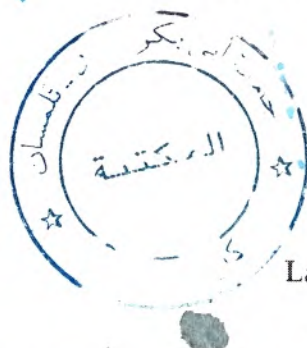


République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-

Mag 146/2

Faculté des sciences

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



Laboratoires de recherche

« Produits Naturels »

« Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

*Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, Option*

« Substances Naturelles, Activité Biologique et Synthèse »

Thème

Contribution à l'étude des propriétés  
antidiabétiques de *Punica granatum* L.  
(grenadier) chez le rat diabétique

Présenté par : M<sup>elle</sup> BELKACEM Nacéra

Soutenu devant le jury :

M <sup>r</sup> BOUCHERIT K.	Maître de conférences	Président	Université de Tlemcen
M <sup>me</sup> ATIK F.	Professeur	Examinatrice	Université de Tlemcen
M <sup>r</sup> LAHFA F.	Chargé de cours	Examineur	Université de Tlemcen
M <sup>r</sup> LOUDJEDI L.	Assistant spécialiste	Examineur	C.H.U. de Tlemcen
M <sup>r</sup> DJAZIRI R.	Maître de conférences	Promoteur	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2008-2009

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-  
Faculté des sciences  
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



Laboratoires de recherche  
« Produits Naturels »  
« Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

*Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, Option*

**« Substances Naturelles, Activité Biologique et Synthèse »**

Thème

Contribution à l'étude des propriétés  
antidiabétiques de *Punica granatum* L.  
(grenadier) chez le rat diabétique

Présenté par : M<sup>elle</sup> BELKACEM Nacéra

Soutenu devant le jury :

M <sup>r</sup> BOUCHERIT K.	Maître de conférences	Président	Université de Tlemcen
M <sup>me</sup> ATIK F.	Professeur	Examinatrice	Université de Tlemcen
M <sup>r</sup> LAHFA F.	Chargé de cours	Examineur	Université de Tlemcen
M <sup>r</sup> LOUDJEDI L.	Assistant spécialiste	Examineur	C.H.U. de Tlemcen
M <sup>r</sup> DJAZIRI R.	Maître de conférences	Promoteur	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2008-2009



## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur DJAZIRI R., Maître de conférences au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen-, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses encouragements et ses conseils judicieux tout le long de la réalisation de ce mémoire. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier profondément Monsieur BOUCHERIT K., Maître de conférences au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen-, et Directeur du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » pour avoir fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury.

Mes remerciements ainsi que ma reconnaissance s'adressent à Monsieur LAHFA F., Chargé de cours au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen- pour l'aide et pour les conseils qu'il m'a fournis tout le long de ma formation universitaire, je le remercie encore pour avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

J'exprime également mes sincères remerciements à Madame ATIK F. Professeur au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen- et responsable du Magister « Substances Naturelles » pour avoir accepté de discuter ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur LOUDJEDI L. Assistant spécialiste en endocrinologie au C.H.U. de Tlemcen pour avoir accepté de juger le travail.

Mes vifs remerciements et ma profonde gratitude s'adressent à Monsieur Serrano J.J. Professeur à l'Université de Montpellier pour ses conseils judicieux et ces orientations ainsi que ses encouragements et son aide tout le long de la réalisation de ce travail.

Ma profonde reconnaissance s'adresse à Monsieur CHABANE SARI D. Professeur au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen- pour l'aide qu'il ma donnée afin de réaliser ce mémoire.

J'exprime ma profonde gratitude et mes remerciements à Monsieur El HACI I. Etudiant en Magister « Substances Naturelles » pour l'aide et pour les conseils qu'il m'a apportés pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect.

Mes remerciements et ma profonde gratitude s'adressent aussi à M<sup>elle</sup> BENARIBA N. Chargée de cours et à M<sup>elle</sup> SEBBAGH N. Maître de conférences au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen- pour l'aide et pour les conseils judicieux qu'elles m'ont apportés tout le long de la réalisation de ce travail.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Monsieur AZZI R. Doctorant en Biologie pour l'aide qu'il ma donnée pour réaliser ce mémoire, je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et à Mr Rahmoun M.N. Ingénieur de laboratoire où le travail a été réalisé, pour sa présence et son aide précieuse.

Mes remerciements spéciaux à toute la promotion de Magister « Substances Naturelles, 2006 » pour leur collaboration et leur participation de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique» et toute l'équipe du laboratoire de recherche « Produits Naturels » en particulier M<sup>me</sup> BELARBI M. Maître de conférences au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen-.



## الملخص

نظرا للأعراض الجانبية الغير مرغوب فيها والتي تتسبب في ظهورها الأدوية المعالجة لمرض السكري، بالإضافة إلى تكلفتها العالية يتم البحث حاليا عن جزيئات طبيعية ذات فعالية وأكثر أمنا لعلاج هذا المرض المزمن انطلاقا من النباتات المستعملة في الطب التقليدي.

يهدف هذا البحث إلى تقييم فعالية المستخلص الخام الكحولي لقشر الرمان (*Punica granatum*) في تحسين مستوى السكر في الدم لدى الجرذان العادية و المصابة بداء السكري عن طريق حقن 50 مغ/كغ من الستربتوزوتوسين من جهة، و من جهة أخرى دراسة فعالية هذا المستخلص في تثبيط نشاط أنزيم الألفا أميلاز. تم اختبار هذا المستخلص عند جرذان التجارب عن طريق الفم و عن طريق الحقن على مستوى الصفاق بجرعتين مختلفتين هما على التوالي 400 مغ/كغ و 20 مغ/كغ حددنا على أساس درجة التسمم المتسببة في مقتل 50% من مجموعة الجرذان والتي بلغت 4000 مغ/كغ عن طريق الفم و 200 مغ/كغ عن طريق الحقن على مستوى الصفاق.

عند الجرذان العادية أظهرت النتائج المتحصل عليها أن المستخلص الخام لا يملك فعالية في خفض نسبة السكر عن مستواها العادي في الدم بالنسبة للجرعتين، في حين تمكن من منع ارتفاع نسبة السكر بعد خضوعها لتجربة سماحية الغلوكوز عن طريق الفم (غلوكوز 2.5 غ/كغ)، و قد كان الحقن على مستوى الصفاق ذو فعالية أكثر. عند الجرذان المصابة بداء السكري و بعد تتبع قصير المدى (4 سا) انخفضت النسبة المرتفعة للسكري في الدم بنسبة طفيفة بعد حقن المستخلص الخام على مستوى الصفاق، أما تناوله عن طريق الفم فلم يظهر أي فعالية.

قياس نسبة السكر في الدم لمدة أسبوعين عند الجرذان المصابة بالسكري بعد تناول يومي للجرعتين المذكورتين أنفا أظهر لنا انخفاض محسوس خلال الأسبوع الأول و الثاني. حيث تبين خلال الأسبوع الأخير أن هذا الإنخفاض كان أهم عند حقن المستخلص على مستوى الصفاق حيث بلغت نسبة الإنخفاض 46.6% أما عن طريق الفم فقد كانت النسبة 32.92%.

أما في ما يخص استقلاب الشحميات، أظهرت النتائج فعالية المستخلص في خفض نسبة الكوليستيرول و الغليسيريديت الثلاثية في مصل الجرذان المصابة بداء السكري والتي تم معاملتها لمدة أسبوعين. أما عن نشاط أنزيم الألفا أميلاز فقد تبين أن قشر الرمان يكتسب إمكانية تثبيط نشاط هذا الأنزيم بتركيز متوسطي بلغ 3.65 غ/ل.

**الكلمات المفتاحية:** داء السكري، الرمان، أعشاب طبية، ستربتوزوتوسين، تسمم، الألفا أميلاز، مالتوز، تثبيط الألفا أميلاز، نسبة السكري المرتفعة.

## Résumé

Ce travail porte sur la recherche des propriétés antidiabétiques de l'extrait brut « hydroalcoolique » de l'épicarpe de *Punica granatum* « Grenadier », plante utilisée traditionnellement dans le traitement du diabète sucré à travers le monde.

Cet extrait a été expérimenté d'une part sur des rats normaux et rendus diabétiques par la STZ (50 mg/kg p.c.) après la détermination de ses doses létales par voie orale et intrapéritonéale *in vivo*, d'autre part sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*.

La toxicité de cet extrait chez le rat Wistar révèle une  $DL_{50}$  de 4000 mg/kg p.c. par voie orale, et de 200 mg/kg p.c. par voie IP.

L'influence de l'extrait brut « hydroalcoolique » sur le taux de glucose sanguin chez les rats normaux et diabétiques nous a permis d'obtenir des résultats qui montrent que chez les rats normo glycémiques aucun effet hypoglycémiant n'a été observé à court et à long terme, par contre le test de tolérance orale au glucose chez les rats normaux révèle que l'extrait empêche l'augmentation du pic d'hyperglycémie provoquée par voie orale (glucose 2.5 g/kg p.c.).

Le suivi à court terme des rats diabétiques montre que l'administration par voie intrapéritonéale de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut provoque une faible diminution de l'hyperglycémie, tandis que par voie orale (400 mg/kg p.c.) aucune diminution n'a été observée.

De même, Chez les rats diabétiques, l'administration quotidienne de l'extrait se traduit par une diminution de l'ordre de 56% et 46.7% par voie orale et intrapéritonéale respectivement durant la première semaine, alors que la diminution a été plus importante durant la deuxième semaine par voie intrapéritonéale. De ce fait, l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* possède une activité antihyperglycémiant.

Sur le métabolisme lipidique, l'extrait brut provoque un effet hypolipidémiant pour les deux paramètres étudiés (Cholestérol et Triglycérides) chez les rats diabétiques après un suivi de deux semaines.

Les tests réalisés *in vitro* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase montrent un effet inhibiteur exercé par l'extrait brut de *Punica granatum* avec une  $IC_{50}$  de 3.65 g/l et un  $K_i$  de 1.25 g/l.

**Mots clés** : *Punica granatum*, diabète sucré, streptozotocine, plantes médicinales, Toxicité,  $\alpha$ -amylase, acide dinitrosalicylique, maltose, inhibition, hyperglycémie post-prandiale.



## Abstract

This study was designed to evaluate the antidiabetic effect of hydroalcoholic extract from *Punica granatum* peels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats and its potent  $\alpha$ -amylase inhibitory.

The toxicity evaluation of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* was determined in oral and intraperitoneal administration in rats. The oral LD<sub>50</sub> of the extract was found to be greater than 4 g/kg b.w. The intraperitoneal LD<sub>50</sub> was determined as 200 mg/kg b.w.

Antidiabetic effect of this extract was investigated after oral and intraperitoneal administration at dose of 400 mg/kg b.w. and 20 mg/kg b.w. respectively.

In normal fasted rats, all doses of the test drug extract showed no hypoglycaemic effect (short and long time), but were found to be depressing the peak value of blood glucose after oral glucose tolerance (glucose 2.5 g/kg b.w.).

In streptozotocin-induced diabetic rats, intraperitoneal administration of 20 mg/kg b.w. of the extract led to lowering effect in blood glucose level. The fall was seen at 1h and remained up 3 h after administration of the test drug extract but not in orale administration.

After 2-weeks of daily treatment in streptozotocin-induced diabetic rats, plasma glucose levels were increased after oral and intraperitoneal administration of hydroalcoholic extract from *Punica granatum* peels by 32.92% and 46.6% respectively.

However, this extract showed hypolipidemic effect (Cholesterol, triglycerides) in streptozotocin-induced diabetic rats.

Finally, the crude hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peels showed strong inhibitory activity for  $\alpha$ -amylase activity with an IC<sub>50</sub> value at 3.65 g/l and Ki at 1.25 g/l.

**Key words:** *Punica granatum*, diabetes mellitus, streptozotocin, medicinal plants, toxicity,  $\alpha$ -amylase, dinitrosalicylic acid, maltose, inhibition, post-prandial hyperglycaemia.

## Liste des abréviations

ADA	American Diabetic Association.
AE	Activité enzymatique
CHE	Cholestérol esterase
CHOD	Cholesterol oxydase
DID	Diabète Insulino-Dépendant
DL <sub>100</sub>	Dose létale de 100% de la population
DL <sub>50</sub>	Dose létale de 50% de la population
DNID	Diabète Non Insulino-Dépendant
DOD	Densité optique de dosage
DOE	Densité optique de l'Etalon
Fig.	Figure
GK	Glycérol kinase
GPO	Glycerol-3-Phosphate oxidase
HDL	High Density Lipoprotein.
HGPO	Hyperglycémie provoquée par voie orale
I	Inhibiteur
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice de 50% d'une activité
IP	Intrapéritonéale
K <sub>m</sub>	Constante de Mechaelis
K <sub>i</sub>	Constante d'inhibition
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipo protéine lipase
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
OMS	Organisation Mondiale de la Santé.
p.c.	Poids corporel
POD	Peroxydase
PPAR <sub>γ</sub>	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
S	Substrat
STZ	Streptozotocine
Tabl.	Tableau
Tps	Temps
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study Group.
V <sub>i</sub>	Vitesse initiale
V <sub>max</sub>	Vitesse maximale
α	Alpha
β	Bêta
<	Inférieur
>	Supérieur

## Liste des unités

Da	Dalton
g	Gramme
g/kg	Gramme par kilogramme
g/l	Gramme par litre
Kg	Kilogramme
L	Litre
M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mMol	Millimole
mMol/min	Millimole par minute
t/min	Tours par minute
T°	Température
UI	Unité internationale
%	Pourcentage
μ	micro
H	Heure
°C	Degré Celsius



## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Critère de diagnostique du diabète sucré et des troubles de la glycorégulation.....	3
<b>Tableau 02</b> : Classification étiologique des diabètes sucrés.....	4
<b>Tableau 03</b> : Les cinq classes d'antidiabétiques oraux avec leurs avantages et inconvénients spécifiques....	10
<b>Tableau 04</b> : Quelques plantes antidiabétiques utilisées dans le monde et leur principe actif isolé.....	13
<b>Tableau 05</b> : Quelques constituants chimiques de différentes parties de <i>Punica granatum</i> .....	16
<b>Tableau 06</b> : Quelques activités biologiques de <i>Punica granatum</i> citées dans la littérature scientifiques.....	19
<b>Tableau 07</b> : Composition de l'aliment AL ALF en pourcentage.....	26
<b>Tableau 08</b> : Les différentes doses administrées par voie orale et IP pour la détermination des doses létales de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> .....	26
<b>Tableau 09</b> : Répartition des rats normaux pour l'étude à court terme de l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica grantum</i> .....	28
<b>Tableau 10</b> : Répartition des rats normaux pour l'étude à long terme de l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> .....	28
<b>Tableau 11</b> : Répartition des rats normaux soumis à un test d'HGPO.....	29
<b>Tableau 12</b> : Répartition des rats diabétiques pour l'étude à court terme de l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> .....	30
<b>Tableau 13</b> : Préparation de la gamme d'étalonnage du maltose.....	35
<b>Tableau 14</b> : Résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> .....	38
<b>Tableau 15</b> : Effet de différentes doses d'extrait brut administrées par voie orale sur le comportement des rats.....	39
<b>Tableau 16</b> : Effet de différentes doses d'extrait brut administrées par voie IP sur le comportement des rats.....	40
<b>Tableau 17</b> : Chimie des urines des rats rendus diabétiques par la STZ.....	41
<b>Tableau 18</b> : Variation de la glycémie à court terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	43
<b>Tableau 19</b> : Variation de la glycémie à court terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie IP.....	43
<b>Tableau 20</b> : Variation de la glycémie à long terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	46
<b>Tableau 21</b> : Variation de la glycémie à long terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie IP.....	46
<b>Tableau 22</b> : Variation de la glycémie chez les rats normaux soumis à une HGPO et traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	49
<b>Tableau 23</b> : Variation de la glycémie chez les rats normaux soumis à une HGPO et traités par l'extrait brut de l'épicarpe <i>Punica granatum</i> par voie IP.....	49



<b>Tableau 24</b> : Variation de la glycémie à court terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de l'épicarpe <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	53
<b>Tableau 25</b> : Variation de la glycémie à court terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de l'épicarpe <i>Punica granatum</i> par voie IP.....	53
<b>Tableau 26</b> : Variation de glycémie à long terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	56
<b>Tableau 27</b> : Variation de la glycémie à long terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de l'épicarpe <i>Punica granatum</i> par voie IP.....	56
<b>Tableau 28</b> : Les valeurs moyennes des triglycérides plasmatiques chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	60
<b>Tableau 29</b> : Les valeurs moyennes du cholestérol total chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	60
<b>Tableau 30</b> : Les valeurs moyennes des triglycérides plasmatiques chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut par voie IP.....	63
<b>Tableau 31</b> : Les valeurs moyennes du cholestérol total chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut par voie IP.....	63
<b>Tableau 32</b> : Les valeurs moyennes du poids corporel des rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie orale.....	66
<b>Tableau 33</b> : Les valeurs moyennes du poids corporel chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> par voie IP.....	67
<b>Tableau 34</b> : Les vitesses initiales de la réaction enzymatique à différentes concentrations d'amidon.....	69
<b>Tableau 35</b> : Les vitesses initiales obtenues après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en absence et en présence de différentes concentrations de l'extrait brut.....	72
<b>Tableau 36</b> : Les vitesses maximales obtenues en présence et en absence de l'extrait brut .....	73
<b>Tableau 37</b> : Les vitesses initiales et les pourcentages d'inhibition obtenus après hydrolyse enzymatique de 5g/l d'amidon en présence de différentes concentrations de l'extrait brut .....	74
<b>Tableau 38</b> : Les vitesses initiales obtenues en absence et en présence de différentes concentrations d'Acarbose.....	78
<b>Tableau 39</b> : Les vitesses maximales obtenues en absence et en présence de différentes concentrations d'Acarbose.....	79
<b>Tableau 40</b> : Les vitesses initiales et les pourcentages d'inhibition obtenus après hydrolyse enzymatique de 5g/l d'amidon en présence de différentes concentrations d'acarbose.....	80
<b>Tableau 41</b> : Paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase ( $V_{max}$ et $K_m$ ) déterminés en absence et en présence de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> et de l'acarbose.....	82
<b>Tableau 42</b> : Les vitesses initiales, les pourcentages d'inhibition, l' $IC_{50}$ et le $K_i$ obtenus en présence de l'extrait brut et de l'acarbose dans le milieu réactionnel.....	82



## Liste des figures

Figure 01 : <i>Punica granatum</i> .....	14
Figure 02 : Fruits de <i>Punica granatum</i> de la région de Tafna « Tlemcen ».....	22
Figure 03 : Représentation schématique des tests phytochimiques.....	24
Figure 04 : Variation de la glycémie 48h après l'injection IP de la STZ aux rats d'expérimentation.....	42
Figure 05 : Variation du poids corporel 48h après l'injection IP de la STZ aux rats d'expérimentation.....	42
Figure 06: Evolution de la glycémie durant 3h. suite à l'administration par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (400mg/kg p.c) chez les rats normaux.....	44
Figure 07 : Evolution de la glycémie durant 3h. suite à l'administration par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (20mg/kg p.c) chez les rats normaux.....	44
Figure 08 : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (400mg/kg p.c.) chez les rats normaux...	47
Figure 09 : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (20mg/kg p.c.) chez les rats normaux.....	47
Figure 10 : Evolution de la glycémie des rats normaux ayant une HGPO traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> administré par voie orale (400mg/kg p.c.).....	50
Figure 11 : Evolution de la glycémie des rats normaux ayant une HGPO et traités par l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> administré par voie IP (20mg/kg p.c.).....	50
Figure 12: Evolution de la glycémie durant 3h. suite à l'administration par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (400mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques.....	54
Figure 13 : Evolution de la glycémie durant 3h. suite à l'administration par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (20mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques.....	54
Figure 14 : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (400mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques	57
Figure 15 : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (20mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques.....	57
Figure 16 : Courbe d'étalonnage de maltose (Méthode de Bernfeld (1955), « λ540nm »).....	68
Figure 17 : Effet des différentes concentrations d'amidon sur l'activité enzymatique de l'α-amylase.....	68
Figure 18 : Représentation linéaire en double inverse de <i>Lineweaver et Burk</i> ( $1/V_i = f(1/[S])$ ).....	70
Figure 19 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de l'extrait brut à 2.5g/l en fonction du temps.....	71
Figure 20 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de l'extrait brut à 5g/l en fonction du temps.....	71
Figure 21 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de l'extrait brut à 10g/l en fonction du temps.....	71
Figure 22 : Représentation de <i>Lineweaver Burk</i> ( $1/V_i = f(1/[S])$ ) en absence et en présence de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> .....	73

Figure 23 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de l'amidon à 5g/l en présence de différentes concentrations de l'extrait brut .....	74
Figure 24: Courbe logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de de l'extrait brut .....	75
Figure 25 : Représentation de Dixon : $1/V_i=f [I]$ « I= Extrait brut ».....	76
Figure 26 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence d'acarbose à 1.25g/l en fonction du temps.....	77
Figure 27 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence d'acarbose à 2.5g/l en fonction du temps.....	77
Figure 28 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence d'acarbose à 5g/l en fonction du temps.....	77
Figure 29 : Représentation de <i>Lineweaver Burk</i> « $1/V_i=f (1/[S])$ » en absence et en présence de différentes concentrations d'acarbose.....	79
Figure 30 : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique d'amidon à 5g/l en présence de différentes concentrations d'acarbose .....	80
Figure 31 : Courbe logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'acarbose.....	81
Figure 32 : Représentation de Dixon $1/V_i=f[I]$ « I= Acarbose ».....	81



# Sommaire

Introduction générale.....	1
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Le diabète sucré</b>	
I-Définition du diabète sucré.....	3
II-Critères de diagnostic.....	3
III-Classification du diabète sucré .....	4
IV-Les deux principaux types de diabète sucré.....	5
IV-1- Le diabète de type 1.....	5
IV-2- Le diabète de type 2.....	5
V-Complications du diabète sucré.....	6
V-1- Complications aiguës.....	6
V-2- Complications chroniques.....	6
VI-Traitement du diabète sucré.....	8
VI-1- Traitement du diabète de type 1.....	8
VI-2- Traitement du diabète de type 2.....	8
<b>Chapitre II : La phytothérapie et le diabète sucré</b>	
I- Introduction.....	11
II- Les plantes médicinales à activités antidiabétiques.....	11
III- <i>Punica granatum</i> .....	14
III-1- Description botanique.....	14
III-2- Classification botanique.....	15
III-3-Noms communs.....	15
III-4- Composition chimique .....	15
III-5- Utilisation traditionnelle de <i>Punica granatum</i> .....	18
III-6- Activités biologiques de <i>Punica granatum</i> .....	18
III-7- <i>Punica granatum</i> et le diabète sucré.....	20
<b>Partie II : Partie expérimentale</b>	
<b>Chapitre I : Matériel et méthodes</b>	
I- Matériel végétal.....	22
I-1- Récolte et préparation.....	22
I-2- Analyses phytochimiques.....	23
I-3- Extraction du matériel végétal.....	23
II- Expérimentation animale.....	26
II-1- Les animaux.....	26

II-2- Toxicité de l'extrait brut.....	26
II-3- Induction du diabète expérimental.....	27
II-4- Effets antidiabétiques de l'extrait brut <i>in vivo</i> .....	27
II-4-1-Effet chez rats normo glycémiques.....	27
II-4-2-Effet sur la régulation de l'hyperglycémie temporaire (HGPO).....	29
II-4-3-Effet sur la régulation de l'hyperglycémie permanente (rats diabétiques).....	29
II-4-4-Effet sur la régulation de quelques paramètres lipidiques.....	30
II-4-5-Effet sur l'évolution du poids corporel.....	30
II-4-6-Techniques analytiques des paramètres plasmatiques.....	31
II-4-7- Analyse statistique des données.....	33
III- Effet de l'extrait brut sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase <i>in vitro</i> .....	34
III-1- Matériels.....	34
1- Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA).....	34
2- Solution de l' $\alpha$ -amylase.....	34
3- Solutions de substrat.....	34
4- Solutions de l'extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> .....	34
5- Solutions d'acarbose.....	35
6- Solution de maltose (courbe d'étalonnage).....	35
III-2- Méthodes.....	36
1-Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bernfeld (1955).....	36
2-Mesure de la vitesse initiale.....	36
3-Détermination des paramètres cinétique de l' $\alpha$ -amylase.....	37
4-Détermination des paramètres cinétiques en présence de l'extrait brut et l'acarbose.....	37

## Chapitre II : Résultats et interprétation

I- Analyses phytochimiques.....	38
II-Rendement de l'extraction de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> .....	39
III-Toxicité de l'extrait brut de <i>Punica granatum</i> .....	39
IV-Induction du diabète par la STZ.....	41
V-Effets antidiabétiques de l'extrait brut <i>in vivo</i> .....	43
V-1-Effet chez les rats normo glycémiques.....	43
V-2-Effet sur la régulation de l'hyperglycémie temporaire.....	49
V-3-Effet sur la régulation de l'hyperglycémie permanente.....	53
V-4-Effet sur la régulation de quelques paramètres lipidiques.....	60
V-5-Effet sur l'évolution du poids corporel.....	66



VI-Effet de l'extrait brut sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase <i>in vitro</i> .....	68
VI-1-Courbe d'étalonnage.....	68
VI-2-La cinétique enzymatique de l' $\alpha$ -amylase en absence d'extrait brut.....	68
VI-2-1-Mesure des vitesses initiales.....	68
VI-2-2- Détermination des paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase.....	69
VI-3-La cinétique enzymatique en présence de l'extrait brut.....	70
VI-3-1-Mesure des vitesses initiales en présence de l'extrait brut.....	72
VI-3-2-Détermination du mécanisme d'inhibition exercé par l'extrait brut.....	72
VI-3-3-Détermination des pourcentages d'inhibition et l'IC <sub>50</sub> de l'extrait brut.....	74
VI-3-4-Détermination de la constante d'inhibition (K <sub>i</sub> ).....	75
VI-4- La cinétique enzymatique en présence d'acarbose.....	76
VI-4-1-Mesure des vitesses initiales en présence d'acarbose.....	78
VI-4-2-Détermination du mécanisme d'inhibition exercé par l'acarbose.....	78
VI-4-3-Détermination des pourcentages d'inhibition et l'IC <sub>50</sub> de l'acarbose.....	80
VI-4-4-Détermination de la constante d'inhibition (K <sub>i</sub> ).....	81
VI-4-5-Comparaison entre l'effet de l'extrait brut et de l'acarbose sur l'activité de l' $\alpha$ amylase.....	82
<b>Discussion</b> .....	<b>84</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>97</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>99</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>113</b>

# Introduction



Le diabète sucré est devenu un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Il touche environ 194 millions de personnes à l'heure actuelle dont 90% sont des diabétiques de type 2 [OMS et FID, 2004].

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

Le traitement actuel de cette maladie est efficace dans la baisse de la glycémie. Cependant le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas, ce qui conduit à long terme à l'émergence des complications très sérieuses conduisant à une morbidité et une mortalité importante.

Pour les diabétiques de type 1 et devant l'insulinopénie absolue, l'insulinothérapie reste le seul moyen pour contrôler le désordre glucidique [Gin et Rigalleau, 1999]. Pour les diabétiques de type 2, les antidiabétiques oraux en premier et l'insulinothérapie en cas d'échec sont les seuls disponibles pour atténuer l'hyperglycémie chronique [Domus, 1998] ; [Edelman, 1998].

Actuellement dans le monde, le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon alarmante. L'impact de cette pathologie sur les systèmes de santé est très lourd à travers les pertes humaines et les coûts élevés liés aux soins, ainsi que la prise en charge des malades. Les médicaments antidiabétiques disponibles visent à soigner et non à guérir la maladie. Au cours de ces dernières décennies, une attention particulière a ciblé l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement et le contrôle de cette maladie conformément aux recommandations de l'OMS [OMS, 2002b].

L'essor récent de la phytothérapie offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques [Hamdan et Afifi, 2004].

Les informations ethnobotaniques recueillies dans plusieurs régions du monde estiment que plus de 1200 espèces végétales, soit plus de 725 genres appartenant à 183 familles sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes [Marles et Farnsworth, 1995].

La richesse et la biodiversité végétale en Algérie, méritent d'être explorées dans le domaine de la recherche de molécules antidiabétiques originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication.

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

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des propriétés antidiabétiques présumées de cette plante. L'épicarpe de ses fruits est la partie utilisée dans le traitement traditionnel dans la plupart des pays.

Ces propriétés nécessitent d'être expérimentées chez un modèle de rats ayant un diabète expérimental induit par la STZ ainsi que chez les rats normaux. Le suivi de ces animaux est effectué à court et à long terme en deux voies d'administration, la voie orale et la voie intrapéritonéale à des doses différentes d'un extrait brut « hydroalcoolique » préparé à partir de l'épicarpe de *Punica granatum*.

Une autre approche thérapeutique du diabète sucré est de diminuer l'hyperglycémie post-prandiale par le ralentissement de l'absorption intestinale de glucose par l'inhibition des enzymes responsables de l'hydrolyse des hydrates de carbones comme l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase [Rhabasa et Chiasson, 2004] ; [Kim *et al.*, 2004].

Afin d'évaluer la place de *Punica granatum* dans cette approche nous avons étudié l'effet de l'extrait brut de son épicarpe sur l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae in vitro*.



# Partie I: Synthèse bibliographique

## Chapitre I: Diabète sucré

## I- Définition du diabète sucré

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

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

## II- Critères de diagnostic

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

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

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

Une glycémie à jeun modérément augmentée (1.1 g/l mais <1.26 g/l) correspond à une glycémie à jeun anormale (Impaired Fasting Glycemia) ; état qui induit un trouble de l'homéostasie glucidique, alors que l'intolérance au glucose est définie par une glycémie de 1.4 g/l mais < 2 g/l à la 120<sup>ème</sup> minute de l'HGPO [Wens *et al.*, 2007] ; [Rodier, 2001] (Tabl. 01).

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

[Alberti et Zimmet, 1998]

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



### III- Classification du diabète sucré

La classification étiologique du diabète sucré proposée par l'ADA et l'OMS figure dans le tableau 02.

<b>Tableau 02 : Classification étiologique des diabètes sucrés [Comité d'Expert..., 1997]</b>	
<p><b>I- Diabète de type 1 :</b> destruction des cellules<math>\beta</math>, conduisant à une carence absolue en insuline.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• D'origine immunologique</li> <li>• Idiopathique</li> </ul> <p><b>II- Diabète de type 2 :</b> spectre variable, d'une résistance à l'action de l'insuline prédominante avec déficit insulinosécrétoire relatif à un déficit insulinosécrétoire prédominant avec résistance à l'action de l'insuline.</p> <p><b>III. Autres types de diabète spécifiques</b></p> <p><i>A. Défauts génétiques de la fonction des cellules<math>\beta</math>.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Chromosome 12, HNF-1 (anciennement Mody 3)</li> <li>2. Chromosome 7, glucokinase (anciennement Mody 2)</li> <li>3. Chromosome 20, HNF-4 (anciennement Mody 1)</li> <li>4. Mutation de l'ADN mitochondrial</li> <li>5. Autres</li> </ol> <p><i>B. Défauts génétiques de l'action de l'insuline</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Insulinorésistance de type A</li> <li>2. Lépréchaunisme</li> <li>3. Syndrome de Rabson-Mendenhall</li> <li>4. Diabète lipoatrophique</li> <li>5. Autres</li> </ol> <p><i>C. Diabètes pancréatiques</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pancréatites</li> <li>2. Traumatisme/pancréatectomie</li> <li>3. Cancer du pancréas</li> <li>4. Mucoviscidose</li> <li>5. Hémochromatose</li> <li>6. Pancréatite fibrocalculeuse</li> <li>7. Autres</li> </ol> <p><i>E. Diabètes induits par des médicaments ou des toxiques</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vacor (raticide)</li> <li>2. Pentamidine</li> <li>3. Acide nicotinique</li> <li>4. glucocorticoïdes</li> <li>5. Hormones thyroïdiennes</li> <li>6. Diazoxide</li> <li>7. Agonistes <math>\beta</math>-adrénergiques</li> <li>8. Diurétiques thiazidiques</li> <li>9. Diphenylhydantoïne</li> <li>10. Interféron-<math>\alpha</math></li> <li>11. Autres</li> </ol>	<p><i>F. Infections</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rubéole congénitale</li> <li>2. Cytomégalovirus</li> <li>3. Autres</li> </ol> <p><i>D. Endocrinopathies</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acromégalie</li> <li>2. Syndrome de Cushing</li> <li>3. Glucagonome</li> <li>4. Phéochromocytome</li> <li>5. Hyperthyroïdie</li> <li>6. Somatostatine</li> <li>7. Hyperaldostéronisme primaire</li> <li>8. Autres</li> </ol> <p><i>G. Formes rares de diabètes liés à une pathologie du système immunitaire</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. syndrome de "Stiff-man"</li> <li>2. Anticorps dirigés contre le récepteur de l'insuline</li> <li>3. Autres</li> </ol> <p><i>H. Autres syndromes génétiques s'accompagnant parfois d'un diabète</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Syndrome de Down (trisomie 21)</li> <li>2. Syndrome de Klinefelter</li> <li>3. Syndrome de Turner</li> <li>4. Syndrome de Wolfram</li> <li>5. Ataxie de Friedreich</li> <li>6. Chorée de Huntington</li> <li>7. Syndrome de Lawrence-Moon-Biedl-Bardet</li> <li>8. Dystrophie myotonique (Steinert)</li> <li>9. Porphyries</li> <li>10. Syndrome de Prader-Willi-Labhart</li> <li>11. Autres.</li> </ol> <p><b>IV. Diabète gestationnel</b></p>

## IV- Les deux principaux types du diabète sucré

### IV-1- Le diabète de type 1

Il correspond à l'ancienne terminologie du diabète insulino-dépendant « DID » qui représente environ 10% de tous les cas de diabète à l'échelle mondiale et survient généralement à l'enfance.

Il s'agit d'une maladie auto-immune caractérisée par une destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques dont 80% de ces cellules sont touchées aboutissant habituellement à une carence absolue en insuline « insulino-pénie » [Drouin *et al.*, 1999] ; [Cerasi *et al.*, 1997] .

Fondamentalement, pour la constitution du diabète de type 1 il faut :

- Une prédisposition immunogénétique ;
- Facteurs déclenchants (facteurs environnementaux) ;
- Réaction auto-immune dirigée contre les cellules  $\beta$ , à laquelle participent des lymphocytes T auto réactifs, cytotoxiques, des cytokines et des anticorps [Spinass *et Lehmann*, 2001].

### IV-2- Le diabète de type 2

Anciennement appelé le diabète non insulino-dépendant « DNID ». Il est beaucoup plus fréquent et représente environ 90% de l'ensemble des cas mondiaux. Il survient le plus souvent chez l'adulte, mais on l'observe aussi chez les adolescents [OMS, 2002a].

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

Il est caractérisé par :

- Une insulino-résistance dominante avec insulino-pénie relative ; ou
- Une diminution prédominante de l'insulino-sécrétion associée ou non à une insulino-résistance [Drouin *et al.*, 1999] ; [Girard, 1999].

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

Plusieurs facteurs favorisent le déclenchement du diabète de type 2 :

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



## V- Complications du diabète sucré

Le diabète sucré est un important problème de santé publique dont la fréquence augmente de plus en plus. Il aboutit à des complications sévères aiguës ou chroniques.

### V-1- Complications aiguës

- **L'hypoglycémie** : elle apparaît suite à un excès relatif d'insuline dans le sang et débouche sur des valeurs glycémiques exceptionnellement basses [ADA, 2005]. Elle survient aussi dans une large mesure exclusivement chez les patients traités par les sulfamides hypoglycémiant même à faible dose [Marker *et al.*, 1992].

- **Acidocétose** : est la résultante clinique et biologique d'un trouble métabolique, ionique et hydrique liée à la carence absolue ou relative en insuline [Tournaire, 1994]. Lorsqu'il y a cette carence importante en insuline et une insuffisance d'apport de substrats énergétiques, la lipolyse et la céto-genèse augmentent, entraînent l'hyperglycémie, forte augmentation de la diurèse (risque de déshydratation) et chute de pH sanguin [Rodier, 2001].

- **Coma hyperosmolaire** : le facteur déclenchant de l'hyperglycémie (infections, accidents vasculaires cérébraux, corticothérapie...) s'associe fréquemment à un facteur de déshydratation avec une insuffisance rénale caractérisée par une augmentation du seuil rénal de glucose [Perlemuter et collin, 2003] ; [Pinies *et al.*, 1994].

- **Acidose lactique** : caractérisée par une hyperlactatémie (acidose métabolique sévère). C'est une complication rare mais de pronostic très sévère ; elle révèle presque toujours du non respect de contre indication ou précaution d'emploi de la metformine. Ceci contre indique l'administration de cette famille d'antidiabétiques oraux, en cas d'insuffisance cardiaque ou hépatique importante et d'insuffisance rénale [Halimi, 2003].

### V-2- Complications chroniques

Il existe deux types de complications chroniques, les complications liées à la microangiopathie et regroupent la rétinopathie, néphropathie et la neuropathie, et celles liées à la macroangiopathie et regroupent les complications cardiovasculaires [Duron et Heurtier, 2006].

#### a/ Les complications microangiopathiques

Elles sont cliniquement responsables de l'atteinte des capillaires rétiens et glomérulaires rénaux et aussi nerveux.

Les complications microangiopathiques (rétinopathie, néphropathie et neuropathie) sont la conséquence d'une toxicité directe du glucose, avec amplification des voies métaboliques intracellulaires [Wolffenbuttel et Van Haefden, 1995].

• **La rétinopathie diabétique** : elle demeure la cause la plus fréquente de cécité acquise dans le groupe d'âge de 25 à 75 ans [Evans *et al.*, 1996]. Elle est favorisée par une mauvaise régulation du diabète, par l'hypertension et par l'insuffisance rénale. Son traitement précoce peut en freiner ou en stabiliser l'évolution dans plus de la moitié des cas. La rétinopathie diabétique est caractérisée par des modifications veineuses, des lésions capillaires rétinienne, des hémorragies et une ischémie de la zone rétinienne. Ces éléments peuvent endommager toute la rétine périphérique ainsi que la macula (zone de la vision centrale) [Harding, 2005].

• **La néphropathie diabétique** : l'atteinte rénale spécifique est une glomérulonéphrite, qui passe au fil des années par plusieurs stades, la microalbuminurie, la protéinurie et enfin l'insuffisance rénale qui conduit à l'épuration extra rénale ou à la greffe rénale [Girard, 1999] ; [ADA, 2004].

• **La neuropathie diabétique** : la moitié environ des patients diabétiques présentent après 25 ans une neuropathie directement liée au niveau de contrôle métabolique, susceptible de causer une morbidité grave [Nasadini et Tonolo, 2004]. L'hyperglycémie chronique est le facteur causal mais il existe d'autres facteurs comme la durée de la maladie, l'âge, facteurs nutritionnels [Duron et Heurtier, 2006].

#### **b/ Les complications macroangiopathiques diabétiques**

Par opposition à la microangiopathie qui touche la micro-circulation on désigne sous le terme de macroangiopathie diabétique, l'atteinte des artères musculaires allant de l'aorte jusqu'aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200  $\mu\text{m}$  [Grimaldi, 1999].

La constitution de la macroangiopathie diabétique (maladie coronarienne, artérite), ferait intervenir l'hypertension artérielle, des anomalies lipidiques complexes, la toxicité vasculaire du glucose, et éventuellement l'insulino-résistance [Wolffenbuttel et Van Haefen, 1995].

Les complications cardiovasculaires représentent la cause majeure de la mortalité chez les diabétiques de type 1 et type 2 [Grimaldi et Timist., 1996].



## **I. Traitement du diabète sucré**

### **VI-1- Traitement du diabète de type 1**

Le diabète de type 1 est caractérisé par une perte de la fonction pancréatique avec une insulino-pénie absolue. Devant cette condition les objectifs thérapeutiques consistent à apporter l'insuline endogène qui fait défaut [Gin et Rigalleau, 1999].

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

### **VI-2- Traitement du diabète de type 2**

Le traitement de cette affection nécessite d'utiliser des molécules à effet antidiabétique, souvent associées entre elles (Antidiabétiques oraux) [Domus, 1998].

Si le traitement ne se révèle pas assez efficace, on est contraint d'utiliser de l'insuline malgré ses effets secondaires indésirables [Edelman, 1998].

Un régime alimentaire à basse calorie de glucides, protéines et de lipides, et l'exercice physique régulier, peut permettre de régulariser la glycémie [Domus, 1998].

#### **VI-2-1-Les antidiabétiques oraux**

L'obtention d'un contrôle glycémique satisfaisant dans le but de prévenir les complications liées au diabète nécessite le recours à des agents pharmacologiques en plus du traitement hygiéno-diététique. Les médicaments oraux actuellement disponibles offrent un large spectre sur le plan de leur mécanisme d'action, mais ils ont un certain nombre de contre indications et d'effets indésirables [Virally *et al.*, 2007] (Tabl. 03).

Les antidiabétiques oraux sont dirigés vers trois cibles physiologiques différentes :

↳ Une stimulation de la sécrétion d'insuline : cette action est représentée par les sulfamides hypoglycémiantes (Glibenclamide...);

↳ Une potentialisation de l'effet de l'insuline (diminution de l'insulinorésistance) : cet effet est assuré par la classe des biguanides (metformine) et les thiazolidinediones (Troglitazone, Pioglitazones...);

↳ Un ralentissement de l'absorption intestinale des glucides (Acarbose, Miglitol...) [Charbonnel et Cariou, 1997] ; [Halimi, 2003].

- **Mécanisme d'action des antidiabétiques oraux**

1- **Les sulfamides hypoglycémiantes** : stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Ils se lient à un récepteur situé sur la membrane plasmique appelé SUR (sulfanylurea receptor) et inhibent l'efflux de potassium des cellules  $\beta$  par fermeture des canaux potassique ATP dépendant. L'élévation de la concentration de potassium intracellulaire crée une dépolarisation membranaire provoquant l'ouverture des canaux calcium voltage dépendant. C'est en définitive l'augmentation du calcium intracellulaire qui provoque la sécrétion d'insuline par un phénomène d'exocytose [Allain, 2000] ; [Larger, 1997].

2- **Les biguanides** : dont la seule forme commercialisée est la metformine « Glucophage » qui n'agit pas sur la sécrétion insulinaire mais une action exclusivement extrapancréatique consiste essentiellement en :

- Une réduction de l'insulino-résistance en ralentissant la production de glucose par le foie ;
- Une augmentation de l'utilisation périphérique du glucose par les cellules musculaires et hépatiques ;
- Une réduction de la néoglucogénèse hépatique [Larger, 1997]; [Wens *et al.*, 2007].

3- **Les thiazolidinediones** : améliorent la sensibilité à l'insuline dans les tissus adipeux et hépatiques. Ils agissent par l'intermédiaire du récepteur PPAR- $\gamma$  au sein du noyau cellulaire. La stimulation de ce récepteur mène à l'expression ou à la suppression d'une série de gènes qui jouent un rôle dans le métabolisme du glucose, des protéines et des lipides [Yki-Jarvinen, 2004] ; [Fonseca *et al.*, 2000].

4- **Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase** : qui inhibent le dernier stade de la digestion des sucres. Ceux qui ne peuvent pas être absorbés ; continuent leur périple dans l'intestin et subissent la fermentation colique bactérienne en acides gras volatiles où sont éliminés dans les selles [Grimaldi, 1999] ; [Duron et Heurtier, 2006].



**Tableau 03** : Les cinq classes d'antidiabétiques oraux avec leurs avantages et inconvénients spécifiques [Inzucchi, 2002]

	<b>Biguanides : metformine</b>	<b>Sulfonylurées</b>	<b>Glinides</b>	<b>Glitazones</b>	<b>Acarbose</b>
Mécanisme d'action	Résistance à l'insuline ↓ Production de glucose hépatique ↓	Sécrétion d'insuline ↑	Sécrétion d'insuline ↑	Insulinorésistance ↓	Ralentissement de la résorption intestinale des hydrates de carbone
Effets supplémentaires	Effet favorable sur les facteurs de risque cardio-vasculaires	-	=	-	-
Risque d'hypoglycémie	-	+	±	-	-
Poids	↓ ou =	↑	↑	↑	=
Effet favorable sur les complications	Prouvé	Prouvé	Pas encore d'études	Pas encore d'études	Pas encore d'études
Principaux effets indésirables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problèmes gastro-intestinaux</li> <li>• Acidose lactique (rare)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypoglycémie</li> <li>• Prise de poids</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prise de poids</li> <li>• Œdème</li> <li>• Insuffisance cardiaque</li> </ul>	Troubles gastro-intestinaux
Principales contre indications	Situations qui ↑ le risque d'acidose lactique : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insuffisance rénale</li> <li>• Insuffisance hépatique</li> <li>• Décompensation cardiaque sévère</li> </ul>	Insuffisance rénale	Peuvent être pris en cas d'insuffisance rénale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insuffisance hépatique</li> <li>• Décompensation cardiaque sévère</li> <li>• Combinaison insuline</li> </ul>	-
Coût	#	#	#	###	##

Légende : ↑ augmenté, ↓ diminué, + présent, ± présent de façon limitée, = stable, # le nombre des sigles reflète la hauteur du prix.

# Chapitre II:

## La phytothérapie et le diabète sucré



## **I- Introduction**

Malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement d'une multitude d'affections et de maladies dans les différentes sociétés et cultures [Eisenberg *et al.*, 1993] ; [De Smet, 2002].

L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels surtout dans le cas des maladies chroniques comme le diabète sucré, la forte incidence des effets indésirables des médicaments de synthèse qui leur sont associés et l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les pays en voie de développement, font qu'une large tranche de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine naturelle complémentaire ou parallèle pour se soigner et où la tradition de médecine par les plantes est bien ancrée dans les mœurs [Eddouks *et al.*, 2007] ; [Wang et Ng, 1999].

Dans les pays développés le traitement du diabète est relativement bien assuré par les moyens thérapeutiques modernes, le retour à la phytothérapie demeure comme médecine alternative seule ou en complément, pour diminuer la dose de médicaments synthétiques, mais aussi par ce que certaines plantes semblent en même temps capables de lutter contre les complications du diabète (sclérose des vaisseaux sanguins, dépôt athéromateux, artérites, hypertension, infections) [Dey *et al.*, 2002].

## **II- Les plantes médicinales a activité antidiabétique**

Plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques ont été menées à travers le monde pour recenser les plantes antidiabétiques utilisées dans les différentes pharmacopées traditionnelles [Grover *et al.*, 2002] ; [Jouad *et al.*, 2001] ; [Ivorra *et al.*, 1989]. Les informations ethnobotaniques recueillies dans plusieurs régions du monde estiment que plus de 1200 espèces végétales, soit plus de 725 genres appartenant à 183 familles sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes [Marles et Farnsworth, 1995] ; [Bailey et Day, 1989].

Les investigations ethnopharmacologiques sont actuellement centrées sur la validation expérimentale des propriétés curatives, traditionnellement attribuées à ces remèdes. Dans 81% des cas, les indications traditionnelles des plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées [Marles et Farnsworth, 1995]. Certaines de ces plantes, dont l'activité pharmacologique a été confirmée sur des modèles d'animaux, ont également fait l'objet de plusieurs études cliniques [Ernst, 1997]. Pour plusieurs plantes, les molécules bioactives responsables de l'activité pharmacologique ont été identifiées et isolées et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets thérapeutiques ont été

partiellement ou complètement élucidés afin de conduire à la découverte de nouveaux médicaments pour le traitement pharmacologique du diabète sucré.

L'exemple classique est celui de *Galega officinalis*, une plante largement utilisée dans le traitement du diabète en Europe. Les premières investigations ont révélé la présence de guanidines en forte concentration dans cette plante [Oubré *et al.*, 1997]. Plus tard, les propriétés hypoglycémiantes des guanidines ont été mises en évidence, ce qui a conduit à la découverte de la metformine, agent antidiabétique oral visant à diminuer l'insulino-résistance [Dey *et al.*, 2002].

Ainsi, les plantes sont une source inépuisable de substances chimiques : tanins, glycosides, flavonoïdes, saponosides etc..., et qui auraient des propriétés curatives appréciables et qu'aucune chimie synthétique et combinatoire ne peut nous offrir [Fabricant et Farnsworth, 2001].

Le tableau 04 regroupe quelques principes actifs ayant des activités antidiabétiques, isolés à partir des plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète sucré à travers le monde.

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

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

D'après cette enquête, *Trigonella foenum graecum* (Halba), *Citrullus colocynthis* (Handal) et *Berberis vulgaris* (Ghris) sont les plantes les plus utilisées, alors que *Laurus nobilis* (Rend), *Nigella sativa* (Sanouj), et *Punica granatum* (Romman) sont moyennement utilisées dans cette région.



**Tableau 04 :** Quelques plantes antidiabétiques utilisées dans le monde et leur principe actif isolé.

Nom scientifique de la plante	Principe actif isolé	Classe chimique	Mécanisme d'action, effet provoqué ou dose administrée	références
<i>Pterocarpus marsupium</i> (Légumineuse)	Epicathéchine	Flavonoïdes	*Augmente le taux d'insuline dans les îlots pancréatiques. *Induit la régénération des cellules $\beta$	[Hii et Howell, 1984] [Sheehan et Zemaitis, 1983]
<i>Bauhinia purpura</i> (Légumineuse)	Quercétine		Potentialise la sécrétion d'insuline au niveau des cellules $\beta$ pancréatiques d'environ 44 à 47%	[Hii et Howell, 1985]
<i>Berberis vulgaris</i> (Berberacée)	Berbérine	Alcaloïdes	Antagoniste l'hyperglycémie	[Qiming et Mingzhi, 1986]
<i>Trigonella foenum graecum</i> (Légumineuse)	Trigonélline		Sensibilisation des cellules à l'action de l'insuline	[Ajabnoor et Tilimsani, 1988]
<i>Galega officinalis L.</i> (Fabacée)	GaléGINE		30 mg/kg de galéGINE provoquent chez les rats diabétiques une action hypoglycémiant;	[Petricic et Kolodzera, 1982]
<i>Phoenix dactylifera</i> (Palmacée)	Lupeol acétate	Stéroïdes et triterpénoïdes	Activité hypoglycémiant	[Harborne et Baxter, 1993]
<i>Coffea arabica</i> (Rubiaceae)	$\beta$ -Sitostérol			[Sampaio <i>et al.</i> , 1979]
<i>Panax ginseng</i> (Araliacée)	Ginsenside Rg <sub>2</sub>			[Chung et Joo, 1992]
<i>Citrullus colocynthis</i> (Cucurbitacée)	2-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-cucurbitacine I, E, L	Glucosides	50 mg/kg diminuent la glycémie chez les rats d'expérimentation.	[Abdel-hassan <i>et al.</i> , 2000]
<i>Blighia sapida koening</i> (Sapindacée)	Hypoglycine A, Hypoglycine B	Acides Amines	Inhibent la $\beta$ -oxydase intervenant dans la dégradation des acides gras	[Bruneton, 1999]
<i>Allium cepa</i> (Liliacée)	Allyl propyle disulfide Diallyl disulfide oxide	Composés sulfurés	*Effet hypoglycémiant chez des rats rendus diabétiques et des patients ayant un diabète de type 2. *Effet compétition avec l'insuline	[Augusti, 1974] [Oliver-Breuer et Zahob, 1979]
<i>Atriplex halimus</i> (Chénopodiaceae)	Magnésium Chrome	Ions organiques	*Diminue l'insulinorésistance *Favorise l'action de l'insuline et stimule ses récepteurs.	[Lefebvre <i>et al.</i> , 1994] [Cerasi <i>et al.</i> , 1997]

### III-*Punica granatum*

#### III-1- Description botanique

C'est un petit arbuste des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Il peut vivre jusqu'à 200 ans mais est le plus productif en fruits dans ses 20 premières années de fructification ; Son écorce est gris beige et à tendance à se crevasser et à desquamer avec l'âge. Ses feuilles caduques sont opposées, luisantes et mesurent 3 à 7 cm de long sur 2 cm de large, Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. Cultivé partout et souvent sub spontané dans le tell. La floraison a lieu en fin d'été. Fructification en septembre et octobre. [Bridel *et al.*, 2004] ; [Quezel et Santa, 1963] (Fig. 01).



Figure 01 : *Punica granatum* [Wikipédia, 2008]



### III-2- Classification botanique

**Règne :** Végétale

**Embranchement :** Phanérophytes

**Sous Embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotyledones

**Sous classe :** Gamopétales

**Ordre :** Myrtiflorales

**Famille:** Punicacées

**Genre:** Punica

**Espèce:** *Punica granatum* [Bridel *et al.*, 2004] ; [Quezel et Santa, 1963].

### III-3-Noms communs

**Arabe :** Romman

**Français :** Grenadier « Fruit : Grenade »

**Anglais :** Pomegranate

**Bengalie:** Dalim

**Inde:** Anaar, Dadima

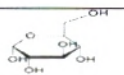
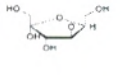
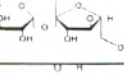
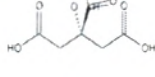
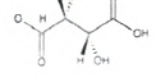
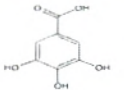
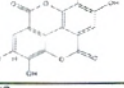
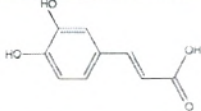
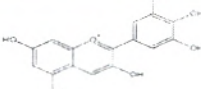
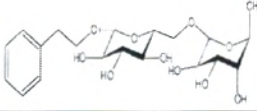
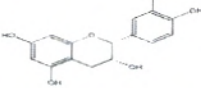
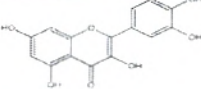
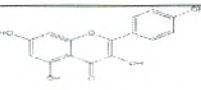
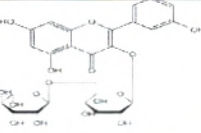
[Fatope *et al.*, 2002] ; [Chopra *et al.*, 1960] ; [Kirthikar et Basu, 1975] ; [Nadkarni *et al.*, 1976] ; [Vidal *et al.*, 2003].

### III-4- Composition chimique


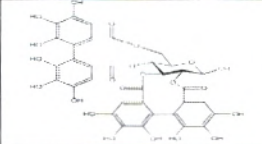
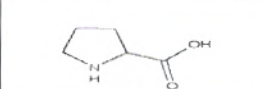
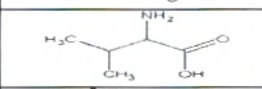
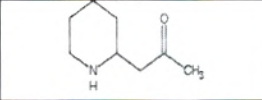
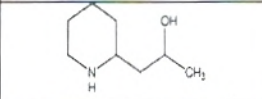



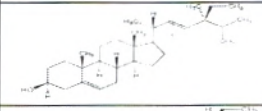
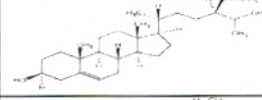
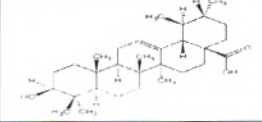
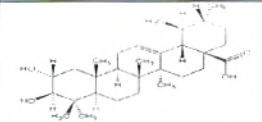
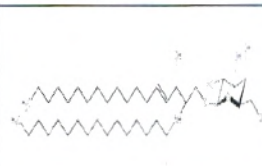
L'étude phytochimique de *Punica granatum* révèle sa richesse en polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes...) et d'autres composés tels que les alcaloïdes ainsi que la présence des sucres, des acides organiques, des acides aminés, des stéroïdes, et des sels minéraux selon la partie de la plante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

Le tableau 05 regroupe quelques constituants chimiques de différentes parties de *Punica granatum*.

**Tableau 05:** Quelques constituants chimiques de différentes parties de *Punica granatum*.

La classe chimique	Nom de composé	Structure chimique	Partie de la plante	Références
Les sucres	Glucose		J	[Cui <i>et al.</i> , 2004]
	Fructose			[Cui <i>et al.</i> , 2004]
	Saccharose			[Gabbasova et Abdurazakova, 1969]
Les acides organiques	Acide Citrique		J	[Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002]
	Acide Tartarique			
Acides Hydroxybenzoïques	Acide Gallique		J, E, F	[Amakura <i>et al.</i> , 2000b ; Huang <i>et al.</i> , 2005a]
	Acide Ellagique		J, E, G	[Amakura <i>et al.</i> , 2000b], [Wang <i>et al.</i> , 2004]
Acides Hydroxycinnamique	Acide Caffeïque		J, E	[Artik ,1998 ; Amakura <i>et al.</i> , 2000a]
Anthocyanes	Delphinidine		E	[Noda <i>et al.</i> , 2002]
Glycosides aliphatiques	Rutinoside phenethyl		G	[Wang <i>et al.</i> , 2004]
Flavonoïdes	Epicatechine		J, E	[De Pascual-teresa <i>et al.</i> , 2000]
	Quercetine		J, E	[Artik , 1998]
	Kaempferol		E	[Van Elswijk <i>et al.</i> , 2004]
	Kaempferol 3-O-rhamnoglucoside		E	[Van Elswijk <i>et al.</i> , 2004]



Les tanins	Punicaline		E, Fe, Ec, R	[Tanaka <i>et al.</i> , 1986 ; Gil <i>et al.</i> , 2000]
	Pedunculagine		E	[Satomi <i>et al.</i> , 1993]
Les acides aminés	Proline		J	[Velioglu <i>et al.</i> , 1997]
	Valine		J	[Seppi Ak Franciosi, 1980]
Les alcaloïdes	Peellettierine		E, Ec, R	[Neuhofer <i>et al.</i> , 1993 ; Vidal <i>et al.</i> , 2003]
	Sedridine		R	[Neuhofer <i>et al.</i> , 1993]
Les acides gras	Acide linoléique		G	[Hopkins et Chisholm 1968 ; Schubert <i>et al.</i> , 1999; Hornung <i>et al.</i> , 2002]
	Acide Oleique		G	[Schubert <i>et al.</i> , 1999]
	Acide Palmitique		G	[Schubert <i>et al.</i> , 1999]
Les stéroïdes	Stigmastérol		G	[Abd El Wahab <i>et al.</i> , 1998]
	β-sitostérol		G	[Abd El Wahab <i>et al.</i> , 1998]
Les triterpénoïdes	Acide urosolique		G, F	[Ahmed <i>et al.</i> , 1995; Huang <i>et al.</i> , 2005b]
	Acide asiatique		F	[Batta et Rangaswami, 1973]
Glycolipides	Cérébroside		G	[Tsuyuki <i>et al.</i> , 1981]
Minéraux	Fe, Cl, Cr, Cu, K, Mn, Mg, Na, Zn, Rb, Se,...		G	[Waheed <i>et al.</i> , 2004]

G : Graines, F : Fleurs, E : Epicarpe, Ec : Ecorce, R : Racine, Fe : Feuille

### III-5- Utilisation traditionnelle de *Punica granatum*

Les fruits de grenadier ainsi que ses graines, son écorce, son épicarpe et ses fleurs sont utilisés depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique Latine, régions dont cet arbuste est originaire. Il est utilisé historiquement pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires [Afaq *et al.*, 2005].

Les différentes parties de cette plante (écorce, épicarpe, racines, feuilles) sont utilisées traditionnellement pour traiter la dysentérie, la diarrhée, les coliques, les hémorragies et l'ulcer. Elles sont connues aussi pour leurs propriétés astringentes et anthelminthiques (écorce, épicarpe) [Kirthikar et Basu, 2000] ; [Naovi *et al.*, 1991] ; [Vidal *et al.*, 2003] [Sathyavati *et al.*, 1987] ; [Sudheesh et Vijayalakshmi, 2005] ; [Mahmoud *et al.*, 1994].

Les feuilles vertes sont utilisées pour le traitement de certaines pathologies respiratoires « Bronchite » [Roig, 1974] ; [Zhang *et al.*, 1995] et aussi contre la conjonctivite [Gracious-Ross *et al.*, 2001].

### III-6- Activités biologiques de *Punica granatum*

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

En plus, *Punica granatum* est visée actuellement pour traiter d'autres maladies comme le SIDA, les maladies cardiovasculaires, les symptômes allergiques et le cancer. Elle est utilisée aussi en hormonothérapie et dans le domaine de cosmétique [Lee et Watson, 1998] ; [Shiraishi *et al.*, 2002] ; [Aviram et Dornfeld, 2003] ; [Watanabe et Hatakoshi, 2002] ; [Afaq *et al.*, 2005] ; [Lansky, 2000] ; [Maoyadi, 2004] ; [Kawamada et Shimada, 2002] ; [Curry, 2004].

Le tableau 06 regroupe les principales activités biologiques étudiées de différentes parties de *Punica granatum*.



**Tableau 06** : Quelques activités biologiques de *Punica granatum* citées dans la littérature scientifique

Activités biologiques	Partie de la plante	Références
Anticancéreuse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fruit complet</li> <li>• Jus de fruit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Syed <i>et al.</i>, 2007 ; Lansky et Newman , 2007]</li> <li>• [Seeram <i>et al.</i>, 2005]</li> </ul>
Antiinflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fruit complet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Lansky et Newman , 2007]</li> </ul>
Antioxydante	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epicarpe</li> <li>• Graines</li> <li>• Jus de fruit</li> <li>• Fleurs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Ricci <i>et al.</i>, 2006 ; Chidambara <i>et al.</i>, 2002 ; Rout et Banerjee., 2007 ; Surveswaran <i>et al.</i>, 2007]</li> <li>• [Schubert <i>et al.</i>, 1999]</li> <li>• [Rosenblat <i>et al.</i>, 2006 ; Seeram <i>et al.</i>, 2005]</li> <li>• [Kaur <i>et al.</i>, 2006 ; Bagri <i>et al.</i>, 2008 ; Stangeland <i>et al.</i>, 2009]</li> </ul>
Antimicrobienne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fruit complet</li> <li>• Epicarpe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Braga <i>et al.</i>, 2005]</li> <li>• [Prashanth <i>et al.</i>, 2001a ; Calzada <i>et al.</i>, 2006 ; Voravuthikunchai <i>et al.</i>, 2005]</li> </ul>
Antidiarrhémique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Graines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Das <i>et al.</i>, 1999]</li> </ul>
Antiulcéreuse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epicarpe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Ajaikumar <i>et al.</i>, 2005]</li> </ul>
Contre l'athérosclérose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epicarpe</li> <li>• Graines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Parmar et Kar, 2007]</li> <li>• [De Nigris <i>et al.</i>, 2007]</li> </ul>
Immunomodulatrice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epicarpe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Gracious-Ross <i>et al.</i>, 2001]</li> </ul>
Antiparasitaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epicarpe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [Voravuthikunchai <i>et al.</i>, 2006]</li> </ul>

### III-7- *Punica granatum* et le diabète sucré

A l'origine, des remèdes traditionnels à travers quelques pays du monde depuis des centaines d'années, montrent que les fleurs de *Punica granatum* sont la seule partie utilisée dans le traitement du diabète sucré [Jurjani, 1878] ; [Majoosi, 1889] ; [Saxena et Vikram, 2004].

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

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

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

Dans la région de « Taounata Province » (Maroc), l'épicarpe des fruits de grenadier est aussi utilisé traditionnellement pour traiter le diabète sucré d'après l'enquête réalisée par El Hilaly *et al.* (2003).

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

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

#### • **Actions antidiabétiques de *Punica granatum***

Plusieurs études expérimentales ont été réalisées afin de démontrer l'effet antidiabétique de grenadier.

Jafri *et al.* (2000), montrent que l'extrait hydroéthanolique des fleurs de *Punica granatum* administré par voie orale à différentes doses (300, 400 et 500 mg/kg p.c.) diminue l'hyperglycémie significativement chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane. Ils montrent aussi que ces doses diminuent le pic d'HGPO par gavage d'une solution de glucose à 2 g/kg p.c.



L'activité hypoglycémiante des graines de *Punica granatum* a été aussi démontrée par les travaux de Das *et al.* (2001) après administration des différentes doses d'extrait méthanolique par voie orale chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine.

Khalil (2004), montre que l'extrait aqueux de l'épicarpe de *Punica granatum* provoque une diminution de la glycémie chez les rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane. La dose de 430 mg/kg p.c. de cet extrait provoque une augmentation du taux d'insuline et une régénération des cellules  $\beta$  pancréatiques endommagées par l'alloxane.

Li *et al.* (2005), ont montré que l'extrait méthanolique des fleurs de *Punica granatum* à différentes doses administrées par voie orale diminue l'hyperglycémie post-prandiale (HGPO) chez les souris. Chez les rats génétiquement diabétiques (Zucker), la dose de 500 mg/kg p.c. administrée quotidiennement pendant deux semaines provoque une diminution de l'hyperglycémie de l'ordre de 43.1%. Le même extrait testé *in vitro* sur l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase montre un effet inhibiteur vis-à-vis de cette enzyme avec une  $IC_{50}=1.8 \mu\text{g/ml}$ .

L'action antidiabétique des fleurs de *Punica granatum* a été aussi démontrée par Huang *et al.* (2005a), cette action est prouvée par l'administration de 500 mg/kg p.c. d'extrait alcoolique pendant 6 semaines chez un modèle de rat génétiquement diabétique expliquée par l'activation du récepteur PPAR- $\gamma$ .

La consommation de jus de grenadier par les patients diabétiques de type 2 ayant une hyperlipidémie provoque une diminution du taux de cholestérol total. Cette activité a été démontrée par les travaux d'Esmailzadeh *et al.* (2006).

En 2007, Katz *et al.*, montrent aussi que l'effet antidiabétique de l'extrait des fleurs et de jus de fruits est expliqué par l'activation des récepteurs PPAR- $\gamma$ .

D'après Bagri *et al.* (2008), l'extrait aqueux des fleurs de *Punica granatum* administré par voie orale pendant trois semaines à différentes doses (250 et 500 mg/kg p.c.) aux rats rendus diabétiques par la STZ diminue significativement l'hyperglycémie, l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie.

# Partie II: Partie expérimentale

## Chapitre I: Matériel et Méthodes



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

**Partie I :** préparation et extraction du matériel végétal à partir de l'épicarpe de *Punica granatum* et l'analyse phytochimique de différents extraits ;

**Partie II :** évaluation de l'effet antidiabétique de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* qui consiste à étudier :

- *in vivo* : l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* sur la régulation de la glycémie et de quelques paramètres lipidiques chez les rats normaux et redus diabétiques (diabète expérimental induit par la streptozotocine) ;

- *in vitro* : l'effet inhibiteur de l'extrait brut sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase, enzyme intervient dans l'hydrolyse de certains polysaccharides.

## I- Matériel végétal

### I-1- Récolte et préparation

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

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



**Figure 02 :** Fruits de *Punica granatum* de la région de Tafna « Tlemcen »

## I-2- Analyses phytochimiques

Dans le but de connaître la composition chimique globale de l'épicarpe de *Punica granatum*, des tests phytochimiques sont réalisés sur différents extraits préparés dans différents solvants (Eau, Méthanol et Ether diéthylique) selon le procédé suivant :

25 g du matériel végétal séché et broyé sont ajoutés à 150 ml de différents solvants séparément. Les différents mélanges sont portés sous reflux pendant 1 h. Après refroidissement et filtration des extraits obtenus, les filtrats sont soumis aux différents tests en présence de certains réactifs de caractérisation spécifiques pour chaque classe chimique étudiée (Fig. 03) (Annexe II).

Les principaux constituants analysés sont :

- ✓ les tanins ;
- ✓ les alcaloïdes ;
- ✓ les flavonoïdes ;
- ✓ les stéroïdes ;
- ✓ les coumarines ;
- ✓ les anthocyanes ;
- ✓ les saponosides.....

## I-3- Extraction du matériel végétal « Extrait brut »

Cet extrait nécessaire pour les tests biologiques est préparé comme suit :

Dans un Erlen Meyer rodé contenant 100 ml d'une solution aqueuse de méthanol (30/70 : v/v), 10 g de poudre fine du matériel végétal sont ajoutés. Le mélange est porté sous reflux pendant 2 h sous agitation. L'extrait obtenu est ensuite refroidi puis filtré à température ambiante, le filtrat est évaporé à sec à 60°C à l'aide d'un rota vapeur.

Afin d'évaluer l'effet antidiabétique de l'épicarpe de *Punica granatum in vivo*, l'extrait sec obtenu est solubilisé dans l'eau distillée.

Les doses administrées aux animaux dépendent des doses létales médianes (DL<sub>50</sub>) obtenues après la détermination du degré de toxicité de l'extrait brut avec une dilution au  $1/10$ .

Pour les tests réalisés *in vitro* sur l' $\alpha$ -amylase, l'extrait est solubilisé dans la solution du tampon phosphate (0.02 M, pH 6).



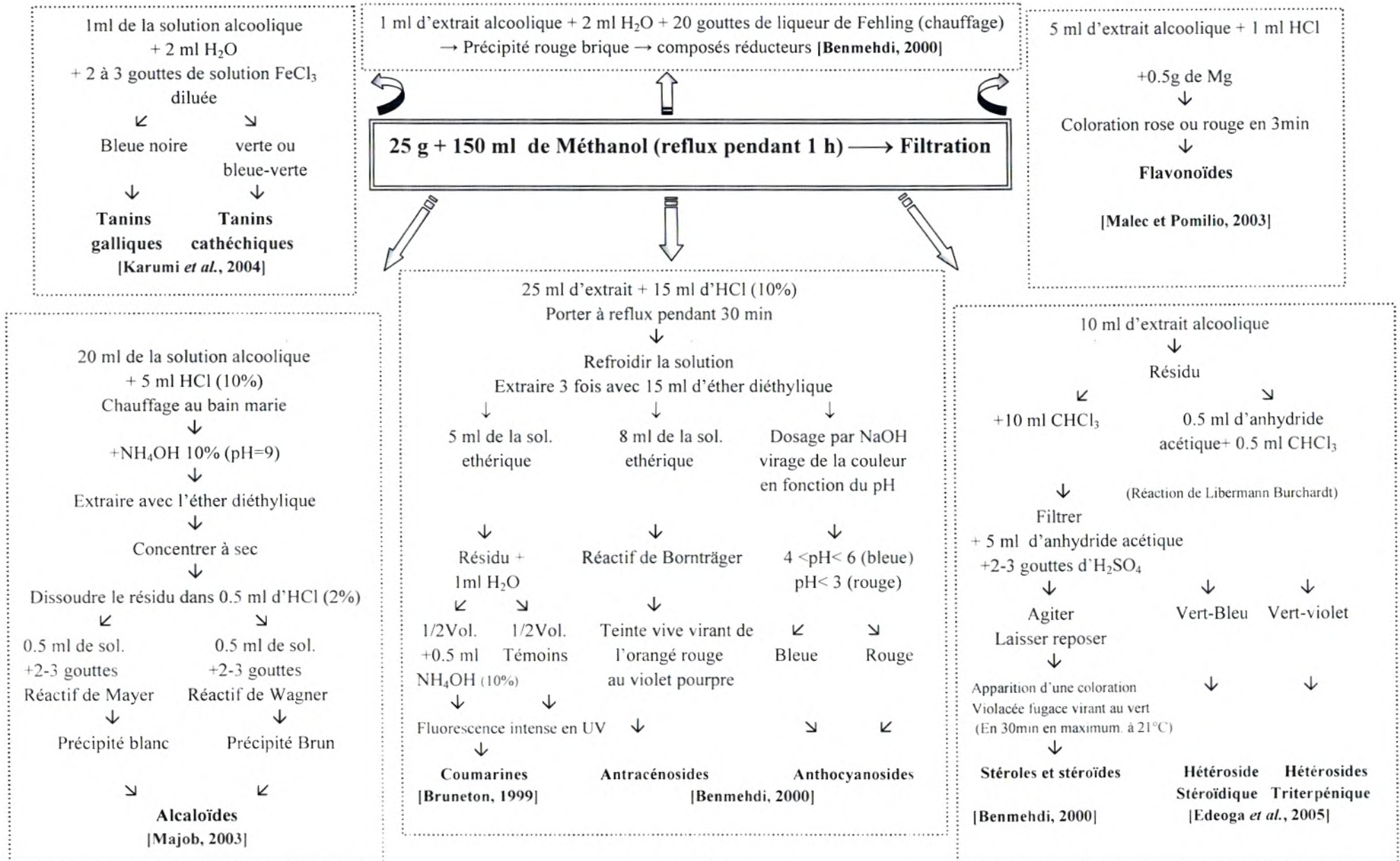


Figure 03 : Représentation schématique des tests phytochimiques

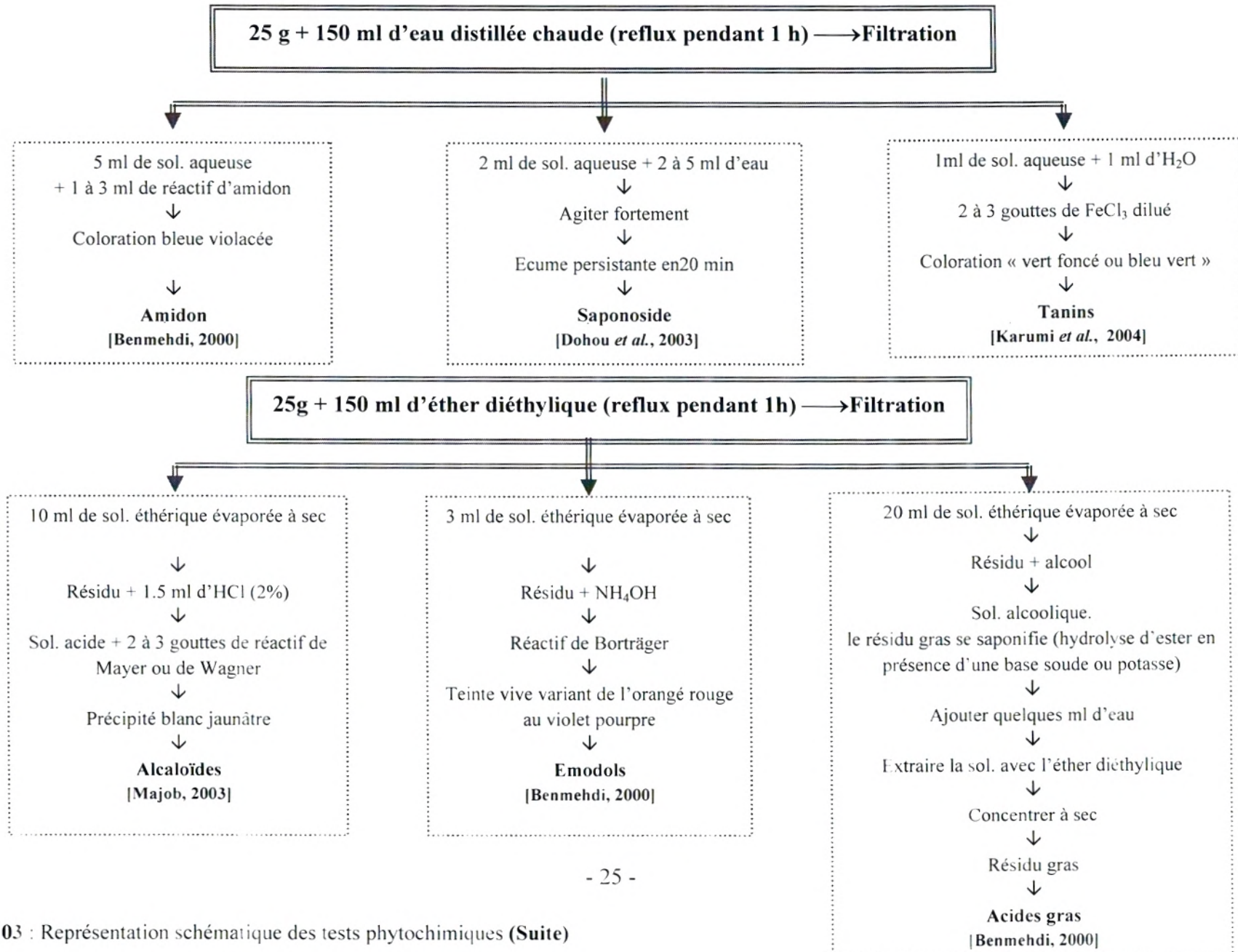


Figure 03 : Représentation schématique des tests phytochimiques (Suite)



## II- Expérimentation animale

### II-1- Les animaux

Notre expérimentation est réalisée sur des rats blancs « *Rattus norvegicus* » variété Wistar des deux sexes, adultes, âgés de 3 à 4 mois (Effectif de 194 rats). Le poids corporel de ces rats varie entre 180 et 300 g.

L'élevage de ces animaux s'est déroulé au sein de l'animalerie du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen.

Les animaux sont nourris avec un aliment « EL ALF » de Aïn Fezza composé de maïs, orge, gluten, tourteaux de soja, huile de soja, phosphate mono calcique, carbonate de calcium, sel, lysine, méthionine, un complexe poly-vitaminique (CMV) et autres additifs (Tabl. 07).

L'eau de robinet et l'aliment leur sont fournis *ad libitum*.

**Tableau 07** : Composition de l'aliment « EL ALF » en pourcentage

Constituants	Glucides	Protéines brutes	Graisses brutes	Cendres brutes	Cellulose brute	CMV+ minéraux	Teneur en eau
Pourcentage (%)	52.8	17,4	3,6	6,2	5,0	1	14

### II-2- Toxicité de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*

Pour déterminer la toxicité (doses létales DL<sub>100</sub> et DL<sub>50</sub>) de l'extrait étudié, différentes doses sont administrées par voie orale et intrapéritonéale à raison de 10 ml/kg p.c. aux différents lots de rats âgés de 3 à 4 mois (6 rats dans chacun). Un lot témoin recevant de l'eau physiologique pour chaque voie d'administration est nécessaire pour comparer les résultats.

Les animaux sont suivis les six premières heures puis chaque jour pendant 15 jours (Tabl. 08).

**Tableau 08** : Les différentes doses administrées par voie orale et IP pour la détermination des doses létales de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*

Sexe et poids corporel	Voie d'administration	Doses administrées (mg/kg p.c.)						Témoins
		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7
♂ (180-220g)	Orale	400	800	1000	2000	3000	4000	NaCl 0.9%
♀ (170-210g)	Intrapéritonéale	100	200	400	600	800	1000	NaCl 0.9%

### II-3- Induction du diabète expérimental

Dans le but de provoquer un état d'hyperglycémie aux animaux d'expérimentation, une dose de 50 mg/kg p.c. de STZ [ $C_8H_{15}N_3O_7$  : *Sigma Aldrich*] est injectée par voie intrapéritonéale aux rats des deux sexes, âgés de 3 à 4 mois ayant un poids corporel de 180 à 280g.

La STZ est solubilisée dans une solution de tampon citrate (0.1 M, pH 4.5) [Gupta *et al.*, 2005] [Das *et al.*, 2001].

Ces animaux sont suivis durant les premiers jours par mesure de la glycémie à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives (One touche Ultra) à partir de l'extrémité caudale et de quelques paramètres urinaires (trace de sang, corps cétoniques, glucose, protéines, pH) à l'aide des bandelettes réactives (Labstix).

L'apparition de quelques symptômes de diabète sucré (polyurie, polyphagie, polydipsie, chute de poids) nous a permis de confirmer ainsi l'installation du diabète chez ces animaux.

Les rats ayant une glycémie à jeun supérieur à 2 g/l et une glucosurie importante (+++) sont considérés diabétiques et sont retenus pour l'expérimentation [Bagri *et al.*, 2008].

### II-4- Effets antidiabétiques de l'extrait brut *in vivo*

Afin d'évaluer les effets antidiabétiques de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* sur la régulation du métabolisme glucidique et lipidique chez les rats normaux et diabétiques, deux voies d'administration sont étudiées, la voie orale et la voie intrapéritonéale.

#### II-4-1-Effet chez rats normo glycémiques

##### a/ Effet à court terme

L'effet à court terme de l'extrait brut sur la régulation de la glycémie des rats normaux nécessite la répartition de ces derniers en 3 lots pour chaque voie d'administration. Chaque lot comporte 5 rats âgés de 3 mois et maintenus à jeun pendant 16 h (Tabl. 09).

La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives (One touche Ultra) à partir de l'extrémité caudale des animaux dans un intervalle de temps de 3 h. ( $t_0$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{120}$  et  $t_{180}$  min).



**Tableau 09:** Répartition des rats normaux pour l'étude à court terme de l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*

	♂ (180-240 g)	♀ (170-200 g)
	Solutions administrées par voie orale	Solutions administrées par voie IP
<b>Lot 1 : Normaux Témoins (NT)</b>	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)
<b>Lot 2 : Normaux Traités (NTRT)</b>	Extrait brut (400 mg/kg p.c.)	Extrait brut (20 mg/kg p.c.)
<b>Lot 3 : Normaux positifs (Npos.)</b>	Glibenclamide* (5 mg/kg p.c.)	Glibenclamide (5 mg/kg p.c.)

**b/ Effet à long terme**

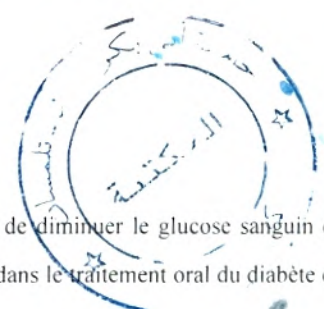
L'étude de l'effet à long terme de l'extrait brut sur la régulation de la glycémie des rats normaux nécessite la répartition de ces animaux en deux lots pour les deux voies d'administration (orale et IP). Chaque lot comporte 5 rats âgés de 3 mois et maintenus à jeun pendant 16 h (Tabl. 10).

Après administration quotidienne de l'extrait brut, la glycémie est mesurée chaque semaine pendant deux semaines à partir de l'extrémité caudale des animaux à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives (One touche Ultra).

**Tableau 10:** Répartition des rats normaux pour l'étude à long terme de l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*

	♂ (200-300 g)	♀ (180-220 g)
	Solutions administrées par voie orale	Solutions administrées par voie IP
<b>Lot 1 : Normaux Témoins (NT)</b>	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)
<b>Lot 2 : Normaux Traités (NTRT)</b>	Extrait brut (400 mg/kg p.c.)	Extrait brut (20 mg/kg p.c.)

\* Le glibenclamide (Glibil®), est un agent hypoglycémiant sulfonyluréé permettant de diminuer le glucose sanguin en stimulant la libération d'insuline des cellules β des îlots pancréatiques. Il est indiqué dans le traitement oral du diabète de type 2 [Larger, 1997].



### II-4-2- Effet sur la régulation de l'hyperglycémie temporaire (HGPO)

Afin d'étudier l'effet de l'extrait brut sur la régulation de l'HGPO par gavage d'une solution de glucose à 2.5 g/kg p.c. chez les rats normaux, il est nécessaire de préparer différents lots de rats âgés de 3 mois (5 rats dans chacun) pour chaque voie d'administration orale et IP (Tabl. 11).

Après 16 h de jeun, la glycémie est mesurée durant les 3 heures qui suivent l'administration de l'extrait brut ( $t_0$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{120}$  et  $t_{180}$  min) à partir de l'extrémité caudale des animaux.

- $t_0$  min : représente le temps d'administration des différentes solutions.
- $t_{30}$  min : représente le temps où la solution de glucose est administrée par gavage aux différents lots.

**Tableau 11:** Répartition des rats normaux soumis à un test d'HGPO.

	♀ (180-200 g)	♀ (180-210 g)
	Solutions administrées par voie orale	Solutions administrées par voie IP
<b>Lot 1 : Normaux Témoins (NT)</b>	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)
<b>Lot 2 : Normaux Traités (NTRT)</b>	Extrait brut (400 mg/kg p.c.)	Extrait brut (20 mg/kg p.c.)
<b>Lot 3 : Normaux positifs (N pos.)</b>	Glibenclamide (5 mg/kg p.c.)	Glibenclamide (5 mg/kg p.c.)

### II-4-3-Effet sur la régulation de l'hyperglycémie permanente (rats diabétiques)

#### a/ Effet à court terme

Le suivi à court terme de l'hyperglycémie chez les rats rendus diabétiques par la STZ est effectué durant les 4 premières heures après l'administration de l'extrait, pour cela 3 lots de rats âgés de 3 à 4 mois sont préparés pour chaque voie d'administration. Chaque lot comporte 5 rats maintenus à jeun pendant 16 h.

La glycémie est mesurée à  $t_0$  min avant puis, à  $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{120}$  et  $t_{180}$ ,  $t_{240}$  min après l'administration de l'extrait brut à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives (One touche Ultra) à partir de l'extrémité caudale des rats (Tabl. 12).



**b/ Effet à long terme**

L'étude de l'effet à long terme de l'extrait brut sur la régulation de l'hyperglycémie des rats diabétiques est effectuée durant 15 jours après administration quotidienne de différentes doses indiquées dans le tableau 12. Pour les deux voies étudiées, la glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives (One touche Ultra) chaque semaine pendant deux semaines après 16 h de jeun sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux.

**Tableau 12** : Répartition des rats diabétiques pour l'étude à court et à long terme de l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*.

	♂ (200-290 g)	♀ (180-220 g)
	Solutions administrées par voie orale	Solutions administrées par voie IP
<b>Lot1 : Diabétiques Témoins (DNT)</b>	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)	NaCl 0.9% (10 ml/kg p.c.)
<b>Lot 2 : Diabétiques Traités (DTRT)</b>	Extrait brut (400 mg/kg p.c.)	Extrait brut (20 mg/kg p.c.)
<b>Lot 3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b>	Glibenclamide (5 mg/kg p.c.)	Glibenclamide (5 mg/kg p.c.)

#### II-4-4- Effet sur la régulation de quelques paramètres lipidiques (Cholestérol total, Triglycérides)

Le dosage enzymatique du cholestérol total et des triglycérides sur du plasma, est nécessaire pour évaluer l'effet de l'extrait brut sur la régulation de ces paramètres lipidiques chez les rats normaux et diabétiques indiqués dans les tableaux 10 et 12 respectivement, après administration quotidienne de l'extrait étudié pendant deux semaines pour les deux voies d'administration orale et intrapéritonéale.

Les prélèvements sanguins chez ces animaux sont effectués chaque semaine pendant deux semaines, à l'aide d'une pipette pasteur héparinée au niveau du sinus rétro orbital de l'œil après un jeun de 16 h. des différents lots précédents. Le sang recueilli est centrifugé à 3000t/min pendant 10 min.

#### II-4-5- Effet sur l'évolution du poids corporel

L'évolution du poids corporel des rats normaux et diabétiques indiqués respectivement dans les tableaux 10 et 12, est suivie chaque semaine pendant deux semaines afin d'évaluer l'effet de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* sur la croissance pondérale de ces animaux.

## II-4-6-Techniques analytiques des paramètres plasmatiques

### a/ Dosage de la glycémie

La glycémie des différents lots de rats est mesurée à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives (One touche Ultra) sur une goutte de sang prélevée à partir de l'extrémité caudale des animaux (sang veineux).

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

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

%G : pourcentage de variation de la glycémie

G<sub>0</sub>: glycémie basale (Temps = 0min)

G<sub>t</sub> : glycémie à un temps précis

#### • Principe du glucomètre

Généralement les glucomètres sont constitués d'une couche adsorbante sur laquelle la goutte du sang est déposée, finement poreuse ou recouverte d'une membrane sur sa face interne, elle retient les globules rouges et laisse diffuser que le plasma vers les couches inférieures où se trouve le réactif essentiellement la glucose-oxydase (éventuellement l'héxokinase) associée à un chromogène. La coloration obtenue est mesurée par réflectométrie dans le lecteur de glycémie [Desch, 2001].

### b/ Dosages enzymatiques des paramètres lipidiques

Le taux du cholestérol total et des triglycérides plasmatiques est déterminé par une technique enzymatique colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre par un kit de SPINREACT spécifique pour chaque paramètre.

L'intensité de la coloration est mesurée à 505 nm contre un blanc et comparée à un étalon dont la concentration égale à 2 g/l pour les deux paramètres.



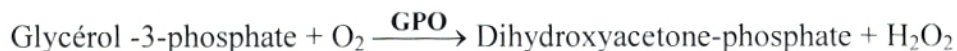
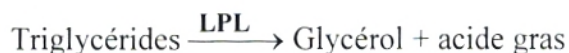
- **Principe de dosage du cholestérol** [Fasce, 1982]



**Calcul:**

$$\text{Taux de Cholestérol total} = (\text{DOD}/\text{DOE}) \times 2 \text{ g/l}$$

- **Principe de dosage des triglycérides** [Fossati et Prencipe, 1982]



**Calcul:**

$$\text{Taux des triglycérides} = (\text{DOD}/\text{DOE}) \times 2 \text{ g/l}$$

Les variations de ces deux paramètres sont exprimées en pourcentage par rapport à la valeur basale et sont calculés selon la même formule décrite dans la page 31.

**II-4-7- Analyse statistique des données**

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

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

**3- L'écart type ( $\sigma$ )**  $\sigma_x = \sqrt{V_x}$

**4- L'erreur standard de la moyenne (ESM)**

$$Sm = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n(n-1)}}$$

**5- Test de Student**

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

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

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

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



### III- Effet de l'extrait brut sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*

Cette partie de notre expérimentation consiste à étudier l'effet inhibiteur probable de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

#### III-1- Matériels

##### 1- Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Dans un Erlen Meyer, 1 g de DNSA est dispersé dans 40 ml d'eau distillée. A cette solution 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 ml d'une solution de NaOH 2N rend le réactif limpide avec une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C.

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

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

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

A partir de cette solution mère (260 UI/ml) différentes dilutions sont préparées afin d'obtenir une activité enzymatique finale de l' $\alpha$ -amylase dans le milieu réactionnel de 1.3UI/ml.

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

##### 3- Solutions de substrat

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre (Merk). Différentes concentrations d'amidon sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6) afin de réaliser les tests sur l' $\alpha$ -amylase. Les concentrations finales utilisées dans le milieu réactionnel sont : 1.25 ; 2.5 et 5 g/l.

##### 4- Solutions de l'extrait brut de *Punica granatum*

Différentes concentrations de l'extrait brut sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6) afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase. Les concentrations finales utilisées sont : 1 ; 2.5 ; 3.75 ; 5 et 10 g/l.

##### 5-Solutions d'acarbose

L'acarbose « Glucobay®50 » fabriqué par Bayer est un pseudo-tétrasaccharide d'origine microbienne (*Actinoplanacea*). L'acarbose exerce ses effets au niveau de l'intestin, en inhibant certaines enzymes ( $\alpha$ -glucosidase) impliquées dans la biodégradation des disaccharides, des oligosaccharides et des polysaccharides. Il en résulte un retard dose-dépendant de la digestion de ces glucides. Par conséquent un ralentissement de la libération de glucose dans la circulation sanguine, ainsi l'acarbose diminue les fluctuations et surtout les pics post-prandiaux de la glycémie [Hermans, 1998] ; [Wens *et al.*, 2007].

Il est utilisé dans cette expérience comme contrôle positif (molécule de référence) afin de comparer son activité vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase par rapport à celle de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*.

Les concentrations finales utilisées dans le milieu réactionnel sont : 0.5 ; 0.75 ; 1.25 ; 2.5 ; et 5 g/l.

### 6- Solution de maltose (courbe d'étalonnage)

A fin de déterminer la quantité de maltose produite par hydrolyse enzymatique de l'amidon, on se réfère à une courbe d'étalonnage basée sur une gamme de différentes concentrations de maltose préparées à partir d'une solution mère de maltose à 2 g/l (Tabl. 13).

**Tableau 13** : Préparation de la gamme d'étalonnage du maltose

Tubes	1 (blanc)	2	3	4	5
Solution de maltose (ml)	0	0.5	1	1.5	2
Solution de tampon phosphate (ml)	2	1.5	1	0.5	0
Volume final (ml)	2	2	2	2	2
[Maltose] mMol	0	1.38	2.77	4.16	5.5



### III-2- Méthodes

#### 1-Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bernfeld (1955)

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

#### \*Mode opératoire

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

\* Milieu réactionnel = solution enzymatique+solution d'amidon

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

#### 2-Mesure de la vitesse initiale

Pour mesurer la vitesse initiale de la réaction enzymatique, il est nécessaire de mesurer la quantité de produit apparu ou le substrat disparu pendant les premières minutes de la réaction enzymatique.

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

Pour déterminer la quantité de maltose produite après cette hydrolyse enzymatique, nous avons choisi la méthode de dosage des sucres réducteurs décrite précédemment.

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

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

$V_i$  : vitesse initiale

$\Delta P$  : différence entre deux concentrations du produit formé

$\Delta t$  : différence entre deux temps de la réaction

### 3-Détermination des paramètres cinétique de l' $\alpha$ -amylase

Pour calculer les paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase ( $V_{max}$  et  $K_m$ ), nous avons utilisé la représentation en double inverse, celle de *Lineweaver Burk* ( $1/V_i = f(1/[S])$ ), qui permet de déterminer précisément les paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase.

### 4-Détermination des paramètres cinétiques en présence de l'extrait brut et l'acarbose

La présence de l'extrait brut et de l'acarbose à différentes concentrations a pour but de déterminer :

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

$$\%I = \frac{V_{i1} - V_{i2}}{V_{i1}} \times 100$$

$\%I$  : pourcentage d'inhibition

$V_{i1}$  : Vitesse initiale en absence d'inhibiteur

$V_{i2}$  : Vitesse initiale en présence d'inhibiteur

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



# Chapitre II:

## Résultats et Interprétation

### I- Analyses phytochimiques

L'analyse phytochimique réalisée sur différents extraits de l'épicarpe du fruit de *Punica granatum* a donné les résultats mentionnés dans le tableau 14.

La méthode de détection des différentes familles de composés consiste en une précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques. En effet, ces réactions se traduisent par l'apparition d'une turbidité, floculation ou changement de couleur qui nous renseigne sur la nature des familles existantes dans la plantes.

**Tableau 14:** Résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'épicarpe de *Punica granatum*.

Composés recherchés	Solvant d'extraction	Résultats
Alcaloïdes	Méthanol	-
Alcaloïdes	Ether diéthylique	-
Tanins	Méthanol	+++ (gallique)
	Eau	+++
Flavonoïdes	Méthanol	+++
Stérols et stéroïdes	Méthanol	-
Hétérosides stéroïdiques et triterpénique	Méthanol	-
Composés réducteurs	Méthanol	+++
Coumarines	Méthanol	-
Anthracénosides	Méthanol	+++
Anthocyanosides	Méthanol	++
Saponosides	Eau	++
Emodols	Ether diéthylique	+
Acides gras	Méthanol	-
Amidon	Eau	-

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

D'après le tableau précédent, les tests phytochimiques révèlent que l'épicarpe de fruits de *Punica granatum* est très riche en tanins, en flavonoïdes, en anthracénosides et en composés réducteurs, tandis que les anthocyanosides, les saponosides et les emodols sont moyennement présents.

Les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpènes, les coumarines, l'amidon et les acides gras sont révélés négatifs dans cette analyse.



## II- Rendement de l'extraction de l'épicarpe de *Punica granatum*

Après extraction sous reflux de l'épicarpe de *Punica granatum*, en présence d'une solution aqueuse de méthanol (30:70 v/v), l'extrait obtenu après évaporation à sec de couleur marron, aspect caramélisé, donne un rendement égal à 45%. Cet extrait est très soluble dans l'eau distillée.

## III- Toxicité de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*

### a/ Administration par voie orale

L'administration intragastrique (voie orale) de différentes doses de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* aux différents lots de rats pour la détermination des doses létales donne les résultats indiqués dans le tableau 15.

**Tableau 15 :** Effet de différentes doses de l'extrait brut administrées par voie orale sur le comportement des rats.

Lots		Temps								
		1h	3h	6h	24h	48h	72h	1 <sup>ère</sup> semaine	2 <sup>ème</sup> semaine	
Expérimentaux [Extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (mg/kg p.c.)]	Témoins (NaCl 0.9%)	10 ml/kg	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
	400	400	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
		800	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
		1000	Activité ±réduite	Activité ±réduite	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
		2000	Activité ±réduite	Activité ±réduite	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
		3000	Activité très réduite	Activité ±réduite	Activité ±réduite	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
		4000	4000	Activité très réduite	Activité très réduite	Activité très réduite	2 morts	1 mort	Comp. normal	Comp. normal
Total = 3/6 rats										

Comp. Comportement.

**b/ Administration par voie intrapéritonéale**

L'effet de l'injection intrapéritonéale de différentes doses de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* sur le comportement des rats est indiqué dans le tableau 16.

**Tableau 16:** Effet de différentes doses de l'extrait brut administrées par voie IP sur le comportement des rats.

Lots		Temps						1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>
		1h	3h	6h	24h	48h	72h	semaine	semaine
Témoins (NaCl 0.9%)	10 ml/kg	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
	100	Activité ±réduite	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal	Comp. normal
Expérimentaux [Extrait brut de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> (mg/kg p.c.)]	200	Activité ±réduite	Activité ±réduite	Activité ±réduite	Activité ±réduite	Activité ±réduite	3morts/6	Comp. normal	Comp. normal
	400	Activité très réduite	Activité très réduite	Activité très réduite	4morts/6	Activité ±réduite	Activité ±réduite	Comp. normal	Comp. normal
	600	Activité très réduite	Activité très réduite	Activité très réduite	6morts/6	-	-	-	-
	800	Activité très réduite	Activité très réduite	Activité très réduite	6morts/6	-	-	-	-
	1000	Activité très réduite	Activité très réduite	Activité très réduite	6morts/6	-	-	-	-

Comp. Comportement



D'après les résultats indiqués dans le tableau 15, on note que l'extrait brut de l'épicerpe de *Punica granatum* administré par voie orale provoque une mortalité de 50% des animaux à une dose de 4000 mg/kg p.c. après 48 h. Cette dose est considérée comme étant une DL<sub>50</sub> de l'extrait brut par voie orale.

Par voie intrapéritonéale (Tabl.16), la dose de 200mg/kg p.c. de l'extrait brut provoque la mort de la moitié du lot (50%) dans une période de 72 h. La dose de 600 mg/kg p.c. provoque la mort totale (100%) après 24 h. Ces doses sont considérées respectivement la DL<sub>50</sub> et la DL<sub>100</sub> de l'extrait brut par voie intrapéritonéale.

#### IV- Induction du diabète par la STZ

Quarante huit heures après l'injection intrapéritonéale de 50 mg/kg p.c. de la STZ aux rats d'expérimentation, les paramètres suivant sont analysés :

- **La glycémie** : la conséquence principale de l'injection de la STZ est l'hyperglycémie. Cette dernière atteint un taux variant entre 2 à 3.5 g/l chez l'ensemble de rats (n=30) (Fig. 04).

- **Le poids corporel** : parmi les effets observés après l'injection de la STZ une chute de poids corporel des animaux de l'ordre de 11% (Fig. 05).

- **La chimie des urines** : l'analyse de quelques paramètres urinaires des rats rendus diabétiques par la STZ donne les résultats indiqués dans le tableau 17.

**Tableau 17** : Chimie des urines des rats rendus diabétiques par la STZ (50 mg/kg p.c.).

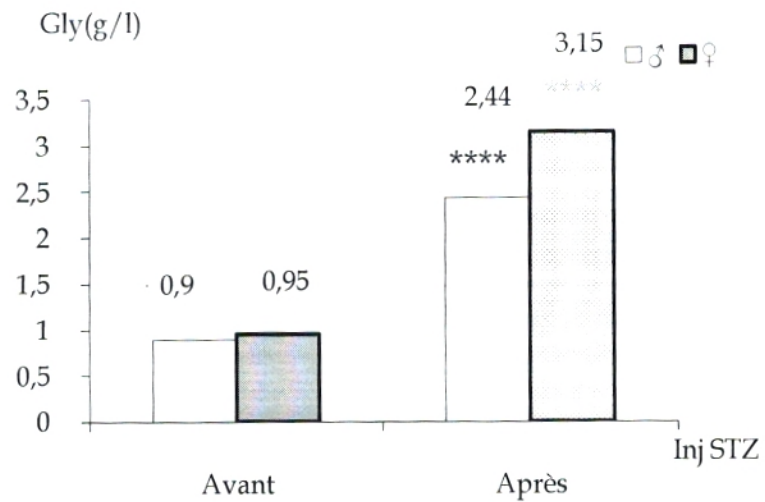
Paramètres	Sang	Corps cétoniques	Glucose	Protéines	pH
Révélation	Trace ou (-)	Trace ou (-)	++++	Trace ou (-)	6 à 6.5

(++++): Forte présence

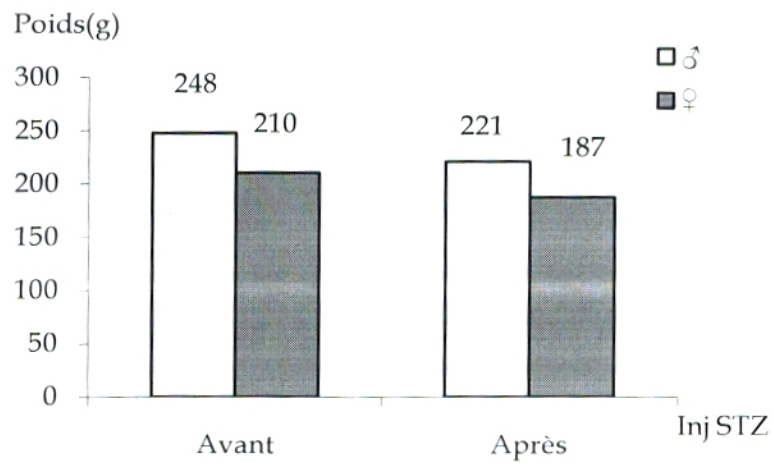
(-): Négatif

- **Les symptômes du diabète sucré** : Après 48h de l'injection de la STZ aux différents lots de rats, les symptômes cliniques du diabète sucré commencent à apparaître principalement :

- ✓ Une polyurie ;
- ✓ Une polydipsie ;
- ✓ Une polyphagie.



**Figure 04** : Variation de la glycémie 48 h après l'injection IP de la STZ (50 mg/kg p.c.) aux rats d'expérimentation.  
(n=30 ; \*\*\*\* p<0.0001)



**Figure 05** : Variation du poids corporel 48 h après l'injection IP de la STZ (50 mg/kg p.c.) aux rats d'expérimentation (n=30).



**V- Effets antidiabétiques de l'extrait brut *in vivo*****V-1- Effet chez les rats normo glycémiques****V-1-1- Effet à court terme****a/ Administration par voie orale**

L'administration de 400 mg/kg p.c. de l'extrait brut par voie orale chez les rats normaux donne les résultats indiqués dans le tableau 18 et la figure 06.

**Tableau 18:** Variation de la glycémie à court terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* par voie orale.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)				
		0	30	60	120	180
<b>1 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		1.03±0.035	1.14±0.055 (10.06%)	1.16±0.015 (12.19%)*	1.13±0.068 (9.67%)	1.06±0.073 (2.71%)
<b>2 : Normaux traités (NTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext. brut »		0.99±0.048	1.18±0.016 (19.67%)*	1.24±0.009 (25.96%)****	1.15±0.053 (16.43%)	1.07±0.033 (8.92%)
<b>3 : Normaux positifs (Npos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		0.89±0.072	0.81±0.036 (-9.23%)*	0.77±0.041 (-13.51%)***	0.59±0.0013 (-33.33%)***	0.55±0.025 (-37.61%)****

**b/ Administration par voie intrapéritonéale**

Le tableau suivant ainsi que la figure 07, montrent l'effet sur la glycémie après injection intrapéritonéale de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* chez les rats normaux comparés aux témoins après un suivi de 3 h.

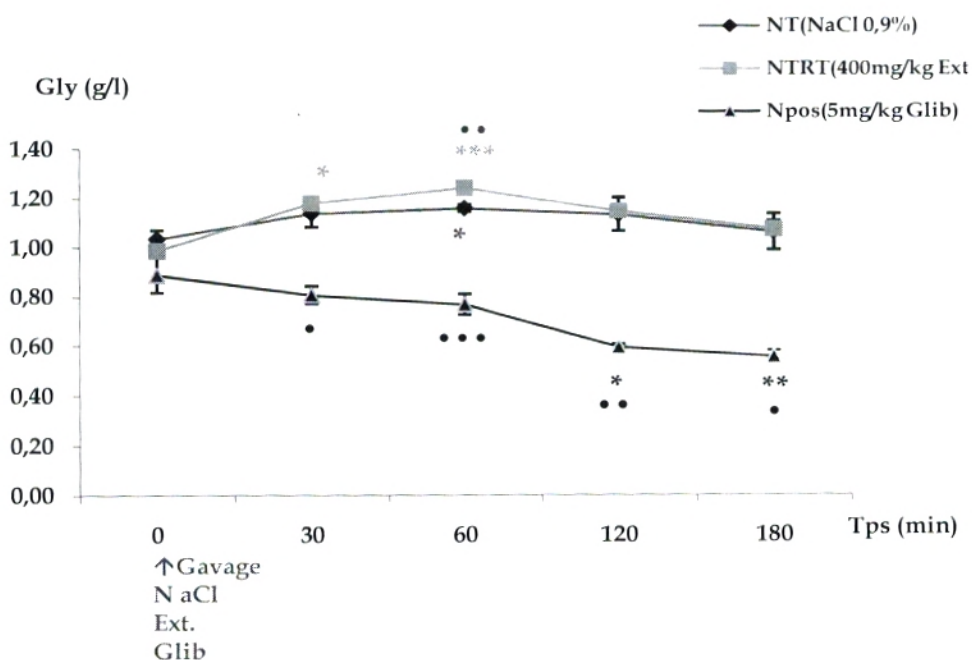
**Tableau 19 :** Variation de la glycémie à court terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* par voie IP.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)				
		0	30	60	120	180
<b>1 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.88±0.072	0.98±0.024 (11.11%)	0.87±0.025 (-1.14%)	0.81±0.065 (-8%)	0.74±0.057 (-15.7%)
<b>2 : Normaux traités (NTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext. brut »		0.96±0.069	1.15±0.011 (19.84%)*	1.05±0.021 (10.08%)*	0.93±0.034 (-2.87%)	0.98±0.043 (2.77%)*
<b>3 : Normaux positifs (Npos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		0.97±0.017	0.92±0.067 (-4.55%)	0.77±0.068 (-20.7%)*	0.52±0.072 (-46.58%)****	0.66±0.109 (-31.88%)*

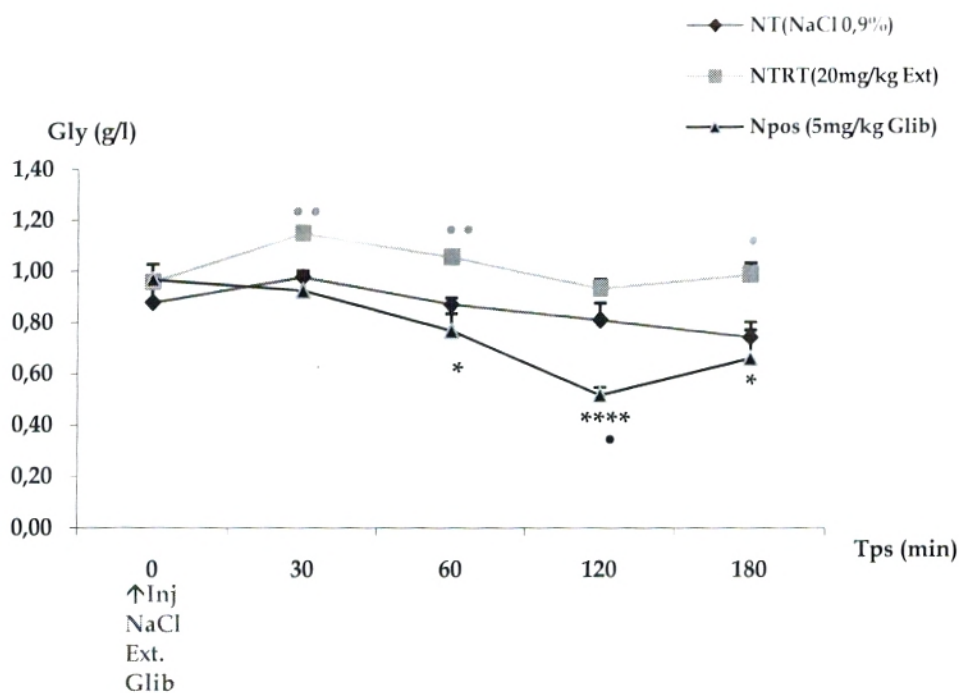
(%) : pourcentage de variation par rapport à T0

(\*) : degré de signification par rapport à T0

(\*) : degré de signification par rapport aux témoins



**Figure 06:** Evolution de la glycémie durant 3 heures suite à l'administration par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (400 mg/kg p.c.) chez les rats normaux. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, (\* / • P<0.05) (n=5).



**Figure 07 :** Evolution de la glycémie durant 3 heures suite à l'administration par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (20 mg/kg p.c.) chez les rats normaux. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, (\* / • P<0.05) (n=5).

(\*) : degré de signification par rapport à T0 (•) : degré de signification par rapport aux témoins



## **Interprétation des résultats**

### **a/ Administration par voie orale**

D'après les résultats représentés sur la figure 06, l'administration de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* par voie orale à une dose de 400 mg/kg p.c. ne provoque aucun effet apparent sur la glycémie chez les rats normaux, par rapport à celle des témoins, la glycémie des rats traités par l'extrait reste dans les limites normales avec une légère augmentation pendant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> heure (1.18 g/l et 1.24 g/l respectivement).

Par ailleurs chez les rats traités par le glibenclamide (5 mg/kg p.c.), une diminution significative de la glycémie est observée dès la 60<sup>ème</sup> min. Cette diminution atteint un pourcentage relativement important de 37.61% à la 3<sup>ème</sup> heure de l'expérience avec une glycémie de 0.55 g/l.

### **■ b/ Administration par voie intrapéritonéale**

L'administration de l'extrait brut de *Punica granatum* par voie IP à une dose de 20 mg/kg p.c. ne provoque aucun effet hypoglycémiant. Comme celle des rats témoins, la glycémie des rats traités par l'extrait reste dans les limites normales au cours de l'expérimentation avec une légère augmentation pendant la première heure (Fig. 07).

Par contre le glibenclamide à 5 mg/kg p.c. par voie IP provoque un effet hypoglycémiant hautement significatif avec un taux de diminution de 46.58% à la 2<sup>ème</sup> heure de l'expérimentation et uniquement de 32% à la 3<sup>ème</sup> heure. A la fin de l'expérience la diminution est moins importante par rapport à la précédente avec un taux de 32% (0.66g/l) ce qui indique le retour à l'état initial.

### V-1-2- Effet à long terme

#### a/ Administration par voie orale

L'administration de 400 mg/kg p.c. de l'extrait brut par voie orale chez les rats normaux chaque jour pendant 15 jours donne les résultats indiqués dans le tableau 20 et la figure 08.

**Tableau 20:** Variation de la glycémie à long terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épitarpe de *Punica granatum* par voie orale.

Temps (semaine)		Glycémie (g/l)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.89±0.046	0.92±0.070 (3.35%)	1.08±0.034 (21.20%)**
<b>2 : Normaux traités (NTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. d'Ext. brut »		1.08±0.034	0.80±0.025 (-26.33%)***	0.94±0.057 (-13.07%)

#### b/ Administration par voie intrapéritonéale

Le tableau suivant ainsi que la figure 09, montrent les résultats obtenus après injection quotidienne par voie intrapéritonéale de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut chez les rats normaux pendant deux semaines.

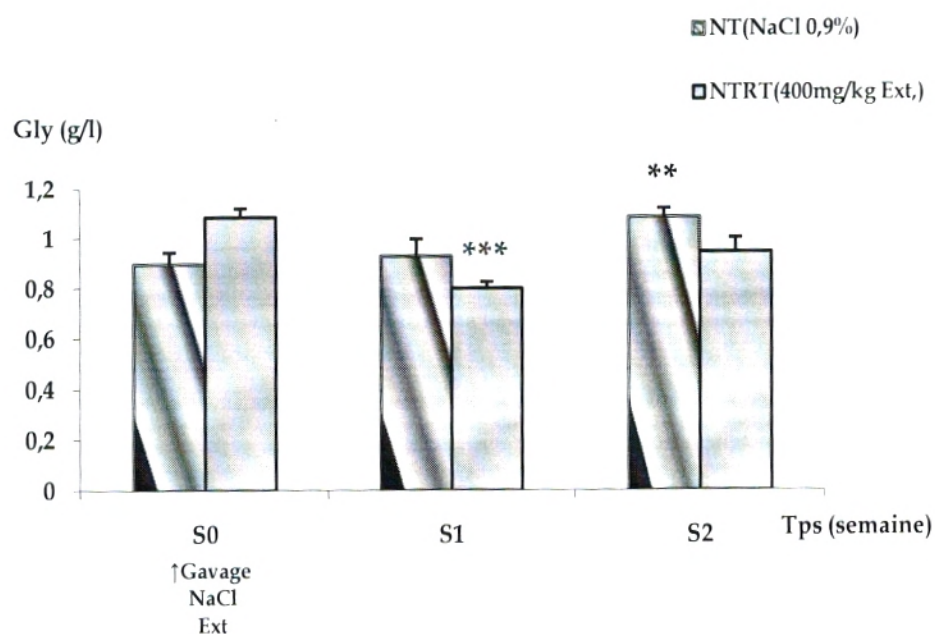
**Tableau 21 :** Variation de la glycémie à long terme chez les rats normaux traités par l'extrait brut de l'épitarpe de *Punica granatum* par voie IP.

Temps (semaine)		Glycémie (g/l)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		1.19±0.05	1.12±0.007 (-6.48%)	0.87±0.06 (-26.92%)**
<b>2 : Normaux traités (NTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. d'Ext. brut »		1.12±0.013	0.95±0.053 (-15.33%)*	0.83±0.022 (-25.49%)****

(%) : pourcentage de variation par rapport à S0

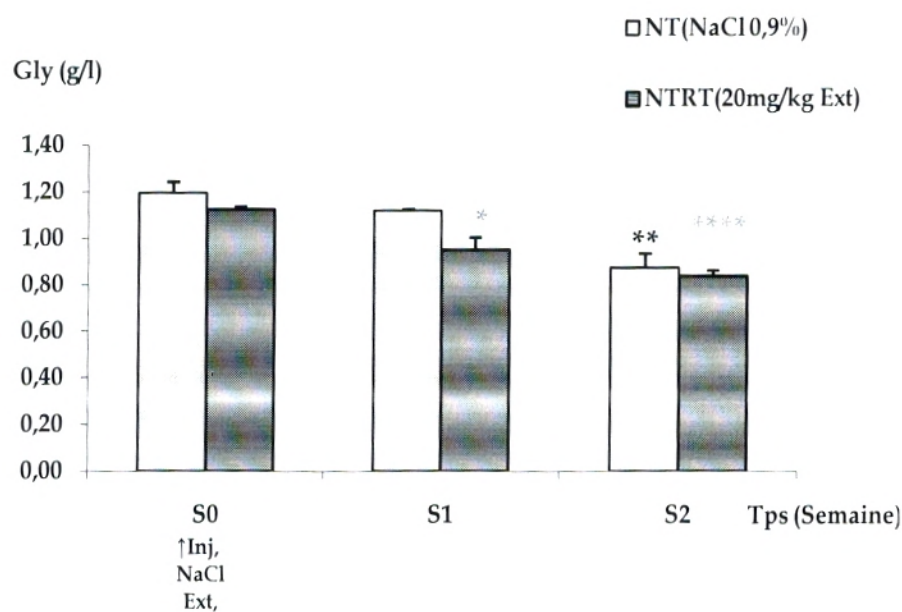
(\*) : degré de signification par rapport à S0





**Figure 08** : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (400 mg/kg p.c.) chez les rats normaux.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, (\*  $P < 0.05$ ) (n=5).



**Figure 09** : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (20 mg/kg p.c.) chez les rats normaux.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, (\*  $P < 0.05$ ) (n=5).

(\*) : degré de signification par rapport à S0

### **Interprétation des résultats**

#### **a/ Administration par voie orale**

Une diminution très significative de la glycémie de l'ordre de 26.33% est observée chez les rats normaux traités par l'extrait brut au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine. Au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine cette diminution atteint seulement 13.07%.

Durant la période d'expérimentation, l'extrait ne provoque aucun effet hypoglycémiant apparent, la glycémie des rats traités reste dans les limites des valeurs normales de 0.80 à 0.94 g/l durant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine respectivement.

Ainsi, les rats normaux témoins présentent une légère augmentation de la glycémie de l'ordre de 21% au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine (Fig. 08).

#### **b/ Administration par voie intrapéritonéale**

L'extrait brut administré par voie IP à une dose de 20 mg/kg p.c., provoque une diminution significative de la glycémie des rats normaux au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine (15.33%), cette diminution est hautement significative au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine (25.49%) mais sans aucun effet hypoglycémiant notable. La glycémie atteint une valeur normale de 0.95 g/l et 0.83 g/l au cours de la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine respectivement.

Même, chez les rats témoins, une diminution significative de la glycémie de 27% est observée au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine de l'expérimentation (Fig. 09).



## V-2-Effet sur la régulation de l'hyperglycémie temporaire (HGPO)

### a/ Administration par voie orale

L'administration de 400 mg/kg p.c. par voie orale de l'extrait brut aux rats normaux soumis à une HGPO (gavage de glucose à 2.5 g/kg p.c.) nous a permis d'obtenir les résultats indiqués dans le tableau 22 et la figure 10.

**Tableau 22:** Variation de la glycémie chez les rats normaux soumis à une HGPO et traités par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* par voie orale.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)				
		0	30	60	120	180
<b>1 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.91±0.067	1.30±0.193 (42.45%)	1.62±0.170 (77.46%)****	1.36±0.110 (48.6%)*	0.97±0.072 (5.7%)
<b>2 : Normaux traités (NTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext. brut »		1.01±0.047	1.40±0.127 (37.94%)*	1.42±0.060 (40.12%)****	1.37±0.098 (35.77%)*	1.28±0.106 (26.48%)*
<b>3 : Normaux positifs (Npos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		0.86±0.064	0.75±0.043 (-12.8%)*	1.13±0.080 (31.16%)*	0.59±0.098 (-31.4%)**	0.44±0.062 (-48.84%)***

### b/ Administration par voie intrapéritonéale

La dose de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut administrée par voie IP chez les rats soumis à une épreuve d'HGPO donne les résultats indiqués dans le tableau 23 et représentés graphiquement sur la figure 11.

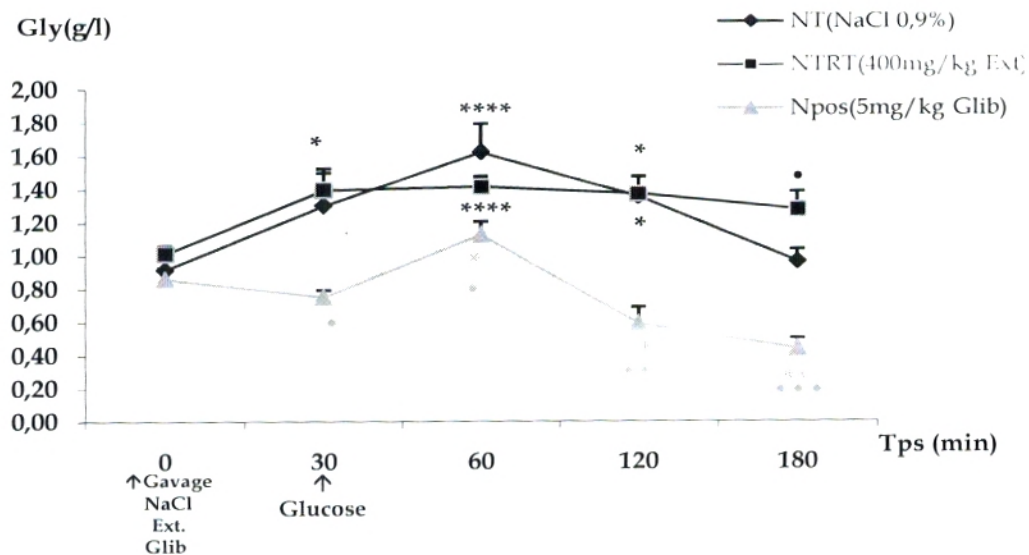
**Tableau 23:** Variation de la glycémie chez les rats normaux soumis à une HGPO et traités par l'extrait brut de l'épicarpe *Punica granatum* par voie IP.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)				
		0	30	60	120	180
<b>1 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.91±0.067	1.30±0.193 (42.45%)	1.62±0.170 (77.46%)****	1.36±0.110 (48.6%)*	0.97±0.072 (5.7%)
<b>2 : Normaux traités (NTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext. brut »		0.92±0.074	1.23±0.096 (34.64%)*	1.20±0.195 (31.15%)	0.93±0.341 (1.37%)*	1.07±0.334 (17.21%)
<b>3 : Normaux positifs (Npos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		1.18±0.016	1.08±0.061 (-8.81%)	1.30±0.086 (10.17%)	0.80±0.058 (-32.03%)***	0.42±0.040 (-64.07%)****

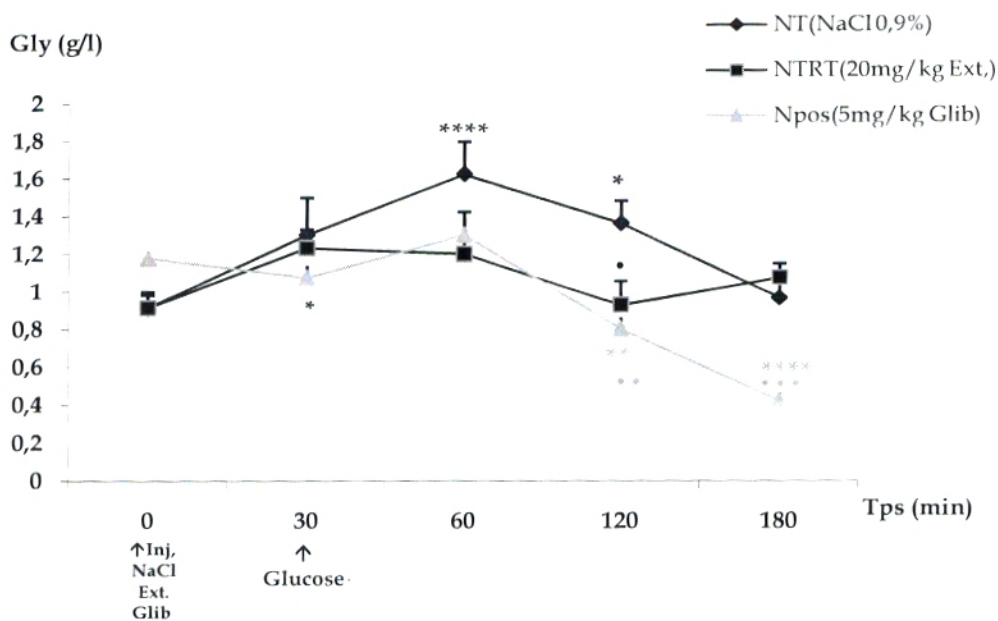
(%) : pourcentage de variation par rapport à T0

(\*) : degré de signification par rapport à T0

(\*) : degré de signification par rapport aux témoins



**Figure 10 :** Evolution de la glycémie des rats normaux ayant une HGPO traités par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie orale (400 mg/kg p.c.)  
Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ ESM, (\*/\* P<0.05) (n=5).



**Figure 11 :** Evolution de la glycémie des rats normaux ayant une HGPO et traités par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie IP (20 mg/kg p.c.)  
Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ ESM, (\*/\* P<0.05) (n=5).

(\*) : degré de signification par rapport à T0 (•) : degré de signification par rapport aux témoins



### **Interprétation des résultats**

#### **a/ Administration Par voie orale**

Le test de tolérance orale au glucose (2.5 g/kg p.c.), nous a permis d'observer que chez les témoins le pic d'hyperglycémie atteint son maximum 30 min après le gavage de la solution de glucose c'est-à-dire à la 60<sup>ème</sup> min de l'expérience, la glycémie à ce point est augmentée d'une façon hautement significative de l'ordre de 77.46% pour atteindre une valeur de 1.62 g/l. Cette augmentation persiste jusqu'à la 2<sup>ème</sup> heure mais avec un taux moins important que le précédent (48.6%) avec une glycémie de 1.36 g/l.

Chez les rats traités par l'extrait brut de *Punica granatum* à une dose de 400 mg/kg p.c. par voie orale, le pic d'hyperglycémie est moins important par rapport à celui des témoins à la 60<sup>ème</sup> min de l'expérimentation. Cette hyperglycémie atteint une valeur de 1.42 g/l (+40.12%) contrairement aux témoins où elle atteint 1.62 g/l (77.46%), ce qui indique que l'extrait empêche l'augmentation du pic d'hyperglycémie. A la 120<sup>ème</sup> min de l'expérimentation, le pic de l'hyperglycémie atteint un taux de 48.6% (1.36 g/l) chez les témoins, par contre chez les rats traités par l'extrait le taux d'augmentation atteint uniquement 35.77% (1.37 g/l), après, le retour progressif de la glycémie à l'état normal semble être plus lent que chez les témoins à la fin de l'expérience (3<sup>ème</sup> heure).

Chez les rats témoins positifs (glibenclamide à 5mg/kg p.c.), la glycémie diminue légèrement 30 min après son administration ( $t_{30}$  min), du fait de son effet insulino-stimulateur et par conséquent hypoglycémiant. Mais après gavage de glucose ( $t_{30}$  min), le pic d'hyperglycémie apparaît 30 min après ( $t_{60}$  min) avec une augmentation moins importante que chez les témoins normaux, variation de 31% au lieu de 77%. Par la suite, la glycémie diminue progressivement les 2 heures qui suivent, pour atteindre des valeurs inférieures à la glycémie initiale avec une hypoglycémie à la fin de l'expérience de 0.44 g/l (Fig. 10).

### **b/ Administration par voie intrapéritonéale**

La dose de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut de *Punica granatum* administrée par voie IP chez les rats soumis à une HGPO (glucose à 2.5 g/kg p.c.) empêche l'apparition du pic d'hyperglycémie. L'effet de cette dose commence à apparaître 30 min après le gavage de la solution de glucose ( $t_{60}$  min). La glycémie à ce point prend une valeur de 1.20 g/l (+31.15%) contrairement aux témoins où la glycémie augmente d'une façon hautement significative pour atteindre une valeur de 1.62 g/l avec un taux d'augmentation de 77.46% par rapport à l'état initial.

A la 2<sup>ème</sup> heure, la glycémie des rats traités par l'extrait est diminuée jusqu'à une valeur normale de 0.93 g/l (+1.37%), par contre le pic de l'hyperglycémie persiste chez les témoins avec une hyperglycémie de 1.36 g/l (48.6%) ce qui indique que l'extrait brut de *Punica granatum* administré par voie IP empêche aussi l'augmentation de la glycémie après une surcharge orale en glucose.

Pour les rats traités par le glibenclamide (5 mg/kg p.c.), nous avons noté que l'effet hypoglycémiant de ce dernier apparaît nettement à la 3<sup>ème</sup> heure de l'expérience où la diminution de la glycémie est hautement significative avec un pourcentage de 64.07% et une glycémie de 0.42 g/l en moyenne (Fig. 11).



### V-3-Effet sur la régulation de l'hyperglycémie permanente (rats diabétiques)

#### V-3-1-Effet à court terme

##### a/ Administration par voie orale

L'étude de l'effet à court terme de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* sur la variation de l'hyperglycémie des rats diabétiques nous a permis d'obtenir les résultats indiqués dans le tableau 24 et la figure 12.

**Tableau 24** : Variation de la glycémie à court terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de l'épicarpe *Punica granatum* par voie orale.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)					
		0	30	60	120	180	240
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »	2.45±0.34	3.05±0.31 (24.69%)	3.28±0.32 (34.09%)	3.49±0.28 (42.60%)*	3.37±0.35 (37.93%)	3.19±0.40 (30.41%)	
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »	2.48±0.37	2.96±0.16 (19.68%)	2.83±0.20 (14.26%)	3.06±0.23 (23.55%)*	2.85±0.32 (15.23%)	3.20±0.35 (29.21%)	
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »	2.40±0.71	2.54±0.62 (5.73%)	2.36±0.78 (-1.67%)	2.23±0.69 (-6.98%)	1.97±0.60 (-18.02%)	2.18±0.76 (-9.06%)	

##### b/ Administration par voie intrapéritonéale

L'effet à court terme de l'extrait brut administré par voie IP à une dose de 20 mg/kg p.c. chez les rats diabétiques donne les résultats du tableau 25 représentés sur la figure 13.

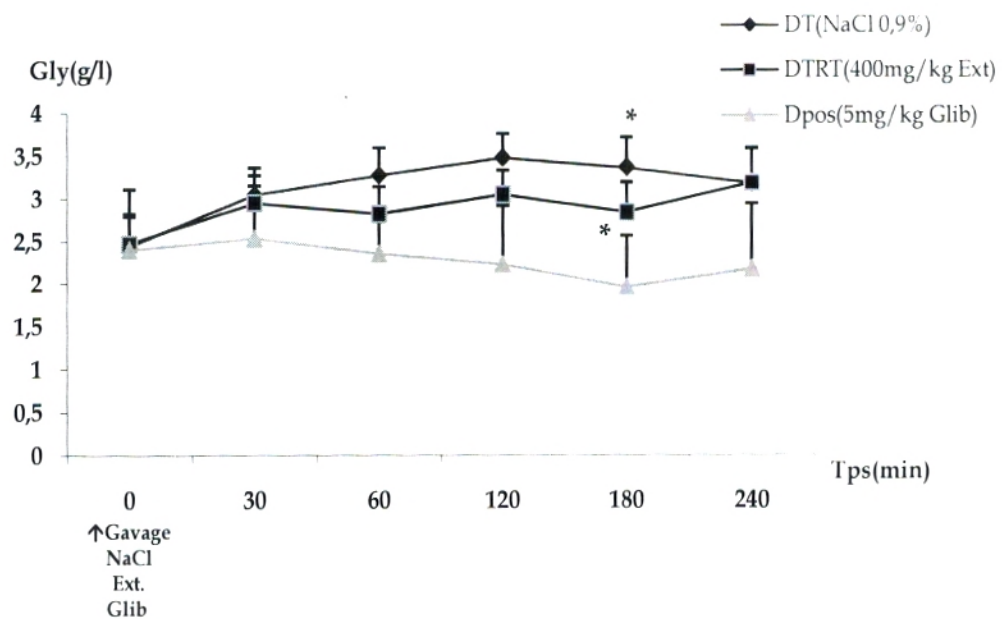
**Tableau 25** : Variation de la glycémie à court terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut *Punica granatum* par voie IP.

Lots	Temps (min)	Glycémie (g/l)					
		0	30	60	120	180	240
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »	3.06±0.20	3.41±0.31 (11.6%)	3.59±0.31 (17.3%)	3.24±0.36 (5.9%)	2.79±0.47 (-8.7%)	2.45±0.54 (-20%)	
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext brut »	3.22±0.37	2.95±0.38 (-8.32%)	2.98±0.38 (-7.27%)	2.78±0.40 (-13.6%)	2.62±0.38 (-18.63%)	2.70±0.47 (-15.9%)	
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »	3.18±0.65	2.92±0.71 (-8.10%)	2.88±0.77 (-9.49%)	2.61±0.75 (-17.72%)	2.73±0.82 (-14.20%)	2.80±0.86 (-11.94%)	

(%) : pourcentage de variation par rapport à T0

(\*) : degré de signification par rapport à T0

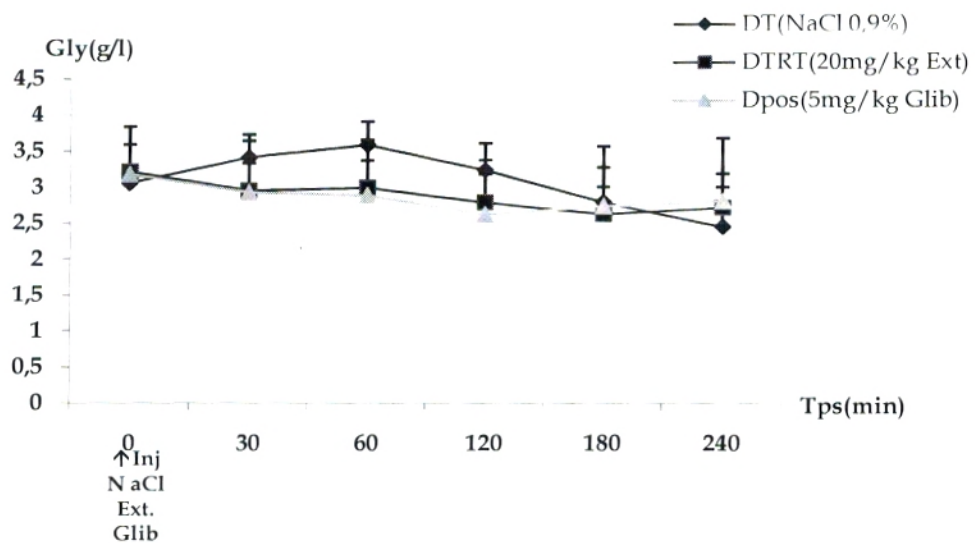




**Figure 12:** Evolution de la glycémie durant 4 heures suite à l'administration par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (400 mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, (\* P < 0.05) (n=5).

(\*) : degré de signification par rapport à T0



**Figure 13 :** Evolution de la glycémie durant 4 heures suite à l'administration par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (20 mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM (n=5).

## **Interprétation des résultats**

### **a/ Administration Par voie orale**

Les rats diabétiques témoins traités par l'eau physiologique présentent une hyperglycémie très importante qui persiste jusqu'à la fin de l'expérimentation (4 h) pour atteindre une valeur finale de 3.19 g/l.

Le traitement par voie orale par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* à une dose de 400 mg/kg p.c. chez les rats diabétiques ne semble provoquer aucun effet sur l'hyperglycémie. Ces animaux présentent une hyperglycémie moins importante que celle des témoins durant les 3 premières heures de l'expérience pour atteindre un taux final de 3.20 g/l.

Par contre l'hyperglycémie des rats traités par le glibenclamide à une dose de 5 mg/kg p.c. par voie orale diminue d'une manière progressive pour atteindre un taux de 18% à la 3<sup>ème</sup> heure avec une glycémie de 1.97 g/l pour être augmentée légèrement à la fin de l'expérience (-9.06% par rapport à t<sub>0</sub> min) (Fig. 12).

### **b/ Administration par voie intrapéritonéale**

Les rats diabétiques témoins présentent une hyperglycémie qui persiste jusqu'à la 4<sup>ème</sup> heure de l'expérience avec des valeurs très importantes. Cette hyperglycémie dépasse les 3 g/l pendant les deux premières heures de l'expérience pour être diminuée légèrement à la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> heure (8.7 et 20% respectivement).

La dose de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut de *Punica granatum* administrée par voie IP aux rats diabétiques provoque une légère diminution de l'hyperglycémie de l'ordre de 8% dès la 30<sup>ème</sup> min qui suit l'injection, cette diminution non significative persiste jusqu'à la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> heure de l'expérimentation pour atteindre un taux de 13.6% et 18.63% respectivement. Malgré cette diminution, la glycémie reste toujours élevée avec des valeurs relativement importantes inférieures à 3 g/l dès la 30<sup>ème</sup> min.

Le glibenclamide (5mg/kg p.c.) par voie IP provoque aussi une diminution non significative de l'hyperglycémie jusqu'à la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> heure de l'expérience avec un taux de diminution de 17.72% et 14.20% respectivement mais sans atteindre la glycémie de l'état normal (Fig. 13).



### V-3-2-Effet à long terme

#### a/ Administration par voie orale

Le tableau 26 et la figure 14, montrent l'effet de l'extrait brut administré par voie orale sur la variation de la glycémie chez les rats diabétiques durant une période de 15 jours.

**Tableau 26 :** Variation de glycémie à long terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* par voie orale.

		Glycémie (g/l)		
		S0	S1	S2
Lots	Temps (semaine)			
	<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10ml/kg p.c. NaCl 0.9% »	2.45±0.34	2.48±0.67 (1.32%)	3.70±0.41 (50.92%)
	<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »	2.48±0.32	1.09±0.41 (-56.06%)*	1.66±0.41 (-32.92%)*
	<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »	2.40±0.71	1.19±0.75 (-50.55%)	3.30±1.28 (37.36%)

#### b/ Administration par voie IP

L'extrait brut administré quotidiennement par voie IP aux rats diabétiques durant les deux semaines d'expérimentation donne les résultats indiqués dans le tableau 27 et la figure 15.

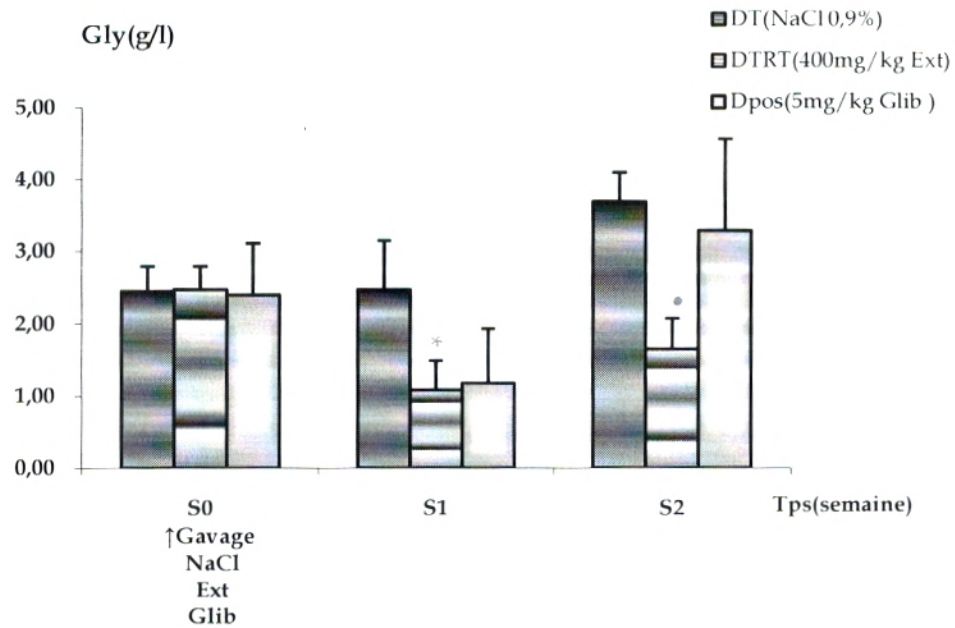
**Tableau 27:** Variation de la glycémie à long terme chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de l'épicarpe *Punica granatum* par voie IP.

		Glycémie (g/l)		
		S0	S1	S2
Lots	Temps (semaine)			
	<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »	3.06±0.49	3.015± 0.31 (-1.34%)	3.05±0.60 (-0.03%)
	<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext. brut »	3.22±0.37	1.72±0.36 (-46.7%)**	1.72±0.23 (-46.6%)**
	<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »	3.18±0.65	2.64±0.63 (-16.84%)	1.64±0.39 (-48.34%)*

(%) : pourcentage de variation par rapport à S0

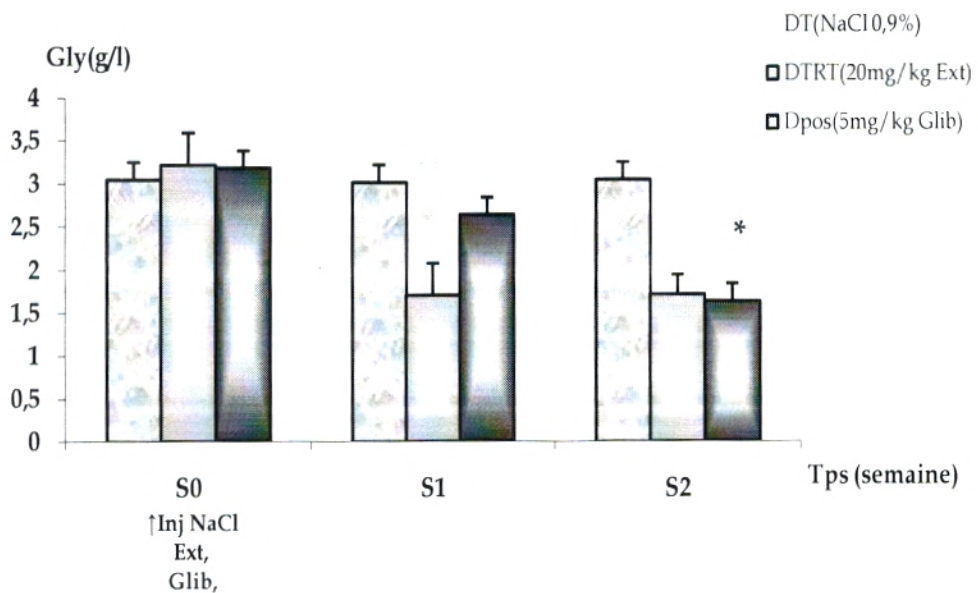
(\*) : degré de signification par rapport à S0

(\*\*) : degré de signification par rapport aux témoins



**Figure 14** : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie orale de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (400 mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, (\*/\* P<0.05) (n=5).



**Figure 15** : Evolution de la glycémie durant deux semaines suite à l'administration quotidienne par voie IP de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* (20 mg/kg p.c.) chez les rats diabétiques.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, (\*/\* P<0.05) (n=5).

(\*) : degré de signification par rapport à S0 (•) : degré de signification par rapport aux témoins

## **Interprétation des résultats**

### **a/ Administration par voie orale**

Chez les rats diabétiques, au bout de la 1<sup>ère</sup> semaine du traitement quotidien par l'extrait brut de *Punica granatum* par voie intragastrique, nous avons noté une diminution importante de l'hyperglycémie de l'ordre de 56% par rapport à l'état initial, la glycémie diminue de 2.48 g/l à 1.09 g/l. Par ailleurs l'hyperglycémie des rats témoins reste stable au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine (2.48 g/l).

Au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine, les témoins diabétiques présentent une hyperglycémie très importante de 3.70 g/l avec un taux d'augmentation de l'ordre de 50.92% par rapport à l'état initial, tandis que chez les rats traités par l'extrait, la diminution de l'hyperglycémie au cours de cette semaine est moins importante que la précédente mais avec un taux relativement important de l'ordre de 32.92% avec une glycémie de 1.66 g/l.

Chez les rats diabétiques témoins ayant reçu une dose de 5 mg/kg p.c. de glibenclamide par voie orale, une diminution de l'hyperglycémie de l'ordre de 50.55% est observée au cours de la première semaine. Par contre, une réaugmentation de la glycémie est notée au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine pour atteindre une valeur de 3.3 g/l avec un pourcentage d'augmentation de 37.36% (Fig. 14).

Par ailleurs, parmi les symptômes caractéristiques de l'état du diabète : la polyurie. Il a été observé une diminution importante du volume des urines éliminées chez les rats traités par l'extrait durant toute la période expérimentale. Tandis que cette polyurie demeure très importante chez les deux autres lots des rats diabétiques témoins.



**b/ Administration par voie intrapéritonéale**

L'administration quotidienne de l'extrait brut de *Punica granatum* par voie IP à une dose de 20 mg/kg p.c. provoque une diminution significative de l'hyperglycémie de 3.22 g/l à 1.72 g/l pendant la 1<sup>ère</sup> semaine avec un pourcentage de diminution de l'ordre de 46.7%. Cette diminution importante de l'hyperglycémie se maintient durant la 2<sup>ème</sup> semaine avec le même pourcentage de diminution. Par contre l'hyperglycémie des rats diabétiques témoins reste pratiquement stable aux alentours de 3 g/l durant toute la durée de l'expérimentation.

Chez les rats traités par le glibenclamide par voie IP, l'hyperglycémie diminue progressivement à la fin de la 1<sup>ère</sup> semaine avec une diminution non significative de l'ordre de 16.48% (2.64 g/l), puis elle diminue davantage au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine pour atteindre une valeur de 1.64 g/l (-48.34%) (Fig. 15).

Cette voie d'administration réduit aussi le volume des urines éliminées chez les rats traités par l'extrait brut de *Punica granatum*. Les deux autres lots des rats diabétiques présentent une polyurie très importante durant toute la période de l'expérimentation.

### V-4- Effet sur la régulation de quelques paramètres lipidiques

#### a/ Administration par voie orale

Les tableaux suivants regroupent les valeurs obtenues après dosage enzymatique des triglycérides et du cholestérol total après administration quotidienne de 400 mg/kg p.c. de l'extrait brut de l'épicrape de *Punica granatum* par voie orale chez les rats normaux et diabétiques, pendant deux semaines.

**Tableau 28:** Les valeurs moyennes des triglycérides plasmatiques chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe *Punica granatum* par voie orale.

Lots	Temps (semaine)	Triglycérides (g/l)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		2.08±0.5	2.01±0.43 (-3.43%)	4.94±0.44 (137.16%)**
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »		2.00±0.63	1.55±0.31 (-22.6%)	1.92±0.72 (-4.12%)•
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		3.89±1.2	1.70±0.83 (-54.35%)	2.78±1.29 (-30.09%)•
<b>4 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		1.82±0.43	1.74±0.2 (-4.28%)	2.0±0.23 (9.40%)
<b>5 : Normaux traités (NTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »		2.0±0.23	1.08±0.1 (-45.7%)*•	1.84±0.24 (-7.39%)

**Tableau 29 :** Les valeurs moyennes du cholestérol total chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe *Punica granatum* par voie orale.

Lots	Temps (semaine)	Cholestérol (g/l)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.65±0.052	0.40±0.094 (-39.16%)*	0.64±0.096 (-2.28%)
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »		0.65±0.067	0.40±0.068 (-38.83%)*	0.38±0.054 (-41.9%)*•
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		0.62±0.130	0.41±0.021 (-32.92%)*	0.40±0.13 (-35.36%)
<b>4 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.45±0.06	0.42±0.083 (-6.66%)	0.39±0.045 (-12.77%)
<b>5 : Normaux traités (NTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »		0.39±0.045	0.54±0.074 (39.5%)*	0.56±0.067 (43.95%)*•

Chaque valeur signifie la moyenne ±ESM (n=5)

(\*) : degré de signification par rapport à S0

(•) : degré de signification par rapport aux témoins

(%) : pourcentage de variation par rapport à S0



## **Interprétation des résultats**

### ■ **Effet sur la triglycémie**

#### **a/ Les rats diabétiques**

Le taux significativement élevé des triglycérides plasmatiques chez les rats diabétiques témoins apparaît nettement au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine de l'expérimentation, pour atteindre une valeur moyenne de 4.94 g/l avec un taux d'augmentation de l'ordre de 137.16% par rapport à l'état initial, l'une des conséquences de l'installation du diabète induit par la STZ.

Chez les rats traités par l'extrait brut de *Punica granatum*, une diminution de l'ordre de 22.6% est observée durant la première semaine où le taux des triglycérides atteint 1.55 g/l. Au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine le taux des triglycérides reste pratiquement stable (1.92 g/l) par rapport à l'état initial (2 g/l) ce qui signifie que l'extrait hydroalcoolique de *Punica granatum* empêche l'augmentation du taux des triglycérides plasmatiques si on compare avec les témoins où le taux des triglycérides est augmenté au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine.

Chez les rats traités par le glibenclamide (5 mg/kg p.c.), une diminution de l'ordre de 54.35% des triglycérides plasmatiques est observée au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine avec une valeur de 1.70 g/l par rapport à l'état initial où le taux des triglycérides atteint une valeur de 3.89 g/l. Au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine, la diminution des triglycérides plasmatiques est moins importante que la précédente où elle atteint uniquement 30% par rapport à l'état initial.

#### **b/ Les rats normaux**

Une diminution peu significative du taux des triglycérides est notée chez les rats normaux traités par l'extrait brut à une dose de 400 mg/kg p.c. par voie orale. Cette diminution est de l'ordre de 45.7% au cours de la première semaine. Au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine la diminution est moins importante que la précédente où elle atteint uniquement un pourcentage de 7.39%. Par contre, chez les témoins le taux des triglycérides reste pratiquement stable durant l'expérimentation.



## ■ Effet sur la cholestérolémie

### a/ Les rats diabétiques

Après deux semaines d'expérimentation, le taux du cholestérol total chez les rats diabétiques traités par l'extrait brut de *Punica granatum* à une dose de 400 mg/kg p.c. par voie orale est diminué de 0.65 g/l à 0.38 g/l à la fin de l'expérience. Cette diminution est de l'ordre de 38.83% et 41.96% au cours de la première et la deuxième semaine respectivement par rapport à l'état initial. Par contre, chez les rats diabétiques témoins au cours de la 1<sup>ème</sup> semaine, le taux du cholestérol total est diminué pour atteindre une valeur équivalente à celle des rats traités (0.40 g/l) puis augmenté durant la 2<sup>ème</sup> semaine pour atteindre une valeur de 0.64 g/l ce qui indique que l'effet de l'extrait brut sur le métabolisme du cholestérol apparaît mieux au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine. De ce fait, l'extrait brut empêche l'augmentation du cholestérol total chez les rats diabétiques.

Ainsi, les rats traités par le glibenclamide (5 mg/kg p.c.), présentent une diminution de la cholestérolémie de l'ordre de 32.92% et 35.36% durant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine respectivement.

### b/ Les rats normaux

Une augmentation du taux de cholestérol total de l'ordre de 39.5% et 43.95% au cours de la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine de l'expérimentation respectivement est notée chez les rats normaux traités par l'extrait brut. Contrairement aux témoins où le taux du cholestérol total est légèrement diminué avec un taux de 6.66% et 12.77% durant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine respectivement.

**b/ Administration par voie intrapéritonéale**

Après administration quotidienne de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut de *Punica granatum* par voie IP pendant deux semaines, le dosage des triglycérides plasmatiques et du cholestérol total chez les rats normaux et diabétiques donne les résultats indiqués dans les tableaux suivants.

**Tableau 30:** Les valeurs moyennes des triglycérides plasmatiques chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut par voie IP.

Lots	Temps (semaine)	Triglycérides (g/l)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		1.66±0.63	1.58±0.23 (-4.5%)	3.32±0.27 (100%)*
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext brut »		2.14±0.55	1.22±0.25 (-42.64%)	1.52±0.60 (-28.97%)••
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		1.34±0.36	1.98±0.42 (47.63%)	1.47±0.11 (9.64%)••
<b>4 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		1.97±0.46	0.79±0.067 (-59.85)*	2.04±0.33 (3.6%)
<b>5 : Normaux traités (NTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext brut »		1.40±0.17	2.89±0.54 (107.45%)*	1.85±0.24 (32.76)

**Tableau 31 :** Les valeurs moyennes du cholestérol total chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut par voie IP.

Lots	Temps (semaine)	Cholestérol (g/l)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.61±0.084	0.67±0.055 (9.09%)	0.75±0.10 (22.40%)
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext brut »		0.49±0.04	0.51±0.052 (3.43%)•	0.56±0.050 (12.72%)
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		0.46±0.052	0.60±0.050 (32.81%)*	0.51±0.05 (14%)•
<b>4 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		0.55±0.034	0.58±0.1 (6.36%)	0.53±0.021 (-4.09%)
<b>5 : Normaux traités (NTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext brut »		0.55±0.053	0.58±0.06 (5.9%)	0.68±0.09 (24.54%)

Chaque valeur signifie la moyenne ±ESM (n=5)

(\*) : degré de signification par rapport à S0

(•) : degré de signification par rapport aux témoins

(%) : pourcentage de variation par rapport à S0

## **Interprétation des résultats**

### ■ **Effet sur la triglycéridémie**

#### **a/ Les rats diabétiques**

Chez les rats diabétiques témoins, une augmentation du taux de triglycérides plasmatiques de l'ordre de 100% est observée au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine de l'expérimentation pour atteindre une valeur de 3.32 g/l par rapport à l'état initial où le taux des triglycérides est de 1.66 g/l.

Après administration quotidienne de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut de *Punica granatum* par voie intrapéritonéale, le taux des triglycérides est diminué significativement chez les rats diabétiques traités avec un pourcentage de 42.64% et 28.97% durant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine respectivement.

Par ailleurs, le glibenclamide à 5 mg/kg p.c. ne provoque aucune diminution des triglycérides plasmatiques chez les rats diabétiques, par contre une augmentation non significative par rapport à l'état initiale est observée au cours de la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine avec un taux d'augmentation de l'ordre de 47.63% et 9.64% respectivement, mais avec des valeurs relativement inférieures à celles des témoins notamment à la 2<sup>ème</sup> semaine ( $p < 0.01$ ).

#### **b/ Les rats normaux**

Chez les rats normaux traités quotidiennement avec une dose de 20 mg/kg p.c. de l'extrait brut, une augmentation peu significative des triglycérides plasmatiques est notée pendant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine avec un taux de variation de l'ordre de 107.45% et 32.76% respectivement. Par contre, le taux des triglycérides plasmatiques est diminué de 59.85% chez les rats normaux témoins au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine.



## ■ Effet sur la cholestérolémie

### a/ Les rats diabétiques

L'extrait brut de *Punica granatum* administré chaque jour pendant 15 jours à une dose de 20 mg/kg p.c. par voie IP ne provoque aucune diminution du cholestérol total chez les rats diabétiques. La cholestérolémie de ces rats reste pratiquement stable avec une très faible augmentation de l'ordre de 3.43% et 12.72% pour la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine respectivement, par contre les rats témoins traités par l'eau physiologique présentent une augmentation du taux de cholestérol notamment à la 2<sup>ème</sup> semaine avec un pourcentage de 22.40%, ce qui indique que l'extrait brut empêche l'augmentation du taux du cholestérol chez les rats diabétiques traités.

Par ailleurs, une augmentation du taux de cholestérol total a été notée chez les rats traités par le glibenclamide avec un pourcentage relativement important de 32.81% durant la 1<sup>ère</sup> et uniquement de 14% durant la 2<sup>ème</sup> semaine, où le taux du cholestérol est relativement inférieures à celui des témoins ( $p < 0.05$ ).

### b/ Les rats normaux

Les rats normaux témoins présentent une très faible augmentation du taux de cholestérol total durant la première et la deuxième semaine avec un pourcentage de 6.36% et 4.09% respectivement.

Chez les rats normaux traités par l'extrait brut à une dose de 20mg/kg p.c. par voir IP, aucune diminution n'est observée, au contraire nous avons noté une augmentation de l'ordre de 24.54% à la 2<sup>ème</sup> semaine du traitement.

### V-5- Effet sur l'évolution du poids corporel

#### a/ Administration par voie orale

L'évolution du poids corporel des rats normaux et diabétiques traités quotidiennement durant deux semaines par l'extrait brut de *Punica granatum* par voie orale à une dose de 400 mg/kg p.c., est indiquée dans le tableau suivant :

**Tableau 32** : Les valeurs moyennes du poids corporel des rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* par voie orale.

Lots	Temps (semaine)	Poids (g)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		228.00±5.56	221.00±6.77 (-3%)	228.20±6.53 (0.17%)
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »		215.75±10.01	214.75±10.07 (-0.46%)	213.75±14.77 (-0.92%)
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		221.60±7.88	228.34±5.49 (3%)	236.66±13.59 (6.76%)
<b>4 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		258.60±7.28	277.00±7.92 (7.11%)	287.00±9.05 (11%)
<b>5 : Normaux traités (NTRT)</b> « 400 mg/kg p.c. Ext brut »		287.00±9.05	262.60±13.77 (-8.50%)	260.00±16.04 (-7.31%)

Chaque valeur signifie la moyenne ±ESM (n=5)  
(%) : pourcentage de variation par rapport à S0

Aucune variation significative du poids corporel n'est observée chez les rats diabétiques traités par l'extrait. Le poids corporel de ces animaux reste pratiquement stable au cours de l'expérimentation après la chute pondérale provoquée par la STZ.

Par ailleurs les rats diabétiques traités par le glibenclamide présentent une légère reprise du poids corporel de 6.76% à la 2<sup>ème</sup> semaine de l'expérience.

Pour les rats normaux traités par l'extrait, une faible diminution de l'ordre de 8% est notée pendant les deux semaines par rapport aux rats normaux témoins qui présentent une légère augmentation de 7 à 11% durant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine d'expérimentation respectivement.



### b/ Administration par voie intrapéritonéale

L'effet de l'extrait brut sur l'évolution du poids corporel des rats normaux et diabétiques administré quotidiennement par voie IP à une dose de 20 mg/kg p.c. durant deux semaines donne les résultats regroupés dans le tableau 33.

**Tableau 33** : Les valeurs moyennes du poids corporel chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme par l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* par voie IP.

Lots	Temps (semaine)	Poids (g)		
		S0	S1	S2
<b>1 : Diabétiques témoins (DT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		188.40±5.77	192.80±9.10 (2.33%)	196.80±7.40 (4.46%)
<b>2 : Diabétiques traités (DTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext brut »		192.20±4.46	194.00±5.32 (0.17%)	199.20±4.96 (3.64%)
<b>3 : Diabétiques positifs (Dpos.)</b> « 5 mg/kg p.c. Glibenclamide »		183.00±7.7	198.00±7.87 (8.22%)	199.00±7.68 (8.88%)
<b>4 : Normaux témoins (NT)</b> « 10 ml/kg p.c. NaCl 0.9% »		188.40±6.66	193.40±6.82 (2.65%)	198.20±9.42 (5.20%)
<b>5 : Normaux traités (NTRT)</b> « 20 mg/kg p.c. Ext brut »		195.20±7.64	196.80±4.12 (0.81%)	200.28±4.05 (2.60%)

Chaque valeur signifie la moyenne ±ESM (n=5)

(%) : pourcentage de variation par rapport à S0

L'administration intrapéritonéale de l'extrait brut de *Punica granatum* ne provoque aucun effet sur la croissance pondérale des rats diabétiques. Le poids corporel de ces animaux reste pratiquement stable durant toute la période de l'expérimentation. Par contre le glibenclamide provoque une petite reprise du poids de 8.22% et 8.88% durant la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine de l'expérimentation respectivement.

Chez les rats normaux traités par l'extrait brut, aucune influence sur le poids corporel n'est observée. Les deux lots d'expérimentation présentent un poids corporel stable durant les deux semaines.

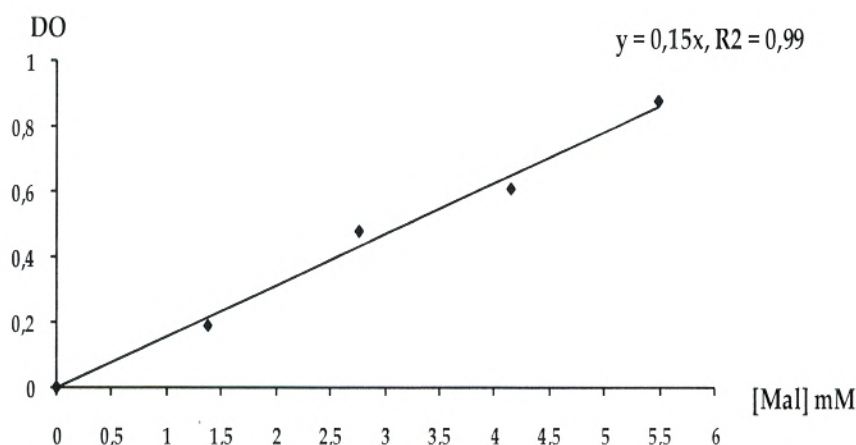


## VI- Effet de l'extrait brut sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*

### VI-1-Courbe d'étalonnage

La gamme d'étalonnage préparée à partir d'une solution mère de maltose à 2g/l est représentée graphiquement sur la figure 16 ( $R^2= 0.99$  ;  $y=0.15x$ ).

Pour chaque point situé sur la courbe, l'expérience est répétée trois fois.



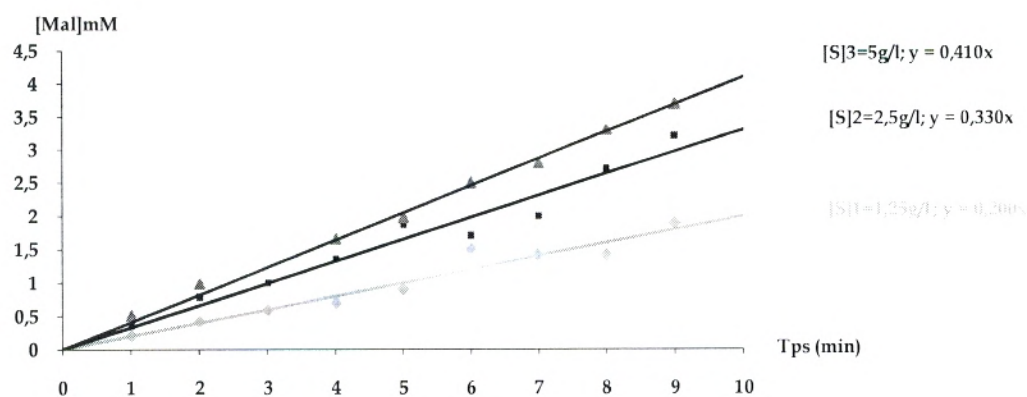
**Figure 16** : Courbe d'étalonnage de maltose (Méthode de Bernfeld (1955), «  $\lambda 540\text{nm}$  »).

### VI-2-La cinétique enzymatique de l' $\alpha$ -amylase en absence d'inhibiteur

#### VI-2-1-Mesure des vitesses initiales

Afin de déterminer les vitesses initiales de la réaction enzymatique, nous avons choisi différentes concentrations finales de substrat (amidon) à savoir 1.25 ; 2.5 ; et 5 g/l et une activité enzymatique finale de l' $\alpha$ -amylase égale à 1.3 UI/ml dans le milieu réactionnel.

L'effet de ces concentrations d'amidon sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique est représenté sur la figure 17.



**Figure 17** : Effet de différentes concentrations d'amidon en fonction du temps sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase (AE=1.3 UI/ml).

Les vitesses initiales sont les pentes des droites ( $\Delta P/\Delta t$ ) tracées à travers les points expérimentaux (Fig. 17). Chaque point situé sur ces droites est une mesure de la vitesse initiale de la réaction en fonction d'une concentration finale de substrat. L'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase est maintenue constante ( $AE=1.3$  UI/ml).

Pendant les premières minutes de la réaction enzymatique, nous avons constaté que les vitesses initiales restent constantes pour chacune des concentrations de substrat.

Les vitesses initiales obtenues lors de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat sont indiquées dans le tableau 34.

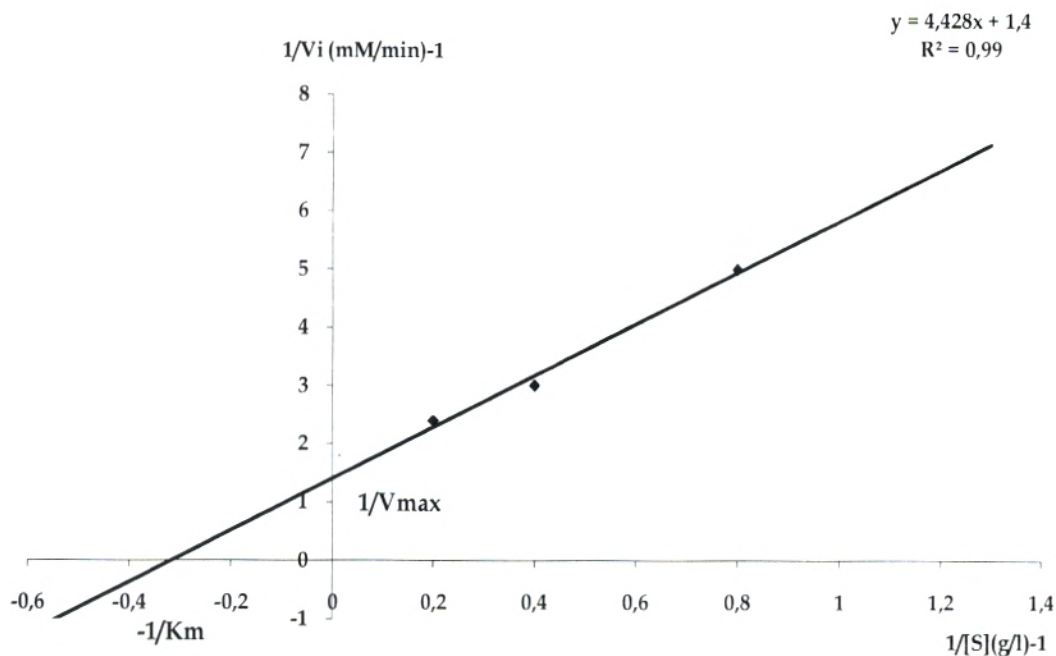
**Tableau 34:** Les vitesses initiales de la réaction enzymatique à différentes concentrations d'amidon

Concentrations de substrat	$[S]_1=1.25$ g/l	$[S]_2=2.5$ g/l	$[S]_3=5$ g/l
Vitesses initiales (mM/min)	0.200	0.330	0.410

#### VI-2-2- Détermination des paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase

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

La courbe de *Lineweaver et Burk* est une linéaire qui permet de déterminer les paramètres cinétiques directement sur le graphe avec précision, il suffit de lire sur le graphe les valeurs correspondantes aux intersections de la droite avec les axes de coordonnées (Fig. 18).



**Figure 18:** Représentation linéaire en double inverse de *Lineweaver et Burk* ( $1/V_i = f(1/[S])$ ) de la réaction enzymatique entre l' $\alpha$ -amylase et les différentes concentrations d'amidon.

Le calcul de la vitesse maximale ( $V_{\max}$ ) et la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de l' $\alpha$ -amylase à partir de la représentation précédente donne les résultats suivants :

$$V_{\max} = 0.714 \text{ mM/min}$$

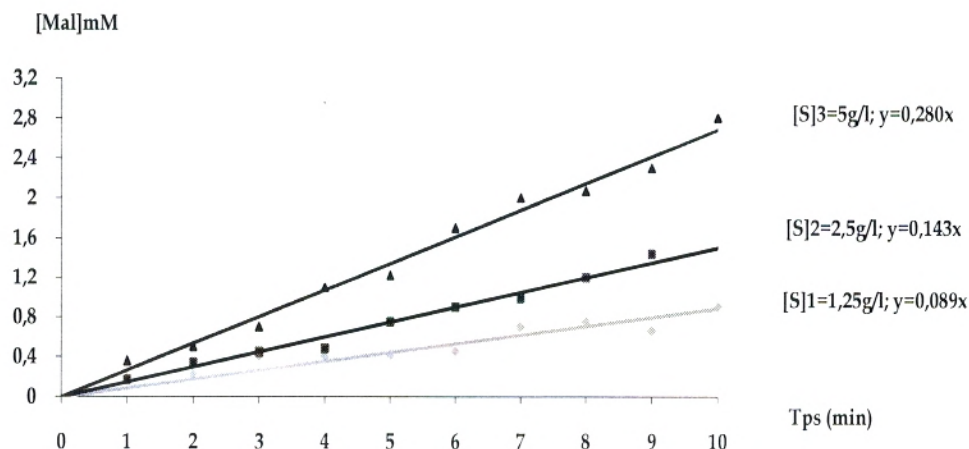
$$K_m = 3.4 \text{ g/l}$$

### VI-3-La cinétique enzymatique en présence de l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica grantaum*

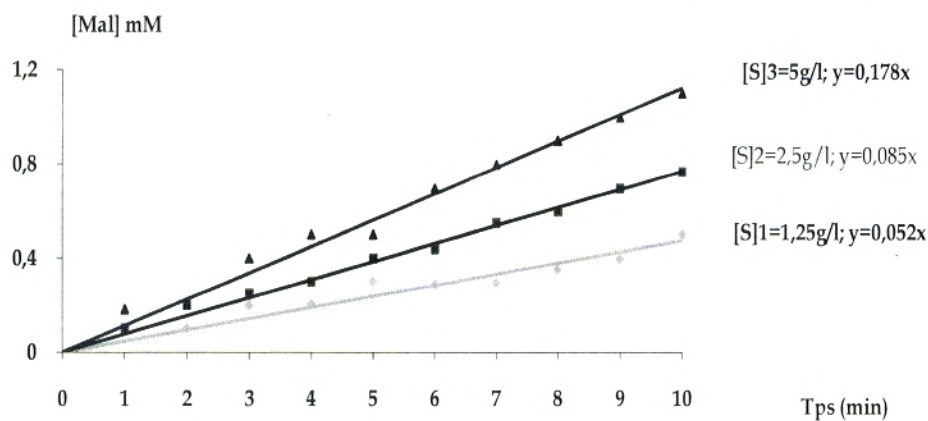
Suivant le même mode opératoire, les différentes quantités de maltose produites en fonction du temps par hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de différentes concentrations d'extrait brut de *Punica granatum* sont représentées sur les figures qui suivent (Fig. 19, 20, 21).

Les concentrations finales de l'extrait brut utilisées dans le milieu réactionnel sont respectivement 2.5 ; 5 et 10 g/l. Chacune de ces concentrations est testée avec les différentes concentrations d'amidon indiquées précédemment dont l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase est maintenue constante ( $AE = 1.3 \text{ UI/ml}$ ).

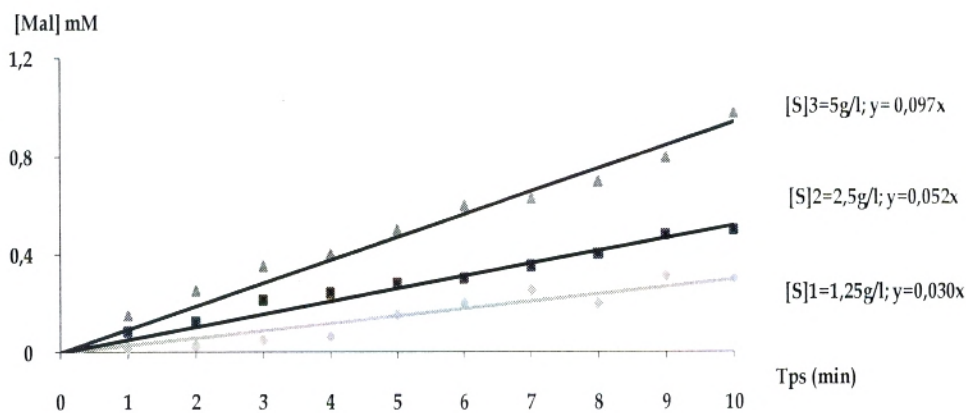




**Figure 19 :** Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de l'extrait brut à 2.5 g/l en fonction du temps (AE=1.3 UI/ml)



**Figure 20 :** Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de l'extrait brut à 5 g/l en fonction du temps (AE=1.3 UI/ml)



**Figure 21:** Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de l'extrait brut à 10 g/l en fonction du temps (AE=1.3 UI/ml)

### VI-3-1-Mesure des vitesses initiales en présence de l'extrait brut

Le tableau 35 regroupe les valeurs de vitesses initiales calculées à partir des courbes représentées sur les figures 19, 20 et 21. Il comporte aussi les valeurs de vitesses initiales obtenues lors de la cinétique enzymatique en absence d'inhibiteur.

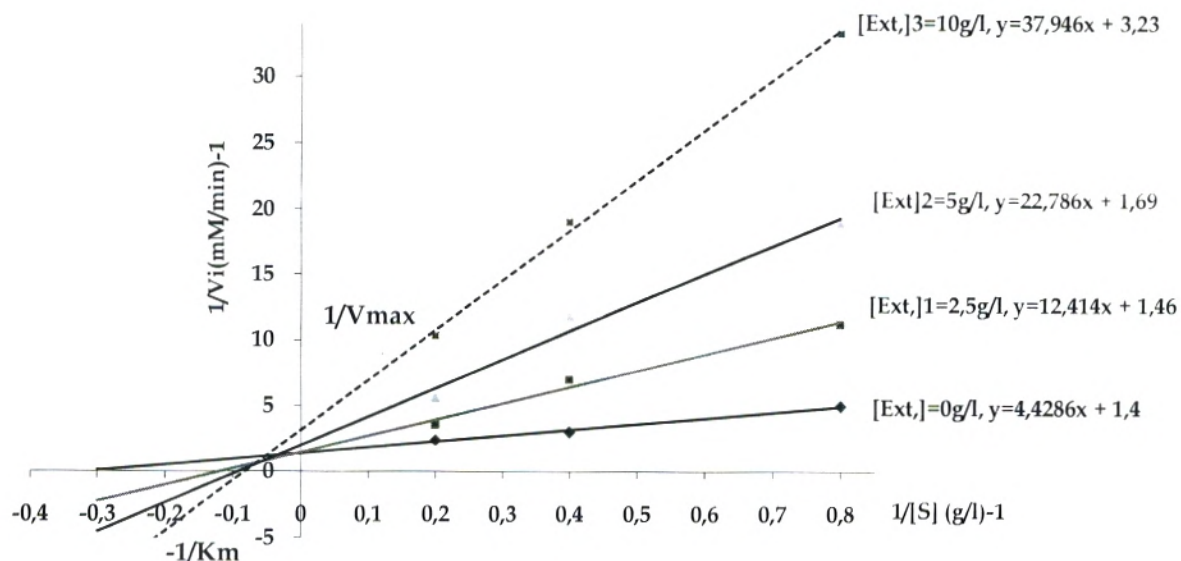
**Tableau 35** : Les vitesses initiales exprimées en mM/min obtenues après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en absence et en présence de différentes concentrations de l'extrait brut (AE=1.3 UI/ml).

Concentration de substrat \ Concentrations de l'extrait	[S] <sub>1</sub> =1.25 g/l	[S] <sub>2</sub> =2.5 g/l	[S] <sub>3</sub> =5 g/l
En absence d'extrait	0.200	0.330	0.410
[Ext.] <sub>1</sub> =2.5 g/l	0.089	0.143	0.280
[Ext.] <sub>2</sub> =5 g/l	0.052	0.085	0.178
[Ext.] <sub>3</sub> =10 g/l	0.030	0.052	0.097

D'après les résultats indiqués dans le tableau précédent, nous pourrions observer une diminution relativement importante des vitesses initiales en présence de différentes concentrations de l'extrait brut par rapport à celle obtenues lors de la cinétique enzymatique en absence d'inhibiteur. Les nouvelles vitesses initiales obtenues diminuent quand la concentration de l'extrait augmente, c'est-à-dire que les vitesses initiales sont inversement proportionnelles aux concentrations de l'extrait, cela signifie qu'il y a une inhibition de l' $\alpha$ -amylase par l'extrait brut de l'épicerpe de *Punica granatum*.

### VI-3-2-Détermination du mécanisme d'inhibition exercé par l'extrait brut

Pour connaître le mécanisme d'inhibition exercé par l'extrait brut de l'épicerpe de *Punica granatum*, il suffit de tracer la courbe en double inverse de *Lineweaver Burk* «  $1/V_i=f(1/[S])$  » de la cinétique enzymatique en absence et en présence de l'extrait brut (Fig. 22).



**Figure 22** : Représentation de *Lineweaver Burk* ( $1/V_i=f(1/[S])$ ) en absence et en présence d'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum*, (AE=1.3 UI/ml).

A partir des courbes représentées sur la figure 22, nous pouvons calculer les vitesses maximales obtenues en présence de différentes concentrations de l'extrait brut ainsi que les constantes de Michaelis ( $K_m$ ) (Tabl. 36).

**Tableau 36**: Les vitesses maximales et les constantes de Michaelis obtenues en absence et en présence de l'extrait brut

Concentrations de l'extrait (g/l)	0	2.5	5	10
$V_{max}$ (mM/min)	0.714	0.685	0.591	0.310
$K_m$ (g/l)	3.4	8	10	11.11

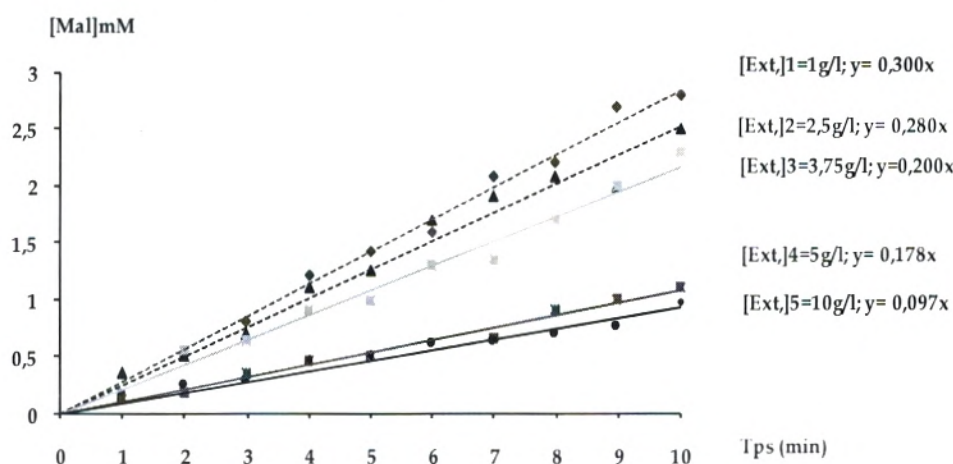
En se basant sur les résultats du tableau précédent, on note une diminution de la vitesse maximale obtenue lors de la cinétique enzymatique en absence d'inhibiteur et une augmentation de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) quand la concentration de l'extrait augmente. Les deux paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase sont ainsi modifiés en présence de l'extrait brut. De ce fait, la représentation de *Lineweaver Burk* (Fig. 22) révèle que le mécanisme par lequel l'extrait brut exerce une inhibition est un mécanisme **non compétitif mixte**.



### VI-3-3-Détermination des pourcentages d'inhibition et l'IC<sub>50</sub> de l'extrait brut

Pour calculer les pourcentages d'inhibition et déterminer la concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique (IC<sub>50</sub>), nous avons fait varier les concentrations de l'extrait brut en maintenant une concentration de substrat fixée à 5 g/l. L'activité enzymatique est maintenue constante (AE=1.3 UI/ml).

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 23.



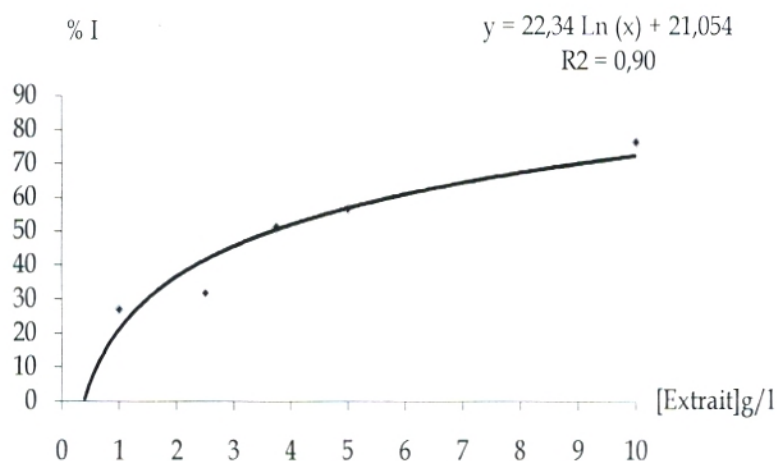
**Figure 23** : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de l'amidon à 5 g/l en présence de différentes concentrations de l'extrait brut (AE=1.3UI/ml)

Les vitesses initiales calculées à partir de ces courbes pour les différentes concentrations de l'extrait brut sont indiquées dans le tableau 37, ainsi que les pourcentages d'inhibition calculés par rapport aux vitesses initiales obtenues en absence de l'extrait avec la même concentration de substrat selon la formule décrite précédemment (page 37).

**Tableau 37** : Les vitesses initiales et les pourcentages d'inhibition obtenus après hydrolyse enzymatique de 5g/l d'amidon en présence de différentes concentrations d'extrait brut (AE=1.3 UI/ml)

Concentrations de l'extrait (g/l)	0	1	2.5	3.75	5	10
Vi (mM/min)	0.410	0.300	0.280	0.200	0.178	0.097
%I (%)	0	26.27	31,70	51.21	56.58	76.34

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase ( $IC_{50}$ ) exercée par l'extrait brut est déterminée graphiquement en utilisant la régression logarithmique des pourcentages d'inhibition ( $y=22.34 \text{ Ln } (x) + 21.054$  ;  $R^2=0.90$ ) représentée sur la Figure 24.



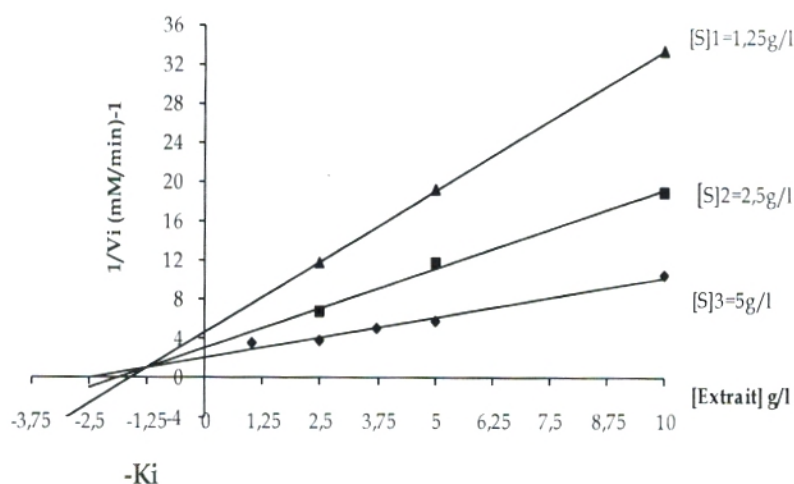
**Figure 24:** Courbe logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait brut

L' $IC_{50}$  calculée à partir de cette représentation est de **3.65g/l**

#### VI-3-4-Détermination de la constante d'inhibition ( $K_i$ )

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

Afin de déterminer cette constante, nous avons utilisé la représentation de Dixon «  $1/V_i=f [I]$  » (Fig. 25)



**Figure 25:** Représentation de Dixon :  $1/V_i = f [I]$  « I= Extrait brut »

Le  $K_i$  calculé à partir de la représentation de Dixon égale à :  $K_i = 1,25 \text{ g/l}$

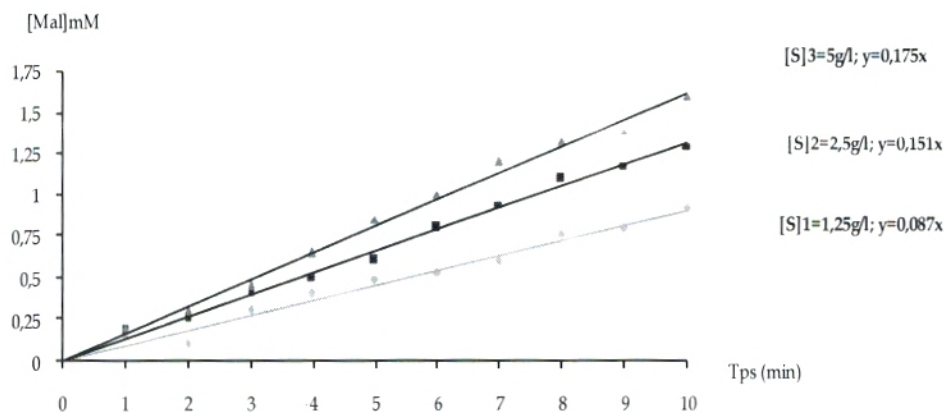
#### VI-4- La cinétique enzymatique en présence d'acarbose

Les figures suivantes (Fig. 26, 27 et 28) représentent les quantités de maltose produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence de différentes concentrations finales d'acarbose dans le milieu réactionnel égales à 1,25 ; 2,5 et 5 g/l.

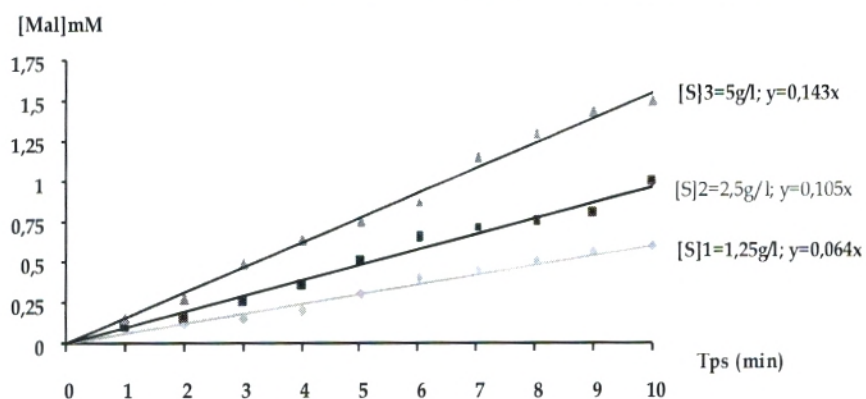
Chaque concentration d'acarbose est testée avec les différentes concentrations de substrat.

L'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase est maintenue constante ( $AE = 1,3 \text{ UI/ml}$ ).

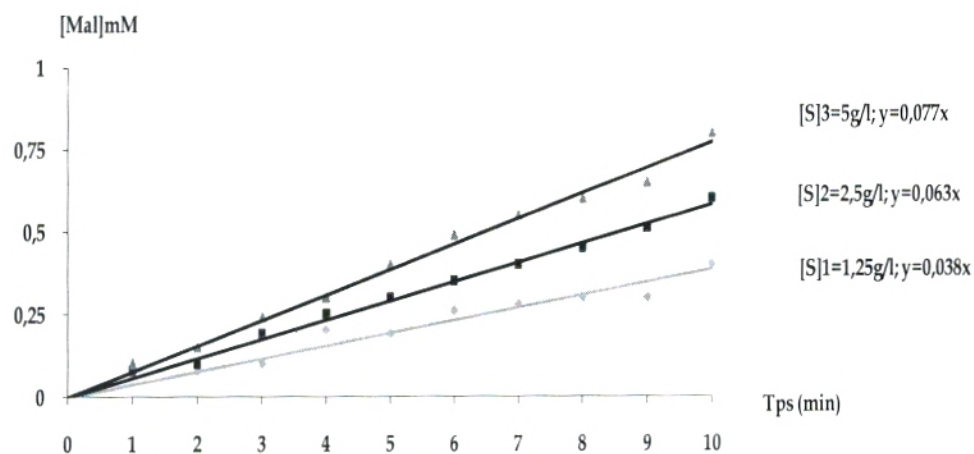




**Figure 26:** Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence d'acarbose à 1.25 g/l en fonction du temps (AE=1.3 UI/ml)



**Figure 27 :** Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence d'acarbose à 2.5 g/l en fonction du temps (AE=1.3 UI/ml)



**Figure 28 :** Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en présence d'acarbose à 5 g/l en fonction du temps (AE=1.3 UI/ml)

### VI-4-1-Mesure des vitesses initiales en présence d'acarbose

Le tableau suivant regroupe les vitesses initiales obtenues en présence de différentes concentrations d'acarbose calculées à partir des courbes précédentes, comparées à celles obtenues lors de la cinétique enzymatique en absence d'inhibiteur.

**Tableau 38:** Les vitesses initiales exprimées en mM/min obtenues après hydrolyse enzymatique de différentes concentrations d'amidon en absence et en présence de différentes concentrations d'Acarbose (AE= 1.3 UI/ml)

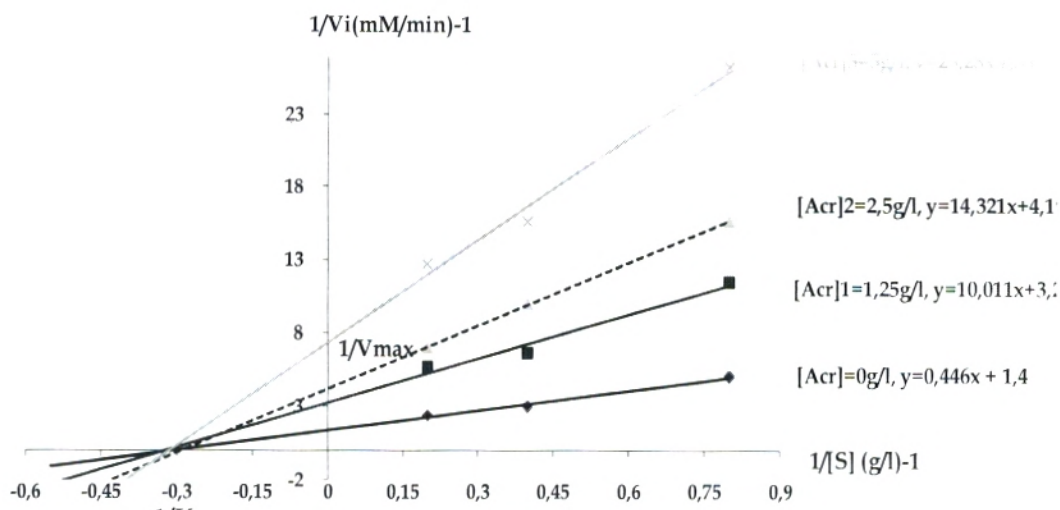
Concentrations de substrat Concentrations d'acarbose	[S] <sub>1</sub> =1.25 g/l	[S] <sub>2</sub> =2.5 g/l	[S] <sub>3</sub> =5 g/l
	En absence d'Acarbose	0.200	0.330
[Acar] <sub>1</sub> =1.25 g/l	0.087	0.151	0.175
[Acar] <sub>2</sub> =2.5 g/l	0.064	0.105	0.143
[Acar] <sub>3</sub> =5 g/l	0.038	0.063	0.077

D'après les résultats indiqués dans le tableau 38 on note une diminution de vitesses initiales obtenues lors de la réaction enzymatique en présence d'acarbose par rapport à celles obtenues en absence d'inhibiteur.

En présence de différentes concentrations de substrat, on note que les vitesses initiales sont inversement proportionnelles aux concentrations d'acarbose, ce qui explique l'effet inhibiteur exercé par cette molécule vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase.

### VI-4-2-Détermination du mécanisme d'inhibition exercé par l'acarbose

La représentation de *Lineweaver Burk* «  $1/V_i = f(1/[S])$  » représentée sur la figure 29, nous a permis de déterminer le mécanisme d'inhibition exercé par l'acarbose ainsi que la vitesse maximale et la constante de Michaelis ( $K_m$ ) en présence de différentes concentrations d'acarbose (Tabl. 39).



**Figure 29:** Représentation de *Lineweaver Burk* «  $1/V_i=f(1/[S])$  » en absence et en présence de différentes concentrations d'acarbose (AE=1.3UI/ml)

**Tableau 39 :** Les vitesses maximales et la constante de Michaelis obtenues en absence et en présence de différentes concentrations d'Acarbose

Concentrations d'acarbose (g/l)	0	1.25	2.5	5
Vmax (mM/min)	0.714	0.306	0.240	0.136
Km (g/l)	3.4	3.4	3.4	3.4

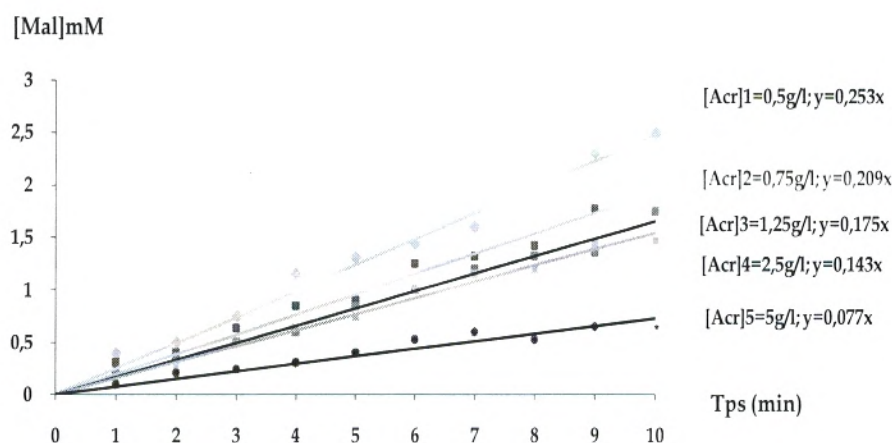
D'après le tableau 39, on note que les différentes concentrations d'acarbose diminuent la vitesse maximale de la réaction enzymatique par rapport à la vitesse maximale obtenue en absence d'inhibiteur (0.714 mM/min). Par contre la constante de Michaelis ( $K_m$ ) reste constante (3.4 g/l). En effet, la représentation de *Lineweaver Burk* montre que le mécanisme d'inhibition exercé par l'acarbose est un mécanisme **non compétitif**.



### VI-4-3-Détermination des pourcentages d'inhibition et l'IC<sub>50</sub> de l'acarbose

Avec une activité enzymatique de 1.3 UI/ml et une concentration de substrat fixée à 5 g/l et en présence de différentes concentrations d'acarbose, nous pouvons calculer le pourcentage d'inhibition ainsi que l'IC<sub>50</sub>.

Les différentes concentrations de maltose produites après hydrolyse enzymatique d'amidon à 5 g/l en présence de différentes concentrations d'acarbose sont représentées sur la figure 30.



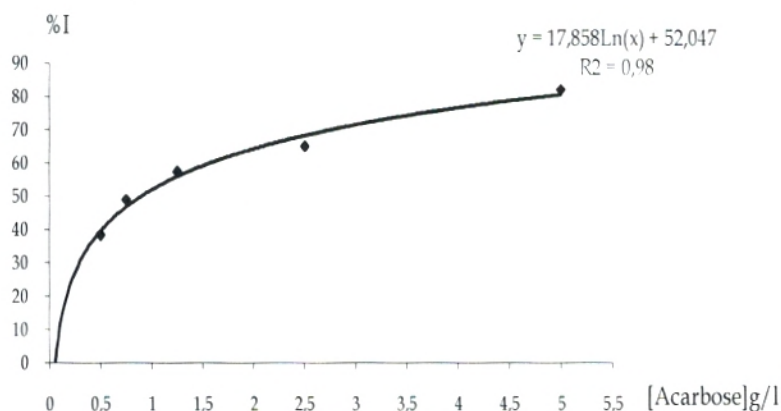
**Figure 30** : Les quantités de maltose (mM) produites après hydrolyse enzymatique d'amidon à 5 g/l en présence de différentes concentrations d'acarbose (AE= 1.3 UI/ml).

Le tableau 40 regroupe les vitesses initiales calculées à partir des courbes représentées sur la figure précédente ainsi que les pourcentages d'inhibition calculés par rapport à la vitesse initiale de la réaction enzymatique obtenue en absence d'inhibiteur avec la même concentration de substrat [S]=5 g/l.

**Tableau 40** : Les vitesses initiales et les pourcentages d'inhibition obtenus après hydrolyse enzymatique de 5g/l d'amidon en présence de différentes concentrations d'acarbose (AE=1.3 UI/ml)

Concentrations d'acarbose (g/l)	0	0.5	0.75	1.25	2.5	5
Vi (mM/min)	0.410	0.253	0.209	0.175	0.143	0.077
%I	0	38.29	49.02	57.31	65.12	81,22

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique est calculée à partir de la régression logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations d'acarbose représentée sur la figure 31 ( $y=17,858 \ln(x) + 52,047$ ,  $R^2= 0,98$ ).

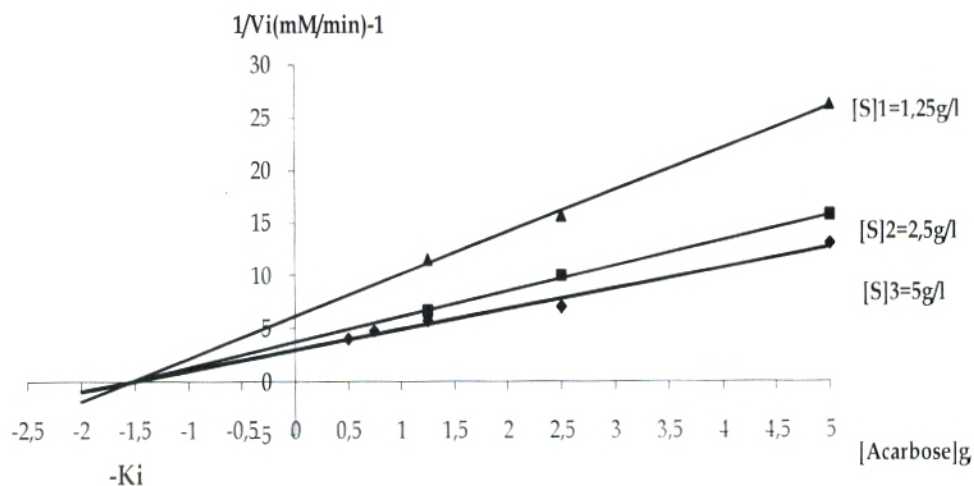


**Figure 31** : Courbe logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations d'acarbose

L'IC<sub>50</sub> calculée à partir de cette régression est de **0.89 g/l**

#### VI-4-4-Détermination de la constante d'inhibition (K<sub>i</sub>)

En se basant sur la représentation linéaire de Dixon «  $1/V_i=f([I])$  » afin de déterminer la constante d'inhibition (K<sub>i</sub>) de l'acarbose (Fig. 32).



**Figure 32**: Représentation de Dixon  $1/V_i=f([I])$  « I= Acarbose »

La constante d'inhibition calculée est de **1.5 g/l**

### VI-4-5- Comparaison entre l'effet de l'extrait brut et de l'acarbose sur l'activité alpha amylasique

Les tableaux suivants regroupent les résultats obtenus lors des tests *in vitro* réalisés sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase afin de comparer l'effet inhibiteur de l'extrait brut et de l'acarbose.

**Tableau 41** : Paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) déterminés en absence et en présence de l'extrait brut et de l'acarbose dans le milieu réactionnel (AE= 1.3 UI/ml)

		Absence d'inhibiteur	Présence d'inhibiteur		
Extrait brut de l'épicaire de <i>Punica granatum</i>	[Extrait] (g/l)	0	2,5	5	10
	$V_{max}$ (mM/min)	0.714	0.685	0.591	0.310
	$K_m$ (g/l)	3.4	8	10	11.11
	Mécanisme d'inhibition	Non compétitif mixte			
Acarbose	[Acarbose] (g/l)	0	1.25	2.5	5
	$V_{max}$ (mM/min)	0.714	0.306	0.240	0.136
	$K_m$ (g/l)	3.4	3.4	3.4	3.4
	Mécanisme d'inhibition	Non compétitif			

**Tableau 42** : Les vitesses initiales, les pourcentages d'inhibition, l' $IC_{50}$  et le  $K_i$  obtenus en absence et en présence de l'extrait brut et de l'acarbose dans le milieu réactionnel (AE= 1.3 UI/ml) ([S]=5g/l)

		Absence d'inhibiteur	Présence d'inhibiteur				
[Extrait] (g/l)	0	1	2,5	3,75	5	10	
$V_i$ (mM/min)	0.410	0.300	0.280	0.200	0.178	0.097	
%I	0	26.27	31,70	51.21	56.58	76.34	
$IC_{50}$ (g/l)		3.65					
$K_i$ (g/l)		1.25					
[Acarbose] (g/l)	0	0.5	0.75	1.25	2.5	5	
$V_i$ (mM/min)	0.410	0.253	0.209	0.175	0.143	0.077	
%I	0	38.29	49.02	57.31	65.12	81,22	
$IC_{50}$ (g/l)		0.89					
$K_i$ (g/l)		1.5					



D'après ces résultats, l'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* exerce un effet inhibiteur vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase ainsi que l'acarbose.

L'action inhibitrice exercée par l'acarbose est très puissante par rapport à celle exercée par l'extrait brut. A une concentration équivalente entre les deux (5g/l), l'acarbose provoque une inhibition de l'ordre de 81.22%, par contre elle est uniquement de 56.58% en présence de l'extrait.

Par ailleurs la concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique obtenue en présence d'acarbose (0.89g/l) est presque 4 fois inférieure à celle obtenue en présence de l'extrait (3.65g/l).

L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est donnée par la constante d'inhibition  $K_i$ , qui représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés. Ainsi l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus forte que le  $K_i$  est petit.

Le  $K_i$  obtenue dans cette expérience est plus important en présence d'acarbose qu'en présence d'extrait brut, ce qui signifie que l'affinité entre l' $\alpha$ -amylase et l'acarbose est moins importante.

# Discussion

*Punica granatum* (grenadier), plante comestible, connue pour être utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle dans de nombreux pays pour traiter plusieurs maladies dont le diabète sucré [Jafri *et al.*, 2000].

Ce n'est que récemment, les scientifiques s'intéressent de plus en plus à cette plante pour ses propriétés thérapeutiques présumées et vérifier son efficacité à l'aide des méthodes et approches plus rationnelles. Ce ci nous a incité de vérifier l'activité antidiabétique de l'extrait brut hydroalcoolique de l'épicarpe de grenadier chez les rats normaux et diabétiques tout en effectuant une étude phytochimique de cette partie de la plante.

### ☞ Analyse phytochimique

L'étude phytochimique de différents extraits de l'épicarpe de *Punica granatum* (aqueux, méthanolique et éthérique) révèle la présence de différentes classes de métabolites secondaires, notamment les tanins, les flavonoïdes, les anthocyanes, les saponosides ainsi que les sucres réducteurs.

Ce ci a été démontré dans de nombreux travaux qui révèlent la présence des tanins, des anthocyanes, des flavonoïdes et de pectine au niveau de l'épicarpe de *Punica granatum* (Nozire et Serpil, 1993). D'après Ozcal et Dinc (1993), les flavonoïdes et les tanins sont les composés les plus abondants dans l'épicarpe de cette plante.

Un complexe polysaccharidique au niveau de l'épicarpe de grenadier a été identifié par Jahfar *et al.* (2003).

Aslam *et al.* (2006), ont montré que les constituants chimiques majeurs de l'extrait aqueux de l'épicarpe de *Punica granatum* sont : punicalagine, punicaline, acide ellagique, acide gallique, quercetine, luteoline, kaempferol et naringénine.

De même, l'extrait de fruit entier de *Punica granatum* est très riche en composés phénoliques et de sucres réducteurs ainsi qu'en alcaloïdes d'après Vidal *et al.* (2003).

Afaq *et al.* (2005), ont montré que le fruit de grenadier est très riche en composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les anthocyanes, les catéchines et autres, ainsi que les tanins hydrolysables (punicaline, acide ellagique) dont 92% de ces constituants ont une activité antioxydante.



### ☞ Toxicité de *Punica granatum*

Afin d'évaluer les propriétés antidiabétiques de l'extrait hydrométhanolique de l'épicarpe de *Punica granatum* chez les animaux de laboratoire, il était nécessaire au préalable de déterminer ses doses létales médianes (DL<sub>50</sub>) selon la voie d'administration adoptée (orale et IP) dans le but de déterminer les doses administrées aux rats lors des tests biologiques.

A propos des tests expérimentaux réalisés sur les rats, une DL<sub>50</sub> de l'ordre de 4000 mg/kg p.c. administrée par voie orale est obtenue dans cette étude. Cette dose relativement élevée révèle que l'extrait étudié est loin d'être toxique par cette voie.

Une dose encore plus élevée est aussi obtenue par Patel *et al.* (2008), qui ont trouvé une DL<sub>50</sub> de l'ordre de 5000 mg/kg p.c. après administration par voie orale d'un extrait préparé à partir des fruits entiers de *Punica granatum*. Cette dose qui n'est pas influencée par le sexe révèle que l'extrait n'est pas toxique d'après ces auteurs.

Amorin (1995), a trouvé une DL<sub>50</sub> équivalente à celle obtenue dans notre étude (4000 mg/kg p.c.) après administration intragastrique d'un extrait aqueux des fruits entiers de *Punica granatum*.

Par ailleurs, lorsque l'extrait est administré par voie intrapéritonéale, la DL<sub>50</sub> obtenue dans notre travail est de l'ordre de 200 mg/kg p.c. ce qui signifie que la toxicité de l'extrait brut par voie IP est plus importante par rapport à la voie orale.

Patel *et al.* (2008) ont également trouvé une DL<sub>50</sub> de l'ordre de 217,5 mg/kg p.c. chez les rats d'expérimentation et de l'ordre de 187.5 mg/kg p.c. chez les souris après administration IP du même extrait indiqué précédemment sans aucune influence de sexe.

Selon Vidal *et al.* (2003), la DL<sub>50</sub> serait de l'ordre de 731 mg/kg p.c. chez les souris des deux sexes après administration IP d'une macérât hydroalcoolique des fruits entiers de grenadier.

La toxicité des racines de *Punica granatum* a été déterminée par Desta (1995) qui révèle une DL<sub>50</sub> de l'ordre de 2031 mg/kg p.c. après injection IP d'un extrait hydroalcoolique chez les souris.

Fuentes *et al.* (1985), ont montré que les fruits de *Punica granatum* en absence d'épicarpe ne possèdent aucun risque de toxicité, tandis que l'écorce et les racines seraient toxiques.

D'après certains auteurs (Tripathi et Singh, 2000 ; Segura *et al.* 1990 ; Ferrera *et al.* 1989), l'effet toxique de *Punica granatum* serait dû à la présence des tanins et des alcaloïdes dans certaines parties de la plante.

Ainsi, nous pouvons noter que la toxicité d'une plante serait influencée par plusieurs facteurs, notamment la partie de la plante, sa composition chimique, le mode d'extraction, la voie d'administration et aussi l'espèce animale utilisée.

D'après Robin (1988), une plante est considérée toxique si sa dose létale médiane administrée par voie IP chez les Mammifères correspond à une dose de moins de 500 mg/kg p.c.

De ce fait, l'extrait brut « hydroalcoolique » de l'épicarpe de *Punica granatum* est considéré toxique, lorsqu'il est injecté par voie intrapéritonéale.

Ainsi dans le cadre de notre expérimentation nous avons utilisé des doses diluées au  $1/10$  à partir de la  $DL_{50}$  afin d'éviter tout risques de toxicité chez les animaux d'expérimentation.

### ☞ **Diabète expérimental**

Le diabète sucré peut être induit chez l'animal par différentes techniques essentiellement par l'injection des agents chimiques tels que la streptozotocine [Szkudelski et Szkudelska, 2002] qui est un glucosamine nitrosé produit par *Streptomyces achromogenes*. Elle exerce un effet cytotoxique sur les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans [Lewis et Bardier, 1960] [Szkudelski, 2001]. Elle provoque une destruction sélective des cellules  $\beta$  pancréatiques [Bolzàn et Bianchi, 2002] conduisant à un défaut de la sécrétion d'insuline qui est donc la première altération métabolique résultant de l'action de la STZ. Le degré et la sévérité du diabète dépend de la dose injectée ainsi que le nombre et la voie d'injection [Szkudelski, 2001] ; [Adib et Aughsteen, 2000].



Dans notre étude, la dose de 50 mg/kg p.c. de la STZ administrée par voie intrapéritonéale provoque une hyperglycémie de l'ordre de 2 à 3.5 g/l au bout de 48 h chez l'ensemble de rats traités.

Ces résultats sont aussi obtenus par Gupta *et al.* (2005) après injection intrapéritonéale de 50 mg/kg p.c. de STZ préparée dans une solution du tampon citrate (0.1 M, pH 4.5) à des rats Wistar. Cette dose provoque une hyperglycémie de l'ordre de 2.5 g/l.

Outre l'hyperglycémie, due à une carence en insuline consécutive à une destruction plus au moins massive des cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline, d'autres symptômes caractéristiques de l'installation du diabète sont apparait : glucosurie, polydipsie, polyphagie et une polyurie, cette dernière est due à une hyperfiltration glomérulaire. Ces observations sont en accord avec celles de Domingo en 2005 (60 mg/kg p.c. de STZ en intraveineuse) et Bagri *et al.* (2008) (60 mg/kg p.c. en intrapéritonéale) chez les rats Wistar.

D'autres perturbations de nature métabolique, apparaissent également suite à l'injection de la STZ aux animaux de notre expérimentation tels que l'augmentation du taux de cholestérol total et des triglycérides plasmatiques, résultat obtenu aussi par Bagri *et al.* (2008) après induction du diabète expérimental chez le rat Wistar (STZ à 60mg/kg p.c. en IP).

Basdevant (1994), a noté que l'anomalie la plus nette caractéristique du diabète de type 2 est une augmentation du taux de triglycérides liée à une augmentation de VLDL et une diminution du taux d'HDL-Cholestérol. De même, il a noté que la concentration de cholestérol total et de LDL-Cholestérol ne sont pas augmentés.

Chez nos rats, le poids corporel est également touché, il chute d'environ 11%, 48h après l'injection de la STZ, il se traduit par une fonte musculaire résultant d'un défaut de l'utilisation de glucose comme substrat énergétique, conséquence de l'état diabétique et la carence en insuline. Cette chute de poids se stabilise ensuite jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Ces observations sont également notées par Shirwaikar *et al.* (2006) où la diminution du poids corporel est de 17.6% deux semaines après injection de 60 mg/kg p.c. de STZ. De même une diminution de 22% a été observée par Mayor et Calle (1988), après deux semaines de l'injection de 65 mg/kg p.c. de STZ chez le rat Wistar.



### ☞ Effets antidiabétiques

Nos tests biologiques réalisés *in vivo* à court et à long terme pour l'évaluation des propriétés antidiabétiques de l'épicarpe de *Punica granatum*, chez les rats normaux et rendus diabétiques par la STZ, montrent un effet antihyperglycémiant de l'extrait brut indépendamment de la voie d'administration.

Chez les rats normaux, l'extrait hydrométhanolique administré par voie orale et IP à une dose de 400 mg/kg et 20 mg/kg p.c. respectivement, ne provoque aucun effet hypoglycémiant. Comparativement au glibenclamide (sulfamide hypoglycémiant), qui provoque une diminution très importante de la glycémie durant 3 h due à une stimulation de la sécrétion de l'insuline [Larger, 1997].

D'après ces résultats on suggère que l'extrait hydrométhanolique n'agit pas au niveau pancréatique, ou bien, la capacité de stimuler la sécrétion d'insuline est très réduite par rapport à celle du glibenclamide.

Chez les rats normaux soumis à une HGPO et après un suivi de 3 h, les témoins présentent un seuil maximal de l'hyperglycémie à 60 et 120 min. La glycémie revient ensuite à sa valeur initiale (3<sup>ème</sup> heure), ce ci indique l'autorégulation de la glycémie contrôlée par l'insuline sécrétée suite à un stimulus exogène qui est le glucose.

L'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie orale à une dose de 400 mg/kg et par voie IP à une dose de 20 mg/kg p.c. empêche l'augmentation du pic d'hyperglycémie provoquée par la solution de glucose. Chez les rats témoins l'hyperglycémie atteint un taux d'augmentation de 48.6% à la 120<sup>ème</sup> min (1.36 g/l). A ce point et au cours de l'administration par voie orale de l'extrait étudié, la glycémie augmente de 35.77% (1.37 g/l), cet effet est encore plus marqué lorsque l'extrait est administré par voie IP où la glycémie n'est que légèrement augmentée (1.37%) après la surcharge en glucose avec une glycémie normale de 0.93 g/l.

Les témoins positifs traités par le glibenclamide à 5 mg/kg p.c., présentent le pic d'hyperglycémie le plus faible. Il provoque une hypoglycémie à cause de leur effet stimulateur de la sécrétion d'insuline à la fin de l'expérimentation. Dans le cas du traitement par voie intrapéritonéale le glibenclamide diminue la glycémie significativement à la 3<sup>ème</sup> heure avec un pourcentage de 64.07%, la glycémie passe de 1.18 g/l ( $t_{0\text{min}}$ ) à 0.42 g/l ( $t_{120\text{min}}$ ) ( $p < 0.0001$ ), tandis que par voie orale la diminution est uniquement de 48.84% ( $t_{0\text{min}} = 0.86$  g/l ;  $t_{120\text{min}} = 0.44$  g/l) ( $p < 0.001$ ).

A partir de ces résultats du test de tolérance orale au glucose, les molécules actives de l'extrait brut de *Punica granatum* agiraient sur la régulation de la glycémie selon deux voies possibles :

- ✓ soit en stimulant la sécrétion d'insuline,
- ✓ soit en augmentant l'utilisation périphérique de glucose (Stockage de glucose).

Chez les rats diabétiques, le suivi à court terme, montre que l'extrait brut administré par voie IP provoque une faible diminution de l'hyperglycémie de l'ordre de 18.63% à la 3<sup>ème</sup> heure de l'expérience ; alors que l'administration par voie orale ne provoque aucune diminution de l'hyperglycémie. Par ailleurs, le glibenclamide provoque une diminution de l'hyperglycémie de l'ordre de 18% à la 2<sup>ème</sup> heure après son administration par voie IP, alors que par voie orale cette diminution (18%) est observée à la 3<sup>ème</sup> heure de l'expérience.

De ce fait, l'effet exercé par l'extrait brut et le glibenclamide sur la régulation de l'hyperglycémie chez les rats diabétiques est plus au moins important par voie IP que par voie orale. Ce ci est expliqué par leur absorption rapide à travers le péritoine, ce qui laisse à suggérer qu'il y a probablement une faible stimulation de la sécrétion d'insuline insuffisante pour rétablir la glycémie à sa valeur normale.

Le suivi à long terme des rats diabétiques traités quotidiennement durant 15 jours par l'extrait brut par voie orale et IP montre que cet extrait provoque une diminution régulière de l'hyperglycémie durant les deux semaines du traitement. Au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine, le traitement par voie IP provoque une diminution significative (46.6%) plus importante que celle provoquée par voie orale (32.92%).

De même, le glibenclamide (5 mg/kg p.c.) se révèle plus efficace par voie IP que par voie orale notamment à la 2<sup>ème</sup> semaine.

Ces résultats nous ont permis de suggérer que l'extrait brut stimule la sécrétion d'insuline et/ou favorise la captation de glucose au niveau périphérique.

Encore bien étudié que la STZ augmente la production hépatique de glucose [Fisher et Kahn, 2003]. Il est donc probable que les constituants actifs de l'extrait étudié agissent en inhibant la lyse des réserves glucidiques et/ou inhibant la synthèse du glucose.



L'effet antihyperglycémiant de *Punica granatum* a fait l'objet de plusieurs études :

Khalil (2004), a démontré que le traitement quotidien durant 4 semaines par voie orale par un extrait aqueux de l'épicarpe de *Punica granatum* à une dose de 430 mg/kg p.c. provoque une diminution de la glycémie chez les rats normaux ainsi que chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane comparés aux témoins. Cette diminution due à une augmentation du taux d'insuline. Ainsi l'étude histologique du pancréas chez les rats diabétiques montre une régénération des cellules  $\beta$  pancréatiques endommagées par l'alloxane.

Nogueira et Pereira (1986), montrent que l'épicarpe de *Punica granatum* en infusion provoque un effet antihyperglycémiant chez les rats d'expérimentation par inhibition de l'absorption intestinale de glucose.

Parmar et Kar (2007), ont montré que l'extrait préparé à partir de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie orale à une dose de 200 mg/kg p.c. provoque une diminution de la glycémie et une augmentation du taux d'insuline plasmatique chez les rats ayant une athérosclérose.

Par ailleurs, Jafri *et al.* (2000), ont montré que l'extrait hydroalcoolique des fleurs de *Punica granatum* administré par voie orale à différentes doses (300, 400 et 500 mg/kg p.c.) diminue le pic de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (glucose 2g/kg p.c.) jusqu'à la 90<sup>ème</sup> min de l'expérience par rapport aux témoins.

En outre chez les rats normaux, ces mêmes doses provoquent un effet hypoglycémiant à la 2<sup>ème</sup> heure de l'expérimentation.

Chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane, ces différentes doses diminuent significativement l'hyperglycémie après 1 h et persiste jusqu'à la 2<sup>ème</sup> heure de l'expérience.

Li *et al.* (2005), ont montré que l'extrait méthanolique des fleurs de *Punica granatum* administré par voie orale à différentes doses (250, 500 et 1000 mg/kg p.c.) provoque une diminution de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (saccharose 1g/kg p.c.) avec un taux de 13.9%, 19.7% et 20.6% respectivement chez les souris normales. Ces résultats sont expliqués par le ralentissement de l'absorption intestinale de glucose.



Le même extrait administré par voie orale à une dose de 500 mg/kg p.c. chez les rats génétiquement diabétiques (Zucker) provoque une diminution de l'hyperglycémie de l'ordre de 43.1% après deux semaines du traitement quotidien.

L'effet antidiabétique des fleurs de *Punica granatum* a été aussi démontré par Huang *et al.* (2005a), cette action a été prouvée par l'administration quotidienne de 500 mg/kg p.c. d'extrait alcoolique pendant 6 semaines chez un modèle de rat génétiquement diabétique (Rats Zucker obèses) par l'activation du récepteur PPAR- $\gamma$  au niveau nucléaire. Ce dernier joue un rôle important dans la sensibilisation des récepteurs de l'insuline en conséquence une correction du désordre glucidique par diminution de l'hyperglycémie. Le test de tolérance orale au glucose réalisé après 5 semaines du traitement par l'extrait alcoolique des fleurs de *Punica granatum* (500 mg/kg p.c.) montre une diminution de l'hyperglycémie 30 min et 180 min après une surcharge en glucose (2 g/kg p.c.).

En 2007, Katz *et al.*, montrent aussi que l'effet antidiabétique de l'extrait des fleurs et de jus de fruits de *Punica granatum* est expliqué par l'activation du récepteur PPAR $\gamma$ .

D'après Bagri *et al.* (2008), l'extrait aqueux des fleurs de *Punica granatum* administré aux rats diabétiques à des doses différentes (250 et 500 mg/kg p.c.) par voie orale, diminue l'hyperglycémie significativement par rapport à son taux initial. Après trois semaines de traitement la glycémie diminue de 3.08 g/l à 1.12 g/l pour la première dose et de 3.32 g/l à 0.84 g/l pour la deuxième dose.

L'activité hypoglycémisante des graines de *Punica granatum* a été démontrée par Das *et al.* (2001) après administration de différentes doses d'extrait méthanolique (150, 300 et 600 mg/kg p.c.) par voie orale chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine. Ces doses provoquent une diminution significative de l'hyperglycémie avec un taux de 40%, 47% et 52% respectivement après 12 h.

Parallèlement à l'étude de l'influence de l'extrait brut « hydroalcoolique » de *Punica granatum* sur la régulation de la glycémie, nous nous sommes intéressés à certains aspects du métabolisme lipidique essentiellement la cholestérolémie et la triglycéridémie chez les rats normaux et diabétiques traités à long terme.

Les résultats obtenus dans notre étude, montrent que chez les rats normaux, le traitement par voie orale à une dose de 400 mg/kg p.c. de l'extrait étudié diminue le taux des triglycérides plasmatiques, par contre le taux de cholestérol est augmenté. Le traitement par voie intrapéritonéale (20 mg/kg p.c.), provoque l'augmentation du taux plasmatique des deux paramètres analysés.

Chez les rats diabétiques traités par l'extrait, un effet hypolipidémiant est observé durant l'expérimentation.

L'extrait brut de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie orale à une dose de 400 mg/kg p.c. corrige les perturbations lipidiques chez les rats diabétiques (diminution de l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie).

Par voie intrapéritonéale, l'extrait brut arrive à diminuer le taux des triglycérides plasmatiques d'une part, d'autre part, il empêche l'augmentation du taux de cholestérol total par rapport aux témoins traités par l'eau physiologique.

Le glibenclamide par voie orale corrige les perturbations lipidiques pour les deux paramètres d'une part, d'autre part par voie intrapéritonéale, l'augmentation de la triglycéridémie et de la cholestérolémie notée chez les rats diabétiques atteint des valeurs relativement inférieures à celles des rats témoins.

A partir de ces résultats, on suggère que les corrections du désordre lipidique chez les rats diabétiques induit par la STZ, sont probablement dues à une stimulation de la sécrétion d'insuline, hormone qui stimule la lipogénèse et inhibe la lipolyse [Baudin, 2001].



L'effet hypolipidémiant de *Punica granatum* est confirmé par les travaux de :

Parmar et Kar (2007), qui montrent que l'extrait préparé à partir de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie orale à une dose de 200 mg/kg p.c. provoque une diminution du taux des triglycérides plasmatiques chez les rats ayant une athérosclérose.

Huang *et al.* (2005c) ont montré que l'administration de 500 mg/kg p.c. d'extrait alcoolique des fleurs de *Punica granatum* à long terme (6 semaines) provoque une réduction du taux des triglycérides plasmatiques associée à une diminution du cholestérol total chez les rats génétiquement diabétiques (Rats Zucker obèses).

De même, Bagri *et al.* (2008), montrent que les doses de 250 mg/kg et 500 mg/kg p.c. d'un extrait aqueux des fleurs de *Punica granatum*, administrées par voie orale diminuent significativement le taux des triglycérides plasmatiques et du cholestérol total chez les rats rendus diabétiques par la STZ après trois semaines de traitement par rapport aux témoins.

La consommation de jus de fruits de *Punica granatum* par les patients diabétiques de type 2 ayant une hyperlipidémie (Cholestérol total et triglycérides sérique  $\geq 2$ g/l) provoque une diminution du taux de cholestérol total, par contre le taux des triglycérides ne subit aucun changement. Ces effets ont été démontrés par les travaux d'Esmailzadeh *et al.* (2006).

De Nigris *et al.* (2005) ont montré que l'administration orale de jus de grenade à des souris hypercholestérolémiques à différents stades de l'athérosclérose a réduit de manière significative la progression de la maladie.



Une autre approche thérapeutique du diabète sucré est de diminuer l'hyperglycémie post-prandiale. Cette diminution est expliquée par le ralentissement de l'absorption intestinale de glucose par l'inhibition de certaines enzymes responsables de l'hydrolyse des di et poly-saccharides comme l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase au niveau du tube digestif [Rhabasa et Chiasson, 2004].

L'agent antidiabétique oral connu pour cette action est l'acarbose, qui est un tétrasaccharide d'origine bactérienne dont l'homologie structurale avec les di et les tétrasaccharides alimentaires explique la liaison aux  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse des entérocytes [Bailey, 2003] ; [Larger, 1997]. Leur efficacité tient à la forte affinité de cette liaison, il s'agit d'une liaison rapidement réversible et compétitive avec le site actif de l'enzyme [Larger, 1997] ; [Inzucchi, 2002], de ce fait, l'absorption de glucose après un repas est ainsi retardée dans le temps [Reuser et Wisselaar, 1994].

L'autre enzyme entre dans cette approche thérapeutique, est l' $\alpha$ -amylase qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1-4 glucosidiques de l'amidon, du glycogène et différents poly et oligosaccharides [Tranier *et al.*, 2004].

Dans cette étude, les tests biologiques réalisés *in vitro* sur l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* montrent que l'extrait hydroalcoolique de l'épicerpe de *Punica granatum* exerce une inhibition non compétitive mixte vis-à-vis de cette enzyme avec une  $IC_{50}$  de 3.65 g/l et une constante d'inhibition de 1.25 g/l.

D'après ces résultats, on suggère que l'extrait brut de l'épicerpe de *Punica granatum* agirait au niveau digestif par l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par conséquent le ralentissement de l'absorption de glucose au niveau intestinal ce qui réduit l'hyperglycémie post-prandiale [Nogueira et Pereira, 1986].

Cette activité inhibitrice a été aussi démontrée par Prashanth *et al.* (2001**b**), qui ont montré que l'extrait éthanolique de l'épicerpe de *Punica granatum* à une concentration de 1 mg/ml dans le milieu réactionnel exerce un effet inhibiteur vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase avec un pourcentage d'inhibition de 68.2% dans une étude qui s'intéresse aux plantes antidiabétiques.

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

Vu que l'extrait hydroalcoolique de *Punica granatum* est très riche en tanins d'après l'analyse phytochimique réalisée dans cette étude, nous pouvons suggérer que ces composés interviennent avec un grand pourcentage dans le phénomène d'inhibition de cette enzyme, n'empêche pas que les autres constituants interviennent aussi.

L'activité inhibitrice vis-à-vis de l' $\alpha$ -glucosidase de l'extrait méthanolique des fleurs de *Punica granatum* a été démontrée par Li *et al.* (2005) avec une  $IC_{50}$  de 1.8  $\mu$ g/ml dans le but de confirmer son effet sur l'absorption intestinale de glucose.

Toujours dans le but de diminuer l'hyperglycémie post-prandiale, Teixeira *et al.* (2007) ont évalué le potentiel hypoglycémiant de certaines plantes marines *Spataglossum schroederi* et *Caulerpa racemosa*. L'extrait acétonique de ces deux plantes exerce une activité inhibitrice sur l' $\alpha$ -amylase dont l' $IC_{50}$  égale à 0.58 et 0.09 mg/ml respectivement.

Bhandari *et al.* (2008), ont montré que l'extrait hydroalcoolique de *Bergenia ciliata* exerce un effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase avec un pourcentage d'inhibition de 30.2% et 93.5% respectivement.

Loizzo *et al.* (2008), ont étudié l'activité inhibitrice de l'extrait méthanolique de *Marrubium radiatum* sur l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase afin de confirmer son effet sur l'hyperglycémie post-prandiale. Ils ont trouvé une  $IC_{50}$  de 61.1 et 91.2  $\mu$ g/ml vis-à-vis de la première et la deuxième enzyme respectivement.

L'acarbose utilisé dans cette étude comme témoin positif exerce une activité inhibitrice non compétitive avec une constante d'inhibition de 1.5 g/l et une  $IC_{50}$  de 0.89 g/l. Cette dernière est inférieure à celle de l'extrait brut (3.65g/l), ce qui explique la pureté de l'acarbose donc la puissante activité inhibitrice vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase.

D'après Qian *et al.*, (1994) ; Wong et Robertson (2003), l'acarbose est l'un des principaux inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase.

Yoon et Robyt (2003), ont montré que l'acarbose et deux autres analogues structuraux exercent un effet inhibiteur vis-à-vis de quatre types d' $\alpha$ -amylase à savoir l' $\alpha$ -amylase humaine salivaire, l' $\alpha$ -amylase du pancréas porcine, l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* et l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

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



# Conclusion

L'objectif de notre travail est l'évaluation de l'effet antidiabétique de l'épicarpe de *Punica granatum*, plante utilisée traditionnellement pour traiter le diabète sucré.

A la lumière des résultats obtenus, l'extrait brut « hydroalcoolique » de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie orale et intrapéritonéale à des doses de 400 mg/kg et 20 mg/kg p.c. respectivement chez les rats normaux soumis au test de tolérance orale au glucose (état d'hyperglycémie temporaire) et chez les rats diabétiques (état d'hyperglycémie permanente) est capable de diminuer l'hyperglycémie chez ces animaux. Cet effet semble s'accompagner d'un rétablissement de certains paramètres plasmatiques, triglycéridémie et cholestérolémie liés au désordre métabolique provoqué par le diabète.

Par ailleurs, les symptômes associés au diabète (notamment la polyurie), semblent être atténués chez les rats diabétiques traités quotidiennement à long terme.

D'autre part, cet extrait exerce un effet inhibiteur vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase avec un mécanisme non compétitif mixte et une  $IC_{50}$  de 3.65 g/l.

A partir de ces résultats, plusieurs hypothèses expliquant le mode d'action de cet extrait peuvent être proposées :

- ⊗ Une stimulation de la sécrétion d'insuline (effet direct sur le pancréas) ;
- ⊗ Une sensibilisation des tissus cibles à l'action de l'insuline (muscle, foie, adipocytes), en augmentant l'utilisation périphérique de glucose ;
- ⊗ Un ralentissement de la l'absorption intestinale de glucose.

Ce travail contribue à élucider certains aspects de l'effet antidiabétique de l'épicarpe de fruit du grenadier (*Punica granatum*). Toutefois, il serait souhaitable d'approfondir notre étude en s'intéressant notamment à :

✎ La recherche, l'identification et la caractérisation de composé (s) présent (s) dans l'extrait hydrométhanolique responsables de son efficacité antidiabétique ;

✎ L'élucidation de son mécanisme d'action au niveau de certaines cibles :

- Sur le pancréas endocrine *in vitro* afin d'évaluer l'effet insulino sécrétoire ;
- Sur les cellules cibles à l'action de l'insuline (cellules musculaires, hépatiques, adipocytaires), afin de vérifier la captation périphérique de glucose ;
- Recherche d'éventuel effet toxique sur quelques organes internes (foie, reins, pancréas).
- Ainsi qu'une étude de l'action inhibitrice vis-à-vis de l' $\alpha$ -glucosidase dont le but de confirmer l'effet sur l'absorption intestinale des glucides.

Introduire dans l'analyse certains paramètres sanguins indispensable tel que : l'Insuline, le glucagon, les lipoprotéines..., afin de mieux cerner les effets métaboliques des substances administrées aux animaux d'expérience.

Par ailleurs, il serait intéressant d'examiner l'impact du diabète expérimental et de son traitement sur l'intégrité et l'activité de certains organes clés (foie, pancréas, reins) notamment la régénération des cellules  $\beta$  du pancréas endocrine.



# Références bibliographiques

- [1]. Abd El Wahab S.M., El Fiki N.M., Mostafa S.F., Hassan A.E.B., 1998. Characterization of certain steroid hormones in *Punica granatums* L. seeds. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy* (Cairo University), 36: 11–15.
- [2]. Abdel-Hassan I.A., Abdel-Barry J.A., Tariq Mohammeda S.T., 2000. The hypoglycaemic and antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 71 (1-2): 325-330.
- [3]. Adib A. et Aughsteen, 2000. An ultrastructural study on the effect of streptozotocine on the islets of langerhans in mice. *Journal of electron microscopy*, 49 (5): 681-690.
- [4]. “ADA” American Diabetes Association, 2004. Nephropathy in diabetes. *Diabetes care*, 27: S79-83.
- [5]. “ADA” American Diabetes Association, 2005. Workgroup on hypoglycaemia Defining and Reporting hypoglycaemia in diabetes. *Diabetes Care*, 28: 1245-9.
- [6]. Afaq F., Saleem M., Krueger C.G., Reed J.D., Mukhtar H., 2005. Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulate MAPK and NF-Kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*, 113: 423-433.
- [7]. Ahmed R., Ifzal S.M., Saifuddin A., Nazeer M., 1995. Studies on *Punica granatum*. I. Isolation and identification of some constituents from the seeds of *Punica granatum*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8: 69–71.
- [8]. Ajabnoor M.A., Tilimsani A.K., 1988. Effect of *Trigonella foenum graecum* on blood glucose levels in normal and allonxan diabetic mine. *Journal of ethnopharmacol.*, 22: 45-49.
- [9]. Ajaikumar K.B., Asheef M., Babu B.H., Padikkala J., 2005. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 96: 171-176.
- [10]. Alberti K.G., Zimmet P., 1998. Definition, diagnostic and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnostic and classification of diabètes mellitus provisional report of WHO consultation. *Diabetes Med.*, 15: 539-53.
- [11]. Allain P., 2000. Insuline. Les médicaments 3<sup>ème</sup> Ed. (CDM Ed.). Novembre 2000, ISB N, 2-9510288-1-4.
- [12]. Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y., 2000a. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*; 891: 183–188.
- [13]. Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y., 2000b. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A*, 896: 87–93.
- [14]. Amorin A., 1995. Test of mutagenesis in mice treated with aqueous extracts from *Punica granatum* L. *Revista Brazileria de Farmacia*, 74: 110-111.

- [15]. Artik N., 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing*, 8: 492-499.
- [16]. Aslam M.N., Lansky E.P., Varani J., 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote prolifération and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *Journal of ethnopharmacology*, 103: 311-318.
- [17]. Augusti K.T., 1974. Effect on alloxan diabetes of allyl propyl disulfid obtained from onion. *Naturwissenschaften*, 61: 172-173.
- [18]. Aviram M., Dornfeld L., 2003. Methods of using pomegranate extract causing regression in lesions due to arteriosclerosis in humans. *US Patent*, 6. 641-850.
- [19]. Bagri P., Ali M., Aeri V., Bhowmik M., Sultana S. 2008. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology*. S0278-6915 (08) 00555-3.
- [20]. Bailey C.J., Day C., 1989. Traditional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care*, 12: 553-64.
- [21]. Bailey C.J., 2003. New approches to the pharmacotherapy of diabetes (3<sup>rd</sup> ed.) In Pickup J.C., and William G., Editors, *Textbook of diabetes*, Vol. 2, Blackwell Science Lrd., UK., 73.1-73.21
- [22]. Barcelo A., 1996. Série de monographie sur les maladies liées au vieillissement : Diabètes sucré non insulino dépendant (DNID). Vol. 17 N°1.
- [23]. Basdevant A., 1994. Diabète sucré et hyperlipidémie. Dans Assal JPH, Ekoe JH, Lefebvre P. et Slama G., Reconnaître, comprendre, traiter le diabète sucré. 2<sup>ème</sup> édit. Maloine. Chap. 33: 105-8.
- [24]. Baudin G., 2001. Biologie du diabète. *Médecine nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, Vol. 25 (2) : 55-60.
- [25]. Batta A.K., Rangaswami S., 1973. Crystalline chemical components of some vegetable drugs. *Phytochemistry*, 12: 214.
- [26]. Benmehdi H., 2000. Valorisation des plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Thèse de Magister. *Chimie organique appliquée*. Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen-.
- [27]. Bernfeld P., 1955. Amylase,  $\alpha$  and  $\beta$ , in *Methods in Enzymology*. (Colowick S. and Kaplan N.O. eds.), *Academic Press*, New York. Vol. 1: 149-158.
- [28]. Bhandari M.R., Jong-Anurakkum N., Hong G., Kawabata J., 2008. Alpha-glucosidase and alpha amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw). *Food chemistry*, 106: 246-252.
- [29]. Bolzàn A.D., Bianchi M.S. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.*, 512: 121-134.
- [30]. Braga L.C., Schupp J.S., Chartone-Souza E., Nasciomento A.M.A., 2005. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 335-339.



- [31]. Bridel F., Bailly C., Dion N., Patiny A., Guimarães O., Geirnaert E., 2004. Guide visual des espèces. ABCorpus. GNU F.D.L. 85.
- [32]. Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> édition. Lavoisier. *Tec. Doc.* 538-1120
- [33]. Calzada F., Yépez-Mulia L., Aguilar A., 2006. *In Vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Girardia lamblia* to plant used in Mexican tradicional medecine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 367-370.
- [34]. Cerasi E., Kaiser N., Gross DJ., 1997. From sand rat to diabetic patient is non insulin dependant diabetes mellitus disease of the  $\beta$ -cells? *Diabetes and metabolism*, 23: 47-51.
- [35]. Charbonnel B., et Cariou B., 1997. Diabète non insulino-dépendant: indications thérapeutiques. *Medecine thérapeutique*; 3 hs: 103-11.
- [36]. Chidambara Murthy K.N., Jayaprakasha G.K., Singh R. P., 2002. Studies on Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) Peel extract using in vivo models. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4791-4795.
- [37]. Chung J.N., Joo H.K., 1992. Hypoglycaemic action of ginseng saponins on streptozotocin-induced diabetes in rat. *Koryo Insam Hakhoechi*, 16: 190-197.
- [38]. Chopra C.L., Bhatia M.C., Chopra K., 1960. In vitro antibacterial activity of oils from Indian medicinal plants-I. *Journal of American Pharmacy Association* (Science Edition), 49: 780.
- [39]. Cui S.M., Sasada Y., Sato H., Nii N., 2004. Cell structure and sugar and acid contents in the arils of developing pomegranate fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73: 241-243.
- [40]. Curry S.C., 2004. Breast enhancement system. *U.S. Patent*, 6: 673-366.
- [41]. Das A.K., Mandal S.C., Banerjee S.K., Sinha S., Das J., Saha B.P., Pal M., 1999. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacolog*, 68: 205-208.
- [42]. Das A.K., Mandal S.C., Benerjee S.K., Sinha S., Saha B.P., Pal M., 2001. Studies on the hypoiglycemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytothe. Res.*, 15 (7): 628-9.
- [43]. De Nigris F., Balestrieri M.L., Williams-Ignarro S., D'Armiento F., Fiorito C., Ignarro L.J., Napoli C., 2007. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric oxid Biology and chemistry*, 17: 50-54.
- [44]. De Nigris F., Williams-Ignarro S., Lerman L.O., Crim E., Botti C., Mansueto G., D'Armiento F., De Rosa G., Sica V., Ignarro L.J., Napoli C., 2005. Beneficial effects of pomegranate juice on

- oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102 (13): 4896-4901
- [45]. De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C., 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5331-5337.
- [46]. De Smet P.A., 2002, Herbal remedies. *N. Engl. J. Med.*, 347 (25): 2046-57.
- [47]. Desch G., 2001. Aspects biochimiques et analytiques du diagnostic et de la surveillance du diabète: Imagerie fonctionnelle et métabolique. *Medecine Nucléaire*, Vol. 25 (2): 61-72.
- [48]. Desta B., 1995. Ethiopian traditional herbal drugs. Part I. Studies on the toxicity and therapeutic activity of local taenicidal medications. *Journal of Ethnopharmacology*, 45: 27-33.
- [49]. Dey-Anoja S., Chun-Su Y., 2002. Thérapies alternatives pour le diabète de type 2. *Altern Med.*, 7 (1): 45-58.
- [50]. Dohou N., Yamni., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine *Thymelaea lythroïdes*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142: 61-78.
- [51]. Domingo M.C., 2005. Influence du diabète sucré expérimental sur la réponse cardiovasculaire et rénale à la sérotonine. Thèse de doctorat : Université LOUIS PASTEUR, Strasbourg, France ; Université de Salamane, Espagne. 225
- [52]. Domus M., 1998. Synthèse médicale, 668: 6-22.
- [53]. Drouin P., Blickle J.F., Charbonnel B., Eschwege E., Guillausseau P.J., Daninos J.M., Balarac N. et Sauvanet J.P., 1999. Diagnostic et classification du diabète sucré. Les nouveaux critères. *Diabète et Métabolisme*. Paris, 25 (1): 72-83.
- [54]. Duron F., Heurtier A., 2006. Epidémiologie, clinique et traitement des diabètes. Endocrinologie. DCEM1. Examen National Classant 2006-2007. Université Paris VI, 232: 239-299.
- [55]. Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O., 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4: 685-685.
- [56]. Eddouks M., Maghjrani M., Lemhadri A., Ouahidi M.L., Jouad H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac in the south-east region of Morocco (Talilafet). *Journal of Ethnopharmacology*, 82 (2-3): 97-103.
- [57]. 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.
- [58]. Edelman S.V., 1998. Type 2 diabetes mellitus. *Adv. Inter. Med.*, 43: 449-500.
- [59]. Eisenberg D.M., Kessler R.C., Foster C., *et al.*, 1993. Unconventional medicine in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 328: 246-52.



- [60]. El Hilaly J., Hamammouchi M., Lyoussi B., 2003. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate Province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacol.*, 86: 149-58.
- [61]. Ernst E., 1997. Plants with hypoglycaemic activity in humans. *Phytomedicine*, 4 (1): 73-8.
- [62]. Esmailzadeh A., Tahbaz F., Gaieni I., Alavi-Majd H., Azadbakht L. 2006. Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 76 (3): 147-51.
- [63]. Evans J., Rooney C., Ashwood F., *et al.*, 1996. Blindness and partial sight in England and Wales. *Health trends*, 28: 5-12.
- [64]. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 1997. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 20: 1183-97.
- [65]. Fabricant D.S., Farnsworth N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.*, 109: 69-75.
- [66]. Fasce C.P., 1982. Serum cholesterol determined colorimetrically with enzyme. *Clin Chem.*, 18: 901.
- [67]. Fatope M.O., Al Burtomani S.K.S., Takeda Y., 2002. Monoacylglycerol from *Punica granatum* Seed Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2): 357-360.
- [68]. Ferrera L., Schettino O., Forgione P., Rullo V., Di-Gennaro S., 1989. Identification of the root *Punica granatum* in galenic preparations. *Bollettino Della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 65: 385-390.
- [69]. Fisher S.J, Kahn R., 2003. Insulin signalling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *Journal of Clinical Investigation*, 111: 463-468.
- [70]. Fonseca V., Rosenstock J., Patwardhan R., Salzman A., 2000. Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. A randomised controlled trial. *JAMA*, 283: 1695-701.
- [71]. Fossati P., Prencipe L., 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with enzymes that produce Hydrogen peroxide. *Clin Chem.*, 28: 2077-2080.
- [72]. Fuentes V.R., Rodriguez N., Poucheau M., Cabrera L., Lara B., 1985. Estudios en la medicina tradicional en Cuba II. *Rivista Plantas medicinales*, 5: 13-40.
- [73]. Gabbasova L.B., Abdurazakova S.K., 1969. Chemical composition of pomegranate juice. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Pischevaya Tekhnologiya: Nauchno-Tekhnicheskii Zhurnal*, 4: 30-31.



- [74]. Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4581–4589.
- [75]. Gin H., et Rigalleau V., 1999. Diététique et diabète. *Encycl. Med. Chir* ; Elsevier, Paris ; *Endocrinologie-Nutrition*, 10-366: R-10 : 6p.
- [76]. Girard J., 1999. Fondements physiopathologiques du diabète de type 2. *La revue du praticien*, 49: 22-29.
- [77]. Gracious-Ross R., Selvasubramanian S., Jayasundar S., 2001. *Journal of ethnopharmacology*, 78: 85-87.
- [78]. Grimaldi A., 1999. Diabétologie. Questions d'internat. CHU-PS ; 15-253 :99-129.
- [79]. Grimaldi A. et Timsit J., 1996. Physiologie du diabète de type 1. *Imes diabètes : Comprendre pour traiter*, 4: 54-70.
- [80]. Grover J.K., Yadav S., Vats V., 2002. Medicinal plants of Indian with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacol*, 81: 81-100.
- [81]. Gupta R.K., Kesari A.N., Murthy P.S., Chandra R., Tandon V., Watal G., 2005. Hypoglycaemic and antidiabetic effect of the ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 75-81.
- [82]. Halimi S., 2003. Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID). Corpus Médical. Faculté de Médecine de Grenoble. *Alpes Med.*, 223b: 1-12.
- [83]. Hamdan D.I., Afifi F.U., 2004. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 117-121.
- [84]. Harborne, B. J., & Baxter, H., 1993. *Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants*, London: Taylor & Francis: pp. 791.
- [85]. Harding S., 2005. *Diabetic retinopathy*. London: BMJ Publishing Group Ltd., Clinical Evidence: Update 20041001.
- [86]. Hermans MP. Diabète de type 2 et adaptation thérapeutique. *Louvain Med.* 1998 ; 118 : S2-S8.
- [87]. Hii C.S.T., Howell S.L., 1985. Effect on flavonoïds on insulin secretion and  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  handling in rat islets of langerhans. *J. Endocrinol.*, 107: 1-8.
- [88]. Hii C.S.T., Howell S.L., 1984. Effects of epicatechin on rat islets of langerhans. *Diabetes*, 33: 291-296.
- [89]. Hopkins C.Y., Chisholm, M.J., 1968. A survey of the conjugated fatty acids of seed oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45: 176–182.

- [90]. Hornung E., Pernstich C., Feussner I., 2002. Formation of conjugated -11-13-double bonds by -12-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *European Journal of Biochemistry*, 269: 4852–4859.
- [91]. Huang T.H., Peng G., Kota B.P., Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., Li Y., 2005a. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR- $\gamma$  and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207: 160–169.
- [92]. Huang T.H., Yang Q., Harada M., Li, G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., Li, Y., 2005b. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor- $\kappa$ B pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46: 856–862.
- [93]. Huang T.H., Peng G., Kota, B.P., Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., Li Y., 2005c. Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids. *British Journal of pharmacology*, 45 (6): 767-74.
- [94]. Inzucchi S.E., 2002. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. Scientific review. *J. Am. Med. Assoc.*, 287: 360-72.
- [95]. Ivorra M.D., Paya M., Villar A., 1989. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 27: 243-75.
- [96]. Jafri M.A., Aslam M., Javed K., Singh S. 2000. Effect of *Punica granatum* Linn. (Flower) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 309-314.
- [97]. Jahfar M., Vijayan K.K., Azadi P., 2003. Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 7: 43-50.
- [98]. Jouad H., Haloui M., Rhiouani H., *et al.*, 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 (2-3): 175-82.
- [99]. Jurjani M.I., 1878. Zakheera-Khwarsam-Shahi. *Munshi Nawal Kischore*. Lucknow (Urdu translation) p. 540.
- [100]. Kandra L., Gyémánt G., Zajáč Á., Batta G., 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319: 1265-1271.
- [101]. Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugb uaja V.O., 2004. Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J. Med. Scien.*, 4: 179-182.
- [102]. Kashket *et al.*, 1988. Inhibition of salivary amylase by water soluble extract of tea. *Arch oral Biol.*, 33- 845-846.
- [103]. Katz S.R., Newman R.A., Lansky E.P., 2007. *Punica granatum*: Heuristic treatment for diabetes mellitus. *J. Med. Food.*, 105 (2): 213-7.



- [104]. Kaur G., Jabnbar Z., Athar M., Alam M.S., 2006. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract processes potent antioxidant activity and abrogates FE-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and chemical toxicology*, 44: 984-993.
- [105]. Kawamada Y., Shimada T., 2002. Cosmetic or tropical composition containing *Punica granatum* extracts. Japon Kokai Tokkyo Koho, *Japanese Patent*: JP 2002234814 A2 20020823.
- [106]. Khalil E.A.M., 2004. Antidiabetic effect of aqueous extract of pomegranate (*Punica granatum*) peels in normal and alloxan diabetic rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medecine*, 16: 92-99.
- [107]. Kim Y.M., Wang M.H., Rhee H., 2004. A novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research*, 339: 715-717.
- [108]. Kirthikar K.R., Basu B.D., 1975. Indian Medicinal plants. *2nd Edition*. Bishen Singh and Mahendra Pal Singh. *Dehradun*, 1084-1087.
- [109]. Kirthikar K.R., Basu B.D., 2000. *Punica granatum* In: Indian Medicinal Plants. *Sri Satguru Publications*, Vol. 5: 1508-1513.
- [110]. Lansky E.P., Newman R.A., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 177-206.
- [111]. Lansky E.P., 2000. Pomegranate supplements prepared from pomegranate material including pomegranate seeds. *U.S. Patent*, 6: 060-063.
- [112]. Larger E., 1997. Mécanisme d'action des antidiabétiques oraux. *Médecine thérapeutique*, Paris ; Hors Série : 97-102.
- [113]. Ledoux S., 1997. Le diabète insulino-dépendant. *Endocrinologie et Nutrition*. Ed. Vigot. 251-255.
- [114]. Lee J., Watson R.R., 1998. Pomegranate: a role in Health and promotion and AIDS? In: Watson RR. (Ed.), *Nutrients and Foods in AIDS*. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 179-172.
- [115]. Lefebvre P.J. Paolisso G., Meludus S., Gastillo MJ., et Sheen A.J., 1994. Magnesium et diabète. *In nutraews « science, nutrition, prévention et santé »*. 2-3.
- [116]. Lewis C., Barbier A.R. 1960. Streptozotocin, a new antibiotic *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Antidiabetic Ann.*; 22 : 247-254.
- [117]. Loizzo M.R., Saab A.M., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Piccolo V., Statti A., De Cindio B., Houghton P., Menichini F., 2008. *In vitro* inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against an giotensin converting enzyme (ACE) and digestif enzymes related to diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 119 (1): 109-116.



- [118]. Li Y., Wens S., Kota P.B., Peng G., Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., 2005. *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic Fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 239-244.
- [119]. Mahmoud A., Nawwar M., Sahar A., Husein M., et Merfort I., 1994. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry*, 36: 793-798.
- [120]. Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R., 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranien Journal of Pharmaceutical Research*, 77-82.
- [121]. Majoosi A.I.A., 1889. Kamilussanah. Munshi Nawal Kishore. Luchnow (Urdu translation by Kantoori) p. 145.
- [122]. Malec L.S., Pomilio A.B., 2003. Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromas pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry*, 1: 30-38.
- [123]. Maoyadi A., 2004. Mixtures of pomegranate seed oils for cosmetics. *Japanese Patent: JP 2004083544 A2 20040318*.
- [124]. Marles R.J. et Fransworth N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2: 137-189.
- [125]. Marker J.C., Cryer P.E., Clutter W.E., 1992. Attenuated glucose recovery from hypoglycaemia in the elderly. *Diabetes*, 41: 671-8.
- [126]. Mayor P. et Calle C., 1988. Glucagons binding and lipolitic response in isolated adipocytes from streptozotocin diabetic rats. *Japan Endocrinol.*, 35 (2): 207-15.
- [127]. Moore H., Summerbell C., Hooper L., Cruickshank K., Vyas A., Johnstone P., Ashton V., Kopelman P., 2004. Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. The Cochrane database of Systemic Reviews Issue 2, Art. N°. CD004097. pub. 2.
- [128]. Nadkarni K.M., Nadkarni A.K., Chopra R.N., 1976. Indian Material Medica. *Popular Prakshan*. Bombay, Vol.1: 1031-1035.
- [129]. Naovi S.A.H., Khan M.S.Y., Vohora S.B., 1991. Antibacterial, antifungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Fititerapia*, 62: 221-228.
- [130]. Nasadini R., Tonolo G., 2004. Relationship between blood glucose control, pathogenesis and progression of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15 (Sup1): S1-5.
- [131]. Negi S. et Baner J., 2006. Amylase and protease production from *Aspergillus awamori*. *Food Techol. Biotechnology*, 44 (2): 257-261.
- [132]. Neuhofer H., Witte L., Gorunovic M., Czygan F.C., 1993. Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia. *Pharmazie*, 48: 389-391.
- [133]. Nogueira D.G., Pereira N.A., 1986. Inhibitory action of intestinal absorption of glucosa of the epicarp of roma (*Punica granatum* L.). *Rev. Bras. Farm.*, 67: 129.

- [134]. Noda Y., Kaneyuka T., Mori A., Packer L., 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 166–171.
- [135]. Nozire O., Serpil D., 1993. Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum* L) peels from the stand point of pharmacy. *Ankara Ecz. Fac. Derg.*, 22 (1-2): 21.
- [136]. Oliver-Bever B., Zahob GR., Quart L., 1979. *Crud drug Res.*, 17: 139.
- [137]. OMS et FID (Organisation Mondiale de la Santé, fédération Internationale du Diabète) ; 2004. Communiqués de presse 2004 : il faut agir contre le diabète. Genève.
- [138]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 2002a. Diabète sucré. Aide mémoire N° 138.
- [139]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 2002b. Fact Sheet N°. 271. Geneva
- [140]. OMS (Organisation mondiale de la santé), 1999. Definition, Diagnostic and Classification of Diabetes Mellitus and its complications. Report of a WHO consultation, Part 1: *Diagnostic and classification of Diabetes Mellitus*. 1-49.
- [141]. Ortiz-Andrade R.R.V., Rodriguez-Lopez M.L., Garduño-Ramirez P., Castillo-España S., Estrada-Soto, 2005. Anti-diabetic effect on alloxinized and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of *Tournefortia hartwegiana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 37-42.
- [142]. Oubré A.Y., Carlson T.J., King S. R. et al. 1997. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40: 614-7.
- [143]. Ozcal N., Dinc S., 1993. Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the stand point of pharmacy. *Eczacilik Fakültesi Dergisi*, 22: 21-29.
- [144]. Parmar H.S., Kar A. 2007. Protective role of *Citrus sinensis*, *Musa paradisiaca* and *Punica granatum* peels against diet-induced atherosclerosis and thyroid dysfunction in rats. *Nutrition Research*, 27: 710-718.
- [145]. Patel C., Dadhaniya P., Hingorani L., Soni M.G., 2008. Safety assessment of pomegranate fruits extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food and chemical toxicology*, 46 (8) : 2728-35.
- [146]. Perlemuter L., Collin de l'Hortel G., 2003. Diabète et maladies métaboliques. Ed ; Masson. 4<sup>ème</sup> édition.
- [147]. Petricic J., and Kalodzera Z., 1982. Galeginin: its toxicity antidiabetic activity and content determination. *Acta. Pharma. Yugoslavica*, 32: 219-223.
- [148]. Pinies J.A., Cairo G., Gastambide S., Vasques J.A., 1994. Course and prognosis of 132 patients with diabetic non ketonic hyperosmolar state. *Diabetes and metabolism*, 20: 43-8.



- [149]. Poyrazoglu, E., Goekmen, V., Artik, N., 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 567-575.
- [150]. Prashanth D., Asha M.K., Amit A., 2001a. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72: 171-173.
- [151]. Prashanth D., Padmaja R., Samiulla D.S., 2001b. Effect of certain plant extracts on  $\alpha$ -amylase activity. *Fitoterapia*, 72: 179-181.
- [152]. Qian M., Haser R., Buisson G., Duee E., Payan F., The active center of a mammalian  $\alpha$ -amylase structure of the complex of pancreatic  $\alpha$ -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry*, 33: 6284-6294.
- [153]. Qiming C. et Mingzhi X., 1986. Hypoglycaemic effect of *Coptis chinensis* extract and Berberine. *Yaoxue Xuebao*, 21: 401-406.
- [154]. Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition : Centre National de la Recherche Scientifique. Paris 7. 1170p
- [155]. Reuser A. et Wisselaar H., 1994. An evaluation of potential side-effects of alpha glucosidases inhibitors used for the management of diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.*, 24 (suppl 3): 19-24.
- [156]. Rhabasa-Lhoret R., et Chiasson J.L., 2004. Alpha glucosidase inhibitors (3<sup>rd</sup> ed.). In R. A. Defronzo, E. Ferrannini, H. Keen, and P., Zimmet (Eds). *International textbooks of diabetes mellitus* (Vol. 1). UK: John Wiley.
- [157]. Ricci D., Giamperi L., Bucchini A., Fraternali D., 2006. Antioxydant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia*, 77: 310-312.
- [158]. Robin J.M., et Norman R.F., 1988. Economic and medicinal plant research, 6 : 156-157.
- [159]. Rodier M., 2001. Définition et classification du diabète. *Médecine nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25 (2): 91-93.
- [160]. Roig J.T., 1974. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. *Ciencia y Técnica*, Havana, 401-402.
- [161]. Rosenblat M., Hayek T., Aviram M., 2006. Antioxidative effects of pomegranate juice consumption by diabetic patients on serum and on macrophage. *Atherosclerosis*, 187: 363-371.
- [162]. Rout S., Banerjee R., 2007. Free radical scavenging, antiglycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresource Technology*, 98: 3159-3163.
- [163]. Sampaio E.M., Furtado FAS., Furtado JS., Cavalcante MNM. and Riedel OO., 1979. Hypoglycaemic producing activities of raw coffee beans (*Coffea Arabica*). *Rev. Medecine. Univ. Fed. Doceara*, 19: 49-54.



- [164]. Sathyavati G.V., Gupta A.K., Neeraj T., 1987. Medicinal plants of India. *Indian council of medical research*, New Delhi. Vol. 2: 540.
- [165]. Satomi, H., Umemura, K., Ueno, A., Hatano, T., Okuda, T., Noro, T., 1993. Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16: 787-790.
- [166]. Saxena A., Vikram N.K., 2004. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 10: 369-378.
- [167]. Schubert S.Y., Lansky E.P., Neeman I., 1999. Antioxidant and eicosanoïd enzym inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoïds. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 11-17.
- [168]. Seeram N.P., Adams L.S., Henning S.M., Niu Y., Zhang Y., Nair M.G., Heber D., 2005. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 360-367.
- [169]. Segura J.J., Morales-Romos L.H., Verde-Star J., Guerra D., 1990. Growth inhibition of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* produced by pomegranate root (*Punica granatum* L.) *Archivos de Investigacions Médicas*, 21: 235-239.
- [170]. Seppi A.k, Franciosi, A., 1980. Chemical composition of pomegranate juice (*Punica granatum*): amino acid contents. *La Revista della Societa Italiana di Scienza dell'alimentazione*, 9: 211-212.
- [171]. Sheehan WE., Zemaitis MA., 1983. A constituent of *Pterocarpus marsupium* (-)-Epicathechin, as a potential antidiabetic agent. *J. Nat. Prod.*, 46: 232-234.
- [172]. Shiraishi T., Abe M., Miyagawa T., 2002. Cheese foods containing conjugated polyunsaturated fatty acid glycerids. *Japanese Patent*, JP: 2002176913.
- [173]. Shirwaikar A., Rajendran K., Barik., 2006. Effect of aqueous bark extract of *Garuga pinnata* Roxb. in straptozotocin-nicotinamide induced type II diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*.
- [174]. Spinass G.A., Lehmann R., 2001. Diabète sucré: Diagnostic, classification et pathogénèse. *Forum Med. Suisse*, 20: 519-525.
- [175]. Stangeland T., Remberg S. F., Lye K. A., 2009. Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables. *Food and Chemistry*, 113: 85-91.
- [176]. Sudheesh S., et Vijayalakshmi N.R., 2005. Flavonoïds of *Punica granatum*-potential antiperoxydative agents. *Fitoterapia*, 76: 181-186.
- [177]. Surveswaran S., Cai Y.Z., Corke H., Sun M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102: 938-953.

- [178]. Syed D.N., Afaq F., Mukhtar H., 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminar in Cancer Biology*, 17: 377-385.
- [179]. Szkudelski T., Szkudelska K., 2002. Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes in vitro. *Physiol. Res.*, 51: 255-259.
- [180]. Szkudelski T., 2001. The mechanism of alloxan and Streptozotocin action in  $\beta$  cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 50: 537-546.
- [181]. 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.
- [182]. Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., 1986. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34: 650-655.
- [183]. Teixeira V.L., Rocha F.D., Houghton P.J., Kaplan M.A. Pereira R.C., 2007.  $\alpha$ -amylase inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycaemic potential. *Fitoterapia*, 78: 35-36.
- [184]. Tournaire J., 1994. Endocrinologie. Diabète Nutrition pour le praticien. Ed. Masson. SIMEP ; 1<sup>ère</sup> Ed. 317-319.
- [185]. Tranier S., Robert X., Haser R., Bozennet S., Sresson B. et Aghjani N., 2004. Rôle du domaine C de l' $\alpha$ -amylase AMY1 du grain d'orge dans la reconnaissance et la fixation du substrat « la pince à sucre ». Lab oratoire de biocristallographie IB CP-UMR 5086, CNRS/UCB L, IRF 128. Lyon.
- [186]. Tripathi S.M., Singh D.K., 2000. Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, 33: 1351-1355.
- [187]. Tsuyuki H., Ito S., Nakatsukasa Y., 1981. Lipids in pomegranate seeds. *Nihon Daigaku No-Juigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku*, 38: 141-148.
- [188]. Van Elswijk D.A., Schobel U.P., Lansky E.P., Irth H., Van der Greef J., 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65: 233-241.
- [189]. Velioglu S., Unal C., Cemeroglu B., 1997. Chemical characterization of pomegranate juice. *Fruit Processing*, 8: 307-310.
- [190]. Vidal A., Fallarero A., Peña B.R., Medina M.E., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y., Vuorela P.M., 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 295-300.
- [191]. Virally M., Blichlé J.F., Girard J., Halimi S., Simon D., Guillausseau P.J., 2007. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathology, unmet needs and therapeutic perspectives. *Diabetes and Metabolism*, 33: 231-244.



- [192]. Voravuthikunchai S.P., Limsuwan S., Mitchell H., 2006. Effect of *Punica granatum* pericarp and *Qercus infectoria* Nutgalls on Cell surface hydrophobicity and cell survival *Helicobacter pylori*. *Journal of Health science*, 52 (2): 154-159.
- [193]. Voravuthikunchai S.P., Sririrak T., Limsuwan S., Supawita T., Iida T., Honda T., 2005. Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Health Science*, 51 (5): 590-596.
- [194]. Waeber G., 2000. Diabétologie expérimentale. *Revue médicale de la Suisse Romande*, 120 : 907-913.
- [195]. Waheed S., Siddique N., Rahman A., Zaidi J.H., Ahmad S., 2004. INAA for dietary assessment of essential and other trace elements in 14 fruits harvested and consumed in Pakistan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 260 : 523-531.
- [196]. Wang R.F., Xie W.D., Zhang Z., Xing D.M., Ding Y., Wang W., Ma C., Du L.J., 2004. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products*, 67: 2096–2098.
- [197]. Wang H.X., Ng T.B., 1999. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemi, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sci.*, 65 (25): 2663-77.
- [198]. Watanabe K., Hatakoshi M., 2002. *Punica granatum* leaf extracts for inactivation of allergen. Japan Kokai Tokkyo Koyo. Japanese Patent, JP: 2002370996 A2 20021224, 5pp.
- [199]. Wens J., Sunaert P., Nobels F., Feyen L., Crombruggen P.V., Bastiaens H., Royen P. V., 2007. Diabète sucré de type 2. Recommandation de bonne pratique. *Société Scientifique de Médecine Générale (SSMG)*, 02: 3-72.
- [200]. Wikipédia « Encyclopédie libre », 2008. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Grenadier>
- [201]. Wolffenbittel B., Van Haefen T., 1995. Prevention of complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs*, 50: 263-288.
- [202]. Wong D.W.S., et Robertson G.H., 2003.  $\alpha$ -Amylases. *U.S. Department of Agriculture, Albany, California, U.S.A.* 56.
- [203]. Yki-Jarvinen H., 2004. Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med.*, 351: 1106-18.
- [204]. Yoon S.H., Robyt J.F., 2003. Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4<sup>IV</sup>- $\alpha$ -maltohexaosyl and 4<sup>IV</sup>- $\alpha$ -maltododecaosyl analogues. *Carbohydrate Research*, 338: 1969-1980.
- [205]. Zimmet P., Alberti K., Shaw J., 2001. Global and social implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782-787.
- [206]. Zhang J., Zhan B., Yao X., Gao Y., Shog J., 1995. Anti-viral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus in vitro. *Chung Kuo Chung Yao Chin.* 20: 556-558.



# Annexes

## Annexe I : Les plantes antidiabétiques utilisées dans la région de Tlemcen [Benmehdi, 2000]

Nom scientifique	Famille	Nom vernaculaire
<i>Trigonella foenum graecum</i> L.	Fabiacées	Halba
<i>Citrullus colocynthis</i> L.	Cucurbitacées	Hantal
<i>Saccocalyx saturoioides</i>	Labiées	Zaâtar
<i>Berberis vulgaris</i>	Berberidacées	Ghriss
<i>Aloe vera</i>	Liliacées	Merr ou sber
<i>Narum oleander</i> L.	Apocynacées	Defla
<i>Anmoïdes verticilata</i>	Ombellifères	Nûnkha
<i>Globularia alypum</i> L.	Globulariacées	Aïn larneb
<i>Juniperus phoenicea</i>	Cupressacées	Arâar
<i>Ajuva iva</i> L.	Labiées	Chendgoura
<i>Artemisia herba alba</i> ass.	Composées	Schih
<i>Inula viscosa</i> L.	Composées	Magraman
<i>Marrubium vulgare</i>	Labiées	Marriwa
<i>Mentha pulegium</i> L.	Labiées	Fliou
<i>Ammi visigana</i> Lam.	Apiacées	Bachnikha
<i>Olea europaea</i> L.	Oéacées	Zeb oudj, Zitoun
<i>Murtus communis</i> L.	Myrtacées	Raïhane
<i>Zizyphus lotus</i> L.	Rhamnacées	Aroug essedra
<i>Prunus amygdalus</i> var.. amara	Rosacées	Louz el mor
<i>Ruta chalepensis</i>	Rutacées	Fidjel
<i>Peganum harmala</i>	Zygophylacées	Harmal
<i>Zygophyllum album</i> L.	Zygophylacées	Aggaya
<i>Papaver rhoeas</i>	Papaveracées	Ben naâman
<i>Mentha rotundifolia</i>	Labiacées	Domrane
<i>Lawsonia inermis</i>	Lythracées	Henna
<i>Lavandula staechas</i>	Labiées	Helhal
<i>Ferula assa foetida</i>	Ombéllifères	Hentite
<i>Arbutus unedo</i>	Ericacées	Lendj
<i>Rhamus alatemus</i>	Rhamnacées	Meliles
<i>Erythrina indica</i>	Gentianacées	Meraret el hanech
<i>Juglans regia</i>	Juglandacées	Ourag el djouz
<i>Laurus nobilis</i>	Lauracées	Rend
<i>Punica granatum</i>	Punicacées	Romman
<i>Nigella sativa</i>	Ranunculacées	Sanoudj
<i>Anacyclus pyrethrum</i>	Composées	Tigantas
<i>Cuminum cyminum</i>	Ombellifères	Kemmoun
<i>Athophytum scoparium</i>	Chenopodiacées	Nedjem
<i>Stipa tenacissima</i> L.	Graminées	El halfa

<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Cupressacées	Ourag ettaga
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	Pinacées	Essnouber
<i>Pistacia lentiscus</i> .	Anacardiées	darw
<i>Bryonia dioïca</i>	Cucurbitacées	Brestoum
<i>Anvillea radiata</i>	Composées	En goud
<i>Prunus dullis</i>	Rosacées	Ourag el khoukh
<i>Capsicum frutescens</i>	Solanacées	Felfal el har
<i>Artemisia arborescens</i>	Composées	Chhiba
<i>Stureja calamintha</i>	Rabiées	Nabta
<i>Rubus fruticosus</i>	Rosacées	Ourag el âligue
<i>Chamaerops humilis</i>	Palamcées	Aroug el doum
<i>Calycotome spinosa</i>	Papilionacées	Aroug el gendoul
<i>Musa paradisiaca</i>	Musacées	Ourag el banan
<i>Eucalyptus globulus</i>	Murtacées	Kalitouss
<i>Ficus carica</i>	Moracées	Ourag el tin el aswad
<i>Allium cepa</i>	Liliacées	Ourag Bassla
<i>Cynara scolymus</i>	Composées	Ourag el Khorchaf
<i>Zea mays</i>	Graminées	Châr eddora
<i>Urtica urens</i>	Urticacées	Harrigue
<i>Corinandrum sativum</i>	Ombilifères	El kosbar
<i>Carya pecan</i>	Juglandacées	Gorgaâ el djebal
<i>Quercus ilex</i>	Fagacées	Aroug edbâgh
<i>Pinus halepensis</i>	Pinacées	Taïda
<i>Ampelodesma mauritanicum</i>	Graminées	Aroug eddiss
<i>Lippia citriodora</i>	Verbenacées	Louiza
<i>Opuntia ficus indica</i>	Coctacées	Ourag el hendia
<i>Cydonia oblonga</i>	Rosacées	Sfargel
<i>Mentha aquatica</i>	Labiées	El hbaq
<i>Allium sativum</i>	Liliacées	Ettoum
<i>Scolymus grandiflows</i>	Composées	Aroug el gamina
<i>Ciltis australis</i>	Ulmacées	Ourag ettoghaz
<i>Micropus bombicinus</i>	Composées	Bousoufa
<i>Zizyphus spina christi</i>	Rhamnacées	Aroug essfizef
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Labiées	Yazir



**Annexe II : Réactifs et réactions de caractérisation des tests phytochimiques**

• **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée dissoudre 2g de KI et 1.27g de I<sub>2</sub>, le volume obtenu est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

• **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d'HgCl<sub>2</sub> dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.

• **Réaction de Libermann Burchardt** : Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5 ml d'Anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentrée. Agiter et laisser la solution reposer 30 min à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert.

• **Réaction de Bornträger** : En milieu alcalin aqueux (NH<sub>4</sub>OH), les anthracénosides et emodols donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus au moins violacé.

• **Réactif d'amidon** : Dissoudre 1.2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2.5g d'iodure de potassium. chauffer, dans un bain mari 5ml de la solution à tester avec 10ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition. L'apparition d'une couleur bleue violacée révèle la présence d'amidon.

## المخلص

خضوعها لتجربة سماحية الغلوكوز عن طريق الفم (غلوكوز 2.5 غ/كغ)، و قد كان الحقن على مستوى الصفاق ذو فعالية أكثر.

عند الجرذان المصابة بداء السكري و بعد تتبع قصير المدى (4 سا) انخفضت النسبة المرتفعة للسكر في الدم بنسبة طفيفة جدا بعد حقن المستخلص الكحولي على مستوى الصفاق، أما تناوله عن طريق الفم فلم يظهر أي فعالية.

قياس نسبة السكر في الدم لمدة أسبوعين عند الجرذان المصابة بالسكري بعد تناول يومي للجرعتين المذكورتين انفا أظهر لنا انخفاض محسوس خلال الأسبوع الأول و الثاني. حيث تبين خلال الأسبوع الأخير أن هذا الإنخفاض كان أهم عند حقن المستخلص على مستوى الصفاق حيث بلغت نسبة الإنخفاض

46.6% أما عن طريق الفم فقد كانت النسبة 32.92%.

أما في ما يخص استقلاب الشحميات، أظهرت النتائج فعالية المستخلص في خفض نسبة الكوليستيرول و الغليسيريدات الثلاثية في مصال الجرذان المصابة بداء السكري والتي تم معاملتها لمدة أسبوعين.

أما عن نشاط أنزيم ألفا أميلاز فقد تبين أن قشر الرمان يكتسب إمكانية تثبيط نشاط هذا الأنزيم بتركيز متوسطي بلغ 3.65 غ/ل.

**الكلمات المفتاحية:** داء السكري، الرمان، أعشاب طبية، سترپتوزوتوسين، تسمم، ألفا أميلاز، مالتوز، تثبيط ألفا أميلاز، نسبة السكر المرتفعة.

نظرا للأعراض الجانبية غير المرغوب فيها و التي تسبب في ظهورها الأدوية المعالجة لمرض السكري، بالإضافة إلى تكلفتها العالية يتم البحث حاليا عن جزيئات طبيعية ذات فعالية وأكثر أمنا لعلاج هذا المرض المزمن انطلاقا من النباتات المستعملة في الطب التقليدي.

يهدف هذا البحث إلى تقييم فعالية المستخلص الكحولي لقشر الرمان (*Punica granatum*) في تحسين مستوى السكر في الدم لدى الجرذان

العادية و المصابة بداء السكري عن طريق حقن 50مغ/كغ من السترپتوزوتوسين من جهة، و من جهة أخرى دراسة فعالية هذا المستخلص في تثبيط نشاط أنزيم ألفا أميلاز.

تم اختبار هذا المستخلص عند جرذان التجارب عن طريق الفم و عن طريق الحقن على مستوى الصفاق بجرعتين مختلفتين هما على التوالي

400مغ/كغ و 20مغ/كغ حددتا على أساس درجة التسمم المتسببة في مقتل 50% من مجموعة الجرذان والتي بلغت 4000مغ/كغ عن طريق الفم و 200مغ/كغ عن طريق الحقن على مستوى الصفاق.

عند الجرذان العادية أظهرت النتائج المحصلة عليها أن المستخلص الكحولي لا يملك فعالية في خفض نسبة السكر عن مستواها العادي في الدم بالنسبة للجرعتين، في حين تمكن من منع ارتفاع نسبة السكر في الدم بعد

## Résumé

Ce travail porte sur la recherche des propriétés antidiabétiques de l'extrait brut « hydroalcoolique » de l'épicerpe de *Punica granatum* « Grenadier », plante utilisée traditionnellement dans le traitement du diabète sucré à travers le monde.

Cet extrait a été expérimenté d'une part sur des rats normaux et rendus diabétiques par la STZ. (50mg/kg p.c.) après la détermination de ses doses létales par voie orale et intrapéritonéale *in vivo*, d'autre part sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*.

La toxicité de cet extrait chez le rat Wistar révèle une DL<sub>50</sub> de 4000mg/kg p.c. par voie orale, et de 200mg/kg p.c. par voie IP.

L'influence de l'extrait brut « hydroalcoolique » sur le taux de glucose sanguin chez les rats normaux et diabétiques nous a permis d'obtenir des résultats qui montrent que chez les rats normo glycémiques aucun effet hypoglycémiant n'a été observé à court et à long terme, par contre le test de tolérance orale au glucose chez les rats normaux révèle que l'extrait empêche l'augmentation du pic d'hyperglycémie provoquée par voie orale (glucose 2.5g/kg p.c.).

Le suivi à court terme des rats diabétiques montre que l'administration par voie intrapéritonéale de 20mg/kg p.c. de

l'extrait brut provoque une faible diminution de l'hyperglycémie, tandis que par voie orale (400mg/kg p.c.) aucune diminution n'a été observée. De même, Chez les rats diabétiques, l'administration quotidienne de l'extrait se traduit par une diminution de l'ordre de 56% et 46.7% par voie orale et intrapéritonéale respectivement durant la première semaine, alors que la diminution a été plus importante durant la deuxième semaine par voie intrapéritonéale.

De ce fait l'extrait brut de *Punica granatum* possède une activité antihyperglycémiant.

Sur le métabolisme lipidique, l'extrait brut provoque un effet hypolipidémiant pour les deux paramètres étudiés (Cholestérol et Triglycérides) chez les rats diabétiques après un suivi de deux semaines.

Les tests réalisés *in vitro* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase montrent un effet inhibiteur exercé par l'extrait brut de *Punica granatum* avec une IC<sub>50</sub> de 3.65g/l. et un Ki de 1.25g/l.

**Mots clés :** *Punica granatum*, diabète sucré, streptozotocine, plantes médicinales, Toxicité,  $\alpha$ -amylase, acide dinitrosalicylique, maltose, inhibition, hyperglycémie post-prandiale.

## Abstract

This study was designed to evaluate the antidiabetic effect of hydroalcoholic extract from *Punica granatum* peels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats and its potent  $\alpha$ -amylase inhibitory.

The toxicity evaluation of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* was determined in oral and intraperitoneal administration in rats. The oral LD<sub>50</sub> of the extract was found to be greater than 4g/kg b.w. The intraperitoneal LD<sub>50</sub> was determined as 200mg/kg b.w.

Antidiabetic effect of this extract was investigated after oral and intraperitoneal administration at dose of 400mg/kg b.w. and 20mg/kg b.w. respectively.

In normal fasted rats, all doses of the test drug extract showed no hypoglycaemic effect (short and long time), but were found to be depressing the peak value of blood glucose after oral glucose tolerance (glucose 2.5g/kg b.w.).

In streptozotocin-induced diabetic rats, intraperitoneal administration of 20mg/kg b.w. of the extract led to lowering effect in blood glucose level. The fall was seen at 1h and

remained up 3 h after administration of the test drug extract but not in oral administration.

After 2-weeks of daily treatment in streptozotocin-induced diabetic rats, plasma glucose levels were increased after oral and intraperitoneal administration of hydroalcoholic extract from *Punica granatum* peels by 32.92% and 46.6% respectively.

However, this extract showed hypolipidemic effect (Cholesterol, triglycerides) in streptozotocin-induced diabetic rats.

Finally, the crude hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peels showed strong inhibitory activity for  $\alpha$ -amylase activity with an IC<sub>50</sub> value at 3.65g/l and Ki at 1.25g/l.

**Key words:** *Punica granatum*, diabetes mellitus, streptozotocin, medicinal plants, toxicity,  $\alpha$ -amylase, dinitrosalicylic acid, maltose, inhibition, post-prandial hyperglycaemia.