

MAST. Bio-93 / 02

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère d'Enseignement et de la Recherche Scientifique
Université **ABOU BAKR BELKAID –TLEMCEN-**
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre
et de l'Univers
Département de Biologie



Inscrit sous le N°: 1328
Date: 2011 يونيو 10
Code:



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master
en Biologie Option Biochimie Appliquée

Thème :

Etude de la toxicité aiguë d'extrait éthanolique
des glycosides cucurbitacines des graines de la
coloquinte (*Citrillus colocynthis*)

Présenté par : Melle **BACHIRI Halima Saàdya**

Soutenu le : 03 /07 /2011

Devant le jury :

Président: M^r **DJAZIRI R.**

Examineur: M^r **LAHFA F.**

Promoteur: M^r **AZZI Rachid**



Année universitaire : 2010-2011

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

En premier lieu Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur, **Azzi Rachid** , Chargé de cours au département de biologie, faculté des sciences, Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen- pour sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils, ses qualités humaines. Pour tout cela, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Le grand merci à Monsieur **Djaziri R**, Maître de conférence au département de biologie, faculté des sciences, Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen-, d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime également ma profonde reconnaissance et mes respects à Monsieur **Lahfa F.**, Chargé de cours au département de biologie, faculté des sciences, Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen- d'avoir accepter d'examiner et discuter ce travail.

Je remercie toutes personnes ayant contribuées à la réalisation de ce travail et surtout aux responsables des laboratoires.



Dédicace

A mes chers parents, de votre affection de votre sacrifice et de tous les efforts que vous avez déployé durant toute ma vie j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect.

A mes grands-parents, que dieu vous donne longue vie et bonne santé.

A mes deux chers frères Mohammed El-Achraf et Mohammed Chams Eddine

A mes Oncles, Tantes, Cousins et Cousines, ce travail vous est dédié. Merci pour votre soutien.

A mes deux chères amies de vie Halima et Meriem, pour les moments de peine et de joie que nous avons eu à partager, et à toutes mes amies.

A ma deuxième famille Mchernen de votre gentillesse et de votre soutien pendant ma résidence à Tlemcen.

A tous mes camarades de promotion.



الملخص

يستعمل نبات الحنظل كدواء تقليدي ضد داء السكري في المغرب العربي و الشرق الاوسط، الا انها قد تكون سامة احيانا اذا اخذت بجرعات زائدة، لهذا يتمحور بحثنا حول مدى تأثير مستخلص الغلوكوزيدات المستحضرة من الكحول المستخرجة من بذور نبات الحنظل وذلك بالتركيز على درجة التسمم وانخفاض نسبة السكر في الدم بالتجريب على جرذان اناث مخبرية عادية.

اول اعراض التسمم الحاد عند هذه الجرذان كان بعد حقنها مباشرة بمستخلص الغلوكوزيدات المستحضرة من الكحول المستخرجة من بذور نبات الحنظل باستعمال حقنة تحت الصفاق ومرة واحدة، نتج عنها صعوبة في التنفس مع نقص في الحركة. قد تصبح هذه الاعراض اسوا مع زيادة الجرعات حتى موت الجرذان مباشرة بعد الحقن.

مقياس التسمم الحاد يتم بالبحث عن جق 100 (الجرعة القاتلة ل 100 من الحيوانات) التي قدرت ب 3000 مغ كغ، و عن جق 50 (الجرعة القاتلة ل 50 من الحيوانات) التي قدرت ب 2330,7 مغ كغ.

هناك تأثير واضح للتسمم الحاد بمستخلص الغلوكوزيدات المستحضرة من الكحول المستخرجة من بذور نبات الحنظل على وزن الجرذان خلال الاسبوع الموالي للحقن بمختلف الجرعات بالمقارنة مع الجرذان الشاهدة.

كذلك نرى من خلال النتائج المتحصل عليها، هناك تأثير واضح على خفض نسبة السكر في الدم بحيث تكون جد معتبرة حوالي 68,93 بالمئة بالمقارنة مع نسبته في الوقت ت0 ساعتان بعد حقن 1200 مغ كغ من المستخلص.

الكلمات المفتاحية: الحنظل، مرض السكري، الغليكويزيدات، التسمم الحاد جق 50، الفئران المخبرية.



Résumé

Notre étude a porté sur la recherche des effets toxique et hypoglycémiant d'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) « Handal », famille des cucurbitacées, sur des rats femelles Wistar normaux.

Cette plante est utilisée comme remède traditionnel pour le traitement du diabète sucré dans la région du Maghreb et du Moyen- Orient. Mais, elle devient très toxique voir mortelle à des doses élevées.

L'étude de la toxicité aigue chez des rats femelles traités par l'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) par voie intrapéritonéale a montré chez les animaux même à des doses faibles une difficulté de respiration et une activité réduite et ses symptômes deviennent plus graves avec l'augmentation des doses jusqu'à la mort des animaux sur place après l'injection de l'extrait.

La toxicité aigue de cet extrait a été évaluée par la détermination de la DL₅₀ et la DL₁₀₀. Les valeurs de la DL₁₀₀ est de 3000 mg/kg p.c et de la DL₅₀ est calculée par la méthode de Litchfield et Wilcoxon, est de 2330,7 mg/kg p.c.

Un effet clair de la toxicité aigue d'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) influence sur le poids corporel des rats durant la semaine qui suit l'injection intrapéritonéale des différentes doses de cet extrait, par rapport aux rats témoins.

De même, les résultats obtenus montrent un effet hypoglycémiant de l'extrait éthanoliques des glycosides cucurbitacines. La diminution de la glycémie devient très significative, d'ordre de 68,93% par rapport à la glycémie basale (T0), 2 heures après l'injection de 1200mg/kg p.c. de notre extrait.

Mots clés : *Citrullus colcynthis*, toxicité aigue, diabète sucré, glycosides cucurbitacines, DL₅₀, rats Wistar



Sommaire

Sommaire.....	I
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Liste des abréviations.....	V
Liste des unités.....	VI
Introduction générale.....	01

1^{ère} Partie : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le diabète.....	03
II. Plantes antidiabétiques.....	06
III. Toxicité des plantes antidiabétiques.....	08
IV. Généralités sur le principe actif.....	09
V. Notions de toxicologie.....	11
1. Comment évaluer un effet toxique ?.....	11
2. Etude de la toxicité aiguë (Détermination de la dose létale DL ₁₀₀ , DL ₅₀).....	11
3. Toxicité sub-aiguë et toxicité chronique.....	13
4. Dosage des paramètres biochimiques.....	16
5. Examens plasmatiques liés à la fonction hépatique.....	18
6. Examens plasmatiques liés à la fonction rénale.....	19
7. Examens des urines.....	20
8. Examen hématologique.....	20
9. Examens histopathologiques.....	21
VI. La coloquinte (<i>Citrullus colocynthis</i>) et leurs effets thérapeutiques.....	21
VII. Toxicité de la coloquinte (<i>Citrullus colocynthis</i>).....	24

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

I- Enquête ethno-botanique.....	25
II- Analyses phytochimiques.....	27
1. Matériel végétal.....	27

2.	Dégraissage du matériel végétal.....	27
3.	Tests phytochimiques.....	28
3.1	Préparation des extraits	28
3.2	Tests phytochimiques	28
4.	Extraction des glycosides cucurbitacines.....	29
5.	Caractérisation des glycosides	30
III-	Analyses biologiques.....	31
1.	Les animaux.....	31
2.	Répartition des rats.....	31
3.	Préparation des doses à tester.....	32
4.	Administration des doses aux différents lots.....	32
5.	Observation de l'évolution de la toxicité aigue chez les rats.....	33
5.1	Détermination de la DL ₅₀ (Par la méthode de Litchfield et Wilcoxon).....	33
5.2	Le suivie du poids corporel des rats.....	33
6.	Effet hypoglycémiant des différentes doses des glycosides cucurbitacines.....	33
7.	Analyses statistiques.....	34
 Chapitre 2 : Résultats et interprétation		
I-	Enquête ethno-botanique.....	36
1.	Informations sur les diabétiques questionnés.....	36
2.	Etats cliniques des diabétiques	37
3.	Utilisation des plantes antidiabétiques.....	38
II-	Analyses phytochimiques.....	40
1.	Tests phytochimiques.....	40
2.	Rendement de l'extrait éthanolique de glycosides cucurbitacines après extraction....	40
III-	Analyses biologiques	41
1.	Evaluation de la toxicité aigue	41
1.1	Les symptômes de la toxicité pendant le premier jour de l'injection.....	41
1.2	Le suivie des signes de toxicité pendant la semaine.....	43
1.3	Le suivie des poids des rats survivants pendant la première semaine.....	43
2.	Effet hypoglycémique d'extrait des glycosides cucurbitacines chez des rats normaux.	43
IV-	Discussion.....	45
V-	Conclusion générale.....	49
VI-	Références bibliographiques.....	50

Listes des figures

Figure 1 : La fleur de <i>Citrullus colcyntis</i>	22
Figure 2 : Le fruit de <i>Citrullus colcyntis</i>	22
Figure 3 : Dégraissage par l'appareil de soxhlet	27
Figure 4 : Diagramme montrant l'extraction des glycosides cucurbitacines selon la méthode de Natiq et al., 1989	30
Figure 5 : Détermination de DL_{50} par la méthode de Lichfield et Wilcoxon (taux de mortalité en fonction de logarithme la dose injectée)	42

Listes des tableaux

Tableau 01 : Complications du diabète	06
Tableau 02 : Résultats de quelques études ethnobotaniques sur les plantes antidiabétiques dans différentes régions du monde	07
Tableau 03 : Détermination des doses létales des glycosides cucurbitacines injectées aux rats par voie intra-péritonéale	32
Tableau 04 : Répartition des diabétiques selon le sexe, le poids et l'âge.....	36
Tableau 05 : Etats cliniques des diabétiques	37
Tableau 06 : Répartition de la population diabétique selon l'utilisation des plantes antidiabétiques et leurs efficacités.....	38
Tableau 07 : Plantes antidiabétiques recensées et utilisées dans la région de Méchéria.....	39
Tableau 08 : Résultats des tests phytochimiques des extraits acide et aqueux.....	40
Tableau 09 : Rendement de l'extrait éthanolique de glycosides cucurbitacines.....	40
Tableau 10 : Les symptômes observés et le taux de mortalité des rats en fonction de la dose administrée.....	41
Tableau 11 : Résultats de l'évolution de la glycémie pendant la semaine qui suit l'injection intra-péritonéale d'extrait.....	43
Tableau 12 : Evolution de glycémie durant 3 heures après l'injection intra-péritonéale d'extrait des glycosides cucurbitacines.....	44

Liste des abréviations

ADA :	American Diabetes Association.
ADP:	Adénosine Diphosphate.
ALAT :	ALanine Amino Transférèse.
ASAT :	ASpartate Amino Transférèse.
ATP :	Adénosine Triphosphate.
CAP :	Centre Anti Poison.
CSST :	Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec.
DL100 :	Dose létale.
DL50 :	Dose médiane.
FID :	Fédération Internationale du Diabète.
GOD :	Glucose Oxydase.
HbA1c :	Hémoglobine glyquée.
IP:	Intra péritonéale.
MODY:	Maturity Onset Diabetes of the Young.
NDDG :	National Diabetes Data Group.
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé.
p.c:	Poids corporel.
POD:	Peroxydase.
RDM :	Recommandations de la direction des médicaments.
STZ:	Streptozotocine.
TGO :	Transaminase Glutamo-oxalo-actétique.
TGP :	Transaminase glutamopyruvique.
UV :	Ultrat violet.
VS :	Vitesse de sédimentation.
α :	Alfa.
β :	Bêta.

Liste des unités

% :	Pourcent
μ :	Micro
μl :	Microlitre
g :	Gramme
g/l :	Gramme par Litre
mg :	Milligramme
Kg :	Kilogramme
mg/Kg :	Milligramme par Kilogramme
mg/ml :	Milligramme par Millilitre
ml :	Millilitre
mol :	Mole
mol/ml :	Mole par Millilitre
nm :	Nanomètre
min :	Minute
T/min :	Tours par minute
h :	Heure

Introduction générale

Au cours des temps l'homme a dû faire face à une impérieuse nécessité de distinguer les plantes utiles de celles qui tuent.

L'usage des plantes à des fins thérapeutiques ou narcotiques et leur ingestion accidentelle ou par confusion avec d'autres plantes comestibles, déterminent des accidents fréquents dans le monde.

La médecine traditionnelle existe depuis toujours : elle est la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales. Dans certains pays, les appellations médecine parallèle/ alternative /douce sont synonymes de médecine traditionnelle [OMS, 2000].

Traiter, soigner, ou guérir les maladies, c'est le but des phytothérapeutes à travers le monde. De ce fait plusieurs maladies qui posent de très graves problèmes à l'échelle mondiale sont prises en charge par les chercheurs dans ce domaine afin de trouver de nouveaux remèdes.

Une des maladies les plus dangereuses est le diabète sucré qui est considéré parmi les maladies les plus fréquentes de notre civilisation. Il touche quelques 5 à 7% de la population mondiale [Waeber, 2000]. Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultante d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de cette hormone [Raccah, 2004].

En Afrique, jusqu'à 80% de la population utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de soins de santé [OMS, 2002]. Précisément, dans certains pays d'Afrique, les plantes médicinales représentent la seule source de médicaments pour près de 90% de la population [Anne-Laure, 2002]. De même, dans de nombreux pays asiatiques la médecine traditionnelle continue d'être largement utilisée, même si l'allopathie est facilement disponible. En Chine, l'utilisation des remèdes traditionnels représente 40% de tous les soins de santé. En même temps, pour certains pays de l'Amérique Latine, il a été rapporté que 71% de la population de Chili et 40% de la population de Colombie ont utilisé la médecine traditionnelle [OMS, 2002].

Introduction générale

La médecine traditionnelle est également très populaire dans de nombreux pays développés parce qu'elle est fermement intégrée à des systèmes de croyance plus globaux [OMS, 2002].

Plusieurs enquêtes ethnobotaniques et ethnopharmacologiques ont été réalisées dans la région du Maghreb, dont la population est reconnue par l'usage de plantes médicinales, montrent la diversité des plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète [Ziyyat et al., 1997 ; Jouad et al., 2001 ; Bnouham et al., 2002, Eddouks et al., 2007; Tahraoui et al., 2007; Allali et al., 2008 ; El Amrani et al., 2010; Lahsissene and Kahouadji, 2010].

Mais, les plantes sont à l'origine de nombreuses intoxications à travers le monde [Rhalem Naima et al., 2008].

Tous ces chiffres montrent que les gens se tournent, de nouveau, vers la médecine traditionnelle et surtout vers les plantes médicinales.

En absence de législation stricte et en absence de contrôle de l'efficacité des plantes, l'usage de celles-ci, pour des populations, reste une solution facile et naturelle. Nombre de ces plantes peuvent être toxiques, abouti à des intoxications graves, voire mortelles. Quelle est la solution qui permet d'élargir l'utilisation de ces plantes à condition d'éviter les risques d'intoxication ?

Notre étude porte sur l'effet toxique d'extrait éthanollique des glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des rats Wistar femelles.

1^{ère} Partie :
Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le diabète

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie résultant soit de défauts de la sécrétion soit de l'action de l'insuline, ou des deux conjuguées [The expert Committee..., 1997]. L'hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les nerfs, les reins, le cœur et les vaisseaux [Raccah, 2004].

Le diabète est une maladie courante dont la fréquence augmente à une vitesse alarmante partout dans le monde. En 1985, le nombre de diabétiques dans le monde était estimé à 30 millions. En 1995, il était monté à 135 millions. En 2000, on recensait 171 millions de diabétiques dans le monde. L'évolution prévue est de 324 millions en 2025 et 366 millions en 2030 [Simon et al., 2005 ; OMS et FID, 2004].

En 1998 ; le nombre de diabétiques en Algérie était estimé à plus de 3 millions dont 25% ignorent leur maladie. Dans la Wilaya de Tlemcen, des données statistiques déclarées en l'an 2000 par l'association d'aide aux diabétiques de la Wilaya de Tlemcen, révèle qu'il y a environ 18272 cas de diabète dans la Wilaya [Association d'aide aux diabétiques Tlemcen, 2000].

Une nouvelle classification du diabète a été proposée par l'American Diabetes Association (ADA) en 1997 [The expert Committee..., 1997].

Cette classification différencie quatre grands types de diabète :

- **Diabète de type 1 (ex-insulino-dépendant)** : est caractérisé par une destruction des cellules β . Il aboutit à une déficience absolue en insuline. Il en existe deux formes: une forme auto-immune, la plus fréquente, dans laquelle une immunité cellulaire anormale détruit les cellules β , et une forme idiopathique, plus rare;
- **Diabète de type 2 (ex-non-insulino-dépendant)** : est caractérisé par la combinaison d'une résistance à l'insuline et d'un déficit généralement plus relatif qu'absolu de la sécrétion insulinaire. Les sujets diabétiques de type 2 forment donc un groupe hétérogène, avec aux deux extrêmes des patients massivement insulino-résistants (avec peu de déficit sécrétoire) et des sujets insulino-requérants (avec insulino-résistance relative);

- *Autres types de diabète spécifiques (ex-secondaires)* : Il s'agit d'un ensemble hétérogène d'affections du pancréas exocrine, d'endocrinopathies, de diabètes médicamenteux ou chimiques, et d'affections génétiques, en particulier au niveau de la cellule β (diabète MODY [Maturity Onset Diabetes of the Young] et diabète mitochondrial) [Buyschaert et Hermans, 1998];
- *Diabètes gestationnel* : cette forme de diabète est généralement transitoire et disparaît dans les semaines suivant l'accouchement. Les femmes qui ont souffert du diabète gestationnel risquent davantage de développer un diabète type 2 par la suite [Naylor et al., 1997].

Le diabète type2 est une maladie multifactorielle : concourent à son développement et à son évolution, des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux qui affectent l'insulinosécrétion et l'action de l'insuline [Guillausseau et al., 1997].

Le gain de poids et la localisation abdominale de la graisse sont des facteurs de risque majeur de diabète type2 [Fumeron, 2005].

D'autre part, la consommation de certains aliments (tout particulièrement les graisses et les sucres raffinés) a été associée à un risque plus élevé de présenter un diabète [Feskens et al., 1991].

Il a été constaté que la prise de certains médicaments et l'utilisation de certains agents chimiques a un effet nocif sur le métabolisme du glucose (les corticoïdes, les diurétiques (furosémide, métalazone, thiazide), les contraceptifs oraux, les glucocorticoïdes, la prolactine, les inhibiteurs des récepteurs b-adrénergiques et la phénytoïne) [NDDG, 1979].

D'autre médicaments sont considérés comme toxiques pour les cellules β pancréatiques : (streptozotocine, l'alloxane, les quinoléines, la pentamidine et les produits N-nitrosés) [Golay, 1994].

Quelque soit la population étudiée, la prévalence du diabète de type 2 augmente avec l'âge [French et al., 1990 ; Gourdy et al., 2001], et diminue après l'âge de 85 ans [Dornan, 1994].

La différence entre les taux de diabète sucré diagnostiqué chez les hommes et les femmes peut s'expliquer par la différence de fréquentation des établissements de soins de santé par les

deux sexes. Toutefois, le sexe comme tel n'est pas considéré comme un facteur de risque pour le diabète de type 2 [**Barceló, 1996**].

Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par deux types d'anomalies: des altérations de l'insulinosecrétion et des anomalies des effets de l'insuline sur ses tissus cibles : insulinosensibilité (insulinorésistance) [**Guillausseau et al., 1997**].

Le syndrome métabolique se traduit biologiquement soit par une hyperinsulinémie et une altération de la tolérance au glucose, soit une évolution par un diabète de type 2 lorsque les capacités sécrétoires du pancréas sont dépassées. Il concerne en premier lieu le foie et les muscles ; plus récemment, les tissus adipeux. De même, la résistance de la cellule β pancréatique entraîne une altération de la sécrétion d'insuline qui précipite l'évolution vers l'hyperglycémie chronique [**Bastard et al., 2001**].

Elle se traduit au niveau hépatique par une augmentation de la production hépatique de glucose, directement corrélée au degré d'hyperglycémie observée à jeun, et au niveau des tissus insulinosensibles, tout particulièrement le muscle, par une diminution de l'utilisation périphérique du glucose en période postprandiale [**Dinneen et al., 1992; Martin et al., 1992**].

Le traitement antidiabétique oral s'articule actuellement autour de 4 classes thérapeutiques, dirigé contre 3 cibles physiopathologiques différentes :

- Une stimulation de l'insulino-sécrétion par les sulfamides hypoglycémiantes ;
- Une diminution de l'insulino-résistance par les Biguanides et les Thiazolidinediones ;
- Un ralentissement de l'absorption intestinale du glucose par les inhibiteurs des alpha Glucosidases [**Charbonnel et Cariou, 1997**].

Les complications du diabète sont importantes et sont de deux types : des complications aiguës qui sont très répandues chez le diabète de type 1 et d'autres chroniques qui se trouvent surtout chez les diabétiques de type 2 (**tableau 01**).

Tableau 01: Complications du diabète [Capet et al, 1999].

Complications aiguës	<ul style="list-style-type: none"> • Hypoglycémie (suite au traitement) • Hyperglycémie 	acidocétose coma hyperosmolaire acidose lactique
Complications chroniques	<ul style="list-style-type: none"> • Microvasculaires (microangiopathie) • Macrovasculaires (macroangiopathie) 	rétinopathie néphropathie neuropathie cardio vasculaire

Ainsi, étant donné le nombre croissant de diabétiques de type 2, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques ou l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques s'est intensifiée ces dernières années. Les plantes peuvent fournir la source pour de nouveaux médicaments antidiabétiques, et des centaines de plantes ont été citées dans le traitement traditionnel du diabète [Bailey et Day, 1989 ; Ivorra et al., 1989].

II. Plantes antidiabétiques

Plus 1123 espèces de plantes recensées par les ethnopharmacologues, sont expérimentées contre le diabète de type 2. Ces plantes représentent 725 genres et 183 familles. 81% de ces plantes testées sur les animaux de laboratoire montrent une réduction de l'hyperglycémie [Marles et Farnsworth, 1996].

Ces plantes, recensées, sont généralement présentées dans des tableaux qui résume le nom scientifique de la plante, la famille, les noms vernaculaires courants utilisés dans la région étudiée, la partie utilisée (plante entière, partie aérienne, tige, racines feuilles, fruits,...), parfois le principe actif (alcaloïdes, glycosides, saponosides, flavonoïdes,...) , les méthodes de préparation traditionnelle (infusion, décoction, macération,...), les animaux utilisés pour les tests (rats, souris, lapin, chien, chat,...), voie d'administration (orale, intra-péritonéale i.p, intra-vineuse i.v, sous cutanée S.c, ...) type de diabète et agent diabétogène (alloxane, Streptozotocine,...), nombre de citation et référence bibliographiques, ... [Azzi, 2007].

Le tableau suivant résume quelques études ethnobotaniques sur les plantes antidiabétiques dans différentes régions du monde.

Synthèse bibliographique

Tableau 02 : Résultats de quelques études ethnobotaniques sur les plantes antidiabétiques dans différentes régions du monde [Azzi, 2007].

Pays (régions)	Nombre d'espèce	Référence
Algérie (région de Tlemcen)	80	[Benmehdi, 2000]
Algérie (région Ouest Algérien)	56	[Allali et al. 2008]
Maroc	94 espèces pour 38 familles	[Bnouham et al, 2002]
Maroc (région de Fez-Boulemane : Nord Centre)	54	[Jouad et al, 2001]
Israël, Golan et Palestine	26	[Said et al, 2002]
Afrique du Sud (région d'Eastern Cape Province)	14 espèces pour 6 familles	[Erasto et al, 2005]
Canada (Québec)	18 espèces pour 9 familles	[Leduc et al, 2006]
Mexique	269	[Hernandez-Galicia et al, 2002]
Inde	48	[Satyavati et al, 1989]
Inde	800	[Grover et al, 2002]
Inde (région de Sikkim et Darjeeling Himalayan)	37 espèces pour 28 familles	[Chherti et al, 2005]
Chine	20	[Dharmananda, 2003]
le monde entier	53	[Bailey et Day, 1989]
le monde entier	389	[Padavala et al, 2006]

Bnouham et al, en 2006, ont regroupé dans leur synthèse bibliographique l'ensemble des plantes antidiabétiques étudiées et reportées dans la littérature entre 1990 et 2000. Ils ont recensé 176 espèces plantes intégrées dans 84 familles à pouvoir antidiabétique clair [Bnouham et al., en 2006].

Cependant, juste une minorité de ces plantes connaissent une évolution scientifique, citons essentiellement, *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus*, *Trigonella foenum-graecum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, et autres [Al- Achi, 2005]. Ce qui est remarquable, c'est l'existence de plusieurs composés d'origine végétale, semblent donner cet effet bénéfique. Leur nature différente les fait agir à différents sites.

III. Toxicité des plantes antidiabétiques

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves voire mortels [Fournier, 2001].

Les plantes sont à l'origine de 5% des intoxications signalées au CAP (Centre Anti Poison) de Strasbourg et 3,2% des intoxications selon l'Association Américaine des Centres Anti Poison [Patrick, 2003 ; Fleisch, 2005]. Parmi l'ensemble des plantes réputées toxiques, certaines présentent un danger réel en cas d'ingestion alors que d'autres ne provoquent que des troubles mineurs, principalement digestifs. Tous les organes de la plante contiennent les principes toxiques, mais surtout les racines et les graines, renferment des alcaloïdes diterpéniques dont le principal est l'aconitine qui a une toxicité principalement neurologique et cardiaque [Fleisch, 2005].

Les plantes toxiques peuvent entraîner plusieurs syndromes associés, mais un appareil peut prédominer [Bedry et al., 1999].

Les plantes antidiabétiques peuvent entraîner une chute trop brutale de la glycémie avec malaise hypoglycémique, voire coma, au même titre que l'insuline ou les autres médicaments hypoglycémisants, surtout si ces plantes sont associées à un traitement déjà existant et qui équilibrait le diabète.

Par ailleurs, la recherche d'un traitement bon marché amène parfois des malades du diabète à utiliser un peu n'importe quelle plante, certaines peuvent être antidiabétiques mais à des doses qui les rendent toxiques, d'autres sont trop dangereuses pour un usage antidiabétique [Hurt J M; 2003].

De nombreuses plantes sont utilisées à tort depuis des générations. Le "sorossi" *Momordica charantia* est hypoglycémiant, il est utilisé comme antidiabétique mais aussi comme fébrifuge en tisane. Une hypoglycémie sévère suivie d'un coma chez des jeunes enfants qui avaient bu à jeun une tisane de feuille de cette plante a été décrits par le service de réanimation de Cayenne [Hulin et al., 1988].

IV. Généralités sur le principe actif

Parmi les nombreuses substances contenues dans un végétal, certaines plus que d'autres possèdent des propriétés pharmacologiques, on les appelle principes actifs. Ceux-ci sont de nature variée; on les distingue soit par leurs effets sur l'homme (propriétés pharmaceutiques), soit par leur nature chimique (propriétés phytochimiques). Si sa présence ne préjuge pas obligatoirement d'une intoxication [**Dauvin, 2009**].

❖ Variabilité de l'effet pharmacologique

L'identification d'un principe actif dans une plante n'est pas synonyme de toxicité grave et constante. Pour expliquer cela, on tiendra compte de quelques facteurs:

a) Le principe actif lui-même :

- Nature: propriétés toxiques, bénéfiques, voire neutres ;
- Concentration dans la plante: varie d'un organe à l'autre, mais aussi selon le sol, l'ensoleillement, la saison, certains principes actifs disparaissent à maturité du fruit, comme c'est le cas dans la tomate, ce qui permet sa consommation ;
- Dénaturation: la chaleur, la cuisson peuvent inactiver certains toxiques [**Dauvin, 2009**].

b) L'absorption:

L'absorption du principe actif peut être freinée par le contenu du tube digestif. Certains principes actifs présents dans la plante ne sont pas absorbés s'ils ne sont pas rendus disponibles par une mastication préalable. C'est le cas de l'if, dont la graine toxique passe le tube digestif sans montrer aucun effet nocif si elle n'est pas d'abord broyée. [**Dauvin, 2009**].

c) La susceptibilité individuelle:

Multifactorielle, elle dépend de l'âge, du poids, de plus, une réelle sensibilité ou résistance individuelle est à prendre en compte, mais non mesurable [**Dauvin, 2009**].

❖ **Réflexion sur la notion de toxicité**

La toxicité est définie comme la capacité d'une substance, ici d'un végétal, à nuire à un organisme vivant [Dauvin, 2009].

❖ **Principaux composés actifs**

• Alcaloïdes :

Substances naturelles organiques, comptant plusieurs milliers de molécules, ayant pour point commun une structure azotée. D'origine végétale et généralement douées de propriétés pharmacologiques remarquables, toxiques ou thérapeutiques diverses. Plantes riches en alcaloïdes: colchicine, éphédrine, morphine, nicotine, cocaïne [Dauvin, 2009].

• Hétérosides :

Substances naturelles organiques, caractérisées par l'association d'un ose et d'une molécule non osidique. Ils possèdent des propriétés pharmacologiques marquées. On distinguera selon la principale propriété les hétérosides cardiotoniques, cyanogéniques et anthracéniques [Dauvin, 2009].

• Saponosides :

Ils possèdent, comme leur nom l'indique, les propriétés tensio-actives du savon. En contact avec de l'eau, ils forment une solution moussante. Les plantes qui les contiennent ont d'ailleurs souvent été utilisées comme savon. Ingérées, elles auront une action irritante sur la muqueuse digestive [Dauvin, 2009].

• Composés phénoliques :

Ce sont des alcools aromatiques d'origine végétale. Dérivés non azotés caractérisés par une composition chimique incluant au moins un groupement hydroxyle et un noyau aromatique [Dauvin, 2009].

• Huile essentielle :

Produit odorant extrait des plantes, mélange complexe et variable renfermant de multiples composés, principalement des terpènes [Dauvin, 2009].

- Terpènes :

Hydrocarbures produits par de très nombreuses plantes, caractérisés par leur pouvoir odoriférant. Mais certains terpènes contenus dans les huiles essentielles leur confèrent des propriétés neurotoxiques, d'autres sont très allergisants [Dauvin, 2009].

- Tanins :

Substances contenues dans de très nombreux végétaux, notamment les écorces et les bois, les racines et les feuilles, les pépins du raisin. Utilisées autrefois pour tanner les peaux, c'est-à-dire pour les rendre souples et imputrescibles. Il existe de nombreux tanins. Ce sont eux qui sont responsables du caractère astringent de certains végétaux [Dauvin, 2009].

Afin de garantir l'innocuité des produits destinés à l'homme dans les conditions d'emploi prévue, des études toxicologiques doivent être réalisées. Ces études évaluent l'ensemble des risques et permettant de statuer sur :

- La toxicité aigue
- La toxicité sub-aiguë et toxicité chronique [Montgomery, 1990].

V. Notions de toxicologie

1. Comment évaluer un effet toxique ?

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives (non mesurables) ou quantitatives (mesurables) adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui nous permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer dans quatre catégories:

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas;
- les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (ex. : lapin, rat et souris);
- les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules; et
- les études théoriques par modélisation (ex. : structure-activité) [CSST, 2004].

2. Etude de la toxicité aigue (Détermination de la dose létale DL₁₀₀, DL₅₀):

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL₅₀). Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de

comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Elle sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances [CSST, 2004].

➤ Détermination de la dose létale DL_{100} , DL_{50}

- La dose létale DL_{100} : C'est la dose qui entraîne la mort de la population des animaux d'essais. La DL_{100} est un indice de létalité qui mène à mentionner le degré de toxicité d'un produit chimique donné [Bonvalot, 2002].

- La dose létale DL_{50} : La dose létale médiane c'est la valeur statistique de la dose d'une substance chimique qui provoque la mort de 50% des organismes d'une population donnée dans des conditions expérimentales définies [Laigneau, 2000].

La DL_{50} est la quantité d'une matière administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50% (la moitié d'un groupe) d'animaux d'essais traités dans un temps déterminé, 7 à 14 jours. La DL_{50} est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aigue) d'une matière [Wepierre, 1977].

➤ Etudes expérimentales

- a. Espèces animales : Certains organismes de réglementation préconisent l'utilisation d'au moins deux espèces animales, dont l'une appartenant aux rongeurs.

- b. Sexe des animaux : Pour au moins une des espèces, il est préférable d'avoir des animaux des deux sexes.

- c. Nombre d'animaux : Dans le cas des rongeurs, chaque groupe doit comprendre au moins cinq animaux par sexe. Pour les autres espèces, chaque groupe doit comprendre au moins deux mâles et deux femelles.

- d. Voie d'administration : D'ordinaire, la voie orale suffit étant donné qu'il s'agit de la voie normale d'administration. Toutefois, certains organismes de réglementation préconisent en outre la voie parentérale. Dans les cas où la voie parentérale a été retenue pour l'homme, il suffira d'utiliser cette voie pour les essais chez l'animal.

- e. Niveaux de dose : Un nombre suffisant de niveaux différents de dose doivent être utilisés chez les rongeurs pour déterminer la dose létale approximative. Chez les non-

rongeurs, des niveaux suffisamment élevés doivent être utilisés pour permettre l'observation de signes manifestes de toxicité.

f. Fréquence : La substance expérimentale doit être administrée en une ou plusieurs fois sur une période de 24 heures.

g. Observation : Les signes de toxicité, leur sévérité, apparition, progression et réversibilité doivent être observés et notés en fonction de la posologie et du moment. En règle générale, il convient d'observer les animaux pendant 7 à 14 jours au moins.

Les animaux morts pendant la période d'observation ainsi que les rongeurs survivants à la période d'observation doivent être autopsiés. Au besoin, on procédera à un examen histopathologique des organes ou tissus présentant des changements macroscopiques à l'autopsie [OMS, 2000].

3. Etude de la toxicité sub-aiguë et toxicité chronique :

- Toxicité sub-aiguë : Elle consiste à étudier les conséquences néfastes de l'administration répétée du produit étudié. Le produit est administré quotidiennement, une ou deux fois par jour, pendant une durée de 90 jours en général [Laroche, 2001 ; Montgomery, 1990].

- Toxicité chronique : Elle permet de caractériser le profil toxicologique d'une substance chez le rat, à la suite d'une exposition répétée et prolonger au-delà de 90 jours. Dans ce cas, le produit est administré quotidiennement, une à deux fois par jour pendant 18 à 24 mois. Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé pour la toxicité sub-aiguë, sauf que la période est plus longue [Laroche, 2001].

- Etudes expérimentales

- a. Espèces animales : Nombre d'organismes de réglementation préconisent l'utilisation d'au moins deux espèces animales, dont l'une appartenant aux rongeurs.

- b. Sexe des animaux : D'ordinaire, il convient d'utiliser autant de mâles que de femelles.

- c. Nombre d'animaux : Dans le cas des rongeurs, chaque groupe doit comprendre au moins dix animaux par sexe. Pour les autres espèces, chaque groupe doit comprendre au

moins trois mâles et trois femelles. Si des essais intermédiaires sont prévus, le nombre d'animaux doit être augmenté en conséquence.

d. Voie d'administration : D'ordinaire, il faut utiliser la voie d'administration clinique prévue.

e. Durée du traitement : La durée d'administration de la substance expérimentale dépendra de la durée d'utilisation clinique prévue.

En principe, la substance expérimentale doit être administrée tous les jours de la semaine. La durée d'administration de l'étude doit être inscrite au regard de chaque résultat.

f. Niveaux de dose : Il faut prévoir des groupes pour au moins trois niveaux de dose différents.

Un niveau ne doit pas causer d'effets toxicologiques (dose sans effet) et un autre doit produire des effets toxicologiques manifestes. Dans cette fourchette, l'adjonction d'au moins un autre niveau de dose augmente la possibilité d'observer une relation dose-réaction. Toutes les études doivent inclure un groupe témoin d'animaux d'expérience chez lequel on n'administre que le véhicule.

g. Observations et examens : Les points 1 à 6 ci-dessous doivent faire l'objet d'observations et d'examens:

1. Signes généraux, poids corporel et quantité de nourriture et d'eau absorbée : Les signes généraux des animaux d'expérience doivent être observés tous les jours; le poids corporel et la quantité de nourriture absorbée doivent être calculés périodiquement. Si cela s'avère utile, il faudra aussi mesurer la quantité d'eau absorbée.

2. Examen hématologique : Les échantillons de sang doivent être prélevés chez les rongeurs avant l'autopsie. Pour les autres animaux, les échantillons sanguins doivent être prélevés avant l'administration du médicament, au moins une fois pendant la période d'administration (pour les études qui durent plus d'un mois), et avant l'autopsie.

Il est souhaitable pour les examens hématologiques et de biochimie sanguine d'inclure autant de paramètres que possible.

3. Examen des fonctions rénales et hépatiques : Le foie et les reins, organes qui régissent d'ordinaire le métabolisme et l'excrétion, sont particulièrement sensibles aux agents toxiques potentiels; leur fonction doit donc être surveillée dans les études toxicologiques de longue durée.

Il convient de sélectionner parmi les rongeurs un nombre fixe d'animaux dans chaque groupe chez lesquels on fera un examen des urines avant l'administration du médicament et ensuite au moins une fois pendant la période d'administration.

4. Autres explorations fonctionnelles : Il convient, selon le cas, d'effectuer un électrocardiogramme et des examens de la vue et de l'ouïe (audition). Chez les rongeurs, il faut procéder à des examens ophtalmologiques d'un nombre fixe d'animaux de chaque groupe au moins une fois pendant la période d'administration; pour les autres animaux, l'examen doit se faire sur tous les animaux avant de commencer à administrer le médicament et ensuite au moins une fois pendant la période d'administration.

5. Animaux morts : Tous les animaux morts doivent être autopsiés le plus rapidement possible. Les organes et tissus doivent être soumis à un examen macroscopique. En outre, dans la mesure du possible, il convient de peser les organes et effectuer des examens histopathologiques pour essayer d'identifier la cause de la mort et la nature (sévérité ou degré) des effets toxiques présents.

6. Animaux moribonds : Afin de maximiser la quantité d'informations utiles que l'on peut obtenir pendant la période d'administration, il faut sacrifier tous les animaux moribonds plutôt que de les laisser mourir. Il faudra auparavant noter les observations cliniques et prélever des échantillons sanguins pour des analyses hématologiques et de biochimie sanguine. A l'autopsie, il faudra procéder à l'examen macroscopique des organes et des tissus, peser les organes et enregistrer les données. On procédera à un examen histopathologique complet pour essayer de caractériser la nature (sévérité ou degré) de tous les effets toxiques.

Tous les animaux survivants doivent être autopsiés à la fin de la période d'administration du médicament ou après disparition des effets toxiques.

h. Disparition des effets toxiques : Pour étudier la disparition des effets toxiques, il faut examiner les animaux que l'on laisse vivre pendant plus ou moins longtemps après avoir cessé de leur administrer la substance expérimentale [OMS, 2000].

La majorité des études pharmacologiques commencent par une étude toxicologique descriptive chez l'animal et par des observations cliniques chez l'humain. Idéalement les études animales devraient comporter des observations chimiques et comportementales. Le plus souvent, les analyses portent sur l'urine et le sang [Liston, 1991 ; RDM, 1990 ; Berthiaum, 1995].

4. Dosage des paramètres biochimiques

1-Glycémie :

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique, soit une glycémie supérieure à 1,26g/l (7mmol/l) à deux reprises. Cette définition est fondée sur le seuil glycémique à risque de microangiopathie, en particulier à risque de rétinopathie [Sachon et al, 2004].

Le dosage du glucose sérique est basé sur une technique enzymatique colorimétrique par la méthode de Trinder (1969). Le D-glucose est transformé par la glucose oxydase en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène lequel oxyde, en présence de la peroxydase, le phénol en un complexe chromogène coloré en rouge dont l'absorbance est mesurée à 505 nm [Trinder, 1969].

GOD



GOD: glucose oxydase

POD



POD: peroxydase

3-L'hémoglobine glyquée (HbA1c)

Un peu de recul, après les émotions suscitées par une lecture trop rapide des dernières études, permet de cerner les questions qui se posent encore quant à l'intérêt et aux limites de l'HbA1c dans la surveillance de l'équilibre glycémique des diabétiques [Cugnet-Anceau, Bauduceau, 2008 ; Ray et al., 2009]. Une discussion est également ouverte quant à sa place dans le diagnostic du diabète de type 2 [Selvin et al., 2010].

Il est indiqué pour la surveillance des traitements antidiabétiques. Sa valeur est proportionnelle à la concentration moyenne du glucose plasmatique. Il est dosé par une chromatographie échangeuse d'ions. Chez un diabétique le taux de doit être poche de 6%. Une augmentation de 0,3g/l de la glycémie donne une hausse de 1% de l'hémoglobine glyquée [Jacques, 2008].

4-Cholestérol total

Le cholestérol est déterminé suivant une méthode enzymatique colorimétrique décrite par [Trinder, 1969]. Après hydrolyse enzymatique puis oxydation, l'indicateur quinoneimine formé à partir du peroxyde d'hydrogène et de l' amino 4 antipyrine en présence du phénol et de peroxydase permet la quantification du cholestérol selon les réactions suivantes :

Cholestérol estérase



Cholesterol oxydase



L'intensité de la coloration de la quinoneimine mesurée à 500 nm, proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon du sérum.

5-Triglycérides

Le dosage des triglycérides a été effectué suivant une méthode enzymatique colorimétrique [Young et pestaner, 1975; Fossati et Prencipe, 1982] quantifiant le glycérol libéré après action de la lipase selon les réactions suivantes.

Lipoprotéine lipase



Glycerol Kinase, Mg⁺⁺

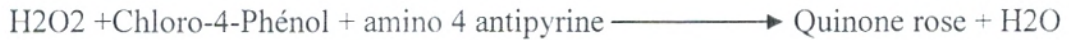


Glycerol 3 phosphate

oxydase



Peroxydase



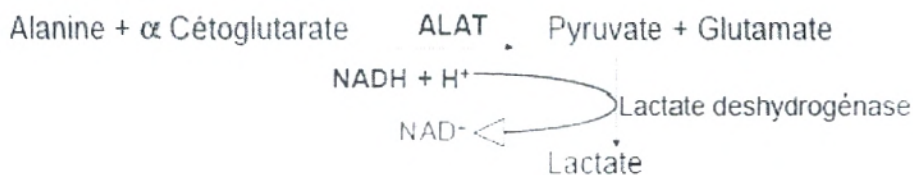
L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm est proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans l'échantillon du sérum.

5. Examens plasmatiques liés à la fonction hépatique

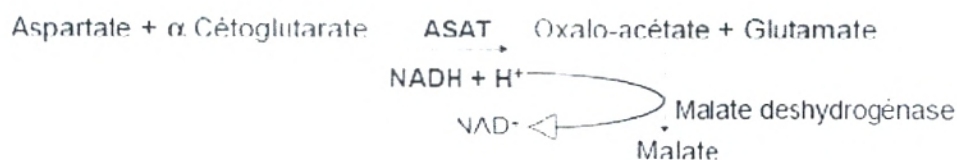
Transaminases :

Les transaminases permettent le transfert du groupement aminé d'un acide aminé sur un acide a cétonique. L'acide aminé est alors transformé en acide a cétonique correspondant et l'acide a cétonique en acide aminé. Les deux principales réactions de transamination sont catalysées par les transaminases **TGO** (Transaminase Glutamo-oxalo-actétique) ou **ASAT** (ASpartate Amino Transférase) et **TGP** (Transaminase glutamopyruvique) ou **ALAT** (ALanine Amino Transférase) [Valdiguié, 2000].

ALanine Amino Transférase



ASpartate Amino Transférase

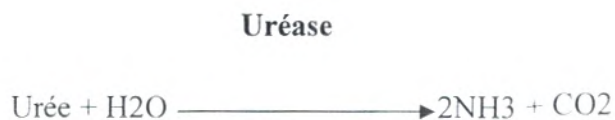


Mesure de la disparition du NADH à 340 nm par spectroscopie UV. [Valdiguié, 2000].

6. Examens plasmatiques liés à la fonction rénale

1-Urée

L'urée est le terme ultime principal du catabolisme protéique chez l'homme. Le dosage de l'urée dans le sang ou azotémie et dans l'urine est le paramètre le plus ancien de la biochimie clinique ; associé aux dosages du glucose, il reste aujourd'hui l'un des plus demandés. [Valdigué, 2000]. Un taux élevé indique généralement une atteinte glomérulaire, mais la concentration peut être aussi modifiée par une alimentation inadéquate ou une hépatotoxicité, fréquente [Frank, 1992]. L'urée est dosée en cinétique par une méthode enzymatique [Berthelot, 1998]. Selon la réaction suivante :



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée, la lecture est effectuée à 630 nm.

2-Créatinine

La créatinine plasmatique et urinaire est le reflet de la masse musculaire globale. Pour un sujet donné, le taux plasmatique et la quantité de créatinine éliminée quotidiennement dans les urines constituent des paramètres biologiques remarquablement fixes. Pour ces raisons, la valeur de la clairance de la créatinine revêt une signification sémiologique fondamentale lors de l'étude d'une insuffisance rénale [Valdigué, 2000].

La créatinine est strictement éliminée par les reins. Son dosage est employé dans l'évaluation de la fonction rénale et plus particulièrement dans l'estimation du débit de filtration glomérulaire [Charriere et al, 2008].

Après défécation à l'acide trichloracétique, on utilise la réaction de Jaffé. La créatinine au contact d'un picrate alcalin donne une coloration orange. La créatine ne donnant pas cette réaction, la créatinine préformée est dosée seule. La lecture est effectuée à 510 nm [Valdigué, 2000].



7. Examens des urines

1-Protéinurie

En raison de leur taille, seulement une faible partie des protéines de faible poids moléculaire passe le filtre glomérulaire. Ces protéines sont facilement réabsorbées par les tubules proximaux et leur présence en grande quantité dans l'urine est une indication de la perte de la fonction de réabsorption tubulaire. Par contre, l'excrétion de protéines de poids moléculaire élevée indique une perte de l'intégrité des glomérules [Frank, 1992].

2-Glycosurie

Le glucose présent dans le filtrat glomérulaire est totalement réabsorbé dans les tubules. La glycosurie en l'absence d'hyperglycémie indique une déficience tubulaire [Frank, 1992].

3-Corps cétonique

La présence de cétonurie signe une carence insulinique très profonde, elle doit donc être recherchée chez tout diabétique de type 2 en cas de fortes poussées hyper glycémique, de perte de poids rapide, ou de symptomatologie clinique tapageuse. [Halimi, 2003]. La β -hydroxybutyrate deshydrogénase transforme le β -hydroxybutyrate en acétoacétate en présence de NAD. L'absorption du NADH produit est mesurée à 340 nm [Williamson et al., 1962].

8. Examens hématologiques

1-Numération- Formule

L'étude des paramètres hématologiques n'est pas pertinente pour le diagnostic d'une intoxication. On peut observer, comme lors de nombreuses affections, des modifications de la formule sanguine avec, notamment et une leucocytose modérée [Giles, 1983].

2-Tests de coagulation

Le foie est le lieu de synthèse de nombreux facteurs de la coagulation. Toute perturbation de la fonction hépatique peut donc entraîner des modifications de la coagulation. Des troubles de celle-ci, avec apparition de céphalgie et d'autres symptômes apparaissent en phase terminale de l'intoxication [Mc Gorum et al, 1999].

3-Vitesse de sédimentation (VS)

Les valeurs normales de la vitesse de sédimentation sont de 3 à 10 mm la première heure. La VS varie chaque fois qu'un déséquilibre humoral concerne les protéines plasmatiques, elle s'accélère quand augmente la proportion de fibrinogène (qui recouvre les hématies et les fait adhérer les unes aux autres en formant des rouleaux) ou la proportion de globulines [Balcells, 1993].

4-Hémoglobine

La majorité des hémoglobines anormales ont une charge électrique différente de l'hémoglobine normale : les acides aminés de la globine situés à l'extérieur sont hydrophiles et chargés électriquement ; en les soumettant à une charge électrophorétique, on peut les détecter grâce à leur migration différente. La migration se fait sur un acétate de cellulose à pH alcalin ; après coloration les hémoglobines sont dosées par densitométrie optique [Jacques, 2008].

9. Examens histopathologiques :

Les modifications pondérales de l'organe, suggèrent souvent des lésions rénales. De nombreuses autres lésions pathologiques peuvent être détectées à l'examen macroscopique. Les examens histopathologiques peuvent révéler le site, l'étendue et l'apparence morphologique des lésions rénales. Et la même chose pour le foie [Frank, 1992].

VI. La coloquinte (*Citrullus colocynthis*) et leurs effets thérapeutiques

La coloquinte est une Cucurbitacée d'origine tropicale, qu'on trouve à l'état sauvage tout autour du bassin méditerranéen. La plante a le port rampant d'un concombre, ses fleurs sont jaunes et dioïques comme il est de règle dans toute la famille, et elles sont suivies de fruits globuleux, de taille très variable, généralement jaune vif, charnus et d'une amertume épouvantable [Ben Salah et al, 1986].

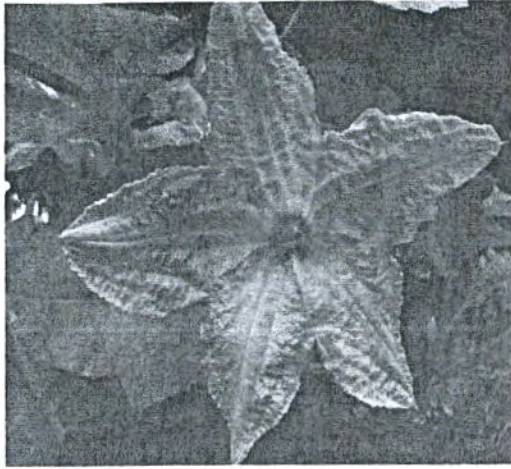


Figure 1 : la fleur de *Citrullus colcyntis*



Figure 2 : le fruit de *Citrullus colcyntis*

En médecine populaire, la coloquinte est utilisée selon plusieurs modes, contre en application locale soit seule, soit associée à des feuilles de tabac ; les feuilles sont utilisées contre l'hémorragie. Elles sont prescrites pour soulager les douleurs des membres inférieurs, le dos et les articulations [Banarjee et al, 1967].

La coloquinte comme plante médicinale, possède plusieurs actions thérapeutiques [Yanif et al, 1999], de plus elle possède une activité purgatives, anti-tumorale [Abdel-Hassen et al, 2000 ; Al- Yahya et al, 2000 ; Ziyat et al, 1997 ; Darwish et al, 1973], anti-inflammatoire [Al Ghaithi et al, 2004 ; Barth et al ; 2002], anti-rhumatismal [Boukef et al, 1986], laxative [Ziyat et al, 1997 ; Al Faraj, 1995] et contre les troubles urogénitaux, la leucémie, l'ictère, la fièvre, les désordres biliaires, les hémorroïdes,... [Duke, 1978 ; Ziyat et al, 1997].

L'extrait éthanolique du fruit de la coloquinte exerce un effet antimicrobien sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermis* [Al Kofahi et al, 1996].

Les racines sont employées dans le traitement de l'ictère, les maladies urinaires, le rhumatisme et l'inflammation. L'huile extraite à partir des graines est employée pour traiter des morsures (de serpent, de scorpion), épilepsie, pour favoriser la croissance de cheveux et pour noircir les cheveux gris [Nadkarni, 1998].

Les feuilles sont employées pour le traitement de l'ictère et l'asthme [Kirtikar et al, 1984 ; Baquare et al, 1984].

La coloquinte est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré, par plusieurs modes d'utilisation [Lev et al, 2002 ; Said et al, 2002], pieds

trompés pendant 1 h dans le décocté de fruit frais coupé en tranche ; consommation de la poudre de l'épicarpe séché et mélangé avec les aliments, utilisation sublinguale de 1 à 2 graines séchées par jour et rarement prise orale de l'infusion de fruit [Jouad et al, 2001 ; Merzouki, 2000].

Le fruit de la coloquinte est riche en alcaloïdes. Deux alcaloïdes sont déterminés dans tous les organes de la plante ($C_{10}H_{15}O_3$ et $C_{16}H_{24}O_3$), alors qu'un troisième alcaloïde ($C_{20}H_{36}O_6$) est présent au niveau des graines, pulpes, feuilles et racines [Afifi et al, 1973].

Citrullus colocynthis renferme divers glycosides : Le colocynthin ($C_{56}H_{34}O_{23}$), qui est responsable de l'amertume et des propriétés médicinales de la pulpe [John et al, 1998]. Ces glycosides se trouvent en grande quantité (0,22%) dans la pulpe. Les graines, les tiges et les feuilles renferment des taux respectifs de l'ordre de 0,18%, 0,17%, 0,15% [Darwish et al, 1974]. C'est β -cistosol-D-glucoside qui est reconnu essentiellement par son effet antidiabétique, alors que les cucurbitacées A et B, sont responsables de l'activité anticancéreuse et insectifuge [Duke, 2002].

Une enquête ethnobotanique effectuée par Benmehdi en 2000 sur 80 plantes traditionnellement utilisées pour traiter le diabète dans la région de Tlemcen (Algérie), révèle que la coloquinte est la plante la plus utilisée après le fenugrec [Benmehdi, 2000].

D'autres effets hypoglycémiant et antihyperglycémiant ont été recherchés sur des extraits isolés à partir de différentes parties de la coloquinte ; citant :

En 2002, Azzi et Boumellah ont vérifié les effets antidiabétiques des saponosides et des glycosides extraits des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des rats Wistar rendus diabétique par la STZ. Ils ont constaté que l'injection de 20mg/kg p.c des saponosides ou 20 mg/kg p.c des glycosides cucurbitacines extrait chloroformique par voie intrapéritonéale provoquent une diminution significative de la glycémie durant 5 semaines chez les rats diabétiques [Azzi et Boumellah, 2002].

En 2003, Benariba a étudié l'effet antidiabétique d'extait brut aqueux, des saponosides, des flavonoïdes et les acides aminés libres extraits des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*), *in vivo* sur des rats normaux et rendus diabétiques par la STZ (hyperglycémie permanente et hyperglycémie provoquée par voie orale) et *in vitro* sur les îlots de Langerhans isolés du pancréas de rat normal (évaluer l'effet insulinosécrétoire de chaque extrait). Elle a

observé que ces extraits provoquent une diminution significative de l'hyperglycémie 6 heures après leurs injections aux rats diabétiques. De plus ils exercent un effet insulino- sécrétoire sur les îlots de Langerhans isolés [Benariba, 2003].

D'autres travaux ont été réalisés par Nmila et al, en 2000, ont montré l'effet insulino-tropique des extraits de fruits de *Citrullus colocynthis*. Ils ont observé que la perfusion durant 20 min de 0.1 mg/ml d'extrait brut ou d'extrait alcoolique aqueux ou de béta-pyrazol-1-ylalanine, stimule la sécrétion d'insuline dans le pancréas et les îlots de Langerhans isolés des rats, en présence de 8.3 mM du glucose [Nmila et al, 2000].

VII. Toxicité de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*)

Pendant des périodes bibliques, les fruits de la coloquinte ont été recueillis et considérés comme poison mortel [Yanif et al, 1999].

A des doses élevées, cette plante est hautement toxique pour les animaux et les humains. Les signes d'intoxication sont douleurs gastro-intestinales avec diarrhée, vomissement, rétention urinaire, fatigue, hypothermie, désordre cardiaque et congestion cérébrale produisant un effondrement fatal [Charnot, 1945].

La coloquinte renferme 2 principes actifs : la colocynthe et la colocynthine. Cette dernière confère à la plante un effet purgatif extrêmement violent et dangereux, qui provoque généralement des hémorragies intestinales dont l'issue est souvent fatale. L'intérêt de cette plante réside dans les substances pharmaceutiques qu'on a pu en tirer et auxquels on reconnaît un effet hypoglycémiant. Les manifestations cliniques rapportées à l'intoxication par la coloquinte comprennent des vertiges, des épigastalgies, des nausées, des vomissements et une diarrhée [Ben Salah et al, 1986].

2^{ème} Partie :
Partie expérimentale

I- Enquête ethno-botanique

Afin d'étudier l'utilisation des plantes antidiabétiques par la population diabétique de la région de Méchéria, nous avons réalisé un questionnaire au sein de laboratoire d'urgence du grand hôpital de Méchéria wilaya Naâma qui regroupe des informations sur 20 diabétiques questionnés, leur traitements éventuels, complications et surtout le recensement des plantes antidiabétiques utilisés par cette population et leurs modes d'utilisation.

- Enquête effectuée auprès du laboratoire d'urgence du grand hôpital de Méchéria ;
- Durée d'enquête (15 jours) ;
- Nombre des diabétiques questionnés 20.

Ce questionnaire est réalisé en trois parties :

- Des renseignements sur les diabétiques (l'âge, le poids et le sexe);
- L'état clinique des diabétiques (type et complications de diabète) ;
- L'utilisation des plantes antidiabétiques chez la population étudiée (plante utilisée, efficacité et mode d'emploi).

Questionnaire de diabète

Université Abou Bekr Belkaïd

Faculté des sciences

Département de biologie

Laboratoire antibiotique antifongique, Physico-chimique synthèse et activités biologiques

1-Identification

N° :.....

Prénom :.....

Sexe :..... Age :.....Poids :.....

Adresse : Ville :..... Wilaya :.....

2-Information sur diabète

Quelle est la date du diagnostic de diabète :.....

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Type de diabète

- Diabète type 1 Diabète gestationnel
 Diabète type 2 Autres types

Quels traitements suivez-vous ?

- Diététique Insulinothérapie
 Antidiabétiques oraux (précisez la classe utilisée) :.....

Avez-vous souffert de :

- Troubles de la vue Troubles cardiaque et de circulation
 Troubles rénaux Hypertension artérielle

3- Information sur les plantes antidiabétiques

Connaissez- vous des plantes traditionnelles pour le traitement de diabète ?

- Oui Non

Si oui, les quelles ?.....

Utilisez-vous les plantes traditionnelles pour traiter le diabète ?

- Oui Non

Si oui, les quelles ?.....

Pensez-vous que les plantes médicinales sont plus efficaces que les autres traitements commercialisés ?

- Oui Non

Date de questionnaire : réalisé par :

Source d'information :



II- Analyses phytochimiques

1. Matériel végétal

Notre étude a été faite sur les graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) qui sont récoltées à maturité durant le mois de septembre dans la région de Ain-Sefra wilaya de Nâama.

Les fruits sont séchés à l'air et à l'abri de la lumière. Les graines sont isolées après de l'épicarpe et pesées.

Les graines sont broyées en poudre fine à l'aide d'un moulin à café.

2. Dégraissage du matériel végétal

A fin d'éliminer les graisses et d'autres substances lipophiles qui peuvent perturber le processus extractif ultérieur, notamment en induisant la formation d'émulsions. Il a été procédé à une délipidation (dégraissage) préalable des graines de coloquinte broyées, par percolation à l'aide d'un soxhlet.

Pour ce faire, le corps de soxhlet, contenant une cartouche remplie de 100g des graines de coloquinte broyées, est monté sur un ballon rempli par 500 ml d'hexane, est surmonté d'un réfrigérant et l'ensemble est porté à reflux pendant 6 heures à l'aide d'une chauffe ballon avec une température d'ébullition stable.

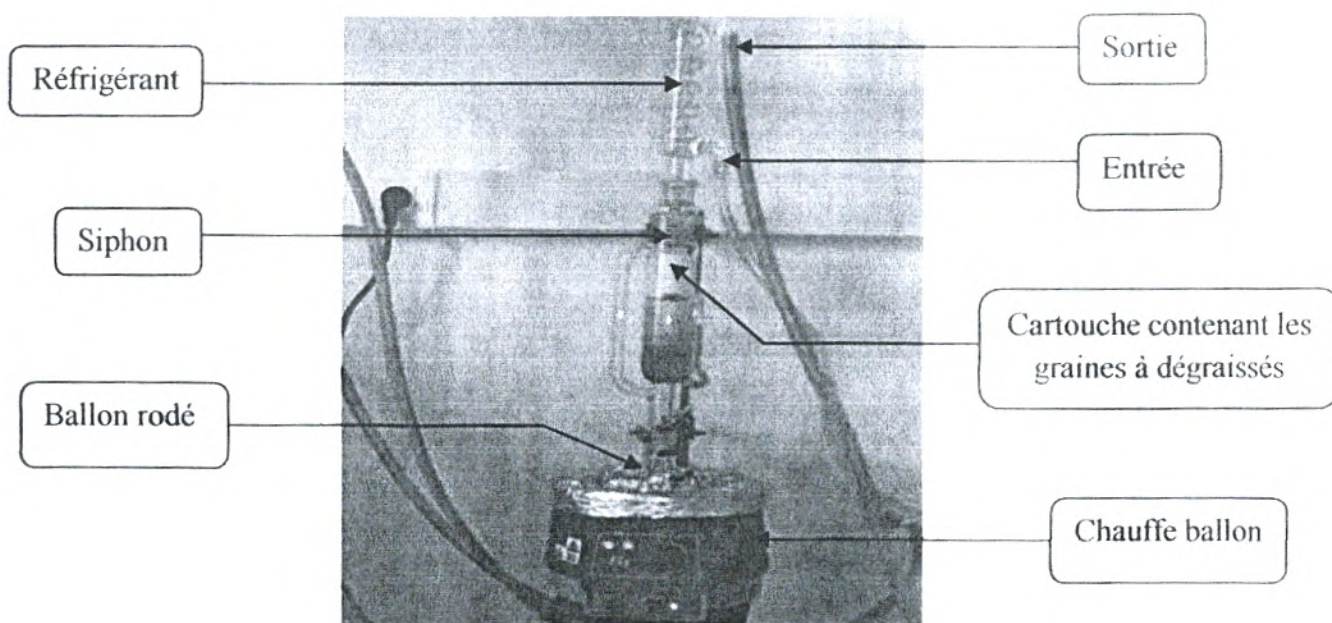


Figure 3 : Dégraissage par l'appareil de soxhlet.

3. Tests phytochimiques

3.1. Préparation d'extraits

- **Macération en milieu acide**

Mélanger 10 g des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) broyées et dégraissées avec 100 ml d'HCl 2% ; laisser macérer pendant 24h à l'abri de la lumière. Après filtration, récupérer le filtrat acide dans un flacon opaque afin de réaliser des tests phytochimiques.

- **Infusion dans l'eau distillée**

Verser 100 ml d'eau distillée bouillante sur 10g de graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) broyées et dégraissées, mélanger bien et laisser le mélange refroidir.

Après filtration, récupérer le filtrat sous forme d'extrait aqueux dans un flacon opaque afin de réaliser des tests phytochimiques.

3.2. Tests phytochimiques :

Préparer 2 séries de tubes en verre ; dans la première verser 1ml de l'extrait de macération en milieu acide dans chaque tube et dans la deuxième verser 1ml de l'extrait d'infusion aqueux dans chaque tube et réaliser les tests suivants :

- **Hétérosides** : Par la réaction de Liebermann Burchardt

5ml de solution à tester sont mélangées avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré y sont ajoutées. L'ensemble est agité et laissé au repos pendant 30 min à température ambiante. Cette réaction donne avec les glycosides stéroïdiques et tritèrpeniques respectivement des colorations vert et vert violet.

- **Alcaloïdes** :

A 0.5 ml de l'extrait, on ajoute 5 ml d'HCL à 1 %, incubation au bain de marie, on divise l'extrait obtenu en trois tubes. On ajoute au 1^{er} le réactif de Mayer, le 2^{ème} réactif de Wagner et le dernier réactif de Dragondroff.

L'apparition d'un précipité blanc, brun et rouge respectivement révèle la présence des alcaloïdes.

- **Tanins :**

A 2 ml d'extrait à tester, on ajoute 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 1%. Après quelques minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée.

- **Flavonoïdes :**

Traiter 5 ml de l'extrait avec quelques gouttes d' HCl concentré. Ajouter quelques milligrammes de tournures de magnésium. La présence des flavones aglycones est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.

4. Extraction des glycosides cucurbitacines

Cette extraction est faite selon la méthode de **Natiq et al., 1989** :

- Extraction sous reflux, pendant 6 heures : 50g des graines de la coloquinte broyées et dégraissées en présence de 150 ml de chloroforme ;
- Filtration du mélange et récupération du filtrat;
- Elimination des traces d'eau qui peuvent refermer le solvant organique par l'addition de Na_2SO_4 ;
- Filtration ;
- Concentration de la phase organique à sec à l'aide d'un rotavapor ;

Les glycosides cucurbitacines (extrait chloroformique) sont obtenus **sous forme un liquide visqueux de couleur marron.**

- Extraction du même marc avec 200 ml d'éthanol 80%, pendant 6 heures ;
- Filtration du mélange et récupération du filtrat;
- Extraction liquide – liquide du filtrat (3 à 4 fois) à l'aide d'une ampoule à décanté avec 50ml d'acétate d'éthyle
- Elimination des traces d'eau qui peuvent refermer le solvant organique décanté par l'addition de Mg SO_4 ;
- Filtration ;
- Concentration de la phase organique à sec à l'aide d'un rotavapor ;

Les glycosides cucurbitacines (extrait éthanolique) sont obtenus sous forme **d'un solide de couleur brun.**

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

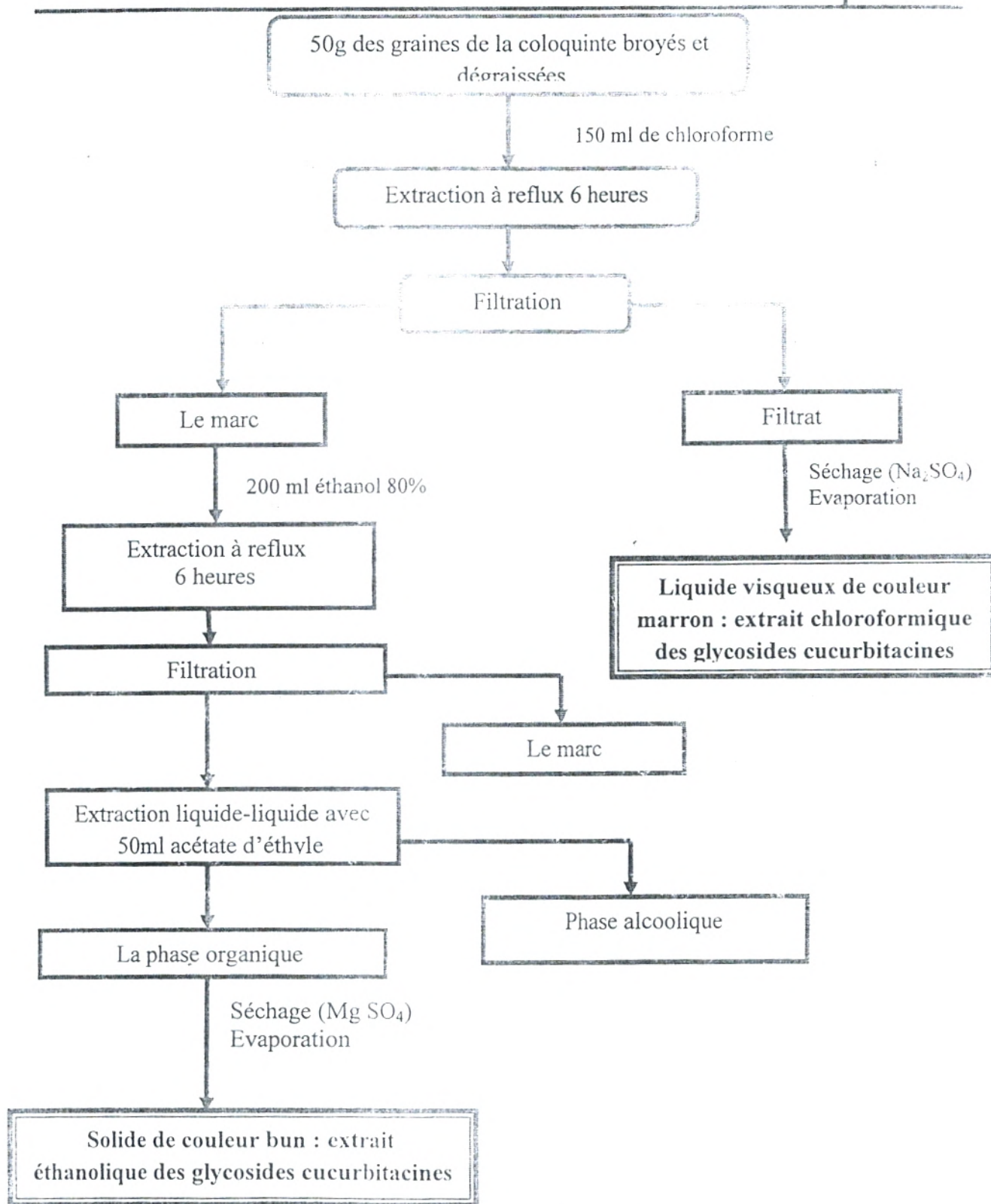


Figure 4 : Diagramme montrant l'extraction des glycosides cucurbitacines selon la méthode de Natiq et al., 1989 .

5. Caractérisation des glycosides

Par la réaction de Liebermann Burchardt (voir tests phytochimiques).

III- Analyses biologiques

Ces tests consistent à la détermination de la toxicité aigue et l'effet hypoglycémiant de l'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) après administration unique par voie intra-péritonéale de différentes doses d'extrait.

Le but recherché est de déterminer la toxicité aigue de cette plante sur des rats femelles Wistar normaux en fonction de la dose de substance administrée. Cette toxicité aigue est matérialisée par la Dose Létale 50 (DL₅₀) qui correspond à la dose qui provoque 50 % de mortalité des rats.

1. Les animaux

Dans cette étude, nous avons travaillé sur des rats albinos (*Rattus norvegicus*) de variété Wistar sexe femelle âgées de 2 à 3 mois ayant un poids variant entre 100 et 280 g.

Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'animalerie de département de Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Algérie.

Les rats sont hébergés dans des cages en plastique et maintenus dans les conditions favorables d'élevage et disposés d'eau du robinet et de nourriture standard, la litière est renouvelée trois fois par semaine.

Les animaux sont nourris avec un aliment complet standard sous forme de granulés. Il est composé de maïs, tourteaux de soja, issus de meunerie, plus un complexe minéralo-vitaminiques (glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse brute 3.4%, cellulose brute 3%, cendres brutes 4.9%, humidité 14%, vitamines 1.7%).

L'eau et l'aliment sont fournis ad libitum.

2. Répartition des rats

Nous avons constitué des lots de 4 à 5 rats femelles dans chaque lot qui doit recevoir une dose unique de l'extrait préparé (**Voir tableau 03**).

3. Préparation des doses à tester

L'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) à tester est préparé par la solubilisation du solide brun des glycosides dans 0,5 ml d'éthanol et 0,5 ml d'acétate d'éthyle et dilué dans de l'eau physiologique jusqu'à le volume voulu.

4. Administration des doses aux différents lots

Les animaux sont privés de nourriture 16 heures avant les tests. Ils sont pesés au moment de l'application de l'extrait et identifiés par une marque au niveau de la queue.

Ensuite, une glycémie basale (T0) est mesurée, pour l'ensemble des rats, à l'aide d'un lecteur du glucose (glucomètre à bandelettes réactives One Touch Ultra).

Les d'extraits des glycosides cucurbiacines des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sont administrés à différentes doses, par voie intra-péritonéale, à raison d'une dose par lot.

Tableau 03 : Détermination des doses létales des glycosides cucurbitacines injectées aux rats par voie intra-péritonéale.

Extrait	N° Lot	Nombre de rats	Poids moyen (g)	Doses injectés en I.P. mg/kg (p.c)
Glycosides cucurbitacines éthanoliques	1	05	206	100
	2	04	147,5	150
	3	04	168,75	200
	4	04	167,5	250
	5	04	139,75	300
	6	04	147,25	600
	7	04	128,5	1200
	8	05	101,8	2000
	9	04	165,75	2500
	10	04	109,75	3000

IP : intra-péritonéale.



5. Observation de l'évolution de la toxicité aiguë chez les rats

Après l'administration de l'extrait, les animaux sont observés après chaque une heure pendant 3 heures, le premier jour et tous les jours pendant 7 jours. Pendant cette période, nous notons le nombre de morts ainsi que les troubles symptomatologiques observés. Les essais de la toxicité aiguë permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court (de 1 à 7 jours). Les principaux effets recherchés sont :

- les signes cliniques,
- les modifications pathologiques visibles à l'œil nu,
- et la létalité (mortalité).

5.1 Détermination de la DL₅₀ (Par la méthode de Litchfield et Wilcoxon)

Après administration des différentes doses des glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte, par voie intra-péritonéale, aux différents lots et à partir de ces données, on trace la courbe : nombre de rats morts = f (log dose mg/kg).

La DL₅₀ est calculée à partir de la droite tracée par projection.

5.2 Le suivi des poids corporel des rats

Le poids corporel et la croissance des rats sont suivis durant une semaine après l'injection par voie intra-péritonéale des différentes doses des glycosides.

Le poids est mesuré à l'aide d'une balance en gramme (g) et le taux de croissance des rats par rapport au 1^{er} jour est exprimé en % et calculé selon la formule suivante

$$\text{Taux de croissance (\%)} = \frac{(P_j - P_{j0}) \times 100}{P_{i0}}$$

P_{j0} : poids du 1^{er} jour

P₇ : poids du 7^{ème} jour.

6. Effet hypoglycémiant des différentes doses des glycosides cucurbitacines

Dans le but de vérifier l'effet hypoglycémiant des glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte, l'évolution de la glycémie des rats des différents lots est suivie à court termes durant 3 heures (0, 1h, 2h et 3h) après l'injection intra-péritonéale d'extrait.

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Le sang est prélevé à partir de la veine caudale et la glycémie est mesurée à l'aide d'un lecteur de glucose (glucomètre à bandelettes réactives One Touch Ultra).

Les teneurs en glucose sont exprimées en g/l et les variations de la glycémie sont exprimées en pourcentage (%).

$$\text{Pourcentage de variation de la glycémie (\%)} = \frac{(G_t - G_0) \times 100}{G_0}$$

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

G_t : glycémie à temps t.

7. Analyse statistiques

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou plus exactement des valeurs de référence. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse.

▪ La moyenne

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

▪ La variance

$$V_x = \frac{1}{n} \sum_i (x_i - \bar{x})^2$$

▪ L'écart-type

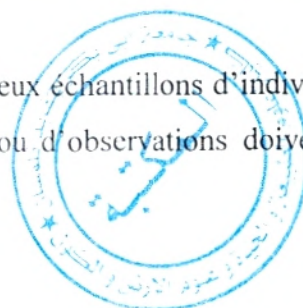
$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

▪ L'erreur standard de la moyenne (Sm)

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

▪ Test de Student

Dans les études biologiques il est important de savoir si deux échantillons d'individus ou encore deux ou plusieurs séries de résultats d'expériences ou d'observations doivent être



Chapitre 1 : Matériels et méthodes

considérés comme réellement différents. On a impliqué ce test à but pour comparer deux moyennes

- En cas de petits échantillons (n_1 et/ou $n_2 < 30$)

Comme notre cas on a 4 rats dans chaque lot, on applique cette loi ; Dans un premier temps on calcule la variance commune comme suit :

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \frac{\sum(x-m_1)^2 + \sum(x-m_2)^2}{n_1+n_2-2} \Leftrightarrow \sigma^2 = \frac{n_1\sigma_1^2 + n_2\sigma_2^2}{n_1+n_2-2}$$

Dans ces conditions. La variance standard de la différence des moyennes est :

$$S_d^2 = \sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]$$

Pour comparer les deux moyennes on applique le teste de Student, à ν degrés de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon :

$$\nu = d.l.l = n_1 + n_2 - 2$$

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

Si le t calculé ou expérimentale est plus élevé que t_ν de la table de Student, la différence entre les moyennes des deux échantillons est significative [Schwartz, 1992 ; Amotte, 1971].

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 $p < 0,0001$ (****)

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

I. Enquête ethno-botanique

Les résultats obtenus de l'enquête ethnobotanique réalisée au niveau du grand hôpital du Méchéria wilaya de Naama sont présentes dans les tableaux suivants ; réparties en 3 parties :

1. Informations sur les diabétiques questionnés

Le tableau 4 présente quelques informations sur les diabétiques questionnés concernant le sexe, le poids et l'âge qui sont des paramètres qui interviennent dans l'étiologie du diabète.

Tableau 04 : Répartition des diabétiques selon le sexe, le poids et l'âge.

Questions	Répartition	Nombre (%)	Type diabète	Nombre (%)
Sexe	masculin	11(55%)	Type 1	04(20%)
			Type 2	07(35%)
	Féminin	09(45%)	Type 1	04 (20%)
			Type 2	04(20%)
			Gestationnel	01(05%)
	Poids	< 40kg	01(05%)	Type 1
Type 2				00(00%)
40-60kg		01(05%)	Type 1	00(00%)
			Type 2	01(05%)
60-80kg		13(65%)	Type 1	05(25%)
			Type 2	06(30%)
			Gestationnel	01(05%)
80-100kg		05(25%)	Type 1	02(10%)
			Type 2	03(15%)
Age		- 30 ans	03(15%)	Type 1
	Type 2			01(05%)
	Gestationnel			01(05%)
	30 - 45 ans	08(40%)	Type 1	01(05%)
			Type 2	07(35%)
	45 -75ans	07(35%)	Type 1	04(20%)
			Type 2	03(15%)
	>75ans	02(10%)	Type 1	02(10%)
			Type 2	00(00%)

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

La répartition de la population étudiée selon le sexe présente un nombre légèrement élevée de sexe masculin que féminin d'ordre 55% et 45% respectivement.

Dans notre étude, 65% des cas recensés, ont un poids normal entre 60-80 kg et 25% des diabétiques étudiés, présentent un risque d'obésité dont le poids est entre 80-100 kg.

La Fréquence des diabétiques dans la population étudiée augmente avec les classes d'âge arrive à 35% entre 45 et 75 ans et elle diminue significativement après l'âge de 75ans à cause de l'augmentation des taux de mortalité.

2. Etats cliniques des diabétiques

Tableau 05 : Etats cliniques des diabétiques.

Questions	Répartition	Nombre (%)
Type de diabète	Type1	08 (40%)
	Type2	11 (60%)
	Gestationnel	01 (05%)
	Autres type	00 (00%)
Traitements	Diététique	01(05%)
	insulinothérapie	10 (50%)
	Antidiabétiques oraux	09 (45%)
	Insuline+comprimés	00 (00%)
Complications	Trouble de la vue	11 (55%)
	Trouble rénaux	20 (100%)
	Trouble cardiaques	05 (25%)
	Hypertension artérielle	14 (70%)
	Pas de complications	00 (00%)

Dans notre échantillon le nombre des diabétique de type 1 et de type 2 sont d'ordre de 40 % et 60% respectivement et 5% de diabète gestationnel. Ces valeurs ne confirment pas la classification du diabète publiée par l'OMS et l'ADA , qui soulignent la prédominance de nombre des diabétiques type 2 (90%) par rapport au diabétiques de type 1 (10%).

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

Nous avons constaté que la plupart des diabétiques recensés souffrent des complications micro-angiopathiques et macro angiopathiques ; 55% entre eux souffrent des troubles de vue et 70% d'hypertension artérielle et 100% de troubles rénaux et les troubles cardiaques sont moins fréquents (25%).

1. Utilisation des plantes antidiabétiques

Tableau 06 : Répartition de la population diabétique selon l'utilisation des plantes antidiabétiques et leurs efficacités.

Questions	Nombre (%)		Type diabète	Nombre (%)
Connaissent les plantes antidiabétiques	15(75%)		Type 1	07(35%)
			Type 2	07(35%)
			Gestationnel	01(05%)
Ne connaissent pas les plantes antidiabétiques	05(25%)		Type 1	01(05%)
			Type 2	04(20%)
Utilisent les plantes	11(55%)		Type 1	05(25%)
			Type 2	05(25%)
			Gestationnel	01(05%)
N'utilisent pas les plantes	09(45%)		Type 1	04(20%)
			Type 2	05(25%)
Les plantes sont plus efficaces que les autres traitements	Oui	03(15%)	Type 1	00(00%)
			Type 2	03(15%)
	Non	16(80%)	Type 1	08(40%)
			Type 2	08(40%)

Malgré que 75% des diabétiques questionnés connaissent des plantes antidiabétiques seulement 55% entre eux les utilisent. Et parmi eux 85% jugent l'inefficacité des plantes à cause des risques de toxicité et la complexité de leurs modes de préparation.

• Plantes antidiabétiques recensés dans la région de Méchéria

L'enquête ethnobotanique réalisée sur les 20 diabétiques de la région de Méchéria, nous a conduits à réaliser un tableau de 12 plantes antidiabétiques répartie selon leurs familles,

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

nom scientifiques, nom vernaculaire, parties utilisées, modes de préparation et le nombre de citation.

Tableau 07 : Plantes antidiabétiques recensées et utilisées dans la région de Méchéria

Famille	Nom scientifique	Nom populaire	Partie utilisée	Préparation	Nombre citation
Composées	<i>Artemisia absinthium</i>	Chiba	Partie aérienne	Infusion	08
	<i>Artemisia abrotanum</i>	Chih	Partie aérienne	Décoction	03
Cucurbitacées	<i>Citrullus colocynthis</i>	Handal	Fruits graines	Macération	04
Cupressacées	<i>Juniperus phoenicea</i>	Araar	Cônes, Feuilles	Macération	05
Fabacées	<i>Trigonella foenum</i>	Halba	Graines	Décoction Macération Poudre	09
Lamiacées	<i>Origanum compactum</i>	Zater	Feuilles	Décoction Infusion	02
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Azir	Feuilles Partie aérienne	Décoction Infusion	07
Lythracées	<i>Lawsonia inermis</i>	Hanna	Feuilles	Décoction	01
Moracées	<i>Ficus carica L.</i>	Kermous	Fruits		01
Punicacées	<i>Punica granatum L.</i>	Qchour romman	Péricarpe	Décoction Poudre	02
Ranunculacées	<i>Nigella sativa L.</i>	Sanouj	Graines	Poudre	01
Oléacées	<i>Olea europea L</i>	Zitoun	fruits	Huile	01

D'après le tableau ci-dessus, nous avons constaté que la fréquence d'utilisation des plantes est variable chez la population diabétique de Méchéria (entre 9 et une seule citation). De même, la majorité des plantes recensées sont récoltées dans cette région riche en plantes médicinales.

Les plantes les plus utilisées par ordre de citation sont : Halba (*Trigonella foenum*), Chiba (*Artemisia absinthium*), Azir (*Rosmarinus officinalis*) et Araar (*Juniperus phoenicea*) et handal (*Citrullus colocynthis*).

II. Analyses phytochimiques

1. Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques des deux extraits préparés par macération en milieu acide ou infusion en milieu aqueux des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 08: Résultats des tests phytochimiques des extraits acides et aqueux.

Famille	Réactif	Macération en milieu acide	infusion en milieu aqueux
Hétérosides	Réaction de Liebermann Burchardt	--	+
Alcaloïdes	Mayer	+++	traces
	Wagner	+++	+
	Dragendorff	+++	++
Flavonoïdes	Mg ²⁺	--	--
Tanins	FeCl ₃ à 1%	--	--

+ : positif ; ++ : Très positif ; +++ : Hautement positif ; -- : négatif

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté la présence des alcaloïdes dans les deux extraits, les hétérosides dans l'extrait préparé par infusion. De même nous avons noté l'absence des flavonoïdes et des tanins dans les deux extraits préparés.

2. Rendement de l'extrait éthanolique de glycosides cucurbitacines après extraction

Tableau 09: Rendement de l'extrait éthanolique de glycosides cucurbitacines après extraction.

Extrait, aspect physique	Masse (g)	Rendement (%)
Solide de couleur brun	1,705	3,41

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

L'extraction des glycosides cucurbitacines, à partir de 50g des graines de coloquinte broyées et dégraissées par l'éthanol et l'acétate d'éthyle, nous a permis de récupérer 1,705g un solide de couleur brun, soit un rendement de 3,41%.

III. Analyses biologiques

1. Evaluation de la toxicité aiguë :

Après administration de l'extrait éthanolique des glycosides des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*), par voie intra-péritonéale, aux différents lots des rats, et avec les doses comprises entre 100 mg/kg et 3000 mg/kg, on a obtenu les résultats suivants :

1.1 Les symptômes des la toxicité pendant le premier jour de l'injection

Dès le début du traitement et ceci même pour les doses faibles, on a constaté chez les animaux les symptômes suivants :

- Une difficulté de respiration.
- L'activité des animaux se réduit, leur démarche devient lente, puis peu à peu ils se couchent sur le ventre, et enfin ils se rangent les uns à côté des autres

Après 24 heures, les animaux survivants ont retrouvé un comportement normal comparable à celui des témoins.

Tableau 10 : Les symptômes observés et le taux de mortalité des rats en fonction de la dose administrée.

N° Lot	Nombre de rats	Doses injectés I.P. mg/kg p.c	Taux de mortalité	Symptômes
0	05	Nacl 0.9%	00	Comportement normal
1	05	100	00	difficulté de respiration et une marche lente pendant les 3 premières heures après l'injection
2	04	150	00	
3	04	200	00	
4	04	250	00	
5	04	300	00	
6	04	600	01	difficulté de respiration, une marche lente et la mort d'un seul rat après 2 heures de l'injection
7	04	1200	00	difficulté de respiration et une démarche lente avec vibration des pieds plus de 3 heures après l'injection

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

8	05	2000	00	difficulté de respiration et une démarche lente plus de 3 heures après l'injection 2 rats se couchent sur le dos pendant la 1 ère heure
9	04	2500	03	difficulté de respiration et fortes troubles de marche mort de 3 rats quelques minutes après l'injection de l'extrait.
10	04	3000	04	difficulté de respiration et morts des 4 rats sur place

D'après les résultats ci dessus, la dose létale DL_{100} (la dose qui entraîne la mort de 100% de l'effectif des rats du lot) de l'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines serait de 3000 mg/kg et la DL_{50} (la dose qui entraîne la mort de 50% de l'effectif des rats dans un lot) est entre 2000 et 2500 mg/kg p.c.

- Calcul de la DL_{50} , DL_{100} (Par la méthode de Litchfield et Wilcoxon)

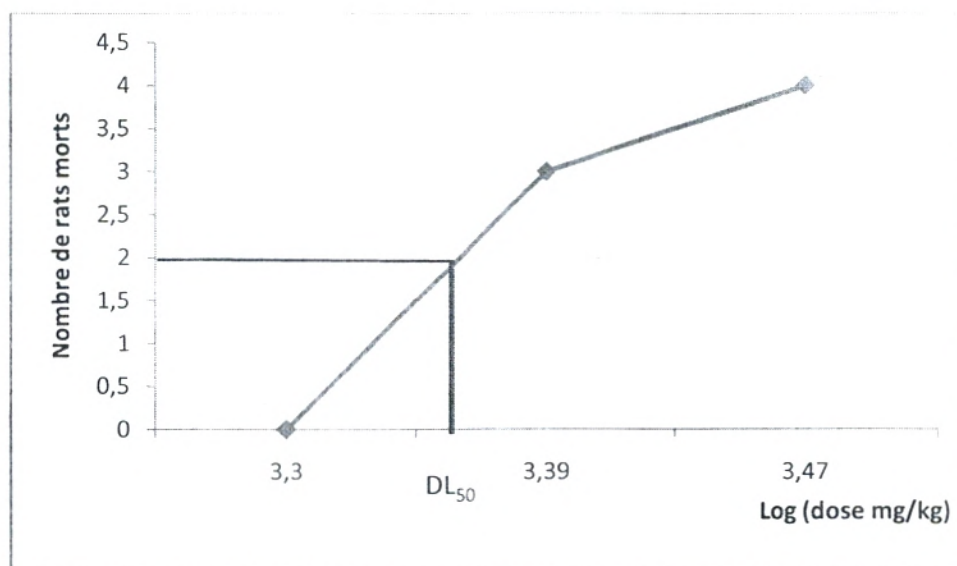


Figure 5 : Détermination de DL_{50} par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (taux de mortalité en fonction de logarithme la dose injectée).

D'après la figure, nous avons déduit une dose létale médiane DL_{50} de 2330,7 mg/kg p.c

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

1.1 Le suivie des signes de toxicité pendant la semaine

Tous les rats survivants se trouvent à l'état normal pendant toute la semaine qui suit l'injection à l'exception d'un seul rat de lot7 (1200 mg/Kg) qui a présenté une infection abdominale dans le 6^{ème} jour de la semaine.

1.3 Le suivie des poids des rats survivants pendant la première semaine

Tableau 11 : Résultats de l'évolution du poids corporel pendant la semaine qui suit l'injection intra-péritonéale d'extrait.

Lot	Doses injectés I.P. mg/kg p.c	1 ^{er} jour	4 ^{ème} jour	7 ^{ème} jour	Taux de croissance (%)
0	Nacl 0.9%	157,25±06,50	170,00±08,06	197,25±11,50	+25.47%
1	100	206,00±37,82	224,00±42,08	218,00±45,16	+05.83%
2	150	147,50±11,90	165,75±06,29	183,50±07,51	+24.40%
3	200	168,75±02,50	167,25±06,34	157,50±03,32	-06.66%
4	250	167,50±05,00	167,00±05,94	166,00±09,27	-00.89%
5	300	139,75±19,69	161,75±12,76	152,75±11,53	+09.30%
6	600	147,25±23,98	146,33±20,82	130,50±21,39	-11.38%
7	1200	128,50±23,98	127,50±17,06	130,66±21,56	+01.68%
8	2000	103,50±04,82	108,80±05,72	106,20±06,98	+02.60%

Nous avons constaté une diminution des taux croissances chez la plupart des lots de rats, une semaine après l'injection intra-péritonéale des différentes doses d'extrait des glycosides cucurbitacines des gaines de coloquinte, par rapport aux rats témoins qui présentent un taux de croissance supérieur à 25% dans la même période. De plus nous avons noté des chutes de poids corporel chez certains lots qui peut arriver à -11,38 % chez les rats de lot 6 (600mg/kg). Cela peut être du à l'effet toxique de l'extrait et même probablement au régime alimentaire mal équilibré.

2. Effet hypoglycémique d'extrait des glycosides cucurbitacines chez des rats normaux

Le tableau 12 présente l'évolution de la glycémie durant 3heures chez les rats femelles Wistar normaux soumis à des injections intra-péritonéales des différentes doses d'extrait des glycosides cucurbitacines des graines de coloquinte.

Chapitre 2 : Résultats et interprétations

Cette variation de la glycémie est exprimée en % par rapport au la glycémie basale de temps 0 min (T0).

Tableau 12 : Evolution de glycémie durant 3 heures après l'injection intra-péritonéale d'extrait des glycosides cucurbitacines.

Lot	Doses injectées I.P. (mg/kg p.c.)	Glycémie basale (T ₀)(g/l)	Pourcentage de variation de la glycémie (%) ± SEM		
			1h	2h	3h
0	Nacl 0.9%	0.87±0.08	+17.41±0.09	+4.59± 0.08	+02.29±0.10
1	100	0,97±0,046	+08,24 ± 0,16	+09,27±0,11	05,15±0,18
2	150	0,86±0,26	+41,80±0,082*	+26,70±0,049	+18,60±0,13
3	200	1,00±0,17	+24,24±0,055*	+18,18±0,20	+20,20±0,45
4	250	1,03±0,025	+03,92±0,25	-22,54±0,49	-30,39±0,33
5	300	1,34±0,23	+06,76±0,10	-21,05±0,34	-25,56±0,54
6	600	1,24±0,23	-20,16±0,81	-54,03±0,52	-54,61±0,52
7	1200	1,04±0,18	-54,36±0,15**	-68,93±0,045***	-51,45±0,25*
8	2000	0.89±0.10	-23,59±0,20	-25,84±0,32	-06,74±0,38

*Signification par rapport à la glycémie basale

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent bien la diminution de la glycémie (effet hypoglycémiant), 3 heures après l'injection intra-péritonéale des doses élevées (250 à 2000mg/kg p.c.) d'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de coloquinte chez les rats normaux.

Cette diminution augmente avec l'augmentation de la dose injectée et devient très significative, d'ordre de 68,93% par rapport à la glycémie basale (T₀), 2 heures après l'injection de 1200mg/kg p.c. d'extrait des glycosides.

A faible dose (100 à 200 mg/kg p.c.), nous avons noté une augmentation peu significative de la glycémie une heure après l'injection des extraits, corrigée à la 3^{ème} heure d'expérimentation.

IV. Discussion

Plusieurs études ethnobotaniques et ethno-pharmacologiques montrent la diversité des plantes antidiabétiques utilisées traditionnellement par la population algérienne, magrébines, arabe et partout dans le monde :

Allali et al. en 2008, ont recensé 56 plantes antidiabétiques utilisées par la population de l'Ouest d'Algérie. De même, **Benmehdi en 2000**, a enregistré dans son enquête ethnobotanique 80 plantes traditionnellement utilisées pour traiter le diabète dans la région de Tlemcen (Algérie).

Au Maroc, **Ziyyat et al., 1997 ; Merzouki et al., 2000 ; Jouad et al., 2001 ; Bnouham et al., 2002** et **El Amrani et al., 2010** ont classé plus de 100 plantes médicinales destinées au traitement du diabète dans ce pays .

Bnouham et al., en 2006, ont regroupé dans leur synthèse bibliographique l'ensemble des plantes antidiabétiques étudiées et reportées dans la littérature entre 1990 et 2000. Ils ont recensé 176 espèces plantes intégrées dans 84 familles à pouvoir antidiabétique clair.

Plusieurs études ethnopharmacologiques classent la coloquinte comme étant une plante traditionnelle utilisée pour traiter le diabète. **Bnouham et al. en 2006**, ont classé la coloquinte parmi les plantes antidiabétiques les plus étudiées dans les recherches scientifiques entre 1990 et 2000.

Wasfi, 1994 ; Lev et Amar, 2002 ; Saïd et al., 2002 ont constaté que dans : Arabie saoudite, Emirats Arabe unie, Jordanie, Israël, Palestine et Golan, les graines et les fruits de la coloquinte sont recommandées aux diabétiques pour leur effets antidiabétiques [].

L'extraction des glycosides cucurbitacines à partir de 50g des graines de la coloquinte broyées et dégraissées permet de récupérer un produit solide de couleur brun, avec un rendement de 3,41 %.

D'après **Darwish-Sayed et al. en 1974**, l'analyse chromatographique par CCM, en présence d'un mélange de solvant contenant n-Butanol, acide acétique et eau (4/1/5), montre que l'extrait éthanolique révèle 8 composés (4 glycosides cucurbitacines et 4 formes aglycones des cucurbitacines).

Discussion

De même, **Natiq et al. en 1989**, ont identifié seulement deux glycosides cucurbitacines (2-O- β -D-gluco-pyranosyl-cucurbitacine I, 2-O- β -D-gluco-pyranosyl-cucurbitacine L) à partir d'extrait éthanolique de la partie aérienne et les fruits des la coloquinte broyés et dégraissés récoltés dans la région de Basrah (Sud Iraq).

Delazar et al. en 2006, ont isolé et identifié à partir des fruits trois flavones glycosides : isosaponarine, isovitexine et isoorientine 3'- O- méthyle éther; et deux glycosides cucurbitacine : 2-O- β -D-gluco-pyranosyl-cucurbitacine I et 2-O- β -D-gluco-pyranosyl-cucurbitacine L.

Plusieurs recherches confirment l'effet antidiabétique d'extrait éthanoliques des glycosides citant :

Azzi en 2007, a montré que l'extrait chloroformique et éthanoliques des glycosides (20mg/kg) de la coloquinte provoque une diminution de l'hyperglycémie chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine à court terme et à long terme.

Abdel-Hassan et al. (2000), ont montré que l'administration par voie orale de 50 mg/kg des glycosides extraits de l'épicarpe de *Citrullus colocynthis* (la coloquinte) provoque une diminution significative de la glycémie après 2h et 3h et très significative après 6h chez des lapins normaux.

Zhang et Tan (2000), ont montré qu'une seule dose (150mg/kg p.c) d'extrait éthanolique de *Gynura procumbens* Merr. famille des Astéracée, administrée par voie orale, provoque une diminution significative de la glycémie chez les rats rendus diabétiques par la STZ. De même, ils n'ont pas noté un effet hypoglycémiant chez les rats normaux.

Abdel-barry et al. (1997), ont démontré que l'administration intra-péritonéale de 0.8g/kg d'extrait éthanolique des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugrec) famille des légumineuses provoque une diminution significative de la glycémie chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane. De même, ils n'ont pas noté un effet hypoglycémiant chez les rats normaux.

Pushparaj et al. (2000), ont noté que les tests de tolérance orale au glucose chez des rats rendus diabétiques par l'alloxane, montrent que l'administration orale deux fois par jour de 125mg/kg d'extrait éthanolique des feuilles d'*Averrhoa bilimbi* L. (Bilimbi) famille des

Discussion

Oxalidée; réduit la glycémie à 50% et la triglycéridémie à 130% chez les rats diabétiques par rapport aux témoins.

Kako et al. (1995), ont étudié l'effet hypoglycémiant de Senegin-II, principal glycoside isolé des rhizomes de *Polygala senga* l. (*Senga radis*) famille des polygalacée. Ils ont montré que l'administration intra-péritonéale de 2.5mg/kg p.c réduit (après 4 heures) significativement la glycémie chez les souris KK-Ay (model des souris diabétiques) et les souris normales.

L'effet d'extrait éthanolique des graines d'*Eugenai jambolana* famille des myrtacées a été étudié par **Sharma et al (2003)**. Ils ont trouvé que l'administration orale de 100mg/kg p.c d'extrait éthanolique provoque une diminution significative de la glycémie de 18.9% à court terme (après 90 min de traitement) et 21%, 90 min après un gavage de 2.5g/l du glucose (test tolérance au glucose) chez les lapins rendus diabétiques par l'alloxane.

La recherche de l'effet toxique d'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*), nous a conduits à des résultats montrant un effet toxique clair à plusieurs niveaux de doses avec une chute de la glycémie chez les rats normaux.

L'étude de la toxicité aiguë (détermination de la DL₅₀) par glycosides cucurbitacines des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) a permis de calculer la valeur de la DL₅₀ chez les rats femelles normaux par la méthode de Litchfield et Wilcoxon qui était de **2330,7 mg/kg p.c.**

Au regard des résultats des DL₅₀ (2000 mg/kg <DL₅₀= 2330,7 mg/kg <2500 mg/kg p.c) d'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*), ces glycosides cucurbitacines deviennent très toxiques à doses élevées.

Azzi et Boumallah (2000), ont noté une dose létale médiane DL₅₀ de 200 mg/kg et une DL₁₀₀ de 250 mg/kg d'extrait des glycosides cucurbitacines préparée dans l'acétone chez les souris de laboratoire.

De même **Azzi (2007)**, a confirmé ces résultats : DL₅₀ (200 mg/kg) et DL₁₀₀ (250 mg/kg) sur des rats Wistar.

Charnot (1945), a noté qu'à des doses élevées, cette plante est hautement toxique pour les animaux et les humains. Les signes d'intoxication sont douleurs gastro-intestinales avec

Discussion

diarrhée, vomissement, rétention urinaire, fatigue, hypothermie, désordre cardiaque et congestion cérébrale produisant un effondrement fatal [Charnot, 1945].

Ben Salah et al (1986) ont trouvé que la coloquinte renferme 2 principes actifs : la colocynthe et la colocynthine. Cette dernière confère à la plante un effet purgatif extrêmement violent et dangereux, qui provoque généralement des hémorragies intestinales dont l'issue est souvent fatale. L'intérêt de cette plante réside dans les substances pharmaceutiques qu'on a pu en tirer et auxquels on reconnaît un effet hypoglycémiant. Les manifestations cliniques rapportées à l'intoxication par la coloquinte comprennent des vertiges, des épigastralgies, des nausées, des vomissements et une diarrhée

Conclusion générale

V. Conclusion générale

D'après les résultats obtenus, dans notre étude, nous avons conclu que l'injection intrapéritonéale des différentes doses d'extrait éthanolique des glycosides cucurbitacines extraits des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) provoque un effet toxique chez les rats Wistar femelles.

La DL₅₀ tirée de cet extrait était de **2330,7 mg/kg** et la DL₁₀₀ enregistrée était de **3000mg/kg p.c.**

De même, nous avons constaté que les glycosides cucurbitacines des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) influencent sur la croissance normale des rats.

De plus, nous avons conclu que cet extrait à un effet hypoglycémiant à forte doses (> 250 mg/kgp.c).

Cette étude mérite d'être compléer par d'autres travaux :

- Augmenter le nombre des rats.
- Essayer d'autres modes d'administration.
- Utiliser d'autres espèces animales et modèles expérimentaux.
- Réaliser les dosages biochimiques suivants : TGO, TGP, urée et créatinine qui influencent sur la fonction hépatique et la fonction rénale.
- Faire des coupes histologiques pour le foie et les reins.

VI. Références bibliographiques

1. **Abdel-barry JA, Abdel-Hassan IA et Al-Hakiem MH; 1997.** Hypoglycaemic and anti- hyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*; 58: 149- 155.
2. **Abdel-Hassan I, Abdel-Barry J A et Mohammeda S T; 2000.** The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* ; 71: 325-330.
3. **Afifi M, Darwish S, Balba S; 1973.** Nitrogenous bases of different organ of *Citrullus colocynthis*. *Planta media*.24 (3):260-265.
4. **Al Faraj S; 1995.** haemorrhagic colitis induced by *Citrullus colocynthis*. *Annual Tropen parasitology*; 89 (6): 695-696.
5. **Al Kofahi S, Batchoun R, Awais w et Najib N; 1996.** Biological activity of some Jordanian medicinal plants extracts. *Fitoterapia*; LXVII.5: 435-442.
6. **Al-Achi A; 2005.** Herbs that affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care*.8 (7): 325-330.
7. **Al-Ghaithi F, El-Ridi M R, Adeghate E et Amiri M H ; 2004.** Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*; xxx: 1-7.
8. **Allali H, Benmehdi H , Dib M A, Tabti B, Ghalem S et Benabadji N; 2008.** Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian journal of chemistry* ; 20 (04) : 2701-2710.
9. **Al-Yahya M A, Al-Farhan A H et adem S E I; 2000.** Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. *Fitoterapia*; 71: 385-391.
10. **Anne-Laure ; 2002.** Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: "*Dioscorea sylvatica*" (Dioscoreaceae), "*Urginea altissima*" (Liliaceae), "*Jamesbrittenia fodina*" and "*J. Elegantissima*" (Scrophulariaceae). *Thèse de Doctorat, Université de Lausanne*.
11. **Association d'aide aux diabétiques Tlemcen ; 2000.** Sidi Cheker.Tlemcen.
12. **Azzi R et Boumellah O ; 2002.** Contribution à l'étude des effets antidiabétiques des saponosides et des glucosides extraits de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des rats Wistar rendus diabétique par la Streptozotocine et la recherche de ses effets antifongiques

Références bibliographiques

sur *Fusarium oxysporum*. Mémoire DES en Biochimie. Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.

13. Azzî R ; 2007. Contribution à la recherche des effets antidiabétiques des alcaloïdes et glycosides cucurbitacines extraits des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat rendu diabétique par la Streptozotocine. Mémoire de magistère, Université de Tlemcen.

14. Bailey C J et Day C ; 1989. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. Diabetes Care; 12 (8): 553-564.

15. Balcells A, 1993. Examens de laboratoire pour le praticien.

16. Banarjee P S, Dandiya P C ; 1967. J.Pharma. Sci; 56:1665.

17. Baquare S R; Tansif M ; 1984. Medicinal plants of southern West Pakistan. Periodical export book agency. (Delhi).

18. Barceló A ; 1996. Série de monographie sur les maladies liées au vieillissement : diabète sucré non insulino-dépendant (DNID). vol. 17 N°1.

19. Barth A, Müller D et Dürrling K; 2002. *In vitro* investigation of a standardized dried extract of *Citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats. Exp Toxic Pathol; 54: 223-230.

20. Bastard J P, Vigouroux C et Capeau J; 2001. Syndrome métabolique ou syndrome d'insulinorésistance. Encycl Méd Chir, Endocrinologie-Nutrition ; 10-363-A-10.

21. Bedry R, Pillet O, Favarel-Garrigues JC; 1999. Intoxications par les plantes et les poissons vénéneux. Intoxications aiguës. Collection réanimation:448-466.

22. Ben Salah N, Amamou M., Jerbi Z., Ben Salah F. et Yacoub M ;1986. : un cas de surdosage en *Peganum harmala* L. Journal de toxicologie clinique et expérimentale,

23. Benariba N ; 2003. Contribution à l'étude antidiabétique des extraits de graine de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar rendu diabétique par la Streptozotocine. Mémoire de Magistère en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.

24. Benmehdi H; 2000. Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de magistère en chimie organique appliquée. Département de chimie faculté des sciences Université Tlemcen.

25. Berthelot M.P.E; 1998. Antioxydant status in diabetic rat liver. Effects of vanadate. Biochem Pharmacol;45(3):539-42. la port chem. APPL 284.

26. Berthium Yves ; 1995. Les canadiens pour la recherche médicale.

Références bibliographiques

27. **Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A et Ziyat A ; 2002.** Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes & Metabolism* ; 10: 33-50.
28. **Bnouham M, Ziyat A, Mekhfi H, Tahri A et Legssyer A; 2006.** Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int J Diabetes & Metabolism*; 14: 1-25.
29. **Bonvalot N, 2002.** Méthode d'élaboration : 14.
30. **Boukef K et Souissi H R; 1986.** Contribution à l'étude des plantes utilisées en médecine populaire tunisienne. Faculté de Pharmacie Monastir : 31-44.
31. **Bruneton, J ; 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Paris, pp. 647-673.
32. **Buyschaert M et Hermans M P ; 1998.** Critères révisés et nouvelle classification du diabète sucré. *Louvin MED* ; 117 : 1-6.
33. **Capet F, Debaillie R, Tafforeau J et Van Oyen H; 1999.** Situation Actuelle et Eléments pour le Développement d'une Politique de Santé : diabète épidémiologie. *CROSP* ; 19 : 1-12 ; 27-28.
34. **Charbonnel B et Cariou B; 1997.** Diabète non insulino-dépendant: indications thérapeutiques. *Médecine thérapeutique* ; 3.hs: 103-11.
35. **Charnot A; 1945.** La toxicologie au Maroc. Mémoire de Soc. Sci. Nat. Du Maroc, Rabat, n° XLVII, p 826.
36. **Charriere S., Rognant N., Chiche F., Cremer A., Deray G., Priou M ; 2008.** Insuffisance rénale chronique et maladie cardiovasculaire. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* Volume 58, Pages 40-52.
37. **Chhetri D R, Parajuli P et Subba G C; 2005.** Antidiabetic plants used by Sikkim and Darjeeling Himalayan tribes, India. *Journal of Ethnopharmacology*; 99:199-202.
38. **Claude Bendavid.** Biochimie des Grandes Fonctions Hépatiques.
39. **CSST (Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec), 2004.** Notions de toxicologie. Bibliothèque nationale du Québec ; 2ème édition, ISBN.
40. **Cugnet-Anceau C, Bauduceau B; 2008.** Équilibre glycémique et morbidité cardiovasculaire : apport des études 2008. *Ann Endocrinol* 2009;70:1-8.
41. **Darwish-Sayed M, Balbaa S I et Afifi M S A; 1973.** Nitrogenous base of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica*; 24 (3): 260-265.
42. **Darwish-Sayed M, Balbaa S I et Afifi M S A; 1974.** The glycosidal content of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica*; 26: 293-298.

Références bibliographiques

43. **Dauvin Estelle, 2009.** Intoxication par les plantes ; Thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine.
44. **Delazar A ,Gibbons S, Kosari A R, Nazemiyeh H, Modarressi M, Nahar L et Satyajit D; 2006.** Flavone C-Glycosides and cucurbitacin Glycosides from *Citrullus colocynthis*. DARU. 14(3) :109-114.
45. **Desch G; 2001.** Aspects biochimiques et analytiques du diagnostic et de la surveillance du diabète: Imagerie fonctionnelle et métabolique. Médecine Nucléaire; vol.25.2: 61-72.
46. **Dharmananda S; 2003.** Treatment of diabetes with Chinese herbs and acupuncture. Internet journal of the institute for traditional medicine and preventive health care.
47. **Dinneen S, Gerich J et Rizza R ; 1992.** Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med ; 327 : 707-713.
48. **Dornan T; 1994.** Diabetes in the elderly: epidemiology. J R Soc Med; 87: 609-12.
49. **Duke J A; 1978.** The quest for tolerant germplasm.. In: ASA Special Symposium 32, Crop tolerance to suboptimal land conditions. Am. Soc. Agron. Madison, WI: 1-61.
50. **Duke S; 2002.** Phytochemical and ethnobotanical databases.USDA-ARS-NGRL. Beltsville Agricultural Research Center.EDT.
51. **Eddouks M., Maghrani, M., & Michel, J,B ;2005.**Hypoglycemic effect of *Triticum repens* P. Beauv in normal and diabetic rats. Journal of Ethanopharmacology, 102: 228-232.
52. **El Amrani F, Rhallab A, Alaoui T, El Badaoui K et Chakir S.; 2010.** Etude ethno pharmacologique de quelques plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Meknès-Tafilalet(Maroc). Phytothérapie 3: 1-1
53. **Erasto1 P,Adebola P O, Grierson D S et Afolayan1 A J; 2005.** An ethnobotanical study of plants used for the treatment of diabetes in the Eastern Cape Province, South Africa. African Journal of Biotechnology; 4 (12): 1458-1460.
54. **Feskens E.J.M., Bowles C.H. et Kromhout D.; 1991.** Carbohydrate intake and body mass index in relation to the risk of glucose tolerance in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 136–140.
55. **Flesch F, 2005.** Intoxications d'origine végétale Plant poisoning F. Flesch (Praticien hospitalier) *Centre antipoison, hôpitaux universitaires de Strasbourg.*
56. **Fossati P, Prencipe L; 1982.** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. Clin Chem; 28:2077-2080.
57. **Fournier P ; 2001.** Les quatres flores de France. Lachevalier. Paris. Vol II.2.

Références bibliographiques

58. Frank C.LU ; 1992. Toxicologie, Données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Paris pp 73- 202.
59. French L R, Boen J R, Martinez A M, Bushouse S A, Sprafka J M et Goetz F C 1990. Population based study of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Wadena, Minnesota. *Diabetes*; 39 :p1131-1137.
60. Fumeron F; 2005. De l'obésité au diabète de type2 : épidémiologie et physiopathologie. *Cholé-doc* ; N°88.
61. Giles CJ, 1983. Outbreak of ragwort (*Senecio jacobaea*) poisoning in horses. *Equine Vet. J.*; 15; 248-250.
62. Golay A ; 1994. Étiologie du diabète de type 2. 2^{ème} édition Maloine chap II: 105-108.
63. Gourdy P, Ruidavets J B, Ferriere J, Ducimetière P, Amouyel P H, Arveiler D, Cottel D, Lamany N, Bingham H et Hanaire-Broutin; 2001. Prevalence of type 2 diabetes and impaired fasting glucose in the middle-aged population of the three region the monica study 1995-7. *Diabetes Metab (Paris)*; 27 :347-358.
64. Grover J K Yadav S et Vats V; 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*; 81:81-100.
65. Guillausseau P J, Tielmans D, Virally-Monod M, Assayag M; 1997. Diabetes : from phenotypes to genotypes. *Diabetes Metab* ; 23 : 14-21.
66. Harborne J B; 1998. Phytochemical methods : A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall Thomson Science (UK); 3^{ème} ed.: 203-234.
67. Hernandez-Galicia E, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Santamaria L, Roman-Ramos R, Chavez-Miranda A A, Garcia- Vega L M, Flores-Saenz J L et Alarcon-Aguilar F J ; 2002. Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* ; 45: 118-124.
68. Hurt J M; 2003. Plantes médicinales et diabète. TERRAHERBA.
69. Ivorra MD, Paya M, Villar A ; 1989. Review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *J. Ethnopharmacol.*, 27: 243-75.
70. Jacques Labescat, 2008. Guide des examens complémentaires, 2^{ème} édition.
71. John U et Cincinnati O ; 1898. *Citrullus colocynthis*. Reprinted from the Western druggist. Chicago.
72. Jouad H, Haloui M, Rhiouni H, El Hilaly J et Eddouks M ; 2001. Ethnobotanical survey of medicinal used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North center region of Morocco (Fez- boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*; 77: 175-182.

Références bibliographiques

73. **Kako M, Miura T, Usami M, et al.; 1995.** Effect of Senegin-II on blood sugar in normal and NIDDM mice. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1159-1161.
74. **Kirtikar et Basu, 1984.** Indian medicinal plants. Bishen Singh, Mahendra Pal Singh, Dchra Dern ...022.
75. **Lahsissene, H. et Kahouadji, A ; 2010.** Analyse ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques de la flore marocaine: cas de la région de Zaër. *Phytothérapie* 8(4) : 202-209.
76. **Laigneau Jaques ; 2000.** Mort annoncée du pire des tests.
77. **Laroche. L, 2001.** Toxicologie générale : 25.
78. **Leduc C, Coonishish J, Haddad P et Currier A; 2006.** Plants used by Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. *Journal of Ehtnopharmacology*; 105: 55-63
79. **Lev E et Amar Z; 2002.** Ethnopharmacology survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*; 82: 131-145.
80. **Liston .AJ ,1991.** Toxicologie.
81. **Litchfield, J.J , F Wilcoxon ;1985.** A simplified method of evaluating dose effective experiment.In Kalayanova Sofia.
82. **Marles R J et Farnsworth N; 1996.** antidiabetic plants and their active constituent. *Prot. J Bot Med*; 1 (3): 85-135.
83. **Martin B C, warram J H, Krolewski A S, Bergman R N, Soeldner J S et Kahn C R; 1992.** Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25 years follow-up study. *Lancet*; 2: 925-929.
84. **Mc Gorum BC, Murphy D, Love S, Milne EM, 1999.** Clinicopathological features of equine primary hepatic disease: a review of 50 cases. *Vet. Rec*; 145; 134-139.
85. **Merzouki A , Ed-Derfoufi F et Molero M E S A J; 2000.** Contribution to knowledge of rifian traditional medicine .2: Flok medicine in Ksar Lakbir (NW Morocco).*Fitoterapia*; 71:278-307.
86. **Merzouki A, Ed-Derfoufi F et Molero Mesa J ; 2000.** Contribution to knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir (NW Morocco). *Fitoterapia*; 71: 278-307.
87. **Montgomery.CA 1990,** Oncological and toxicological research: Alleviation and control of pain and distress in laboratory animal's.
88. **Nadkarni K M; 1998.** Indian Plants and Drugs with their Medical Properties and Uses. In TRAFFIC India. Asiatic Publishing House, Delhi, India.

Références bibliographiques

89. Natiq ARH, Donald AW et Nahia JY; 1989. cucurbitacines glycosides from *Citrullus colocynthis*, phytochemistry ;28(4)-1268-1271.
90. Naylor C D, Sermer M, Chen E et al ; 1997. Selective screening for gestational diabetes mellitus. N Engl J Med; 337: 1591-96.
91. NDDG. National Diabetes Data Group; 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes; 28: 1039–57.
92. Nmila R, Gross R, Rachid H, Roye M, Manteghetti M, Petit P, Tijane M, Ribes G et Sauvaire Y; 2000. insolinotropic Effect of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. Planta Medica; 66: 418-423.
93. OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ; 2002. Diabète sucré. Aide mémoire ; N°138.
94. OMS (Organisation Mondiale de la Santé); 2000. Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle; 1 : 1-79.
95. OMS et FID (Organisation Mondiale de la Santé, fédération Internationale du Diabète) ; 2004. Communiqués de presse 2004 : il faut agir contre le diabète. Genève.
96. Padavala A B, Gadde, Radha, Vedurupaka, Talluru , Yellapu et Kolli ; 2006. A database of 389 medicinal plants for diabetes. Bioinformation ; 1(4): 130-131.
97. Patrick N SAS ; 2003. Intoxications par les végétaux : plantes baies. Éditions Scientifiques et Médicales.
98. Patrick N ; 2003. Intoxications par les végétaux : plantes et baies. Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS.
99. Pushparaj P, Tan CH et Tan BK; 2000. Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. J Ethnopharmacol; 72: 69-76.
100. Raccah D ; 2004. Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré.
101. Ray KK, Seshasai SR, Wijesuriya S, Sivakumaran R, Nethcott S, Preiss D, et al; 2009. Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. Lancet; 373:1765–72.
102. RDM (Recommandations de la direction des médicaments) ; 1990. Evaluation toxicologique. Direction générale de la protection de la santé, santé Canada.
103. Rhalem Naima, Khattabi Asmae, Soulaymani Abdelmjid, Ouammi Lahcen , Soulaymani-Bencheich Rachida; 2008. Centre Anti Poison et de pharmacovigilance du

Références bibliographiques

Maroc, Faculté des sciences de Kénitra, Université Ibn Tofail, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

104. Sachon C, Cornet P et Grimaldi A ; 2004. Diagnostic du diabète. In Diabète de type II, coordonné par Grimaldi A. EMC référence, Elsevier, Paris : 83-101.

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

106. Satyavati G V, Neeraj T et Madhu S; 1989. Indigenous plant drugs for diabetes mellitus.

107. Selvin E, Steffes MW, Zhu H, Matsushita K, Wagenknecht L, Pankow J, et al 2010. Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *N Engl J Med*; 362:800–11.

108. Simon D, Fagot-Campagna A, Eschwège E et Balkau B ; 2005. Diabète : définition, dépistage et épidémiologie. In *Traité de diabétologie*, coordonnateur Grimaldi A. Médecine sciences Flammarion : 3-21.

109. Tahraoui, A., El-Hilally, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in South-eastern Morocco. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 105–117.

110. The 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: 1183-1197.

111. Trinder P; 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxydase with an alternative oxygen acceptor. *Ann clin Biochem*.

112. Valdiguié P; 2000. Biochimie clinique. *Médicales inter nationales*, 2^{ème} édition cap.10 : enzymes plasmatiques : 235-266. (remplacée la référence Piere 2000)

113. Wasfi W K ,1994. some pharmacological Studies on *Citrullus colocynthis* .*Journal of Herbs, spices and Medicinal plants* ;2(2) :65-79.

114. Weaber G ; 2000. Diabétologie expérimentale. *Revue médicale de la Suisse Romande*; 120 : 907- 913.

115. Wepierre.J ; 1977 .abrégé de pharmacologiedynamique générale. P, 187.

116. Williamson D.H., MELLANBY J., KREBS M.A., 1962. Enzymatic determination of hydroxybutyric acid and aceto acetic acid in blood. *Biochem. J.*, 82, 90-96.

Références bibliographiques

117. Yanif Z, ellashabelsky et Schafferman D;1999. Colocynth : Potential arid land oil seed from an ancient cucurbit. Dans: J. Janick (Ed). Perspectives on new crops and new use. ASHS press; Alexandria V A.
118. Young D et Destaner L ; 1975. Clin chem. 21-5.
119. Ziyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli, Serhrouchni M et Benjelloun W ; 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. Journal of Ethnopharmacology ; 58: 45-54.