

MÉMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue d'obtention d'un diplôme de Master en biologie
Option : Biochimie appliquée

Thème

Evaluation de l'effet antidiabétique de l'extrait
méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.
sur des souris *Swiss albinos* rendues diabétique par
la streptozotocine.

Présenté par :

M^{elle} YOUSFI Farida
M^{elle} ZADI Yamina

Devant le jury :

Président :	M ^{elle} KHETTAL Bachra	(M.C.B)
Promoteur:	M ^r TACHERFIOUT Mustapha	(M.A.A)
Co-promoteur:	M ^r BELMOUHOUB Messaoud	(M.A.A)
Examineur:	M ^r BASLI Abd Elkader	(M.A.A)
Examineur:	M ^r BOUKHALFA Farid	(M.A.A)

Année universitaire 2013/2014

Remerciements

Mes vifs remerciements s'adressent :

Au bon Dieu, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

A mon encadreur *Mr TACHERFIOUT M*, pour son attention, sa simplicité, sa sympathie et sa générosité scientifique.

Qu'il trouve ici l'expression de toutes nos gratitudee pour son soutien permanent

A *Mr BELMOUHOU B*, pour sa précieuse aide, ses conseils et son soutien l'honneur.

Qu'il trouve ici nos sincères gratitudee et nos sincères remerciements

A *M^{elle} KHETTAL B*, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et nous honoré par sa présidence de jury.

Qu'elle trouve ici nos sincères gratitudee et nos sincères remerciements

A *Mr BASSLI A*, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire parti de jury, pour évaluer notre travail

Qu'il soit assuré de nous respectueuses et très sincères gratitudee

A *Mr BOUKHALFA F*, d'avoir accepté et consacré son temps précieux pour examiner notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre haute considération

A l'équipe de l'animalerie : *SAIDA, HABIBA, TASSAADIT ET LINDA*, pour leur aide précieuse

Nous tenons aussi à remercier *Dr CHEBOUT I.* maitre assistante hospitalo-universitaire en anatomie pathologie du CHU de Bejaia et *M^m HELLALE*, chef de service de laboratoire d'histopathologie de l'hôpital FRANTZ FANON de BEJAIA pour le temps qu'elles nous ont consacré lors de la réalisation des coupes histologiques

FARIDA ET YAMINA.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mon très cher père pour tous ce qu'il a fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour ses encouragements et ses orientations.

Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.

Mes chers sœurs « Kouka et Wissam » en témoignage de toute mon affection.

Mes frères « Sales et Rayane » Nos rayons de soleil à qui je souhaite la réussite.

Mon grand père et Mes grands mère « que Dieu les garde pour notre famille ».

Mes oncles ainsi que leurs épouses.

Toutes mes cousines et tous mes cousins.

Mes meilleurs amis « Kahina, Lydia, Mahmoud, Amar et Yacine ».

Ainsi qu'a tous mes amis (es).

A mon chère binôme Farida et sa famille.

A toute la promotion Biochimie appliquée 2014.

YAMINA.Z

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mon très cher père pour tous ce qu'il a fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour ses encouragements et ses orientations.

Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.

Mes très chères frères « Idir et Ryad » Nos rayons de soleil à qui je souhaite la réussite.

Mes très chères sœurs « Djazira, Naima, Fetta, Kahina et Ouzna » en témoignage de toute mon affection.

A leurs maris.

A mes chères neveux et nièces « Kenza ,Massi, Celina, Sara, Hanine et Rayane ».

A mes très chères tentes.

A mes amies « Bessma, Meriem, Linda, Lisa, Djidji et Rachida ».

A mes copines de chambre.

A mon chère binôme Yamina et sa famille.

A toute la promotion Biochimie appliquée 2014.

FARIDA.Y

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 01

Chapitre I : Généralité sur le diabète

I.1) Définition de diabète 03

I.2) Classification de diabète 03

I.2.1) Diabète type I..... 03

I.2.2) Diabète type II 04

I.2.3) Diabète gestationnel 04

I.2.4) Diabète spécifique 04

I.3) Les critères de diagnostic du diabète 04

I.4) Les complications du diabète 05

I.4.1) Complications aiguës..... 05

I.4.2) Les complications chroniques 05

I.5) Epidémiologie..... 08

I.6) Traitement du diabète de type II..... 09

I.6.1) Approche alimentaire..... 09

I.6.2) L'insulinothérapie..... 09

I.6.3) Les Antidiabétiques Oraux (ADO) 09

II.2) Phytothérapie de l'obésité et du diabète de type II 09

Chapitre II : Généralité sur la plante

II.1) Description de *Rhamnus alaternus L.*..... 13

II.2) Classification..... 14

II.3) reproduction du *Rhamnus alaternus L.*..... 14

II.4) Nomenclature 14

II.5) Ecologie et répartition géographique 15

II.6) Usage traditionnel 15

II.7) Caractéristiques biochimiques..... 15

II.8) Activités biologiques de *Rhamnus alaternus L.*..... 16

II.8.1) Activité anti oxydante.....	16
II.8.2) Activité antimutagène	17
II.8.3) Activité anti-inflammatoire	17
II.8.4) Activité anti-enzymatique	17

Chapitre III : Matériel et méthodes

III-1-Préparation du matériel végétal	18
III-2-Extraction.....	18
III-3-Analyses phytochimiques	19
III-3-1-Dosage des polyphénols totaux	19
III-3-2-Dosage des flavonoïdes	19
III-4-Evaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus</i> <i>alaternus</i>	20
III-4-1-Matériel animal	20
III-4-2-Induction de diabète	21
III-4-3-Mode d'action de la streptozotocine	21
III-4-4-Protocole expérimentale.....	21
III-5-Paramètres suivis durant l'expérimentation.....	21
III-5-1-La quantité de l'eau et de la nourriture consommées.....	21
III-5-2-L'évolution pondérale	22
III-5-3-La glycémie	22
III-6-Paramètres mesurés à la fin de l'expérimentation	22
III-6-1-Dosage du cholestérol total	22
III-6-2-Dosage des triglycérides.....	23
III-6-2-Dosage de HDL.....	24
III-7-Test de tolérance au glucose (OGTT = oral glucose tolérance test).....	25
III-8-Etude histologique	25
III-8-1-Prélèvement des organes	25
III-8-2-Fixation.....	26
III-8-3-Lavage déshydratation et éclaircissement	26
III-8-4- Enrobage à la paraffine et confection des bloque.....	27
III-8-5- Déparaffinage et coloration	28
III-8-6- Visualisation microscopique	28

Chapitre IV : Résultats et discussions

VI-1-Taux d'extraction	29
VI-2-Analyses phytochimiques.....	29
VI-2-1- Teneur en polyphénols totaux	29
VI-2-2- Teneur en flavonoïdes totaux.....	29
IV-3-Evolution de la glycémie	30
IV-4- Variation de poids corporel	32
IV-5- Quantité de nourriture consommée	33
IV-6- Le volume d'eau consommé.....	35
IV-7- Dosage des paramètres lipidiques sanguins	37
IV-8-Effet de l'extrait méthanolique de rhamnus alaternus sur la tolérance au glucose	38
IV-9-Etude histologique du pancréas	34
Discussion des coupes histologique	42
V- Conclusion et perspective	43

Références bibliographiques.

Annexes.

Liste des abréviations

- ACD** : acidocétose diabétique.
- ADA** : American Diabète Association.
- ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- ADO** : antidiabétiques oraux.
- ADP** : adénosine-5-phosphate.
- ATP** : adénosine Triphosphate.
- CHO** : hyperosmolaire non cétosique.
- CONT** : contrôle.
- DAP** : dihydroxyacétone phosphate.
- DO** : densité optique.
- DTG** : diabète gestationnel.
- DTI** : diabète de type I.
- DTII** : diabète de type II.
- EDTA** : éthylène diamine tétra-acétique
- ERO** : espèces réactifs de l'oxygène.
- G3P** : glycérol-3- phosphate.
- Glib** : glibenclamide.
- GPJ** : glycémie plasmatique à jeun.
- GPO** : glycérol phosphate déshydrogénase.
- GPO** : glycémie plasmatique occasionnelle.
- H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène.
- HDL** : High Density Lipoproteins.
- HPGO** : hyperglycémie provoquée par voie orale.
- LDL** : Low Density Lipoproteins.
- LPL** : lipoprotéines lipases.
- Nor** : normale.
- OMS** : organisation mondiale de la santé.
- ONAB** : Office National Alimentation Bétail.
- SEM** : standard error means.
- STZ** : streptozotocine.
- TC** : cholestérol totale.
- TG** : triglycéride.
- VLDL** : Very Low Density Lipoproteins.

Liste des figures

Figure 1 : Feuilles, fruit et fleurs de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	13
Figure 2 : structures chimiques de quelques flavonoïdes de <i>Rhamnus alaternus</i> L	14
Figure 3 : Les feuilles (fraîches et sèches) et poudre de <i>Rhamnus alaternus</i> L	17
Figure 4 : Elevage des souris <i>Swiss albinos</i> au sein de l'animalerie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia	19
Figure 5 : Injection intra péritonéale d'une dose unique de streptozotocine (STZ) à raison de 130 mg.kg ⁻¹ de poids corporel.....	20
Figure 6 : Structure chimique de la Streptozotocine	21
Figure 7 : La dissection des souris	26
Figure 8 : Les étapes d'inclusion par l'automate	27
Figure 9 : Distributeur de paraffine à gauche et réalisation des coupes au microtome LEICA RM 2145 à droite.....	27
Figure 10 : Evolution de la glycémie. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.....	30
Figure 11 : Evolution pondérale durant 20 jours de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.....	32
Figure 12 : Quantité de nourriture consommée. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.....	33
Figure 13 : Quantité d'eau consommée. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM	36
Figure 14 : effet de l'extrait méthanolique sur la tolérance de glucose (OGTT) à une concentration de 2g/kg	38
Figure 15 : Coupe histologique du pancréas (A) lot témoin Gx10 ; (B) lot control Gx10 ; (C) 200mg/kg/jour Gx100 et (D) 400 mg/kg/jour Gx100	41

List des tableaux

Tableau I : les plantes médicinales à effets anti diabétiques	10
Tableau II : classification botanique de <i>R. alaternus L</i>	14
Tableau III : Dosage des paramètres lipidiques sanguins après 20 jours de traitement.....	37

Introduction

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'homme a toujours cherché à se servir des plantes pour s'alimenter d'abord mais aussi pour se soigner. La phytothérapie constitue une alternative sérieuse ou tout au moins un complément appréciable à la pharmacie classique issue de la chimie moderne. Et de nombreux remèdes prescrits ont des principes actifs d'origine naturelle.

Dans la tradition populaire, certaines plantes sont mentionnées pour être des remèdes de différentes maladies parmi lesquelles le diabète. Les recherches modernes ne font que redécouvrir ce savoir acquis au cours des siècles. En effet, de nombreux travaux ont pu démontrer l'activité et les modes d'action thérapeutiques des plantes médicinales (**Schawenberg et Ferdinand, 1977 ; Bézanger-Beauquesne, 1996**).

Le diabète est la première maladie non transmissible reconnue en 2006 par les Nations Unies comme une menace pour la santé mondiale aussi grave que les épidémies infectieuses telles que la tuberculose, le SIDA et la malaria (**Bonita et al., 2003**).

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de sécrétion de l'insuline, de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées. L'hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux (**Peter-Riesch et al., 2002**).

Le genre *Rhamnus* (*Rhamnaceae*), inclut des espèces végétales médicinales bien connue dans le bassin méditerranéen possédants diverses propriétés biologiques (**Mai et al., 2001**). Les propriétés thérapeutiques de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. appelé communément Mèlilés ont été mises en évidence *in vitro*, elles sont dues à des composés actifs tels que les polyphénols (**Ammar et al., 2008**).

Quoique certains auteurs de pays méditerranéens ont entrepris des études limitées sur cette plante (**Ben Ammar et al., 2007; Ben Ammar et al., 2008; Djeridane et al., 2007**), surtout sur la composition de ses huiles essentielles, en Algérie, du moins à notre connaissance cette espèce végétale n'a pas fait l'objet d'études antérieures.

L'objectif de notre étude consiste à tester l'effet antidiabétique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. sur des souris rendu diabétique par la streptozotocine.

Notre travail se divise en deux parties, la première partie est une synthèse bibliographique sur le diabète et le *Rhamnus alaternus* L. La deuxième partie est la partie, expérimentale qui est consacrée à l'étude des effets antidiabétiques de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, suivi de dosage de paramètres lipoprotéiques, ainsi que la réalisation des coupes histologiques.

Chapitre I
Généralité sur le diabète

I-Généralités sur le diabète

I-1 Définition

L'OMS le définit par une glycémie supérieure à 1,26 g/L (7mmol/L) après un jeûne de 8 heures vérifiée par deux prises de sang consécutives, ou supérieur à 2g/L quelque soit l'heure du prélèvement en présence de symptômes clinique (polyurie, polydipsie et amaigrissement). (**Scheen et Luyckx , 2010**). C'est une pathologie du métabolisme en glucose provoquée par un dysfonctionnement des cellules β des îlots de Langerhans, sécrétrices de l'insuline, ou une mauvaise assimilation de cette dernière par les tissus périphériques (l'insulinorésistance) (**Wens et al., 2005**).

I-2-Classification du diabète

Selon l'étiologie et la physiologie, quatre grands groupes de diabète sont distingués selon la dernière révision de la classification du diabète (**Guillausseau, 1997**). Diabète type I (DTI), Diabète type II (DTII), Diabète gestationnel (DTG) et Autres types spécifique de diabète.

I-2-1 Diabète de type I

Le diabète type I, également appelé diabète insulino-dépendant ou autrefois, diabète juvénile, est un état d'hyperglycémie chronique dû à une affection de pancréas endocrine dont les îlots de Langerhans ne secrète plus d'insuline (insulinopénie) (**Calop et al., 2008**). C'est une forme de diabète sucré qui apparait de manière brutale chez l'enfant et l'adolescent, mai peut également survenir chez le jeune adulte (<40ans) et il concerne 10% des diabétiques (**Gille Côté et al., 2013**).

On distingue deux sous-types dans la classification de l'American Diabetes Association (**Senec, 2006**). Le diabète de type I auto-immun au cours duquel la destruction des cellules β par un processus auto-immun est authentifiée par la présence d'anticorps anti-cellules d'îlots. Cette forme est la plus fréquente elle représente plus de 90 % des cas en Europe. Le diabète de type I idiopathique caractérisé par l'absence d'auto-anticorps. Il s'agit d'un cadre nosologique mal défini, incluant les diabètes céto-siques du sujet noir originaire d'Afrique subsaharienne et les diabètes suraigus japonais.

I-2-2 Diabète de type II

Le diabète de type II, autrefois dit non insulino-dépendant ou diabète d'âge mûr, il survient généralement chez les sujets d'âge mûr (plus de 40 ans). C'est la forme la plus répandue (90% des cas) dans toutes les régions de globe (**Portha, 2003**). L'hyperglycémie dans le diabète de type II est due à une réduction du captage du glucose et à une production glucosée hépatique excessive, liées à une diminution de l'insulinosécrétion et de l'insulinosensibilité (**Virally et al., 2007**).

L'insulinorésistance ou anomalie de l'action de l'insuline en périphérie, est la deuxième anomalie observée. Elle se traduit au niveau hépatique par une augmentation de la production de glucose et au niveau musculaire, par une diminution de l'utilisation du glucose (**Busch-Brafin et Pinget, 2001 ; Scheen et Luyckx, 2010**). Le diabète type II a un caractère familiale et est souvent associé à un excès de poids (obésité), à l'hypertension artérielle et à l'hypertriglycéridémie (**Grimaldi, 2004**).

I-2-3 Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est un trouble métabolique de gravité modérée apparaissant en fin de grossesse en relation avec une résistance à l'insuline augmentée et/ou déficit de sécrétion d'insuline et qui disparaît dans le postpartum (**Lesluyes et Vialettes, 1996**).

I-2-4 Le diabète spécifique

Est un ensemble hétérogène d'affections du pancréas, d'endocrinopathies, de diabètes médicamenteux ou chimiques, et d'affections génétiques, en particulier au niveau de la cellule β (**Benhamou, 2005**).

I-3-Les critères de diagnostic du diabète

En 1997 le niveau standard pour un taux de glucose normal fut réduit par l'American Diabète Association (ADA) car beaucoup de personnes souffraient des complications dues au diabète même si n'étaient pas diabétique selon les standards (**Scheen et Luyckx, 2010**). En 2003, le standard fut à nouveau modifié, la commission publia le nouveau standard pour le diagnostic en se basant sur les critères suivants (**Rubi et Alan, 2007**).

- **Glycémie plasmatique occasionnelle (GPO) :** c'est le niveau de glucose à tous moment de la journée. Elle doit être $\geq 2\text{g/L}$ ou $11,1\text{mmol/L}$ et accompagner de symptômes classiques de diabète (polyurie, polydipsie, perte de poids inexplicé).
- **Glycémie plasmatique à jeun (GPJ) :** c'est le niveau de glucose en absence de prise alimentaire calorique depuis au moins 8 heures. Elle doit être $\geq 1,26\text{g/L}$ ou $7,0\text{mmol/L}$.
- **Hyperglycémie provoquée par voie orale (HPGO) :** c'est le niveau de glucose après une administration de 75g de glucose dissous dans 250ml de l'eau par voie orale. Elle doit être $\geq 2\text{g/L}$ ou $11,1\text{mmol/L}$.

Chacun des critères précédents doit être confirmé par au moins un des trois autres. Pratiquement c'est la glycémie à jeun qui est avant tout recommandée, étant la plus rapide à effectuer, la plus commode pour les patients, la plus reproductible ainsi que la moins chère. (OMS, 2012).

I-4-Les complications du diabète

I-4-1 Complications aiguës

L'acidocétose diabétique (ACD), le coma l'hyperosmolaire non cétosique (CHO) et l'hypoglycémie sont des complications aiguës du diabète. L'acidocétose diabétique s'observe principalement chez les sujets atteints du diabète de type I, et le coma hyperosmolaire chez les sujets à diabète de type II; ces troubles sont associés à une carence absolue ou relative en insuline, une déplétion volémique et une altération de l'état mental (Eugene Braunwad et *a.l*, 2002).

I-4-1-1-Acidocétose diabétique

L'acidocétose est un désordre métabolique qui traduit une carence relative ou absolu d'insuline empêchant la pénétration cellulaire du glucose, associé à une élévation des hormones de la contre régulation glycémique (glucagon, catécholamine, cortisol...etc.).

La carence insulinique favorise la mise en place d'un état catabolique avec activation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse, et formation des corps cétonique dans le foie, ainsi que l'augmentation de la libération intra hépatique de substrats issus de tissu adipeux et des muscles (acides gras libres, acides aminés). L'ACD apparaît généralement en quelques

jours précédés d'une phase de cétose simple qui se manifeste par des nausées et des vomissements qui dominent souvent, une douleur abdominale, une glycosurie, une déplétion volémique et une tachycardie (**Grimaldi ,2009**).

I-4-1-2-Le coma hyperosmolaire

Ce type de coma est rare et grave, survient chez les sujet âgé, porteur d'un DT II. Il est caractérisé par une déshydratation massive, se définit par une osmolarité supérieure à 350 mmol/L due à une hyperglycémie importante de l'ordre de 8 à 10 g/L (**Idelam et al., 2000**). La cétose absente ou discrète est corrélée à l'absence d'élévation importante des acides gras libres. Cette inhibition de la lipolyse s'expliquerait par la persistance au début du processus d'une insulinémie périphérique insuffisante pour permettre la pénétration intra-cellulaire du glucose, mais suffisante pour inhiber la lipolyse (**Grimaldi ,2009**).

I-4-1-3-L'acidose lactique chez les diabétiques

C'est une accumulation d'acide lactique par catabolisme anaérobie de glucose. Aussi grave que rare, elle complique le sujet ayant DT II traités par biguanides en cas d'insuffisance rénale ou hépatique (**Grimaldi ,2009**).

I-4-1-4-L'hypoglycémie

Le coma hypoglycémique survient en cas d'inadéquation entre les doses d'insuline et les besoins (un effort physique sans réduction des doses d'insuline ou une réduction des apports alimentaires) ou en cas de surdosage accidentel ou volontaire d'insuline. C'est un coma brutal plus fréquent du DT I, cependant elle peut entraîner des crises convulsives, un traumatisme accidentel et une ischémie myocardique chez les patients ayants une cardiopathie sous-jacente (**Lonlay et al ., 1998**). Les symptômes de l'hypoglycémie sont : neurovégétatifs (sudation, tremblement, palpitation, tachycardie, faim impérieuse et anxiété) ou neuroglucopénique (confusion, somnolence, difficulté d'élocution, incapacité de se concentrer et incoordination) (**Landry et al., 2006**).

I-4-2 Les complications chroniques

Ces complications chroniques font suite à une hyperglycémie de longue durée (de 5 à 15ans) (**Grimald, 2009**). Elles sont associées à des complications organiques spécifiques touchant particulièrement, les yeux, les nerfs, les reins, le cœur et les vaisseaux, qui provoquent un risque de métabolite très élevé. Ces complications se divisent en 2 groupes :

Les microangiopathie et les macroangiopathie. La microangiopathie touche la microcirculation tandis que la macroangiopathie touche les gros vaisseaux allant de l'aorte jusqu'aux petites artères distales de diamètre supérieure à 200µm (**Racch, 2004**).

I-4-2-1-La microangiopathie diabétique

Elle se caractérise par l'apparition retardée de lésions caractéristiques dont les conséquences se manifestent au niveau de la rétine, des glomérules rénaux et des nerfs périphériques. La prévalence de ces lésions est fonction du temps et de la qualité du contrôle métabolique exprimée en valeur moyenne du pourcentage d'hémoglobine glyquée, on distingue :

(i) La rétinopathie diabétique

C'est une cause majeure de malvoyance et de cécité, et la première cause de cécité avant l'âge de 50 ans. La prévalence actuelle de la rétinopathie est de 40% après 10 ans de diabète (**Henricsson et al., 2003 ; Grimald A., 2009**).

(ii) La néphropathie diabétique

C'est une pathologie du glomérule secondaire au diabète. Environ 30% des diabétique de type I présente une néphropathie (**Caulin, 2009**).

(iii) La neuropathie

Le diabète est actuellement la première cause de neuropathie dans le monde. La prévalence des neuropathies augmente avec la durée du diabète, des signe de neuropathie sont observés chez 8% des patients au moment du diagnostic du diabète et chez 50% des réexaminés 25 ans après (**Pcart, 1977**).

(iiii) Le pied diabétique

Il s'agit d'une complication grave et fréquente du diabète puisqu'elle est une des premières causes d'hospitalisation prolongée. Les lésions du pied représentent un problème socio-économique important. Cette complication résulte de 3 facteurs : la diminution de la vascularisation, la présence de lésions neurologiques à l'origine d'une diminution de la sensibilité, et la déminéralisation des os du pied (**Grimaldi, 2009**)

I-4-2-2-La macroangiopathie diabétique :

La macroangiopathie est à l'origine des complications les plus graves du diabète et constitue la première cause de mortalité des patients diabétiques. Elle est définie comme étant l'atteinte des grosses artères, regroupe l'ensemble des complications artérielles des territoires coronaires, cérébraux et périphériques. Deux types d'atteintes peuvent survenir sur ces réseaux artériels : l'athérome d'une part, et la sclérose artérielle non athéromateuse d'autre part (**Grimaldi, 2009**).

L'athérome, d'installation lentement progressive, est caractérisé par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères de gros et de moyen calibre. Cette évolution peut aboutir à des manifestations ischémiques chroniques entrecoupées d'épisodes aigus athéro-thrombotiques (**Grimaldi, 2009**).

L'artériosclérose est une sclérose de l'ensemble de la paroi artérielle (non limitée à l'intima), pure (sans athérome), non focale et diffuse (touchant tous les calibres artériels) (**Tuomilehto et al., 1996**).

I-5-Epidémiologie

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a annoncé en 2012 que plus de 250 millions de personnes sont atteintes de diabète dans le monde dont 90% sont diabétiques de type II. Selon cette même organisation, le nombre de diabétiques dépassera 366 millions d'ici 2030 si rien n'est fait pour enrayer l'épidémie (**Soedamah-Muthu et al., 2006**).

En Algérie, selon les déclarations du ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière à l'occasion de la journée mondiale du diabète, l'Algérie compte, en 2010, plus de 2,7 millions de diabétiques et risque d'en comptabiliser près de 5 millions, en 2025, si des mesures de prévention ne sont pas prises (**Lounes, 2011**). Le diabète de type II occupe la quatrième place parmi les maladies non transmissibles et sa prévalence ne cesse pas d'augmenter. Elle est beaucoup plus élevée par rapport à celle mondiale (7.3% contre 3,5%). (**Boudiba et Mimouni-Zerguini, 2008**).

I-6-Traitement du diabète de type II

I-6-1-Approche alimentaire

Dans 10 à 20% des cas de diabète de type 2 récemment diagnostiqués, un contrôle adéquat de la glycémie peut être obtenu, parfois temporairement, uniquement par une restriction calorique. Le traitement non pharmacologique et en particulier la réduction du poids pour le patient obèse, est le seul traitement intégral capable de contrôler simultanément la plupart des problèmes métaboliques du patient atteint de diabète de type II, ainsi que l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, l'hypertriglycéridémie et l'hypertension artérielle (Caulin, 2009).

I-6-2) L'insulinothérapie

L'installation d'une carence progressive de la sécrétion d'insuline conduit tôt ou tard à recourir à l'insuline chez la plupart des DTII. Si ce recours n'est pas tardif, des schémas simples souvent en association aux antidiabétiques oraux (ADO) peuvent s'avérer efficaces. Ils sont relativement aisés à mettre en œuvre à la condition d'une bonne éducation du patient (Halimi, 2008). On débutera, le plus souvent par une injection d'insuline semi-lente quotidienne assurant un taux basal d'insuline (Yki-Jarvinen, 2002).

I-6-3-Les Antidiabétiques Oraux (ADO)

Les antidiabétiques oraux sont nécessaires dès lors que la diététique et l'activité physique combinées ne suffisent pas, ce qui est habituel. 05 classes d'ADO sont actuellement disponibles et qui peuvent agir par deux modes différents, soit ils jouent le rôle d'hypoglycémisants (les sulfonylurées et les analogues des méglitinides) qui agissent en stimulant la libération d'insuline préformée par le pancréas, soit ils jouent le rôle d'anti-hyperglycémisants (les biguanides, les thiazolidinediones et les inhibiteurs de l' α glucosidase) qui exercent leur action antidiabétique en empêchant la glycémie d'augmenter sans toutefois la faire chuter (Scheen, 2007).

II-2) Phytothérapie de l'obésité et du diabète de type II

Les plantes utilisées pour réduire la glycémie et améliorer le diabète de type II sont représentées dans le tableau I.

Tableau I : les plantes médicinales à effets anti diabétiques

Nom scientifique	Nom commun	Partie et Mode d'utilisation	Référence
<i>Allium sativum</i>	Ail	Consommer les gousses d'ail cru 1 à 2 gousses par jour (écrasée ou finement hachée), ou en poudre 0,5 à 1g par jour (en gélules gastrorésistantes), ou en teinture alcoolique (20 à 30 gouttes par jour)	Fort, 1976
<i>Azadirachta indica</i>	Margousier	les feuilles, graines et les ramilles Décoction, macération, jus. L'extrais des feuilles sont employer pour le traitement du diabète.	Mutalik, 2005
<i>Ocimum sanctum</i>	Basilic Sacré	Les parties aériennes, Les feuilles Décoction composée : 8 à 15 g/j et prend une tasse par jour. Infusion simple (après les repas) et décoction.	Fort, 1976.
<i>Olea europea</i>	L'olivier	Feuilles, huile : en infusé ou même en décoction, à raison de 20 à 50g/L d'eau. On peut utiliser la poudre des feuilles d'olivier en gélules. par pression, l'huile qui est très digestible non cuite et qui	Moatti et al., 1983
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Fenugrec	Graines : 50 g de poudre de graines, 2 fois par jour pendant 10 jours, chez des diabétiques non insulinodépendants, réduisait de façon significative la glycémie à jeun et la fuite urinaire du glucose ainsi que le taux de lipides sanguins.	Aissa , 2000
<i>Allium cepa</i>	L'oignon	Le bulbe et son suc : consommation quotidienne d'oignon cru à raison de 30 à 40 g par jour (assez difficile à supporter) mais l'oignon cuit et son extrait aqueux sont également hypoglycémiant (soupe, infusion), ou teinture mère (40 à 50 gouttes 3	Valnet, 1985

		fois/jour)	
<i>Salvia officinalis</i>	Sauge	Les feuilles, les fleurs, et l'huile essentielle Infusion : 20 g pour 1L.d'eau bouillante, infuser 10mn, 3 tasses par jour Tisane : 1 cuillère de thé bien remplie dans 1/4 de litre d'eau bouillante, infusé rapidement.	Aissa B, 2000
<i>Galiga officinalis</i>	La galéga	20 g d'extrait mou de galéga, 50 g de glycérine neutre, qsp 300 ml d'eau Une cuillerée à soupe 2 fois par jour. Infusion : 10 g de plante séchée de galéga et 30g des feuilles séchées de myrtille pour un litre d'eau bouillante Infuser 5 minutes Deux tasses par jour loin des repas.	Valnet, 1983
<i>Ajuga iva</i>	L'ivette	Les feuilles : macération pendant une nuit des feuilles du laurier noble avec la plante de l'ivette. 2 verres par jour à jeun avant les repas	Bennaghmouch L et al., 2002
<i>Momordica charantia</i>	Concombre amer	Les fruits, les graines, les feuilles ou la plante entière. l'extrait de <i>Momordica charantia</i> entraîne une baisse significative de la glycémie. La plante (amère) est utilisée crue (jus, salade), cuite à l'eau (soupe, infusion, épinard), ou frite à l'huile	Goetz, 2007
<i>Cannelle de Ceylan</i>	Cannelle	La prise de la cannelle par voie orale de 1, 3, ou 6g par jour réduit le taux sérique de glucose	Goetz, 2007
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	Les feuilles et l'huile. obtenue par distillation à la vapeur. Infusion : 3 à 4 feuille (ou une cuillerée a café de feuille coupée)/tasse, faire bouillir durant 1mn laissé infuser 10mn. Boire 3 à 5 tasses/jour. Poudre en cachets de 0.50g, à raison 6 à 10/jour. sous forme alcoolature à raison 2à 4g/jour. ou	Goetz, 2007

		l'huile sous forme de gouttes 2 à 5/jour.	
<i>Camellia sinensis</i>	Thé	Les feuilles : Infusion 30 à 40 g de feuilles (une petite poignée) dans 1 litre d'eau très chaude, infuser 15 minutes, boire 3 à 6 tasses par jour	E. M. P., 2001
<i>Rubus ulmifolius</i> <i>Schott</i>	Ronce à feuilles d'Orme	feuilles, fleurs en boutons, jeunes pousses et fruits. infusion 10g de feuilles dans 500ml d'eau bouillante pendant 15mn. Il est conseillé de boire 2 tasses/jour loin des repas	Fort, 1976
<i>Vincadiformis</i> Pourr. <i>Minor</i>	Petite pervenche	feuilles. Décoction composée de 10 à 15g/l, boire un litre de la décoction pendant 10 jours.	Fort, 1976 ; Aissa, 2000;

Chapitre II
*Généralité sur *Rhamnus**
alaternus L

II-Généralités sur *Rhamnus alaternus* L.

II-1-Description botanique de *Rhamnus alaternus* L

Rhamnus alaternus L. est une espèce végétale qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*. Les plantes de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle et en préparation culinaire, c'est une famille cosmopolite d'arbres, arbustes et herbacées qui contient environ 50 genres et 900 espèces (Richardson et al., 2000), de 2-6 mètres de hauteur, ayant des tiges droites (Izhaki et al., 2002 ; Hemmami et al., 2006 ; Bas et al., 2009). En Algérie, 9 espèces végétales appartenant à 3 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques (Quezel et Santa, 1963).

Rhamnus alaternus L. est un Arbuste toujours vert, parfois très grand, à feuilles luisantes, ovoïdes ou lancéolées, sont alternes, lisses, pétiolées (3-6 cent, sur 2-3), à bords cartilagineux et dentées, Elles restent sur l'arbre pendant deux années environ, coriaces, à nervure médiane épaisse, trinervées à la base. Ce genre de plante produit des fruits charnus qui mûrissent vers la fin du printemps début d'été, et ça représente une source importante d'eau et de nutriments pour les oiseaux et les petits mammifères (Gulias et al., 2004).

La croissance de *R. alaternus* est lente, sa longévité considérable. Son bois est à fibre courte et cassante, très lourd, très homogène, d'un grain fin, blanc jaunâtre à l'état d'aubier, brun clair ou foncé à l'état parfait comme le chêne (Mathieu, 1860). Ces différentes caractéristiques font de cette plante une espèce très ancienne et très importante de la méditerranée ou elle s'est bien adaptée pour les températures très élevés, les radiations solaires et les déficits de vapeur et de pression (Martinez-sanchez et al., 2008).



Figure 01 : Feuilles, fruit et fleurs de *Rhamnus alaternus* (Aronne et Wilcock, 1995).

II-2 Classification : La classification de *Rhamnus alaternus* est représentée dans le tableau II
Tableau II : classification botanique de *R. alaternus* L (Yi-ling et Pan-Kai, 1982)

Taxon	Nom
Domaine	Eukaryota- Eucaryote
Règne	Plantae Végétale.
Sous Règne	Viridiaeplantae- Plantes Vertes
Règne	Magnoliophyta- Plantes A Fleurs
Sous Phylum	Spermatophytina-Plantes A Graines
Infraphylum	Angiospermae-Angiosperme
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida Dicotylédones
Sous Classe	Rosidae
Super Ordre	Rhamnanae
Ordre	Rhamnales
Genre	Rhamnus
Nom Binominal	Rhamnus Alaternus
Famille	Rhamnaceae

II-3 Reproduction de *Rhamnus alaternus* L

L'inflorescence des plantes masculines et femelles se produit en décembre, mais l'éclosion des fleurs commence fin février au début de mars (Aronne et Wilcock, 1995), et l'inflorescence masculine commence habituellement 1 à 2 semaines avant les femelles (Rottenberg, 2000) et produit 4 fois autant de fleurs que les femelles (Aronne et Wilcock, 1995), les fleurs jaunâtres produisent du nectar et du pollen, et la pollinisation est stimulés par les insectes et le vent (Bas et al., 2005 a).

II-4 Nomenclature

En arabe : Am'lile'ce, M'lila, Soitfair, Oud El-khir ou bien Safir. En Kabyl : Mélilés (Bhouri et al., 2012; Debeaux, 1984). En anglais : Buckthorn. En Français : Nerprun, En Allemand : Kreülzdorn. En Espagnol : Aladierna, Cosco Unia, Sanguino de Andalucia. En Italien : Alaterno, Legno Puzzo (Gubb, 1913).

II-5 Ecologie et répartition géographique

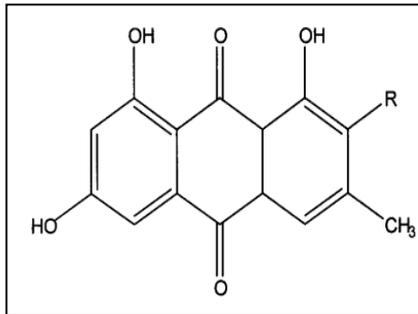
Cet arbrisseau est caractéristique de la zone littorale et, uni aux lentisques, à l'arbousier, au myrte et à d'autres plantes à feuilles persistantes, il joue un rôle important dans la composition des maquis qui couvrent une bonne partie du littoral et des îles de la Méditerranée. *R. alaternus* habite les coteaux secs et calcaires du Sud de la France, de la Corse, de l'Algérie, du Nord de la Tunisie (**Chancerel, 1920 ; Ben Ammar et al., 2008**). En France, il se trouve encore dans l'Isère, l'Ardèche, l'Aveyron, le Lot, la Vienne, le Maine-et-Loire et en Bretagne (**Penzig, 1902**).

II-6 Usage traditionnel

En médecine traditionnelle *R. alaternus* a été employé en tant que digestif, diurétique, hypotensif et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (**Bhourri et al., 2012**). Les baies de *R. alaternus* ont une action purgative, d'une saveur âpre, employés en médecine vétérinaire (**Gubb, 1913**). Les feuilles en infusion constituent des gargarismes astringents (**Chancerel, 1920**).

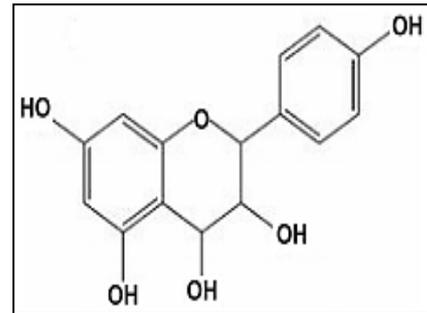
II-7 caractéristiques biochimiques

L'étude photochimique sur les extraits de la partie aérienne, et les racines de *R. alaternus* L. a révélé la présence de diverses quantités d'anthraquinones, de coumarines, de tannins et en particulier des flavonoïdes (**Ben Ammar et al., 2008**); dont on trouve des flavonoïdes glycosylés tel que le kaempferol 3-O-Bisorhamninoside, le rhamnocitrin 3-O-Bisorhamninoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamninoside (**Ban Ammar et al., 2009**), et des flavonoïdes aglycones comme le kaempferol, la quercétine et l'apigénine (**Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2009**). Elle est aussi riche en flavones hétérosides (**Stocker et al., 2004**) et coumarines (**Ben Ammar et al., 2005**).

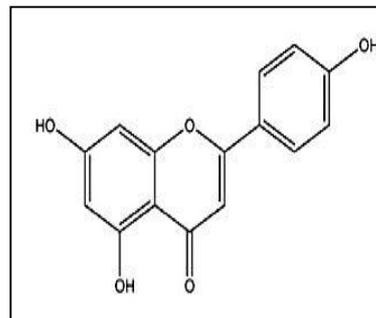


R=H emodine

R=OH alaternine (bortolomeazzi et al., 2007).



Kaempferol (jain et batil , 2010)



Apégénine (Kawasaki et al., 2010).

Figure 02 : structures chimiques de quelques flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* L.

II-8 Activités biologiques de *Rhamnus alaternus*

II-8-1 Activité anti oxydante

Certains extraits de *Rhamnus alaternus*, ont un potentiel d'activité antioxydante liée à la composition de la plante en flavonoïdes et polyphénols (Ben ammar, et al., 2008 bhourri et al., 2012). Les flavonoïdes neutralisent les radicaux libres, en se liant directement à ces derniers.

Les flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* sont de bon chélateurs de métaux qui jouent un rôle important dans le métabolisme de l'oxygène et l'apparition des espèces réactifs de l'oxygène (ERO) et la réduction du H₂O₂ par génération de quantité importante de radicaux libres hydroxyles [Aschok, 2001]. Les travaux de Kelly (2002) et Yen (1995) ont démontré que les flavonoïdes, sont de bons donneurs d'électrons et d'hydrogène ce qui leur confère la

capacité de terminer la chaîne de formation des radicaux, en convertissant les radicaux libres et les ERO en produits stables.

II-8-2 Activité antimutagène

L'effort oxydant (le déséquilibre) provoqué par des espèces réactives de l'oxygène induit l'oxydation des biomolécules menant aux dommages cellulaires (**Ben Ammar et al., 2008**). L'extrait organique de *R. alaternus* a une propriété antimutagène qui se traduit par l'inhibition des agents mutagène (Aflatoxine B1) qui pourrait être due à l'abondance des flavonoïdes et des tannins (**Ben Ammar et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2007**).

II-8-3 Activité anti-inflammatoire

Des études ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* possèdent des activités anti-inflammatoires. Ces activités sont corrélées avec la composition en polyphénols surtout en flavonoïdes, tannins et les anthraquinones tels que l'émodin, cette propriété est due principalement à leurs activités de piégeage des radicaux libre (**Ben Ammar et al., 2005**).

II-8-4 Activité anti-enzymatique

Des études in vitro ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* inhibent significativement l'activité des carboxyl estérases, enzymes largement distribuées dans les tissus animaux, essentiellement impliqués dans le catabolisme du nombreux xénobiotiques, tels que des carboxylesters, des thio-esters et des amides aromatiques. Cette propriété inhibitrice est attribuée aux flavonoïdes qui exercent une activité non compétitive (**Stocker et al., 2004**).

Chapitre III
Matériels et méthodes

III-Matériel et méthodes :

III-1-Préparation du matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Rhamnus alaternus* L, récoltées au niveau du village Taghzouit de la région de Bejaia durant le mois mars 2012. Une fois récoltée, les feuilles fraîches de *Rhamnus alaternus* ont été séchées à l'air libre pendant 20 jours, puis transférées à l'étuve à 35 °C pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et une meilleure extraction. Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les particules ainsi obtenues après broyage sont tamisées sur un tamis de diamètre de 250µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stocké à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à extraction (Figure02).



Figure 03 : Les feuilles (fraîches et sèches) et poudre de *Rhamnus alaternus* L.

III-2-Extraction

L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal selon le protocole préconisé par (Owen et Johns, 1999) avec de légère modification. 20g de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* sont macérés dans 200 ml de méthanol. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 07 heures à une température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée plusieurs fois sur papier de Wattman N°03, et le filtrat est récupéré (filtrat 1). Ensuite, 150 ml de méthanol ont été ajoutée pour le précipité, et le mélange a été laissé sous agitation pendant une nuit (afin d'avoir une extraction exhaustive) et ensuite filtré dans les même conditions, le filtrat (filtrat 2) est récupéré.

Les deux filtrats ont été mélangé et lavé avec l'éther de pétrole dans une ampoule à décanter pour éliminer les matières lipophiles (chlorophylle, cires...etc) et laisser pour évaporation dans une haute puis transférer à l'étuve à 40 °C jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant et le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

P0 : poids de la poudre avant extraction.

P1 : poids de l'extrait sec après extraction

III-3-Analyses phytochimiques

III-3-1-Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits a été déterminé en suivant le protocole d'**Owen et Johns (1999)**, avec quelques modifications. Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange jaune d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) qui se réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration est proportionnelle aux taux des composés phénoliques (**Ribéreau-Gayon et al., 1982**).

A température ambiante, 250 μ l d'extrait ont été ajoutés à 1,25ml du réactif de Folin-Ciocalteu (0,1N) et le tout est bien mélangé. Après 5 min d'incubation, 1 ml d'une solution de monohydrate carbonate de sodium (7,5% p/v) a été ajoutée et le tout est bien mélangé. La préparation a été laissée incuber pendant 1 heure à l'obscurité, puis l'absorbance a été mesurée à 740 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait est remplacé par le solvant. Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage de l'échantillon.

La quantité des polyphénols totaux est exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique (mg EAG/g d'extrait) (annexe I).

III-3-2-Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïde des extraits a été déterminé en suivant le protocole de **Quettier-Deleu et al. (2000)**, avec quelque modification. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres en présence du chlorure d'aluminium, grâce aux groupements hydroxyles libres (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait (**Berset, 2006**).

A température ambiante, 1 ml de la solution d'extrait est ajouté à 1 ml d'une solution de chlorure d'aluminium (2%), le tout bien mélanger. Après incubation pendant 15 min, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 410 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait est remplacé par le solvant. Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de la quercétine dans les mêmes conditions que le dosage de l'échantillon. La quantité des flavonoïdes est exprimée en équivalents milligramme de quercétine (annexe I).

III-4-Evaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* L

III-4-1-Matériel animal

25 souris male *Swiss albinos* pesant entre 30 et 35g (au début de l'expérimentation) sont utilisées dans cette expérimentation. Elles sont issues par élevage au niveau de l'animalerie de la faculté de pharmacie de l'Université Mentouri de Constantine.

Les souris ont été placés dans des cages transparentes en polypropylène ou chaque cage regroupe 5 souris, à une température ambiante de 20 à 24°C, avec un cycle de 10/14 h (lumière/obscurité), et disposés de granules d'aliment standard provenant de L'ONAB (Office National Alimentation Bétail), El-Kseur de Bejaïa, et l'eau de robinet. La litière utilisée est la sciure renouvelée 3 fois par semaine pour garder le bon conditionnement hygiénique des souris.



Figure 04 : Elevage des souris *Swiss albinos* au sein de l'animalerie du l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

III-4-2-Induction de diabète

Pour évaluer l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* un diabète sucré similaire au diabète type II a été induit par injection intra-péritonéale d'une dose unique de streptozotocine (STZ) (sigma, St louis, USA) à raison de 130 mg.kg^{-1} de poids corporel aux souris mis à jeun pendant environ 16 heures,.

La streptozotocine est reconstitué juste avant l'administration dans un tampon citrate (0,05M, PH 4,5). Après 72 heures de l'injection, une évaluation de glucose sanguin est effectuée au niveau de la veine principale de la queue en utilisant un glucomètre (**Fujita et al., 2005**).



Figure 05 : Injection intra péritonéal d'une dose unique de streptozotocine (STZ) à raison de 130 mg.kg^{-1} de poids corporel

III-4-3-Mode d'action de la streptozotocine

La streptozotocine captée par la cellule β pancréatique via le transporteur de glucose GLUT2, la réduction de l'expression des transporteurs GLUT2 est un moyen de prévention adopté par la cellule contre l'action diabétogène de la STZ. La STZ détériore l'oxydation de glucose et provoque l'insulite, et la diminution de la sensibilité de la cellule β au glucose, (**Szkudelski, 2001**).

Parmi les principales actions de ce diabétogène, contribuant dans la destruction de la cellule β pancréatique, est l'alkylation de l'ADN par la methylation de la guanine, par conséquent la methylguanine s'apparie par erreur avec la thymine (**Bolzan et Bianchi, 2002**). La STZ induit également la formation de radicaux libres qui contribuent dans la destruction

des cellules β pancréatiques ; après leur formation, ces molécules agissent en synergie avec la STZ pour générer un dommage au niveau de l'ADN (Pavana *et al.*, 2007).

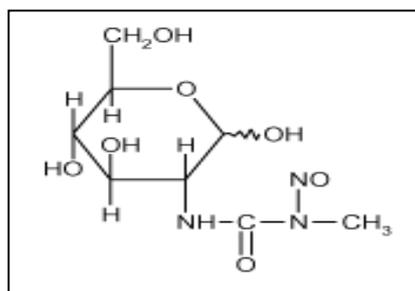


Figure 06 : Structure chimique de la Stréptozotocine (Konrad *et al.*, 2001).

III-4-4-Protocole expérimentale

Dans ce modèle expérimental, 25 souris mâles *Swiss Albinos* sont rendues diabétiques par injection intra-péritonéale d'une dose unique de streptozotocine (STZ) à raison de 130 mg/kg de poids corporel. Les souris dont le glucose sanguin est supérieur de 2g/l sont considérées diabétiques et réparties d'une façon homogène (glycémie et poids) en 05 groupes de 05 souris chacun.

Le groupe I (control normal) reçoit un gavage avec de l'eau physiologique. Le groupe II (control diabétique) reçoit une injection unique intra péritonéale de 130mg/kg de streptozotocine et un gavage quotidien avec de l'eau physiologique. Les groupes III, IV et V reçoivent une injection unique intra péritonéale de 130mg/kg/ de streptozotocine et un gavage quotidien respectif avec 20 mg/kg de glibenclamide (un médicament hypoglycémiant, appartenant à la classe des sulfamides), 200 mg/kg/jour et 400 mg/kg/jour de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*.

Le jour où les souris sont devenues diabétiques et réparties en groupe est considéré comme le jour J₀. L'étude a été réalisée durant 20 jours à partir du jour J₀ et plusieurs paramètres ont été suivis durant cette période à intervalle régulier de 05 jours (Annie *et al.*, 2005).

III-5-Paramètres suivis durant l'expérimentation

III-5-1-La quantité de l'eau et de la nourriture consommées

La quantité de nourriture et le volume de l'eau consommée par les souris s'avèrent deux paramètres essentiels dans l'étude de l'évolution du diabète, pour cela ces deux

paramètres ont été mesurés quotidiennement pendant la période de l'expérimentation. Une quantité de nourriture a été pesée puis offerte aux souris de chaque lot, et après 24 heures, la quantité de nourriture restante a été estimée afin de déduire la quantité consommée. Le volume de l'eau consommé par chaque lot a été mesuré avec la même méthode.

III-5-2-L'évolution pondérale

L'évolution pondérale est l'un des paramètres cruciaux qui détermine l'état d'un diabétique, et en raison d'une perte du poids très considérable qui accompagne l'apparition de la maladie, le suivi de la variation pondérale des malades s'avère très important pour se renseigner de la situation de ces derniers.

Pour pouvoir suivre la variation pondérale des animaux pendant l'expérimentation, la moyenne du poids de toutes les souris a été mesurée avant l'induction du diabète. L'évolution du poids des souris de chaque lot a été mesurée chaque cinq jour à l'aide d'une balance électronique jusqu'aux 20^{ème} jours.

III-5-3-La glycémie

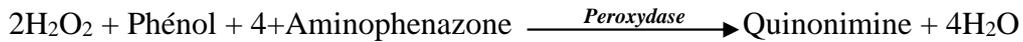
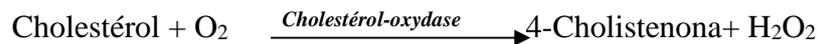
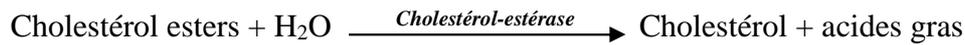
La glycémie est mesurée chaque cinq jour à l'aide d'un glucomètre et des bandelettes (one touch ultra) pour chaque souris. La prise de sang se fait par incision au niveau de la queue sur les souris non anesthésiées, après mise à jeun pendant 16 heures avec libre accès à l'eau.

III-6-Paramètres mesurés à la fin de l'expérimentation

Au 20^{ème} jour de l'étude, les souris ont été mises à jeun durant la nuit. Le prélèvement sanguin a été effectué sous anesthésie sous l'effet de l'éther par voie de la veine jugulaire. Une fois le sang est récupéré dans des tubes contenant l'EDTA, il est centrifugé à 3000tours/minute pendant 30 minutes pour récupérer le sérum qui va servir au dosage des lipoprotéines plasmatiques (Triglycérides, Cholestérol total, et HDL-Cholestérol).

III-6-1-Dosage du cholestérol total

Le cholestérol plasmatique est libéré par le cholestérol estérase à partir des esters de cholestérols puis oxydés par le cholestérol oxydase en cholestenona, parallèlement à la libération des molécules H₂O₂. L'intensité de la couleur formé, est proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon. L'origine de la coloration donnée est du à la formation d'un complexe selon la réaction suivante (SPINREACT, 2013) (Annexe II).



Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré dans le tableau ci-dessus. Après mélange et incubation pendant 05min à 37°C, les absorbances sont lues à 505nm et la couleur est stable pendant au moins 60 minutes.

	Blanc	Standard	Echantillon
R (ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (µl)	-----	10	-----
Echantillon (µl)	-----	-----	10

Le taux du cholestérol total est calculé selon la formule suivante

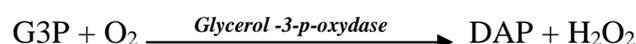
(A échantillon / A standard) × 200 = mg/dL de cholestérol dans l'échantillon.

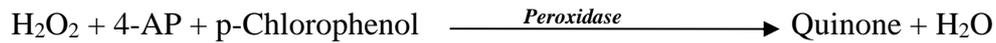
Le facteur de conversion : mg/dL × 0.0258 = mmol/L.

III-6-2-Dosage des triglycérides

Les triglycérides de l'échantillon sont incubés avec les lipoprotéines lipases (LPL), qui libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3- phosphate (G3P) et adénosine-5-phosphate (ADP) par le glycérol kinase en présence d'ATP. Le glycérol-3-phosphate est convertie par la suite par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H2O2).

Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H2O2) réagit avec le 4-aminophenazone (4-AP) et le p-chlorophenol en présence de peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rougeâtre (SPINREACT, 2013) (Annexe II).





Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré dans le tableau ci-dessous. Après mélange, les tubes sont incubés les tubes à 37°C, pendant 5 minutes. Les mesures de la densité optique (DO) sont effectuées au spectrophotomètre à 505 nm (490-550). Le taux des triglycérides est exprimé en mmol/L est donné par la formule suivante.

	Blanc	Standard	Echantillon
R (ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (µl)	-----	10	-----
Echantillon (µL)	-----	-----	10

Le taux des triglycérides total est calculé selon la formule suivante

$(A \text{ échantillon} / A \text{ standard}) \times 200 = \text{mg/dL de triglycéride dans l'échantillon.}$

Le facteur de conversion : $\text{mg/dl} \times 0.0113 = \text{mmol/L.}$

III-6-2-Dosage de HDL

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) présentes dans l'échantillon, se précipitent par le phosphotungstate en présence d'ions magnésium. Après centrifugation et élimination du culot, le surnageant contenant les lipoprotéines de haute densité (HDL) est utilisé pour doser le HDL-cholestérol.

Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré au tableau ci-dessus. Après l'ajout de réactif (annexe), le tout est bien homogénéiser et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite le mélange est centrifugé à 4000 tour/minute pendant 20 minutes ou pendant 2 minutes à 12000 tours/minute. Le surnageant contenant le HDL-c est récupéré est utilisé pour doser le taux du HDL par la même méthode cité précédemment concernant le cholestérol total (SPINREACT, 2013) (Annexe II)

R	(µl)	100
Echantillon	(ml)	1.0

La mesure des densités optiques (DO) est effectuée au spectrophotomètre à 505 nm.

La concentration du HDL cholestérol est calculée selon la fonction suivante :

$A_{505\text{nm}} \text{ Echantillon} \times 320 = \text{mg/dl HDL-c dans l'échantillon.}$

Le LDL-c est estimé à l'aide d'une formule standard, fondée sur l'équation de Friedewald (Friedewald et al., 1972).

$$LDL = TC - HDL - \frac{TG}{5}$$

III-7-Test de tolérance au glucose (OGTT = oral glucose tolérance test)

Le test de tolérance au glucose (OGTT) permet de tester l'effet de différentes doses de l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* sur la glycémie post prandiale. Cet extrait et le médicament hypoglycémiant standard (glibenclamide) sont mis en suspension dans une solution saline NaCl 0.9%, puis administré à des souris diabétiques par voie orale 45minute avant le gavage gastrique d'une solution de glucose à la dose de 2g.kg^{-1} .

Le groupe 01 de souris diabétique (control négatif), a reçu une solution de glucose. Le deuxième groupe diabétique (control positif) a reçu une dose unique de glibenclamide (20mg.kg^{-1}) avant 45minute de l'administration de glucose. Le troisième et le quatrième groupe ont reçu des doses uniques respectivement de 200mg.kg^{-1} et 400mg.kg^{-1} 45minute avant l'administration de glucose. L'évolution de la glycémie est suivie pendant 03 heures (30, 60, 120 et 180 minute) après l'administration de la solution de glucose.

III-8-Etude histologique

III-8-1-Prélèvement des organes

Après la collecte du sang au 21^{ème} jour, les souris sacrifiés sous anesthésie sont fixés sur une plaque en liège sur sa partie dorsale en fixant ses quatre pattes à l'aide des punaises de fixation (Figure 05). Une petite incision est provoquée au niveau de périnée qui permet d'insérer une sonde d'incision. Suite à ca, on procède à la dissection de la cavité abdominale.

Le pancréas est isolés pour observer des changements histopathologique ou des anomalies tissulaires (lésions, couleur, consistance, régénération...etc.).



Figure 07 : La dissection des souris

III-8-2-Fixation

Il consiste à figer les structures des organites cellulaires tout en conservant les constituants cellulaires et tissulaires dans un état proche du vivant. L'agent fixateur solidifie le gel protéique qui circule entre les mailles du réseau membranaire limitant le hyaloplasme et les organites. Les pancréas récupérés sont lavés avec de l'eau physiologique, et immédiatement immergés dans un liquide fixateur qui est le formol (10%) dont le volume est environ 10 fois le volume de l'organe afin d'éviter leur dégradation et obtenir une rigidité tissulaire suffisantes. Les organes sont coupés et les pièces obtenues sont placés dans des cassettes en plastique numérotées et bien identifiées pour chaque groupe

III-8-3-Lavage déshydratation et éclaircissement (Inclusion)

Avant de procéder à la déshydratation, les pièces fixées sont lavées à l'eau courante pendant 30 minutes ou plus, afin d'éliminer l'excès de fixateur. Les pièces fixées et lavées sont ensuite placées dans l'automate qui constitue de 12 cylindres, réparties en : 6 cylindres d'alcool (éthanol 100°) pour déshydrater les échantillons (étape de déshydratation), 4 cylindres de xylène pour les purifier d'alcool (étape d'éclaircissement) et 2 cylindres de paraffine xylène pour éliminer le xylène, chaque bain prend 1h30 dans chaque cylindre (Figure 06) ;



Figure 08 : Les étapes d'inclusion par l'automate (CHU de Bejaia, 2014)

III-8-4- Enrobage à la paraffine et confection des bloque

Une fois les coupes sont réalisées, les cassettes sont immergées dans deux bains successifs de paraffine liquide pour que cette dernière s'infiltre dans les échantillons. Ainsi elles sont protégées contre l'humidité et le dessèchement. (Figure07). Après leur enrobage, les cassettes sont incubées a basse température jusqu'à refroidissement de la paraffine. Le refroidissement permet l'obtention d'un bloc pour chaque prélèvement. La coupe du bloc de paraffine au microtome permet de réaliser une coupe très fine de 3 à 5 μm d'épaisseur pour chaque prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires. La coupe est déposée et collée sur une lame en verre puis on lais sécher à l'étuve.



Figure 09 : Distributeur de paraffine à gauche et réalisation des coupes au microtome LEICA RM 2145 à droite réalisé à l'hôpital Frantz fanon de Bejaia.

III-8-5- Déparaffinage et coloration

Les lames sont baignées dans 02 bains successifs de Xylène pendant 5 min chacun, suivi de 02 bains successifs d'éthanol à 90% pendant 3mn chacun, puis rincées à l'eau.

Les lames sont ensuite mises dans un bain d'hématoxyline pendant 3 min, suivi d'un bain d'éosine pendant 5 min, et rincée dans deux bains successifs d'éthanol à 90%, puis laissée sécher.

III-8-6- Visualisation microscopique

La visualisation microscopique est réalisée à l'aide d'un microscope optique doté d'un appareil photo « LEICA EC3 » qui nous a permis d'obtenir les photos des différents prélèvements.

Résultat et discussion

V-I Résultat et discussion

VI-1-Taux d'extraction

Une macération a été réalisée sur la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* avec le méthanol, après extraction de 20 g de l'échantillon et évaporation du solvant du filtrat. On a obtenu un extrait sec ayant un poids de 3.66 g ce qui correspond à un rendement de 18.3%. Ce rendement est beaucoup plus élevé par rapport à celui obtenu par **Ljubuncic et ses collaborateurs (2005)** en utilisant comme solvant l'eau distillé qui est de l'ordre de 8%.

Cette différence peut être due à plusieurs facteurs, le taux d'extraction des composés phénoliques à partir d'une matière végétale peut être influencé par leur nature chimique, la nature du solvant, la méthode d'extraction utilisée, le diamètre des particules, le milieu de culture ou la provenance de l'échantillon et du temps de macération.

VI-2-Analyses phytochimiques

VI-2-1- Teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Après l'addition de la solution de monohydrate carbonate de sodium et le réactif de Folin Ciocalteu, une couleur bleu est obtenu. Cette coloration varie en fonction de la concentration de l'extrait de la plante.

La quantité des polyphénols correspondante a été rapportée en équivalent gramme d'acide gallique et montre que l'extrait méthanolique de *R. alaternus* contient environ $97.46 \pm 1,34$ mg EAG/g d'extrait sec.

VI-2-2- Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon été la quercétine. Après l'addition d' $AlCl_3$ et incubation une couleur jaunâtre est obtenue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait de la plante.

La teneur en flavonoïdes montre que l'extrait méthanolique de *R. alaternus* contient environ 44.98 ± 0.72 mg EQ/g d'extrait sec. Ces résultats obtenus sont nettement inférieures au résultat trouvé par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)**, qui ont démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ 283 ± 11 mg EQ

/g. Cette différence pourrait s'expliquer par la région dans laquelle la plante est cultivée, la méthode de dosage ainsi que la période de la récolte.

IV-3-Evolution de la glycémie

Les résultats de l'effet antidiabétique de l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* sur des souris diabétiques durant 20 jours de traitement à des doses quotidiennes de 200 et 400 mg/kg/jour de poids corporel sont illustrés par la figure 08.

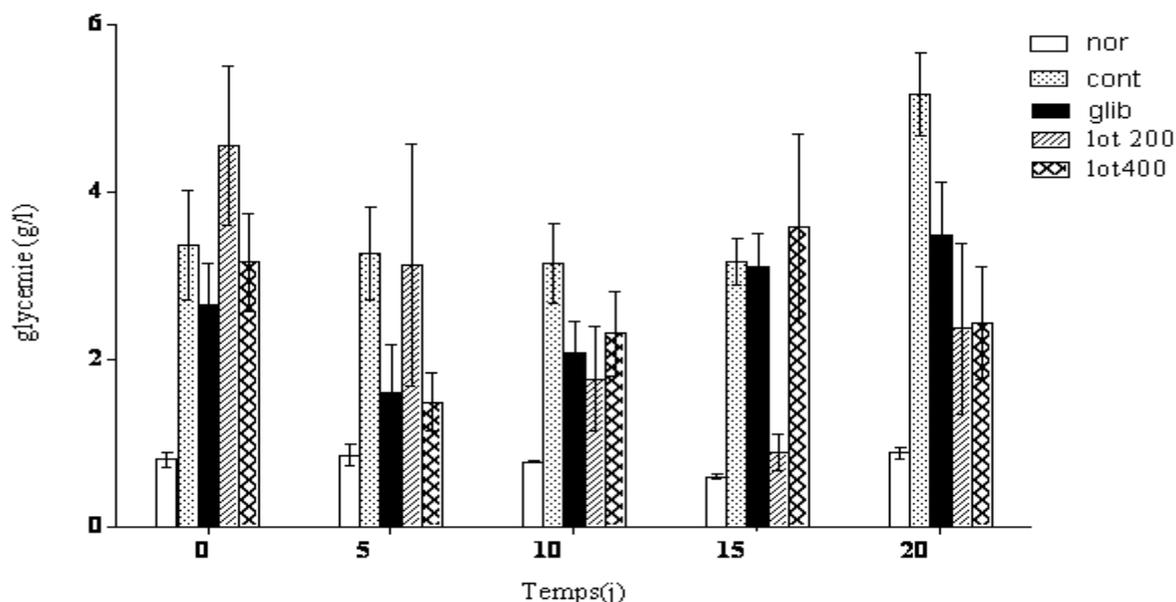


Figure 10 : Evolution de la glycémie. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM

L'analyse des résultats montre une diminution progressive de la glycémie chez les souris diabétique traitées par l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* à une dose de 200 mg/kg/jour de 4.55g/L jusqu'à 0.89g/L à la fin du 15^{ème} jour. Ce taux de glycémie remonte pour atteindre 2.36 g/L. au 20^{ème} jour.

Au 5^{ème} jour de traitement, la glycémie des souris traitées (200 mg/kg/jour) est légèrement inférieure à celle des souris diabétique non traitées (3.12g/L contre 3.26g/L), mais reste relativement élevé par rapport à celle des souris traitées avec un hypoglycémiant (glibenclamide) qui est de l'ordre de 1.60 g/L. Comparant les taux de glycémie entre le groupe IV (200 mg/kg/jour) et le groupe I (témoin normal), on constate une grande différence entre les deux groupe (figure 08). Au 10^{ème} et 15^{ème} jour, la glycémie reste relativement élevée (1.76 et 0.89 g/L respectivement) par rapport à celle des souris normales (groupe I) (0.77 et

0.59 g/L), mais très inférieure par rapport à celles des diabétiques non traitées (groupe 02) (3.15 et 3.16 g/L) et traitées avec glibenclamide (groupe 03) (2.08 et 3.11 g/L).

Juste après 5 jours de traitement avec 400mg/kg/jour de l'extrait, on remarque la diminution de la glycémie de 3.15g/L jusqu'à 1.49g/L. Cependant, cette valeur reste supérieure à celle des souris normales (0.85g/L), mais inférieure à celle des souris contrôles (3.26g/l) et très proche de celle des souris traitées avec glibenclamide (1.60g/L). A partir du 10^{ème} jour, la glycémie augmente à nouveau pour atteindre une valeur de 3.59g/L au 15^{ème} jour dépassant ainsi celles des souris normales, contrôles et diabétiques traitées par glibenclamide (0.77g/L, 3.14g/L et 2.08g/L). A la fin de cette étude (20^{ème} jour), on constate que la glycémie diminue à nouveau jusqu'à 2.42g/L, mais qui est tout à fait supérieure à celle des souris normales (0.87g/L), et inférieure par rapport au contrôles (5.16g/L) et au groupe traité par glibenclamide.

Le traitement de souris diabétiques par glibenclamide provoque une diminution de la glycémie juste après 05 jours (1.60g/L). Ce taux de glucose sanguin remonte graduellement pour atteindre une valeur de 3.47g/L au 20^{ème} jour. Ce taux reste supérieur au souris normales et inférieure au contrôle tout au long de cette étude.

L'administration orale quotidienne durant 20 jours de l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* à une dose de 200mg/kg/jour pour des souris rendues diabétiques par la streptozotocine, provoque une réduction importante de la glycémie. Cette réduction est éventuellement due à la régénération des cellules pancréatiques, la stimulation de la sécrétion de l'insuline ou par son action favorisant la glycogénogenèse et /ou inhibitrice de la néoglucogenèse hépatique ce qui diminue la libération de glucose par les cellules hépatocytes. L'augmentation de la glycémie à la fin de cette étude pourrait être due soit à l'inefficacité du traitement pendant les 05 derniers jours, soit à la variation des facteurs externes tels que le stress, la période entre le dosage de la glycémie de chaque souris et la durée de jeun.

Le traitement des souris diabétiques par glibenclamide (20 mg/kg/jour) s'avère inefficace malgré son action sécrétrice de l'insuline à une dose de 2.5mg/kg/jour apporté par **Silva et al. (2002)**. Cela s'explique par l'état physiologique des souris, dont la quasi-totalité de leurs pancréas a été détruit par la streptozotocine en induisant une hypo-insulinémie sévère.

IV-4- Variation de poids corporel

Le poids est l'un des plus importants paramètres qui nous renseigne sur l'apparition et l'évolution du diabète à cause de sa relation directe avec le métabolisme lipidique. Pour cela on a suivi cette variation durant toute la période de traitement des souris.

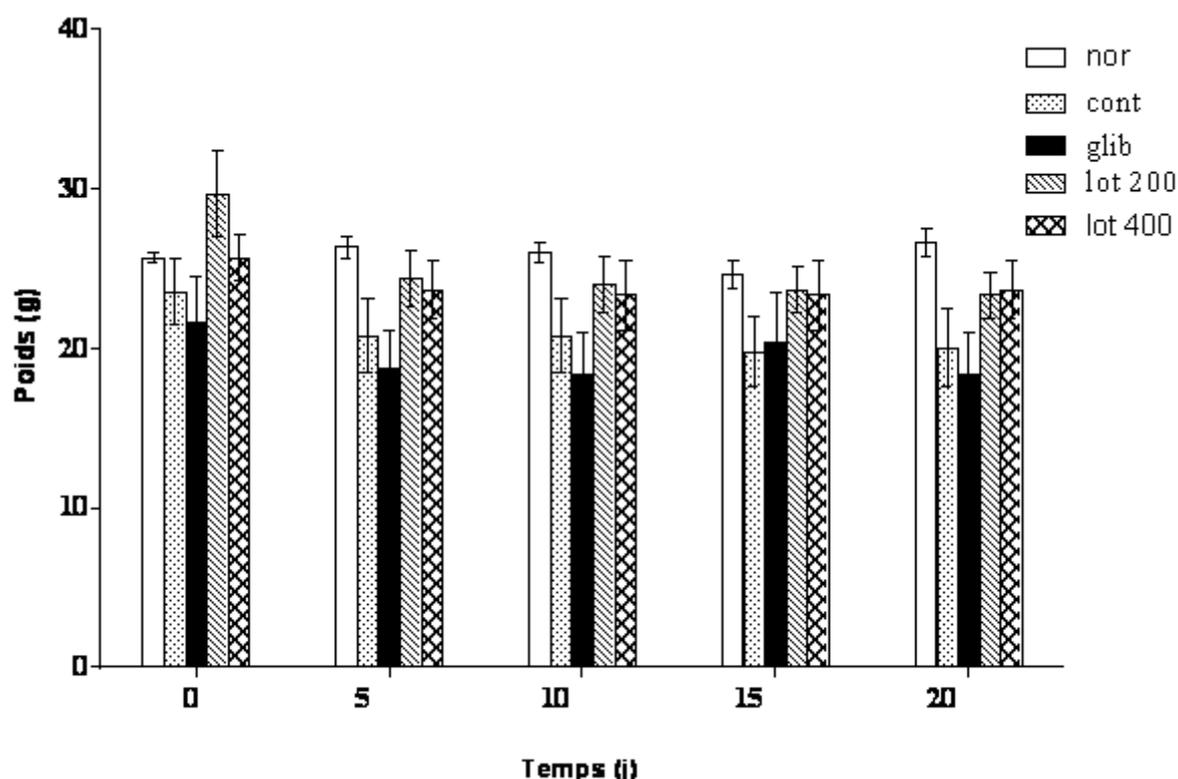


Figure 11 : Evolution pondérale durant 20 jours de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM

D'après les résultats, on remarque que le poids des souris normales, diabétiques non traitées et celle traitées avec le glibenclamide reste stable avec de légères fluctuations non significative durant toute la période de traitement.

Concernant la dose de 200mg/kg/jour, on constate une diminution du poids corporel de plus de 5 g au cours des 05 premiers jours du traitement (29.67g à 24.33g). Du 5^{ème} jour jusqu'au 20^{ème} jour, le poids des souris reste pratiquement stable durant toute cette période de traitement (24.33g au 5^{ème} jours et 23.33g au 20^{ème} jour), ce qui correspond à une diminution d'environ 22% du poids corporel à la fin de l'expérience.

Le groupe traité par 400mg/kg/jour d'extrait ne présente pas une grande variation du poids corporel tout au long de cette étude (23.67g au jour 05, 23.33g au 10^{ème} jour et 23.67g au 20^{ème} jour).

La diminution observée du poids corporel des souris diabétiques par rapport au témoin, qui est due probablement à l'induction de diabète avec la streptozotocine est associée aux caractéristiques de perte de poids et à l'augmentation de l'atrophie musculaire (**Chatterjee et al., 2002**). Le traitement des souris diabétiques par l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* à des doses de 200 et 400 mg/kg/jour, montre une légère diminution durant les 05 premiers jours de traitement suivi d'une stabilité durant les 15 jours suivants. Cela pourrait s'expliquer probablement par le pouvoir de l'extrait à stimuler la glycogénogenèse musculaire et /ou l'inhibition de la glycogénolyse musculaire et lipolyse dans les tissus adipeux.

IV-5- Quantité de nourriture consommée

La quantité de la nourriture consommée par les souris étudiées est l'un des paramètres mesurés durant notre travail. En fait, la polyphagie constitue un symptôme crucial du diabète. Ce paramètre nous renseigne essentiellement sur le rétablissement de la sécrétion de l'insuline ainsi que le degré de l'utilisation de glucose par les cellules. En raison d'une utilisation réduite de glucose par les cellules lors d'une carence aiguë en insuline ainsi que son élimination *via* les tubules rénaux, l'apport d'alimentation augmente pour compenser le manque d'énergie (**Bouglé et Annane, 2009**).

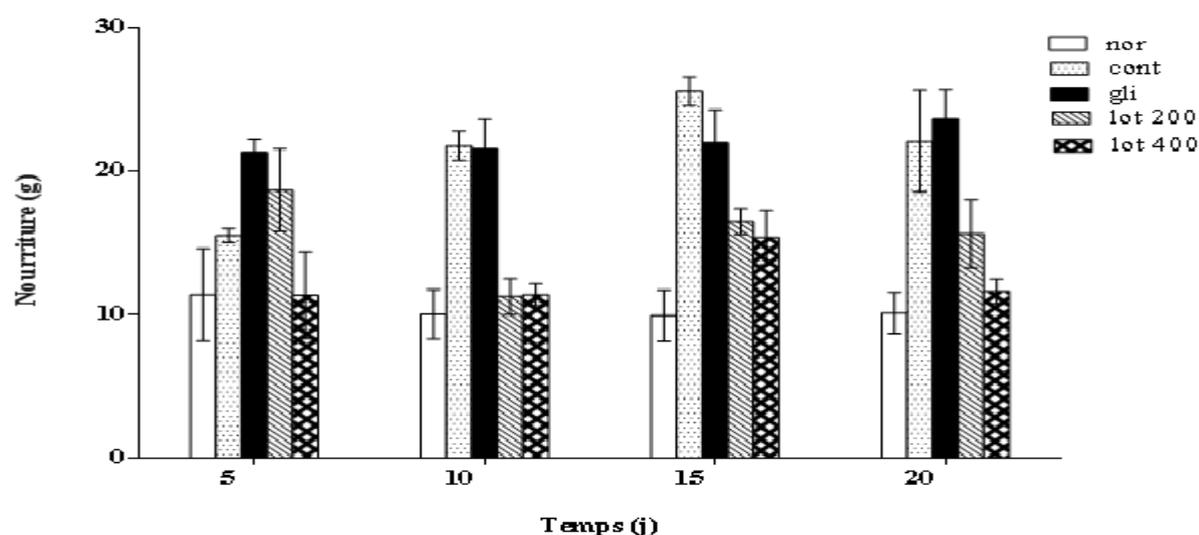


Figure 12 : Quantité de nourriture consommée. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM

La figure 10 représente l'influence d'un traitement de 20 jours par l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus L.* sur le taux de consommation journalière de nourriture chez des souris sains et des souris rendus diabétiques par STZ.

(I) Groupe IV (200 mg/kg/jour) : Les résultats obtenus montrent que la quantité de la nourriture consommée durant les 05 premiers jours par le groupe de souris diabétiques traitées par 200 mg/kg/jour de l'extrait ($18,67g \pm 5$) est supérieure à celle consommé par les souris normal ($11,36g \pm 6,44$), des souris diabétiques ($15,5g \pm 1$) ; Mais reste inférieure à celle consommée par les souris traités par le glibenclamide ($21,31 \pm 1,86$). Notant aussi que ce dernier est le groupe qui a consommé plus de nourriture par rapport aux autres groupes.

Après 10 jours de traitement la quantité de la nourriture chute pour le groupe traité par 200 mg/kg/jour de l'extrait ($11,25g \pm 2,52$) ; une quantité qui est proche de celle de groupe témoin (non diabétique) et largement inférieure à celle consommé par le groupe de souris non traité et traité par glibenclamide ($21,75g \pm 2,06$ et $21,54g \pm 4,15$ respectivement). Au 15^{ème} jour, cette quantité a légèrement augmenté ($16,5g \pm 1,79$), contrairement à la quantité consommée par le groupe témoin qui a gardé presque le même comportement alimentaire durant toute la période de l'expérimentation. Au dernier jour de l'expérimentation (20^{ème} jour) la quantité de la nourriture consommé est maintenu presque stable ($16,25g \pm 4,33$), mais reste toujours supérieure à celle consommée par le groupe témoins est inférieure à celle consommée par le groupe control et celle du groupe traité par glibenclamide.

L'augmentation de la quantité de la nourriture consommée (polyphagie) au début de l'expérimentation (symptôme de diabète type 2) est le résultat d'un déficit quasi-total en insuline, dont le rôle est la capture et l'utilisation de glucose par les cellules de l'organisme, ce qui provoque un manque d'énergie, (manque d'utilisation de glucose et son échappement au niveau des tubules rénaux). Donc l'apport d'alimentation augmente pour compenser le manque d'énergie (**Bouglé et Annane, 2009**). La chute de la quantité de la nourriture après 10 jours de traitement peut être expliquée par la présence d'une hyperglycémie durant cette période, et que le taux de glucose est maintenu dans le sang jusqu'à son utilisation (**Perlemuter et al., 2000**). Le ré augmentation de la quantité consommée après 15 jours et qui persiste jusqu'à la fin de traitement est dû probablement à la diminution de taux de la glycémie durant cette période.

(I) Groupe V (400 mg/kg/jour) : Les résultats obtenus, montrent que la quantité de la nourriture consommée par le groupe diabétique traité par l'extrait à une dose de 400 mg/kg/jour est maintenu presque stable durant les 10 premiers jours ($11,33\text{g} \pm 1,53$ au 5^{ème} jour et $11,75\text{g} \pm 1,53$ au 10^{ème} jour). Au 15^{ème} jour de traitement, cette quantité a augmenté jusqu'à $15,38\text{g} \pm 3,76$. A la fin de l'expérimentation (20^{ème} jour), on note que la quantité de la nourriture consommée a baissé de nouveau ($11,63\text{g} \pm 1,71$). Cette quantité reste proche à celle consommée par le groupe de souris non diabétique, mais toujours inférieur à celle consommé par le groupe contrôle est diabétique traité par glibenclamide.

Ces résultats montrent que les souris témoins et les souris diabétiques traités par 400 mg/kg/jour de l'extrait, ne présentent pas de polyphagie durant cette période du traitement. Cela s'explique probablement par l'hyperglycémie modérée observée chez ces souris. Le glucose est maintenu dans le sang jusqu'à son utilisation, malgré son oxydation lente par les cellules, et cela, en raison de sa concentration plasmatique qui n'a pas encore atteint le seuil rénal, où il sera éliminé dans les urines. L'élimination de glucose *via* les tubules rénaux, provoque un gaspillage d'énergie, ce qui se traduit par un besoin abusif de l'apport de nourriture (polyphagie) (Perlemuter *et al.*, 2000).

IV-6- Le volume d'eau consommé

Le volume d'eau consommé durant la période de traitement est mesuré quotidiennement vu que la polydipsie est un symptôme du diabète sucré, et qui reflète l'efficacité des extraits testés, en effet la présence d'une polydipsie considérable durant la période de traitement, est forcément due à la diminution de l'insulinémie, et la disparition de ce phénomène s'explique par le rétablissement de taux du glucose plasmatique.

(I) Groupe IV (200 mg/kg/jour) : La figure 11 montre que le volume d'eau consommé par le groupe traité par 200 mg/kg/jour de l'extrait durant les 10 premiers jours est élevé par rapport à celui consommé par les autres groupes témoin, control et diabétiques traité par glibenclamide (30.35ml contre 7.33, 25,22 et 21ml respectivement). Au 15^{ème} jour, on remarque que le volume d'eau consommé par ce groupe représente le volume le plus élevé durant toute l'expérimentation par rapport à tous les autres groupes. Au 20^{ème} jour, on constate que ce groupe reste toujours le plus consommateur d'eau, mais avec un taux réduit par rapport au précédent dosage. Les souris traitées par la dose de 200 mg/kg/jour, montrent

une polydipsie importante qui dépasse celle présentée par les souris témoin, diabétiques non traités, et traitées par glibenclamide.

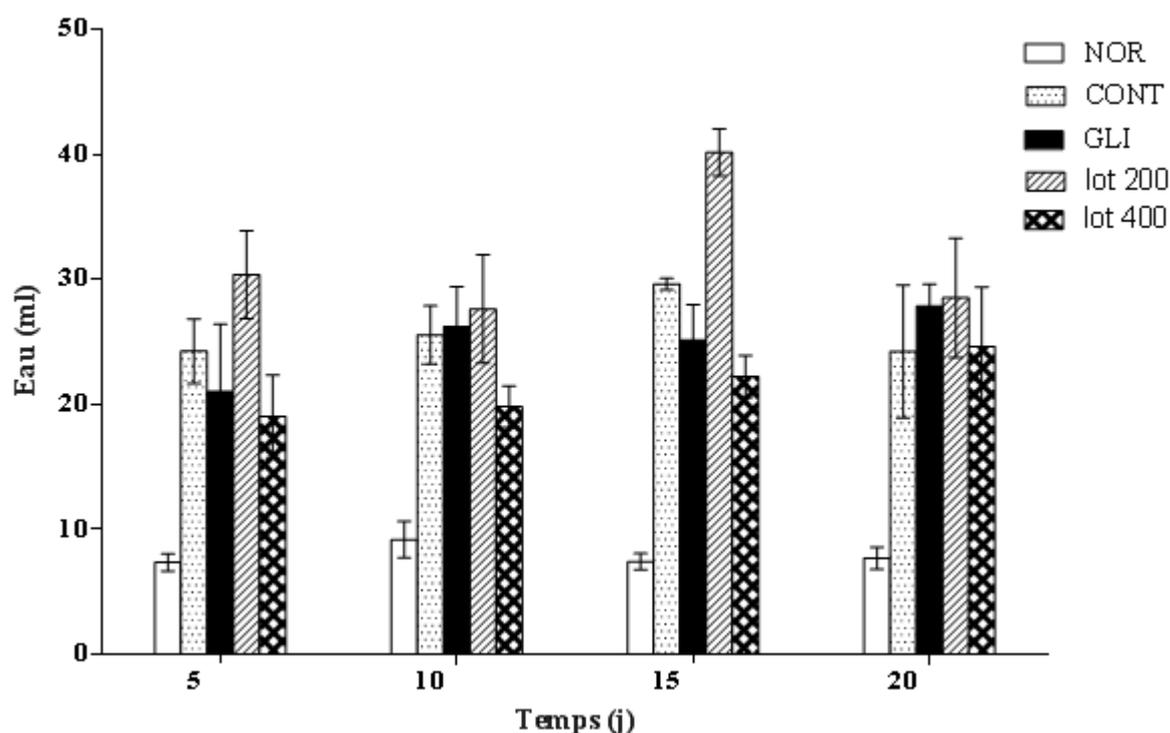


Figure 13 : Quantité d'eau consommée. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

(I) Groupe V (400 mg/kg/jour) : Suite aux résultats obtenus, on remarque que le volume d'eau consommé par ce groupe est maintenu stable durant les 10 premiers jours de traitement (19 ml), un volume qui est amplement supérieure à celui consommé par le groupe témoin ($7,33\text{ml} \pm 1,56$) mais qui demeure inférieure à celui consommé par le groupe de souris control et diabétique traité par glibenclamide. Durant les 10 derniers jours de traitement, une légère augmentation de volume d'eau consommé a été remarquée, et à la fin du traitement, on constate que le volume d'eau consommé par ce groupe est équivalent à celui consommé par le groupe contrôle (24 ml).

Malgré la variation du taux de glucose dans le sang durant la période du traitement, les souris traitées par 400 mg/kg/jour de l'extrait ont montré une polydipsie progressive durant la période de traitement, cependant, elle reste moins importante par rapport aux souris traité avec 200 mg/kg/jour.

La polyurie qui est dû à la consommation excessive d'eau (polydipsie) est l'un des symptômes principaux du diabète sucré qui est le résultat d'une hyperglycémie causée essentiellement par un déficit en insuline (**Silbernagl et Lang, 2002**). D'ailleurs c'est ce que nous avons constaté tout au long de cette étude concernant les groupe diabétique ou on a du changer la litière quotidiennement pour garder de bonne conditions hygiénique.

La polydipsie résulte de deux mécanismes ; une baisse de la pénétration cellulaire de glucose ; et en même temps que cette barrière apparaît, la production de glucose par le foie est augmentée (accroissement de la néoglucogénèse et de la glycolyse). La glycosurie est conséquence de l'hyperglycémie dès lorsque le seuil rénal du glucose est dépassé. Une molécule de glucose entraîne avec elle plusieurs molécules d'eau, ce qui explique la polyurie et la polydipsie compensatrice qu'elle entraîne (**Silbernagl et Lang, 2002**).

IV-7- Dosage des paramètres lipidiques sanguins

Les paramètres lipidiques sanguins des différents groupes ont été déterminés après 20 jours de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois dosages \pm l'écart-type. Les résultats sont montrés dans les tableaux III.

Tableau III : Dosage des paramètres lipidiques sanguins après 20 jours de traitement

lot	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
Nor	149.79 \pm 29.25	207.76 \pm 61.35	46.64 \pm 15.29	57.13 \pm 33.42
Contr	225.46 \pm 22.97	151.26 \pm 34.26	80.11 \pm 35.66	104.95 \pm 20.93
Lot 200	161.40 \pm 6.99	221 \pm 34.97	53.33 \pm 32.16	70.49 \pm 37.36
Lot 400	159.18 \pm 72.23	151 \pm 27.65	57.39 \pm 20.48	69.61 \pm 53.95

Chez les souris diabétique, on remarque que l'injection de la STZ a provoqué une augmentation de la concentration sérique de cholestérol totale (225.46 mg/dl contre 149.79 mg/dl), et de HDL (80.11 mg/dl contre 46.64 mg/dl) et même de LDL (104.95 mg/dl contre 57.13 mg/dl). Et une diminution de taux de triglycéride (151.26 mg/dl contre 207.76 mg/dl).

Les résultats montrent, que les concentrations sériques de cholestérol (161.40 mg/dl et 159.18 mg/dl), de triglycéride (221 mg/dl et 151 mg/dl) et de HDL (53.33 mg/dl et 57.39 mg/dl), et même de LDL (70.49 mg /dl et 69.61 mg/dl) sont respectivement très voisines chez les souris diabétiques traitées par l'extrait méthanolique à une dose de 200 mg/kg /jour et 400 mg/kg/jour. Ces résultats sont similaires à celle de témoins.

L'effet de l'extrait méthanolique sur la diminution du taux de cholestérol plasmatique, revient peut être à la stimulation de la sécrétion de l'insuline, cette dernière agit également en activant la LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase), une enzyme responsable du transfert de cholestérol libre en cholestérol estérifié qui migre au centre de la lipoprotéine (HDL), ce qui favorise la diminution de sa concentration plasmatique (Arii *et al.*, 1997).

La diminution de taux de LDL (mauvais cholestérol) des souris diabétiques traitées avec les deux doses (200 mg/kg/jour, 400mg/kg/jour) de l'extrait méthanolique des feuilles de *R alaternus*, nous permet de constater que cet extrait a un bon effet de réduire le taux de mauvais cholestérol.

IV-8-Effet de l'extrait méthanolique de rhamnus alaternus sur la tolérance au glucose :

A partir de ces résultats obtenus, on constate qu'après 30 minutes de l'administration de glucose 2g/kg, une forte augmentation de la glycémie chez les souris non traitées (CNTL), de 2.88g/L à plus de 5.22g/L a été observé . en suite, la glycémie déminue.

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose chez des souris diabétiques traitées par l'extrait méthanolique de R alaternus à une dose de 200mg/kg et 400mg/kg sont illustrés dans la figure 12.

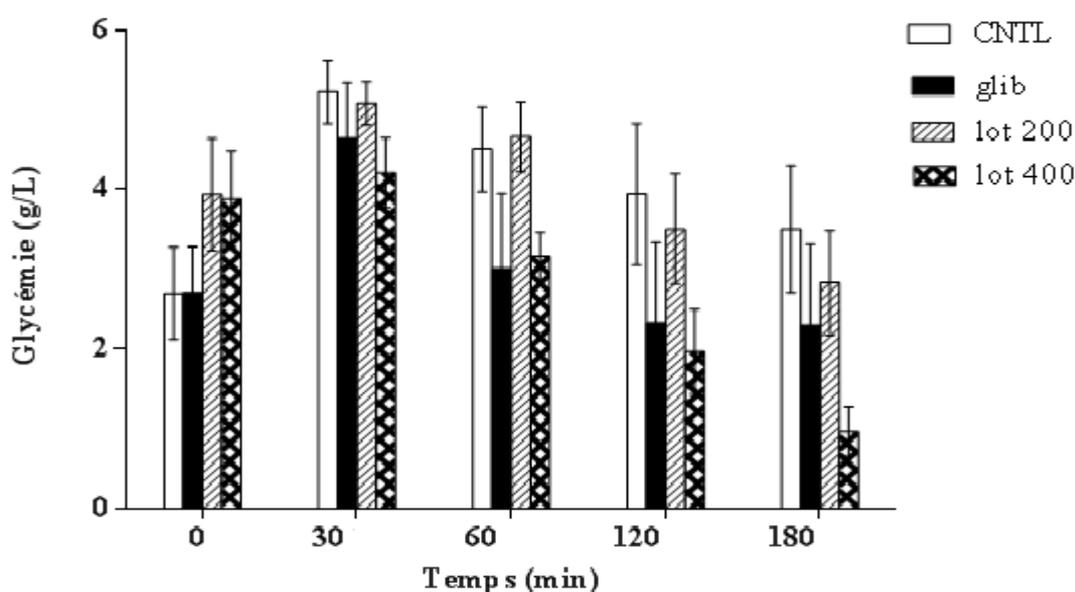


Figure 14 : effet de l'extrait méthanolique sur la tolérance de glucose (OGTT) à une concentration de 2g/kg.

A partir de ces résultats obtenus, on constate qu'après 30 minutes de l'administration du glucose (2 g/kg), une forte augmentation de la glycémie chez les souris non traitées (CNTL), de 2.88 g/L à plus de 5.22 g/L. Ensuite, la glycémie diminue de 4.50g/L (60 minutes) à 3.94g/L (120minutes), puis à 3.50 g/L (180minutes).

Chez les souris traitées par l'extrait méthanolique de *R alaternus* à une dose de 200 mg/kg/ le taux du glucose sanguin a augmenté considérablement de 3.93g/L à 5.08 g/L pour après 30 minutes de l'administration du glucose, à la différence de la glycémie des souris traitées par l'extrait méthanolique à une dose de 400 mg/kg où leur glycémie n'a pas connu une grande élévation (3.88 g/L à 4.21g/L).

Après 60 minutes le taux de glucose des souris traitées avec une dose de 200mg/kg d'extrait à diminué pour atteindre 4.66g /L. chez les souris traitées avec 400mg/kg, cette diminution est beaucoup plus importante puisque elle a atteint 3.16g/L après le même intervalle de temps.

Après la 120^{ème} minutes et 180^{ème} minutes, le taux de la glycémie des souris traitées que ce soit par la dose 200 mg/kg ou 400mg/kg continue à diminuer pour atteindre respectivement, 3.50 g/L et 2.83g/L pour la dose de 200 mg/kg et 1.96g/L et 0.96g/L pour la dose 400 mg/kg.

Pour les souris traitées par glibenclamide (20 mg/kg), leur glycémie augmente légèrement après 30 minutes de l'administration du glucose (de 2.70 g/L à 4.64g/L), commence à diminuer a partir de 60^{ème} minutes pour atteindre sa valeur minimale après 180 minutes (2.30g/L).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique des feuilles de *R alaternus* à une dose de 200 mg/kg et 400 mg/kg a un effet considérable sur la diminution de la glycémie postprandial durant les 180 premières minutes qui suivent la prise d'une dose de glucose de 2g/kg.

On constate aussi que c'est la dose de 400mg/kg qui a un meilleur effet par rapport à la dose de 200mg/kg. Cela s'explique probablement par l'effet de cet extrait à augmenter l'utilisation de glucose par les cellules. Cet effet insulino-mimétique peut se produire par plusieurs mécanismes, le plus important serait l'effet insulinosécrétagogue. Autrement dit, cet extrait exerce son action anti-hyperglycémiant en stimulant la sécrétion de l'insuline, qui agit à son tour en réduisant la glycémie. **(Bakirel et al., 2008).**

IV-9-Etude histologique du pancréas

Notre étude a été réalisée sur deux souris de chaque groupe choisis aléatoirement. Les figures (13) représente des coupes histologiques du pancréas colorées avec l'hématéine éosine réalisées après 20 jours de traitement avec 200 et 400 mg/kg/jour de l'extrait méthanolique de *R. alaternus*; lot I (témoin), lot II (control), lot IV (200 mg/kg/jour) et lot V (400 mg/kg/jour).

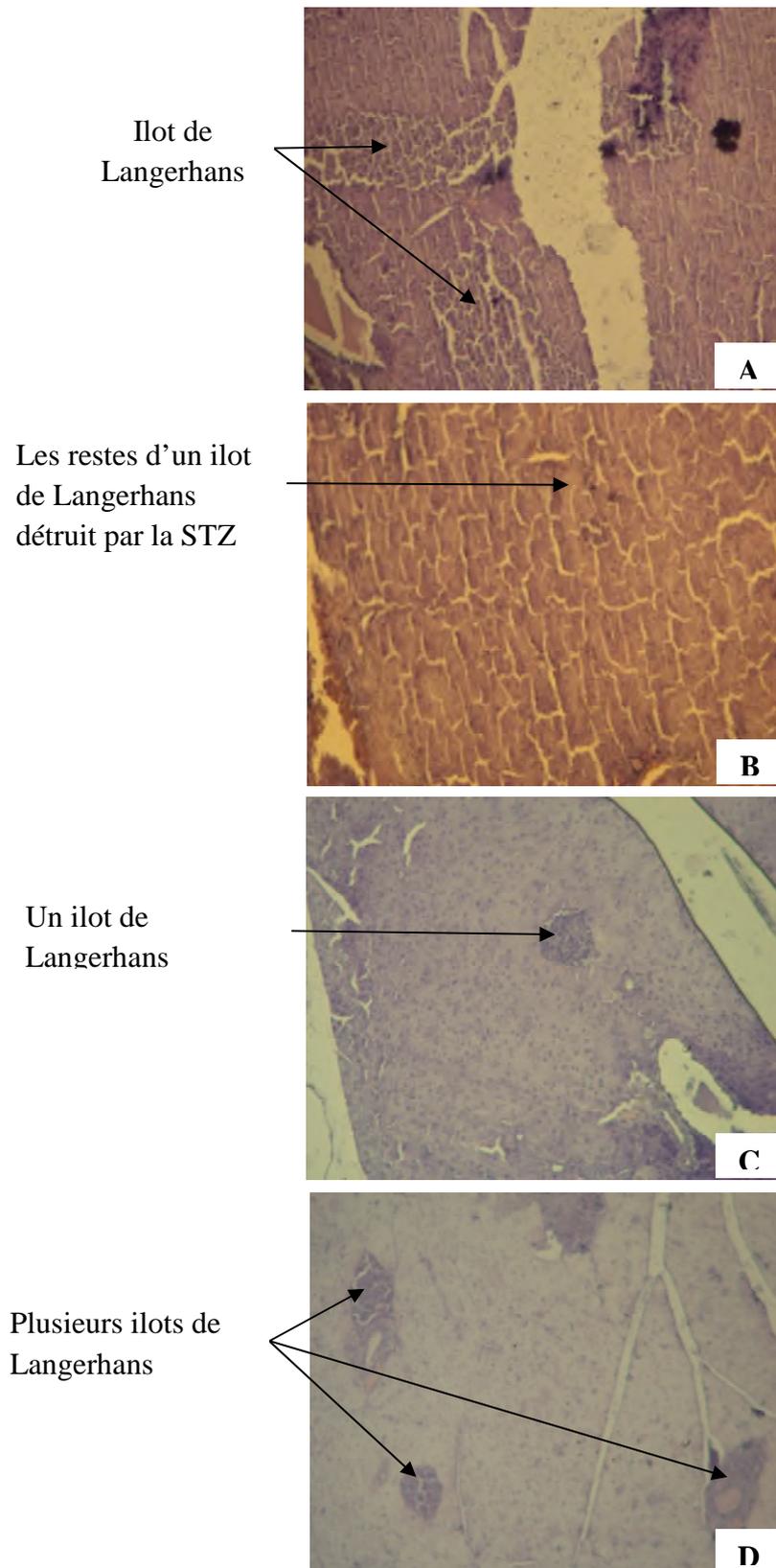


Figure 15 : Coupe histologique du pancréas (A) lot témoin Gx10 ; (B) lot control Gx10 ; (C) 200mg/kg/jour Gx100 et (D) 400 mg/kg/jour Gx100

Discussion des coupes histologique

Le pancréas est une glande mixte, exocrine et endocrine. La partie exocrine est constituée d'unités sécrétrices, les acinus, munis de canaux excréteurs. La partie endocrine est constituée par les îlots de Langerhans dispersés au milieu des acinus.

La figure (A) représente une coupe histologique de pancréas d'une souris du lot témoin (normal), colorées par l'hématéine/éosine, on peut constater la présence de plusieurs amas de cellules pancréatiques sécrétrices de l'insuline (cellules β de Langerhans), mais les acinus sont pas claires à cause de grossissement réduit (G10).

La figure (B) montre l'image d'une coupe histologique de pancréas d'une souris du lot control (diabétique non traité). On constate sur cette figure qu'il y'a une absence des ilots de Langerhans, sauf l'apparition des restes de certains débris et cela est dû à l'effet destructeur de la streptozotocine sur les cellules β pancréatique.

La figure (C) représente l'image d'une coupe histologique de pancréas d'une souris de lot traité par l'extrait méthanolique de *R. alaternus* (200mg/kg/jour). Sur cette figure, on remarque qu'il y'a un seul ilot des cellules β de Langerhans qui commence à se régénérer. Cela est surement dû à l'effet de l'extrait méthanolique administré durant la période de traitement.

La figure (D) montre l'image d'une coupe histologique toujours, de pancréas d'une souris de lot traité par l'extrait méthanolique de *R. alaternus* (400mg/kg/jours). Sur cet échantillon, on remarque la présence de plusieurs îlots des cellules β de Langerhans qui sont en cours de croissance et de développement, ce qui signifie que la dose de 400 mg/kg/jours provoque une régénération beaucoup plus importante par rapport à celle observée au niveau du lot traité par 200mg/kg/jours de l'extrait.

*Conclusion et
perspective*

En Algérie, la médecine traditionnelle est largement répandue et tient une place majeure dans le traitement du diabète. Sachant que le diabète constitue un véritable fléau en Algérie, le nombre d'études en matière de recherche de nouvelles molécules capable de prévenir ou même de retarder l'apparition des complications liées au diabète, reste très limitée.

L'ensemble de nos résultats a permis de souligner les effets bénéfiques de l'administration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus L.* que ce soit dans la diminution de la glycémie ou dans le profil lipidique.

Le groupe de souris soumises à un traitement par l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* à une dose de 200 mg/kg/jour présente une diminution importante de la glycémie durant la période de traitement, la dose 400 mg/kg présente une meilleure efficacité de réduction de la glycémie post prandiale avec le teste de tolérance au glucose OGTT.

Tous les groupes de souris soumis à un traitement par l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* à une dose de 200 mg/kg et 400 mg/kg, présentent une stabilité, voire une légère diminution, du poids pendant la première semaine du traitement et cela est du probablement à sa stimulation de la glycogénogenèse musculaire, et son effet inhibiteur de la lipolyse.

L'étude de l'effet de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* sur le profile lipidique des souris diabétiques, a montré que cet extrait diminue le taux du cholestérol total et de LDL.

L'analyse des coupes histologiques de pancréas des souris traitées avec l'extrait méthanolique de *R. alaternus*, a révélé une apparition des ilots de langerhans. Ces résultats indiquent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est efficace pour la régénération des ilots de langerhans.

Enfin, il ressort du présent travail que le *Rhamnus alaternus L.* est un produit effectivement intéressant et riche en possibilités thérapeutiques. Nos résultats sont remarquables car ils ouvrent dans le future des perspectives expérimentales qui devraient nous permettre d'identifier clairement les molécules impliquées dans l'effet hypoglycémique et hypolipidémique de *Rhamnus alaternus L.* et d'avancer vers une meilleure connaissance du (des) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans les effets pharmacologiques observés.

Cependant, ces résultats doivent être pris avec précaution, notamment après l'alerte donnée par l'association algérienne de diabétologie concernant le recours abusif aux plantes médicinales et les conséquences graves qu'elles peuvent engendrer, notamment l'amputation des pieds.

Références bibliographiques

-A-

- **Abegaz B M. and Peter M G. (1995)** Emodin and emodinanthrone rhamnoside acetates from fruits of *Rhamnus prinoides*. *Phytochem.* 39: 1411-1414.
- **Abou-char C I. and Shamlan S. N.(1980)** A Chromatographic Study of the Anthraquinones of *Rhamnus alaternus* L. I. Extraction, Isolation and Identification of the Aglycones. *Pharm. Biol* 18: 49-55.
- **Aissa B.F. (2000)** : Encyclopédie des plantes utiles flore d'Algérie et du Maghreb. *EDAS Librairie moderne Rouiba.* p 368.
- **Aissa B.F. (2000)** : Encyclopédie des plantes utiles flore d'Algérie et du Maghreb. *EDAS Librairie moderne Rouiba.* p 368.
- **Ammar R B., Bhourri W., Sghaier M B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., Kilani S., Mariotte A M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M G Đ and Ghedira K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem* 116: 258-264.
- **Ammar R B., Sghaier M B., Boubaker J., Bhourri W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K. and Chekir-Ghedira L.(2008):**Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chem.-Biol. Inter.*; 174: 1-10.
- **Annie S., Rajendran K., Punitha I.S.R., (2005).** Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 369–374.
- **Annie, S., Rajendran, K., Punitha, ISR. (2005)** : L'activité antidiabétique de la tige alcoolique extrait de *Coscinium fenestratum* dans streptozotocine nicotinamide induite de type 2 les rats diabétiques.

- **Arii K., Suehiro T., Yamamoto M., Ito H., Hashimoto K. (1997)** : Suppression of plasma cholesteryl ester transfer protein activity in acute hyperinsulinemia and effect of plasma nonesterified fatty acid. *Metabolism* ; 46(10):1166-1170.
- **Aronne G et Wilcock C-C. (1995)** : Reproductive lability in pre-dispersal biology of *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae) *Protoplasma* ,187:49-59.
- **Ashok K T. (2001)**: Imbalance in antioxidant defence and human diseases: multipl approach of natural antioxidants therapy. *Current Science* 81, 9–10.
- **Association Latino-Américaine de Diabète ALAD .(2007)** :Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de Diabetes Mellitus Tipo 2..

-B-

- **Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C. and Pinkas M. (1996)**: Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.
- **Bas E., Recio M C., Abdallah M., Máñez S., Giner R M., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J.L., (2007)**. Inhibition of the pro-inflammatory mediators' production and anti-inflammatory effect of the iridoid scrovalentinoside. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 419–427.
- **Bastard J.P., Fonfrede M &Heurtier A.(2002)** : Les diabetes glucidiques Apport du laboratoire dans le diagnostic ; laboratoire Pasteur Cerba-95066 cergy Pontoise Cedex9-France page 1et 2, p.31.
- **Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Bouskou , and Exarchou V. (2004)** Antifungal properties of *Origanum glandulosum Desf.* extracts. *Food, Agricul. & Envir.*; 2: 63-69.

- **Ben Ammar R., Bhourri W., Ben Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., Kilani S., Mariotte A.M., Chekir-Ghedira L., Dijoux- Franca M.G.et Ghedira K. (2009):** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry. In press.*
- **Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. (2008):** Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol.* 31: 61-80.
- **Benhamou pierre yves.(2005) :**Diagnostic positif et étiologique du diabète in corpus Medical. Faculté de Médecine de Grenoble
http://WWW_Sante.ujf_grenoble.fr/SANTE/1/10 (233f) p 2.
- **Bennaghmouch L., Hajjaji .N et gmiraN. (2002) :** Flavonoïdes d'*Ajuga iva* (L.) *Schreb. Actes Inst. Agron. Vet.* (Maroc), Vol. 22 (1): p 25-30.
- **Bennaghmouch L., Hajjaji .N et gmiraN. (2002):** Flavonoïdes d'*Ajuga iva* (L.) *Schreb. Actes Inst. Agron. Vet.* (Maroc), Vol. 22 (1): p 25-30.
- **Bhourri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K. and Chekir-Ghedira L. (2012) :**Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O- β -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside. *S. Afr. J. Bot.*; 80: 57-62.
- **Bolzan A D, Bianchi M S. (2002):** Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research*; 512: 121–134.
- **Bonita R., Winkelmann R., Douglas KA., de Courten M., McQueen D., Puska P. (2003):** The WHO Stepwise approach to surveillance (STEPS) of non-communicable

disease risk factors. Behavioral Risk Factor Surveillance. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.:9-22.

- **Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. and Pizzariello A. (2007):**Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.*; 100: 1481-1489.
 - **Boudiba A., Mimouni-Zerguini S.(2008) :** Améliorer la prévention et les soins du diabète en Algérie. *Diabetes Voice*. 2008; **53**: 19-21.
 - **Bouglé A., Annane D. (2009) :** Les effets de l'insuline : de la cellule à l'organisme entier. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*; 28 :193–199.
 - **Boutayeb A., Boutayeb S. (2005)** The burden of non communicable diseases in developing countries. *International Journal for Equity in Health*;4:2.
 - **Busch-Brafin M.S., Pinget M. (2001) :** Le diabète de type 2. *Médecine Nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique*; 2 :103-114.
 - **Buyschaert M., Vandeleene B., Parus I., Hermans MP.(1999):** Le diabète sucré d'une réalité d'aujourd'hui à un défi de demain. *Louvain Med*.118: S189-S195.
- C-
- **Calop J., Limat S., Frnandez C. (2008) :** pharmacie clinique et thérapeutique. 3ème Ed. Masson, *Elsevier Masson*, Paris. pp.417-427.
 - **Caulin C, dir. (2009).** « Vidal recos .» 3e éd.Vidal.
 - **Chancerel L. (1920) :**Flore forestière du globe. Ed. Gauthier-Villars, Paris :, p. 561-562.
 - **Chatterjee M N., Shinde R.(2002):** Text Book of Medical Biochemistry. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, p. 317.

- **Collaborative framework (2011)** for care and control of tuberculosis and diabetes. *WHO Sept. Composées phénoliques des végétaux*. Edition Dunod, Paris, pp : 105-133.

~~-D-~~

- **Debeaux JO. (1984)** : Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée. Ed. P. Klincksieck, Paris : p. 81-82.

~~-E-~~

- **ENCYCLOPAEDIA UNIVERSALIS. (1997)**: Diabète.1-10(CD).
- **Encyclopedia of Medicinal Plants (E.M.P) (2001)**.

~~-F-~~

- **Fort G. (1976)** : Guide de traitement par les plantes médicinales et phytocosmétologie. Édition Heures de France, Vol. 01, p 655.
- **Friedewald W T., Levy R I., Fredrickson D S. (1972)**: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem*, 18:499–502.
- **Fujita A., Sasaki H., Ogawa K., Okamoto K., Matsuno S., Matsumoto E., Furuta H., Nishi M., Nakao T., Tsuno T., Taniguchi H., Nanjo K. (2005)** : Increased gene expression of antioxidant enzymes in KKAY diabetic mice but not in STZ diabetic mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 69, 113–119.

~~-G-~~

- **Goetz P. (2007)** : Phytothérapie du diabète, *Phytothérapie Numéro 5*: p212–217.
- **Grimaldi A., dir. (2009)** «Traité de Diabétologie.» 2^{ème} édition. Médecine-Sciences.
- **Gubb AS. (1913)** La flore algérienne, naturelle et acquise. *Ed. A. Jourdan, Alger*, p. 16-17.
- **Guillausseau P.J. (1997)**:« Classification and diagnostic criteria of diabetes: propositions of ADA and WHO.» *Diabetes Metab.* 23(5):454-5.

- **Gulias J., Traveset A., Riera N. et Mus M. (2004)** : Critical Stages in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany*, **93**: 723-731.

-H-

- **Halimi S, Debaty I., Villaret L. et Muller M. (2008)** : Mise au point les nouveaux traitements du diabète de type 2 : quelle place pour les incrétines et le rimonabant par rapport aux précédents ? *Revue de Médecine Interne*; 29 : p 1–15.
- **Halimi S., Debaty I., Villaret L. et Muller M. (2008)** : Mise au point les nouveaux traitements du diabète de type 2 : quelle place pour les incrétines et le rimonabant par rapport aux précédents ? *Revue de Médecine Interne*; 29 : p 1–15.
- **Hemmami I., Allagui M-B., Chakroun M., et El Gazzah M. (2006)**: *Rhamnus lycioides* in Tunisia is a new aecial host of oat crown rust. *European Journal of Plant Patholog* , 115: 357–361
- <http://www.djazairress.com/fr/info soir/120502>. Consulté le : [05-2-02-2011].

-I-

- **Izhaki I., Tsahar E., Irena P. et Jacob F. (2002)** : Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Mol Cell Endocrinol*;59:83–91.
- **Jain S. and Patil U. K. (2010)**: Phytochemical and pharmacological profile of *Cassia tora* Linn. - An Overview. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 1: 430-437.
- **Jiwa F. (1997)**:Diabetes in the 1990s-an overview. *Statistical Bulletin* Jan-Mar: 2-8.

-K-

- **Kawasaki I., Jeong M. H., Oh B. K. and Shim Y. H. (2010)**: Apigenin inhibits larval growth of *Caenorhabditis elegans* through DAF-16 activation. *FEBS Letters* 584: 3587-3591.
- **Kelly E H., Anthony R T., Dennis J B., (2002)**. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572 584.
- **Konrad R, Mikolaenko I, Tolar J, Liu K, Kudlow J. (2001)**: The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin inhibition of pancreatic b-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-b-D-glucosaminidase. *Biochemical Journal* 356: 34-41.

-L-

- **L Rubi Dr.(2007):**Alan,DiabetesParaDummies, 2 aEdicin Indianapolis, Indiana: wiley Publishing, Inc.
- **Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K.W., Chen F., Tian Y. (2007):** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771-776.
- **Ljubuncic P., Azaizeh H., Portnaya I., Coganc U., Said O., Saleh K.A., Bomzon A.(2005):** Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel, *Journal of Ethnopharmacology* **99** :43–47.
- **Lounes S :** Diabète en Algérie, 1 malade sur 2 ignore en être atteint [En ligne] ligne : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html>

-M-

- **Mai L P., Gu_Ñritte F İ., Dumontet V., Tri M V., Hill B, Thoison O., Gu_Ñnard D. and S_Ñvenet T. (2001)** Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. *J. Nat. Prod.* 64: 1162-1168.
- **Martínez-Sánchez J J., Franco., J A., Vicente., M J., Muñoz M., Ba_ñón S., Conesa E., Fernández J A., Valdés R., Miralles J., Ochoa J., Aguado M., Esteva J., López J., Aznar L. (2008).** Especies silvestres mediterráneas con valor ornamental Selección, producciónviverística y utilización en jardinería. Dirección General de Patrimonio Natural y Biodiversidad. Consejería de Agricultura y Agua, Región de Murcia, p.224
- **Marzouk M S., El-Toumy S A A., Merfort I., and Nawwar M A M. (1999).** Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*. *Phytochem.*; 52: 943-946.
- **Massin,P.,Eraginay A & Gaudric A. (2000).** :Ritonopathie diabétique. Ed. Scientifiques et médicales Elsevier SAS. P : 137.

- **Mathieu A. (1860)** :Flore forestière; description et histoire des végétaux ligneux qui croissent spontanément en France et des essences importantes de l'Algérie. Suivies d'une méthode analytique pour en déterminer les principales espèces. Ed. Ancienne maison Grimblot et cie, N. Grosjean, successeur, Nancy, , p. 52-53.
- **Moatti R., Fouron R. et Donadieu Y. (1983)** : La phytothérapie : thérapeutique différente. *Edition Librairie Maloine S.A.*, vol. 01, p 245.
- **Moatti R., Fouron R. et Donadieu Y. (1983)** : La phytothérapie : thérapeutique différente. *Edition Librairie Maloine S.A.*, vol. 01, p 245.
- **Mutalik S., Chetana M., Sulochana B., Devi P.U. and Udapa N. (2005)**: Effect of Dianex, an herbal formulation on experimentally induced diabetes mellitus. *Phytothérapie. Res.May*; 19(5): p409.
- **Mutalik S., Chetana M., Sulochana B., Devi P.U. and Udapa N. (2005)**: Effect of Dianex, an herbal formulation on experimentally induced diabetes mellitus. *Phytothérapie. Res.May*; 19(5): p409.

-O-

- **OMS. Le diabète. WHO. (2012)**. [consulté le 8 Novembre 2012].
- **Organisation mondiale de la Santé. (2011)** Guide Technique Pour la Surveillance Intégrée de la Maladie et la Riposte dans la Région Africaine. 2eme Edition Févrierpour la version française Centers for Disease Control and Prevention.
- **Owen P.L. et Johns T. (1999)**: Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacologie*, **64**: 149-160.

-P-

- **Pavana P, Sethupathy S, Manoharan S. (2007):** Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of *tephrosia purpurea* seed extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*; 22(1):77-83.
- **Penzig O. (1902) :** Flore coloriée de poche du littoral méditerranéen. Ed. P. Klincksieck, Paris, , p. 27-28.
- **Perlemuter L., De l'Hortet G c., sélam J L. (2000) :** diabète et maladies métaboliques. Masson ; 3 :89, 90, 101,150
- **Peter-Riesch B., Philippe J., Stalder H. (2002)** Découverte d'un diabète sucré. *PrimaryCare* 2:284–290.
- **Portha B. (2003) :** Anomalies programmées de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type 2 : le paradigme du rat GK. *Med/Sciences* 19 :847-53

-Q-

- **Quettier-deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J. C. Bailleul F. et Trotin F. (2000) :** Phenolic compounds and antioxidants activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35-42.
- **Quezel P and Santa S. (1963)** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, , p. 617-620.*

-R-

- **Raccah D. (2004) :** Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*. 1(1): 29-42.
- **Ribéreau Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et Ribéreau Gayon P. (1982) :** Composés phénoliques. In *Traité d'oenologie, sciences et techniques du vin* . Edition Dunod, Paris, pp. 477-499

- **Ribéreau-Gayon P. (1968):**« Notion générales sur les composés phénoliques » In . *phénoliques des végétaux*. Edition Dunod, Paris, pp. 105-133.
 - **Richardson J E., Fay M F., Cronk Q C B., Bowman D and Chase M W.(2000)** A phylogenetic analysis of *Rhamnaceae* using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.*; 87: 1309-1324
- S-
- **Schawenberg P. et Paris F. (1977)** :Guide des plantes médicinales. *Delachaux et Niestlé*
 - **Scheen A J. (2007):** Antidiabetic agents in subjects with mild dysglycaemia: prevention or early treatment of type 2 diabetes? *Diabetes & Metabolism*, 33: 3–12.
 - **Scheen A. J., Luyckx F H. (2010)** : L’hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) revisitée: 1re partie: Tolérance au glucose, diabète gestationnel et hypoglycémie réactive. *Médecine des Maladies Métaboliques.*; **4**: 569-574.
 - **Scheen A.J. (2007):** Antidiabetic agents in subjects with mild dysglycaemia: prevention or early treatment of type 2 diabetes? *Diabetes & Metabolism*, 33: 3–12.
 - **Senee V.(2006):** Mutations in GLIS 3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabete mellitus and congenital hypothyroidisme, *Nat genet* .38(6) :682-7.
 - **Silbernagl S.,Lang F.(2003)** : Reins, équilibre hydrominéral. Métabolisme des lipoprotéines. In *Atlas de poche de physiopathologie*. Flamarion, pp.118-247.
 - **Silva B M., Szpoganicz B., Pizzolatti M G., Willrich M V., De Sousa E. (2002):** Acute effect of Bayhinia forficata on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethonopharmacology* : 1-5.

- **Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier. J., Amziani R., El Boustani. S. et Moulin A. (2004):** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86:919-925..
- **Strandell E., Eizirik DL., Korsgren O., Sandler S. (1988)** Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations.
- **Szkudelski T. (2001) :** Le mécanisme d'action de l'alloxane et streptozotocine dans les cellules B du rat pancréas. *Physiol Res* 50:537-46.

-T-

- **The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial.» (1995);** [éditorial]. *Diabetes* 44(8):968-83.
- **Tsilibary EC.(2003) :** «Microvascular basement membranes in diabetes mellitus.» *J Pathol*; 200(4):537-46.
- **Tuomilehto J, Rastenyte D, Jousilahti P, Sarti C, Vartiainen E.(1996) :**«Diabetes mellitus as a risk factor for death stroke.Prospective study of the middle-ageFinnish population.» *Stroke*;27(2):210-5

-V-

- **Valnet J. (1983) :** Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes. Paris, édition Maloine S.A., 5^eédition, vol. 01, p 942.
- **Velho G., Bellanné Chantelof C & Timsit J.(2003) :** Le MODY : modèle d'étude d'interactions génotype/phénotype dans le diabète de type 2. *Médecine sciences*, Vol. 9, PP :854_859.
- **Virally M., Blicklé J.F., Girard J., Halimi S., Simon D., Guillausseau P. J. (2007):** Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism*; 33: 231–244.

-W-

- **Wei B L., Lin C N and Won S J. (1992)** Nakahalene and Cytotoxic principles of Formosan Rhamnus Species. *J. Nat. Prod.*; 55: 967-969.
- **Wens J., Patricia S., Frank N., Luc F., Paul V.C., Hilde B., Paul V.R. (2005) :** Recommandations de bonne pratique.diabete sucre de type 2.Societe scientifique de médecine générale. Validé par le CEBAM sous le numéro 2005/02.

-Y-

- **Yen G C., Chen H Y., (1995).** Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 27–32.
- **Yi-ling C et Pan-Kai C. (1982) :** Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, ed., *Fl. Reipubl. Popularis Sin.* 48(1):1-169.
- **Yki-Jarvinen H. (2002):** Combination therapy with insulin and oral agents: optimizing glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*; (Suppl. 3): p 77–81.
- **Yki-Jarvinen H. (2002):** Combination therapy with insulin and oral agents: optimizing glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*; (Suppl. 3): p 77–81.
- **Youl Rhe S., Chon S., Kwon MK., Park IB., Ahn KJ, Kim IJ et al. (2011)** Prevalence of Chronic Complications in Korean Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Based on the Korean National Diabetes Program. *Diabetes Metab J.*;35:504-512.

Annexes

Annexe I : les courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes.

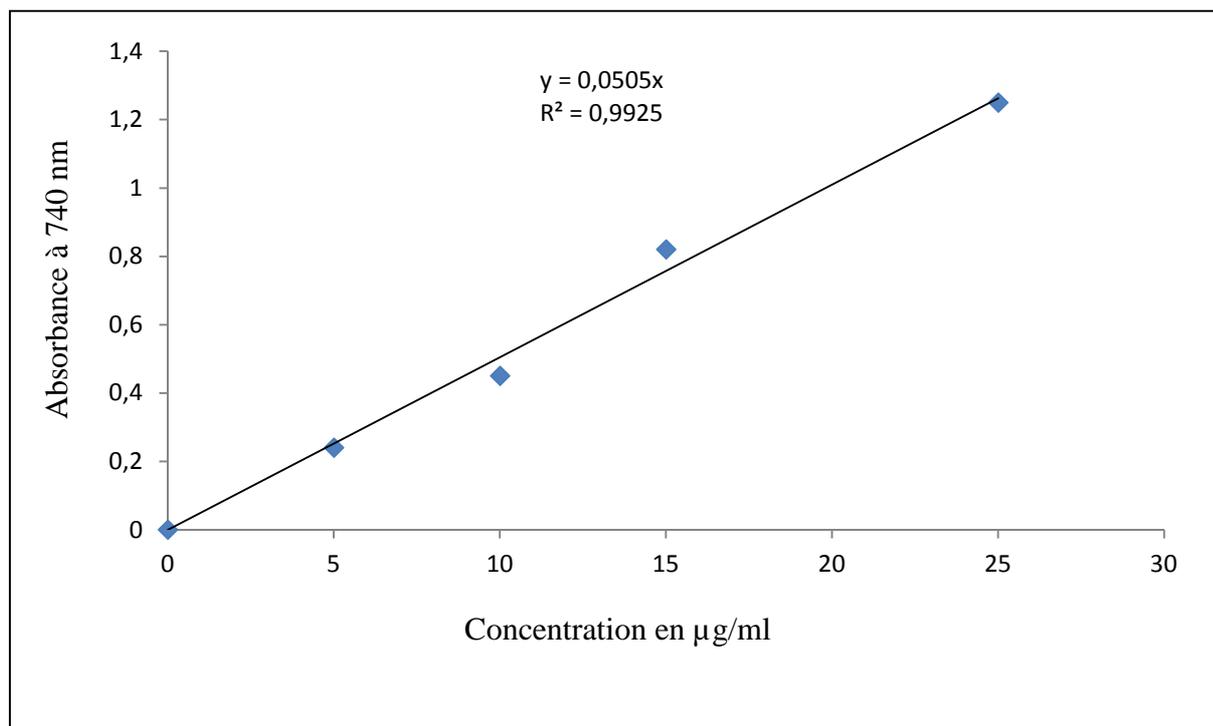


Figure I : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique.

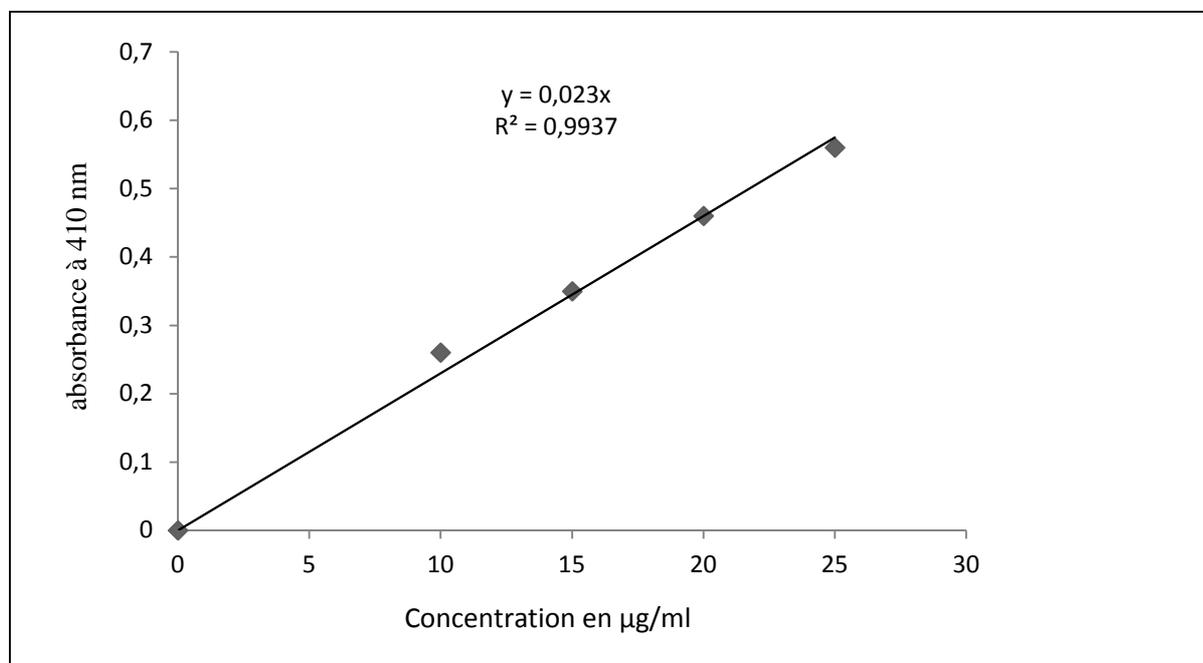


Figure II : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.

Annexe II : Fiches techniques de la composition des réactifs du dosage des paramètres

Lipidiques sanguins

Fiche technique N° 1

Réactif pour le dosage du cholestérol total

R1 Buffer	PIPE pH 6.9	90 mmol/L
		26 mmol/L
R2 Enzyme	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.4 mmol/L
CHOLISTEROL CAL	Cholestérol primaire standard aqueux 200mg/dL	

Fiche technique N° 2

Réactif pour le dosage des triglycérides

R1 Buffer	GOOD pH 7.5	50 mmol/L
	P-chlorophenol	2 mmol/L
R2 Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycerokinase (GK)	500 U/L
	Glycero-3-oxidase (pod)	2500 U/L
	Peroxidase (POD)	440 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol
TRIGLYCERIDESCAL	Triglycérides aqueux standard primaire 200 mg/dL	

Annexes III : Fiches techniques de la composition des produits utilisés lors de la préparation des coupes histologique

Fiche technique N° 1 : Eau gélatiné 0,4 % (**Martoja, 1967**)

Gélatine en poudre	0,4 g
Eau distillée	100 ml

La solution est homogénéisée sous agitateur sur une plaque chauffante

Fiche technique N° 2 : Hématoxyline de Groat : préparation à froid

Solution A	Acide sulfurique concentré	0,8ml
	Alum de fer	1g
	Eau distillée	50ml
Solution B	Hématoxyline	0,5g
	Alcool 90°	50 ml

Résumé

Résumé

L'objectif de la présente étude est de maitre en évidence, les effets des extraits méthanoliques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. à différentes doses 200 mg/kg/jour et 400mg/kg/jour, chez des souris souches *swiss albinos* rendues diabétiques par injection de la streptozotocine. L'analyse phytochimique a montré leur richesse en composés phénoliques (flavonoidiques).

Durant les 20jours de l'expérimentation, une stabilité du poids était observée avec quelques variations chez les deux groupes traités. L'administration de l'extrait a montré un effet antihperglycémique qui a été confirmé par un test complémentaire ; test de tolérance au glucose et un effet antidiabétique confirmé par la régénération des ilots de langerhans en effectuant des coupes histologiques de pancréas.

Mots clés : activité antidiabétique, *Rhamnus alaternus* L. streptozotocine, hyperglycémie,

Summary

The objective of this study is to highlight master, the effects of methanol extracts of the leaves of *Rhamnus alaternus* L.different doses 200 mg/kg/day, and 400 mg/kg/day, in strains *swiss albino* mice made diabetic by injection of streptozotocine. Phytochemical analysis showed their high phenolic compounds (flavonoid).

During 20 days of the experiment, a stable weight was observed with some variations in both treatment groups. The administration of the extract showed a anthyperglycémique effect was confirmed by an additional test; test glucose tolerance, and antidiabetic effect, confirmed by the regeneration of islets of Langerhans in performing histological sections of pancreas.

Keywords: anti-diabetic activity, *Rhamnus alaternus* L, streptozotocine, hyperglycaemia.

