coloquinte provoque une augmentation significative du taux de créatinine et de l'urée contrairement aux faibles doses 500 et 200mg/kg p.c qui ne sont pas toxique. Les extraits de racines de la coloquinte: aqueux,

éthanolique et chloroformique, administrés oralement pendant 7 jours (2g/kg p.c.) ont assuré une augmentation comparable aux rats témoins du taux de créatinémie et l'urémie (**Agarwal et al. 2012**). Chez les rats non diabétiques l'administration quotidienne de l'extrait aqueux du fruit (50 et 100mg/kg) pendant 28 jours ne présente aucun changement significatif de ces paramètres (**Atole et al. 2009**). Sur cette base on suggère que les extraits de la coloquinte ne présentent aucun effet toxique apparent au niveau rénal.

Les transaminases hépatiques ainsi LDH sont des enzymes présents dans nombreux tissus en particulier le foie, le cœur et le rein. L'augmentation du taux de ces enzymes dans la circulation sanguine est un signe d'altération de ces tissus. Dans le but de vérifier la toxicité des extraits de graines de la coloquinte administrés chez des rats diabétiques et non diabétiques, nous avons mesuré l'activité des transaminases: TGO, TGP et phosphatase alcaline chez les rats traités par l'extrait EI (90mg/kg p.c), EAc (10mg/kg p.c) et glibenclamide (10mg/kg p.c). Les principaux résultats obtenus ont montré que, l'administration I. P. pendant trois semaines de l'extrait EAc et le glibenclamide, chez les rats diabétiques et non diabétiques, ne provoque aucune variation significative des transaminases à l'exception de l'extrait EI qui a diminué significativement ( $p \leq 0,05$ ) leur taux chez les rats non diabétiques. Ces résultats sont en concordance avec les résultats obtenus par **Agarwal et al. (2012)** qui ont montré une stabilité du taux de TGO, TGP et phosphatase alcaline chez les rats traités par les extraits de racines de la coloquinte (2g/kg p.c.). De même, aucune variation significative du taux de TGP n'a été observée chez les rats traités par l'extrait éthanolique (500mg/kg p.c) de graines de la coloquinte (**Wasfi. 1994**), ainsi que chez les rats non diabétiques injecté par l'extrait aqueux du fruit 50 et 100mg/kg p.c (**Atole et al. 2009**). L'administration orale de l'extrait aqueux de graines (0,25; 0,5 et 1ml/kg p.c.) diminue significativement le taux plasmatique de certains ions et paramètres biochimiques perturbés par l'injection intrapéritonéale de la streptozotocine, comme LDH, TGO, TGP,  $K^+$  et  $Na^+$  et sans provoqué des variations significatives chez les rats non diabétiques (**Al Ghaithi et al. 2004**). Par contre, 300mg/kg p.c de l'extrait hydrométhanolique de la pulpe augmentent significativement le taux de ces paramètres au niveau sérique, hépatique et rénal par rapport aux rats diabétiques témoins (**Dallak et al. 2009a**). Selon l'étude d'**Iqbal Dar et al. (2011)**, l'administration orale de l'extrait aqueux de la coloquinte (50, 100 et 200mg/kg p.c) assure un effet hépatoprotecteur contre la toxicité du  $CCl_4$  en diminuant significativement le taux des transaminases. Selon ces résultats, et selon la bibliographie on constate, que les extraits de graines de la coloquinte aux concentrations testées au cours de notre étude ne sont pas

toxiques, ceci est confirmé par l'étude **Shafaei et al. (2012)** réalisée chez des lapins recevant oralement l'extrait hydrométhanolique pendant 4 semaines à différentes doses 100 et 200mg/kg, et qui a montré que l'extrait de la pulpe est plus toxique sur le foie, le rein et l'intestin par rapport aux extraits de graines qui sont plus efficaces et non toxiques, la toxicité de la pulpe est liée à sa richesse en cucurbitacines. De même les fruits et les graines immatures sont très toxiques (**Rahimi et al. 2012**). Les travaux d'**Al Qarawi et al. (2003)** ont confirmé la toxicité du fruit de la coloquinte, chez les rats recevant un régime à base de 10% de la poudre du fruit pendant 6 semaines, ces animaux ont présenté une augmentation significative du taux de transaminases ainsi que l'urémie.

Après l'étude de la toxicité des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* et la détermination de la DL<sub>50</sub>, nous avons procédé à l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'administration I.P. des extraits de la coloquinte chez les rats diabétiques et normaux-glycémiques, les rats témoins sont traités par le sérum physiologique ou le glibenclamide (témoin positif). Ces animaux témoins et expérimentaux, ont été suivis à court et à long terme, trois heures (180min) et trois semaines (21 jours) respectivement. Les principaux résultats obtenus ont révélé un effet significatif des extraits EI (90mg/kg), EII (90mg/kg) et En-B (70mg/kg) à court terme à 60, 120 et 180min. en revanche, à long terme l'ensemble des extraits à l'exception de l'extrait EII, diminuent significativement l'hyperglycémie des rats diabétiques au 14<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> jour. Selon ces résultats on a constaté que l'extrait aqueux EI ainsi que En-B EAc présentent un effet à long terme. Cet effet est principalement lié à la composition en phytoconstituants de chaque extrait. Les résultats des tests phytochimiques (*chapitre I*) montrent que l'extrait En-B est riche en terpénoïdes mais pauvre en polyphénols, les extraits EM et EAc sont riches en polyphénols (tannins et flavonoïdes) et pauvres en terpénoïdes, tandis que l'extrait EI regroupe les deux familles terpénoïdes et polyphénols. En fonction des propriétés chimiques de ces molécules: solubilité, structure chimique et interaction moléculaire, on suggère que les terpénoïdes qui présentent un effet rapide à court et à long terme sont rapidement et facilement métabolisés après injection, tandis que l'effet tardif de polyphénols, tannins et flavonoïdes, peut s'expliquer par un métabolisme et une distribution tissulaire lents.

Selon la bibliographie nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux qui ont mis en valeur l'activité antidiabétique des extraits aqueux et organiques de différents organes de la coloquinte. **Abdelhassan et al. (2000)** ont démontré que l'extrait

aqueux de l'épicarpe du fruit, administré par voie orale (300mg/kg), diminue significativement l'hyperglycémie à court terme (3 et 6 heures) chez les lapins rendus diabétiques par l'alloxane. De même, l'injection I.P. de l'extrait aqueux de graines chez les rats streptozotocine (1,25g/kg) provoque une faible diminution de l'hyperglycémie à court terme (4 heures) et une diminution significative à long terme (47 jours de traitement) (**Benmehdi et al., 2008**). Les études d'**Agarwal et al. (2012)** ont révélé que l'extrait aqueux des racines de *Citrullus colocynthis* (2g/kg) provoque une réduction significative de l'hyperglycémie (-58,70%) par rapport à l'extrait chloroformique (-34,72%) et éthanolique (-36,60%) chez les rats diabétiques (alloxane). Les rats non diabétiques recevant un régime hyper-gras et traités oralement par l'extrait aqueux (25 et 50mg/kg p.c) de graines de la coloquinte pendant 25 semaines, présentent une diminution de l'hyperglycémie consécutive au régime alimentaire et un stockage du glycogène au niveau hépatique par rapport aux rats témoins, selon l'auteur la coloquinte joue un rôle important dans la prévention de la stéatose hépatique ainsi que le diabète de type 2 associé à cette anomalie (**Ezzat Ali Esmail. 2012**)

D'autres études ont souligné l'effet antihyperglycémiant de l'extrait aqueux de la coloquinte en stimulant la sécrétion de l'insuline et en neutralisant l'état de stress oxydatif lié au diabète. Les travaux de **Jeyanthi et al. (2011)** et **Dallak et al. (2009b, 2010)**, ont démontré que l'administration de 300mg/kg p.c. de l'extrait aqueux de graines et de pulpe respectivement diminuent l'hyperglycémie chez les rats diabétiques avec augmentation du taux de l'insulinémie par rapport aux rats témoins accompagnée d'un effet antioxydant en augmentant l'activité des antioxydants sériques et hépatiques (SOD, CAT, GSH), selon l'auteur la coloquinte exerce son effet antihyperglycémiant suite à une stimulation de la sécrétion de l'insuline et une activation de son récepteur. Également l'administration orale de mélange d'extraits aqueux de graines de *Citrullus colocynthis*, *Acacia modesta* et *Polygonum fagopyrum* chez les lapins diabétiques (300mg/kg), assure un effet hypoglycémiant significatif accompagné d'une augmentation de l'insulinémie et une protection des cellules  $\beta$ -pancréatiques contre l'effet cytotoxique de l'alloxane (**Zaman 2011**). De même, chez les chiens diabétiques l'administration orale de l'extrait aqueux de graines de la coloquinte diminue l'hyperglycémie avec augmentation de l'insulinémie mais sans provoquer un changement significative des transaminases et l'urémie (**Khoshvaghti et al. 2011**).

Pour ce qui est de l'effet des extraits organiques de la coloquinte, les résultats de **Dallak et al. (2009a; 2009b)**; et **Al-khateeb et al. (2009)** et **Khalil et al. (2010)** ont révélé que l'administration orale de l'extrait éthanolique (300mg/kg p.c) de la pulpe, chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane, diminue l'hyperglycémie et augmente l'insulinémie à court terme (5 heures de suivi) et chez les rats diabétiques soumis à l'IPTTG, avec une diminution significative du taux de l'hémoglobine glyquée et une régulation de certaines enzymes de la glycolyse et la néoglucogenèse. De même, l'extrait méthanolique de pulpe et de feuilles de la coloquinte diminue d'une manière significative le taux de l'hémoglobine glyquée, l'activité de glucose-6-phosphatase et fructose-1,6-bisphosphatase ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'hexokinase hépatique (**Gurudeeban et al. 2012a; Dallak et al. 2009a**). Egalement, les résultats de **Delazar et al. (2006)** ont montré que 200mg/kg p.c de l'extrait méthanolique du fruit, 6 heures après, diminue significativement l'hyperglycémie chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane. Selon **Jayaraman et al. (2009)**, l'extrait éther de pétrole du fruit administré par voie orale chez les rats diabétiques pendant 14 jours, provoque un effet antihyperglycémiant et antioxydant dose-dépendant (300 et 500mg/kg) en diminuant l'hyperglycémie et le taux de TBARS.

L'effet antidiabétique a été également déterminé pour certaines familles chimiques isolées de la coloquinte, les travaux de **Abdel Hassan et al. (2000)** ont révélé que l'administration orale, chez les lapins diabétiques (alloxane) des extraits, d'alcaloïdes (50mg/kg p.c), de saponosides (50mg/kg p.c) et de glycoside (50mg/kg p.c), isolés de l'épicarpe diminuent significativement l'hyperglycémie à 2 et 3 heures après administration de chaque extrait, dont l'extrait de saponosides semble le plus intéressant. De même, l'extrait brut de saponosides des graines de la coloquinte (20mg/kg) injecté par voie intrapéritonéale chez des rats-streptozotocine diminue significativement l'hyperglycémie au bout de 48 heures, cette diminution est maintenue à long terme plus de 4 semaines de suivi (**Benmehdi et al. 2011**).

En ce qui concerne l'effet du traitement à long terme par les extraits de graines de la coloquinte sur l'hyperglycémie des rats diabétiques et non diabétiques soumis au TTOG, les résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Wasfi et al. (1994)** qui ont montré que l'extrait méthanolique et chloroformique de graines de la coloquinte (500mg/kg p.c.) ne provoquent aucune diminution de l'hyperglycémie chez les rats diabétiques et non diabétiques. Par contre **Agrwal et al. (2012)** ont démontré un effet antihyperglycémiant

des extraits de racines de la coloquinte chez des rats diabétiques soumis au TTOG. Selon **Wasfi et al. (1994)**, les graines de la coloquinte traditionnellement utilisées dans le traitement du diabète sucré, expérimentalement ne présentent aucun effet antihyperglycémiant chez, les rats diabétiques, non diabétiques et les rats soumis au TTOG. De ce fait, on suggère que l'administration intrapéritonéale à long terme des extraits de la coloquinte ne présente aucune diminution de l'hyperglycémie consécutive au TTOG, et par conséquent aucun effet inhibiteur sur l'absorption intestinale du glucose et donc aucune inhibition des transporteurs du glucose. Par ailleurs, **Gurudeeban et al. (2012b)** ont certifié que l'extrait hexanique de la partie aérienne de la coloquinte assure *in vitro* une inhibition non compétitive de l' $\alpha$ -glucosidase à 85% dont le  $V_{\max}$  et  $K_m$  sont de l'ordre de 0,84 et 0,88mM/min<sup>-1</sup> respectivement. L'effet antihyperglycémiant de la coloquinte démontré par certaines études, est probablement lié à la composition chimique des extraits testés. Egalement à un autre facteur peut jouer un rôle dans la diversité de l'effet de cette plante, il s'agit du facteur écologique: saison de la récolte, la maturité du fruit ainsi que les conditions de température et de l'humidité, ces paramètres jouent un rôle important dans la composition chimique de la plante ainsi son effet thérapeutique. En ce qui est de la composition chimique, les polyphénols (tannins et flavonoïdes) et les terpénoïdes, sont connus par leur effet régulateur de l'absorption intestinale des glucides. La myricétine diminue l'absorption intestinal du glucose et du fructose en inhibant les transporteurs Glut2 et Glut5 respectivement (**Kwon et al. 2007**). De même, la catechin, l'épicatéchine et l'épigallocatechine diminuent le co-transport intestinal Na<sup>+</sup>-glucose (SGLut1) (**Hussain et al. 2013b**). Tandis que les terpénoïdes sont de puissants inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase (**Kumar et al. 2013a, Kumar et al. 2013b**).

Au cours de notre étude de l'activité antidiabétique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis*, nous avons testé l'effet de ces extraits sur les variations de certains paramètres biochimiques sanguins du métabolisme lipidique: triglycéridémie, cholestérolémie totale, ainsi que d'autres paramètres de toxicité: urée, créatinine, TGO, TGP et phosphatase alcaline. Les principaux résultats obtenus ont montré que l'administration (I.P.) à long terme des différents extraits de graines de la coloquinte provoque une diminution significative du taux de triglycéridémie et de cholestérolémie chez les rats diabétiques, sans diminuer leurs taux chez les rats non diabétiques. En fonction de ces résultats on constate que la coloquinte assure la correction de certaines perturbations du métabolisme lipidique provoquées par l'injection de la streptozotocine, en provoquant une diminution du taux de l'hyper-triglycéridémie et l'hypercholestérolémie. Les travaux de **Talabani et**

*al.* (2012) ont montré que le  $\beta$ -sistosérol richement présent dans la graine (16,92%) par rapport à l'épicarpe du fruit (6,72%), administré à la dose 80mg/kg p.c. pendant une semaine provoque chez les lapins une diminution significative de cholestérolémie et triglycéridémie. De même, les lapins néo-zélandais, soumis à un régime alimentaire riche en cholestérol et la poudre d'extrait hydrométhanolique (30/70 v/v) de graine et de pulpe de la coloquinte, aux concentrations de 100 et 200mg/kg p.c. révèlent une diminution du taux de quelques paramètres lipidiques: Triglycérides, cholestérol total, HDL-cholestérol et LDL- cholestérol (**Zamani et al. 2007**). De même, la prise orale de la poudre du fruit (100mg/kg) trois fois par jour pendant six semaines (sous forme de capsules), diminue significativement chez des patients hyperlipédimiants, non diabétiques, le taux du cholestérol et des triglycérides (**Rahbar et al. 2010**). Les résultats de **Sebbagh et al. (2009)** ont montré qu'un régime alimentaire riche en huile de graines de la coloquinte provoque chez les rats streptozotocine, par rapport aux rats témoins, une augmentation significative du taux de triglycéridémie, de cholestérolémie totale et des acides gras libres sans modifié le taux du HDL et LDL-cholestérol. Les lapins recevant un régime hypergras (riche en cholestérol) et l'extrait éthanolique de pulpe (1,2 g/kg p.c.) pendant 3 mois présentent une diminution significative du taux de lipides (triglycérides et cholestérol) sériques et hépatique par rapport aux rats témoins (**Daradka et al. 2007**). Par contre les extraits aqueux et organiques (chloroforme et éthanol) administrés oralement pendant 7 jours (2g/kg p.c.) ont assuré une augmentation du taux de triglycéridémie, HDL et LDL-cholestérol ainsi une diminution du taux de cholestérol sérique (**Agarwal et al. 2012**). L'étude clinique, réalisée par **Huseini et al. (2009)** sur 50 patients diabétiques de type 2 traités pendant deux mois, 3 fois par jour de 100 mg/kg p.c de la poudre du fruit sous forme de capsule, a révélé une diminution significative de l'hyperglycémie, l'hémoglobine glyquée et l'hypertriglycéridémie.

Autres paramètres peuvent nous renseigner sur la toxicité du produit à tester chez les rats comme, l'évolution du poids corporel, la prise d'eau et d'aliment ainsi la biométrie et l'histologie de certains organes. Dans cette étude, on s'est intéressée à la mesure du poids corporel, la consommation d'eau et d'aliment chez les rats témoins et expérimentaux, diabétiques et non diabétiques chaque semaine: 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours. A la fin les rats ont été sacrifiés afin d'effectuer la biométrie (mesure du poids) du foie, du pancréas, des reins, du muscle et de la graisse épидidymaire, ainsi l'immunohistochimie du pancréas (marquage de l'insuline). Les principaux résultats ont montré que les rats non diabétiques traités par les

différents extraits de graines de la coloquinte présentent une augmentation progressive de la prise d'eau et d'aliment comparativement aux rats témoins. Tandis que chez les rats diabétiques, ces extraits semblent diminuer la polydipsie et la polyphagie chez les rats en diminuant progressivement et significativement la prise d'eau et d'aliment par rapport aux rats témoins (NaCl 0,9%) et témoins contrôles glibenclamide (10mg/kg). De même chez les rats non diabétiques on observé une évolution de poids corporel chez les témoins et les expérimentaux, alors que les rats diabétiques traités par les extraits EI et En-B présentent une évolution significative du poids corporel par rapport aux rats témoins et les autres groupes de rats. Chez les rats diabétiques la chute de poids corporel et l'augmentation de la consommation et d'eau et d'aliment sont consécutives à l'effet diabétogène de la STZ, responsables d'une chute remarquable du poids corporel, malgré une prise d'eau et d'aliment importante accompagné par forte élimination urinaire (**Akbarzadeh et al. 2007; De la Garza-Rodea et al. 2010**). Les travaux d'**Agarwal et al. (2012)** ont enregistré une chute du poids corporel chez les rats diabétiques traités pendant 14 jours par les extraits aqueux et organiques des racines de la coloquinte (2g/kg p.c.). L'extrait aqueux de pulpe et de feuilles de la coloquinte aux doses 250 et 500mg/kg p.c assure chez les rats diabétiques une augmentation du poids corporel comparative aux rats témoins traités par 0,25mg/kg p.c de glibenclamide (**Gurudeeban et al. 2012**). De ce fait on constate que les extraits de la coloquinte peuvent améliorer certains symptômes du diabète induit par la STZ, car ils s'opposent à la chute du poids corporel avec la diminution de la polyphagie et la polydipsie chez les rats expérimentaux.

En ce qui concerne la biométrie des organes: le pancréas, le foie, les reins, les testicules, le muscle et la graisse épидидymaire. Chez les rats non diabétiques aucune variation significative n'a pas été observée chez l'ensemble des rats à l'exception de l'extrait EM (100mg/kg) qui a augmenté significativement le poids du foie et l'extrait aqueux EI (90mg/kg) qui diminuer significativement le poids du foie, des reins et de la graisse épидидymaire. Par contre chez les rats diabétiques on a noté des variations peu significatives du poids du pancréas, du foie, des reins et des testicules chez tous les groupes de rats, tandis que le poids de la graisse et du muscle soléus est significativement élevé chez les expérimentaux par rapport aux témoins avec une prédominance des extraits organiques (EM, EAc et En-B) par rapport à l'extrait aqueux (EI et EII). La biométrie des organes qui est proportionnelle au poids corporel, peut nous renseigner sur la toxicité des extraits testés. Chez les rats expérimentaux qui ont présentés un certain gain de poids corporel par rapport

aux rats témoins (sérum physiologique) et témoins positif (glibenclamide 10mg/kg), le poids des organes relatif aux poids corporel principalement le pancréas, le foie, les reins et les testicules présentent des fluctuations non significatives entre témoins et expérimentaux. En revanche, le poids de la graisse épидидymaire et du muscle soléus est significativement élevé chez l'ensemble de groupes de rats expérimentaux par rapport aux groupes témoins, ce résultat reflète l'effet des extraits de graines de la coloquinte sur l'amélioration des perturbations du diabète expérimental sur le poids corporel, en assurant la prévention de la taille ainsi que le poids du muscle et la graisse épидидymaire.

Pour chercher l'effet directe des extraits de la coloquinte sur les cellules  $\beta$  pancréatiques, nous nous sommes intéressés à l'analyse immunohistochimique du pancréas par marquage de l'insuline. L'observation microscopique des coupes histologiques nous a permis de constater que l'administration I.P. à long terme pendant trois semaines des extraits de la coloquinte a provoqué une augmentation de la taille des îlots pancréatiques ainsi que leur contenu en insuline, essentiellement chez les rats traités par les extraits EI (90mg.kg p.c.), EM (100mg.kg p.c.) et EAc (10mg.kg p.c.) par rapport aux rats témoins (NaCl) et témoins contrôle (glibenclamide 10mg/kg p.c). Chez les rats témoins diabétiques (NaCl), qui ne reçoivent aucun traitement, on remarque une diminution de la taille des îlots pancréatiques ainsi que leur contenu en insuline, selon la bibliographie l'injection de multiples faibles doses de la STZ dégrade progressivement en quelque jours les îlots, contrairement à l'injection unique de la forte dose (50-70mg/kg p.c) qui diminue rapidement et significativement la taille des îlots pancréatiques (-50%) avec modification de leur architecture, présentent un aspect fusiforme et leur contenu en insuline avec une faible toxicité hépatique et sans aucune lésion rénale (Akbarzadeh et al. 2007; Mir Sajad et al. 2008; Zafar et al. 2009; De la Garza-Rodea et al. 2010; Zaman 2011; Karatug et al. 2013 ). En fonction de ces résultats on suggère que les extraits de la coloquinte EI, EM et EAc qui ont assuré *in vivo* à long terme un effet antihyperglycémiant chez les rats diabétiques sans provoquée une hypoglycémie chez les rats non diabétiques, sont capables d'assurer la régénération des cellules  $\beta$ -pancréatiques ainsi que la stimulation de la synthèse et le stockage de l'insuline dans ces cellules. La possibilité de la régénération des cellules est très probable, car les résultats obtenus par Sebbagh et al. (2009) ont confirmé que l'administration d'un régime à base d'huile de graines de la coloquinte est susceptible de diminuer l'hyperglycémie chez les rats-STZ avec augmentation de la masse des cellules  $\beta$  ( $\beta$  cell masse) suite à une régénération de ces cellules. Également l'administration orale d'un mélange d'extraits aqueux

de graines (100 et 300 mg/kg p.c) de trois plantes: *Citrullus colocynthis*, *Acacia modesta*, *Polygonum fagopyrum*, diminue significativement l'hyperglycémie chez les lapins diabétiques expliquée par une restauration dose dépendante de la taille des îlots et augmentation de leur contenus en insuline (**Zaman 2011**).

Les tests phytochimiques ainsi le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux réalisés en *chapitre I*, ont révélé la richesse des extraits EM, AEc et EI en ces composés par rapport aux autres extraits, selon les analyses de CCM parmi ces flavonoïdes la quercétine et la myricétine. Dans la bibliographie ces dernières appartiennent à la classe des flavonoïdes (flavonol) connus par leur effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres qui sont à l'origine dans le cas de la STZ de la destruction des îlots pancréatiques. L'administration orale d'un mélange de trois antioxydants: Acide  $\alpha$ -lipoïque, vitamine E et Sélénium 50, 100 et 0,25mg/kg p.c respectivement pendant 30 jours, assure une régénération des îlots avec augmentation de la synthèse et la sécrétion de l'insuline chez les souris-STZ (**Karaturg et al. 2013**). Les polyphénols également peuvent assurer cet effet, selon **Ardestani et al. (2007a)** la quercétine et l'épicathéchine qui sont les composants majoritaires de flavonoïdes sont capables d'inhiber les radicaux libres de la STZ et protègent les îlots de Langerhans contre l'effet délétère de cette molécule, de même le silymarine (un autre flavonoïde) présente un effet  $\beta$ -cytoprotecteur en inhibant les cytokines de l'inflammation responsables de la destruction autoimmune du pancréas d'où l'inhibition du diabète de type 1. Les travaux de **Coskun et al. (2005)** ont certifié que l'administration orale de quercétine (15mg/kg p.c) chez le rat trois jours avant l'injection de la STZ est capable de diminuer le taux des radicaux libres (NO) sériques et pancréatiques avec une prévention de l'intégrité des îlots pancréatiques par rapport aux rats témoins. De même **Vessal et al. (2003)** ont confirmé que I.P. de 15mg/kg p.c de quercétine pendant 10 jours est suffisante pour diminuer l'hyperglycémie des rats diabétiques avec une augmentation de tailles des îlots ainsi la surface de l'insuline marquée. Autre flavonoïde, l'épigallocatechine-3-gallate, administré (I.P.) à différentes doses (5, 10, 50 et 100mg/kg p.c) chez les rats pendant quatre jours avant l'injection de la streptozotocine, assure une diminution de l'hyperglycémie et une régénération dose dépendante des îlots pancréatique (**Yun et al. 2006**), l'administration orale de 30mg/kg p.c de l'épicatéchine chez les rats diabétiques (alloxane) pendant 5 jours, assure également une régénération de la population des cellules  $\beta$  (**Chakravarthy et al. 1982**). **Amala (2006)** a noté que l'épicatéchine protège *in vitro* les cellules  $\beta$ -pancréatiques contre

l'effet cytotoxique des IL-1 $\beta$  et de la streptozotocine. Autres études qui ont mis en valeur l'effet de la coloquinte sur l'histologie du foie et du rein. **Abd El-Baky et al. (2011)** ont signalé que l'administration orale quotidienne de l'extrait hydroéthanolique de pulpe de la coloquinte (50mg/kg) pendant 50 jours, présente un effet antioxydant et une amélioration du fonctionnement du glomérule qui constitue le site d'une néphropathie. L'administration orale de l'extrait éthanolique (300mg/kg p.c) de la pulpe chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane pendant 30 jours protège le foie contre la stéatose (**Khalil et al. 2010**). Par contre, l'injection intrapéritonéale de l'extrait hydrométhanolique de pulpe dégraissé par l'hexane (100mg/kg p.c) chez les lapins provoque une lésion tissulaire sévère au niveau de l'intestin grêle, du foie et du rein, cette toxicité est due est la forte présence de cucurbitacines dans la pulpe beaucoup plus que dans la graine (**Shafaei et al. 2012; Elgerwi et al. 2013**). De même un régime à base de graines de la coloquinte (25%, 50% et 75% p/p) chez les rats pendant 90 jours ne présente aucune lésion tissulaire au niveau du foie, du pancréas et des testicules, tandis que le rein et l'intestin sont fortement influencés par ce régime (**Ambi et al. 2007**).

Autres tests biologiques ont été également réalisés au cours de cette étude, pour évaluer l'activité antidiabétique des extraits aqueux de la coloquinte: le prétraitement des rats pendant trois semaines par les extraits EI et EII avant l'injection de la streptozotocine et ceci afin de tester l'effet protecteur de la coloquinte vis-à-vis de la toxicité de la STZ. L'usage externe de ces extraits chez les rats diabétiques et non diabétiques, pour tester l'effet antihyperglycémiant des molécules susceptibles de diffuser à travers la peau. Et également l'effet de la coadministration orale des extraits (EI, EII) et du glucose dans l'intention de tester l'effet de la coloquinte sur la glycémie post-prandiale.

Pour ce qui est de l'effet protecteur de la coloquinte, le prétraitement à long terme pendant trois semaines (21 jours) des rats par l'extrait aqueux EI (90mg/kg p.c) avant l'injection de la STZ, diminue significativement l'hyperglycémie par rapport au prétraitement de 24 heures. Ce qui reflète un effet protecteur de l'extrait de la coloquinte à long terme et non pas l'effet immédiat vis-à-vis de la cytotoxicité de la streptozotocine. Tandis que le prétraitement des rats par l'extrait EII (90mg/kg p.c) ne présente aucune diminution de l'hyperglycémie. En fonction du mode de préparation des extraits EI et EII, on constate que le tégument de la graine entière (EI) est plus riche en molécules actives que le cotylédon de la graine broyées (EII). Ces molécules sont majoritairement des terpénoïdes (cucurbitacines) et des polyphénols, mais c'est beaucoup plus les polyphénols qui assurent l'effet antioxydant

tandis que les cucurbitacines sont de puissants anticancéreux. Selon la bibliographie l'administration orale ou I.P. de la quercétine à différentes doses (15 et 25mg/kg p.c) chez le rat quelques jours avant l'injection de la STZ assure une prévention de l'intégrité et l'architecture des îlots pancréatiques avec diminution du taux des radicaux libres (NO) sériques et pancréatiques (Vessal et al. 2003; Coskun et al. 2005; Adewole et al. 2007; Kebièche et al. 2011; Rifaai et al. 2012). De même le prétraitement I.P. des rats par l'épigallocatechine-3-gallate pendant quatre jours avant la STZ, assure une régénération dose dépendante des cellules  $\beta$  pancréatiques par rapport aux rats témoins (Yun et al. 2006). *In vitro*, la quercétine (0.05mM) est capable de provoquer la régénération des cellules  $\beta$  en culture suite à une stimulation de la réplication d'ADN (Hii et al. 1984). Egalement la quercétine 50mg/kg p.c s'oppose à l'hyperinsulinémie et l'hyperprolifération des cellules  $\beta$  induite par la surcharge orale au fructose (10%) pendant 4 semaines (Li et al. 2013).

Concernant les résultats de l'usage externe des extraits aqueux des graines de la coloquinte EI et EII chez les rats diabétiques et non diabétiques, nous avons constaté que les extraits aqueux provoquent un effet hypoglycémiant, sans diminuer significativement l'hyperglycémie des rats diabétiques. Au cours de ce test notre but été de reproduire le mode d'utilisation traditionnel de cette plante par la population des diabétiques, en immergeant les pieds dans l'infusé des fruits de la coloquinte pendant une courte période jusqu'à la sensation de goût amère dans la bouche. Sur cette base nous avons constaté que l'effet de ces extraits est principalement expliqué par la diffusion dermique de certaines molécules hypoglycémiantes liposolubles qui franchissent facilement la barrière cutanée et qui agissent sur la glycémie des rats non diabétiques et non pas sur les rats diabétiques en provoquant un effet hypoglycémiant et non pas antihyperglycémiant. Car à la fin de l'expérimentation (180 min), il a été remarqué chez les rats non diabétiques expérimentaux des troubles de comportement: tremblements, diminution de l'activité et une hypothermie, ces signes sont moins fréquents chez les rats diabétiques. Cet état d'hypoglycémie peut être expliqué soit par un excès de l'insuline, soit par un défaut de production de glucose ou bien une neurotoxine des extraits aqueux EI et EII. Cependant la neurotoxicité est moins probable puis que les rats diabétiques présentent des signes moins graves. De ce fait on suggère que les extraits aqueux provoquent une hypersécrétion de l'insuline, qui stimule au niveau musculaire et adipeux une forte expression des transporteurs de glucose les Glut4 de faibles *Km* et forte affinité au glucose ce qui aboutit à l'hypoglycémie chez les rats non diabétiques. Par contre chez les rats diabétiques l'hypersécrétion de l'insuline était insuffisante pour provoquer une hypoglycémie

car le nombre des cellules  $\beta$  fonctionnelles est réduit suite à l'injection de la STZ. Les molécules qui peuvent assurer la sécrétion de l'insuline sont probablement des terpénoïdes ou beaucoup plus des polyphénols. En dermatologie l'utilisation des terpénoïdes et des polyphénols comme molécules qui accélère la diffusion cutanée est très courante (**Cal et al. 2003; Batchelder et al. 2004; Humbert et al. 2008; Park et al. 2012**)

En ce qui est de la coadministration orale des extraits aqueux EI (90mg/kg p.c) et EII (90mg/kg p.c) de graines de la coloquinte avec la solution de glucose (2g/kg) chez les rats diabétiques, les résultats obtenus ont révélé que l'extrait aqueux EI a significativement diminué l'hyperglycémie par rapport aux rats témoins et les rats traités par le glibenclamide (5mg/kg p.c). Par contre l'extrait aqueux EII a provoqué une augmentation de la glycémie durant toute l'expérimentation. Selon ces résultats on constate que la coadministration orale de l'extrait EI (90mg/kg p.c)-glucose (2g/kg p.c.) assure une inhibition de l'absorption intestinale du glucose en agissant probablement sur les transporteurs du glucose Glut2. De plus, la voie d'administration joue un rôle important dans la mise en valeur de l'effet antihyperglycémiant de l'extrait EI. Car chez les rats traités par l'extrait EI quotidiennement pendant trois semaines et soumis au TTOG (cités ci-dessus), l'administration I.P. de l'extrait EI suivie 30min après par le gavage de la solution de glucose ne présente aucune diminution de la glycémie. Sur cette base on résume que la coadministration orale de l'extrait aqueux EI a rapidement inhibé les transporteurs intestinales du glucose malgré la présence concomitante des molécules du glucose. L'effet inhibiteur de cet extrait est principalement lié à sa composition chimique, dont les tests phytochimiques ont révélé sa richesse en tannins, terpénoïdes et en flavonoïdes. Selon la bibliographie les polyphénols sont des inhibiteurs de l'absorption intestinale des glucides en inhibant, les transporteurs du glucose et du fructose, ou les enzymes digestives. **Ader et al. (2001)** ont certifié que les flavonoïdes glucosides présentent une forte interaction aux SGLT-1 par rapport à la forme aglycone. La quercétine-3-O-glucoside et la quercétine-4'-O-glucoside inhibe compétitivement les transporteurs du glucose SGLT-1 au niveau de la bordure en brosse de l'intestin (**Cermak et al. 2004**). De même, la catéchine, l'épicatéchine et l'épigallocatechine diminuent le co-transport intestinal  $\text{Na}^+$ -glucose (SGLT1) (**Hussain et al. 2013b**), tandis que la quercétine, et la myricétine diminuent l'absorption intestinale du glucose et du fructose en inhibant les transporteurs Glut2 et Glut5 (**Kwon et al. 2007**). Les terpénoïdes et les polyphénols peuvent également empêcher l'hyperglycémie post-prandiale par inhibition, *in vivo* et *in vitro*, des enzymes digestives:  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase (**Fontana et al. 2011; Kumar et al. 2013a**,

**Kumar et al. 2013b).** Selon **Gurudeeban et al. (2012b)** l'extrait hexanique de la partie aérienne de la coloquinte assure *in vitro* une inhibition non compétitive de l' $\alpha$ -glucosidase à 85% dont le  $V_{\max}$  et  $K_m$  sont de l'ordre de 0,84 et 0,88mM/min<sup>-1</sup> respectivement.

En conclusion, à travers cette étude *in vivo*, on a pu mettre en évidence l'effet antihyperglycémiant et antidiabétiques des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* administrés par voie I.P. notamment les extraits EI, EM et EAc. L'ensemble de ces extraits ne provoque aucun effet hypoglycémiant chez les rats non diabétiques, et aucune amélioration de la tolérance orale au glucose chez les rats diabétiques soumis au TTOG au 21<sup>ème</sup> jours. Les extraits testés, sans être toxiques, ont pu également modifier certaines perturbations consécutives au diabète en assurant une diminution de l'hypertriglycémie, l'hypercholestérolémie, de la polyphagie, la polydipsie, la prévention de la chute du poids corporel ainsi que la régénération des cellules $\beta$ . Autres effets sont assurés par l'extrait aqueux EI qui inhibe l'absorption intestinale du glucose, par inhibition des transporteurs de glucose par ces phytoconstituants principalement les flavonoïdes (quercétine et myricétine). Ces mêmes molécules par leur effet antioxydant attribuent à l'extrait aqueux EI son effet protecteur des cellules  $\beta$ -pancréatiques vis-à-vis des radicaux libres issues de la décomposition de la STZ. Au cours de cette partie de travail on a pu distinguer l'effet de l'extrait EI (préparés à partir des graines non broyées) par rapport à l'extrait EII (préparés à partir des graines broyées) ce qui nous a permis de constater que les molécules actives sont fortement localisées dans le tégument de la graine par rapport au cotylédon.

***Chap. III : Etude in vitro de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte***

*Introduction*

Les progrès scientifiques des techniques *in vitro* et leur application dans le domaine de pharmacologie expérimentale, ont largement contribué à la détermination des mécanismes d'action des produits naturels ou de synthèse dans le cadre de la recherche, le développement de nouveaux médicaments, et l'évaluation de leur efficacité ou leur toxicité lors des tests précliniques. Ces moyens d'investigation complémentaires aux modèles animaux, sont indispensables pour mieux comprendre l'effet thérapeutique ou toxique des extraits ou de principes actifs isolés de plantes médicinales. Dans le cas des plantes antidiabétiques, le mécanisme par lequel elles peuvent provoquer une activité hypo- ou antihyperglycémiant est multiple. Il peut avoir un effet direct sur le pancréas en stimulant la sécrétion de l'insuline: effet insulino-trope; ou bien un effet extra-pancréatique en stimulant la captation et le stockage du glucose par les cellules cible de l'insuline, telle que les cellules musculaires, adipeuses et hépatiques, il peut s'agir d'un effet insulino-mimétique (insulin-like).

La mise en évidence de ces mécanismes d'action nécessite l'incubation d'enzymes, de cellules ou de tissus isolés en présence de produits à tester, et étudier leur effet inhibiteur ou stimulateur des enzymes, des voies métaboliques ou de la signalisation cellulaire. Afin d'examiner *in vitro* l'effet antidiabétique de molécules bioactives, plusieurs techniques peuvent être utilisées: la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques des îlots de Langerhans, la captation et le métabolisme du glucose par les adipocytes, les myocytes et les hépatocytes isolés.

Par ailleurs, certains tests de toxicité peuvent être réalisés *in vitro* sur des modèles de cellules en culture ou isolées. Ils concernent les mesures de viabilité (bleu de trypan) ou de cytotoxicité. Cette dernière est habituellement déterminée par mesure dans le milieu d'incubation de l'activité du LDH, enzyme intracellulaire libérée suite à une perte de l'intégrité membranaire.

A la lumière des résultats obtenus précédemment (étude *in vivo* de l'activité antidiabétique) nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'évaluation de l'effet des différents extraits de graines de *Citrullus colocynthis*, sur la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans. Pour ce faire, les îlots de Langerhans sont mis à incuber en présence des extraits (EI, EII, EM, EAc En-B et FA) et des concentrations croissantes de glucose. Dans un deuxième essai nous nous sommes intéressés à examiner l'effet cytoprotecteur de la coloquinte vis-à-vis de la STZ, ainsi que l'effet cytotoxique sur les îlots de Langerhans.

**Chap. III : Etude in vitro de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte**

*Matériel et méthodes*

## Matériel et méthodes

Cette partie d'étude a été réalisée au laboratoire Hormonologie Expérimental, Université Libre de Bruxelles-Belgique, qui a contribué à l'évaluation de l'effet des extraits de la coloquinte sur la sécrétion de l'insuline par les îlots de langerhans *in vitro*. Les rats ayant servi pour l'étude *in vitro* provient de *Charles Rivers Laboratories*.

### 1. Evaluation de l'effet insulinosécrétoire des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* par les îlots de Langerhans

L'évaluation de l'effet insulinosécrétoire a été réalisé *in vitro* sur les îlots de Langerhans isolés et incubés, en présence des différents extraits de graines de la coloquinte: extrait aqueux non dégraissé (EI), extrait aqueux dégraissé (EII), extrait eau-méthanol (EM), acétate d'éthyle (EAc), n-butanol (En-B) et la fraction A(FA). Le taux de sécrétion de l'insuline est déterminé dans le milieu d'incubation.

La réalisation de cette expérience nécessite d'abord l'isolement des îlots à partir du pancréas de rat suivant la méthode de **Lacy et Kostianovsky (1967)**. Certaines modifications sont apportées au niveau du laboratoire Hormonologie Expérimental et ceci afin d'obtenir un meilleur rendement, atteignant environ 400 à 600 îlots à partir d'un seul pancréas. Les îlots isolés sont mis à incuber avec les différents extraits.

#### 1.1. Prélèvement du pancréas

Le prélèvement de pancréas s'effectue sur des rats femelles Wistar. Après incision abdominale, le canal cholédoque est cathétérisé pour perfuser une solution de Hanks environ 15ml contenant 0.43mg/ml de collagénase P (Roche, GmbH, Mannheim, Germany), ce qui distend le pancréas et facilite son prélèvement. Le pancréas gonflé est ensuite nettoyé des caillots sanguins, des ganglions et des amas graisseux.

#### 1.2. Digestion enzymatique

Le pancréas nettoyé est incubé à 37°C pendant 15 min, sous faible agitation, dans le reste de la solution de Hanks-collagénase 0,43 mg/ml. Ceci permettra une meilleure digestion enzymatique des glandes exocrines jusqu'à l'obtention d'une suspension d'un aspect sableux. Pour éviter la lyse des îlots par les enzymes protéolytiques du pancréas exocrine, après

incubation, la digestion enzymatique est stoppée par l'ajout d'environ 30 ml du Hanks froid (4°C) avec une faible agitation pendant une minute.

### 1.3. Isolation des îlots de Langerhans

L'isolation des îlots nécessite trois lavages de la suspension des îlots et du pancréas exocrine par la solution du Hanks, après décantation de 1 à 2min. Le surnageant est aspiré (sous vide) pour éliminer la collagénase et les exocrines flottantes. La préparation finale, environ 2 à 3ml, est transférée dans une boîte de Pétri placée sous une loupe binoculaire pour collecter les îlots à 4°C.

### 1.4. Incubation des îlots

Après isolement et purification des îlots de Langerhans, on procède à une incubation d'un groupe de 8 îlots pendant 90 min à 37°C (95% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) dans des cupules (1cm de diamètre et 2.3 cm de hauteur) à 1 ml du milieu d'incubation, contenant le Krebs Ringer Bicarbonate (KRB, BSA 0.1%), différentes concentrations du glucose (2,8; 8,3; 16,7mM) et les extraits (voir composition citée ci-dessous). **Le Tableau n° 19** résume les différentes concentrations des extraits de graines de la coloquinte testées, extrait aqueux EI, extrait aqueux EII, eau-méthanol (EM), acétate d'éthyle (EAc), n-butanol (En-B), ainsi que la fraction A (FA).

**Tableau n°19:** Incubation des îlots en présence de différentes concentrations des extraits de la coloquinte et de glucose

	<i>Glucose 2,8 mM</i>	<i>Glucose 8,3 mM</i>	<i>Glucose 16,7 mM</i>
<i>Extrait Aqueux EI</i>	45, 135, 450, 4500 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose	45, 135, 450, 4500 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose	45, 135, 450, 4500 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose
<i>Extrait Aqueux (EII)</i>		50, 150, 450 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose	
<i>Eau-methanol (EM)</i>		56, 167, 500 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose	
<i>Acétate d'éthyle (EAc)</i>	20 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose	20 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose	20 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose
<i>n-butanol (En-B)</i>		40, 116, 035 µg/ml + KRB (BSA 5%) + glucose	
<i>Fraction A</i>		500, 2000 µg/ml + KRB (BSA 5%) + glucose	
<i>Témoins</i>	H <sub>2</sub> O + KRB (BSA 0,1%) + glucose	H <sub>2</sub> O + KRB (BSA 0,1%) + glucose	H <sub>2</sub> O + KRB (BSA 0,1%) + glucose

La composition du milieu d'incubation des îlots est comme suit ;

- Solution I : 30ml (NaCl 448mM et tampon Hepes 40mM, pH=7.4)
  - Solution II : 30ml (KCl 20mM NaHCO<sub>3</sub> 96mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM)
  - Solution III : 30 ml (CaCl<sub>2</sub> 4mM)
  - D-glucose anhydre: (2,8 ou 8.3 ou 16,7mM)
  - O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%, v/v)
  - Albumine: 300 mg (2.5mg/ml)
- } Krebs Ringer  
Bicarbonate (KRB)

### 1.5. Dosage de l'insuline

Après incubation pendant 90 min (temps nécessaire aux îlots pour effectuer une réponse) environ 600 µl du milieu d'incubation, retiré sous une loupe binoculaire, est conservé à -80°C pour effectuer le dosage de l'insuline par une méthode radioimmunologique (Leclercq-Meyer *et al.* 1985).

Après la détermination du pourcentage de radioactivité à partir de courbe étalon, le taux de l'insuline dans les différents milieux d'incubation est exprimé en µU/îlot.

### 2. Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait eau-méthanol de graines de *Citrullus colocynthis* vis-à-vis de la β-cytotoxicité de la streptozotocine

A la lumière des résultats obtenus précédemment sur la sécrétion de l'insuline *in vitro*, ainsi que l'effet préventif des extraits aqueux sur la toxicité de la streptozotocine *in vivo*, nous sommes proposés d'examiner cet effet préventif de la coloquinte vis-à-vis de la cytotoxicité de la streptozotocine *in vitro*. Dans ce but notre choix a été porté sur l'extrait EM.

Après isolement et purification des îlots de Langerhans, on procède dans un premier temps à une incubation de 60 min à 37°C, d'un groupe de 8 îlots dans 1 ml du milieu du Krebs Ringer Bicarbonate (KRB) et du glucose (16,7mM), de l'extrait eau-méthanol (500µg/ml), de streptozotocine (500µg/ml), ou les deux associés (EM-STZ 500 µg/ml). **Le Tableau n° 20** résume les différentes concentrations utilisées au cours de cette expérience (témoins et échantillons).

Dans un deuxième temps après la première incubation, la totalité du milieu d'incubation est retiré (îlots à sec) sous une loupe binoculaire, et remplacé rapidement par

1 ml de KRB sans extrait ou STZ. Les îlots sont incubés une deuxième fois pendant 60 min à 37°C.

En fin, le milieu d'incubation prélevé est conservé à -80°C pour effectuer le dosage de l'insuline par méthode radioimmunologique.

**Tableau n°20:** Incubation des îlots en présence de différentes concentrations des extraits de la coloquinte et de streptozotocine

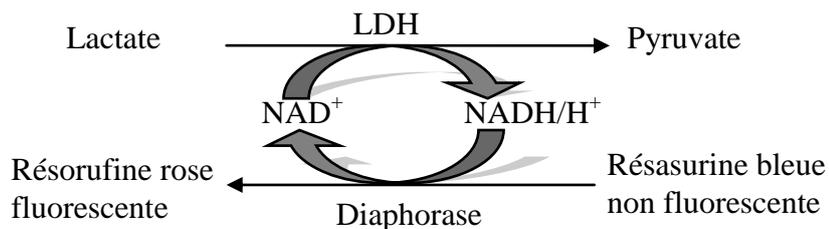
Milieu d'incubation	Glucose 16.7 mM
Streptozotocine	500 µg/ml + KRB (BSA 0,1 %) + glucose
Eau-méthanol	500 µg/ml + KRB (BSA 0,1 %) + glucose
Streptozotocine + Eau-méthanol	500 µg/ml+ 500µg/ml + KRB (BSA 0,1 %) + glucose
Témoins	H <sub>2</sub> O + KRB (BSA 0,1 %) + glucose

### 3. Evaluation de l'effet cytotoxique de l'extrait brut aqueux de graines de *Citrullus colocynthis* sur les îlots de Langerhans

Suite aux observations faites précédemment, l'extrait brut aqueux EI, à forte concentrations montre une inhibition de la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans *in vitro*. Dans cet essai nous nous sommes proposé d'examiner l'effet cytotoxique de cet extrait sur les îlots de Langerhans isolés.

Après isolement et purification des îlots de Langerhans, on procède à une incubation de 90 min à 37°C sous agitation et gazage (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%), d'un groupe de 100 îlots, dans de petite boites de Pétri (6cm<sup>2</sup>), incubé dans 1 ml du KRB, du glucose 8,3mM et en présence de l'extrait brut aqueux EI à différentes concentrations: 50, 150 et 450 µg/ml; le milieu contrôl est à base de KCN 8mM. **Le Tableau n° 21** résume les différentes concentrations de EI utilisées au cours de cette expérience.

Après 30 et 90 min d'incubation, environ 300µl du milieu d'incubation est prélevé, le reste avec les îlots sont homogénéisés à l'aide d'un sonicateur, est ceci à fin d'effectuer un dosage de la LDH dans le milieu d'incubation. La détermination de l'activité de la LDH a été effectuée par fluorescence, en utilisant le Kit Promega G7890 (Cyto Tox-ONE for homogeneous membrane intergrety Assay) selon le principe suivant ;



Le tau de LDH est déterminé à partir d'une gamme étalon (4,125; 6,050 ; 8,25 ; 7,975 ; 9,075 ; 12.10 nM). Après 15 min d'incubation la mesure de la fluorescence est effectuée à 560 nm et à 590 nm, longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement. La résorufine fluorescente produite est proportionnel au taux de LDH. Les résultats sont exprimés en nmol/îlot/min.

**Tableau n°21:** Incubation des îlots en présence de différentes concentrations des extraits aqueux de la coloquinte et de KCN

<i>Milieu d'incubation</i>	<i>Glucose 8.3 mM</i>
<i>Extrait brut aqueux EI</i>	450, 150, 50 µg/ml + KRB (BSA 0,1%) + glucose
<i>KCN</i>	2 mM + KRB (BSA 0,1%) + glucose
<i>Témoin</i>	H <sub>2</sub> O + KRB (BSA 0,1%) + glucose

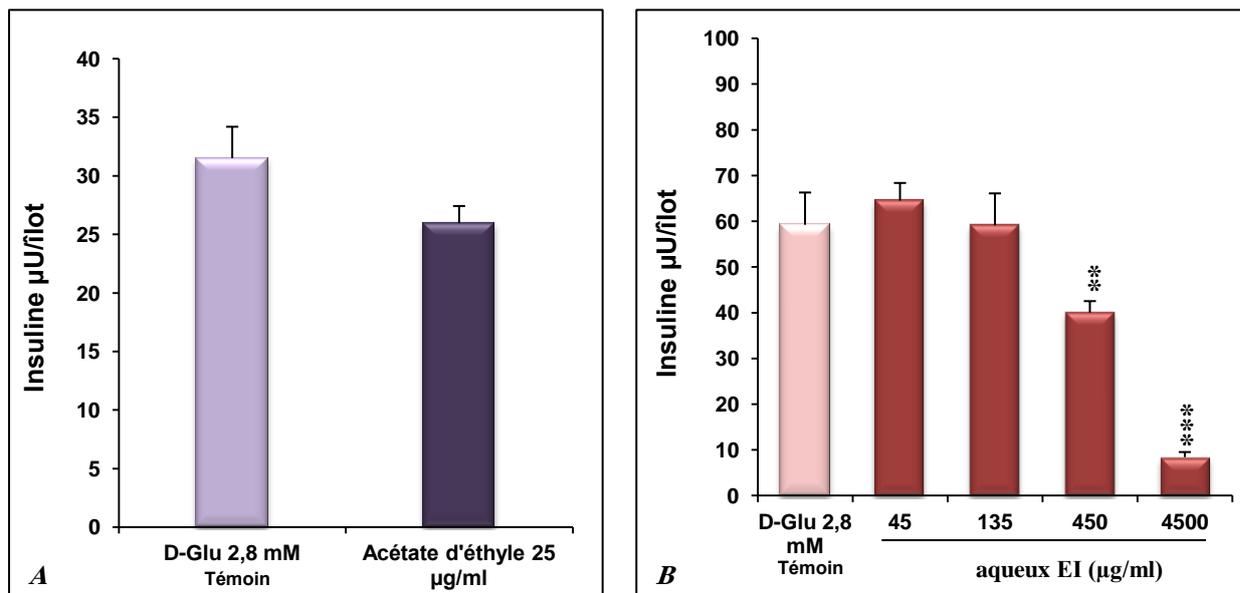
***Chap. III*** : Etude *in vitro* de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte

*Résultats et interprétation*

### 1. Effet insulinosécrétoire des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* sur les îlots de Langerhans isolés

L'effet des différents extraits de graines de la coloquinte, à différentes concentrations de glucose, sur la stimulation de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans est représenté dans les figures 46, 47 (A, B, C, D, E et F) et 48 respectivement.

Dans la figure 46, on remarque que les extraits aqueux (EI) et acétate d'éthyle (EAc) à faible concentration de glucose 2,8mM, inhibent la sécrétion de l'insuline. L'extrait EAc à 25µg/ml provoque une diminution non significative ( $p \leq 0,05$ ) de la sécrétion, tandis que l'extrait aqueux EI aux concentrations 45 et 135µg/ml stimulent très faiblement la sécrétion de l'insuline, par contre les doses 450 et 4500 µg/ml diminuent très significativement la sécrétion basale de l'insuline ( $p \leq 0,001$ ).



**Figure 46:** Effet des extraits de graines de la coloquinte sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans, milieu d'incubation contenant 2,8 mM du D-glucose. **A** : extrait acétate d'éthyle. **B** : extrait aqueux.

\* Comparaison entre extrait et témoin

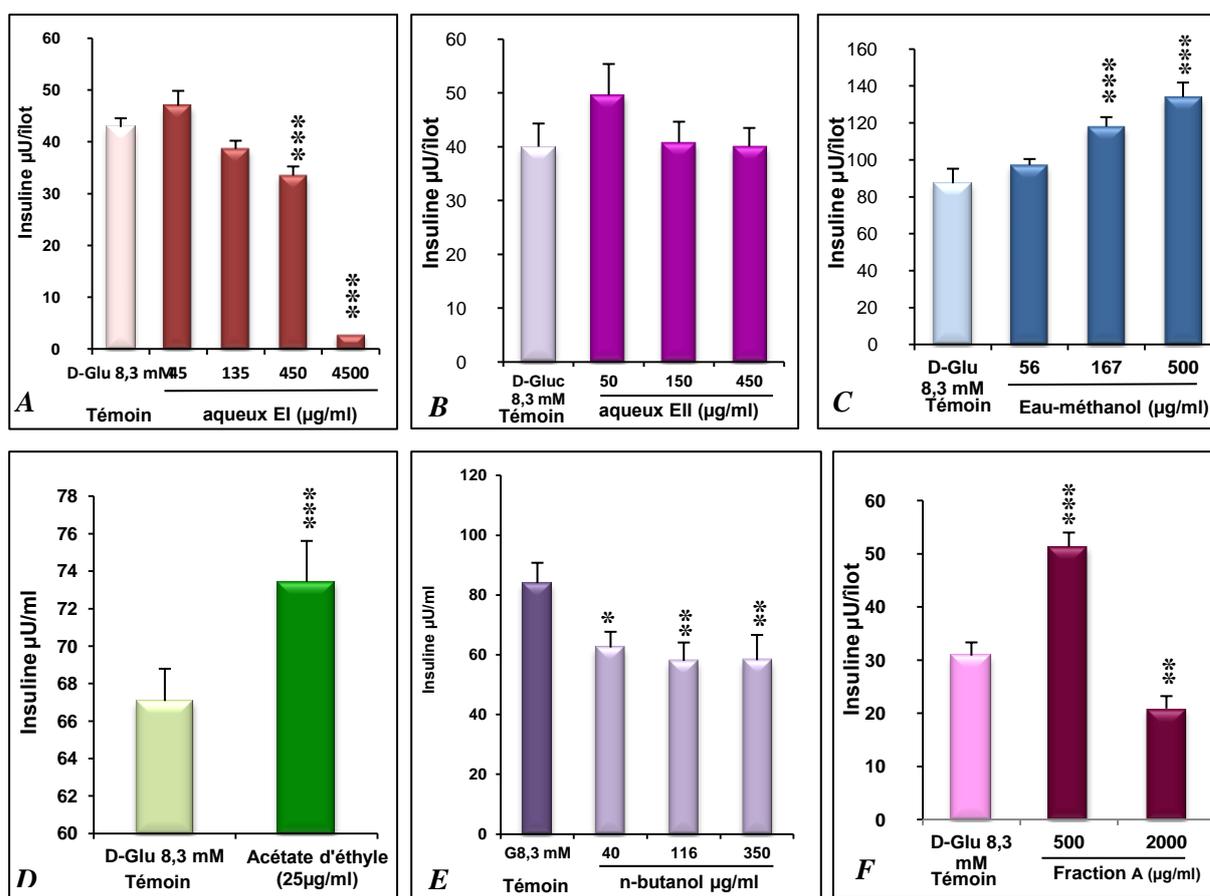
La **figure 47** représente l'effet des différentes concentrations de la coloquinte sur la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans en présence d'une concentration 8,3mM de glucose dans le milieu d'incubation. Les extraits EI, EM, EAc, En-B ainsi la fraction A montrent un effet variable de la sécrétion de l'insuline, par contre l'extrait aqueux EII est nul sur la sécrétion.

L'extrait acétate d'éthyle (EAc) à 25µg/ml a augmenté significativement ( $p \leq 0,001$ ) la sécrétion, par rapport au témoin (**figure 47.D**). L'extrait EM montre un effet stimulateur dose dépendant, à 167 et 500µg/ml respectivement ( $p \leq 0,001$ ). A la même concentration (500µg/ml) la fraction A (récupérée par chromatographie sur colonne) stimule la sécrétion de l'insuline ( $p \leq 0,001$ ), par contre à 2000µg/ml diminue significativement la sécrétion ( $p \leq 0,001$ ).

L'extrait EI aux doses inférieures à 135µg/ml ne semble pas stimuler la sécrétion d'insuline par les îlots, mais à des doses plus élevées supérieur à 450µg/ml, il inhibe fortement l'insuline. Il en est de même pour l'extrait EII qui ne montre aucun effet ni stimulateur ni inhibiteur sur la sécrétion de l'insuline à des doses comprises entre 50 et 450µg/ml.

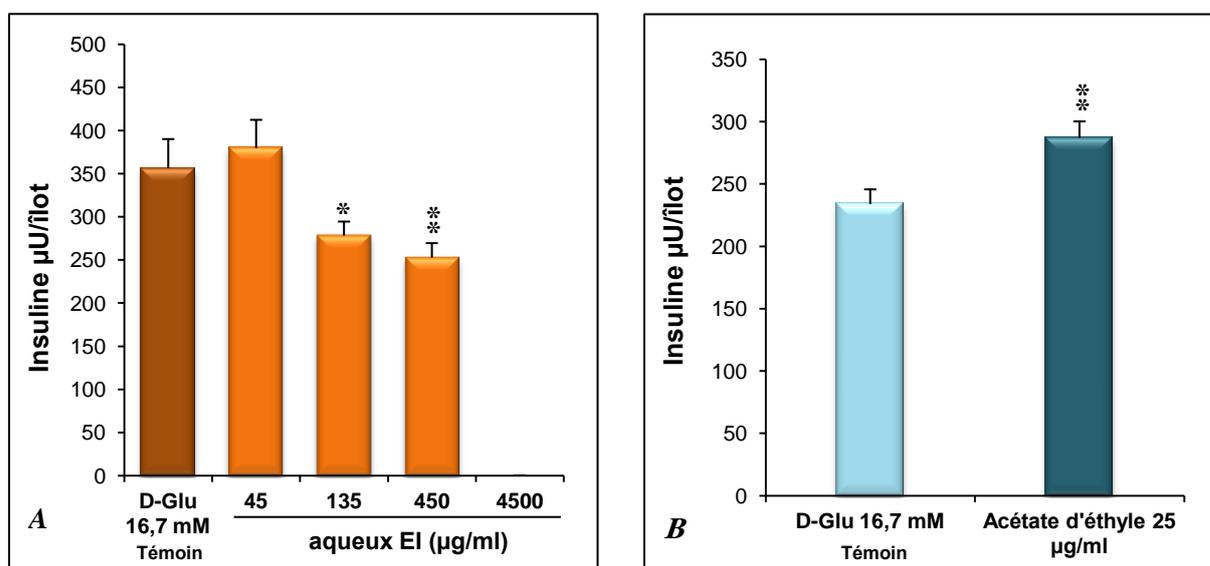
Dans **la figure 48**, on remarque que l'incubation des îlots dans 25µg/ml d'extrait EAc et 16,7mM du glucose assure une augmentation significative de la sécrétion basale de l'insuline ( $p \leq 0,001$ ), tandis que l'extrait aqueux à forte doses continue son effet inhibiteur de la sécrétion en présence de 16,7mM du glucose, à 4500µg/ml la sécrétion est non déterminée.

En fonction de ces résultats on constate que l'extraits EAc, EM et FA stimulent significativement *in vitro* la sécrétion de l'insuline. Tandis que les extraits EI et En-B L'extrait aqueux ne provoque aucune stimulation à faibles doses, au contraire il inhibe significativement la sécrétion de l'insuline à des dose élevées.



**Figure 47:** Effet des extraits de graines de la coloquinte sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans, milieu d'incubation contenant 8,3 mM du D- glucose. *A* : EI. *B* : EII. *C* : EM. *D* : EAc. *E* : En-B. *F* : FA.

\* Comparaison entre extrait et témoin



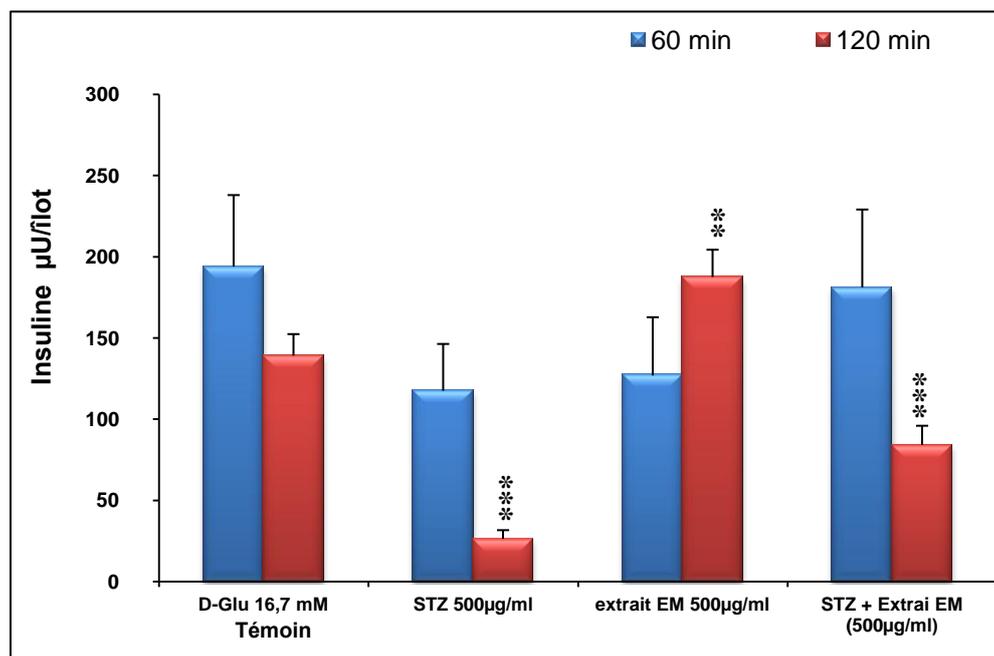
**Figure 48:** Effet des extraits de graines de la coloquinte sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans, milieu d'incubation contenant 16,7 mM du D- glucose. *A* : EI. *B* : EAc.

\* Comparaison entre chaque extrait et le milieu témoin  
 4500  $\mu\text{g/ml}$  : insuline est non détectée

## 2. Effet protecteur de l'extrait eau-méthanol de graines de *Citrullus colocynthis* sur $\beta$ -cytotoxicité de la streptozotocine

Pour tester l'effet cytoprotecteur de la coloquinte, des îlots de Langerhans sont incubés pendant 120min à 16,7mM du D-glucose, en présence de l'extrait EM, de la streptozotocine (STZ) et du mélange EM-STZ. Les résultats obtenus sont mentionnés dans *la Figure 49*.

Dans cette figure on remarque au cours de la première incubation des îlots (60min) aucune différence significative n'est observé ( $p \leq 0,2$ ) dans les différents milieux d'incubation. Par contre à 120 min, l'extrait EM à 500 $\mu$ g/ml stimule significativement la sécrétion basale de l'insuline ( $p \leq 0,05$ ), tandis que la toxicité de la streptozotocine (500 $\mu$ g/ml) inhibe significativement cette sécrétion par les îlots ( $p \leq 0,001$ ). Dans le mélange EM-STZ (500 $\mu$ g/ml) une sécrétion intermédiaire entre les sécrétions précédentes celle de EM et STZ, ceci nous indique la capacité de l'extrait EM de s'opposer à l'effet inhibiteur de la streptozotocine sur les îlots isolés.



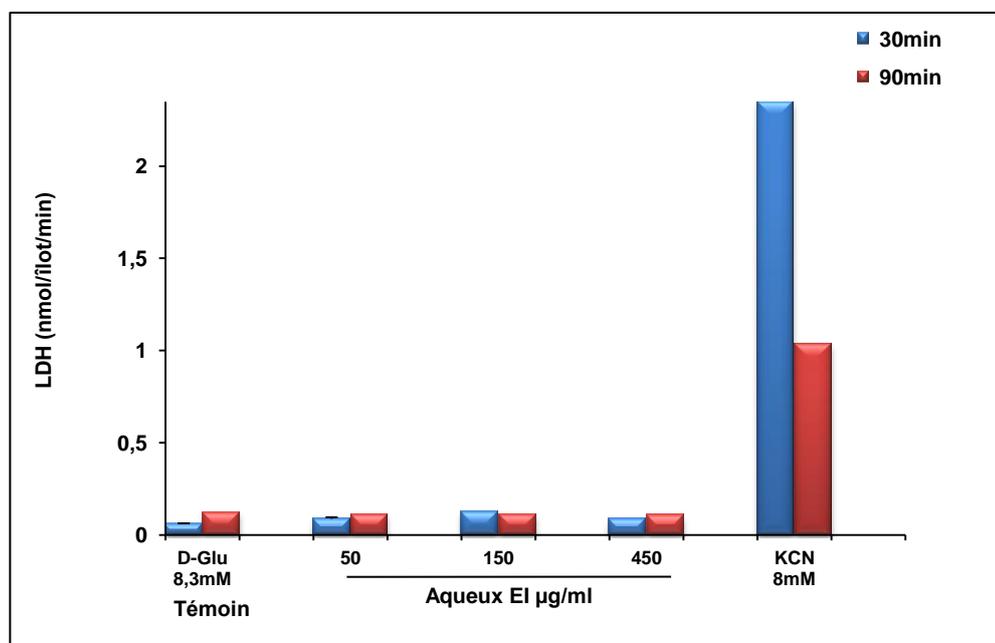
**Figure 49:** Effet protecteur de l'extrait eau-méthanol (EM) de graines de la coloquinte survis-a-vis de  $\beta$ -cytotoxicité de la streptozotocine.

\* Comparaison entre extrait et témoin à 60 et 120min.

### 3. Effet cytotoxique de l'extrait brut aqueux de graines de *Citrullus colocynthis* sur les îlots de Langerhans

Suite à l'effet inhibiteur de l'extrait EI à forte concentration 450 et 4500 $\mu$ g/ml sur la sécrétion de l'insuline (*Figure 46B, 47A et 48A*), il a été indispensable de tester *in vitro* la toxicité de cet extrait sur les îlots pancréatiques en mesurant le taux de LDH libérée dans le milieu d'incubation.

Les résultats obtenus sont représentés dans *les Figure 50*. On remarque que les différentes concentrations de l'extrait EI (50, 150 et 450 $\mu$ g/ml) ne provoquent aucune augmentation significative du taux de LDH par rapport au témoin, par contre le témoin contrôle, KCN (8mM) connu par sa forte toxicité, augmente significativement le taux de LDH à 30 et 90 min d'incubation.



**Figure. 50:** Effet des extraits de graines de la coloquinte sur le taux de LDH libérée dans le milieu d'incubation des îlots de Langerhans à 8,3 mM du D-glucose.

***Chap. III:*** Etude *in vitro* de l'activité antidiabétique  
de la coloquinte

*Discussion*

L'effet antidiabétique des extraits de graines de la coloquinte observé *in vivo* chez les rats diabétiques (Chapitre II), nous a incités d'étudier leur effet sur la sécrétion de l'insuline *in vitro*. De ce fait, des îlots pancréatiques isolés de rats non diabétiques ont été incubés dans des milieux d'incubations à différentes concentrations de glucose (agent sécrétagogue): 2,8 ; 8,3 et 16,7mM, et des extraits de graines: EI (45, 135, 450 et 4500µg/ml), EII (45, 150 et 450µg/ml), EM (56, 167, 500µg/ml), EAc (25 µg/ml) et En-B (40, 116, 350 µg/ml) et la fraction FA (500, 2000 µg/ml).

Les principaux résultats obtenus ont révélé que dans toutes les concentrations du glucose (2,8; 8,3 et 16,7mM), l'extrait aqueux EI à faible dose 45µg/ml stimule faiblement la sécrétion d'insuline, et à fortes concentrations 135 et 450 il diminue progressivement et significativement la sécrétion de l'insuline, jusu'à l'inhibition totale à 4500µg/ml. L'extrait En-B, présente un effet comparable à l'extrait EI à savoir une inhibition de la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans aux doses de 40, 116 ou 350µg/ml. En revanche les extraits EM (167 et 500µg/ml) et EAc (25µg/ml) stimulent une sécrétion dose-dépendante aux concentrations du glucose 2,8; 8,3 et 16,7mM.

Nous avons également remarqué que la présence de l'extrait EM (500µg/ml) dans le milieu d'incubation protège l'intégrité des îlots pancréatiques vis-à-vis de la toxicité de la STZ (500µg/ml) en assurant la continuité de la sécrétion insulinaire. La toxicité de l'extrait aqueux testé *in vitro* sur les îlots de Langerhans ne révèle aucune variation significative du taux de LDH dans le milieu d'incubation.

L'augmentation du taux de glucose sanguin induit la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques, liée principalement à une hyperutilisation du glucose (glycolyse), une hyperproduction d'ATP, et une augmentation du rapport ATP/ADP cytosolique conduisant à la fermeture des canaux  $K^+$ -ATP dépendant. Cette fermeture provoque une dépolarisation membranaire des cellules  $\beta$  suite à une inhibition de l'efflux de  $K^+$  et une augmentation intracellulaire des charges positives. La dépolarisation membranaire engendre l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L, et l'entrée massive du  $Ca^{2+}$  dans la cellule suivant un gradient électrochimique. L'hyper-concentration calcique cytosolique peut se faire également par un relargage de  $Ca^{2+}$  à partir du réticulum endoplasmique (Magnan et al. 2005; Pascal. 2005). Suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , les microvésicules portant l'insuline fusionnent avec la

membrane plasmique, où de nombreuses protéines participent à ce processus: des protéines monomériques à activité GTPasique de type Rab et le complexe NSF-SNAP-SNARE (NSF: N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein; SNAP: Soluble NSF Attachment Protein; SNARE: Soluble NSF attachment protein receptor ou SNAP receptor), dont les SNARE (synaptotagmines, synaptobrevine, syntaxine) sont des molécules-clés du mécanisme de fusion membranaire. Environ 1% des vésicules sont accolées à la membrane «prêtes à fusionner» selon un mécanisme dépendant du calcium. Tandis que la majorité des vésicules de sécrétion sont localisées dans le cytoplasme associé à des microfilaments et des microtubules du cytosquelette (**Magnan et al. 2005; Gauthier et al. 2008**). Ce dernier à côté des canaux calciques voltage-dépendants de type L, joue un rôle primordial dans la sécrétion de l'insuline, en assurant l'arrimage, la fixation et la fusion des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique. Les microfilaments à l'état de repos présentent une répartition corticale et sont en interaction avec la syntaxine (protéine SNARE), ce qui empêche la fusion membranaire des vésicules, la stimulation des cellules  $\beta$  par le glucose, et non pas par des sécrétagogues non nutritifs, provoque une dépolymérisation des microfilaments qui permet l'interaction des vésicules avec la syntaxine, ce qui conduit à l'exocytose des granules d'insuline (**Eliasson et al. 2008; Wang et al. 2009**). Les microtubules contribuent également à l'exocytose de l'insuline, le glucose stimule la polymérisation de ces éléments qui assure la migration des vésicules d'insuline du centre cytosolique vers la périphérie par l'intermédiaire de la kinésine, protéine motrice ATPase associée aux microtubules, à ce niveau les vésicules transportées sont exposées aux microfilaments corticaux pour achever leur exocytose (**Wang et al. 2009**).

La sécrétion de l'insuline est régulée par des inhibiteurs et des stimulateurs, classés en trois groupes : déclencheurs, capables de déclencher à eux seuls la sécrétion d'insuline dont le glucose est le puissant stimulateur; amplificateurs (potentialisateurs) qui amplifient l'effet du déclencheur (glucose) comme les acides gras non estérifiés; et atténuateurs qui diminuent la réponse sécrétoire au glucose (**Magnan et al. 2005**). Dans ce cadre se classe les sulfamides hypoglycémisants qui se caractérisent par une stimulation de la sécrétion de l'insuline sans influencer sa synthèse. L'interaction des sulfamides avec leurs récepteurs spécifiques (SUR) au niveau de la membrane des cellules  $\beta$ -pancréatiques provoque la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  dépendant, qui entraîne une dépolarisation membranaire et l'ouverture secondaire des canaux calciques, ce qui induit à l'exocytose des vésicules contenant l'insuline d'une manière similaire à celle observée après stimulation par le glucose (**Kanetee et al. 2009; Derfoufi et al. 2010**).

Plusieurs études ont mis en évidence l'effet insulinosécrétoire de nombreux phytoconstituants *in vivo* et *in vitro*, notamment les polyphénols. Ces derniers ont montré un effet amplificateur de la sécrétion de l'insuline par le glucose suivant divers mécanismes. Selon **Hii et al. (1984)** l'épicatéchine (1mM) stimule la sécrétion de l'insuline induite par 2 et 20mM de glucose. La quercétine et la vitéxine présentent également *in vitro* un effet insulinosécrétagogue dose-dépendant en stimulant l'influx de  $Ca^{2+}$  et l'activation des canaux calciques voltage dépendant de type L (**Prabhakar et al. 2008; Bardy et al. 2013**). Il est de même, La quercétine (20 $\mu$ g/ml) potentialise l'effet du glucose (8,3mM) et du glibenclamide (0,01 $\mu$ g/ml) sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline et phosphoryle la protéine ERK 1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2) impliquée dans cette sécrétion (**Youl et al. 2010b**). L'exposition des îlots pancréatiques à des concentrations faibles de quercétine (0,01-0,1mM/l) et d'épicatéchine (0,8 mM/l), provoque une stimulation de la sécrétion de l'insuline et la captation du  $Ca^{2+}$  via les canaux calciques (**Hii et al. 1985**). Tandis que la kaempferitrine, un flavonoïde glycoside aux concentrations 10, 100 et 1000nM assure *in vitro* un effet insulino-mimétique dans le muscle soléus en stimulant différentes voies métaboliques et nucléaire (MAPK et MEK) responsables de la captation du glucose et son stockage sous forme de glycogène suite à la translocation des Glut4 au niveau membranaire (**Cazarolli et al. 2013**).

Par ailleurs, d'autres phytoconstituants peuvent agir sur la sécrétion de l'insuline comme les alcaloïdes et les saponosides. La berbérine, un alcaloïde isolé de *Berberis vulgaris*, stimule *in vitro* une sécrétion d'insuline dose dépendante avec une augmentation de la captation du glucose dans les cellules en culture, adipocytes 3T3-L1 et myotubes L6, suite à une phosphorylation des MAPK (**Amala. 2006; Jun et al. 2008**). La charantine (saponine stéroïdienne, isolée de *Momordica charantia*), la momordicine I, II, et kuguaglycoside, aux concentrations variables de 10 à 125 $\mu$ g/ml stimulent significativement la sécrétion de l'insuline en présence de 27mM de glucose (**Prabhakar et al. 2008; Keller et al. 2011**). Alors que la momordicoside et ses dérivés aglycones présentent un effet insulino-mimétique, ils stimulent *in vitro* la translocation des Glut4 dans les cellules en culture, les myotubes L6 et les adipocytes 3T3-L1, cet effet est associé à une activation des MAPK impliquée dans la captation du glucose et l'oxydation des acides gras (**Prabhakar et al. 2008; Tan et al. 2008; Teodoro et al. 2008**).

Selon les résultats obtenus concernant la sécrétion de l'insuline qui ont montré un effet stimulateur de la sécrétion dans les extraits EM, EAc et FA, et un effet inhibiteur des extraits EI et En-B. Sur cette base on remarque que les extraits EI et En-B forment un groupe qui présente la même allure de réponse, et les extraits EM et EAc forment un autre groupe qui présente entre eux une allure opposée à celle du premier. L'élément qui forme le point de différence entre ces deux groupes, est principalement les phytoconstituants présents dans ces extraits.

Les tests phytochimiques réalisés dans le premier chapitre de notre étude (**Tableau n°5**), ont révélé la présence des tannins et des flavonoïdes dans les extraits EM, EAc, FA et à un degré moindre dans EI, ils sont très faiblement notés dans l'extrait En-B. Tandis que les terpénoïdes sont présent dans les extraits EI et En-B, faiblement présent dans EM et totalement absent dans En-B. Ces résultats ont été également confirmés par le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux (**tableau n°6**), qui ont montré un taux relativement élevé dans EM et EAc par rapport aux extraits EI et En-B qui renferment des taux approximatifs. Les analyses de CCM (**tableau n°7**) ont indiqué la présence de la quercétine, et la myricétine dans ces extraits. De ce fait, on suggère que l'effet positif des extraits EM et EAc sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans est principalement lié aux polyphénols notamment la quercétine et la myricétine.

Selon les données bibliographiques la catéchine, la quercétine et l'épicatéchine, peuvent présenter *in vitro* un effet déclencheur (insulinosécrétagogue) ou un effet amplificateur sur la sécrétion de l'insuline par les îlots pancréatiques, en présence de faibles ou fortes concentrations du glucose suivant divers voies. Une activation des canaux calciques voltage dépendant en stimulant l'efflux de  $Ca^{2+}$ , ce qui engendre l'exocytose des vésicules de sécrétion de l'insuline; ou bien l'activation de la production de l'AMPc et la phosphorylation des protéines ERK qui sont impliquées dans cette voie (**Hii et al. 1984; Ahmad et al. 1991; Youl et al. 2010b; Bardy et al. 2013**). Selon **Hii et al. (1985)** il existe une relation étroite entre la structure chimique des polyphénols et l'effet insulino-trope, car la quercétine qui est plus hydrophobe que la catéchine et traverse lentement le cytoplasme pour exercer son effet intracellulaire, présentent des groupements carbonyles et des doubles liaisons entre le C-2 et C-3 au niveau du cycle C, ce qui rend l'effet de la quercétine plus remarquable par rapport à l'effet de l'épicatéchine.

En revanche, l'effet inhibiteur des extraits EI et En-B qui devient plus significatif aux fortes concentrations est probablement lié aux terpénoïdes, en particulier les cucurbitacines présents dans ces extraits. Les cucurbitacées, entre autre la coloquinte, sont connues par leur richesse en cucurbitacines (E, B, I, J, L), qui caractérisent généralement le goût amer des espèces de cette famille. Ils peuvent agir éventuellement à plusieurs niveaux du processus de sécrétion de l'insuline, soit au niveau des canaux  $K^+$ -ATP dépendant en inhibant leur phosphorylation ainsi leur fermeture, ce qui inhibe également la dépolarisation membranaire et l'exocytose de l'insuline; ou bien ils peuvent agir au niveau des éléments du cytosquelette, les microfilaments corticaux et particulièrement les microtubules, en agissant sur leur polymérisation indispensables au transport des vésicules de sécrétion du centre cytosolique vers la membrane par le biais de la kinésine.

L'effet insulinothrompe des cucurbitacines n'est pas bien documenté dans la bibliographie, par contre elles sont estimées par leur effet anticancéreux. Les cucurbitacines glucosides E et B, isolés des feuilles de la coloquinte inhibent *in vitro* (20 $\mu$ M) la prolifération de lignées cellulaires du cancer du sein en bloquant les cellules en phase G<sub>2</sub>/M suite à une inhibition de la protéine p34<sup>CDC2</sup>, une inhibition de la phosphorylation des protéines JAK/STAT, et une désorganisation des microfilaments d'actine impliqués dans le changement de la forme cellulaire au cours de la phase M, ainsi qu'une désorganisation de la polymérisation des microtubules (Tannin-Spitz et al. 2007; Thoennissen et al. 2009; Boykin et al. 2011; Duangmano et al. 2012).

L'extrait d'acides aminés libres (0,1mg/ml) de graines de la coloquinte présente *in vitro* un effet insulinothrompe sur les îlots de rats à l'exception du  $\beta$ -pyrazol-1-yl-alanine, un acide aminé non conventionnel spécifique aux cucurbitacées. Selon l'auteur cette sécrétion d'insuline est liée à la présence de leucine (76%) et isoleucine (32%), acides aminés stimulateurs de la sécrétion de l'insuline (Nmila et al. 2002).

L'effet inhibiteur de l'extrait EI aux doses croissantes sur la sécrétion de l'insuline, nous a incités de vérifier sa toxicité sur les îlots pancréatiques en mesurant le taux du LDH dans le milieu d'incubation. Les résultats obtenus ont révélé que chaque dose de cet extrait (50, 150 et 450 $\mu$ g/ml) ne présente aucune toxicité. De ce fait, on confirme que l'extrait EI inhibe la sécrétion de l'insuline suite à un mécanisme moléculaire et non pas par sa toxicité. Cette constatation peut s'appliquer également à l'extrait En-B. Les fortes concentrations d'EI (135, 450 et 4500 $\mu$ g/ml) expliquent une forte concentration des cucurbitacines dans le milieu

d'incubation, qui peuvent agir à différents niveaux dans les îlots pancréatiques pour inhiber le processus d'exocytose de l'insuline. Tandis que, la faible dose de cet extrait (50µg/ml) renferme une faible concentration des cucurbitacines qui reste insuffisante pour exercer un effet inhibiteur significatif.

Dans le but de reproduire *in vitro* l'effet protecteur des extraits de la coloquinte vis-à-vis de la toxicité de la STZ sur les cellules β pancréatiques (étude réalisée *in vivo* dans le chapitre II) et en raison de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux EI sur la sécrétion de l'insuline, nous avons choisi l'extrait EM pour tester son effet β-cytoprotecteur. Dans ce but les îlots sont incubés dans différents milieux d'incubation en présence: de l'extrait EM (500µg/ml), de STZ (500µg/ml), ou du mélange EM+STZ (500µg/ml).

Les principaux résultats après 120min d'incubation ont révélé, une inhibition significative de la sécrétion de l'insuline en présence de la STZ et une sécrétion très significative en présence de l'extrait EM, tandis que le mélange EM-STZ provoque une sécrétion moins fréquente que celle de l'extrait EM et plus importante de celle de la STZ. De ce fait, on suggère que l'extrait EM s'oppose à l'effet cytotoxique de la STZ par traitement de l'état de stress oxydatif (inhibition de la production des radicaux libres) produit lors de sa dégradation. Ce résultat complémentaire à l'étude de l'effet antiradicalaire de cet extrait sur le DPPH (*chapitre I*) a bien confirmé l'effet antioxydant de l'extrait EM sur le piégeage des radicaux libres générés par la décomposition de la STZ dans les îlots. Ces radicaux sont principalement l'oxyde nitrique (NO) responsable de l'alkylation d'ADN et l'inhibition de la production de NAD<sup>+</sup>, ce qui aboutit à une inhibition massive de la production de proinsuline beaucoup plus que la synthèse de l'insuline (**Szkudelski 2001; Lenzen S. 2008**).

L'incubation des îlots en présence de la STZ (2,2mM) pendant 30 et 60min inhibe la sécrétion à 37% et 85% respectivement. Par ailleurs, certaines molécules administrées avant ou après la STZ peuvent s'opposer à son effet toxique, comme les analogues non métabolisables du glucose (3-O-méthylglucose, 2-desoxyglucose et 5-thiogluucose), 3-aminobenzamide et la nicotinamide précurseur de NAD<sup>+</sup> (**Szkudelski 2000; Maldonato et al. 1976**). Les phytoconstituants peuvent également neutraliser l'effet toxique de la STZ en assurant une inhibition de la production des radicaux libres c'est le cas des flavonoïdes. **Youl et al. (2010)** ont démontré que la quercétine (20µg/ml) protège l'intégrité et la viabilité des îlots vis-à-vis de la toxicité du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µg/ml).

En conclusion, l'étude *in vitro* de l'activité antidiabétique des extraits de graines de la coloquinte nous a permis de mettre en évidence l'effet insulinothrompe des extraits EM et EAc, qui amplifient dans toute les concentrations physiologiques du glucose (2,8; 8,3 et 16,7mM) son effet sur la sécrétion de l'insuline. La richesse de l'extrait EM en flavonoïdes (quercétine et myrcétine) confirme sa capacité de piéger les radicaux libres issus de la STZ, et poursuit la stimulation de la sécrétion de l'insuline.

Par ailleurs, Nous avons également pu déterminer l'effet des extraits EI et En-B sur le blocage de la sécrétion de l'insuline, qui est largement loin d'un effet toxique, mais qui se présume à une voie cellulaire impliquant les éléments du cytosquelette. L'effet cytoprotecteur de la coloquinte est confirmé par l'extrait EM qui protège, par ses composés phénoliques notamment les flavonoïdes, les îlots pancréatiques contre les radicaux libres issus de la STZ.

***Discussion générale***

L'importance des études ethnopharmacologiques, qui regroupent plusieurs domaines complémentaires à savoir l'ethnobotanique, la phytochimie, la pharmacologie, et la toxicologie se résume principalement à l'exploitation interdisciplinaire de nouvelles molécules d'origine végétale, traditionnellement utilisées par l'homme, pour déterminer leurs principes actifs ainsi que leur mode d'action. Ce genre d'études a permis actuellement la mise évidence de l'effet thérapeutique de plusieurs, voir des centaines de principes isolés de plantes médicinales ainsi que le développement de nouveaux médicaments: anticancéreux, anti-inflammatoires, antifongiques, antioxydants ou antidiabétiques.

Dans le domaine des plantes antidiabétiques, l'ethnopharmacologie a largement contribué à une approche scientifique de l'utilisation traditionnelle des plantes en phytothérapie, ce qui abouti à la découverte de molécules d'origine végétale comme la galéguine, un alcaloïde isolé de *Galega officinalis* commercialisé depuis 1950 sous forme de biguanide (agent antidiabétique plus efficace produit par hémisynthèse), ainsi que le 4-hydroxyisoleucine acide aminé isolé des graines de *Trigonella foenumgraecum* connu par son effet insulino-trope. Sur environ 1200 plantes antidiabétiques citées dans les diverses enquêtes ethnobotaniques, seulement une centaine ont été étudiées aux laboratoires. Parmi ces plantes notre choix à été porté sur la coloquinte, *Citrullus colocynthis*, plante de la famille des cucurbitacées largement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle, sous forme d'infusion soit des graines soit des fruits en entier, pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier du diabète sucré. Plusieurs travaux scientifiques publiés récemment sur la coloquinte ont montré un effet bénéfique de cette plante comme, antidiabétique, antifongique, antimicrobien, antihistaminique, anti-inflammatoire et anticancéreux (**Hammouda. 2005; Bnouham et al. 2006; Rahimi et al. 2012**).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits de graines de la coloquinte. Ce travail a été réalisé en trois parties expérimentales complémentaires: une étude phytochimique des extraits de graines, notamment un extrait aqueux non dégraissé (EI) et dégraissé (EII), extrait eau-méthanol (EM), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (En-B). Une étude *in vivo* de l'effet antidiabétique chez des rats diabétiques et non diabétiques; et *in vitro* sur la sécrétion de l'insuline.

L'étude phytochimique a révélé la diversité des phytoconstituants présent dans les extraits de la coloquinte, notamment les extraits EI et En-B qui renferment majoritairement les terpénoïdes. Tandis que les flavonoïdes sont fortement présents dans les extraits EM et EAc. Ces extraits par rapport aux extraits EI et En-B renferment le taux le plus élevé en polyphénols et en flavonoïdes totaux, et possèdent ainsi le pouvoir antiradicalaire sur le DPPH le plus important 74 et 88% respectivement. Les valeurs de IC<sub>50</sub> déterminées pour EAc, EM et EI 350, 580 et 500µg/ml respectivement sont nettement élevées à celle de l'acide ascorbique (1,1µg/ml). Cette activité est principalement lié à la richesse de ces extraits en polyphénols essentiellement la quercétine et la myrcétine.

Selon la bibliographie, il existe une relation étroite entre la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et l'activité antioxydante. L'effet «scavanger» des radicaux libres des flavonoïdes dépend généralement de leur structure chimique et la distribution habituelle des groupements hydroxyles. Les groupements 3',4'-orthodihydroxy dans le cycle B et 4-carbonyle sur le cycle C ainsi que le groupement 3-OH et/ou 5-OH sur le cycle C sont très intéressant pour assurer l'effet antioxydant par le transfert de l'atome H sur le DPPH• qui se transforme en DPPHH molécule stable (**Heim et al. 2002; Popovici et al. 2009**). De plus, les flavonols (quercétine, myricétine et kaempférol) qui présentent un groupement hydroxyle en C3 sur le cycle C, sont suggérés comme structure importante dans l'accroissement de l'effet «scavanger» des radicaux libres (**Wojdyło et al. 2007; Pyo et al. 2004; Heim et al. 2002**).

Nombreuses études ont montré et mis en évidence le rôle des polyphénols comme antioxydant, les flavonoïdes en particulier qui protègent les îlots de Langerhans du stress oxydatif provoqué par l'hyperglycémie post-prandiale et l'hyperinsulinémie (insulinorésistance), ils contribuent également à ralentir les perturbations fonctionnelles des cellules β associées au diabète de type2. Ils empêchent également l'évolution du diabète vers des complications secondaires lorsqu'ils sont apportés par une alimentation riche en polyphénols (**Kaneto et al. 1999; Coskun et al. 2005**).

Les propriétés antidiabétiques des plantes peuvent s'exercer suivant différents modes d'action; soit par un effet directe sur le pancréas en augmentant la taille et le nombre des îlots de Langerhans, sur les cellules β pancréatiques en stimulant la sécrétion de l'insuline, la régénération cellulaire, ou une cytoprotection de ces cellules; soit par un effet extrapancréatique en stimulant la captation du glucose et son utilisation par les cellules cibles

à l'insuline, une inhibition de la glycolyse, de la glycogénèse hépatique ou bien une inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase intestinales (**Amala. 2006; Jarald et al. 2008; Wadkar et al. 2008; Jung et al. 2006**).

L'effet antidiabétique de la coloquinte se manifeste par la capacité des extraits EM et En-B a diminué significativement la glycémie au bout de 180min d'expérimentation, tandis que l'effet à long terme devient significatif à partir du 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour dans le cas des extraits EI (90mg/kg p.c.p.c), En-B (70mg/kg p.c.p.c.) et EM (100mg/kg p.c.p.c). Ces mêmes extraits ont assurés également à long terme un effet antidiabétique qui se résume à une correction de certaines perturbations métaboliques associées au diabète expérimental, comme la diminution du taux de triglycéridémie, de cholestérolémie totale, la prévention de la chute du poids corporel ainsi que la diminution de la polydipsie et la polyphagie chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins.

Cet effet est probablement attribué aux terpénoïdes présents dans l'extrait En-B, et aux flavonoïdes dans l'extrait EM. L'extrait EI regroupe les deux familles chimiques flavonoïdes et terpénoïdes. De ce fait on constate que chaque composé chimique se caractérise par une action qui lui est propre et qui devient plus importante en combinaison avec un autre, ce qui reflète l'effet synergique ou additif de ces molécules regroupées dans l'extrait EI.

Un autre facteur qui peut distinguer l'effet de ces molécules est lié à la solubilité, la structure chimique et l'interaction moléculaire; on suggère que les terpénoïdes qui présentent un effet rapide à court et à long terme sont rapidement et facilement métabolisés après injection, tandis que l'effet tardif de polyphénols, tannins et flavonoïdes, peut s'expliquer par un métabolisme et une distribution tissulaire lents.

Ces composés phénoliques plus abondants seraient responsables des propriétés antidiabétiques de la coloquinte, les extraits EM, EAc et EI ont attribués à la coloquinte son effet antidiabétique prometteur, qui se traduit probablement par un effet pancréatique direct en stimulant la sécrétion de l'insuline ou un effet extrapancréatique en augmentant l'effet de l'insuline sur la captation, le métabolisme du glucose et son stockage dans les cellules cibles (adipocytes, myocytes et hépatocytes). Les flavonoïdes sont également réputés par leur effet amplificateur du glucose sur la sécrétion de l'insuline, notamment la quercétine, la myricétine et la catéchine (**Ahmad et al. 1991; Youl et al. 2010b; Bardy et al. 2013**).

L'effet stimulateur de la sécrétion de l'insuline des extraits de la coloquinte a été étudié *in vitro*. Au cours de cette étude nous avons démontré un effet insulino-trope dose dépendant des extraits EM et EAc, qui est principalement lié aux polyphénols notamment les flavonoïdes. Tandis que l'effet inhibiteur noté dans les extraits EI et En-B est lié à la présence des terpénoïdes. Selon les données bibliographiques la catéchine, la quercétine et l'épicatéchine, stimulent la sécrétion de l'insuline via l'activation des canaux calciques voltage dépendant, et l'exocytose des vésicules de sécrétion de l'insuline (**Hii et al. 1984; Ahmad et al. 1991; Bardy et al. 2013**). Le potentiel de cette stimulation est lié à la structure chimique, car les groupements carbonyles et les doubles liaisons entre le C2 et C3 au niveau du cycle C, justifient l'effet remarquable de la quercétine par rapport à l'effet de l'épicatéchine. En revanche, l'effet inhibiteur des extraits EI et En-B est lié aux terpénoïdes, en particulier les cucurbitacines présents dans ces extraits, qui peuvent inhiber la fermeture des canaux  $K^+$ -ATP dépendant et l'exocytose de l'insuline. Ou alors ils peuvent agir sur la polymérisation des microfilaments et des microtubules responsables du transport des vésicules de l'insuline du centre cytosolique vers la membrane plasmique (**Tannin-Spitz et al. 2007; Thoennissen et al. 2009; Duangmano et al. 2012**).

Dans le premier chapitre de notre étude nous avons déterminé *in vitro* l'effet antiradicalaire des extraits EM, EAc et EI de graines de la coloquinte sur le DPPH, cet effet a été également confirmé *in vivo* chez les rats diabétiques traités par ces extraits et qui ont montré que l'administration I.P. à long terme pendant trois semaines des extraits de la coloquinte a provoqué une augmentation de taille des îlots pancréatiques ainsi que leur contenu en insuline. Ce résultat reflète la capacité des extraits à assurer la régénération des cellules  $\beta$ -pancréatiques ainsi que la stimulation de la synthèse et le stockage de l'insuline dans ces cellules. La possibilité de la régénération des cellules  $\beta$  est très probable, car ces extraits renferment des flavonoïdes (quercétine, myricétine) qui sont connus par leur effet antioxydant, expliqué par une inhibition de la production des radicaux libres issus de la STZ et qui sont à l'origine de la destruction des îlots pancréatiques.

De ce fait les flavonoïdes protègent les îlots de Langerhans contre l'effet délétère de cette molécule suite à une diminution du taux des radicaux libres (NO) sériques et pancréatiques, et une prévention de l'intégrité des îlots ainsi qu'une régénération dose dépendante des cellules  $\beta$  pancréatiques (**Vessal et al. 2003; Coskun et al. 2005; Amala 2006; Yun et al. 2006**). De même la quercétine, la myricétine et la catéchines présentes dans

l'extrait EM, par leur effet «scavanger» des radicaux libres s'opposent à l'état de stress oxydative produit lors de la décomposition de la STZ dans des îlots de Langerhans incubés en présence EM-STZ, ce qui assure un effet cytoprotecteur de l'extrait EM sur les cellules-β, qui continuent leur sécrétion de l'insuline malgré la toxicité de la STZ. L'effet cytoprotecteur a été également vérifié *in vivo* chez des rats prétraités par les EI (préparé à partir des graines entières) ou EII (préparé à partir des graines broyées) à la dose 90mg/kg p.c.pendant trois semaines. L'extrait EI empêche fortement l'apparition de l'hyperglycémie induite par la STZ, ce résultat nous a permis de conclure que le tégument de la graine (extrait EI) renferme le maximum des composants actifs par rapport au cotylédon (extrait EII).

De la même manière l'extrait EI diminue significativement par rapport à l'extrait EII, l'hyperglycémie chez les rats soumis à une coadministration orale EI-glucose (90mg/kg-2,5g/kg p.c.). Cet effet est certainement une inhibition de l'absorption intestinale du glucose, liée essentiellement aux polyphénols qui agissent sur l'absorption intestinale des glucides en inhibant les transporteurs intestinaux du glucose et du fructose, ou les enzymes digestives. Les flavonoïdes glucosides inhibent compétitivement les transporteurs du glucose SGLT-1 au niveau de la bordure en brosse de l'intestin, tandis que la quercétine, et la myricétine diminuent l'absorption intestinale du glucose et du fructose en inhibant les transporteurs Glut2 et Glut5 (Cermak et al. 2004; Kwon et al. 2007; Hussain et al. 2013b).

Toutefois, les différentes doses des différents extraits préparés à partir des graines matures et sèches de la coloquinte étudiés *in vivo* et *in vitro* n'ont indiqué aucun signe d'altération tissulaire ni de neurotoxicité chez les rats (changement de comportement, agitation, manque d'activité), car les variations non significatives du taux des transaminases, l'urée, la créatinémie et LDH, ainsi que les doses létales moyennes déterminés pour chaque extrait reflètent la non toxicité hépatique et rénale des extraits de graines de la coloquinte. Selon Rahimi et al. (2012) les graines et les fruits immatures, riches en cucurbitacines, sont très toxiques par rapport aux graines matures séchées.

***Conclusion générale  
et  
perspectives***

Sur la base des informations ethnopharmacologiques et données bibliographiques attribuant à la coloquinte des vertus thérapeutiques dans le traitement du diabète sucré, cette étude a été entreprise afin d'évaluer ses propriétés antidiabétiques.

Guidé par l'usage vernaculaire de cette plante, les graines des fruits mûres séchés sont utilisées comme matière végétale pour préparer des extraits bruts aqueux et organiques. L'analyse phytochimique de ces extraits nous a révélé la présence de nombreuses familles chimiques représentées par les terpénoïdes, coumarines, tanins et flavonoïdes. Ces deux derniers se trouvent à des taux relativement élevée.

Ces résultats nous permettent de constater que la coloquinte est riche en métabolites secondaires, dont la majorité sont extraits par l'eau à partir des graines entières, c'est-à-dire qu'ils sont localisés dans le tégument de la graine.

Ces extraits maintiennent un effet antidiabétique se traduisant par une diminution de l'hyperglycémie chez les rats diabétiques associés à une amélioration des perturbations métaboliques induites par l'installation du diabète. Cette activité antidiabétique serait assurée en partie par l'effet insulinothrompe de certains extraits ou bien par la régénération des cellules  $\beta$  pancréatiques. Nous avons pu également mettre en évidence l'effet antioxydant des extraits EM et EI qui assure une cytoprotection des îlots pancréatiques contre les radicaux libres, et un effet inhibiteur de l'absorption intestinale du glucose. Ces propriétés sont liées aux taux élevés en polyphénols et en particulier en flavonoïdes qui sont préliminairement identifiés comme étant la quercétine et la myrcétine.

A la lumière de cette étude, ce travail préliminaire consacré aux extraits bruts de graines de la coloquinte nécessite d'être poursuivie en s'intéressant essentiellement à;

Un isolement et caractérisation des différents composés chimiques présents dans les différents extraits, notamment l'extrait aqueux EI, EM et EAc afin de déterminer leur structure chimique.

Une étude pharmacologique *in vivo* et *in vitro* pour mettre en évidence l'influence des composés actifs, notamment l'effet insulinosécrétoire ou insulino mimétique, ainsi que l'activité extrapancréatique en étudiant leur effet sur le mécanisme de captation et du

métabolisme du glucose dans les cellules cibles à l'insuline : adipocytes, hépatocytes et myocytes.

Une étude du mécanisme moléculaire des constituants de l'extrait EI et En-B responsables de l'inhibition de la sécrétion de l'insuline observée *in vitro*.

Une étude de l'efficacité des extraits de la coloquinte et leurs principes actifs sur d'autres modèles expérimentaux proches du diabète humain, comme les animaux présentant le syndrome d'insulinorésistance, le diabète induit par un régime hypercalorique, ou le diabète néonatal afin de mieux préciser leur mécanisme d'action.

En fin, les médicaments actuellement utilisés dans le traitement du diabète sucré sont limités au groupe de sulfamides et de biguanides. L'apport de nouvelles structures chimiques ayant une activité antidiabétique serait d'un grand intérêt ouvrant des perspectives thérapeutiques nouvelles pour le traitement du diabète maladie complexe et de plus en plus fréquente dans le monde.

## ***Références Bibliographiques***

- Abd El-Baky A. E., Amin H. K. (2011).** Effect of *Citrullus colocynthis* in ameliorate the oxidative stress and nephropathy in diabetic experimental rats. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research II* (II): 1-10.
- Abdel-Hassan I., Abdel-Barry J., Mohammeda S. (2000).** The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 325-330.
- Abo K.A., Fred-Jaiyesimi A.A., Jaiyesimi A.E.A. (2008).** Ethnobotanical studies of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in South Western Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 67-71.
- Abu-Nasr A. M., Potts W. M. (1953).** The analysis and characterization of the oil from the seed of *Citrullus colocynthis*. *The Journal of The American Oil Chemists Society* 180-120.
- Ader P., Blöck M., Pietzsch S., Wolfram S. (2001).** Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Letters* 162: 175-180.
- Adewole Stephen o., Caxton-Martins Azekiel A., Ojewole John A.O. (2007).** Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic  $\beta$ -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Trad. CAM* 4(1): 64-74.
- Agarwal V., Sharma A. k., Upadhyay A., Singh G., Gupta R. (2012).** Hypoglycemic effects of *Citrullus colocynthis* roots. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research* 69(1): 75-79.
- Ahmad F., Khan MM., Rastogi AK., Chaubey M., Kidwai JR. (1991).** Effect of (-)-epicatechin on cAMP content, insulin release and conversion of proinsulin to insulin in immature and mature rat islets in vitro. *Indian J. Exp. Biol.* 29(6): 516-520.
- Akbarzadeh A., Norouzi D., Mehrabi M.R., Jamshidi Sh., Farhangi A, Allah Verdi A., Mofidian S.M.A., Lame Rad B. (2007).** Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22(2): 60-64.
- Akoh C. C. Nwosu C. V. (1992).** Fatty acid composition of melon seed oil lipids and phospholipids. *JAACS* 69(4): 314-316.
- Al Ghaithi F., EL-Ridi M.R., Adeghate E., Amiri M. H. (2004).** Biochemical Effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 261(1): 143-149.
- Al-Busafi S., Al-Riyami M., Al-Ouwaisi K., Hisham A. (2007).** Screening of Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Some Omani Medicinal Plants. *Journal For Science* 12 (1): 1-6.
- Al-Khateeb M., Dallak M., Al-Hashem F., Bashir N., Abbas M. (2009).** *In vivo*, acute, normo-hypoglycemic, antihyperglycemic, insulinotropic actions of orally administered ethanol extract of *citrullus colocynthis* (L.) schrab pulp. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 5(3): 118-125.
- Allali H., Benmehdi H., Dib M.A., Tabti B., Ghalem S., Benabadj N. (2008).** Phytotherapy of diabetes in West Algeria. *Asian Journal of Chemistry* 20: 2701-2710.
- AL-Qarawi A. A., Adam S. E. I. (2003).** Effect of combination of *Capsicum frutescens* and *Citrullus colocynthis* on growth, haematological and pathophysiological parameters of rats. *Phytother. Res.* 17: 92-95.

- Amala S. (2006).** Traditional Herbal Medicines for Modern Times Antidiabetic Plants. Volum 6. *Taylor & Francis Group, USA* pp: 37-314.
- Ambi A. A., Abdurrahman E. M., Sule M. I., Pateh U. U., Abdurrahman Y. R., Ibrahim N. D. G. (2007).** Phytochemical screening and histopathological studies on the seeds of *Citrullus colocynthis* in albino rats. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences* 6(2): 7-13.
- Andrade-Cetto A., Heinrich M. (2005).** Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 325-348.
- Andrew J. Krentz and Clifford J. Bailey. (2005).** Oral antidiabetic agents current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65 (3): 385-411.
- Andrew M, Kurt H. (2006).** Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Separation and quantification of flavonoids. *Taylor Francis Group*.
- Ardestani A., Yazdanparast R. (2007a).** Flavonoids as potential therapeutic agents for type 1 diabetes. *Medical Hypotheses* 69(4): 955
- Ardestani A., Yazdanparast R. (2007b).** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation. *Food Chem Toxicol* 45: 2402-2411.
- Arulmozhi D. K., Veeranjanyulu A., Bodhankar S. L. (2004).** Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian. J. Pharmacol.* 36(4): 217-221.
- Asghar M. N., Khan I. U., Bano N. (2011).** *In vitro* antioxidant and radical-scavenging capacities of *Citrullus colocynthes* (L) and *Artemisia absinthium* extracts using promethazine hydrochloride radical cation and contemporary assays. *Food Science and Technology International* 17(5): 481-495.
- Asyaz S., Ullah Khan F., Hussain I., Ali Khan M., Ullah Khan I. (2010).** Evaluation of chemical analysis profile of *Citrullus colocynthis* growing in southern Areas of Khyber pukhtunkhwa, Pakistan. *World Applied Sciences journal* 10: 402-405.
- Atole S.K., Jangde C.R., Preety P., Rekhe D.S., Aghav D.V., Waghode H.J., Chougule A.M. (2009).** Safety Evaluation Studies of *Citrullus Colocynthis* for diabetes in Rats. *Veterinary World* 2(11): 423-425.
- Attele A.S., Zhou Y.P., Xie J.T., Wu J.A., Zhang L., Dey L., Pugh W., Rue P.A., Polonsky K.S., Yuan C.S. (2002).** Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes* 51: 1851-1858.
- Ayyad S E. N., Abdel-Lateff A., Alarif W. M., Patacchioli F. R., Badria F. A., Ezmirly S. T. (2012).** *In vitro* and in vivo study of cucurbitacins-type triterpene glucoside from *Citrullus colocynthis* growing in Saudi Arabia against hepatocellular carcinoma. *Environmental toxicology and pharmacology* 33: 245-251.
- Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F. Z., Benmehdi H., Belkacem N. (2012).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(10): 2041-2050.
- Baby J., Jini D. (2011).** Insight into the Hypoglycaemic Effect of Traditional Indian Herbs used in the Treatment of Diabetes. *Reseach Journal of Medicinal Plant* 5(4): 352-376.

- Balaraman A.K., Singh J., Dash S., Maity T.K. (2010).** Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of *Melothria maderaspatana* and *Coccinia indica* in Streptozotocin induced diabetes in rats. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18: 173-178.
- Baldé N.M., Youla A., Baldé MD., Kaké A., Diallo MM., Baldé MA., Maugendre D. (2006).** Herbal medicine and treatment of diabetes in Africa: an example from Guinea. *Diabetes Metab* 32: 171-175.
- Bardy G., Virsolvy A., Quignard JF., Ravier MA., Bertrand G., Dalle S., Cros G., Magous R., Richard S., Oiry C. (2013).** Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in the pancreatic  $\beta$  cells. *Br J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.12194.
- Barnett A. H. (2009).** Obesity and diabetes. Chap.9 Diabetes, obesity and cardiovascular disease—therapeutic implications. Second edition. *Wiley-Blackwell, UK*, pp: 153-184.
- Barri M.E.S., Onsa T., Elawad A.A., Elsayed N., Wasfi I. A., Abdulbari E.M., Adam S. E. I. (1983).** Toxicity of five sudanese plants to young ruminants. *J. Comp. Path.* 93: 559-575.
- Barth A., Müller D., Dürrling K. (2002).** *In vitro* investigation of a standardized dried extract of *Citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats. *Exp Toxic Pathol* 54: 223-230.
- Batchelder Rachel J., Calder Richard J., Thomas Chris P., Heard Charles M. (2004).** In vitro transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of *Camellia sinensis*. *International Journal of Pharmaceutics* 283: 45-51.
- Begum N., Draznin B. (1992).** Effect of Streptozotocin-induced diabetes on GLUT-4 phosphorylation in Rat adipocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 90: 1254-1262.
- Ben Abdeljelil A. (2009).** Le traitement du diabète de type 2 Chez les moins de 65 ans Description et qualité du traitement. *Maîtrise en Pharmacie. Faculté de Pharmacie Université Laval. Québec.*
- Bendjeddou D., Lalaoui K., Satta D. (2003).** Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus olocynthis*. *Journal of Ethnopharmacology* 88: 155-160.
- Benhaddou Andaloussi Ali. (2009).** Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires. *Thèse PhD. Université de Montréal.*
- Benmehdi H., Allali H., Tabti B., Djabou N., Bendi Abdellah A A., Lahfa F., Djaziri R. (2008).** Hypo and antihyperglycaemic effect of *Citrullus coloyntis* L. seeds in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Journal of Chemistry* 20: 2711-2718.
- Benmehdi H., Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Benariba N., Tabti B. (2011).** Effect of saponosides crude extract isolated from *Citrullus Colocynthis* (L.) seeds on blood glucose level in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(31): 6864-6868.
- Bernheim P. P. (2008).** Diabète Etat des lieux dans le monde. *Essentielles* 47 : 5-7
- Bnouham M., Ziyat A., Mekhfi H., Tahri A., Legssyer A. (2006).** Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int J Diabetes & Metabolism* 14: 1-25.
- Böhme Ph., Chamagne L. (2006).** Épidémiologie du diabète dans la zone Interreg III. *Réseau transfrontalier du diabète* 1-16.

- 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.
- Booth G. (2008).** L'environnement et l'obésité: L'importance du lieu de vie. *Endocrinologie, conférences scientifiques* 8(1): 1-6.
- Bösenberg L. H., Van Zyl D. G., (2008).** The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. *JEMDSA* 13(3): 80-88.
- Boudiba A., Mimouni-Zerguini S. (2008).** Improving care and prevention for people with diabetes in Algeria. *Diabetes Voice*. 53 (2): 19-21.
- Bouguerra R., Alberti H., Salem LB., Rayana CB., Atti JE., Gaigi S., Slama CB., Zouari B., Alberti K. (2007).** The global diabetes pandemic: the Tunisian experience. *Eur J Clin Nutr* 61(2): 160-5.
- Boullard B. (2001).** Dictionnaire plantes médicinales du monde-croyances et réalités. *ESTEM édition, Paris* pp: 309-310.
- Bouxid H. (2012).** Les plantes médicinales et diabète de type 2 (à propos de 199 cas). Thèse de doctorat en médecine. *Université Mohammed Ben Abdallah, Faculté de Médecine et de Pharmacie*.
- Boyaghchi M.A. (2008).** The importance of using the extract of Hanzal as inhibitors in manuscripts. *Fourth Islamic Manuscripts conference. Queen's college, University of Combridge* 6-9 july.
- Boykin C., Zhang G., Chen Y-H., Zhang R-W., Fan X-E., Yang W-M., Lu Q. (2011).** Cucurbitacin IIa: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting surviving independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. *British Journal of Cancer* 104:781-789.
- Bruneton J ; 1999.** Pharmacognosie-phytochimie-plantes médicinales. Technique et documentation. Lavoisier 3<sup>ème</sup> édition.
- Buysschaert M. (2003).** Défis en diabétologie. *Louvain Med* 122: S295-S300.
- Cal K., Sznitowska M. (2003).** Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes-in vitro studies. *Journal of Contrôled Release* 93: 369-376.
- Cazarolli Luisa H., Pereira Danielle F., Kappel Virginia D., Folador P., Figueiredo Bonorino dos Santos Reis M., Pizzolatti Moacir G., Silva Barreto Mena Regina F. (2013).** Insulin signaling: A potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. *European Journal of Pharmacology* (article in press).
- Cermak R., Landgraf S., Wolfram S. (2004).** Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border membrane vesicles of porcine jejunum. *British Journal of Nutrition* 91: 849-855.
- Chakravarthy B. K., Gupta Saro J., Code K. D. (1982).** Functional beta cell regeneration in the islets of pancreas in alloxan induced diabetic rats by (-)-epicatechin. *Life Sciences* 31(24): 2693-2697.
- Chandra B.G., Gunatilaka A.A., Khisal A.A., Rahman A.U., Balasubramaniam S. (1988).** Cucurbitacins of *Colocynthis vulgaris*. *Phytochemistry* 27(10): 3225-3229.

- Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3): 178-182.
- Chatenoud L. (2006).** Les anticorps monoclonaux anti-CD3 Une première étape vers un traitement du diabète insulino-dépendant d'origine auto-immune. *Médecine/Sciences* 22: 5-32.
- Chaturvedi P. (2005).** Role of *Momordica charantia* in maintaining the normal levels of lipids and glucose in diabetic rats fed a high-fat and low-carbohydrate diet. *British Journal Of Biomedical Science* 62:
- Chehma A. (2006).** Catalogue des plantes spontanées du sahara septentrional Algérien. *Laboratoire de recherche : Protection des écosystèmes en zone Arides et semi-Arides. Université Kasdi Merbah, Ourgla* pp: 75.
- Chopra I.C., Abrol B.K., Handa K.L. (1960).** Drug Research Laboratory, Jammu (Inde). Première Partie Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. *Organisation des Nations Unies pour l'éducation, Rennes* pp: 29-30.
- 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 pancreas. *Pharmacological Research* 51: 117-123.
- Crase B. (2011).** Cucurbitaceae. Flora of the Darwin Region. (Northern Territory Herbarium, Department of Natural Resources, Environment, the Arts and Sport). In Short, P.S. & Cowie, I.D. (eds) Vol.1: 1-17.
- Daisy Mythili M., Vyas R., Akila G., Gunasekaran S. (2004).** Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Micrcoscopy research and Technique* 63: 274-281.
- Dallak M., Al-Khateeb M., Abbas M., Elessa R., Al-Hashem F., Bashir N., Khalil M. (2009a).** *In vivo*, acute, normo-hypoglycemic, antihyperglycemic, insulinotropic actions of orally administered ethanol extract of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrab pulp. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 5 (3): 119-126.
- Dallak M., Bashir N., Abbas M., Elessa R., Haidara M., Khalil M., Al-Khateeb M. (2009b).** Concomitant Down Regulation of Glycolytic Enzymes, Upregulation of Gluconeogenic Enzymes and Potential Hepato-Nephro-Protective Effects Following the Chronic Administration of the Hypoglycemic, Insulinotropic *Citrullus colocynthis* Pulp Extract. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 5(4): 153-161.
- Dallak M., Bin-Jaliah I. (2010).** Antioxidant activity of *Citrullus colocynthis* pulp extract in the RBC's of alloxan-induced diabetic rats. *Pak J Physiol* 6(1): 1-5.
- Daoudi A., Bousta D., Aarab L., Abdel-Sattar E. (2012).** Evaluation and characterization of the immunomodulatory activity of the protein extract from *Citrullus colocynthis* L. *Food and Agricultural Immunology*, 1-11:1-10.
- Dar A. I., Saxena R. C., Bansal S. K. (2012).** Hepatoprotection: A hallmark of *Citrullus colocynthis* l. against paracetamol induced hepatotoxicity in swiss albino rats. *American Journal of Plant Sciences* 3:1022-1027.
- Daradka H., Almasad Motasem M., Qazan WalidSh., El-Banna Nasser M., Samara O. (2007).** Hypolipidimic effect of *Citrullus colocynthis* L. in rabbits. *Pakistan Journal of Biological Sciencens* 10(16): 2768-2771.

- Darwish S. M., Balbaa S.I., Afifi M.S. (1974).** The glycosidal content of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica* 26(3):293-298
- Dawson S.I., Willis J., Florkowski C. M., Scott R. S. (2008).** All-cause mortality in insulin-treated diabetic patients: A 20-year follow-up. *Diabetes research and clinical practice* 80: e6-e9.
- De la Garza-Rodea Anabel S., Knaän-Shanzer S., den Hartigh Jan D., Verhaegen Alphons PL., van Bekkum Dirk W. (2010).** Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 49(1): 40-44.
- Dehghani F., Azizi M., Panjehshahin M.R., Talaei K., Mesbah F. (2008).** Toxic effects of hydroalcoholic extract of *Citrullus colocynthis* on pregnant mice. *Iranian Journal of Veterinary Research* 9 (1): 42-45.
- Dehghani F., Panjehshahin M.R. (2006).** The toxic effect of alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* on rat liver. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics* 5(2):117-119.
- Dehghani F., Panjehshahin M.R., Azizi M., Mesbah F., Karbalaedoost S., Talaei T. (2003).** Effect of *Citrullus colocynthis* on fertility rate and the number of embryo in mouse. *Toxicology Letters* 144 (1): S110-P407.
- Delazar A., Gibbons S., Kosari A. R., Nazemiyeh H., Modarresi M., Nahar L., Sarker Satyajit D. (2006).** Flavone c-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 14(3): 109-114.
- Derfoufi S., Meddah B., Ramli Y., Cherrah Y. (2010).** Actualités dans le traitement médicamenteux du diabète de type 2. *L'officinal* 81: 16-26.
- Dhanotia R., Chauhan N.S., Dinesh S.K., Vinod K. D. (2011).** Effect of *Citrullus colocynthis* Schrad fruits on testosterone-induced alopecia. *Natural Product Research* 25 (15): 1432-1443.
- Dhiman K., Gupta A., Sharma D.K., Gill N.S., Goyal A. (2012).** A review on the medicinally important plants of the family cucurbitaceae. *Asian Journal of Clinical Nutrition* 4(1): 16-26.
- Dibong Siegfried Didier, Mpondo Mpondo Emmanuel, Ngoye Alfred, Kwin Marie France, Betti Jean Lagarde. (2011).** Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 37: 2496-2507.
- Didi O.M., Hadj-Mahammed M., Zabeirou H. (2003).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional Est). *Courrier du Savoir* 3: 47-51.
- Doss A., Vijayasanthi M., Anand S.P., Parivuguna V., Venkataswamy R. (2011).** Screening of Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *South Asian Journal of Biological Sciences* 1(1): 7-15.
- Duangmano S., Sae-lim P., Suksamrarn A., Domann Frederick E., Patmasiriwat P. (2012).** Cucurbitacin B inhibits human breast cancer cell proliferation through disruption of microtubule polymerization and nucleophosmin/B23 translocation. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 185.
- Dufaitre-Patouraux L., Vague P., Lassmann-Vague V. (2003).** Technologie et fiabilité de l'autosurveillance glycémique : historique et état actuel. *Diabetes Metab* 29: 2S7-2S14.

- Duke J.A., Bogenschutz-Godwin M.J., Cellier J.d., Duke P. K. (2002).** Handbook of medicinal herbs. Second edition, *CRC PRESS, USA* pp: 210-211.
- Dunning T. (2002).** Thérapies complémentaires. *Diabetes Voice* 47(2) : 10-13.
- 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: 194-203.
- Elgerwi A., Benzekri Z., Awaidat S., El-Magdoub A., Abusnina A., El-Mahmoudy A. (2013).** Subchronic haemotoxicity and histotoxicity of *Citrullus colocynthis*. *Journal of American Science* 9(5): 79-87.
- Eliasson L., Abdulkader F., Braun M., Galvanovskis J., Hoppa Michael B., Rorsman P. (2008).** Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* 586(14): 3313-3324.
- Escandell J.M., Kaler P., M. Recio C., Sasazuki T., Shirasawa S., Augenlicht L., Ríos J. L., Klampfer L. (2008).** Activated kRas protects colon cancer cells from cucurbitacin-induced apoptosis: The role of p53 and p21. *Biochemical Pharmacology* 76: 198-207.
- Etuk E.U. (2010).** Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal Of North America* 1(2): 130-134.
- Ezzat Ali Esmail O. (2012).** A possible protective effect of *Citrullus colocynthis* Melon against diabetes mellitus type 2 associated with nonalcoholic fatty liver syndrome in rats. *Journal of American Science* 8(8): 1054-1061.
- Fabricant D.S. Farnsworth N.R. (2001).** The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives* 109: 69-75.
- Fadimatou, Momeni J., Kimbu S.F., Sondengam B.L., Hassan Khan M. T., Iqbal Choudhary M., Rahman A. U. (2010).** Potent inhibitors of tyrosinase activity from *Citrullus colocynthis* Schrad. (Cucurbitaceae). *Acta Pharmaceutica Scientia* 52: 328-334.
- Fagot-Campagna A., Romon I., Fosse S., Roudier C. (2010).** Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France, Synthèse épidémiologique. *Institut de veille sanitaire, Maladies chroniques et traumatismes* 12 p.
- Fejjal N., Gharib N. E., El Mazouz S., Abbassi A., Belmahi A. (2011).** Brulure grave du membre inférieur par l'association D'eau chaude et de *Citrullus colocynthis*. *Annals of Burns and Fire Disasters* XXIV (2):102-103.
- Ferré P. (2005).** Action et sécrétion de l'insuline Double jeu pour les canaux potassiques. *Médecine et Science* 21: 694-696.
- FID (Fédération Internationale du Diabète). (2008).** Réunion régionale de la Fédération Internationale du Diabète. Afrique pour la Mise en œuvre de la Résolution des Nations Unies sur le diabète (61/225) en Afrique. *Nairobi, Kenya*.
- Fleurentin J. Cabalion P., Mazars G., Dos Santos J., Younos C. (1990).** Ethnopharmacologie sources, méthodes, objectives. Premier Colloque européen d'ethnopharmacologie. *Société Française d'ethnopharmacologie Metz* 23-25 Mars.
- Fontana Pereira D., Cazarolli Luisa H., Lavado C., Mengatto V., Figueiredo Bonorino Maria Santos R., Guedes A., Pizzolatti Moacir G., , Silva Barreto Fatima Regina M. (2011).**

- Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* 27 : 1161-1167.
- Foretz M., Hébrard S., Leclerc J., Viollet B. (2008).** Mécanisme d'inhibition de la production hépatique de glucose par la metformine. *Diabète et métabolisme* 34: A9-A42.
- Frank A. Barile. (2008).** Principles of Toxicology Testing, Chap. 6. *CRC Press Taylor & Francis Group, New York.*
- G. Miliuskasa, P.R. Venskutonisa,, T.A. van Beekb. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85: 231-237.
- Gaborit B., Andreelli F.. (2008).** Mécanismes de l'action antidiabétique des thiazolidinediones Anti-hyperglycemic effects of thiazolidinediones. *Nutrition clinique et métabolisme* 22: 84-87.
- Gacem Mohamed A., Ould EL Hadj-Khelil A., Gacemi B. (2013).** Evaluation of antifungal effect of organic extracts of Algerian *Citrullus colocynthis* seeds against four strains of *Aspergillus* isolate from wheat stored. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(12): 727-733.
- Gally F. (2005).** Etude structure/fonction d'une protéine ABC: SUR, Le récepteur des sulfonylurées. *Thèse de doctorat en Science, Discipline: Génie Biologique et Médical. Université Joseph Fourier, Grenoble 1.*
- Galtier F., Bringer J. (2008).** Analogues du GLP-1 versus inhibiteurs des DPP- 4: données de base et en quoi cela diffère-t-il ? *Médecine des maladies Métaboliques* 1: S38-S40.
- Gauthier Benoit R., Wollheim Claes B. (2008).** Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1279-E1286.
- Gautier J. F., Choukem S. P. (2008).** Les incrétines. *Nutrition clinique et métabolisme* 22: 59-65.
- Gill N.S., Kaur S., Arora R., Bali M. (2011).** Scceering of antioxydant and antiulcer potential of *Citrullus colocynthis* methanolic extract. *Research Journal of Phytochemistry* 5(2): 98-106.
- Giwa S., Chuah Abdullah L., Adam Nor M. (2010).** Investigating "Egusi" (*Citrullus Colocynthis* L.) seed oil as potential biodiesel feedstock. *Energies* 3: 607-618.
- Gning S.B., Thiam M., FALL F., BA-Fall K., Mbaye P.S., Fourcade L. (2007).** Le diabète sucré en Afrique subsaharienne aspects épidémiologiques, difficultés de prise en charge. *Med Tro* 67 : 607-611.
- Goetz P. (2007).** Phytothérapie du diabète. *Phytothérapie* 5: 212-217.
- Goguen J. (2005).** Voies alternatives pour le contrôle glycémique dans le diabète de type 2 : Quelles sont les données scientifiques ? *Endocrinologie, conférences scientifiques* 5 (5): 1-6.
- González-Tejero M.R., Casares-Porcel M., Sánchez-Rojas C.P., Ramiro-Gutierrez J.M., Molero-Mesa J., Pieroni A., Giusti M.E., Censorii E., de Pasquale C., Della A., Paraskeva-Hadjichambi D., Hadjichambis A., Houman Z., El-Demerdash M., El-Zayat M., Hmamouchi M., ElJohrig S. (2008).** Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 341-357.
- Gordon M C., David J N. (2002).** Drugs from nature: past achievements, future prospects. Chap1. Iwu M.M. and Wootton J.C. Advances in phytochemistry, Volum1, ethnomedicine and drug discovery. *Elsevier Science B.V. Amsterdam, the Netherland* 23-37.

- Grimaldi A. (2009).** Traité de diabétologie, 2<sup>ème</sup> édition. Ed. Médecine- Sciences, Flammarion.
- Grover J.K., Yadav S., Vats V. (2002).** Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 81-100.
- Guigas B., Foretz M., Stephenne X., Taleux N., Sokal E., Viollet B., Hue L., (2008).** Le mécanisme moléculaire d'activation de l'AMPK hépatique par la metformine est lié à une modification de l'état énergétique cellulaire. *Diabète et métabolisme* 34: A9-A42.
- Gurudeeban S., Ramanathan T. (2012a).** Antidiabetic effect of *Citrullus colocynthis* in alloxan-induced diabetic rats. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology* 1(1): 1-4.
- Gurudeeban S., satyavani K., Ramanathan T. (2010).** Bitter Apple (*Citrullus colocynthis*): an review of chemical composition and biochemical potentials. *Asian Journal of Plant Sciences* 9(7): 394-401.
- Gurudeeban S., Satyavani K., Ramanathan T. (2012b).** Alpha glucosidase inhibitory effect and enzyme kinetics of coastal medicinal plants. *Bangladesh J. Pharmacol.* 7: 186-191.
- Hammouda F.M., Ismail S.I., Abdel-Azim N.S., Shams K.A. (2005).** *Citrullus colocynthis* L. Cucurbitaceae. In A Guide to Medicinal Plants in North Africa. *IUCN Centre Mediterranean Cooperation, Spain* pp: 87-89.
- Handa S.S., Rakesh D.D., Vasisht K. (2006).** Compendium of medicinal and aromatic plants, volume II: Asia. *ICS-UNIDO, Italy* pp: 159-291.
- Hasenah A., Houghton P.J., Amala S. (2006).**  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107(3): 449-455.
- Hatam N. A. R., Whiting D. A. Yousif N. J. (1990).** Lipids and Sterols of *Citrullus colocynthis*. *Int. J. Crude Drug Res.* 28(3): 183-184.
- Heim Kelly E., Tagliaferro Anthony R., Bobilya Dennis J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-584.
- Hii Charles S. T., Howell Simon L. (1984).** Effects of epicatechin on rat islets of Langerhans. *Diabetes* 33: 291-296.
- Hii Charles S. T., Howell Simon L. (1984).** Effects of epicatechin on rat islets of Langerhans. *Diabetes* 33: 291-296.
- Hodge A.M., English D.R., Itsiopoulos C., O'Dea K., Giles G.G. (2011).** Does a Mediterranean diet reduce the mortality risk associated with diabetes: Evidence from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 21: 733-739
- Holt T., Kumar S. (2010).** ABC of diabetes. Sixth edition. *BMJ Books, Wiley-Blackwell. UK* pp:12-18.
- Hsu S.M., Raine L., Fanger H. (1981).** Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29(4): 577-580
- Humbert ph., Marti-Mestres G. (2008).** Voie percutanée. *Thérapeutique dermatologique*

- Huseini H. F., Darvishzadeh F., Heshmat R., Jafariazar Z., Raza M., Larijani B. (2009).** The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad fruit in treatment of type in diabetic patients: A randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research* 23(8): 1186-1189.
- Hussain Abdullah I, Rathore Hassaan A., Sattar Munavvar Z.A., Chatha Shahzad A.S., Ahmad Fiaz ud d., Ahmad A., Johns Edward J. (2013a).** Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. *Industrial Crops and Products* 45: 416-422.
- Hussain Abdulrahman S., Marouf Hasan B. (2013b).** Flavonoids as alternatives in treatment of type 2 diabetes mellitus. *Academia Journal of Medicinal Plants* 1(2): 031-036
- Iqbal Dar A., Sharma V., Saxena R. C, Bansal S. K. (2011).** Hepatoprotective Activity of *Citrullus colocynthis* Linn. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology* 2(2): 1-4.
- Islas-Andrade S., Monsalve Cristina R., De La Paña Jorge E., Polanco Ana C., Palomino Miguel A., Velasco Alfredo F. (2000).** Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochem. Cytochem* 33(3): 201-208.
- Iwai K., Kim M.Y., Onodera A., Matsue H. (2006).**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* thunb. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4588-4592.
- Jarald E., Balakrishnan J. S., Chandra J. D. (2008).** Diabetes and herbal medicines. (Review article) *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 7: 97-106.
- Jayaprakasam B., Seeram N.P., Nair M.G. (2003).** Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters* 189: 11-16.
- Jayaraman R., Shivakumar A., Anitha t., vishal d. J.,Palei N. N. (2009).** Antidiabetic effect of petroleum ether extract of *Citrullus colocynthis* fruits against Streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Rom. J. Biol.- Plant Biol.* 54(2): 127-134.
- Jeyanthi K.A., Christy M. V.A. (2011).** Antioxidant effect of *Citrullus colocynthis* on alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2(2): 696-701.
- Jian C.C., Ming H.C., Rui L.N., Geoffrey A.C., Samuel X.Q. (2005).** Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep* 22 386-399.
- Johnston K., Sharp P., Clifford M., Morgan L. (2005).** Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* 579: 1653-1657.
- Jorge A.P., Horst H., SousaE., Pizzolatti M.G., Silva F.R.M.B. (2004).** Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions* 149: 89-96.
- Jouad H., Haloui M., Rhiouani H., El Hilaly J., Eddouks M. (2001).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology* 77: 175-182.
- Judd W.S., Campbelle C.S., Kellogg E.A., Stevens P. (2002).** Botanique systématique, une perspective phylogénétique. *De Boeck Université, Belgique* Chap 8, pp-306.

- Jun Y., Zhanguo G., Dong L., Zhijun L., Jianping Y. (2008).** Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:148-156.
- Jung M., Park M., Lee H. C., Kang Y.H., Kang E.S., Kim S.K. (2006).** Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. *Current Medicinal Chemistry* 13: 1203-1218.
- Kane M.P., Abu-Baker A., Busch R.S. (2005).** The Utility of Oral Diabetes Medications in Type 2 Diabetes of the Young. *Current Diabetes Revue* 1: 83-92.
- Kanetee B., Albane S., Michel P. (2009).** Anomalies génétiques de sécrétion de l'insuline et diabète sucré de la petite enfance. *Correspondances en Métabolismes Hormones Diabetes et Nutrition*: 36-41.
- Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa Jun-ichiro, Matsuoka Taka-aki, Fujitani Y., Umayahara U., Hanafusa T., Matsuzawa Y., Yamasaki Y., Hori M. (1999).** Beneficial effects of antioxidants in diabetes possible protection of pancreatic  $\beta$ -cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48: 2398-2406.
- Karatug A., Bolkent S. (2013).** The potential role of combined antioxidant treatment on pancreas of STZ-diabetic mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65: 255- 262.
- Kaveri M., Ray I. N. (1986).** Phytochemical Screening of Some Indian Medicinal Plant Species. *Int. J. Crude Drug Res* 24(4): 87-205.
- Kaveri M., Ray I. N. (1986).** Phytochemical Screening of Some Indian Medicinal Plant Species. *Int. J. Crude Drug Res.* 24(4): 187-205.
- Kebièche 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* 9:274-282.
- Keller Amy C., Mab J., Kavalier A., He K., Brillantes Anne-Marie B., Kennellya Edward J. (2011).** Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion *in vitro*. *Phytomedicine* 19:32-37.
- Khalangot Mykola, Tronko Mykola, Kravchenko Victor, Kovtun Vladimir. (2009).** Glibenclamide-related excess in total and cardiovascular mortality risks: Data from large Ukrainian observational cohort study. *Diabetes research and clinical practice* 86: 247-253.
- Khalil M., Gamal M., Dallak M., Al-Hashem F., Sakr H., Refaat A. E., Adly M. A., Al-Khateeb M. (2010).** The effect of *Citrullus colocynthis* pulp extract on the liver of diabetic rats a light and scanning electron microscopic study. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6(3): 155-163.
- Khatibi R. (2012).** Relationship between Alcoholics Extract of *Citrullus Colocynthis* and Rat Liver (Case Study: Iran-south East of Iran). *Journal of Agricultural Science* 4(1): 219-222.
- khatibi R., Teymorri J. (2011).** Anticandidal screening and antibacterial of *Citrullus colocynthis* in South East of Iran. *Journal of Horticulture and Forestry* 3(13): 392-398.
- Khoshvaghti A., Hamidi Ahmad R. (2011).** Comparative effects of oral administration of *Citrullus colocynthis* and insulin injection on serum biochemical parameters of alloxan-induced diabetic dogs. *Comp. Clin. Pathol.* DOI 10.1007/s00580-011-1293-5.

- Koko W. S., Osman E.E., Galal M. (2009).** Antioxidant and antiglycation potential of some Sudanese medicinal plants and their isolated compounds. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(5): 402-411.
- Kouamé J., Gnoula C., Palé E., Bassolé H., Guissou I. P., Simporé J., Nikiéma J.B. (2009).** Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique, Sciences de la santé* 32 (1, 2): 9-23
- Kumar B. D., Mitra A., Manjunatha M. (2009).** *In vitro* and *in vivo* studies of antidiabetic Indian medicinal plants: a review. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 3: 9-4.
- Kumar D., Ghosh R., Pal Bikas C. (2013a).**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory terpenoids from *Potentilla fulgens* and their quantitative estimation by validated HPLC method. *Journal of Functional Foods* (Article in press) xxx xxx-xxx
- Kumar D., Shah V., Ghosh R., Pal Bikas C. (2013b).** A new triterpenoid saponin from *Glinus oppositifolius* with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Natural Product Research* 27(7): 624-630.
- Kumar Sunil, Dinesh Kumar, Manjusha Kamal Saroha, Nidhan Singh, Bhoodev Vashishta. (2008).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharm.* 58: 215-220.
- Kwon O., Eck P., Chen S., Christopher P. C., Lee J. H., Kruhlak M., Levine M. (2007).** Inhibition of the intestinal glucose transporter Glut2 by flavonoids. *The FASEB Journal* 21: 366-377.
- Lacy P.E., Kostianovsky M. (1967).** Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39.
- Lavie D., Willner D., Merlenders Z. (1964).** Constituents of *Citrullus colocynthis* Schrad. *Phytochemistry* 3: 51-56.
- Lawrence L., Richard B., Jyoti K, Susan H., Sharon C. (2009).** Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of Momordica charantia (bitter melon): a mini review. *British Journal of Nutrition* 102: 1703-1708.
- Leclercq-Meyer V., Marchand J., Woussen-Colle M. C., Giroix M. H., Malaisse W.J. (1985).** Multiple effects of leucine on glucagon, insulin and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 116: 1168-1174.
- Lee Y.S., Kim W.S., Kim K.H., Yoon M.J., Cho H.J., Shen Y., Ye J.M., Lee C.H., Oh W.K., Kim C.T., Hohnen-Behrens C., Gosby A., Kraegen E.W., James D.E., Kim J.B. (2006).** Berberine, a natural plant product, activates AMP activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin resistant states. *Diabetes* 55: 2256-2264.
- Lenzen S. (2008).** The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-226.
- Li Jian-Mei, Wang W., Fan Chen-Yu, Wang Ming-Xing, Zhang X., Hu Qing-Hua, Kong Ling-Dong. (2013).** Quercetin preserves  $\beta$ -cell mass and function in fructose-induced hyperinsulinemia through modulating pancreatic Akt/Foxo1 activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1-12.
- Li T., Liu J., Zhang X., Ji G. (2007).** Antidiabetic activity of lipophilic (-)-epigallocatechin-3-gallate derivative under its role of  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61: 91-96.

- Maatooq G. T., El-Sharkawy S. H., Afifi M. S. Rosazza J. P. N. (1997).** C-p-Hydroxybenzoylglyco flavones from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry* 44: 187-190.
- Magnan C., Ktorza A. (2005).** Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique. *EMC-Endocrinologie* 2: 241-264.
- Mahesh C. M., Vidya P. (2008).** Isolation and identification of flavonoid "Quercetin" from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Asian J. Exp. Sci.* 22: 1137-142.
- Maldonado A., Trueheart P.A., Renold A.E., Sharp G.W.G. (1976).** Effects of streptozotocin *in vitro* on proinsulin biosynthesis, insulin release and ATP content of isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 12: 471-481.
- Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Halou E., Fenina N., Aouni M. (2009).** Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. *Journal of Ethnopharmacology* 125: 344-349.
- Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Halou E., Fenina N., Aouni M. (2010a).** Antibacterial and antifungal activities of several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. Immature fruits and seeds. *Journal de Mycologie Médicale* 20: 179-184.
- Marzouk B., Marzouk Z., Fenina N., Bouraoui C., Aouni M. (2011).** Anti-inflammatory and analgesic activities of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruit and seed organic extracts. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15 (6): 665-672
- Marzouk B., Marzouk Z., Haloui E., Fenina N., Bouraoui A., Aouni M. (2010b).** Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 15-19.
- Mekkiou R. (2005).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires d'espèces du genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat d'Etat En Chimie Organique - Option Phytochimie. Université Mentouri – Constantine.
- Memon U., Brohi A., Ahmed Syed W., Azhar I., Bano h. (2003).** Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 16(1):1-6.
- MENA, Middle East and Northern Africa Diabetes Leadership Forum. (2010).** Diabète : La pandémie silencieuse et son impact au Moyen-Orient et en Afrique du Nord. *Dubaï* 12-13 Décembre.
- Menghani E., Sudhanshu, Rao N., Mittal S. (2012).** Screening of antioxidant potential of *Citrullus colocynthis* methanolic extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4(5): 2507-2511.
- Miao J., Zhang J., Deng S., Dai B. (2012).** A new flavone *c*-glycoside from *Citrullus colocynthis*. *Chinese Herbal Medicines* 4(1): 1-3.
- Mir Sajad H., Baqui A., Bhagat R.C., Darzi M.M., Shah Abdul W. (2008).** Biochemical and Histomorphological Study of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (2): 359-364.
- Mosaddegha M., Naghibia F., Moazzenia H., Pirania A., Esmaeilia S. (2012).** Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer-Ahmad province of Iran. *Journal of Ethnopharmacology* 141: 80-95.

- Motala A., Ramaiya K. (2010).** Diabète: la pandémie silencieuse et son impact en Afrique subsaharienne. *Diabetes Leadership Forum*. Johannesburg, 30 septembre et 1 octobre.
- Muniasamy S., Pavaraj M., Rajan M. K. (2010).** Efficacy of the fruit extract of *Citrullus colocynthis* (L.) on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting *Vigna unguiculata* (L.). *Journal of Biopesticides* 3(1): 309 – 312
- Najafi S., Sanadgol N., Sadeghi Nejad B., Ashofteh Beiragi M., Sanadgol. (2010).** Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(22): 2321-2325.
- Natiq A R. H., Donald A. W., Nahia J. Y. (1989).** Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry* 28(4): 1271-1989.
- Nayab D., Ali D., Arshad N., Malik A., m. Choudhary I. Ahmed Z. (2006).** Cucurbitacin glucosides from *Citrullus colocynthis*. *Natural Product Research* 20(5): 409-413.
- Nayab D., Perveen S., Ahmed Z., Malik A. (2010).** New Pentacyclic Cucurbitane Glucosides from the Fruits of *Citrullus colocynthis* Schrad. *Helvetica Chimica Acta* 93: 1012-1018.
- Nehdi Imededdine A., Sbihi H., Tan Chin P., Al-Resayes Saud I. (2013).** Evaluation and characterisation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad seed oil: Comparison with *Helianthus annuus* (sunflower) seed oil. *Food Chemistry* 136: 348-353.
- Nmila R., Rchid H., Gross R., Manteghetti M., Ribes G., Petit P., Tijane M., Sauvaire Y. (2002).** Mise en évidence d'un effet insulino-stimulant de fractions de graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis* L. Schrader). *Biologie & Santé* 2(2): 88-99.
- Ogundele J. O., Oshodi A. A., Amoo I. A. (2012).** Comparative study of amino acid proximate composition of *Citrullus colocynthis* and *Citrullus vulgaris* seeds. *Pakistan journal of nutrition* 11(3): 247-251
- Oliver Chen C-Y.; Blumberg J. B. (2008).** Are There Age-Related Changes in Flavonoid Bioavailability? *Phytochemicals Aging and Health*, Chapter 2. *Taylor & Francis Group*.
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé. (2002).** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève.
- 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, Organisation Mondiale de la Santé. (2007).** Bureau régional de l'Afrique, prévention et contrôle du diabète: une stratégie pour la région africaine de l'OMS.
- Orban J.C., Ghaddab A., Chatti O., Ichai C. (2006).** Acidose lactique et metformine. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 25: 1046-1052.
- Ouadahi N., Berrah A. (2009).** Epidémiologie du diabète en Algérie. Le poids des chiffres actuels et à venir. *Association des Laboratoires d'Analyses Médicales* 2-3 Mai. Alger.
- Ozenda P. (2004).** Flore et végétation du Sahara. Troisième édition. *CNRS éditions, Paris* pp: 436-667.

- Papaccio G., Pisanti Francesco A., Latronico Michael V.G., Ammendola E., Galdieri M. (2000).** Multiple low-dose and single high-dose treatment with streptozotocin do not generate nitric oxide. *Journal of Cellular Biochemistry* 77:82–91.
- Park Soo N., Kim Sun Y., Lim Gyu N., Jo Na R., Lee Min H. (2012).** In vitro skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from Suaeda asparagoides extracts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18: 680-683.
- Pascal F. (2005).** Action et sécrétion de l'insuline double jeu pour les canaux potassiques. *Médecine et Santé* 21(8-9): 694-696.
- Phillipson David J. (2007).** Review: Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* 68: 2960-2972.
- Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4: 25-39.
- Povoski Stephen P., McCullough Patrick J., Zhou W., Bell Richard H Jr. (1993).** Induction of diabetes mellitus in syrian golden hamsters using stored equilibrium solutions of streptozotocine. *Laboratory Animal Science* 3(4): 310-314.
- Prabhakar P. K. and Doble M. (2008).** A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Current Diabetes Reviews* 4: 291-308.
- Preston Alan M. (1985).** Modification of streptozotocin-induced diabetes by protective agents. *Nutrition Research* 5: 435-446.
- 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.
- Raccah D. (2004).** Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie* 1: 29-42.
- Radermecker R.P. (2005).** Le risque hypoglycémique: Implications thérapeutique. *Rev Med Liège* 60: 461-465.
- Rahbar A.R., Nabjpour I. (2010).** The hypolipidimic effect of *Citrullus colocynthis* on patients with hyperlipidimia. *Pakistan Journal of Biological Science* 13(24):1202-1207.
- Rahimi R., Gholamreza A., Mohammad Reza Shams A. (2012).** A review on *Citrullus colocynthis* Schrad: from traditional Iranian medicine to modern phytotherapy. *The Journal Of Alternative And Complementary Medicine* 18 (6): 551-554.
- Ramdani M. (2010).** Rôle du centre de référence de diabétologie d'Oujda-Angad dans la prise en charge des malades diabétiques. *Mastère en management des services de santé-Institut National d'Administration Sanitaire (INAS). Oujda, Maroc.*
- Reddy V. P., Sudheshna G., Afsar S.K., Saran S. S., Kumar S.N., Raja C.R.Reddy K.R. (2012).** Evaluation of anti-ulcer activity of *Citrullus colocynthis* fruit against Pylorus ligation induced ulcers in male Wistar rats. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences* 4(2): 446-451.
- Rezvani M., Hassanpour M., Khodashenas M., Naseh G., Abdollahi M. Mehrpour O. (2011).** *Citrullus colocynthis* (bitter apple) poisoning; a case report. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology* 5(2): 25-27.

- Rifaai Rehab A., El-Tahawy Nashwa F., Saber Entesar A., Ahmed R. (2012).** Effect of quercetin on the endocrine pancreas of the experimentally induced diabetes in male albino rats: a histological and immunohistochemical study. *J. Diabetes Metab.* 3(3): 2-11.
- Roglic G., Unwin N. (2005).** Global mortality attributable to diabetes: time for a realistic estimate. *Diabetes Voice* 50: 33-34.
- Ronald S., Kenny G., Bruce A. P., Plotnikoff R.C., Riddell Michael C. (2008).** Activité physique et diabète. *Canadian journal of diabetes* 32: S41-S44.
- Roussel R., Larger É., Marre M. (2004).** Antidiabétiques oraux. *Correspondances en neurologie vasculaire* IV (1): I-II.
- Roy R.K., Thakur M., Dixit V.K. (2007).** Effect of *Citrullus colocynthis* on Hair Growth in Albino Rats. *Pharmaceutical Biology* 45(10): 739-744.
- Sachon C., Grimaldi A., Masseboeuf N., Rolland M. (2005).** Le diabète de type 2. Guide à l'usage des patients et de leur entourage. *Bash éditions médicales* p43-51.
- Sakurai T., Nishimura T., Otake N., Xinsheng Y., Abe K., Zeida M., Nagasawa H., Sakuda S. (2002).** Assamicin I and II, Novel Triterpenoid Saponins with Insulin-Like Activity from *Aesculus assamica* Griff. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 807-810.
- Sanadgol N., Najafi S., Ghasemi L. V., Motalleb G., Estakhr J. (2011).** A study of the inhibitory effects of *Citrullus colocynthis* (CCT) using hydro-alcoholic extract on the expression of cytokines: TNF- $\alpha$  and IL-6 in high fat diet-fed mice towards a cure for diabetes mellitus. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 3(6): 81-88.
- Saravana A. K., Kavimani S., Jayaveera K.N. (2011).** A review on medicinal plants with potential antidiabetic activity. *International Journal of Phytopharmacology* 2: 53-60.
- Sawaya W. N., Dagher N.J., Khalil J. K. (1986).** *Citrullus colocynthis* Seeds as a Potential Source of Protein for Food and Feed. *J. Agric. Food Chem* 34: 285-288.
- Schafferman D., Beharav A., Shabelsky E., Yaniv Z. (1998).** Evaluation of *Citrullus colocynthis*, a desert plant native in Israel, as a potential source of edible oil. *Journal of Arid Environments* 40: 43- 439.
- Sebbagh N., Cruciani-Guglielmacci C., Ouali, Berthault M.-F F. , Rouch C., Chabane Sari D., Magnan C. (2009).** Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes & Metabolism* 35: 178-184.
- Seger C., Sturm S., Mair M. E., Ellmerer E. P., Stuppner H. (2005).**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae). *Magn. Reson. Chem.* 43:489-491
- Sennoune S., Gerbi A., Duran Marie-Jose Â., Grillasca Joel-Paul, Compe Emmanuel, Pierre S., Planells R., Bourdeaux M., Vague P., Pieroni G., Maixent Jean-Michel. (2000).** Effect of streptozotocin-induced diabetes on rat liver  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Eur. J. Biochem.* 267: 2071-2078.
- Shafaei H., Esmaeili A., Rad Jafar S., Delazar A., Behjati M. (2012).** *Citrullus colocynthis* as a medicinal or poisonous plant: A revised fact. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(35): 4922-4927.

- Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M., Khoshnoodi M. (2007).** *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Contrôle* 18: 800-805.
- Sharma S., Dwivedi J., Jha A.K., Swapnil S. (2010).** Experimental models of diabetes. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 1(2): 292-301.
- Simon D. (2008).** Définition, dépistage et épidémiologie du diabète de type 2. *Médecine des maladies Métaboliques* Suppl.1: S5-S9.
- Singh N., Gupta M. (2007).** Regeneration of  $\beta$  cells in islets of Langerhans of alloxane diabetic rats by acetone extract of *Momordica charantia* (Linn.) (Bitter gourd) fruits. *Indian Journal of Experimental biology* 45: 1055-1062.
- Sonja Sturm and Hermann Stuppner. (2000).** Analysis of Cucurbitacins in Medicinal Plant by High-Pressure Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* 11: 121-127.
- Sultan A., Farman U. K., Iqbal H., Murad A. k., Ihsan U. K. (2010).** Evaluation of chemical analysis profile of *Citrullus colocynthis* growing in southern Areas of Khyber Pukhtunkhwa, Pakistan. *World Applied Sciences journal* 10(4): 402-405.
- Suman S. (2010).** Phytochemical investigation of *Sonchus oleraceus* leaves and *Citrullus colocynthis* root. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 4(2): 159-162.
- Szkudelski T. (2001).** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in  $\beta$ -cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.
- Taghreed A. I., El-Hefnawy H. M., El-Hela A. A. (2010).** Antioxidant potential and phenolic acid content of certain cucurbitaceous plants cultivated in Egypt. *Natural Product Research* 24(16): 1537-1545.
- Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z.H., Lyoussi B. (2007).** Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology* 110: 105-117.
- Talabani Namam S., Tofiq Diary I. (2012).** *Citrullus colocynthis* as a bioavailable source of  $\beta$ -sistosterol, antihyperlipidemic effect of oil in rabbits. *Int.J.Med.Arom.Plants* 2(3): 536-539.
- Talole B.B., Baheti D.G., More P.A. (2011).** Antihistaminic effect of *Citrullus colocynthis* Linn schard leaves. *Pharmacology online* : 468-472.
- Tan M.J., Ye J.M., Turner N., Hohnen Behrens C., Ke C., Q., Tang C., P., Chen T., Weiss H. C., Gesing E. R., Rowland A., James D. E., Ye Y. (2008).** Antidiabetic Activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chemistry and Biology* 15: 263-273.
- Tannin-Spitz T., Bergman M., Grossman S. (2007b).** Cucurbitacin glucosides: Antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364: 181-186.
- Tannin-Spitz T., Grossman S., Dovrat Sara, Gottlieb H.E., Bergman M. (2007a).** Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 73: 56- 67.

- Teodoro T., Zhang L., Alexander T., Yue J., Vranic M., Volchuk A. (2008).** Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *FEBS Letters* 582: 1375-1380.
- Thirunavukkarasu P., Ramkumar L., Ramanathan T., Silambarasan G. (2010).** Antioxydant activity of selected coastal medicinal plants. *World Journal Of Fish and Marine Science* 2(2): 134-137.
- Thissen J.P., Buyschaert M. (2005).** Actualités dans le traitement poly-médicamenteux du diabète sucre de type 2. *Louvain Médical* 124: 5-13.
- Thoennissen Nils H., Iwanski Gabriela B., Doan Ngan B., Okamoto R., Lin P., Abbassi S., Song Jee H., Yin D., Toh M., Xie Wei D., Said Jonathan W., Koeffler Phillip H. (2009).** Cucurbitacin B Induces Apoptosis by Inhibition of the JAK/STAT Pathway and Potentiates Antiproliferative Effects of Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* 69(14): 5876-5884.
- Tielmans A., Laloi-Michelin M., Coupaye M., Virally M., Meas T., Guillausseau P.J. (2007).** Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (première partie). *Presse Med* 36: 269-78.
- Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H. (2011).** Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1(1): 98-106.
- Torkey H.M., Abou-Yousef H.M., Abdel Azeiz A.Z., Hoda E.A. F. (2009).** Insecticidal Effect of Cucurbitacin E Glycoside Isolated from *Citrullus colocynthis* Against *Aphis craccivora*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(4): 4060-4066.
- Upendra R.M., Sreenivasulu M., Chengaiah B., Jaganmohan R.K., Madhusudhana C.C. (2010).** Herbal Medicines for Diabetes Mellitus. *International Journal of PharmTech Research* 2: 1883-1892.
- Vessal M., Hemmati M., Vasei M. (2003).** Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135:357-364.
- Vijayakumar M.V., Singh S., Chhipa R. R., Bhat M.K. (2005).** The hypoglycaemic activity of fenugreek seed extract is mediated through the stimulation of an insulin signalling pathway. *British Journal of Pharmacology* 146: 41-48.
- Vikrant A., Rohini S. (2011).** A review on fruits having anti-diabetic potential. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3: 204-212.
- Vishnu Prasad C.N., Anjana T., Banerji A., Gopalakrishnapillai A. (2010).** Gallic acid induces GLUT4 translocation and glucose uptake activity in 3T3-L1 cells. *FEBS Letters* 584: 531-536.
- Wadkar K.A., Magdum C.S., Patil S.S., Naikwade N.S. (2008).** Anti-diabetic potential and indian medicinal plants. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2: 45-50.
- Wang Z., Thurmond Debbie C. (2009).** Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis-roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *Journal of Cell Science* 122(7): 893-903.
- Wasfi I. A. (1994).** Some pharmacological Studies on *Citrullus colocynthis*. *Journal of Herbs, spices and Medicinal plants* 2 (2): 65-79.
- Wens J., Sunaert P., Nobels F., Feyen L., Crombruggen P.V., Bastiaens H., Royen P.V. (2005).** Recommandations de Bonne Pratique: Diabète sucré de type 2. *CEBAM* numéro 02.

- Wojdyło A., Oszmian´ski J., Czemerys R. (2007).** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.
- Wongsa P., Chaiwarit J., Zamaludien A. (2012).** *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry* 131: 964-971.
- Yoshikawa M., morikawa T, kobayashi H., nakamura A., Matsuhira K., nakamura S., matsuda H. (2007).** Bioactive Saponins and Glycosides. XXVII.1) Structures of New Cucurbitane-Type Triterpene Glycosides and Antiallergic Constituents from *Citrullus colocynthis*. *Chem. Pharm. Bull.* 55(3): 428-434.
- Youl E., Bardy G., Magous R., Cros G., Petit P., Bataille D., Oiry C. (2010a).** La quercétine potentialise la sécrétion d'insuline et protège la fonctionnalité des cellules INS-1 soumises à un stress oxydant exogène en sur-activant ERK1/2. *SFD (ALFEDIAM) Elsevier Masson SAS*: P217.
- Youl E., Bardy G., Magous R., Cros G., Sejalon F., Virsolvy A., Richard S., Quignard JF., Gross R., Petit P., Bataille D., Oiry C. (2010b).** Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br. J. Pharmacol.* 161: 799-814.
- Yun S.Y., Kim S.P., Song D.K. (2006).** Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on pancreatic beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 541: 115-121.
- Zabber A., Bhagat A., Gupta O.P., Gupta K., K., Ram G., Qazi G. N. (2008).** Insulin secretagogue fraction of *Argyrolobium roseus*. *Diabetologia Croatica* 37: 3-12.
- Zafar M., Naqvi Syed Naeem-ul-Hassan; Ahmed M., Kaimkhani Zahid A. (2009).** Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Morphol.*, 27(3):719-725.
- Zaman R.U. (2011).** Glycaemic evaluation of folk recipe (medicinal plants) in alloxan induced diabetic rabbits. *British Journal of Medicine & Medical Research* 1(2): 67-84.
- Zamani M., Rahimi A.O., Mahdavi R., Nikbakhsh M., Jabbari M. V., Rezazadeh H., Delazar A., Nahar L., Sarker S. D.(2007).** Assessment of anti-hyperlipidemic effect of *Citrullus colocynthis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(4): 492-496.
- Zaoui S., Biémont C., Meguenni K. (2007).** Approche épidémiologique du diabète en milieux urbain et rural dans la région de Tlemcen (Ouest algérien). *Cahiers Santé* 17(1) : 15-21.
- Zitouni Imounachen M. (2010).** Antidiabétiques oraux : les biguanides. *L'officinal* 81: 34-36.

## ***Publications***

## Antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* seed aqueous extracts in streptozotocin-induced diabetic rats

Nabila Benariba<sup>1</sup>, Rabeh Djaziri<sup>1</sup>, Bouchra Hanane Zerriouh<sup>1</sup>, Kebir Boucherit<sup>1</sup>, Karim Louchami<sup>2</sup>, Abdullah Sener<sup>2</sup>, Willy J. Malaisse<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Antibiotic and antifungal physico-chemistry, Synthesis and Biological activity, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algeria and <sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

(Received 2 November 2009, accepted 8 December 2009)

### ABSTRACT

The fruit of *Citrullus colocynthis* is traditionally used in Mediterranean countries as infusions to treat diabetes mellitus. The present study investigates the effects of a daily intraperitoneal administration, for a period of 14 days, of extracts from *Citrullus colocynthis* seeds on fasting glucose level, oral glucose tolerance test, body weight and food and fluid intake in streptozotocin-induced diabetic rats. Although the intraperitoneal injection of such extracts failed to affect significantly glycemia over a period of 180 min, glucose tolerance was improved after concomitant oral administration of glucose and an aqueous extract (E1). Even when the E1 extract was applied externally for 180 min, a trend towards improvement of glucose homeostasis was noticed in the diabetic rats. After one and two weeks of daily intraperitoneal injection of the plant extracts, the glycemia measured after overnight fasting was lower than that recorded in diabetic rats injected daily over the same period with saline. Under the same experimental conditions, the plant extracts prevented the decrease in body weight otherwise observed in the diabetic rats, despite a decrease in both fluid and food intake at the 7<sup>th</sup> and/or 14<sup>th</sup> day of these experiments. As a rule the wet weight of liver, pancreas, testis and kidneys, measured on day 15 failed to differ significantly in control and extract-treated diabetic rats. These findings thus document the beneficial long-term effects of *Citrullus colocynthis* seed streptozotocin-induced diabetic rats.

**KEY WORDS:** *Citrullus colocynthis* extracts, streptozotocin-induced diabetic rats, oral glucose tolerance test, body weight, food and fluid intake

### INTRODUCTION

Diabetes mellitus is the most common endocrine disease throughout the world. The International Diabetes Federation (IDF) estimates that, if current trends continue, the number of people with diabetes will almost double, from 194 million people in 2003 to 333 million by the year 2025 (1). In Algeria the prevalence of diabetes was estimated at 7.3 % (2). In this country, diabetic peoples currently use empirical plant preparations to manage their sickness. This fact is attributed to the lack of a current and regular medical treatment for this chronic illness and to the popular belief in the virtue of phytotherapy (3). The fruit of *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae) is traditionally used in Mediterranean countries as infusions to treat diabetes.

*Citrullus colocynthis* (L) Shard (Cucurbitaceae family) is commonly known as bitter apple, colocynthis or handal. It grows widely in the Arabian and Sahara deserts and all around the Mediterranean area (4). The fruit of *Citrullus colocynthis* is traditionally used in folk medicine for several remedies as purgative, anti-inflammatory and to treat hemorrhoids (5, 6). In Arabic countries, and in Algeria, it is recommended to treat diabetes (7-9). Some scientific studies have been conducted to evaluate the potential antidiabetic properties of *Citrullus colocynthis*, its effectiveness, and its acute toxicity in animal model. These studies concern mostly the hypoglycemic activity of different extracts of this plant.

An aqueous extract from rind of *Citrullus colocynthis* fruit was shown to exert a hypoglycemic and antihyperglycemic effect in normal and alloxan diabetic rabbits, this effect being attributed to saponin and

glycosidic components (10). In streptozotocin-induced diabetic rats, an aqueous extract (1.25 g/kg body weight) reduced significantly blood glucose levels over 10-30 days treatment (11). Previously, however, Wasfi (8), in a pharmacological study of *Citrullus colocynthis*, observed no effect of seed extracts on fasting blood glucose levels in normal and diabetic rats. Hydromethanolic (70 %) extracts of colocynthis administered to diabetic rabbits (100-200 mg/kg) produced no significant reduction of plasma glucose levels after 2 and 6 hours but blood glucose levels decreased during the third and the fifth day of study. A dose of 200 mg/kg caused fatal diarrhea on the sixth day of the experiments (12).

Other studies aimed at determining the possible mechanism involved in such antidiabetic properties, e.g. promotion of insulin secretion by pancreatic endocrine cells. Nmila et al. (13) demonstrated that some extract obtained from *Citrullus colocynthis* seeds, such as a free amino acid fraction, exerts an insulinotropic effect when tested in the isolated rat perfused pancreas and isolated rat islets. In streptozotocin-induced diabetic rats, diets enriched with colocynthis seed oil for 2 months decreased significantly hyperglycemia, when compared with sunflower or olive oil, this coinciding with a decrease of insulin resistance (HOMA) and restoration of pancreatic  $\beta$ -cell (14).

The major aim of the present work was to investigate the effects of daily intraperitoneal administration for a period of 14 days of an aqueous extract (E1) and a defatted aqueous extract (E2) from *Citrullus colocynthis* seeds, tested at a dose of 5 ml/kg in streptozotocin-induced diabetic rats (65 mg/kg), on fasting blood glucose levels during the 3 first hours after extract

## Short- and long-term effects of various *Citrullus colocynthis* seed extracts in normal and streptozotocin-induced diabetic rats

NABILA BENARIBA<sup>1,2</sup>, RABEH DJAZIRI<sup>1</sup>, BOUCHRA HANANE ZERRIOUH<sup>1</sup>,  
WAFAA BELLAKHDAR<sup>1</sup>, EMELINE HUPKENS<sup>2</sup>, ZAHIA BOUCHERIT<sup>1</sup> and WILLY J. MALAISSE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Antibiotic and Antifungal Physico-Chemistry, Synthesis and Biological Activity, Faculté des Sciences, University Abou Bekr Belakaid, Tlemcen, Algeria; <sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Received July 4, 2012; Accepted August 22, 2012

DOI: 10.3892/ijmm.2012.1127

**Abstract.** In the light of previous findings, the major aim of the present study was to investigate the potential beneficial effects of various *Citrullus colocynthis* L. seed extracts on such variables as glucose tolerance, body weight gain, pancreas, liver, kidney, testis, epididymal fat and diaphragm muscle weight, as well as serum cholesterol, triglyceride, urea, creatinine, transaminases and alkaline phosphatase concentrations in an animal model of type-1 diabetes mellitus, i.e. streptozotocin-induced diabetic rats. For purpose of comparison, a comparable study was conducted in normal rats. Both the immediate and long-term effects of the plant extracts were assessed in rats injected daily, up to 3 weeks after the start of the experiments. The results of this study reinforce the view that both a crude aqueous extract and a n-butanol extract from the *Citrullus colocynthis* L. seeds may represent the best candidates in order to eventually identify a component suitable for the treatment of both type-1 and type-2 diabetic subjects.

### Introduction

Several reports were recently published on the potential beneficial effects of *Citrullus colocynthis* extracts in animal models of diabetes mellitus (1-4). In light of these previous findings, the present study aimed mainly at assessing the effects of five distinct extracts from *Citrullus colocynthis* seeds, i.e. a crude and a defatted aqueous extract, an H<sub>2</sub>O-methanol extract, an ethyl acetate extract and a n-butanol extract on a number of metabolic variables in streptozotocin-induced diabetic rats. For the purpose of comparison, a comparable study was conducted

in normal rats, whilst a further group of STZ rats was exposed to glibenclamide. Both the short-term effects recorded over 180 min after the first intraperitoneal injection of each tested material and the long-term effects observed after daily injection up to three weeks after the onset of the experiments were examined in the present study.

### Materials and methods

Fresh fruit of *Citrullus colocynthis* were collected from desert area of Ain sefra (Algeria). The species was botanically authenticated. A voucher specimen of the plant is deposited in the herbarium of the Laboratory of Ecology, Box Cucurbitaceae, Code 2686 (University Es Senia-Oran, Algeria). Five extracts from *Citrullus colocynthis* seeds were used in the present experiments, namely a crude untreated aqueous extract, a defatted aqueous extract, an H<sub>2</sub>O-methanol extract, an ethyl acetate extract and a n-butanol extract. The aqueous extracts of *Citrullus colocynthis* L. seeds were prepared as described elsewhere (2). For the hydromethanolic extract, 50 g of seeds were ground and degreased in hexane. This material was heated and stirred 3 times for 3 h in water:methanol mixture (30:70). Then, after filtration and centrifugation, the recovered solution was divided into two volumes; one was evaporated to dryness and provided a hygroscopic red-orange residue (H<sub>2</sub>O-methanol extract; 4.5% dry matter). The second volume was used, after liquid-liquid extraction 3 times with ethyl acetate and n-butanol respectively, for the preparation of the ethyl acetate (orange powder 1.1% dry matter) and n-butanol (brown powder 1.2% dry matter) extracts.

Male Wistar rats weighing 208±3 g (n=72) at the onset of the present experiments were given free access to tap water and a commercial diet containing (w/w) 49.5% carbohydrate, 15.7% protein and 7.8% lipid. Forty-two of these rats were injected intraperitoneally with streptozotocin (65 mg/kg body wt.) dissolved in a citrate buffer (0.1 M, pH 4.5) one week before the onset of the experiments after overnight starvation.

A first blood sample was obtained on day zero after overnight fasting by puncture of the retro-orbital sinus. The animals were then injected intraperitoneally either with saline (5 ml/kg), glibenclamide (10 mg/kg), the crude or defatted aqueous extract (90 mg/kg), the H<sub>2</sub>O-methanol extract (100 mg/kg), the ethyl

---

*Correspondence to:* Professor Willy J. Malaisse, Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium  
E-mail: malaisse@ulb.ac.be

**Key words:** streptozotocin-induced diabetic rats, *Citrullus colocynthis* seed extracts, glucose homeostasis, body weight gain, serum cholesterol and triglyceride concentration

# Protective action of *Citrullus colocynthis* seed extracts against the deleterious effect of streptozotocin on both *in vitro* glucose-stimulated insulin release from rat pancreatic islets and *in vivo* glucose homeostasis

NABILA BENARIBA<sup>1,2</sup>, WAFAA BELLAJDHAR<sup>1</sup>, RABEH DJAZIRI<sup>1</sup>,  
EMELINE HUPKENS<sup>2</sup>, KARIM LOUCHAMI<sup>2</sup> and WILLY J. MALAISSE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Antibiotic and Antifungal Physico-Chemistry, Synthesis and Biological Activity, Faculty of Sciences, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria;

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Free University of Brussels, Brussels, Belgium

Received July 4, 2012; Accepted August 17, 2012

DOI: 10.3892/br.2012.5

**Abstract.** *Citrullus colocynthis* extracts improve glucose homeostasis in alloxan- or streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Little is known, however, regarding the protective effect of these extracts against the  $\beta$ -cytotoxic action of STZ. In the present study, an H<sub>2</sub>O-methanol extract was found to suppress the inhibition of glucose-stimulated insulin secretion by STZ in rat-isolated pancreatic islets. Similarly, when an aqueous extract from *Citrullus colocynthis* seeds was injected daily for 21 days prior to STZ administration, the perturbation of glucose homeostasis otherwise generated by the  $\beta$ -cytotoxic agent was minimized in rats.

## Introduction

*Citrullus colocynthis* extracts were reported to have beneficial effects on glucose homeostasis and body weight maintenance, in either alloxan- or streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (1,2). The present study aimed to examine the possible protective action of *Citrullus colocynthis* extracts against the diabetogenic actions of STZ, since information currently available on the subject is insufficient. (1). To this end, the *in vitro* effect of an H<sub>2</sub>O-methanol *Citrullus colocynthis* seeds extract on the deleterious effect of STZ in glucose-stimulated insulin secretion from isolated rat pancreatic islets was initially exam-

ined. Additionally, the protective action of an aqueous extract from *Citrullus colocynthis* seeds against the STZ-induced impairment of glucose homeostasis was investigated *in vivo* in rats.

## Materials and methods

The aqueous extract of *Citrullus colocynthis* seeds was prepared as described in a previous study (3). For the hydro-methanolic extract, 50 g of seeds were ground and defatted in hexane. This material was then heated and stirred 3 times for 3 h in a water:methanol mixture (30:70). Following filtration and centrifugation, the solution was evaporated until dry, and a hygroscopic red-orange residue (4.5% dry matter) was obtained.

STZ was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

The *in vitro* experiments were carried out in islet groups (n=8/group), obtained from fed female Wistar rats. Islets were prepared by the collagenase procedure (4) and incubated for two successive periods of 60 min each at 37°C in 1.0 ml of a salt-balanced medium (5) containing 1.0 mg/ml bovine serum albumin, 16.7 mM D-glucose and, as required, STZ (1.9mM) and/or the H<sub>2</sub>O-methanol extract (500  $\mu$ g/ml). The insulin content of the incubation media was measured using radioimmunoassay (6).

The *in vivo* experiments were carried out using female Wistar rats injected intraperitoneally with saline (5 ml/kg body wt.) or with crude aqueous extract (90 mg/kg body wt.), either daily for 21 successive days, or only once 24 h prior to the intraperitoneal injection of STZ (0.25 mmol/kg body wt.). The glycemia was measured in blood samples collected from the tail tip, using a glucometer (Accu-Chek).

The results are presented as the mean values ( $\pm$  SEM) with the number of individual determinations (n) or the degree of freedom (df). The statistical significance of differences between the mean values was assessed using the Student's t-test.

**Correspondence to:** Professor Willy J. Malaisse, Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium  
E-mail: malaisse@ulb.ac.be

**Key words:** *Citrullus colocynthis* extracts, streptozotocin, glucose-stimulated insulin release, rat isolated pancreatic islets, glycemia

## Insulinotropic action of *Citrullus colocynthis* seed extracts in rat pancreatic islets

NABILA BENARIBA<sup>1,2</sup>, RABEH DJAZIRI<sup>1</sup>, EMELINE HUPKENS<sup>2</sup>, KARIM LOUCHAMI<sup>2</sup>, WILLY J. MALAISSE<sup>2</sup> and ABDULLAH SENER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Antibiotic and Antifungal Physico-Chemistry, Synthesis and Biological Activity, Faculty of Sciences, University Abou Bekr Belakaid, Tlemcen, Algeria;

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Free University of Brussels, Brussels B-1070, Belgium

Received July 4, 2012; Accepted October 19, 2012

DOI: 10.3892/mmr.2012.1151

**Abstract.** The present study aimed to investigate the direct *in vitro* effects of several distinct *Citrullus colocynthis* seed extracts on glucose-stimulated insulin release from pancreatic islets isolated from rats. Six extracts were tested, a crude aqueous, defatted aqueous, ethyl acetate, H<sub>2</sub>O-methanol and n-butanol extract and an extract containing a major component (fraction A) identified by gel chromatography in the ethyl acetate, n-butanol and H<sub>2</sub>O-methanol extracts. Under selected experimental conditions, the majority of extracts exhibited a positive insulinotropic action, at least when tested in the presence of 8.3 mM D-glucose. The concentration-response correlation observed with distinct extracts revealed the participation of distinct chemical compounds, including compounds with an inhibitory insulinotropic potential, in the modulation of the insulin secretory response to D-glucose. The results of the present study are relevant for further investigations which aim to identify compounds exhibiting positive insulinotropic actions. These agents may be suitable for the treatment of human diabetic subjects.

### Introduction

*Citrullus colocynthis* belongs to the *cucurbitaceae* family and is a well-recognized plant in traditional medicine. The plant has been previously utilized in rural areas as a purgative, anti-diabetic, insecticide and antitumoral agent (1). In a previous study, the beneficial long-term effects of *Citrullus colocynthis* seed extracts on glucose homeostasis and body weight maintenance were documented in streptozotocin-induced diabetic rats (1).

---

*Correspondence to:* Professor Willy J. Malaisse, Laboratory of Experimental Medicine, Free University of Brussels, 808 Route de Lennik, Brussels B-1070, Belgium  
E-mail: malaisse@ulb.ac.be

**Key words:** *Citrullus colocynthis* extracts, glucose-stimulated insulin secretion, rat isolated pancreatic islets

The aim of the present study was to explore the direct *in vitro* effects of several distinct *Citrullus colocynthis* seed extracts on glucose-stimulated insulin release from rat isolated pancreatic islets.

### Materials and methods

***Citrullus colocynthis* extracts.** Six extracts from *Citrullus colocynthis* seeds were tested; a crude aqueous, defatted aqueous, ethyl acetate, H<sub>2</sub>O-methanol and n-butanol extract and an extract containing the major component of the ethyl acetate, n-butanol and H<sub>2</sub>O-methanol extracts, named fraction A.

***Extract preparation.*** The preparation of the crude aqueous and defatted extracts was reported in a previous study (1). For the hydromethanolic extract, 50 g of seeds was ground and degreased in hexane. This material was heated and stirred 3 times for 3 h in a H<sub>2</sub>O-methanol mixture (30/70). Following filtration and centrifugation, the recovered solution was divided into 2 volumes; one was solidified to form a hygroscopic red-orange residue (H<sub>2</sub>O-methanol extract; 4.5% dry matter). The second volume underwent liquid-liquid extraction 3 times with ethyl acetate and n-butanol, for the preparation of the ethyl acetate (orange powder; 1.1% dry matter) and n-butanol (brown powder; 1.2% dry matter) extracts, respectively.

***Thin layer chromatography.*** Following separation by thin layer chromatography, ethyl acetate, n-butanol and H<sub>2</sub>O-methanol extracts revealed the presence of a major single spot. Fractionation of these extracts on a column silica gel, using the elution system methanol/water (80/20), enabled material collection from these fractions (observed under UV light at 254 and 336 nm), which, following solidification, was referred to as fraction A (217 mg).

***Analysis of insulin release.*** For measurement of insulin release, groups of 8 islets prepared by the collagenase method (2) were incubated for 90 min at 37°C in 1.0 ml salt-balanced medium (3) containing 2.5 mg/ml bovine serum albumin and equilibrated against a mixture of O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (95-5, v-v). The insulin content of the incubation media was measured by radioimmunoassay (4). The present study was approved by



Contents lists available at ScienceDirect

## Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb



Document heading doi:

© 2013 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rights reserved.

## Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts

Nabila Benariba<sup>1,2\*</sup>, Rabeh Djaziri<sup>1</sup>, Wafaa Bellakhdar<sup>1</sup>, Nacera Belkacem<sup>1</sup>, Marcel Kadiata<sup>2</sup>, Willy J. Malaisse<sup>2</sup>, Abdullah Sener<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratory of Antibiotic and Antifungal Physico-Chemistry, Synthesis and Biological Activity, Faculté des Sciences, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, Algeria

## PEER REVIEW

## Peer reviewer

Cheriti Abdelkrim, Professor, Department of Chemistry, Phytochemistry & Organic synthesis laboratory, University of Bechar, Bechar, Algeria.

Fax: +213 49815244

E-mail: karimcheriti@yahoo.com

## Comments

The work and results obtained are interesting. Its will certainly enrich research into valorisation of medicinal plants as antioxidants source.

(Details on Page 39)

## ABSTRACT

**Objective:** To study the phytochemical screening of different extracts from *Citrullus colocynthis* (*C. colocynthis*) seeds extracts and to assess their antioxidant activity on the DPPH free radical scavenging. **Methods:** Phytochemical screening, total content of polyphenols and flavonoids of *C. colocynthis* seeds extracts, including a crude aqueous extract (E1), a defatted aqueous extract (E2), a hydromethanolic extract (HM), an ethyl acetate extract (EA) and a *n*-butanol extract (*n*-B) was carried out according to the standard methods and to assess their corresponding effect on the antioxidant activity of this plant. **Results:** None of these extracts contained detectable amount of alkaloid, quinone, anthraquinone, or reducing sugar. Catechic tannins and flavonoids were abundant in E1, HM and EA, whilst terpenoids were abundantly present in E1 and *n*-B but only weekly in HM. Coumarins were found in E2, EA and *n*-B. Polyphenols, expressed as gallic acid equivalent, amounted, per 100 g plant matter, to 329, 1002 and 150 mg in EA, HM and E1 respectively. Flavonoids, expressed as catechin equivalent, amounted, per 100 g plant matter to 620, 241 and 94 mg in EA, HM and E1 respectively. Comparable values were found in *n*-B and E1, with lower values in E2. Quercetin, myricetin and gallic acid were found in the EA and HM extracts by thin layer chromatography. The antioxidative effect of these extracts yielded, when tested at a concentration of 2000 µg/mL in a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay, a reducing percentage of 88.8% with EA, 74.5% with HM and 66.2% with E1, and corresponding IC<sub>50</sub> of 350, 580 and 500 µg/mL as compared to 1.1 µg/mL for ascorbic acid. **Conclusions:** These qualitative and quantitative analytical data document the presence in *C. colocynthis* extracts of such chemical compounds as flavonoids responsible for the antioxidant activity, as well as other biological activities of this plant.

## KEYWORDS

*Citrullus colocynthis*, Polyphenols, Flavonoids, Free radical scavenging

### 1. Introduction

Medicinal plants contain several active principles with specific therapeutic effects. They represent a source of chemical compounds such as tannins, flavonoids, saponins, resins and alkaloids with curative properties, often not provided by synthetic chemical compounds[1]. In Africa, 80% of the population use medicinal plants for primary health care. In traditional medicine, several medicinal plants are

used for the treatment of diabetes mellitus[2]. Ethnobotanic inquiries have recorded the plants used in such a perspective, among which *Citrullus colocynthis* (*C. colocynthis*) represent one of the most commonly used species[3,4].

Infusion prepared from the fruit and seeds of this plant from the cucurbitaceae family are indeed recommended to diabetic patients[5]. The chemical compounds identified in antidiabetic plants are often alkaloids and polyphenols, but also polysaccharides, gums and glycanes[2].

\*Corresponding author: Nabila Benariba, Department of Biology, University Abou Bekr Belkaid, 13000 Tlemcen, Algeria.

Tel: +213797538963

Fax: +21343261359

E-mail: benaribanabila@yahoo.fr

Article history:

Received 15 Sep 2012

Received in revised form 27 Oct 2012, 2nd revised form 15 Oct, 3rd revised form 22 Oct 2012

Accepted 28 Dec 2012

Available online 28 Jan 2013