

Année 2018

N° d'ordre : 09/18 CSVS

Thèse de doctorat

Titre

Étude Pharmacologique Toxicologique de l'*Arbutus unedo L.* au Maroc

Formation doctorale : Sciences du Médicament

Présentée par

Hanae NACEIRI MRABTI

Soutenue publiquement le : 10/12/2018

Devant les membres de jury :

| | | |
|---------------------------|--|------------------------|
| Pr Yahia CHERRAH | Faculté de Médecine et de Pharmacie - Rabat Université Mohammed V | Président |
| Pr My Abbes FAOUZI | Faculté de Médecine et de Pharmacie - Rabat Université Mohammed V | Directeur de thèse |
| Pr Bruno ETO | Faculté de Médecine et de Pharmacie - Xavier Bichat Université Paris Diderot | Co- Directeur de thèse |
| Pr Abdellatif BOUR | Faculté des Sciences - Kenitra Université Ibn Tofail | Rapporteur |
| Pr Youssef BAKRI | Faculté des Sciences - Rabat Université Mohammed V | Rapporteur |
| Pr M'hammed ANSAR | Faculté de Médecine et de Pharmacie - Rabat Université Mohammed V | Rapporteur |
| Pr Mourad ERRASFA | Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès Université Sidi Mohammed Ben Abdellah | Examineur |

*« La culpabilité ne s'attache qu'à celui
qui demeure ignorant quand il a une
chance d'apprendre. »*

Frank HERBERT

Dédicace

Je dédie cette thèse

A Mon très cher époux Marouane Saidi



*Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour
et mon attachement à toi.*

*Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de
m'épauler. Tu me voulais toujours la meilleure.*

Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité.

*Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus
difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés. Je te remercie de ne m'avoir
jamais déçu.*

Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect.

*Je remercie le bon dieu qui a croisé nos chemins. Puisse le bon dieu nous procure
santé et longue vie.*

Remerciements

Un travail scientifique n'est jamais le fruit d'une seule personne, il est l'émanation d'une communauté, d'un réseau d'enseignants et de chercheurs. C'est le moment de remercier toutes les personnes qui ont permis que ce travail se réalise.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Monsieur le **Pr. My Abbes FAOUZI**, de m'avoir témoigné sa confiance en acceptant la direction de ce travail avec beaucoup de bienveillance et une disponibilité à tous les instants. Sa franchise, sa sympathie, son dynamisme, sa rigueur, son esprit critique, et ses conseils judicieux m'ont aidé efficacement à mener ce travail à terme.

Je remercie tous les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail. Je tiens à grandement remercier Monsieur le **Pr. Yahia CHERRAH**, directeur du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse en qualité de président.

Je suis très reconnaissante envers mon co-directeur de thèse Monsieur le **Pr. Bruno ETO**, pour sa finesse d'esprit, son humour et son aimable accueil qui ont contribué grandement au réel plaisir que j'ai eu lors de mon stage de recherche au sein du Laboratoire Trans-CellLab de la faculté de médecine et de pharmacie, Xavier Bichat en France. Je vous remercie également pour l'orientation, l'aide et les conseils que vous m'avez donnés tout au long de mon stage. Merci aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de soutenance.

Je tiens à exprimer ma respectueuse gratitude à Monsieur le **Pr. Abdellatif BOUR** de la Faculté des Sciences de Kenitra, pour avoir aimablement accepté de juger ce travail et d'honorer par sa présence le jury de ma thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur le **Pr. Youssef BAKRI** de la Faculté des Sciences de Rabat, qui a porté un intérêt considérable à ce travail et qui n'a ménagé aucun effort pour siéger parmi le jury de ma thèse.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le **Pr. M'hammed ANSAR** de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, qui me fait l'honneur d'avoir accepté de porter son jugement hautement qualifié sur mon travail, je le prie de bien trouver ici l'expression de ma plus grande estime d'avoir accepté de siéger parmi le jury.

Mes remerciements vont également à Monsieur le **Pr. Mourad ERRASFA** de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, qui me fait l'honneur de siéger parmi les membres de mon jury.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le **Pr. Faouzi KICHOU** de l'Unité d'Histologie et Anatomie Pathologique, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, pour la qualité de sa collaboration. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt porté à ce travail.

Je remercie également Monsieur le **Pr. Jamal CHAHDI OUZZANI** directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles ICSN, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS, Gif-sur-Yvette, France. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Soyez assuré de mon profond respect et de ma vive reconnaissance de m'avoir fait bénéficier de vos expériences et de vos rigueurs scientifiques et professionnelles.

J'adresse de chaleureux remerciements à Messieurs les docteurs **Godefroy Bruno MAMADOU, Nicolas LIMAS NZOUZI et Joe MIANTEZILA** qui m'ont initié à la pratique, la compréhension et la maîtrise de la technique de la chambre d'Ussing. Merci pour vos conseils et votre amitié.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à tous mes amis, et à tous les chercheurs des Laboratoires de Pharmacologie et Toxicologie, Chimie Thérapeutique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, qui m'ont aidé, encouragé et soutenu et qui ont contribué à rendre l'ambiance de travail très agréable.

Que mes parents et mes frères trouvent à travers cette thèse l'expression de ma profonde reconnaissance et ma gratitude éternelle pour l'amour qu'ils m'ont témoigné, le soutien indéfectible et constant et pour la confiance qu'ils m'ont accordée durant toutes ces longues années d'étude. J'espère en avoir été digne, mille fois Merci.

Avant-propos

Mon travail de thèse s'est déroulé principalement sous l'encadrement du professeur My Abbes FAOUZI au sein du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, qui est sous la direction du Professeur Yahia CHERAH.

L'étude du mécanisme d'action de l'effet antidiabétique en utilisant les chambres d'Ussing, a été réalisé dans le laboratoire Trans-CellLab de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Xavier Bichat en France, sous la direction du Professeur Bruno ETO (Professeur en Sciences du Médicament) ; dans le cadre d'une formation (Stage).

L'étude phytochimique (extraction, séparation, isolement, identification), a été faite au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles ICSN, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS, Gif-sur-Yvette, France, en collaboration avec le Professeur Jamal CHAHDI OUAZZANI.

L'étude des paramètres biochimiques a été réalisée en collaboration avec Dr. Mme Badia BELRAJ au sein du laboratoire de biochimie-toxicologie, l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V à Rabat.

L'étude histologique a été réalisée au sein de l'unité d'Histologie et Anatomie Pathologique à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, sous la direction du Professeur Faouzi KICHOU.

Ces travaux ont été réalisés grâce à l'appui du :

- Projet global de l'université Mohammed V, Rabat.

Cette thèse m'a permis d'apprendre énormément de choses tant en termes des connaissances théoriques et pratiques, ainsi que sur le plan personnel.

SOMMAIRE

| | |
|-------------------------|----|
| Dédicace | 2 |
| Remerciements | 3 |
| Avant-propos | 5 |
| Sommaire | 6 |
| Production scientifique | 10 |
| Liste des abréviations | 12 |
| Liste des figures | 13 |
| Liste des tableaux | 14 |
| Introduction générale | 15 |

PREMIÈRE PARTIE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|----|
| 1. Digestion et absorption des glucides | 19 |
| 1.1. Digestion des glucides | 19 |
| 2. Diabète sucré – généralités | 22 |
| 2.1. Diagnostic du diabète sucré | 23 |
| 2.2. Classification | 24 |
| 2.2.1. Diabète de type I | 25 |
| 2.2.2. Diabète de type II | 25 |
| 2.2.3. Diabète gestationnel | 26 |
| 2.2.4. Autres types de diabète : Diabète secondaire (spécifique) | 26 |
| 3. Physiopathologie du diabète de type II | 26 |
| 3.1. Insuffisance pancréatique | 27 |
| 3.2. Résistance à l'insuline | 27 |
| 4. Complications du diabète sucré | 28 |
| 4.1. Complications aiguës | 28 |
| 4.1.1. Acidocétose diabétique | 28 |
| 4.1.2 Coma hyperosmolaire | 28 |
| 4.1.3 Acidose lactique | 29 |
| 4.2. Complications chroniques | 29 |
| 4.2.1. Complications microangiopathiques | 29 |
| 4.2.1.1 Rétinopathie diabétique | 29 |
| 4.2.1.2 Neuropathie diabétique | 30 |
| 4.2.1.3 Néphropathie | 30 |
| 4.2.2 Complications macroangiopathiques | 31 |
| 5. Diabète et stress oxydant | 31 |
| 5.1. Auto-oxydation du glucose ou glycoxydation | 32 |
| 5.2. Voie des polyols | 32 |
| 5.3. Voie de la Protéine kinase C (PKC) | 33 |
| 5.4. Production de produits terminaux de glycation (AGE) | 33 |
| 6. Traitement du diabète sucré | 34 |
| 6.1. Traitements non médicamenteux | 34 |
| 6.2. Traitements médicamenteux | 35 |
| 6.2.1. Sulfamides | 35 |

| | |
|--|----|
| 6.2.2. Biguanides | 35 |
| 6.2.3. Glinides ou métaglinides | 36 |
| 6.2.4. Thiazolidinédiones ou glitazones | 36 |
| 6.2.5. Inhibiteurs de DPP-4 | 37 |
| 6.2.6. Inhibiteurs des alphas glucosidases intestinales | 37 |
| 6.3. Traitement naturel | 38 |
| 6.3.1. Modes d'actions des plantes antidiabétiques | 39 |
| 6.3.2. Etude toxicologique des plantes médicinales | 40 |
| 7. Induction du diabète expérimental | 42 |
| 7.1. Modèles de diabète induits chimiquement : alloxane et streptozotocine (STZ) | 42 |
| 7.1.1. Streptozotocine | 43 |
| 7.1.2. Alloxane | 45 |
| 8. Plantes sous l'étude | 46 |
| 8.1. <i>Arbutus unedo L</i> | 46 |
| 8.1.1. Description botanique d' <i>Arbutus unedo L</i> | 46 |
| 8.1.2. Classification classique | 47 |
| 8.1.3. Propriétés et usages | 47 |
| 8.1.4. Composition chimique d' <i>Arbutus unedo</i> | 48 |

DEUXIÈME PARTIE

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|-----------|
| Chapitre 1 : Enquête ethnopharmacologique | 51 |
| I. Introduction | 51 |
| II. Matériel et méthodes | 52 |
| 1. Description de la zone d'étude | 52 |
| 2. Méthodologie | 53 |
| 3. Identification taxonomique et authentification des données | 53 |
| 4. Analyse des données | 54 |
| 4.1. Fréquence relative de la citation (FRC) | 54 |
| III. Résultats | 55 |
| 1. Données sociodémographiques des informateurs | 55 |
| 2. Flores médicinales | 56 |
| 2.1 Plantes médicinales utilisées dans la gestion du diabète sucré | 56 |
| 3. Partie de plantes utilisées, modes de préparation et d'administration | 60 |
| IV. Discussion | 61 |
| V. Conclusion | 63 |
| Chapitre 2 : Etude phytochimique | 64 |
| I. Introduction | 64 |
| II. Matériel et méthodes | 65 |
| 1. Récolte | 65 |
| 2. Préparation des extraits aqueux lyophilisés | 65 |
| 3. Calcul de rendement | 65 |
| 4. Screening phytochimique | 66 |
| a. Les tanins | 66 |
| b. Flavonoides | 66 |
| c. Térpénoides | 66 |

| | |
|--|-----------|
| d. Quinones libres | 66 |
| e. Anthraquinones | 67 |
| f. Anthocyanes | 67 |
| g. Saponines | 67 |
| h. Alcaloïdes | 68 |
| 5. Dosage phytochimique | 68 |
| 5.1. Dosage des polyphénols totaux | 68 |
| 5.2. Dosage des flavonoïdes | 69 |
| 5.3. Dosage des tanins | 70 |
| 5.4. Dosage des sels minéraux | 71 |
| 6. Etude de l'activité antioxydante : Piégeage du radical libre DPPH | 71 |
| 6.1. Test au DPPH | 72 |
| III. Résultats | 73 |
| 1. Rendement d'extraction | 73 |
| 2. Dépistage phytochimique | 73 |
| 3. Dosage des polyphénols totaux | 74 |
| 4. Dosage de flavonoïdes | 75 |
| 5. Dosage des tanins catéchiques | 76 |
| 6. Composition minérale | 77 |
| 7. Activité antioxydante | 78 |
| 7.1. Piégeage du radical libre DPPH | 78 |
| IV. Discussion | 80 |
| V. Conclusion | 82 |
| Chapitre 3 : Activité antidiabétique | 83 |
| I. Introduction | 83 |
| II. Matériel et méthodes | 85 |
| 1. Activités antidiabétiques <i>in vitro</i> | 85 |
| 1.1. Effet inhibiteur de l' α -amylase | 85 |
| 1.2. Effet inhibiteur d' α -glucosidase | 85 |
| 2. Evaluation de la toxicité aigüe | 86 |
| 2.1. Animaux expérimentaux | 86 |
| 2.2. Méthode | 86 |
| 3. Activité antidiabétique <i>in vivo</i> | 86 |
| 3.1. Induction du diabète expérimental | 86 |
| 3.2. Evaluation des effets antidiabétiques | 87 |
| 3.2.1. Évolution du poids corporel | 87 |
| 3.2.2. Détermination des paramètres biochimiques | 87 |
| 3.3. Collecte et traitement des tissus pour examen | 87 |
| 4. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i> | 88 |
| 4.1. Préparation des homogénats | 88 |
| 4.2. Activité du superoxyde dismutase (SOD) | 88 |
| 4.3. Peroxydation lipidique | 88 |
| 5. Evaluation statistique | 89 |
| III. Résultats | 90 |
| 1. Activités antidiabétiques <i>in vitro</i> | 90 |
| 2. Toxicité aigüe | 90 |
| 3. Activités antidiabétiques <i>in vivo</i> | 90 |
| 3.1. Effet anti-hyperglycémiant | 90 |
| 3.2. Effet sur le poids corporel | 91 |
| 3.3. Effet sur les paramètres biochimiques | 92 |

| | |
|--|------------|
| 3.4. Étude histologique | 93 |
| 4. Evaluation de l'activité antioxydante in vivo | 96 |
| 4.1. Activité du superoxyde dismutase | 96 |
| 4.2. Effet d' <i>A. unedo</i> sur la peroxydation lipidique | 96 |
| IV. Discussion | 98 |
| V. Conclusion | 103 |
| Chapitre 4 : Chambre Ussing : Mécanisme hypoglycémiant | 104 |
| I. Introduction | 104 |
| II. Matériel et méthodes | 107 |
| 1. Appareillage | 107 |
| 2. Solutions utilisées | 107 |
| 3. Animal | 107 |
| 4. Extraction du matériel végétal | 107 |
| 5. Préparation du tissu | 107 |
| 6. Montage du tissu | 108 |
| 7. Etude d'effet d' <i>A.unedo</i> sur l'absorption intestinale du glucose | 108 |
| 8. Statistiques | 108 |
| III. Résultats | 109 |
| 1. L'effet inhibiteur D' <i>A. unedo</i> sur l'absorption du glucose | 109 |
| IV. Discussion | 111 |
| V. Conclusion | 112 |
| Chapitre 5 : Caractérisation chimique | 113 |
| I. Introduction | 113 |
| II. Matériel et méthodes | 114 |
| 1. Matériel végétal | 114 |
| 2. Procédures d'extraction et d'isolation | 114 |
| 3. Méthodes analytiques | 115 |
| 3.1. HPLC analytique | 115 |
| 3.2. HPLC semi préparative | 115 |
| 4. Test d'inhibition enzymatique | 115 |
| 5. Analyses RMN | 115 |
| 6. Analyses statistiques | 116 |
| III. Résultats | 117 |
| IV. Discussion | 121 |
| V. Conclusion | 123 |
| Conclusion et perspectives | 124 |
| Références | 126 |
| Résumé | 149 |
| Abstract | 151 |
| Annexes | 152 |

Production scientifique

Cette thèse a fait l'objet de plusieurs articles scientifiques publiés dans des journaux internationaux, et des communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux.

▪ Articles scientifiques

1- H. Naceiri Mrabti, I. Marmouzi, K. Sayah, L. Chemlal, Y. El Ouadi, H. Elmsellem, Y. Cherrah, My A. Faouzi. «*Arbutus unedo* L aqueous extract is associated with *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity ». Journal of Materials and Environmental Sciences. Vol 8, Issue 1, 2017. Pages: 217-224.

2- H. Naceiri Mrabti, K. Sayah, N. Jaradat, F.Kichou, A.Ed-Dra, B.Belarj, Y.Cherrah, My A. Faouzi. « Antidiabetic and protective effects of the aqueous extract of *Arbutus unedo* L. in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice ». Journal of Complementary and Integrative Medicine. 2018. Pages: 1-11.

3- H. Naceiri Mrabti, N. Jaradat, I.Fichtali, W.Ouedrhiri, S. Jodeh, S. Ayesh, Y.Cherrah, My A. Faouzi. «Separation, Identification, and Antidiabetic Activity of Catechin Isolated from *Arbutus unedo* L. Plant Roots». Journal of Plants. Vol 7, Issue 2, 2018. Pages: 1-31.

4-K. Sayah, I. Marmouzi, H. Naceiri Mrabti, Y. Cherrah, My A. Faouzi. « Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia ». Bio Med Research International. Vol 2,2017. Pages1-7.

5- Y. El Ouadi, H. Bendaif, H. Naceiri Mrabti, H. Elmsellem, Y. Kadmi, M.A, Shariati, I. Abdel-Rahman, B. Hammouti, A. Bouyanzer. «Antioxidant Activity of Phenols and flavonoids contents of aqueous extract of *Pelargonium Graaveolens*orgin in the north – east Morocco». Journal of microbiology, biotechnology and food sciences Vol 6, Issue 5.2017, Pages: 1218-1220.

6-I. Marmouzi, M. El Karbane, M. El Hamdani, M. Kharbachd, H. Naceiri Mrabti, R. Alami, S. Dahraouif, M. El Jemlia, Z. Ouzziff, Y. Cherrah, S. Derraji, My A. Faouzi. «Phytochemical and pharmacological variability in Golden Thistle functional parts:

comparative study of roots, stems, leaves and flowers ». Journal Natural product research. February 2017.

7-Fatma Ben Ayed, Godefroy Mamadou, Hanae Naceiri Mrabti, Nicolas Limas- Nzouzi, Bruno Eto, Sâad Saguem. « Studies on intestinal passage of flumequine and Oxytetracycline - loaded MIL-100 (Fe) in the presence of divalent ions». Tropical Journal of Pharmaceutic al Research Vol 17, Issue 7.2018, Pages: 1295-1299.

8- H. Naceiri Mrabti, M R. Kachmar, A.Ed-Dra, A.Ouahbi, Y. Cherrah, My A. Faouzi. « Ethnopharmacological survey of herbal treatment of diabetes in Beni Mellal region, West center Morocco». Soumis.

9-Hanae Naceiri Mrabti, Francois Massako Mayuk, Moulay EL Abbes Faouzi, Yahia Cherrah, Bruno Eto. « *Arbutus unedo L.*, (Ericaceae) inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rodents ». Soumis.

▪ **Communications orales**

1- H.Naceiri Mrabti, Y.Cherrah, My A. Faouzi. « Activité Antidiabétique *in vitro* et *in vivo* d'*Arbutus unedo L* ». Le V^{ème} congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (Tabarka), Tunisie. (22-25 Mars 2017).

▪ **Communications par affiche**

1- H. Naceiri Mrabti, Y.Cherrah, My A. Faouzi. « Phytochimie et Activité Antioxydant d'*Arbutus unedo L* ». Journées d'Etudes sur les Ressources Naturelles dans la Province de Taza. (16-18 Novembre 2016).

Liste des abréviations

| | |
|------------------|--|
| <i>A. unedo</i> | <i>Arbutus unedo</i> L |
| Acétyl-CoA | Acétyl-coenzyme A |
| ADA | American Diabetes Association |
| AGE | Produits finaux de glycation avancés |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| DL50 | Dose Létale Médiane |
| DNS | Acide dinitrosalicylique |
| DPP4 | Dipeptidylpeptidase-4 |
| EA _{AU} | Extrait aqueux de racines d' <i>Arbutus unedo</i> |
| ERO | Espèces Réactives Oxygénées |
| FID | Fédération Internationale du Diabète |
| g | Gramme |
| GLP-1 | Glucagon-like peptide 1 |
| GLUT 1 | Glucose transporteur type 1 |
| GLUT 2 | Glucose transporteur type 2 |
| GLUT 4 | Glucose transporteur type 4 |
| GLUT 5 | Glucose transporteur type 5 |
| GLUT | Glucose Transporteur |
| h | Heure |
| HAS | Haute Autorité de Santé |
| IC50 | Concentration inhibitrice médiane |
| IDDM | Diabète de type I ou diabète insulino-dépendant |
| Kg | Kilogramme |
| l | Litre |
| mg | Milligramme |
| mL | Millilitre |
| mM | Millimolaire |
| mmoles | Millimoles |
| mn | Minute |
| NAPDH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit |
| NFκB | Nuclear factor kappa b |
| NIDDM | Diabète de type II ou diabète non insulino-dépendant |
| nm | Nanomètre |
| OGTT | Oral Glucose Tolerance Test |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| P/V | Poids/Volume |
| pc | Poids corporel |
| PKC | Protéine kinase C |
| PPAR-γ | Peroxisome proliferator activated receptor |
| pNPG | 4-Nitrophenyl β-D-gluco-pyranoside |
| RGPH | Recensement général de la population et de l'habitat |
| SGLT | Sodium-Glucose Linked Transporter |
| STZ/NA | Streptozotocine/Nicotiamide |
| t/mn | Tours/Minute |
| WHO | World Health Organization |
| % | Pourcentage |
| °C | Degré Celsius |

Liste des figures

| | | |
|------------------|---|------------|
| Figure 1 | Principales étapes de la digestion des sucres (Nistor.Baldea et al., 2010) | 20 |
| Figure 2 | L'absorption intestinale du glucose (Harmon and McLeod, 2001) | 22 |
| Figure 3 | Streptozotocine | 43 |
| Figure 4 | Alloxane | 45 |
| Figure 5 | <i>Arbutus unedo</i> L.(Oliveira, 2010) | 47 |
| Figure 6 | Une carte de la province de Beni Mellal | 52 |
| Figure 7 | Espèces les plus utilisées pour traiter le diabète | 56 |
| Figure 8 | Répartition des espèces végétales au sein des familles | 57 |
| Figure 9 | Fréquence des différentes parties utilisées dans le traitement du diabète | 60 |
| Figure 10 | Les formes galéniques des recettes antidiabétiques | 60 |
| Figure 11 | Le mode d'administration des recettes antidiabétiques | 60 |
| Figure 12 | Réduction par des antioxydants de DPPH en DPPHH | 72 |
| Figure 13 | Teneurs en polyphénols totaux d'extrait aqueux d' <i>A.unedo</i> | 75 |
| Figure 14 | Teneurs en flavonoïdes d'extrait aqueux d' <i>A.unedo</i> | 76 |
| Figure 15 | Teneurs en tanins catéchiques d'extrait aqueux d' <i>A.unedo</i> | 77 |
| Figure 16 | Pourcentage d'inhibition du radical DPPH pour les antioxydants de référence | 79 |
| Figure 17 | Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait aqueux (racine, feuille) d' <i>A. unedo</i> | 80 |
| Figure 18 | Principe du dosage du malondialdéhyde | 90 |
| Figure 19 | Examen histologique du pancréas de souris au 30 ^{ème} jour d'expérimentation | 96 |
| Figure 20 | Schéma du principe de la chambre de perméation d'Ussing (Bruno ETO, 2011) | 106 |
| Figure 21 | Effet de l'extrait aqueux d' <i>A. unedo</i> sur l'ISC induite par le glucose | 111 |
| Figure 22 | Extracteur à solvant accéléré (ASE –Dionex). | 115 |
| Figure 23 | (A) Analyse par HPLC de l'extrait aqueux de racines d' <i>A. unedo</i> . (B) L'extrait aqueux de racines d' <i>A. unedo</i> adsorbé par l'ambrelite XAD -16 (temps de rétention de 2 à 16 min). | 119 |
| Figure 24 | Structure de la catéchine | 120 |

Liste des tableaux

| | | |
|-------------------|--|------------|
| Tableau 1 | Données sociodémographiques des informateurs | 55 |
| Tableau 2 | Les plantes et leurs modes d'emploi dans le traitement du diabète | 58 |
| Tableau 3 | Rendement en extrait aqueux sec d' <i>A. unedo</i> | 74 |
| Tableau 4 | Métabolites secondaires d' <i>A.unedo</i> | 74 |
| Tableau 5 | Composition minérale d' <i>A.unedo</i> en mg / kg | 78 |
| Tableau 6 | Valeurs de IC50 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) d' <i>A.unedo</i> | 82 |
| Tableau 7 | Effet d'extraits aqueux d' <i>A. unedo</i> sur les activités de l' α -amylase et de l' α -glucosidase | 91 |
| Tableau 8 | Effet de l'extrait des racines d' <i>A.unedo</i> sur la glycémie à jeun chez les souris rendues diabétiques par la STZ | 92 |
| Tableau 9 | Effet d' <i>A. unedo</i> sur le poids corporel des souris rendues diabétiques par la STZ | 93 |
| Tableau 10 | Effets de l'extrait d' <i>A. unedo. L</i> sur des paramètres biochimiques sur des souris diabétiques induites par le STZ | 94 |
| Tableau 11 | L'effet d' <i>A. unedo</i> sur l'activité de Superoxyde dismutae | 97 |
| Tableau 12 | L'effet d' <i>A. unedo</i> sur la production MDA dans les tissus hépatiques et rénaux | 98 |
| Tableau 13 | L'effet inhibiteur de la catéchine sur l' α -glucosidase | 121 |

Introduction générale

Le diabète est l'une des plus anciennes maladies connues de l'humanité dont l'effet dévastateur augmente de jour en jour et gravement à un niveau épidémique (Wild et al., 2004). C'est une maladie du métabolisme désordonné des glucides, qui affecte également les protéines et les graisses qui sont causées par l'insuffisance totale ou relative de l'action de l'insuline (Rodier, 2001).

Plusieurs données expliquent que les principaux facteurs de risques responsables de la propagation du diabète sucré, sont l'urbanisation, le changement de mode de vie, l'inactivité physique, l'obésité, et le stress psychosociologique qui menace les individus jour après jour (Whiting et al., 2011).

Le diabète connaît une expansion très significative, selon les dernières estimations de l'OMS et de l'IDF (2016), 422 millions de personnes dans le monde sont diabétiques, ce chiffre atteindrait 552 millions d'ici 2030, soit une personne sur dix et la moitié des personnes atteintes de diabète ne sont pas diagnostiquées. Actuellement, Il y a plus de 199 millions de femmes diabétiques dans le monde soit 47% et ce total devrait augmenter à 313 millions. Le diabète se caractérise aussi par la gravité des complications qu'il engendre. En effet, il est la première cause d'insuffisance rénale terminale, de cécité et d'amputation des membres inférieurs, il est aussi la sixième cause de mortalité.

Au Maroc, plus de 2 millions de personnes âgées de 25 ans et plus sont diabétiques dont 50% sont des femmes et malheureusement 50% de l'ensemble des diabétiques méconnaissent leur maladie (Ministère de la santé, 2016).

Malgré l'utilisation des hypoglycémiantes comme drogues antidiabétiques, le diabète et ses complications constituent une grande problématique dans la prise en charge thérapeutique des diabétiques et la réussite du traitement serait d'un intérêt grandiose, malgré l'avancée de nouvelles molécules thérapeutiques. Les médicaments modernes, y compris l'insuline et les hypoglycémiantes oraux (les biguanides, les sulfonylurées), leur administration régulière engendre d'effets indésirables (Bailey, 2008; Grant, 2003). Récemment, les diabétologues sont arrivés à l'évidence d'un complément thérapeutique constitué par les extraits de plantes est nécessaire pour optimiser le traitement du diabète (June et al., 2015; Pareek et al., 2009).

Le domaine de la recherche sur les plantes médicinales a gagné une importance considérable au cours des dernières décennies et la demande d'utiliser des produits naturels dans le traitement du diabète augmente dans le monde entier. La littérature disponible montre qu'il y a plus de 400 espèces végétales montrant l'activité antidiabétique (Grover et al., 2002). Bien que certaines de ces plantes aient une grande réputation dans la médecine traditionnelle, beaucoup restent à démontrer scientifiquement (Kolling et al., 2010). Une étude scientifique des remèdes traditionnels à base de plantes pour le diabète peut fournir de précieuses pistes pour le développement de médicaments et de stratégies alternatives (Pan et al., 2013).

Au Maroc, comme dans tous les pays du Maghreb et les pays en voie de développement, le recours à la médecine traditionnelle est largement répandu, et plusieurs remèdes à base de plantes utilisés individuellement ou en combinaison sont recommandés pour soigner le diabète sucré (Barkaoui et al., 2017).

Les plantes sont une excellente source d'ingrédients actifs qui peuvent être utilisées pour traiter de nombreuses maladies. Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore locale d'intérêt thérapeutique, utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré ou ses symptômes.

Dans un premier temps, nous nous sommes donné pour but la réalisation d'une enquête ethno-pharmacologique qui a été réalisée dans la province de Beni Mellal par des entretiens directs utilisant un questionnaire semi-structuré. Quarante-cinq plantes médicinales appartenant à vingt-cinq familles ont été identifiées comme étant utilisées pour traiter le diabète. La famille des Fabacées était la plus représentée dans cette étude, alors les plantes les plus fréquemment utilisées étaient : *Olea europae*, *Salvia officinalis*, *Allium sativum*, *Trigonella foenum-graecum*. De plus, cette étude a montré que les parties de plantes les plus utilisées étaient respectivement les feuilles et les graines. Cependant, la décoction était la principale méthode de préparation citée dans cette étude.

Parmi les plantes les plus abondantes dans la région, et les moins étudiées, on cite *Arbutus unedo L* qui est connue sous le nom arabe de "Sasnou" dont les racines sont utilisées en médecine traditionnelle spécialement dans le traitement du diabète.

Le présent travail s'intéresse à l'évaluation de l'activité antidiabétique de ce végétal par la réalisation d'une série d'essais effectués sur la souris swiss rendu diabétique par la streptozotocine/nicotiamide comme modèle de diabète expérimental.

Pour cela nous nous sommes fixés sur les objectifs suivants :

- Procéder à un inventaire, identification, authentification (classification taxonomique), des plantes utilisées pour le traitement du diabète par la population autochtone de la province Beni Mellal (Maroc), à l'aide d'une enquête ethnopharmacologique ;
- Une étude phytochimique préliminaire : caractérisation des principaux constituants des extraits de plante, ainsi une étude *in vitro* de leur activité antioxydante respective vis-à-vis du radical libre DPPH.
- Une évaluation *in vitro* pour leur activité inhibitrice vis-à-vis de l' α amylase et des α glucosidases intestinales.
- Evaluer la toxicité aiguë.
- Evaluer l'effet antihyperglycémiant de l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo*, à moyen terme durant (4 semaines), après l'administration orale quotidien de 500mg/Kg p.c d'extrait brut aqueux des racines chez la souris swiss diabétique.
- Suivre l'évolution de quelques paramètres biochimiques sériques : cholestérolémie, triglycéridémie, transaminases, créatinémie, après l'administration orale quotidienne d'extrait des racines d'*A.unedo* chez la souris swiss.
- Evaluation de l'absorption intestinale : Chambre d'Ussing.
- Isoler et identifier la molécule active.

Première partie

Synthèse bibliographique

I. Digestion et absorption des glucides

I.1. Digestion des glucides

Les glucides alimentaires majeurs dans notre alimentation peuvent être d'origine animale ou végétale soit sous forme polymérisée (glycogène, amidon...) ou libre (saccharose, lactose, glucose, fructose, etc.). Les glucides polymérisés et les disaccharides subissent une digestion avant leur absorption qui est relativement simple, à l'exception de l'amidon qui nécessite une première étape de digestion intraluminale. Les produits de cette digestion intraluminale sont ensuite traités comme les disaccharides naturels (saccharose, lactose) au niveau de la bordure en brosse des entérocytes où ils sont clivés en monosaccharides puis absorbés. Toutefois, il est indispensable de mentionner que les monosaccharides absorbés au niveau de l'intestin ne sont que le glucose, le fructose et le galactose. Où le glucose représente environ 80% des produits de digestion formés cependant que le fructose et le galactose représentent environ 20%. En plus le fructose et le galactose sont convertis en glucose par le foie (Tortora and Grabowski, 2001).

Les celluloses ne sont pas digérées dans l'intestin grêle. Elles sont en effet insensibles à l'action des enzymes permettant la digestion des glucides et parviennent intactes dans le côlon, expliquant leur effet laxatif (Holloway et al., 1978).

Quant à l'amidon ingéré, il est hydrolysé par l' α amylase présente dans la salive. L'amidon résiduel est ensuite hydrolysé par l' α -amylase pancréatique en maltose et petits polymères de glucose qui seront à leur tour transformés en glucose par les α -glucosidases (maltase et α -dextrinase) présentes à la bordure en brosse des cellules intestinales (Marze, 2017).

Le glucose issu de la digestion des glucides est soit immédiatement utilisé pour faire fonctionner le corps, soit stocké sous forme de glycogène. Lorsque le repas tarde à venir ou que l'effort se prolonge, le glycogène se transforme à nouveau en "glucose" (Tortora et Grabowski, 2001).

Les autres disaccharides provenant de l'alimentation seront hydrolysés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes par des enzymes spécifiques avec la formation des monosaccharides correspondantes (*figure 1*).

La bordure en brosse des entérocytes présente de nombreuses enzymes souvent appelées disaccharidases ou oligosaccharidases qui vont hydrolyser les saccharides. Ce sont des grosses glycoprotéines enchâssées dans la membrane entérocytaire et faisant saillie dans la lumière intestinale. On en distingue deux familles (Lecleire, 2008) :

- Les α -glucosidases, comprenant la saccharase-isomaltase, la glucoamylase et la tréhalase. Les deux premières hydrolysent le saccharose, le maltose et les oligosaccharides provenant de l'action de l' α -amylase sur l'amidon, alors que la dernière hydrolyse le tréhalose.
- Une β -galactosidase unique, la lactase, hydrolyse le lactose en galactose et en glucose. Cette dernière enzyme est la seule à ne pas être inductible.

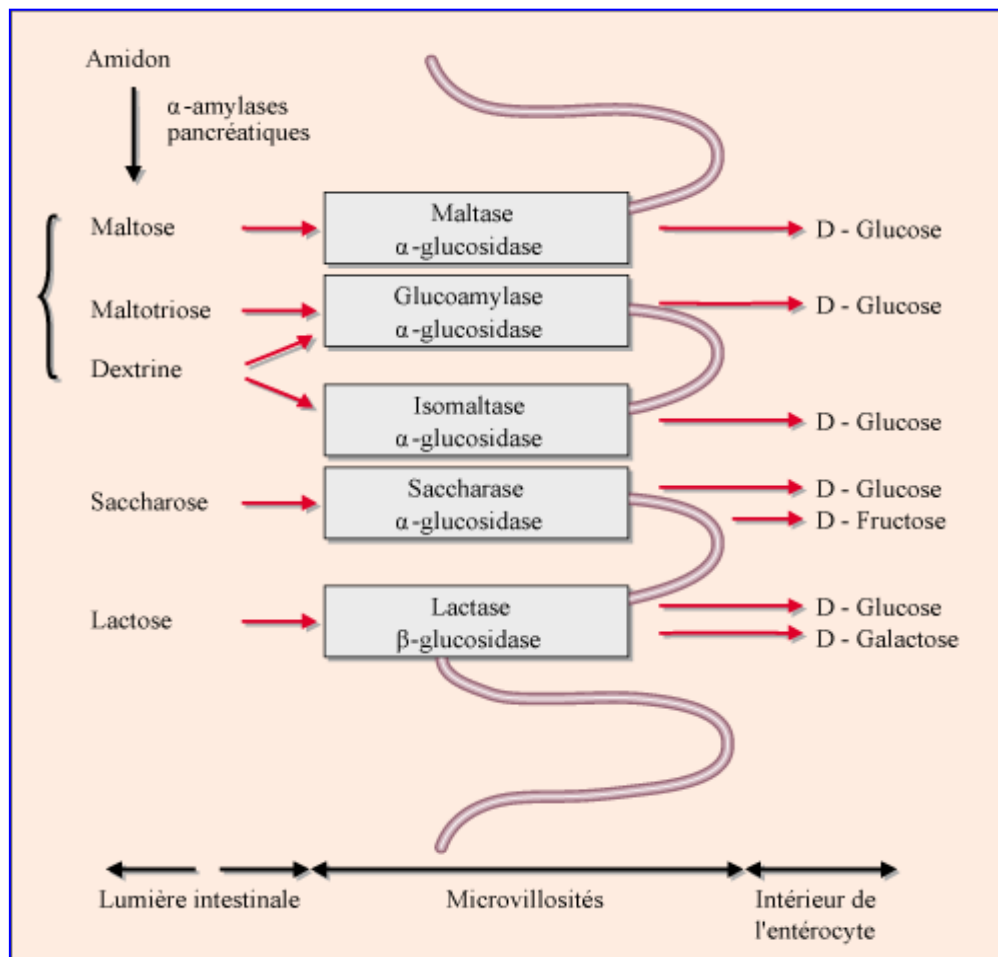


Figure 1: Principales étapes de la digestion des sucres (Nistor Baldea et al., 2010)

Après une digestion complète, tous les glucides complexes sont transformés en sucres simples principalement constitué du glucose, alors l'absorption des glucides se fait sous forme de monosaccharides. Ils doivent ensuite traverser les cellules épithéliales de l'intestin grêle afin de rejoindre la circulation sanguine. Il est à savoir que la membrane des cellules épithéliales est lipophile donc les sucres ne peuvent pas passer et ont besoin de transporteur. Les transporteurs membranaires du glucose appartiennent à deux familles distinctes : (1) les SGLT (Sodium-Glucose Linked Transporter), Co-transporteurs Na^+ /glucose, réalisent un transport actif de glucose dans le rein et l'intestin et (2) les GLUT (Glucose Transporter) relaient la diffusion facilitée du glucose dans pratiquement toutes les cellules (Nistor Baldea et al., 2010).

Le glucose et le galactose pénètrent dans l'entérocyte via le transporteur de glucose sodium dépendant (SGLT1). Deux ions de sodium facilitent la captation du glucose en se liant au transporteur (Lecleire, 2008), et à cet effet, un gradient de sodium est maintenu par la pompe Na^+/K^+ ATPase située à la membrane baso-latérale de l'entérocyte. Le gradient électrochimique ainsi généré par le sodium fournit l'énergie permettant l'entrée du glucose. Il a été démontré qu'en l'absence de Na^+ , le glucose ne se lie pas à son transporteur et n'est donc pas absorbé (Wright et al., 1994).

L'absorption du glucose se fait toujours en couple avec les ions Na^+ . Au niveau intestinal, le passage du glucose est favorisé d'une part par le GLUT2 et d'autre part par le co-transporteur Na^+ /glucose dépendant GLUT (SGLT-1). Pour mieux suivre la quantité du glucose absorbé, c'est plus facile de suivre le flux des ions Na^+ pour savoir s'il y'a eu passage du glucose dans la membrane ou non et évaluer sa quantité. Le second moyen par lequel les sucres peuvent traverser la membrane luminale est le GLUT5. Ce transporteur est responsable de l'entrée du fructose dans les entérocytes intestinaux mais ne transporte ni de glucose ni de galactose, le fructose sort de la cellule par le transporteur GLUT2 qui représente une voie commune pour le glucose et le fructose (Harmon and Mcleod, 2001) (*figure 2*).

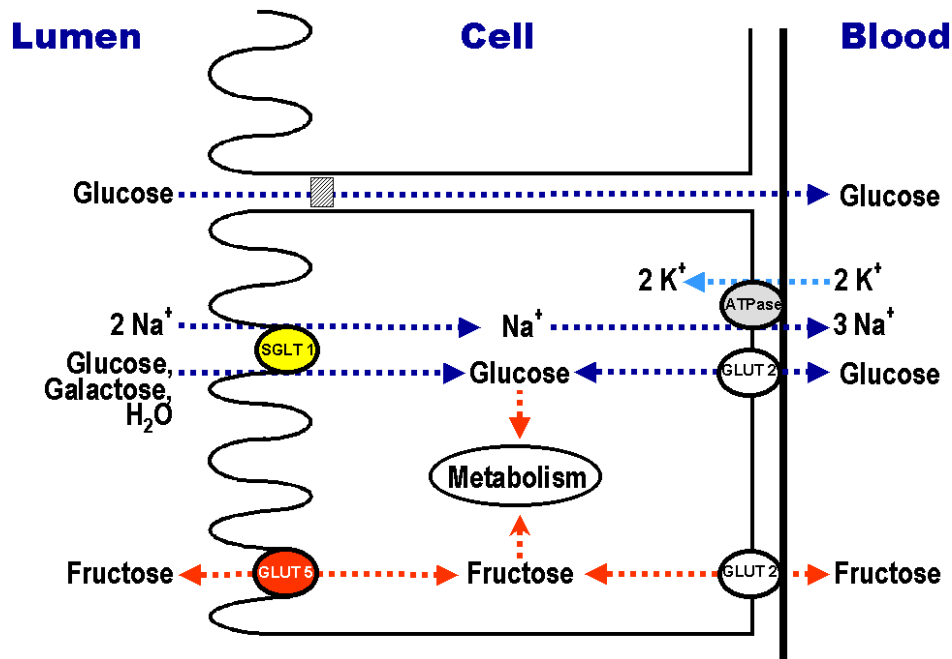


Figure 2: L'absorption intestinale du glucose (Harmon and Mcleod, 2001)

2. Diabète sucré - généralités

Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique liée soit à un trouble de la sécrétion de l'insuline, soit à un trouble de l'action de l'insuline, soit les deux (Raccach, 2004). L'insuline est une hormone produite par le pancréas, revêt un caractère essentiel dans la régulation de la glycémie, puisque c'est la seule hormone ayant une action hypoglycémisante. Une carence ou un défaut d'insuline entraîne une hyperglycémie chronique qui est la cause principale de la survenue des complications dégénératives de la maladie diabétique mais celles-ci sont néanmoins susceptibles d'être évitées ou tout au moins retardées par un traitement adéquat (Karimulla and Kumar, 2011).

C'est en étant à jeun que le dépistage du diabète est réalisé pour mesurer la glycémie dans le sang. Un individu est diabétique quand sa glycémie à jeun est supérieure ou égale à 1,26g/l (7 mmol/l) et doit être mesurée à deux reprises (Fagot-campagna et al., 2010). On distingue différents types de diabète sucré suivant la cause de la maladie (étiologie), le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Le diabète de type 1 représente de 5 à 10% du total des cas et se caractérise par une destruction auto-immune ou idiopathique des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Le type 2 représente de 90 à 95% des cas de diabète totaux et peut aller d'une résistance prédominante à l'insuline avec un déficit relatif en insuline à un défaut prédominant de sécrétion avec ou sans résistance à l'insuline (OMS, 2002).

Le nombre de personnes atteintes de diabète sucré augmente en raison de croissance démographique, faible poids à la naissance, vieillissement, urbanisation, modes de vie sédentaires avec inactivité physique, régimes surmenés, tabagisme, stress psychologique et augmentation de la prévalence de l'obésité (Riturparna and Neeraj, 2007; Wild et al., 2004).

Les symptômes du diabète sucré sont caractéristiques et se manifestent par une polyurie, une polydipsie, un amaigrissement, et parfois par une polyphagie et des troubles de la vision (ADA, 2014). Si aucun traitement n'est administré, la situation peut se développer vers l'acidocétose, l'hyperosmolarité ou l'acidose lactique (ADA, 2014).

Souvent les symptômes du diabète sucré ne sont pas visibles, et l'hyperglycémie présente d'une façon permanente cause des perturbations progressives au niveau des vaisseaux capillaires, ainsi qu'à l'apparition de complications à long terme, qui touchent en particulier l'œil, les reins, les systèmes nerveux et cardiovasculaires (Alberti and Zimmet, 1998). Pour cette raison, un diagnostic de la maladie s'avère nécessaire pour un dépistage précoce et un établissement d'un traitement adéquat.

2.1. Diagnostic du diabète sucré

Les exigences pour la confirmation du diagnostic d'une personne présentant des symptômes sévères et une hyperglycémie différent de celles de la personne asymptomatique dont les valeurs de glycémie se situent juste au-dessus de la valeur seuil diagnostique (WHO, 1999). Le diagnostic clinique du diabète est souvent suspecté devant des symptômes tels qu'une augmentation de la soif et du volume urinaire, des infections récurrentes, une perte de poids inexplicée et, dans les cas graves, une somnolence et un coma. Une estimation de la glycémie unique supérieure aux valeurs diagnostiques indiquées établit le diagnostic dans de tels cas. Un test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) pour établir un diagnostic ne doit être pris en compte que si les valeurs glycémiques sont incertaines et si les taux de glycémie à jeun sont inférieures à ceux qui établissent le diagnostic de diabète (Alberti, 2010). Si un OGTT est effectué, il suffit de mesurer les valeurs de la glycémie à jeun et à 2 heures après une charge orale de glucose de 75 g. Pour les enfants, la charge orale en glucose est liée au poids 1,75 g par kg. Les critères de diagnostic chez les enfants sont les mêmes que pour les adultes (Mahler and Adler, 1999; WHO, 1999).

Le diagnostic de diabète chez un sujet asymptomatique ne doit jamais être établi sur la base d'une seule valeur glycémique anormale. Pour la personne asymptomatique, au moins un résultat de test de glycémie additionnel avec une valeur dans la gamme diabétique est essentiel, à jeun, à partir d'un échantillon aléatoire (occasionnel) ou du test oral de tolérance au glucose (OGTT). Si ces échantillons ne parviennent pas à confirmer le diagnostic de diabète sucré, une surveillance avec des tests périodiques jusqu'à ce que la situation diagnostique devienne claire est recommandée (Tripathi and Srivastava, 2006; WHO, 1999).

Les critères de diagnostic du diabète sucré sont les suivants : symptômes du diabète plus des concentrations de glucose sanguin aléatoires supérieures à 11,1 mmol / l (supérieures à 200 mg / dl), glycémie à jeun supérieure à 7,0 mmol / l (supérieure à 126 mg / dl) (6,1 mmol l (110 mg dl-1) pour le sang total) ou glycémie plasmatique supérieure à 11,1 mmol / l (supérieure à 200 mg / l) dl lors d'un test oral de tolérance au glucose. Le jeûne est défini comme l'absence d'apport calorique pendant au moins 8 heures (ADA, 2010).

Bien qu'il existe une forte corrélation entre l'élévation du glucose plasmatique et de l'hémoglobine glyquée, la relation entre le glucose plasmatique à jeun et l'hémoglobine chez les individus présentant une tolérance normale au glucose ou une légère intolérance au glucose est moins claire et n'est pas universellement standardisée (ADA, 2010; Tripathi and Srivastava, 2006).

2.2. Classification

La classification du diabète a évolué au cours des 50 dernières années. En effet, en 1980, l'OMS considérait, comme la plupart des cliniciens, qu'il y avait deux classes principales de diabète, le diabète insulino-dépendant ou diabète de type I et le diabète non insulino-dépendant ou de type II; des « diabètes d'autres types » et le diabète gestationnel étant aussi reconnus (WHO, 1980). Les recommandations de l'OMS de 1999 proposent de supprimer les dénominations « insulino-dépendant » et « non insulino-dépendant », pour garder uniquement les termes « type I » et « type II » et détailler les différentes formes de « diabète d'autre type », tout en continuant d'individualiser le diabète gestationnel (WHO, 1999).

2.2.1. Diabète de type I

Autrement appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile, est une maladie majoritairement auto-immune (90% des cas). Elle est le résultat de la destruction des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Dans de cas rares, ce type de diabète est considéré comme étant idiopathique, où les causes restent encore inconnues. La destruction des cellules β conduit à une carence quasi complète de l'insuline et par conséquent, une élévation de la glycémie sanguine. Lorsque cette hyperglycémie se manifeste cliniquement, près de 80 % des cellules β sont ravagées (Piro et al., 2008).

C'est une maladie silencieuse qui débute souvent vers le jeune âge (enfance ou adolescence) et se manifeste la plupart du temps vers la vingtaine. Elle est diagnostiquée par une glycémie élevée ainsi que par la présence d'auto-anticorps (contre les îlots pancréatiques et contre l'insuline) dans la circulation sanguine (Torpy et al., 2007). Le diagnostic de la maladie doit se faire rapidement pour débiter l'insulinothérapie (injection d'insuline exogène) et préserver le maximum et le plus longtemps possible, le peu de cellules β restantes intactes.

2.2.2. Diabète de type II

Souvent appelé diabète adulte ou insulino-indépendant, le diabète de type 2 est un trouble métabolique qui se caractérise par une glycémie élevée dans le contexte de la résistance à l'insuline et de la déficience relative en insuline, et qui affecte habituellement les adultes âgés de plus de 40 ans. Par contre, de plus en plus de jeunes enfants ayant un surpoids en souffrent également (Simoneau and Garand, 2011). L'état de résistance à l'insuline accompagné d'un dysfonctionnement de sécrétion de l'insuline joue un rôle déterminant et causal dans le développement de ce type de diabète. De plus, le diabète de type 2 est très souvent associé à l'obésité (Vaccine and Licensed, 2010). En effet, plus de 80% des diabétiques de type 2 sont obèses. Bien que le mode de vie et la suralimentation semblent être les principaux facteurs déclencheurs de cette maladie, des éléments génétiques sont aussi impliqués (Risérus et al., 2009). En effet, l'hérédité augmente d'environ 2 à 4 fois le risque de contracter ce type de diabète, si un des parents en a souffert (Stumvoll et al., 2005).

2.2.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel se caractérise par l'apparition ou la reconnaissance de l'intolérance au glucose observée au cours de la grossesse. Ce diabète, présent dans 2 à 4% des grossesses, peut parfois avoir des conséquences néfastes aussi bien sur le bébé que sur la mère (WHO, 1999).

2.2.4. Autres types de diabète : Diabète secondaire (spécifique)

La classe des autres types particuliers de diabètes secondaires est associée à une cause bien définie. Il s'agit des diabètes pancréatiques, endocriniens, diabète insipide ou diabète cortico-induit des formes monogéniques de diabète ou des diabètes associés à un syndrome génétique ou provoqués par des agents chimiques. Toutefois, ces affections sont relativement peu connues (WHO, 1999).

La présente étude vise principalement le diabète de type 2 et il est discuté en détail dans les sections suivantes.

3. Physiopathologie du diabète de type II

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle. L'hyperglycémie est due à une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β du pancréas endocrine, et une diminution de la sensibilité tissulaire principalement des muscles squelettiques, du tissu adipeux et du foie aux effets de l'insuline, ce qui se traduit par une Insulinorésistance (WHO, 1999).

Cette pathologie comporte une importante prédisposition génétique. Le diabète de type 2 est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique dont les éléments physiopathologiques comprennent une résistance accrue des tissus périphériques (foie, muscles) à l'action de l'insuline, une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas, une sécrétion inappropriée de glucagon, ainsi qu'une diminution de l'effet des incrétines, hormones intestinales stimulant la sécrétion postprandiale de l'insuline (Kimmel and Inzucchi, 2005).

3.1. Insuffisance pancréatique

Au bout de 10 à 20 ans d'intolérance au glucose, le patient devient diabétique. Le pancréas n'arrive plus à fournir la demande en insuline. La sollicitation excessive du pancréas par l'hyperglycémie entraîne son usure prématurée. Ainsi, les cellules β du pancréas endocrine ne peuvent plus assurer une production suffisante d'insuline. La baisse d'activité des cellules β est quantitative et qualitative. Lors d'une injection intraveineuse de glucose, il y a absence du pic précoce d'insuline. Cette absence de pic est préjudiciable pour le patient car il joue un rôle majeur dans la tolérance postprandiale au glucose. Une baisse d'insulinosécrétion à tous stimuli est observée même si l'insulinémie basale reste identique. L'insuline réellement active ne représente que 50% de l'insulinémie alors qu'elle est de 80% chez un patient non diabétique (Pinget, 2002).

3.2. Résistance à l'insuline

L'insuline produit tout un éventail d'effets biologiques sur les processus métaboliques et mitogéniques. Cependant, le terme de résistance à l'insuline se traduit par une diminution de l'effet de l'insuline sur les tissus insuline-sensibles (tissu musculaire, tissu adipeux, foie). La résistance à l'insuline est donc un état physiopathologique dans lequel les niveaux normaux ou élevés d'insuline produisent des effets biologiques atténués. Les principales manifestations cliniques de la résistance à l'insuline sont l'hyperinsulinémie résultant de la surproduction de l'insuline par les cellules β -pancréatiques dans le but de contenir l'hyperglycémie, et l'intolérance au glucose qui est caractérisée par un taux élevé du glucose dans le sang suite à un repas, mais par des concentrations plasmatiques normales du glucose à jeun (Ashcroft and Rorsman, 2012). En fait, une diète hypercalorique associée à un manque d'exercice physique et à l'obésité peut conduire à un état de résistance à l'insuline (Brothers et al., 2010).

La résistance à l'insuline est considérée comme un état pré-diabétique quand le diabète de type 2 représente l'étape subséquente où la sécrétion exagérée d'insuline ne parvient plus à maintenir une glycémie normale.

4. Complications du diabète sucré

Le diabète prédispose les patients à des infections opportunistes, des pathologies vasculaires et neurales. Basé sur sa physiopathologie, les complications du diabète sucré peuvent être aiguës ou chroniques (Alves et al., 2012).

4.1. Complications aiguës

Il existe trois complications métaboliques aiguës principales, l'acidocétose, le coma hyperosmolaire et l'acidose lactique. Elles sont le plus souvent, la conséquence d'erreurs thérapeutiques ou d'un défaut de surveillance (Orban and Ichai, 2008).

4.1.1. Acidocétose diabétique

L'acidocétose est une aggravation du diabète, associé à une déficience en insuline absolue ou relative (Kitabchi et al., 2008). Elle touche surtout les diabétiques de type 1 mais aussi certains diabétiques de type 2, peut apparaître en cas d'omission d'insuline, de stress physiologique (infection, chirurgie, infarctus du myocarde...) (Chun et al., 2012). En absence d'insuline, les cellules du corps sont privées de glucose qui reste piégé dans le compartiment sanguin. En réaction, le tissu adipeux stimule la lipolyse, ce qui aboutit à une libération d'acides gras libres dans le sang (Keller et al., 2003). Ces acides gras sont absorbés puis transformés en Acétyl-CoA par les cellules du corps, ce qui leur procure l'énergie dont elles ont besoin. L'Acétyl-CoA est dégradé en corps cétoniques libérés en quantité excessive dans le sang puis dans les urines (Hansen and Moller, 2010). Une acidocétose sévère peut entraîner une léthargie et une dépression du système nerveux central aboutissant éventuellement à un coma (Kitabchi et al., 2008; Moller et al., 2005).

4.1.2. Coma hyperosmolaire

Le coma hyperosmolaire est une forme de coma qui affecte essentiellement les diabétiques de type 2 d'un âge avancé. Il se caractérise surtout par une hyperglycémie, une polyurie, une insuffisance rénale et une forte déshydratation. Ces symptômes s'installent en plusieurs jours et conduisent à un collapsus, à des infections pulmonaires et à des convulsions. La première mesure consiste à traiter la baisse de volume sanguin (hypovolémie) en injectant un sérum salé isotonique (Usi, 2014).

4.1.3. Acidose lactique

L'acidose lactique est une complication exceptionnelle, mais grave, souvent liée à l'emploi des antidiabétiques appartenant à la famille des biguanides. Elle consiste en l'accumulation d'acide lactique, responsable de crampes musculaires, de troubles digestifs, et de fatigue, de respiration difficile. Ces symptômes ne doivent pas être confondus avec les crampes banales observées après un effort ou après la prise de certains diurétiques. L'acidose lactique est favorisée par une insuffisance rénale, par une insuffisance hépatique grave, par un surdosage en biguanides, par les boissons alcoolisées ou par un jeûne prolongé (François and Jacques, 2013).

4.2. Complications chroniques

Les complications chroniques du diabète sucré affectent de nombreux systèmes d'organes et sont responsables de la plupart de la morbidité et de la mortalité associées à la maladie. Les complications à long terme du diabète sont classiquement divisées en deux catégories (Tripathi and Srivastava, 2006) :

- Les complications microangiopathiques : neuropathie, néphropathie et rétinopathie dont le facteur de risque majeur est l'hyperglycémie chronique (Michael and Fowler, 2008).
- Les complications macroangiopathiques : maladies cardiovasculaires dont les facteurs de risque sont l'hyperglycémie, l'insulinorésistance, des carences en insuline, une dyslipidémie, l'hypertension, l'hyperlipidémie et l'inflammation (Monnier and Thuan., 2007).

4.2.1. Complications microangiopathiques

4.2.1.1. Rétinopathie diabétique

La rétinopathie est une complication fréquente qui touche plus de 50% des diabétiques après 15 ans d'évolution du diabète (Michael and Fowler, 2008 ; Tripathi and Srivastava, 2006). Cette pathologie est responsable, à terme, de cécité en l'absence d'un traitement adapté (Bunce and Richard, 2006; Stratton et al., 2001). Plusieurs facteurs favorisent la survenue d'une rétinopathie diabétique et accélèrent sa progression : l'ancienneté du diabète, le niveau de glycémie, un diabète instable, l'hypertension artérielle, le tabagisme, etc. Elle se

traduit par diverses lésions observables lors d'un examen du fond d'œil : micro-anévrismes rétiniens, hémorragies rétiniennes punctiformes, exsudats et œdèmes rétiniens, et œdème maculaire (Emanuele et al., 2005; Harding et al., 2003).

4.2.1.2. Neuropathie diabétique

La neuropathie diabétique est la complication la plus fréquente du diabète sucré, affectant jusqu'à 50% des patients atteints de diabète de type 1 et de type 2. La neuropathie périphérique diabétique implique la présence de symptômes ou de signes de dysfonctionnement du nerf périphérique chez les personnes atteintes de diabète après que d'autres causes possibles ont été exclues (Zeng et al., 2017). La neuropathie périphérique dans le diabète peut se manifester sous plusieurs formes différentes, y compris les neuropathies sensorielles, focales / multifocales et autonomes. Environ la moitié de toutes les personnes atteintes de diabète présentent un certain degré de neuropathie, qui peut être une polyneuropathie, une mono-neuropathie et / ou une neuropathie autonome (Shaw et al., 2003). La polyneuropathie est la forme la plus courante de neuropathie du diabète (Michael and Fowler, 2008; Tripathi and Srivastava, 2006). Il y a une perte de sensation périphérique qui, associée à une jonction microvasculaire et macrovasculaire altérée à la périphérie, peut contribuer aux ulcères non guérissants, principale cause d'amputation non traumatique (Abbott et al., 1998).

4.2.1.3. Néphropathie

La néphropathie touche préférentiellement les diabétiques de type 1 : 50% des malades en sont atteints (Michael and Fowler, 2008). Ses principaux facteurs d'apparition et de progression sont le mauvais équilibre glycémique et l'hypertension (Giorgino et al., 2004). La néphropathie diabétique évolue en plusieurs étapes et débute par une protéinurie discrète, couramment appelée micro-albuminurie, qui traduit des défauts anatomiques et biochimiques au niveau des glomérules rénaux (Gheith et al., 2016; Giorgino et al., 2004). Elle évolue associée à une hypertension en un syndrome œdémateux susceptible d'évoluer vers une insuffisance rénale. Le patient est alors macroalbuminurique et les glomérules rénaux diminuent en nombre et en capacité fonctionnelle. La néphropathie diabétique évolue à terme vers une insuffisance rénale chronique sévère (Cha et al., 2000).

4.2.2. Complications macroangiopathiques

La macroangiopathie est définie comme l'atteinte des artères de moyen et gros calibre. Elle regroupe les atteintes des artères coronaires, des artères à destinée cervicale et des artères des membres inférieurs (Kissela et al., 2005). Elle représente la principale cause de mortalité dans le diabète, qu'il s'agisse du diabète de type 1 ou 2 (Michael and Fowler, 2008; Tripathi and Srivastava, 2006). L'athérosclérose est beaucoup plus fréquente et sévère chez le diabétique que dans la population générale (Califf et al., 2008; Holman et al., 2008). Les lésions touchent non seulement les gros troncs, mais aussi, et ceci est particulier au diabète, les artères plus distales. Ces atteintes distales et souvent diffuses rendent plus difficiles les perspectives de traitement chirurgical tant en ce qui concerne les coronaires que les membres inférieurs (Kissela et al., 2005).

5. Diabète et stress oxydant

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre production de radicaux libres et espèces antioxydante en faveur de la production de radicaux libres ou espèces réactives oxygénées (Favier, 2003). Le stress oxydant augmente dans les différents tissus que se soit dans le cas du diabète expérimentale ou chez les patients diabétiques, l'hyperglycémie induit une production prolongée des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaires et ceux-ci prolongent le gradient électrochimique des protons générés dans la chaîne mitochondriale menant à une surproduction d'anions superoxydes, qui est l'une des espèces réactives de l'oxygène qui peut endommager les cellules dans de nombreuses voies à travers le stress oxydatif, en l'absence d'une compensation appropriée de la réponse des réseaux antioxydants endogènes des cellules, le système est débordé, entraînant un déséquilibre d'oxydo-réduction, ce qui aggrave encore la situation (Defraigne, 2005; Haleng et al., 2007).

Les espèces réactives de l'oxygène générées lors de l'hyperglycémie causent principalement des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides. En plus il est évident que dans le diabète de type 2, l'activation des voies du stress oxydant est sensible par l'élévation du glucose et des acides gras, elle conduit à deux niveaux de résistance à l'insuline et une diminution de la sécrétion d'insuline et la dysfonction des cellules β sécrétrices de l'insuline (Evans et al., 2003). Il a été montré chez des rats Goto-Kakizaki (GK), diabétiques de type 2, non obèses, une augmentation des marqueurs du stress oxydant suite à une hyperglycémie (Ihara et al., 1999).

Il existe plusieurs mécanismes responsables de la surproduction d'ERO lors d'hyperglycémie : l'auto-oxydation du glucose, la voie des polyols, la voie de la PKC et la glycation des protéines avec formation des produits avancés de fin de glycation (AGEs) (Vincent and Taylor, 2006).

5.1. Auto-oxydation du glucose ou glycoxydation

L'auto-oxydation du glucose a été décrite par Wolff et Dean (1987). Une forte concentration de glucose peut conduire à une accumulation de glycéraldéhyde-3- phosphate qui est ensuite converti en méthylglyoxal. Le méthylglyoxal est un précurseur de la formation des AGE. Normalement le méthylglyoxal est neutralisé par des enzymes, les glyoxalases, qui nécessitent la présence de NADPH. La dépression en NADPH, utilisé par la voie des polyols, fait que le méthylglyoxal ne pourra pas être neutralisé, entraînant ainsi la glycation des protéines intracellulaires (Maessen et al., 2015).

5.2. Voie des polyols

De nombreuses études ont montré que l'hyperglycémie peut entraîner une déviation d'une partie du glucose vers la voie des polyols. Dans des conditions physiologiques, la voie des polyols est inactive. Dans des conditions d'hyperglycémie chronique, une partie du glucose est réduit en sorbitol par action de l'aldose réductase dont le co-facteur est le NADPH (Čolak and Majkić-Singh, 2009; Tesfamariam B., 1994).

Le sorbitol va s'accumuler dans les cellules, de part son incapacité à traverser les membranes, et entraîner de multiples dommages tels que des dommages osmotiques. Une partie du sorbitol peut être oxydée en fructose à l'origine de produits avancés de glycation.

De plus, l'utilisation du NADPH comme cofacteur va entraîner une diminution de la disponibilité de celui-ci pour l'activité de la glutathion réductase, importante pour la formation du glutathion réduit (Brownlee, 2005; Haleng et al., 2007; Lee and Chung, 1999). L'activation de la voie des polyols va ainsi entraîner une augmentation du stress oxydant au sein de la cellule avec une diminution des défenses anti-oxydantes (Haleng et al., 2007).

5.3. Voie de la Protéine kinase C (PKC)

L'hyperglycémie induit une synthèse accrue de glycéraldéhyde-3-phosphate via la glycolyse. Le glycéraldéhyde-3-phosphate est un précurseur du diacylglycerol, activateur de la protéine kinase C (PKC). Il a largement été démontré que le diabète entraînait une activation de la voie de la PKC (Brownlee, 2005).

L'activation de la PKC va entraîner l'augmentation de la production d'ERO par l'augmentation de l'activité NADPH oxydase. L'activation de la PKC va aussi jouer un rôle dans l'inflammation par le biais de l'augmentation de la synthèse du facteur pro-inflammatoire NFkB aussi va contribuer à l'installation de l'insulino-résistance via la diminution de l'expression de eNOS (Haleng et al., 2007).

5.4. Production de produits terminaux de glycation (AGE)

Le glucose réagit facilement avec les groupements amines libres des protéines pour former des « produits d'Amadori ». Ces derniers sont relativement instables et se dégradent en produits avancés de la glycation (AGE) ou en produits de Maillard (Haleng et al., 2007). Les AGE sont augmentés au cours du diabète. Ils sont les produits de trois voies de formation: la glycation non enzymatique, la glycoxydation résultant de l'auto-oxydation du glucose et la voie des polyols (Boulanger et al., 2002).

Des recherches récentes ont montré que les AGE, retrouvés en concentrations élevées dans la rétine et les glomérules rénaux, jouent un rôle important dans le développement des complications du diabète. Ainsi les AGE peuvent aussi être apportés de façon exogène, par l'alimentation, en particulier si les aliments sont riches en sucres et subissent une étape de cuisson (Koschinsky et al., 1997).

Parmi les AGE figure la pentosidine, résultant de la réaction de pentoses avec les protéines. Sa concentration s'élève avec l'âge, dans le diabète et dans les maladies rénales au stade terminal (Haleng et al., 2007). A ce titre, la pentosidine n'est pas un simple marqueur de glycosylation dans le diabète, mais elle pourrait être utilisée comme marqueur plus général de stress oxydant dans d'autres pathologies. Il serait intéressant d'étudier sa présence ainsi que celle d'autres produits AGE dans diverses maladies afin de valider leur implication dans les complications du diabète. En réponse à cette élévation, des travaux récents ont montré que la concentration plasmatique des RAGE était, par exemple, nettement diminuée chez des patients atteints de poly-arthrite rhumatoïde (Pullerits et al., 2005).

6. Traitement du diabète sucré

L'hyperglycémie observée dans le diabète sucré est le résultat d'un décalage entre la quantité d'insuline nécessaire pour réguler les processus métaboliques et la quantité d'insuline sécrétée par les cellules β . Le traitement par l'insuline est le pilier des patients atteints de diabète sucré de type 1, tandis que les modifications du régime alimentaire et du mode de vie sont à la base du traitement et de la prise en charge du diabète sucré de type 2 à ses débuts. L'insuline est également importante dans le diabète sucré de type 2 lorsque la glycémie ne peut être contrôlée par l'alimentation, la perte de poids, l'exercice et les médicaments oraux (Tripathi and Srivastava, 2006).

6.1. Traitements non médicamenteux

Le traitement du diabète de type 2 repose d'abord sur des modifications du style de vie (régime, perte de poids et exercice physique) et sur la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaire associés. Selon les recommandations de l'HAS, (2006) la diététique est la première étape de la prise en charge du diabète de type 2. Une alimentation équilibrée est conseillée, avec une augmentation des apports en glucides lents et une diminution des apports en graisses saturées (Grimaldi, 2011).

L'exercice régulier est bénéfique dans le diabète de type 2 ; il améliore le contrôle glycémique grâce à une augmentation de la sensibilité à l'insuline. De plus, la pratique de l'exercice physique associé à des conseils diététiques retarde la progression de l'état pré-diabétique vers le diabète. Lorsque les mesures précédentes n'apportent pas un contrôle suffisant de la glycémie, l'introduction d'un hypoglycémiant oral s'avère nécessaire (Ducobu, 2003). Encore, l'insulinothérapie occupe une place importante dans l'arsenal thérapeutique du diabète de type 1 et du diabète de type 2 (Creusot et al., 2016). Ce dernier nécessite chez la majorité des patients et surtout pendant les premiers stades, une prise en charge médicamenteuse et cela par l'intervention des antidiabétiques oraux qui sont classés selon leur mode d'action en trois catégories : les sulfamides hypoglycémiantes, les biguanides et les inhibiteurs des alpha-glucosidases.

6.2. Traitements médicamenteux

6.2.1. Sulfamides

Les sulfamides appartiennent chimiquement à la famille des sulfonylurées, ils sont associés à une hypoglycémie, le risque étant plus élevé chez les personnes âgées et les patients atteints d'insuffisance rénale. Ils stimulent la sécrétion d'insuline sans influencer sa synthèse. La première génération de sulfonylurées comprenait le tolbutamide, l'acétohexamide, le tolazamide et le chlorpropamide. Une deuxième génération de sulfonylurées plus efficaces a été mise au point et comprend du glibenclamide, du glipizide, du gliclazide et du glimépiride (Scheen, 2014; Tripathi and Srivastava, 2006).

Les sulfamides se lient à un récepteur spécifique présent sur la membrane des cellules bêta-pancréatiques, appelé SUR "sulfonylurea receptor". La liaison des sulfamides à leurs récepteurs spécifiques entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP dépendant de la cellule bêta-pancréatique source d'une dépolarisation membranaire et de l'ouverture secondaire des canaux calciques. L'afflux de calcium dans le cytoplasme des cellules bêta-pancréatiques induit l'exocytose des vésicules contenant l'insuline d'une façon similaire à celle observée après stimulation par le glucose (Gribble and Reimann, 2003).

6.2.2. Biguanides

Les biguanides représentent une des principales classes des antidiabétiques oraux. La seule molécule de cette classe médicamenteuse actuellement disponible est la metformine. Son utilisation est privilégiée dans les situations d'insulinorésistance, notamment chez les sujets obèses ou en surpoids.

Le mécanisme d'action des biguanides est tout à fait complémentaire de celui des sulfamides hypoglycémiantes qui pour leur part améliorent la sécrétion d'insuline. D'autre part, les biguanides peuvent être prescrits en association avec un traitement par insuline, l'objectif étant alors d'améliorer la sensibilité à l'insuline injectée chez les patients insulinorésistants et de diminuer ainsi les doses d'insuline nécessaires (Inzucchi et al., 1998).

Le mode d'action précis de la metformine reste assez mal connu mais on sait que son action est double en réduisant d'une part l'insulinorésistance et d'autre part en diminuant la production hépatique de glucose (Miller et al., 2013). En présence d'insuline, la metformine diminue la néoglucogénèse et la glycogénolyse au niveau hépatique. Ainsi, l'insuline a une

meilleure efficacité et permet, avec des taux circulants plus bas, de diminuer la glycémie (Hundal et al., 2000).

6.2.3. Glinides ou métaglinides

Les glinides sont des antidiabétiques oraux apparentés aux sulfamides hypoglycémiants. Ils agissent en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques avec le même mécanisme d'action que les sulfamides hypoglycémiants (Takahashi et al., 2007) .

Deux analogues sont actuellement disponibles pour une utilisation clinique à savoir le répaglinide et le nateglinide. Bien que les structures et les mécanismes chimiques diffèrent entre ces agents, l'effet sur la libération d'insuline en phase précoce est similaire, avec une augmentation rapide des concentrations d'insuline après administration et une demi-vie courte. Les premiers essais démontrent leur effet dans la réduction du glucose postprandial et la réduction des épisodes hypoglycémiques (Black et al., 2009).

Les glinides ont un mode d'action similaire à celui des sulfonylurées, mais ont une demi-vie métabolique beaucoup plus courte. Ils stimulent une libération rapide mais de courte durée d'insuline par les cellules β du pancréas qui dure une ou deux heures. Lorsqu'ils sont pris aux repas, ces agents atténuent les excursions de la glycémie plasmatique postprandiale et diminuent le risque d'hypoglycémie pendant la fin de la phase postprandiale parce que moins d'insuline est sécrétée plusieurs heures après le repas (Black et al., 2009; Takahashi et al., 2007).

6.2.4. Thiazolidinediones ou glitazones

Les thiazolidinediones ou glitazones sont des médicaments hypoglycémiants oraux relativement récents qui ont été retirés du marché en 2011. La première de ces molécules, la troglitazone, fut commercialisée aux États-Unis en 1997 avant d'être interdite plus tard en raison de son hépatotoxicité (Pillon et al., 2014).

L'agent antidiabétique de la thiazolidinedione dépend de la présence d'insuline pour son mécanisme d'action. Il diminue la résistance à l'insuline dans la périphérie et dans le foie, ce qui entraîne une élimination accrue du glucose à base d'insuline et une diminution de la production de glucose hépatique (Girard, 2001).

Un effet intéressant de ces médicaments antihyperglycémiques est sur le récepteur activé par le peroxisome-proliférateur γ (PPAR γ). Ces médicaments agissent comme des agonistes lors de la liaison à PPAR γ qui se lie préférentiellement à l'ADN activant la transcription d'une grande variété de régulateurs métaboliques. Les régulateurs augmentent l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation du glucose et du métabolisme lipidique. Des études ont montré qu'il existe une bonne corrélation entre l'affinité PPAR γ et les effets antihyperglycémiques (Girard, 2001).

6.2.5. Inhibiteurs de DPP-4

Les inhibiteurs de DPP-4 bloquent l'action de cette enzyme connue pour dégrader le GLP-1. Le GLP-1 est une incrétine, une hormone gastro-intestinale qui stimule la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée. L'inhibition de la DPP-4 entraîne donc l'augmentation de GLP-1 et la sécrétion d'insuline, tout comme le font les analogues ou mimétiques du GLP-1 tel l'exanatide (Scheen, 2012).

6.2.6. Inhibiteurs des alphas glucosidases intestinales

Les inhibiteurs des α -glucosidases agissent, comme leur nom l'indique, en inhibant de manière compétitive les α -glucosidases intestinales. Elle vient en complément des autres antidiabétiques oraux pour le traitement du diabète de type 2, mal contrôlé, ou lors de la contre-indication aux autres traitements (Laar, 2008).

Les inhibiteurs des α -glucosidases sont compétitifs des enzymes présentes dans les entérocytes de la bordure en brosse, enzymes nécessaires pour hydrolyser les oligo- et les polysaccharides en monosaccharides afin de permettre leur absorption (Dhital et al., 2013).

L'inhibition de ces enzymes ralentit l'absorption des glucides, réduisant ainsi l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie post-prandiale. L'acarbose (Glucor[®]) a été le premier inhibiteur des alpha-glucosidases disponible, le miglitol (Diastabol[®]) a été récemment mis sur le marché ; et enfin le voglibose, lui, n'est disponible qu'au Japon (Laar, 2008).

Le choix le plus évident pour ces alternatives serait des plantes avec des utilisations ethnométriques dans le traitement du diabète.

6.3. Traitement naturel

Malgré la présence de médicaments antidiabétiques connus sur le marché pharmaceutique, les remèdes à base de plantes médicinales sont utilisés avec succès pour traiter cette maladie (Kooti et al., 2016). De nombreux traitements traditionnels contre le diabète sont utilisés dans le monde entier. Les médicaments à base de plantes et les formulations à base de plantes sont souvent considérés comme moins toxiques et ont moins d'effets secondaires (Annapurna et al., 2001), et pendant des millénaires, les plantes médicinales ont été une source précieuse d'agents thérapeutiques, et beaucoup de médicaments d'aujourd'hui sont des produits naturels à base des plantes ou de leurs dérivés (Atanasov et al., 2015).

Sur la base des recommandations de l'OMS, les hypoglycémiantes d'origine végétale utilisés en médecine traditionnelle sont importants (Comité OMS d'experts du diabète sucré, 1980). Les effets antihyperglycémiques attribués à ces plantes sont dus à leur capacité à restaurer la fonction des tissus pancréatiques en provoquant une augmentation de la production d'insuline ou en inhibant l'absorption intestinale du glucose ou la facilitation des métabolites dans les processus insulino-dépendants. La réalisation de cibles glycémiques dans le diabète de type 2 reste un grand défi pendant les soins cliniques (Cook et al., 2001).

À l'heure actuelle, plus de 400 traitements traditionnels contre le diabète ont été signalés, dont seulement un petit nombre a reçu une évaluation scientifique et médicale pour évaluer leur efficacité (Gunjan et al., 2011). L'effet hypoglycémiant de certains extraits végétaux a été confirmé dans des modèles humains et animaux de diabète de type 2 (Preethi, 2013).

Le Comité d'experts sur le diabète de l'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé que les plantes médicinales traditionnelles fassent l'objet d'une enquête plus approfondie. Le principal obstacle à l'intégration de la phytothérapie dans les pratiques médicales modernes est le manque de données scientifiques et cliniques prouvant leur efficacité et leur innocuité. Il est nécessaire de mener des recherches cliniques sur les médicaments à base de plantes en utilisant des bioessais appropriés pour la standardisation biologique, l'évaluation pharmacologique et toxicologique et en développant différents modèles animaux pour l'évaluation de la toxicité et de la sécurité. Il est également important d'établir le ou les composants actifs à partir de ces extraits de plantes (Gunjan et al., 2011).

Une recherche scientifique sur les remèdes traditionnels à base de plantes pour le diabète peut fournir des pistes précieuses pour le développement de médicaments et de stratégies alternatives. Des alternatives sont clairement nécessaires pour une meilleure gestion du diabète en raison du coût élevé et de la faible disponibilité des thérapies actuelles pour de nombreuses populations rurales, en particulier dans les pays en développement.

Les principaux constituants actifs dérivés de plantes médicinales ayant une activité antidiabétique comprennent les alcaloïdes, les glycosides, la gomme de galactomannane, les polysaccharides, les peptidoglycanes, les hypoglycans, la guanidine, les stéroïdes, les glucides, les glycopeptides, les terpénoïdes, les acides aminés et les ions inorganiques. Ceux-ci affectent diverses cascades métaboliques, qui affectent directement ou indirectement le niveau de glycémie dans le corps humain (Prabhakar and Doble, 2011).

6.3.1. Modes d'actions des plantes antidiabétiques

Une très grande variété de mécanismes est impliquée dans l'abaissement du taux de glucose dans le sang. Ceci est dû à la grande variété de classes chimiques des constituants hypoglycémiantes provenant des plantes. Certains de ces composés se révèlent véritablement hypoglycémiantes et pourraient avoir un potentiel thérapeutique, tandis que d'autres peuvent produire une hypoglycémie en tant qu'effet secondaire de leur toxicité, notamment l'hépatotoxicité (Jarald et al., 2008).

L'activité antidiabétique des plantes peut dépendre de plusieurs mécanismes (Jarald et al., 2008; Khalil et al., 2016; Singh, 2011).

- Réduction de la résistance à l'insuline ;
- Stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β ou/et inhibition du processus de dégradation de l'insuline ;
- Apport de quelques éléments nécessaires comme le Calcium, le Zinc, le Magnésium, le Manganèse et le Cuivre pour les cellules β ;
- Régénération ou/et réparation des cellules pancréatiques β lésées ;
- Effet protecteur de la destruction des cellules β ;
- Augmentation du nombre de cellules β dans les îlots de Langerhans ;
- Inhibition de la réabsorption rénale du glucose ;
- Inhibition des β -galactosidase, α -glucosidase et α -amylase ;
- Prévention du stress oxydatif, qui peut être impliqué dans le dysfonctionnement des cellules β ;
- Diminution des activités du cortisol.

6.3.2. Étude toxicologique des plantes médicinales

L'efficacité d'une substance en pharmacologie n'est pas suffisante pour justifier son utilisation en thérapeutique. Un toxique, est une substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener la mort (Viala et al., 2007). Il faut donc définir le rapport bénéfice risque dans l'indication thérapeutique de chaque substance (Subramanion et al., 2011). Les effets toxiques peuvent être détectés par un examen pathologique macroscopique lors de l'examen post mortem ou histopathologique après la réalisation d'études de toxicité. Certains peuvent également être détectés en utilisant l'analyse clinico-chimique des fluides corporels (Timbrell et al., 1996). La phytothérapie et à la consommation des plantes doit apporter une certaine garantie et une certaine caution. L'évaluation de la sécurité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aiguë après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité chronique après administration répétée de la substance. Cependant, l'étude de la toxicité aiguë reste le jalon indispensable dans toute étude toxicologique en utilisant des animaux modèles tels que des souris BALB / c, des souris albinos, des souris Wistar, des rats et des lapins.

▪ Toxicité aiguë

Toutes les substances chimiques sont toxiques lorsque les doses administrées sont suffisantes. Pour qu'une drogue possédant des effets pharmacologiques puisse éventuellement être utilisée comme médicament, il est d'abord nécessaire que l'activité apparaisse à des doses pour lesquelles la toxicité est négligeable.

L'étude de la toxicité aiguë permet d'exprimer la dose capable de tuer dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience dans une même espèce animale (DL50). Dans un délai généralement court, fixé au minimum à sept jours et au maximum à quatorze jours ainsi que la dose maximale sans effet toxique (DME) c'est à dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au lot témoin (Traore, 1999). La toxicité peut être appréciée entre autres par la détermination de la DL50. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien : mort ou survie des animaux.

L'étude de la toxicité aiguë peut être réalisée selon différentes méthodes ; Méthode de Dragstedt et Lang ; Méthode de Karber et Behrens ; Méthode de Miller et Tainter ; Méthode

de Trevan ; Méthode de Litchfield et Wilcoxon ; Méthode selon la ligne directrice européenne de l'OCDE code 423.

Parmi ces méthodes on définit la méthode de la ligne directrice européenne de l'OCDE code 423 [OCDE, 2002]. Cette méthode est reproductible, utilise très peu d'animaux et diffère des autres méthodes de toxicité aiguë (Lignes directrices 420 et 425). Elle permet de classer des substances par ordre de toxicité de façon similaire. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances dans le Système de Classification Globalement Harmonisé (SCGH) de substances entraînant de la toxicité aiguë. Cette méthode ne vise pas le calcul d'une valeur précise de la DL50. Comme la mort d'un nombre d'animaux reste le principal effet observé, la méthode permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée létale. Toutes les informations disponibles sur la substance d'essai doivent être rassemblées avant de procéder à l'essai. Ces informations contiendront l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques et les résultats obtenus dans tout autre essai de toxicité *in vitro* et *in vivo* ; elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un seul sexe (des femelles) sont utilisés à chaque étape (Roll R et al, 1986). L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est à dire :

- Arrêt de l'essai ;
- Administration de la même dose à trois animaux supplémentaires ;
- Administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

7. Induction du diabète expérimental

Le diabète sucré expérimental a été induit chez des animaux de laboratoire par plusieurs méthodes. Une méthode efficace consiste généralement à extraire le pancréas du corps. Toutefois, pour induire une forme notable de diabète, il faut éliminer au moins 90 à 95% du pancréas. Sinon, les îlots de Langerhans dans le pancréas restant peuvent subir une hypertrophie et sécréter une quantité suffisante d'insuline pour satisfaire les besoins métaboliques naturels. L'une des méthodes les plus couramment utilisées pour induire le diabète est en endommageant le pancréas par l'administration de produits chimiques tels que la streptozotocine (STZ) et l'alloxane (Szkudelski, 2001).

Différents modèles animaux ont été utilisés pour le dépistage de l'activité antidiabétique de nouveaux médicaments. Ceux-ci vont des modèles chirurgicaux, des modèles génétiques, de diverses souches animales qui développent spontanément le diabète, et des modèles chimiques du diabète sucré. L'espèce d'animal utilisée est déterminée par plusieurs facteurs. Généralement, les souris sont largement utilisées dans la recherche scientifique en raison de leur facilité de manipulation ainsi que le degré d'homologie qu'ils partagent avec les êtres humains (Ghatta et Ramarao, 2004).

7.1. Modèles de diabète induits chimiquement : alloxane et streptozotocine (STZ)

La recherche sur le diabète chez les sujets humains est entravée par des considérations éthiques évidentes. Le diabète est une maladie chronique avec des séquelles éloignées tout à fait distinctes du syndrome précoce. Comprendre la pathologie diabétique nécessiterait une vie d'études en série. L'utilisation de modèles animaux contourne largement ces problèmes. La maladie peut être induite chez de nombreux animaux, en particulier les rongeurs de laboratoire, en utilisant une variété d'agents chimiques et d'autres procédures expérimentales. Les syndromes spontanés et induits font l'objet d'études approfondies, non seulement parce qu'ils sont fascinants en eux-mêmes, mais aussi parce qu'ils offrent de nouvelles perspectives sur le diabète chez l'homme. L'incidence stable du diabète dans les colonies d'animaux constitue un outil puissant pour l'étude des thérapies préventives de la maladie. L'Alloxan et la STZ sont utilisés pour induire le diabète expérimental chez les animaux. L'action cytotoxique de ces deux agents diabéto-gènes est médiée par les espèces réactives oxygénées. Cependant, la source de leur génération est différente dans le cas de l'alloxane et de la STZ (Like et Rossini, 1976).

7.1.1. Streptozotocine

Streptozotocine, ou Streptozocine ou Izostazin ou Zanosar, (STZ) est un agent antinéoplasique synthétique, initialement identifié dans les années 1950 comme un antibiotique, et est chimiquement lié à d'autres nitrosoureas utilisés dans la chimiothérapie anticancéreuse. La streptozotocine (2-désoxy-2- (3- (méthyl-3-nitrosouréido) -D-glucopyranose) est synthétisée par *Streptomyces achromogenes* (figure 3) (Graham et al., 2011), L'utilisation de STZ a été signalée pour la première fois en 1963 (Asrafuzzaman et al., 2017), elle entraîne un effet cytotoxique sélectif des cellules β des îlots de Langerhans (Anderson et al., 1974), et est utilisée pour induire à la fois l'IDDM et le NIDDM.

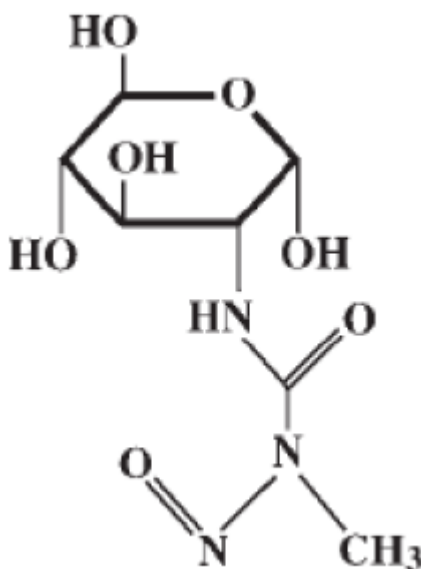


Figure 3: Streptozotocine

Malgré les efforts déployés dans ce domaine par de nombreux chercheurs, le mécanisme d'action de cet agent diabétogène reste encore mal connu. Cependant, des études antérieures ont montré son action sur les îlots de Langerhans. Cette action réduit la masse des cellules β et par conséquent une insulino-pénie caractéristique d'une hyperglycémie chronique ou transitoire (Szkudelski, 2001).

La molécule de la STZ pénètre les cellules β pancréatiques à travers les transporteurs de glucose GLUT2. La pénétration est assurée par la présence du glucose dans la molécule. La décomposition de la STZ en espèces réactives oxygénées (ERO) se fait à l'intérieur de la cellule. Les ERO provoquent une alkylation de l'ADN qui se défragmente, ce qui active la poly(ADP-ribose) polymérase, enzyme clé de la réparation de l'ADN. Cette réaction consomme le NAD et l'ATP comme cofacteurs enzymatiques conduisant à leur déplétion et à la nécrose de la cellule β (Szkudelski, 2001).

En plus de son impact sur le métabolisme des hydrocarbures qui est bien étudié, la STZ provoque une altération du métabolisme glucidique, lipidique et protéique due à la défaillance en insuline (Szkudelski, 2001).

En revanche, certaines recherches ont démontré l'effet indirect de cette toxine sur la signalisation de l'insuline. L'hyperglycémie chronique est à l'origine d'une insulino-résistance résultante d'une diminution d'autophosphorylation du récepteur de cette hormone (Kadowaki et al., 1984).

Récemment dévoilé, elle active l'expression de la protéine kinase C, une protéine responsable de la déphosphorylation du récepteur de l'insuline (Davidoff et al., 2004). On ajoute que l'injection de la STZ est à l'origine d'une chute de poids (Chen and Ianuzzo David, 1982).

De nombreux travaux effectués, ont pour objectif de comprendre le mécanisme pathogène de la STZ. Ces recherches ont montré que ce produit diminue la défense antioxydante de la cellule, particulièrement une inhibition de l'activité superoxyde dismutase (Rajasekaran et al., 2004).

Selon la voie d'administration, la dose ajoutée de la STZ est variable, l'animal et surtout la pathologie voulue (Chen and Ianuzzo David, 1982). A titre d'exemple, dans les essais préliminaires, il est primordial de garder la vitalité de l'animal où on injecte de faibles doses de STZ (dose inférieure ou égale à 60mg/kg) (Xin et al., 2012).

7.1.2. Alloxane

L'alloxane est une pyrimidine oxygénée, son nom scientifique est le 2,4,5,6-tetraoxypyrimidine. Cette molécule est préparée par oxydation de l'acide urique sous l'action de l'acide nitrique (Szkudelski, 2001). Grâce à une analogie structurale au glucose, l'alloxane pénètre à travers les transporteurs de glucose GLUT2 des cellules β pancréatiques. C'est au cytosol que se déroule la réduction de l'alloxane en acide dialurique. Cette réduction est due à plusieurs agents tels que le glutathion réduit, la cystéine, l'acide ascorbique et les groupements SH des protéines. Un pont disulfure est formé par deux groupements thiol du site actif de la glucokinase et l'alloxane. Ce pont inactive l'enzyme (Lenzen et al., 1988).

La ré-oxydation de l'acide dialurique formé en alloxane, favorise la production des espèces réactives oxygénées et l'activation de la réaction de Fenton (Szkudelski, 2001). De l'autre côté, les espèces réactives oxygénées attaquent l'ADN et induisent une défragmentation de ce dernier. Ce mécanisme ressemble à celui de la streptozotocine (Rohilla and Ali, 2012).

L'alloxane inhibe la sécrétion de l'insuline glucose-dépendante, augmente la perméabilité des membranes des cellules β (Watkins et al., 1964), et diminue le taux de l'hormone de croissance au niveau de l'adénohypophyse (Medjdoub et al., 2013).

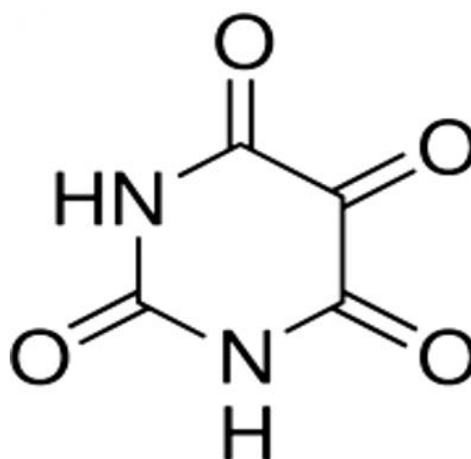


Figure 4: Alloxane

Au Maroc, plusieurs plantes médicinales sont utilisées traditionnellement pour traiter le diabète. Une espèce bien connue de ce genre est *Arbutus unedo* L, qui a été montré pour posséder un rôle bénéfique contre le diabète (Ziyyat et al., 1997), objet de notre étude.

8. Plantes sous l'étude

8.1. *Arbutus unedo* L

8.1.1. Description botanique d'*Arbutus unedo* L.

Arbutus unedo L. est un arbre à feuilles persistantes, d'une hauteur comprise entre 2 et 10 mètres en moyenne (Celikel et al., 2008), qui appartient à la famille Ericaceae, se développe dans les zones qui conservent encore une assez bonne fertilité du sol, abonde sous climat non continental; cette espèce est typique d'un stade de dégradation des groupements de l'étage de végétation du subhumide et du semi-aride supérieur essentiellement, et est largement répandu dans la région méditerranéenne et l'Afrique du Nord. Au Maroc, il est connu sous le nom de «Sasnou ».

Le tronc et les branches sont robustes et présentent une écorce brun-rougeâtre se détachant en lanières fibreuses sur les spécimens âgés.

Les feuilles sont alternées, simples, oblitérantes, vertes foncées, en cuir et ont une marge dentelée, généralement 2-3 fois aussi large que glabre avec un pétiole de 10 mm ou moins (Gomes, 2011; Maleš et al., 2013). Les fleurs, avec des lobes recourbés, sont en forme de cloche, 8-9 mm de long, blanc, et souvent rose pâle (Maleš et al., 2013).

Les fleurs sont rassemblées en grappes rameuses et terminales, hermaphrodites, actinomorphes (régulières) et possèdent 10 étamines. Le calice gamosépale possède 5 lobes courts. La corolle gamopétale de 5 à 7 mm de longueur forme un petit grelot de couleur blanchâtre qui devient caduque avant la fanaison de la fleur. Chaque extrémité des 5 pétales soudés se termine par une courte dent enroulée en dehors. Les fleurs d'*A.unedo* sont une source importante de nectar et de pollen pour les abeilles (Gomes, 2011).

Les fruits sont globulaires, orange-rouge lorsqu'ils sont mûrs, atteignant 2 cm de diamètre, sont récupérés avec des papilles coniques et mûr en automne (Oliveira et al., 2011). Ils prennent environ 12 mois pour mûrir ; par conséquent, l'arbre porte des fruits et des fleurs matures en même temps. Le processus de floraison et de fructification s'étend d'Octobre à Février (Mhamdi Takrouni et al., 2012).



Figure 5: *Arbutus unedo* L (Oliveira, 2010).

8.1.2. Classification classique

| | |
|--------------------|-------------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Spermatophytes |
| Sous-embranchement | Eudicots |
| Classe | Magnoliopsidées |
| Sous-classe | Astéridées |
| Ordre | Ericales |
| Famille | Ericacées |
| Genre | <i>Arbutus</i> |
| Espèce | <i>Arbutus unedo</i> L. |

8.1.3. Propriétés et usages

Dans la médecine populaire traditionnelle, les espèces d'*A.unedo* ont des effets antiseptiques, diurétiques et laxatifs et sont utilisées pour traiter l'hypertension artérielle (Pallauf et al., 2008).

Ses feuilles ont été signalées comme possédant plusieurs propriétés biologiques telles que l'astringent, anti-agrégateur de plaquettes humaines en raison de leurs quantités relatives élevées en tanins, antiseptiques urinaires, anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, anti-hypertension et antidiabétiques (El Haouari et al., 2007; Pavloviç et al., 2011; Ruiz-Rodríguez et al., 2011; Ziyat et al., 1997).

Le fruit d'*A.unedo* a été utilisé dans la médecine traditionnelle car il possède des propriétés astringentes, diurétiques et antiseptiques (Doukani and Tabak, 2015), il peut être une bonne source d'antioxydants s'il est consommé comme fruit frais (Pallauf et al., 2008).

D'autres parties de cette plante sont également utilisées en médecine populaire. Les racines sont utilisées pour le traitement de plusieurs maladies, qui comprennent des douleurs abdominales, les maladies de la vessie, comme antihypercholestérolémiant ou comme dépuratif sanguin (Novais et al., 2004), et pour le traitement du diabète, de l'hypertension et les maladies cardiaques (Jouad et al., 2001), comme diurétique, astringent, antiinflammatoires et antidiarrhéique contre la blennorrhagie (Ziyyat et al., 1997). En outre, (El Haouari et al., 2007) ont également constaté que l'écorce d'*A. unedo* est utilisée pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, dermatologique et urologique et problèmes cardiovasculaires. Ils sont aussi une bonne source de minéraux car ils sont particulièrement riches en calcium (Özcan and Haciseferogullan, 2007).

8.1.4. Composition chimique d'*Arbutus unedo* L

▪ Fruits

Le fruit contient une grande concentration de glucides, de 42% à 52% (Ayaz et al., 2000). Des concentrations similaires dans des fruits d'*A.unedo* récoltés dans le nord-ouest de la Turquie (Şeker and Toplu, 2010). C'est une très bonne source de minéraux comme il est spécialement riche en calcium (Özcan and Haciseferogullan, 2007). Plusieurs composants appartenant à divers groupes phénol ont été rapportés chez les fruits d'*A.unedo*: les acides phénoliques, les flavonols, les dérivés de flavan-3-ols et de galloyle, et les anthocyanes, l'acide gallique (10,7 mg / g, poids sec) était le principal composé phénolique, suivi par l'acide protocatéchuique, l'acide gentsique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et – anisique (Ayaz et al., 2000). Les acides α -linoléique (36,51%), linoléique (21,50%) et oléique (21,01%) étaient les acides gras insaturés prédominants, et l'acide palmitique l'acide gras saturé le plus important (8,20%) trouvé dans les fruits mûrs de fruits de l'arbousier récoltés dans le territoire du parc naturel de Montesinho (Trás-os-Montes, nord-est du Portugal) (Pimpão et al., 2013). La prédominance de ces trois principaux acides a déjà été observée dans les fruits récoltés dans le centre et l'ouest de l'Espagne (Morales et al., 2013).

▪ Feuilles

L'arbutine a été signalée comme étant présente dans des extraits de feuilles d'*A.unedo* collectés au Monténégro, ainsi que des dérivés de l'hydroquinone (Pavlović et al., 2009). La quercitrine, l'isoquercitrine, l'hyperoside et l'acide chlorogénique sont d'autres composés phénoliques identifiés et quantifiés dans des extraits de feuilles d'*A.unedo* de Croatie (Maleš et al., 2013, 2006). Les auteurs de cette étude ont également signalé que les concentrations de ces composés ont changé au cours de l'année. Par exemple, des concentrations plus élevées d'hyperoside et de quercitrine ont été observées en janvier, tandis que l'acide chlorogénique était plus abondant en juin, en juillet et en octobre.

Des extraits de feuilles présentaient des flavanols (catéchines, dimères de procyanidine et esters de gallates respectifs), des flavonols (glucosides de myricétine, quercétine, Kampferol), plusieurs dérivés de galloyle (gallotannins) et ellagiques (ellagitannins). Ces composés étaient également présents dans des extraits de fruits; cependant, le nombre de composés identifiés était plus élevé dans les extraits de feuilles que chez les fruits (Mendes et al., 2011).

L' α -tocophérol a également été trouvé dans les feuilles d'*A. unedo* en provenance de Turquie, les quantités trouvées dépendant de la saison de collecte. Les feuilles récoltées en mars avaient la plus forte concentration d' α -tocophérol

▪ Tiges

Des études réalisées sur les tiges d'*A. unedo* en Algérie ont permis d'identifier à l'aide d'une analyse structurale par RMN 1H, RMN 13C, IR et spectres de masse, la présence de (+) - catéchine, (+) - afzelechine et de (4, 4-dihydroxyphényl) -5,7-dihydroxychroman-3-yl 4-hydroxybenzoate (Dib et al., 2008).

▪ Racines

Une étude phytochimique sur les racines d'*A.unedo* a permis d'identifier deux principaux composés par spectroscopie RMN: (+) - catéchine et (+) gallate de catéchine (Miguel et al., 2014), D'autres composés phénoliques ont également été identifiés par GC-MS tels que l'acide benzoïque, l'ester 4- (acétyloxy) -3-méthoxy-, méthylique; l'acide 4-hydroxyphénylacétique; L'acide caféïque; acide gallique; l'acide protocatechique et le phtalate de bis (2-éthylhexyle)(Dib et al., 2008).

Deuxième partie

Partie expérimentale

Chapitre 1

Enquête ethnopharmacologique

I. Introduction

La phytothérapie est une alternative ou un traitement parallèle dans de nombreuses maladies aiguës et chroniques. Elle suscite un regain d'intérêt dans de nombreux pays du monde, notamment dans les pays du Maghreb. En effet, un grand nombre de plantes sont utilisées en médecine traditionnelle au Maroc, dont certaines pour le traitement du diabète (Eddouks et al., 2005).

L'approche ethnopharmacologique est d'une grande importance dans ce domaine. Elle permet de recenser les remèdes antidiabétiques et de constituer une base de données de plantes médicinales afin de conserver un savoir ancestral qui s'appuie essentiellement sur une tradition orale. De plus, l'ethnopharmacologie peut conduire à la découverte de nouveaux médicaments pour le traitement du diabète (Grover et al., 2002).

La situation géographique du Maroc entre deux mers et un vaste désert traversé par trois chaînes de montagnes, aboutit à une gamme complète de bioclimats méditerranéens. Cette diversité de bioclimats favorise le développement d'une flore riche et variée. Ainsi, sur les 7 000 espèces végétales répertoriées en Afrique du Nord, 4 200 existent au Maroc, contre 3 500 en Algérie, 2 200 en Tunisie, 2 100 en Égypte, 1 800 en Libye et 1 100 en Mauritanie (Azzouzi and Zidane, 2015).

En revanche, les données scientifiques concernant le traitement du diabète en médecine traditionnelle sont insuffisantes. En effet, très peu d'informations sont disponibles sur les plantes médicinales dans le centre du Maroc (Barkaoui et al., 2017; Ouhaddou et al., 2014).

À la lumière de ces données, nous avons mené une enquête dans la province de Beni Mellal pour identifier les plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré.

II. Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude

La province de Beni Mellal est située géographiquement entre le Moyen Atlas et la plaine de Tadla, elle est ouverte vers la limite par les provinces d'Errachidia à l'Est, de Khenifra au Nord-Est et Ouarzazate au Sud-Ouest. Sa population est estimée à 550 678 habitants, soit 22 % de la population de la région selon le RGPH 2014. Béni Mellal est une subdivision de la région de Béni Mellal-Khénifra avec une altitude moyenne de 400 à 700 m et est caractérisée par un climat continental, avec une précipitation de 300 à 750 mm selon les années. Cette situation géographique et cette grande quantité de précipitations confèrent aux forêts de Beni Mellal une richesse en biodiversité végétale, d'où la présence de nombreuses plantes médicinales et aromatiques utilisées en médecine traditionnelle par la population rurale et urbaine.

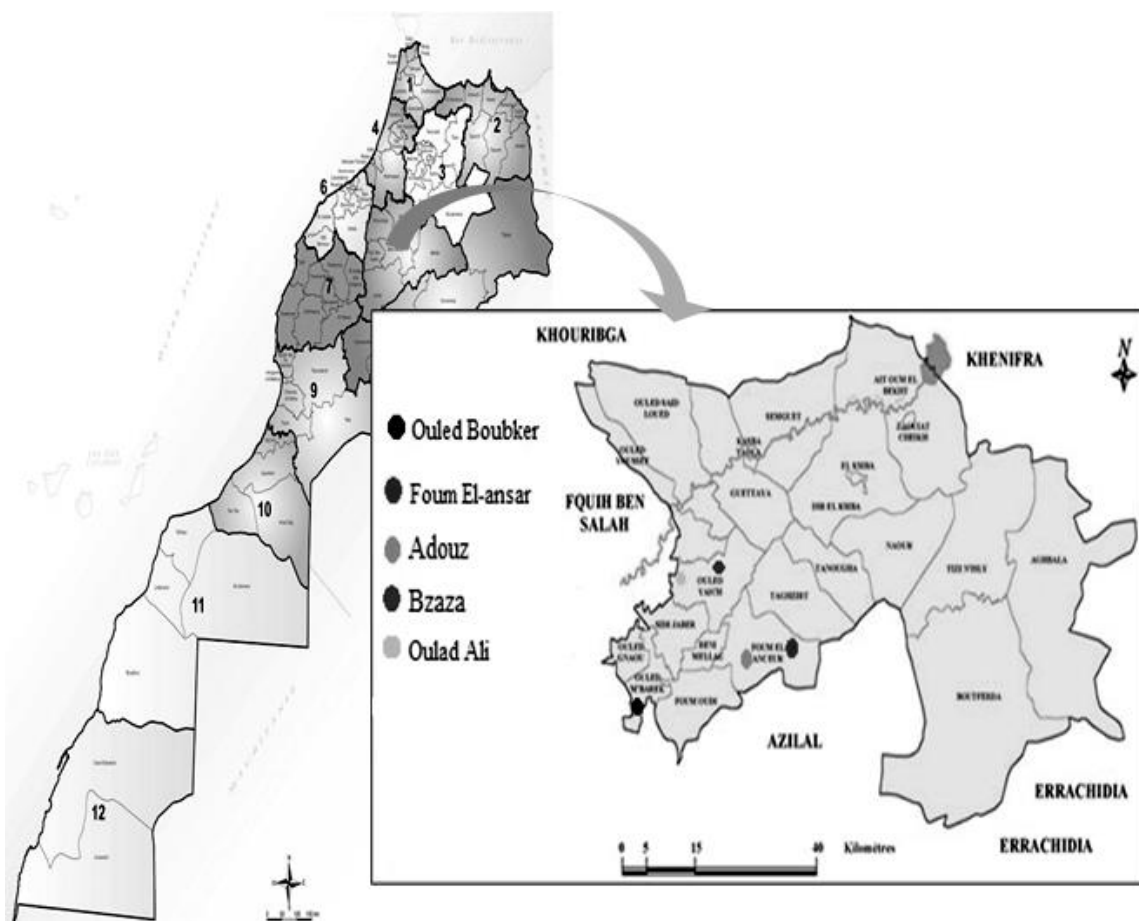


Figure 6: Une carte de la province de Beni Mellal

2. Méthodologie

Une première entrevue a été menée avec les informateurs pour leur donner une brève explication de l'objectif de l'étude et de l'importance de l'information qu'ils allaient fournir afin d'obtenir leur consentement à participer à l'étude. Au total, 400 personnes ont été interviewées directement entre Mai 2015 et Avril 2016 à travers des enquêtes ethnobotaniques dans différentes localités, villages et douars, riveraines de la forêt de Beni Mellal.

Lors des entretiens, des questionnaires semi-structurés (Annexe1), ont été utilisés pour la documentation des données. Chaque questionnaire était composé de deux parties. La première partie concernait des informations démographiques telles que le sexe, l'âge, l'éducation, la source d'information, l'expérience des participants tandis que la deuxième partie comportait des questions informatives sur les noms locaux de plantes, l'identification, le mode de préparation (décoction, macération, infusion,...), la partie végétale utilisée (tiges, racines, feuilles, graines, partie aérienne,...), le mode d'administration, disponibilité des plantes, recette à base de plantes et utilisation de la dose. Le temps passé sur chaque interview était d'environ deux heures, et les noms des plantes ont été enregistrés par l'arabe marocain lorsqu'ils ont été mentionnés.

3. Identification taxonomique et authentification des données

Au début, Une liste des noms vernaculaires des plantes médicinales utilisées par cette population a été créée. L'identification taxonomique des plantes et la détermination définitive de leurs noms botaniques, leurs noms en français et en anglais ont été effectuées ; on se référant à des documents : la flore pratique du Maroc (Fennane et al., 1999) et selon la liste des plantes, (<http://www.theplantlist.org>). Les noms de familles des plantes ont été classés par ordre alphabétique sous la base de système APGIII (Groupe Phylogénie angiospermes) (APG III, 2009), et les spécimens de plantes collectés lors de l'enquête sur le terrain ont été pressés, conservés, montés sur des feuilles d'herbier et ont été déposés à l'herbier du département de botanique de l'Institut Scientifique de Rabat / Maroc, Pour authentifier les plantes antidiabétiques rapportées, nous avons comparé nos données documentées avec des études ethnobotaniques et pharmacologiques sur le diabète, publiées précédemment dans le monde entier.

4. Analyse des données

4.1 Fréquence Relative de la Citation (FRC)

L'importance locale de chaque espèce végétale a été calculée en fonction de la fréquence relative de la citation (Yetein et al., 2013) . La FRC a été calculée comme suit : le nombre d'informateurs, qui ont mentionné l'utilisation de l'espèce (Fc), divisé par le nombre total d'informateurs (N). $RFC = Fc / N$

III. Résultats

I. Données sociodémographiques des informateurs

La présente étude a enrôlé 400 informateurs, y compris des guérisseurs traditionnels, des herboristes et des villageois compétents représentés par 210 femmes (52,5%) et 190 hommes (47,5%) ont été interviewés. Leur âge moyen était de 56 ans avec un minimum de 20 ans et un maximum de 92 ans. La majorité des personnes interrogées appartient à la zone rurale (92%) et 61,75% sont analphabètes. En ce qui concerne l'origine de leurs connaissances, la majorité d'entre eux (67,75%) ont été initiés à la pratique de la médecine traditionnelle dans la famille, cependant les autres ont été initiés par ailleurs (*tableau 1*).

Tableau 1: Données sociodémographique des informateurs

| Caractéristiques | Nombre d'informateurs | Fréquence (%) |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------|
| Tranches d'âge | | |
| <30 | 19 | 4,75 |
|]30-50] | 190 | 47,5 |
|]50-70] | 181 | 45,25 |
|]70-90] | 9 | 2,25 |
| >90 | 1 | 0,25 |
| Total | 400 | 100 |
| Sexe | | |
| Masculin | 190 | 47,5 |
| Féminin | 210 | 52,5 |
| Total | 400 | 100 |
| Scolarisation | | |
| Analphabète | 247 | 61,75 |
| Primaire | 102 | 25,5 |
| Secondaire | 43 | 10,75 |
| Université | 8 | 2 |
| Total | 400 | 100 |
| Source de l'information | | |
| Héritage familial exclusif | 271 | 67,75 |
| Révélation divine | 62 | 15,5 |
| Initiation traditionnelle | 51 | 12,75 |
| Autres | 16 | 4 |
| Total | 400 | 100 |

2. Flore médicinale

2.1. Plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète sucré

Au total 45 espèces végétales ont été répertoriées au cours de la présente étude. Les espèces les plus couramment utilisées pour traiter le diabète étaient : *Olea europaea* avec le FRC le plus élevé (24,25%), suivi de *Salvia officinalis*, *Allium sativum* et *Trigonella foenum-graecum* avec des valeurs de RFC de 23%, 22,5% et 20,5%, respectivement. Les images des plantes ayant les valeurs RFC les plus élevées illustrées à la figure 7.



Figure 7: Espèces les plus utilisées pour traiter le diabète

(A) *Olea europaea* ; (B) *Trigonella foenum-graecum* ; (C) *Salvia officinalis*; (D) *Allium sativum*

Les plantes ont été regroupées en 25 familles ; ce recensement donnait également les différentes voies d'administration, le mode de préparation et les parties utilisées de la plante en médecine telles que présentées dans le tableau 2. Les familles les plus représentées comprenant Fabaceae (6 espèces), Apiaceae (5 espèces), Lamiaceae (4 espèces), Asteraceae et Myrtaceae (3 espèces), suivies des Amaryllidaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Poaceae (2 espèces pour chacune). Toutes les autres familles étaient représentées par une seule espèce comme indiqué dans la figure 8.

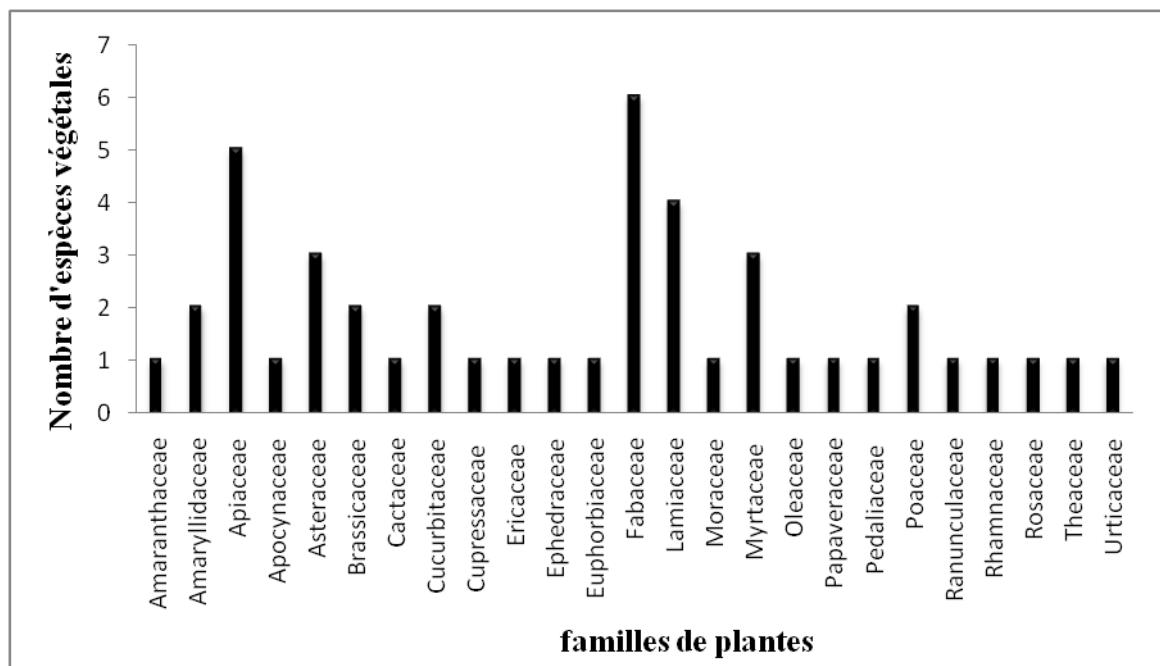


Figure 8: Répartition des espèces végétales au sein des familles

Tableau 2: Les plantes et leurs modes d'emploi dans le traitement du diabète

| Famille | Espèces végétales | Nom vernaculaire | Partie utilisée | Préparation | Administration | FRC (%) |
|----------------|--|------------------|-----------------------------------|---|----------------|---------|
| Amaranthaceae | <i>Chenopodium ambrosioides L.</i> | Mkhinza | Feuilles | Macération | Orale | 7,5 |
| Amaryllidaceae | <i>Allium sativum L.</i> | Touma | Bulbe | Cru | Orale | 22,5 |
| | <i>Allium cepa L.</i> | Al'Bassla | Bulbe | Cru | Orale | 17,5 |
| Apiaceae | <i>Carum carvi L.</i> | Lkarwya | Graines | Décoction, Macération, Infusion, poudre | Orale | 8,5 |
| | <i>Foeniculum vulgare Mill.</i> | Nafaa | Graines | Décoction | Orale | 5,25 |
| | <i>Pastinaca sativa L.</i> | LeftLmahfour | Racines | Cru | Orale | 2,75 |
| | <i>Pimpinella anisum L.</i> | HabbatHlawa | Graines | Décoction | Orale | 3,25 |
| | <i>Petroselinum sativum</i> | Maâdnous | Tige, Feuilles | Décoction | Orale | 2,25 |
| Apocynaceae | <i>Nerium oleander L.</i> | Defla | Feuilles | Fumigation | Inhalation | 6,25 |
| Asteraceae | <i>Artemisia herba alba Asso.</i> | Chih | Tige, Feuilles, Racines | Décoction, Infusion | Orale | 6 |
| | <i>Matricaria chamomilla.</i> | Babounj | Fleurs | Infusion | Orale | 2,25 |
| | <i>Artemisia absinthium L.</i> | Chiba | Feuilles, Tige, Fleurs | Décoction, Infusion | Orale | 5 |
| Brassicaceae | <i>Raphanus sativus L.</i> | Lfjel | Racines | Cru | Orale | 2,25 |
| | <i>Lepidium sativum L.</i> | Habbrchad | Graines | Infusion | Orale | 3,5 |
| Cactaceae | <i>Opuntia ficus indica (L.) Mill.</i> | Lhndia | Tige, Fleurs | Décoction, poudre | Orale | 3 |
| Cucurbitaceae | <i>Cucumis sativus L.</i> | Lkhiar | Fruits | Cru | Orale | 3 |
| | <i>Cucurbita pepo L.</i> | L'krâa | Graines | Décoction, Poudre | Orale | 2,5 |
| Cupressaceae | <i>Tetraclinis articulata Benth</i> | Al'Araâr | Feuilles | Macération | Orale | 7,5 |
| Ericaceae | <i>Arbutus unedo L.</i> | Sasnou | Feuilles, Racines | Décoction | Orale | 1,25 |
| Ephedraceae | <i>Ephedra altissima Desf.</i> | Argan | Tige, Feuilles et Partie aérienne | Décoction | Orale | 11,25 |
| Euphorbiaceae | <i>Euphorbia resinifera</i> | Ssekoum | Feuilles | Décoction | Orale | 5,75 |

| | | | | | | |
|---------------|---|-----------------|-----------------------|-----------------------------|-------|-------|
| | <i>Ceratonia siliqua L.</i> | Lkharoub | Feuilles, Graines | Décoction, poudre | Orale | 3,5 |
| Fabaceae | <i>Glycine max (L.) Merr.</i> | Soja | Graines | Macération, Cru | Orale | 6,25 |
| | <i>Trigonella foenum -graecum L.</i> | Lhelba | Graines | Décoction, poudre | Orale | 20,5 |
| | <i>Lupinus albus L.</i> | Termes | Graines | Poudre | Orale | 5,5 |
| | <i>Cicerarietanum L.</i> | Homous | Graines | Poudre | Orale | 2,75 |
| | <i>Medicago sativa</i> | Fessa | Graines | Poudre | Orale | 2,75 |
| Lamiaceae | <i>Ajuga iva (L.) Schreb.</i> | Chendgoura | Tige, Feuilles | Poudre | Orale | 6 |
| | <i>Marrubium vulgare L.</i> | Mriwt | Feuilles | Décoction | Orale | 6 |
| | <i>Salvia officinalis L.</i> | Salmia | Feuilles | Décoction, Infusion | Orale | 23 |
| | <i>Calamintha officinalis Moench</i> | Manta | Feuilles Tige, Fleurs | Décoction, Infusion | Orale | 3 |
| Moraceae | <i>Ficus carica L.</i> | Lkarmous/Chriha | Feuilles | Macération | Orale | 13,5 |
| | <i>Eucalyptus globulus Labill (sp.)</i> | Al' Kalitouss | Feuilles, Fruits | Décoction | Orale | 2,5 |
| Myrtaceae | <i>Eugenia caryophyllata</i> | Qronfel | Feuilles, Fleurs | Décoction, poudre, | Orale | 5 |
| | <i>Myrtus communis L</i> | Arraihan | Feuilles, Fruits | Décoction, Infusion | Orale | 1,5 |
| Oleaeae | <i>Olea europeae L.</i> | Zaytoun | Feuilles | Décoction | Orale | 24,25 |
| Papaveraceae | <i>Papaver rhoeas L.</i> | Belaaman | Graines | Poudre | Orale | 3 |
| Pedaliaceae | <i>Sesamum indicum L.</i> | Ajenjlane | Graines | Infusion, poudre | Orale | 3 |
| Poaceae | <i>Phalaris canariensis</i> | Zwân | Fruits | Décoction, Infusion, poudre | Orale | 3,75 |
| | <i>Zea mays L.</i> | LahyatAdra | Fleurs | Décoction, Infusion | Orale | 5 |
| Renonculaceae | <i>Nigella sativa L.</i> | Sanûj | Graines | Poudre | Orale | 3 |
| Rhamnaceae | <i>Ziziphus lotus (L.)</i> | Nbeg | Feuilles | Décoction, poudre | Orale | 2,5 |
| Rosaceae | <i>Prunus amygdalus</i> | Louzmarr | Graines | Raw | Orale | 3,75 |
| Theaceae | <i>Camellia sinensis(L.)</i> | Attay | Feuilles | Infusion | Orale | 3 |
| Urticaceae | <i>Urtica dioica L.</i> | Lhriha | Tige, Feuilles | Décoction | Orale | 3 |

3. Partie de plantes utilisées, modes de préparation et d'administration

Les données obtenues ont révélé que les feuilles étaient la partie la plus utilisée (36%), suivies des graines (26%), des tiges (15%), des fleurs (10%), des fruits et des racines (7% chacune) (figure 9). Notre enquête a montré que la décoction était le principal mode de préparation des plantes médicinales (37%) suivie de la poudre (22%), l'infusion (18%), la forme brute (12%), la macération (9%) et de l'inhalation (1%) (figure10). La voie orale a été utilisée dans 98% des cas (figure 11).

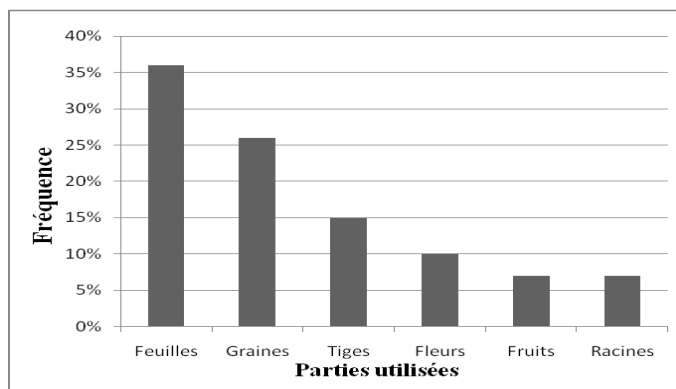


Figure 10 : Fréquence des différentes parties utilisées dans le traitement du diabète

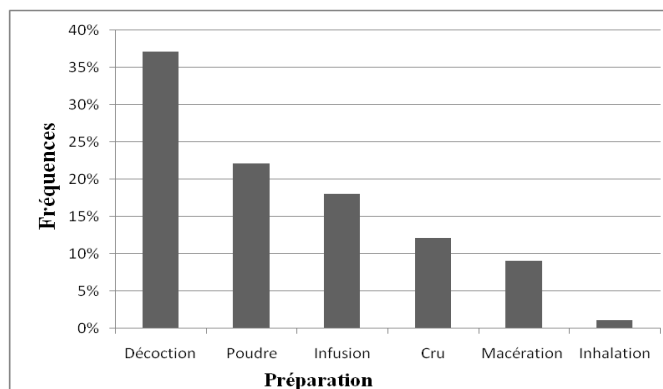


Figure 9: Formes galéniques des recettes antidiabétiques

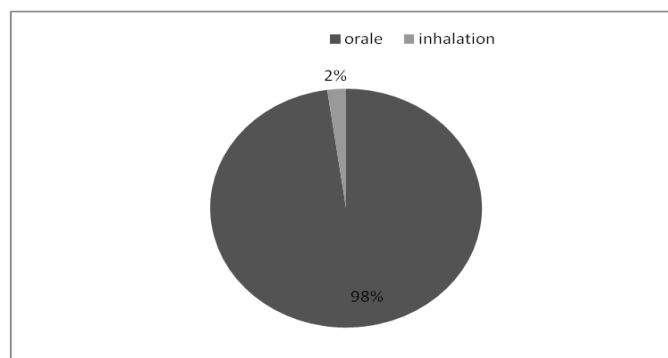


Figure 11: Mode d'administration

IV. Discussion

Le but de cette étude était d'identifier les plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la province de Beni Mellal, ce qui a démontré que cette région est très riche en médecine traditionnelle, phytothérapie populaire et patrimoine botanique. Cette richesse se reflète dans les connaissances des informateurs qui ont démontré une large culture concernant l'utilisation des plantes médicinales, en particulier les herboristes. Les résultats sociodémographiques ont montré que l'âge de tous les participants était compris entre 20 et 92 ans, le groupe le plus représenté étant celui des 30 à 50 ans (47,5%). De même, les résultats obtenus montrent que les femmes utilisent légèrement plus les plantes médicinales que les hommes. Ces résultats confirment ceux d'autres études ethnobotaniques réalisés à l'échelle nationale (Barkaoui et al., 2017; Eddouks et al., 2002; Hmamouchi, 2001; Salhi. et al., 2010; Ziyat et al., 1997). Cela pourrait être dû à ce que les femmes se chargent du séchage, du stockage et de la préparation des recettes pour les soins des membres de la famille.

Dans cette étude, les entretiens ont montré que les personnes âgées étaient particulièrement compétentes et possédaient une plus grande connaissance des plantes que les jeunes; des résultats similaires ont été observés dans d'autres études (Begossi et al., 2002; Ishola et al., 2014). Néanmoins, cette découverte n'excluait pas d'autres groupes d'âge possédant des connaissances précieuses sur les plantes médicinales. En fait, les personnes âgées sont supposées fournir des informations plus fiables, car elles détiennent davantage de connaissances ancestrales transmises oralement. La transmission de ces connaissances est actuellement à risque car elle n'est pas toujours assurée (Anyinam, 1995).

Dans cette étude, les femmes étaient plus représentées parmi les répondants (52,5%) et les hommes à 47,5%. Ces résultats concordent avec ceux d'une enquête menée antérieurement dans les régions de Chtouka Aït Baha et Tiznit au Maroc (Barkaoui et al., 2017) . Cette étude a été menée dans les parties occidentales du Maroc, tandis que l'étude en cours a été menée dans les régions centrales du Maroc, qui se distinguent par leurs emplacements géographiques et leurs zones climatiques. Ces différences étaient évidemment affectées par les plantes utilisées pour le traitement du diabète. Par conséquent, les plantes les plus utilisées dans la présente enquête étaient *Olea europaea*, *Trigonella foenum-graecum* et *Salvia officinalis*, tandis qu'*Allium sativum*, *Salvia officinalis*, *Marrubium vulgare* et *Lavandula dentata* étaient les plantes les plus citées pour le traitement du diabète dans l'étude de Barkaoui et al., (2017).

Les résultats de la présente étude ont montré que 61,75% des informateurs sont des personnes analphabètes et que leur âge était supérieur à quarante ans. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ethnobotaniques menées au Maroc (Eddouks et al., 2002) et au Bangladesh (Kadir et al., 2015). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète sucré est plus célèbre chez les analphabètes (Rahmatullah et al., 2012). Ces résultats sont corroborés par d'autres études, qui ont montré que les personnes présentant un niveau de scolarité inférieur ont plus d'expertise dans les usages de la médecine traditionnelle (Pan et al., 2013). D'autre part, les résultats de cette enquête indiquent la prédominance de certaines familles de plantes telles que Fabaceae et Apiaceae. La prédominance de ces familles a déjà été observée dans un autre pays africain (Karou et al., 2011), alors que d'autre étude ont montré le contraire dans une autre région du Maroc (Barkaoui et al., 2017).

De plus, les espèces les plus couramment utilisées pour traiter le diabète étaient : *Olea europaea* avec le FRC le plus élevé (24,25%), suivie de *Salvia officinalis*, *Allium sativum* et *Trigonella foenum-graecum* avec des valeurs de FRC de 23%, 22,5% et 20,5%, respectivement. L'activité antidiabétique de ces plantes a également été prouvée expérimentalement à l'aide d'études *in vivo* et / ou *in vitro* (Chang and Johnson, 1980; Eidi et al., 2007; Jemai et al., 2009; Lima et al., 2005; Zupkó et al., 2001).

Les plantes utilisées principalement dans le cadre de cette étude sont les mêmes que celles mentionnées précédemment au Maroc (Hachi et al., 2015; Orch et al., 2015) , au Kenya (Keter and Mutiso, 2012), au Togo (Kpodar et al., 2015) et au Pakistan (Yaseen et al., 2015). L'utilisation de feuilles pour traiter les maladies pourrait être attribuée à sa disponibilité, sa facilité de la récolte et sa richesse en substance thérapeutique (Fézan et al., 2008). Le mode de préparation des extraits médicinaux varie selon les groupes socioculturels. La décoction était le principal mode de préparation des plantes médicinales (37%) suivi de la préparation en poudre (22%), de l'infusion (18%), de la forme brute (12%), de la macération (9%) et de l'inhalation (1%). Cette découverte est en accord avec d'autres études ethnobotaniques (Fah et al., 2013), qui indiquent que les recettes sont essentiellement préparées par décoction et qu'environ 89,23% des préparations à base de plantes étaient sous forme liquide et que l'eau était utilisée comme solvant. Il a été observé que l'eau était le solvant de choix dans la préparation des plantes médicinales car elle est abondante et facile d'accès. La grande majorité des remèdes ont été pris par voie orale (98%), des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres études (Benarba et al., 2015; Semenya et al., 2012).

V. Conclusion

Le présent travail nous a permis d'inventorier 45 espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète, dans la Province de Beni Mellal. La fréquence d'utilisation des plantes médicinales est très liée au profil des interviewés ; les plus jeunes méconnaissent en général ce savoir-faire. Les femmes et les hommes ont un savoir médicinal partagé, avec une légère différence au profit des premières en termes d'utilisation des plantes médicinales.

Les plantes médicinales les plus utilisées dans la région étudiée appartiennent à 25 familles dont les plus répondues sont les Fabaceae, les Apiaceae et les Lamiaceae. En médecine traditionnelle, les feuilles représentent majoritairement les parties de la plante utilisées. La décoction est la forme galénique la plus pratiquée par la population locale dont la voie orale constitue la voie d'administration la plus utilisée.

Cette étude nous a permis d'apprécier et de connaître les pratiques de médecine traditionnelle dans le traitement du diabète, transmises par la population de la Province de Beni Mellal.

A la lumière des résultats de cette enquête, et en se basant sur une recherche bibliographique approfondie sur les espèces qui ont été peu ou pas étudiées auparavant, nous avons sélectionné la plante d'*Arbutus unedo* pour valider expérimentalement son utilisation comme remède dans le traitement du diabète.

Chapitre 2

Etude phytochimique

I. Introduction

Les vertus thérapeutiques des plantes médicinales sont connues depuis l'antiquité. Ainsi, l'intérêt pour l'étude scientifique de leur puissance n'a fait qu'augmenter ces dernières années. En fait, des études antérieures ont démontré différentes activités biologiques de plantes, notamment celles antifongiques, antibactériennes, antioxydantes et insecticides. Ce pouvoir thérapeutique est dû principalement aux composés hautement actifs pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies (Mathieu et al., 2008).

Pour mieux connaître les effets possibles des plantes, il est préférable de se référer à la mère nature en étudiant plusieurs facteurs tels que, la partie utilisée de la plante, la saison de récolte, la préparation, l'usage traditionnel, la durée de traitement, etc (Mathieu et al., 2008).

L'étude de la phytochimie fait l'objet d'intenses investigations pour aider à déterminer les constituants chimiques présents dans les plantes médicinales. Pour mener à bien ces investigations, divers organes des plantes (feuilles, écorces, racines, fruits,) sont cueillis dans leur habitat naturel afin de déterminer leur taux de toxicité et analyser leurs éventuels effets pharmacologiques. Un des outils indispensables est la connaissance du screening phytochimique.

Les techniques générales de screening phytochimique peuvent être d'un grand secours. Ces techniques permettent de détecter la présence des groupes de familles chimiques dans une plante donnée, par contre, il ne permet pas d'identifier ou déterminer la structure chimique des composés présents.

Même si les antioxydants de synthèse sont efficaces, leur utilisation est associée à des effets indésirables graves sur la santé (Williams, 1994); par conséquent, l'utilisation d'extraits de plantes médicinales en tant que source potentielle d'antioxydants avec des effets secondaires limités ou nuls est une autre manière importante d'opérer.

II. Matériel et méthodes

I. Récolte

Les racines et les feuilles d'*A.unedo* ont été recueillies dans la région de Beni Mellal au Maroc (32 ° 20'22 "N 6 ; ° 21'39" W, à 620 m d'altitude, 493 mm de précipitations annuelles moyennes. L'espèce *A. unedo* a été identifiée par le Dr. Jamal El Oualidi, département botanique et écologique végétal de l'Institut Scientifique de Rabat. La cueillette des échantillons a été faite en mois de Mai 2015 et 2016.

Après récolte, le matériel végétal (racine, feuille) a été séché à l'air libre et à l'abri de la lumière et de la chaleur. Ensuite, ils ont été broyés afin de procéder à l'extraction.

2. Préparation des extraits aqueux lyophilisés

- 50 g du matériel végétal a été mélangée à 500 mL d'eau distillée (10% p / v) et soumise à une décoction à reflux pendant 30 min
- Laisser le mélange refroidir ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.
- Evaporés sous vide et à une température de 60 °C, à l'aide d'un évaporateur rotatif.
- Les résidus sont ensuite mis dans des bouteilles, et congelés à -80°C et enfin lyophilisés.

3. Calcul de rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait obtenu, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Nous avons déterminé les rendements de notre plante en extrait sec par le calcul du rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = (P1 - P2 / P3) \times 100$$

P1 : poids de la bouteille après lyophilisation ;

P2 : poids de la bouteille vide ;

P3 : poids de la matière végétale de départ (50g).

4. Screening phytochimique

Les extraits de racines et de feuilles d'*A.unedo* ont été examinés pour leur composition chimique qualitative, en utilisant des méthodes standard (Danielle and Odile, 2007; Macheix et al., 2005) pour l'identification des groupes suivants: les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les quinones libres, les anthraquinones, les terpénoïdes et les saponosides.

a. Les tanins

Afin de caractériser les tanins, 1,5 g de matériel végétal sec en poudre, ont été placés dans 10 mL de méthanol 90 % avec agitation pendant 15 min, l'extrait a été filtré et mis dans un tube. L'ajout de FeCl_3 1% permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques.

b. Flavonoïdes

Pour caractériser les flavonoïdes, 0,5 g de la matière végétale a été placé dans 10 mL d'eau distillée pendant 10 min, après agitation l'extrait a été filtré et mis dans un tube, puis, 5 mL d'une solution d'ammoniac diluée sont ajoutés, ensuite, 1 mL d'acide sulfurique est additionné, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes.

c. Terpénoïdes

Afin de caractériser les terpénoïdes, 0,8 g de la matière végétale a été placé dans 10 mL de méthanol, après agitation et filtration, 5 de l'extrait obtenu ont ont placés dans un tube et mélangés avec 2 mL de chloroforme, puis, 3 mL de l'acide sulfurique sont additionnés. La présence de terpénoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur brune rougeâtre.

d. Quinones libres

Pour la recherche des quinones libres, 1 g de matériel végétal, a été placé dans un tube en présence de 15 à 30 mL d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 heures, l'extrait a été filtré et concentré au rotavapeur. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH (0.1 M), lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

e. Anthraquinones

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1g de poudre végétale et 10 mL de CH₃Cl. Nous avons procédé à un chauffage au bain marie pendant 15min, puis nous avons filtré et complété le volume à 10 mL avec du chloroforme.

A l'extrait chloroformiques de matériel végétal, a été ajouté 1 mL du KOH aqueux 10% (v/v), après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

f. Anthocyanes

La mise en évidence d'anthocyane repose sur l'apparition d'une coloration bleu-violacée en milieu alcalin et rouge en milieu acide.

On porte à une ébullition 1 g de poudre dans 10 mL l'eau distillé (Infusé), après refroidissement en filtre). On ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique dilué (2N), après une première observation, on ajoute 5 mL d'ammoniaque NH₄OH. On relève la variation du filtrat. Si la coloration rouge par acidification puis vire au bleu-violacée en milieu basique, il y a présence d'anthocyane.

g. Saponines

Le principe consiste à déterminer l'indice de mousse persistante pendant une période de 15min d'une décoction aqueuse de 2%. Après refroidissement et filtration, on a réajusté le volume à 100 mL.

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire successivement 1, 2, 3, 10 mL de décocté. Ajuster le volume de chaque tube à 10 mL avec de l'eau distillé. Chaque tube est agité horizontalement pendant 15 secondes puis laissé reposer pendant 15min. on relève ensuite la hauteur de la mousse persistante en cm. Si celle-ci est inférieure à 1cm dans tous les tubes, l'indice est moins de 100. La dilution dans le tube où la hauteur de la mousse est égale à 1cm représente l'indice recherché.

Si elle est proche de 1cm dans le Xème tube, on calcule l'indice de mousse par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le Xème tube} * 10 / 0,0X \quad (X= 1, 2, 3, \dots, 10)$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100.

h. Alcaloïdes

Deux grammes du matériel sec et broyé ont été ajoutés à 10 mL de H₂SO₄ (1%), après le résidu formé est soumis à une macération de 4 minutes suivie d'une filtration. La formation d'un précipité jaune après l'ajout de quelques gouttes du réactif de Mayer (mercuritétraiodure de potassium), témoigne la présence d'alcaloïdes.

Si ce test de base est positif, la confirmation de ce résultat se fait en milieu basique par l'ajout de l'ammoniaque à 25% puis du chloroforme ensuite la filtration. La pulvérisation du réactif de Dragendorff donne sur une bande CCM contenant quelques gouttes du filtrat une coloration rouge brique qui confirme la présence des alcaloïdes.

5. Dosage phytochimique

5.1 Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (Mberdoum, 2015). Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante (Lugasi et al., 2003). Ils sont synthétisés, par des plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes. Ces composés phytochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes et sont très diversifiées (Naczki and Shahidi, 2004).

- **Principe**

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits sont déterminées selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par (Lister and Wilson, 2001). C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (Abdel-Hameed, 2009).

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀).

Ce réactif est réduit par l'oxydation provoquée par les composés phénoliques, donnant un mélange de bleus de tungstène W₈O₂₃ et de molybdène Mo₈O₃ de couleur bleu. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot and Charpentier, 2006).

- **Mode opératoire**

Brièvement, 0,5 mL de chaque extrait (1mg/ml) est ajouté à 2,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau). Ensuite, 4 mL de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5 %, m/v) sont ajoutés afin de favoriser un milieu alcalin pour démarrer la réaction d'oxydoréduction. Le mélange est ensuite incubé au bain marie à 45 °C pendant 30 minutes. L'intensité de la coloration bleue produite a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6305) à la longueur d'onde 765 nm.

La quantification des polyphénols totaux a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un standard étalon (l'acide gallique) à différentes concentration (**0.487, 0.975, 1.95, 3.9, 7.81, 15.625, 31.25 $\mu\text{g/mL}$**) dans les mêmes conditions que les extraits et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par 1 gramme d'extrait (mg EAG / 1 g Ex), utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique : **$Y=0,0104x + 0,0204$; $R^2= 0,998$** .

5.2 Dosage des flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides. Et du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Narayana et al., 2001).

- **Principe**

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode décrite par Dewanto et al., (2002), avec le réactif de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

- **Mode opératoire**

1 mL d'échantillon dissous a été placé dans une fiole jaugée de 10 mL. De l'eau distillée a été ajoutée pour que le volume atteigne 7,4 ml, puis 0,3 ml de NaNO_2 (5%) a été ajouté. 0,3 mL d' AlCl_3 (10% m/ v) a été ajouté 5 minutes plus tard. Au bout de 6 minutes, 2 mL de NaOH 1M ont été ajoutés et la solution a été bien mélangée et laissée au repos pendant 30

minutes. Les absorbances ont été mesurées immédiatement à une longueur d'onde égale à 510 nm.

Les teneurs en flavonoïdes totaux dans chaque extrait sont calculées en se référant à l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon la Rutine à différentes concentrations (**50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µg/mL**) et dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage : $Y=0.001x+0.056$ $R^2=0,9550$. $R^2= 0,9550$

Elles sont exprimées en milligrammes d'équivalents de Rutine par gramme d'extrait (mg ER / g de l'extrait).

5.3 Dosage des tanins

Les tannins sont des substances végétales de la famille des polyphénols, le plus souvent hydrosolubles, d'origine végétale et qui possèdent la capacité de précipiter les protéines, alcaloïdes et polysaccharides, à partir de leur solution aqueuse. Ces métabolites secondaires sont utilisés par les plantes supérieures (arbres, plantes à fleur, etc) comme moyen de défense chimique contre les microbes pathogènes et les herbivores. Leurs structures chimiques sont en effet variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes (Khanbabaee and van Ree, 2001).

- **Principe**

L'évaluation quantitative des tanins condensés dans nos extraits est réalisée selon la méthode citée par (Julkunen-Tiitto, 1985) .

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500 nm (Schofield et al., 2001).

- **Mode opératoire**

50µl de chaque des extraits (1 mg/mL), a été mélangé avec 1,5 mL de la vanilline 4%, suivis de 750 µl de l'acide chlorhydrique HCl concentré ont été ajoutés. Après que la solution est bien mélangée et laissé pendant 20 min dans l'obscurité à une température ambiante. Les absorbances ont été mesurées à 500 nm.

Les teneurs en tanins catéchiques sont calculées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie avec la catéchine à des concentrations de (**50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 µg/mL**) :

$$Y=0,0006123x-0,002053 ; R^2= 0,9722$$

Exprimées en milligramme d'équivalents de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g de l'extrait).

5.4 Dosage des sels minéraux

La composition minérale (Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, K, Na et P) a été déterminée à l'aide d'une spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP AES, JobinYvonUltima 2) comme décrit précédemment (Marmouzi. et al., 2015). Brièvement, 150 mg de poudre de racines et de feuilles ont été mélangés avec 2 mL d'acide nitrique HNO₃ (70%) dans un bécher en téflon avant d'être incinéré à 110 °C. Ensuite, on a ajouté 0,5 mL d'acide fluorhydrique et on a placé le bécher couvert sur un bain de sable. Le mélange d'échantillon a été chauffé jusqu'à obtention d'une solution limpide. Après avoir retiré le couvercle, le mélange a été évaporé jusqu'à séchage. Enfin, on a ajouté 2 mL d'acide chlorhydrique (HCl) et on a extrait le résidu par 25 mL de HCl (2,0 M).

6. Etude de l'activité antioxydante : Piégeage du radical libre DPPH

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de plantes. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Pour étudier l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo*, nous avons utilisé le test au DPPH (2,2 -diphényl-1-picrylhydrazyle). Sous sa forme radicalaire de couleur violette, le DPPH absorbe la lumière visible à 517 nm. Après sa réduction en 2,2 -diphényl-1-picrylhydrazine par des antioxydants ou des espèces radicalaires (*figure 12*), son absorbance diminue et sa couleur change vers le jaune. La mesure de la diminution de l'absorbance du DPPH permet donc de déterminer le pouvoir anti-radicalaire des substances testées.

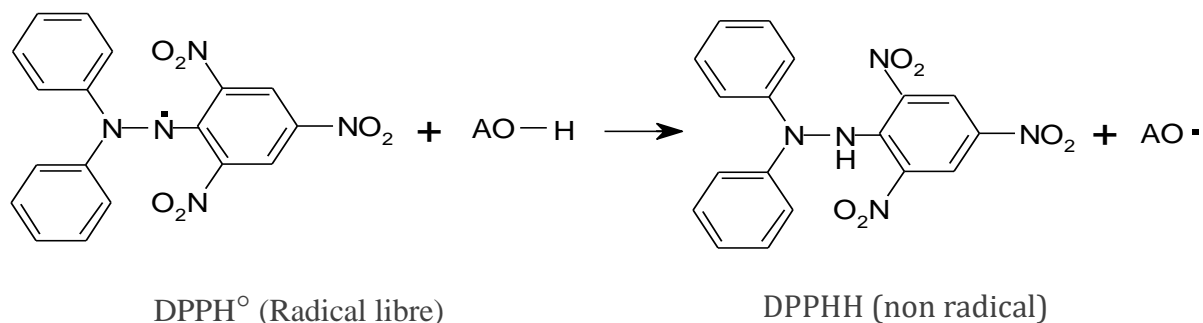


Figure 12 : Réduction par des antioxydants de DPPH en DPPHH

6.1 Test au DPPH

- **Principe**

L'effet antiradicalaire de différents extraits d'*A.unedo* vis-à-vis du radical DPPH° est basé sur la méthode décrit par (Huang et al., 2011).

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil). Ce dernier de couleur violette se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune en acceptant un atome d'hydrogène.

- **Mode opératoire**

Dans des tubes, 2,5 mL de différentes concentrations de chaque extrait aqueux ont été introduit et 0.5 mL de solution méthanolique de DPPH (0.2 mM DPPH, dissous dans le méthanol) fraîchement préparée ont été ajoutés. Le mélange est vigoureusement agité au vortex, les mélanges ont été placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Après l'agitation au vortex, la lecture du changement de couleur a été effectuée par la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde 517nm.

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'antioxydant qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les valeurs d'IC₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage de réduction (PR) du radical DPPH, qui est calculé par la formule suivante :

$$I \% = [(Abs \text{ Control négatif} - Abs \text{ Echantillon}) / Abs \text{ Control négatif}] \times 100$$

Où :

I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif (solution de DPPH seulement).

Le contrôle négatif est composé de la solution de DPPH dans le méthanol seul, et le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le BHT, avec des

concentrations de 0.48 à 1000 µg/mL. En outre, les valeurs IC₅₀ ont été déterminées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5.

III. Résultats

I. Rendement d'extraction

Les rendements en extraits aqueux lyophilisés, d'*A.unedo*, exprimés en pourcentage par rapport au poids du matériel végétal sec de départ, sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Rendement en extrait aqueux sec d'*A.unedo*

| Extrait aqueux | Racines | Feuilles |
|----------------|---------|----------|
| Rendement % | 39.471 | 37.854 |

Nous avons constaté que les racines et les feuilles d'*A. unedo* ont donné un bon rendement en extrait sec. L'eau est le solvant le plus utilisé pour une haute récupération de composés phénoliques.

2. Dépistage phytochimique

Nous avons réalisé les tests phytochimiques sur la matière végétale sèche. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, et la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

Les résultats de l'analyse phytochimique préliminaire de l'extrait d'*A.unedo* conduit à la mise en évidence de plusieurs métabolites secondaires. Le tableau 4 montre que les tanins, les flavonoïdes et les anthraquinones sont présents à fortes concentrations dans les feuilles et les racines. Tandis que, les quinones libres existent avec concentration modérée. Toutefois, les terpénoïdes sont assez présents dans les racines que les feuilles. Avec une absence totale des alcaloïdes et des saponines dans les deux extraits.

Tableau 4: Métabolites secondaires d'*A.unedo*

| | Racines | Feuilles |
|--------------------|---------|----------|
| Tanins catéchiques | +++ | +++ |
| Anthraquinones | +++ | +++ |
| Terpénoïdes | +++ | + |
| Flavonoïdes | +++ | +++ |
| Quinones libres | ++ | ++ |
| Saponines | - | - |
| Alcaloïdes | - | - |

(-) Absent ; (+) présent ; (++) présent avec une concentration modérée; (+++) présent avec une forte concentration

3. Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode spectrophotométrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

L'analyse quantitative des phénols de l'extrait aqueux d'*A.unedo* a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une gamme de solutions standard d'acide gallique établie séparément (Annexe 2). La quantité des phénols totaux dans les extraits est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par 1 gramme d'extrait (mg EAG / g). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 13.

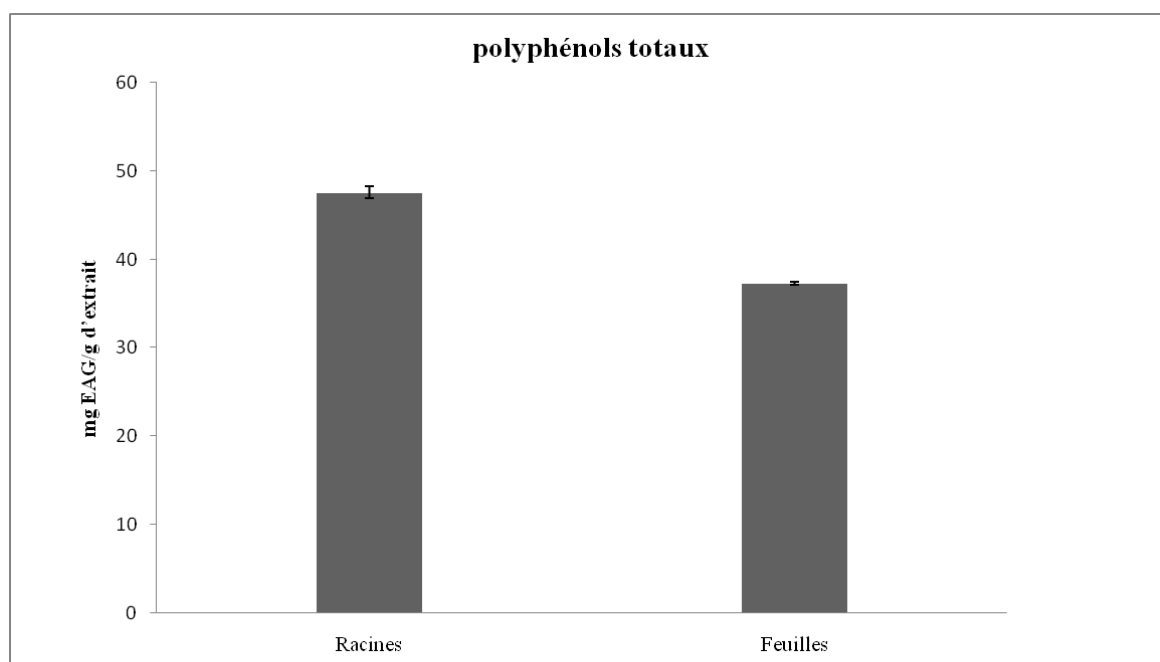


Figure 13: Teneurs en polyphénols totaux d'extrait aqueux d'*A.unedo*

Nous avons constaté que l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* présente des teneurs en polyphénols totaux relativement plus élevée avec une valeur de 47.55 ± 0.67 mg EAG/g que celle donnée par les feuilles 37.30 ± 0.19 mg EAG/g d'extrait.

4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'étalon été la Rutine, en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage (Annexe 2), en remplaçant la Rutine par des dilutions des extraits jusqu'à une concentration appropriée.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de Rutine par 1 gramme de l'extrait (mg ER / g de l'extrait). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 14.

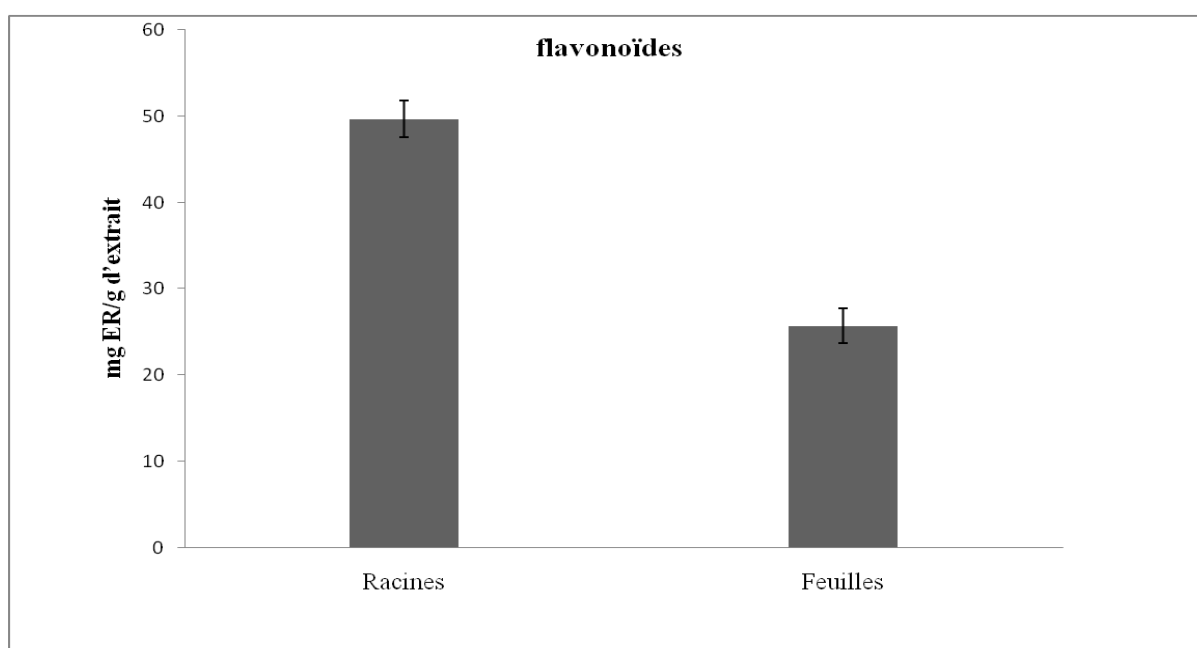


Figure 14: Teneurs en flavonoïdes d'extrait aqueux d'*A.unedo*

Le test révèle que l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* a une teneur importante en flavonoïdes avec une valeur de $49,66 \pm 2,13$ mg ER/g, tandis que celle des feuilles n'est que de $25,73 \pm 2,01$ mg ER/g d'extrait.

5. Dosage des tanins catéchiques

Le dosage des tanins a été réalisé selon la méthode spectrophotométrique de vanilline et l'étalon été la catéchine. La teneur des tanins est exprimée en milligramme d'équivalent de lacatéchine par 1 gramme d'extrait (mg EC/g de l'extrait).

Les taux des tanins de l'extrait aqueux d'*A.unedo* sont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 2), en remplaçant la catéchine par des dilutions des extraits jusqu'à une concentration appropriée. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 15.

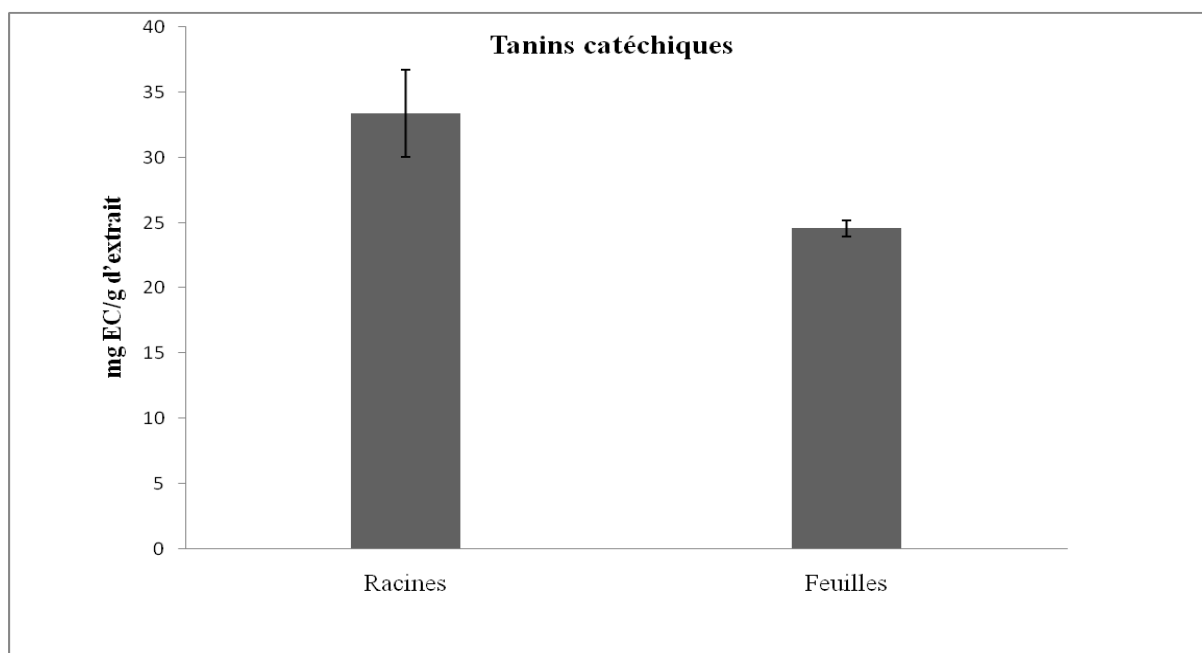


Figure 15: Teneurs en tanins catéchiques d'extrait aqueux d'*A.unedo*

La teneur en tanins a été également plus marquante dans les racines de l'extrait aqueux d'*A.unedo* avec une valeur de $33,38 \pm 3,34$ mg EC /g, face à celle des feuilles enregistrant une valeur de $24,58 \pm 0,63$ mg EC/g d'extrait.

6. Composition minérale

Les teneurs en minéraux dans les racines et des feuilles d'*A.unedo*, exprimées en mg/kg, sont indiquées dans le tableau 5. Cinq macroéléments ; (calcium (Ca), potassium (K), magnésium (Mg), sodium (Na) et phosphore (P)) et trois microéléments ; (cuivre (Cu), fer (Fe) et zinc (Zn)) ont été analysés. Les feuilles d'*A.unedo* présentent des teneurs significativement plus élevées ($p < 0,05$) en Ca ($5738,31 \pm 198,54$), P ($1819,66 \pm 48,94$), K ($10534,86 \pm 365,55$), Fe ($344,78 \pm 16,44$), Mg ($1620,13 \pm 59,78$), et Mn ($29,61 \pm 0,33$) en comparaison avec les racines, tandis que les racines contiennent des quantités significativement plus élevées de Na ($455,79 \pm 14,22$), d'autre part il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les feuilles et les racines dans le contenu de Zn.

Tableau 5: Composition minérale d'*A. unedo* en mg / kg

| | Racines | Feuilles |
|----|-----------------------|-------------------------|
| Ca | $3454,64 \pm 82,91^a$ | $5738,31 \pm 198,54^b$ |
| Na | $455,79 \pm 14,22^b$ | $137,27 \pm 2,89^a$ |
| P | $51,10 \pm 0,79^a$ | $1819,66 \pm 48,94^b$ |
| K | $238,68 \pm 11,19^a$ | $10534,86 \pm 365,55^b$ |
| Fe | $21,86 \pm 0,53^a$ | $344,78 \pm 16,44^b$ |
| Mg | $655,48 \pm 6,29^a$ | $1620,13 \pm 59,78^b$ |
| Zn | $15,66 \pm 0,75^a$ | $12,05 \pm 0,40^a$ |
| Mn | $4,43 \pm 0,54^a$ | $29,61 \pm 0,33^b$ |

Les données indiquent ($n = 3$) \pm erreur standard.

Une même lettre est affectée aux valeurs de la même ligne qui ne présente pas une différence significative ($P > 0,05$).

7. Activité Antioxydante

7.1. Piégeage du radical libre DPPH

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre organique stable avec une bande d'absorption à 517 nm. Il perd cette absorption lorsqu'il accepte un électron ou une espèce de radicaux libres, ce qui entraîne une décoloration visuellement perceptible du violet au jaune.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*A.unedo* étudiée par le test de DPPH sont exprimés par le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits et sont représentés graphiquement (I % en fonction de la concentration) et portés par rapport à ceux obtenus pour le BHT, l'acide gallique et l'acide ascorbique pris comme antioxydants de référence.

Le test de DPPH établie pour les antioxydants de référence (figure16) a montré que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH été très élevés pour les 3 produits BHT, acide gallique et acide ascorbique et supérieur à 90 % à la concentration de 1mg/mL. La concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC_{50}) a été trouvée de $2,26 \pm 0,57$ $\mu\text{g/mL}$ pour l'acide gallique, $2,18 \pm 0,71$ $\mu\text{g/mL}$ pour l'acide ascorbique et de $3,28 \pm 0,79$ $\mu\text{g/mL}$ pour le BHT.

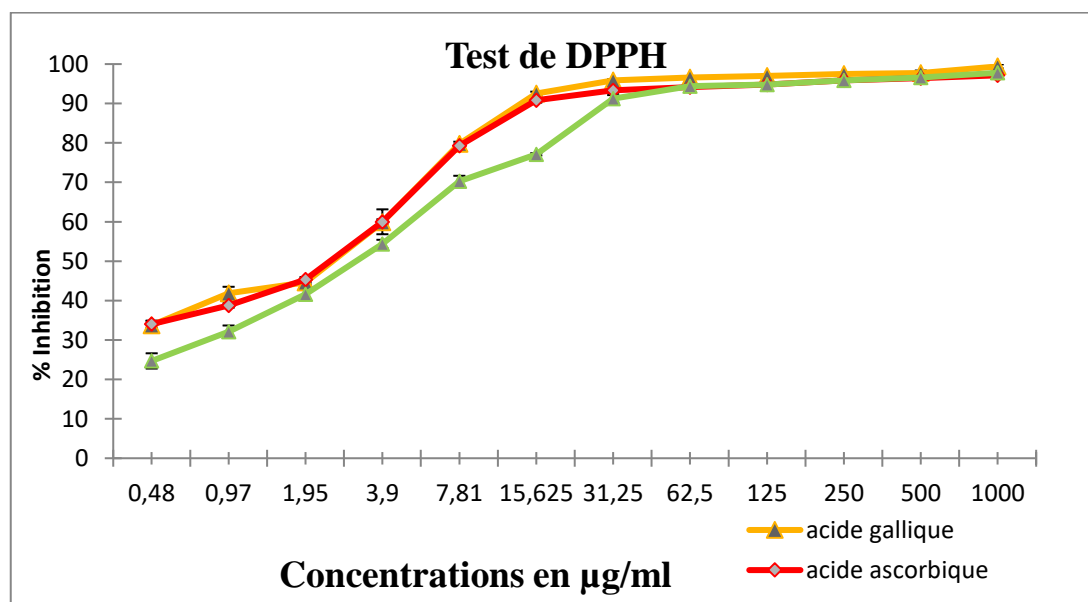


Figure 16: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les antioxydants de référence

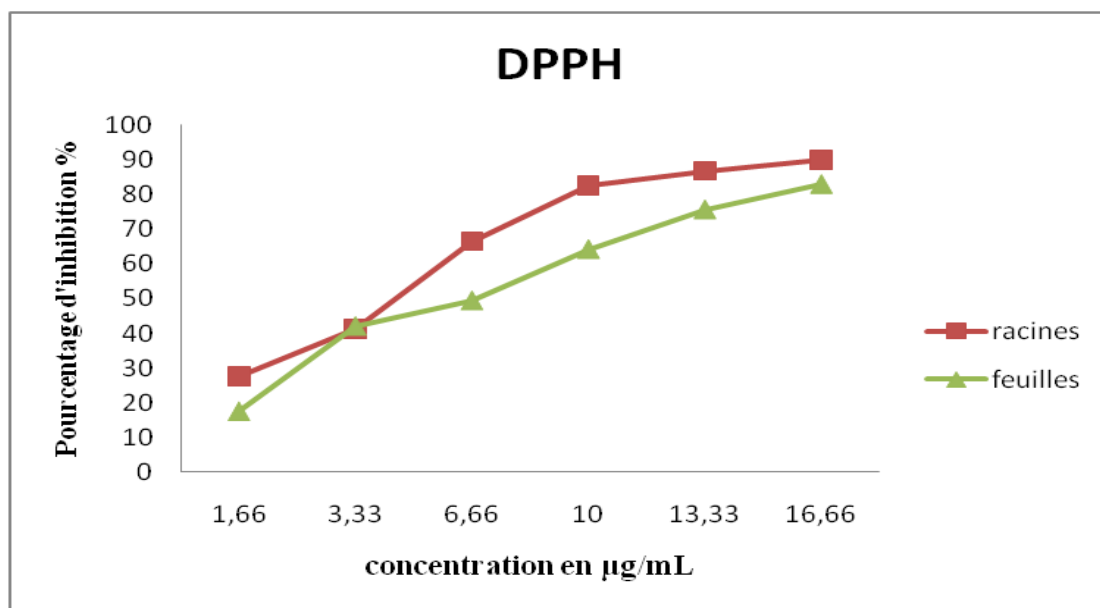


Figure 17: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait aqueux d'*A.unedo*

La figure 17 montre que l'activité antioxydante des extraits exprimée en % d'inhibition du radical DPPH est concentration-dépendante.

Les effets de piégeage des extraits aqueux d'*A.unedo* et de l'acide ascorbique sur les radicaux DPPH exprimés par IC_{50} sont illustrés dans le tableau 6.

Les résultats ont montré que les racines ont une activité antioxydante meilleure que celle des feuilles. Tandis qu'ils ont montré un effet relativement inférieure mais comparable à celui de l'acide ascorbique ($3,12 \pm 0,67 \mu\text{g} / \text{mL}$).

Tableau 6: Valeurs de IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{mL}$) d'*A. unedo*

| | IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{mL}$) |
|------------------|---|
| Racines | 4.52 ± 0.69^a |
| Feuilles | 7.24 ± 0.73^b |
| Acide ascorbique | 3.12 ± 0.67^a |

Une même lettre est affectée aux valeurs de la même ligne qui ne présente pas une différence significative ($P > 0,05$).

IV. Discussion

Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. Cela n'est abordable que par faire d'abord un appel à l'analyse phytochimique qui va permettre d'identifier les différents groupes chimiques présents dans l'extrait de plantes.

Dans ce chapitre l'analyse phytochimique a permis d'identifier les différents groupes chimiques présents dans l'extrait aqueux d'*A.unedo*; les tanins catéchiques, les anthraquinones, les terpénoïdes, les flavonoïdes, et les quinones libre. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Dib et al., 2010).

Dans notre étude, les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les différentes parties d'extraits étudiées d'*A.unedo*. Cette répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une même plante a été rapportée par plusieurs auteurs (Andrade et al., 2009; Mendes et al., 2011; Oliveira et al., 2009). Nos résultats montrent que l'extrait aqueux des racines possède les teneurs les plus élevées, avec une valeur de 47.55 ± 0.67 mg EAG/g d'extrait à celle des feuilles. Cette valeur est supérieure à celle trouvée par (Fortalezas et al., 2010), qui a travaillé sur l'arbousier originaire de l'Espagne signale que l'extrait chloroformique d'*A.unedo* donne un taux de composés phénoliques totaux de $16,46 \pm 3,66$ mg EAG/g d'extrait. Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte et aussi par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales, ainsi la polarité du solvant joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité des composés phénolique (Naczka and Shahidi, 2006).

Les résultats du dosage des flavonoïdes montrent que l'extrait des racines représente l'extrait le plus riche avec une valeur de 49.66 ± 2.13 mg ER/g d'extrait. En comparant nos résultats avec ceux obtenus par (Doukani and Tabak, 2015; Maleš et al., 2006), on constate que les racines d'*A.unedo* présentent des teneurs en flavonoïdes largement supérieures. Ceux-ci peut être expliqué par la différence dans les conditions écologiques, telles que le type de sol, les conditions microclimatiques, position géographique, le site, l'âge et le stade végétatif des plantes et des fruits.

De même les résultats du dosage des tanins montrent que l'extrait des racines représente le taux le plus élevé avec : 33.38 ± 3.34 mg EC/g d'extrait comparés au résultat obtenus par (Mahmoudi et al., 2013).

Concernant la teneur en minéraux, des différences intéressantes ont été enregistrées entre les feuilles et les racines. Ces différences sont probablement liées au profil génétique et partiellement aux conditions environnementales. La présente étude a révélé que *A. unedo* est une bonne source de Ca, Mg, P, Na et K, qui sont très importants dans la nutrition humaine.

Des travaux antérieurs ont décrit la teneur en minéraux des fruits d'*A.unedo* (Özcan and Haciseferogullan, 2007). Cependant, à notre connaissance, il s'agit d'un premier rapport sur les teneurs en minéraux des racines et des feuilles d'*A.unedo*. Les éléments minéraux sont dotés d'une activité de promotion de la santé intéressante. Par exemple, leur contribution dans les systèmes rénaux et cardiovasculaires (Tobian et al., 1984). Le contenu riche en feuilles et racines et le complément minéral intéressant peuvent constituer un ajout intéressant au régime alimentaire et à la thérapie humaine.

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*A. unedo*. Cette activité des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008).

Selon les résultats obtenus dans cette étude, il est indiqué clairement que l'extrait aqueux des racines de la plante testée possèdent de forte activité antioxydante ce qui est compatibles avec ses teneurs les plus élevées en composés phénoliques et en flavonoïdes.

Des études antérieures ont étudié l'effet de piégeage des radicaux DPPH des feuilles et des fruits d'*A.unedo* (Malheiro et al., 2012; Mendes et al., 2011; Oliveira et al., 2011). De même (Márquez-García et al., 2009) a montré qu'*A.unedo* a une corrélation entre la teneur en phénol et son activité antioxydante, ceci pourrait être lié aux observations décrites par Kraus (Kraus et al., 2004). Cependant peu de documents ont décrit la bioactivité des racines (Djabou et al., 2013).

Des études antérieures ont confirmé que les composés phénoliques sont les principaux constituants antioxydants dans les plantes médicinales, les légumes, les fruits et les épices

(Cai et al., 2004). Normalement, l'effet de la capacité antioxydante dépend de la solubilité de l'antioxydant, ils sont solubles dans l'eau ou soluble dans les lipides (Hosseinian et al., 2007).

V. Conclusion

En conclusion, nous pouvons dire que nos résultats montrent que l'extrait aqueux d'*A.unedo* est associé à une activité antioxydante très intéressante. Compte tenu de sa teneur élevée en composés phénoliques et de son profil minéral, cette plante peut être intéressante en tant que source alimentaire riche d'une large gamme de composés phénoliques. Ce qui suggère que l'extrait aqueux d'*A.unedo* peut être utile dans le développement d'un antioxydant. Toutefois, D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer l'importance de cet effet antioxydant chez les animaux et chez l'homme.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle. Or qu'une étude *in vivo* est souhaitable, pour la mise en valeur des activités antioxydante et antidiabétique des extraits de cette plante.

Chapitre 3

Activité antidiabétique

I. Introduction

Le diabète sucré est considéré comme un trouble métabolique chronique, caractérisé par une hyperglycémie et des perturbations métaboliques des protéines, des glucides et des graisses. Il provoque l'échec de la production d'insuline ou de l'action de l'insuline ou les deux (Madhusudhan and Kirankumar, 2015). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 422 millions de personnes souffrent de diabète dans le monde et ce nombre doublera d'ici 20 ans (OMS, 2016).

Le type 2 est plus prévalent que le type 1, avec plus de 90% du total des patients diabétiques qui en souffrent (Malek et al., 2012). Ce type est causé par un déséquilibre entre l'absorption de sucre dans le sang et l'utilisation inefficace de l'insuline par le corps (OMS, 2016).

Le traitement du diabète de type 2 reste compliqué, en raison des plusieurs facteurs inhérents au processus pathologique, notamment l'insulinorésistance, l'hyperinsulinémie, l'altération de la sécrétion d'insuline, une diminution de l'absorption et de l'utilisation de glucose induite par l'insuline (Tiwari and Rao, 2002). Ce type est traité avec des inhibiteurs de la metformine, du glibenclamide, de l' α -glucosidase et de l' α -amylase.

Des données antérieures indiquent que plus de 88 plantes médicinales ont également été citées comme remèdes traitant le diabète au Maroc (Bnouham et al., 2002a). Les plantes anti-diabétiques et leurs composants actifs peuvent constituer une source prometteuse de nouveaux médicaments pour traiter le diabète (Bnouham et al., 2002a, 2002b; Kar et al., 2003).

Suite à l'enquête menée dans la province de Béni-Mellal, le criblage et le dosage phytochimique, l'objectif de ce chapitre est de déterminer la base scientifique de l'utilisation d'*Arbutus unedo* L. (ERICACEAE) connue par ses propriétés dans le traitement du diabète.

L'étude *in vitro* a commencé par l'évaluation de l'activité inhibitrice des deux enzymes α -glucosidase et α -amylase qui sont impliqués dans la digestion humaine. Conséquemment dans l'équilibre du glucose sanguin. Par conséquent, leur inhibition peut être une stratégie importante dans la gestion de la glycémie. Les inhibiteurs naturels de l' α -glucosidase et de l' α -amylase provenant de sources végétales est une approche attrayante pour le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale (Subramanian et al., 2008).

Pour continuer l'étude, nous avons utilisé des souris rendues diabétiques par la streptozotocine-nicotinamide, évidemment après une évaluation des doses toxiques de l'extrait étudié.

II. Matériel et méthodes

I. Activités antidiabétiques *in vitro*

1.1. Effet inhibiteur de l' α -amylase

Le potentiel inhibiteur de l' α -amylase a été étudié en réagissant différentes concentrations de l'extrait aqueux d'*A.unedo* avec l'enzyme α -amylase et la solution d'amidon, comme décrit précédemment (Hashim et al., 2013), avec de légères modifications. Un mélange de 250 μ l d'échantillon et 250 μ L de tampon de phosphate de sodium 0,02 M (pH = 6,9) contenant l'enzyme α -amylase (240 U / mL) a été incubé à 37 °C pendant 20 minutes. Ensuite, 250 μ L de solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate de sodium 0,02 M ont été ajoutés au mélange réactionnel.

Le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 15 min. Ensuite, on a ajouté 1 mL de (DNS) et on a incubé le mélange réactionnel dans un bain d'eau bouillante pendant 10 min. Le mélange réactionnel a ensuite été dilué en ajoutant 2 mL d'eau distillée, et l'absorbance a été mesurée à 540 nm dans le spectrophotomètre. L'acarbose a été utilisé comme témoin positif.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(A_c - A_{cb}) - (A_s - A_{sb})}{A_c - A_{cb}} \times 10$$

Où A_c se réfère à l'absorbance du témoin (enzyme et tampon); A_{cb} se réfère à l'absorbance du blanc témoin (tampon sans enzyme); En ce qui concerne l'absorbance de l'échantillon (enzyme et inhibiteur); Et A_{sb} est l'absorbance de l'échantillon vierge (inhibiteur sans enzyme). Les valeurs IC_{50} (concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique) ont été déterminées.

1.2. Effet inhibiteur d' α -glucosidase

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase de l'extrait a été déterminée en utilisant le substrat pNPG selon la méthode décrite par (Kee et al., 2013), avec quelques modifications. En bref, un mélange de 150 μ L de l'échantillon et 100 μ L de tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH = 6,7) contenant la solution d'enzyme α -glucosidase (0,1 U / mL) a été incubé à 37 °C

pendant 10 min. Après la pré-incubation, on a ajouté 200 μ L de solution de pNPG 1 mM dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 37 ° C pendant 30 min. Après incubation, on a ajouté 1 mL Na_2CO_3 (0,1M) et on a mesuré l'absorbance à 405 nm en utilisant le spectrophotomètre. L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été exprimée en pourcentage d'inhibition, et les valeurs IC_{50} ont été déterminées. L'acarbose a été utilisé comme témoin positif.

2. Évaluation de la toxicité aiguë

2.1. Animaux expérimentaux

Les souris suisses (25-30 g) ont été utilisées tout au long de l'étude. Ils ont été élevés dans le centre des animaux à la Faculté de médecine et de pharmacie, l'Université Mohammed V à Rabat. Tous les animaux ont été maintenus dans une pièce maintenue dans des conditions environnementales contrôlées de 23 ± 1 °C et de 12 heures de cycle d'obscurité et ont librement accès à de l'eau et à un régime alimentaire standard. Les animaux soumis à l'administration orale d'extraits ou de médicaments ont été mis à jeun pendant 16 h avant l'expérience.

2.2. Méthode

Pour la détermination de la toxicité aiguë par la voie orale, les souris suisses femelles et mâles d'un poids compris entre 20-30 g sont utilisées pour cette étude, exempt d'organismes pathogènes spécifiques. Elles sont mises à jeun 14 h avant le test. L'extrait aqueux d'*A.unedo* est administré à l'aide d'une sonde gastrique à la dose maximale de 2 g/kg (OCDE), à raison de 0,5 mL/ 20 g de poids corporel de souris.

Les animaux doivent être observés individuellement quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance.

3. Activités antidiabétiques *in vivo*

3.1. Induction du diabète expérimental

Le diabète a été induit chez les souris mâles à jeun par injection intrapéritonéale (IP) du nicotinamide à une dose de 210 mg / kg p.c avant injection IP d'une solution fraîchement préparée de STZ à une dose de 200 mg / kg p.c. Après une semaine, les animaux ayant des taux plasmatiques de glucose supérieurs à 126 mg / dL ont été inclus dans l'étude.

3.2. Evaluation des effets antidiabétiques

Après l'installation du diabète chez les souris, ces derniers sont répartis en différents groupes : Groupes des normaux témoins ; Groupes des diabétiques témoins ; Groupes des diabétiques traités par la metformine à une dose de 300 mg / kg p.c ; Groupes des diabétiques traités par l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* testé à une dose de 500 mg / kg p.c.

Les animaux ont été traités pendant 30 jours. La glycémie et le poids corporel ont été mesurés chaque semaine. À la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés pour la détermination des paramètres biochimiques et l'évaluation histopathologique du pancréas.

3.2.1. Évolution du poids corporel

Afin de déterminer l'influence de notre extrait sur le poids corporel et la croissance des souris, nous avons suivi l'évolution du poids corporel, des souris témoins et traitées, périodiquement tout au long de l'expérimentation.

Le poids corporel est mesuré à l'aide d'une balance en gramme (g) et les variations du poids corporel des souris par rapport au 1er jour sont exprimées en pourcentage (%) et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Variation du poids corporel (\%)} = (PJ - PJ0) \times 100 / PJ0$$

PJ0 : poids corporel au 1er jour ;

PJ : poids corporel au jour J.

3.2.2. Détermination des paramètres biochimiques

Les échantillons de sang ont été obtenus par la méthode de ponction de plexus rétro-orbitaire en utilisant des tubes capillaires. Les échantillons de sang ont été centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 min à 4 °C et le plasma résultant a été stocké à - 4°C jusqu'à l'analyse. Les paramètres biochimiques triglycérides, urée, créatinine, acide urique, protéine totale, cholestérol, ASAT et ALAT ont été déterminés à l'aide d'un auto-analyseur Abbott Architect c8000, conformément aux instructions du fabricant.

3.3. Collecte et traitement des tissus pour examen

Les procédures histologiques ont été réalisées comme décrit par (Mota et al., 2015) ; de chaque animal sacrifié, un fragment de pancréas prélevé sur la queue pancréatique a été fixé dans 10% de formol tampon neutre. Des tranches de 2 à 3 mm d'épaisseur ont été découpées à

partir d'échantillons de tissus fixes avec une lame chirurgicale et traitées de manière routinière pour obtenir des blocs de tissus intégrés au paraffin. Des sections de 5 µm d'épaisseur ont été traitées à l'aide d'un microtome rotatif et colorées avec de l'hémotoxyline et de l'éosine avant l'observation sous microscopie optique pour examen histopathologique.

4. Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo*

4.1. Préparation des homogénats

La première étape consiste à couper le tissu en petits morceaux, en préparant 10% (p/v) avec le tampon phosphate (0,05M, pH 7,4), puis pré-homogénéiser avec un potier. La deuxième étape consiste à préparer l'homogénat avec un sonicateur et à le centrifuger 3000tr de celui-ci pendant 10 min à 4 °C. Enfin, la dernière étape consiste à collecter le surnageant et à faire des aliquots que nous avons conservé à -20 °C pour l'étude.

4.2. Activité du superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines. Elles sont en première ligne dans le système de défense du stress oxydant. Elles assurent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.

La mesure de l'activité SOD a été déterminée dans les tissus par la méthode de(Beauchamp and Fridovich, 1971).Le mélange de dosage contenait (par litre) : 50 mM de tampon phosphate (pH 7,2), 0,25% triton x-100, 10 mM EDTA (pH 8), 120 mM L-Méthionine, 0,75 mM NBT et 10 µM de riboflavine a été ajouté à la fin de la réaction.

La réaction a été effectuée à 25 ° C et une lampe de 15W pendant 10 min dans un incubateur. L'absorption est lue à 560 nm, l'activité SOD a été mesurée d'après selon l'équation suivante d'après (Sun et al., 1988).

$$\text{Inhibition\%} = (\text{A blanc} - \text{Un échantillon} / \text{A blanc}) \times 100$$

SOD une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme requise pour inhiber de 50% la réduction de NBT).

4.3. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. La peroxydation des lipides dans le foie et les reins est évaluée par le dosage de

malondialdéhyde (MDA) selon la méthode d' (Ohkawa et al., 1979). Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 535 nm). Le principe de cette méthode est résumé ainsi (*figure 18*) :

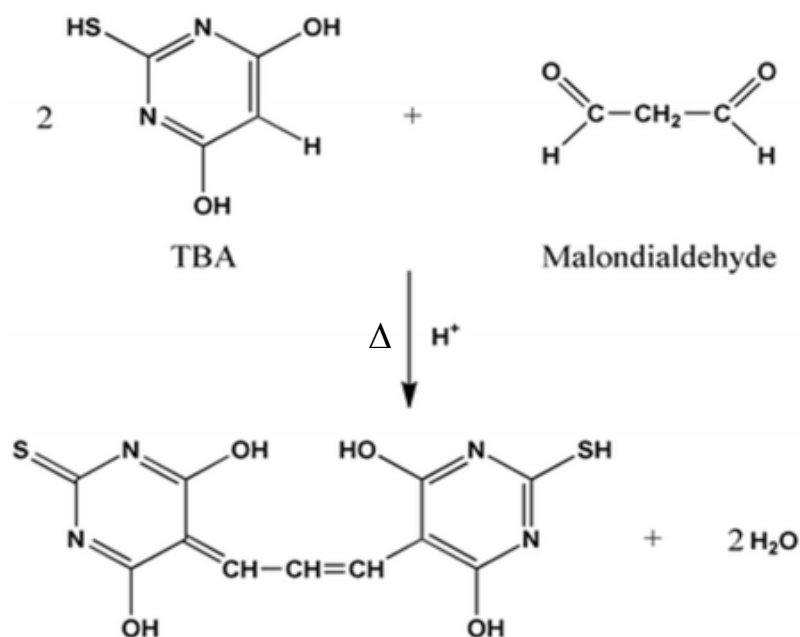


Figure 18: Principe du dosage du malondialdéhyde

Pour le dosage du MDA, 100 μ L de l'homogénat 300 μ L d'acide trichloracétique (TBA ; 0,6%) et 700 μ L d'acide phosphorique (1%) sont additionnés. Le mélange est chauffé à 95 °C pendant 30 minutes, refroidi puis additionné de 2 mL du n-butanol à chaque tube et les tubes ont été soumis à un vortex pendant 20 s, puis centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 minutes, l'absorbance est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 535 nm. Les résultats du dosage sont exprimés en nmol/gramme de tissu.

5. Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types. Les différences entre les moyennes ont été déterminées par une analyse de variance unidirectionnelle suivie du test de Bonferroni à l'aide du logiciel GraphPadPrism 5 (San Diego, CA, USA). La valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative dans toutes les expériences.

III. Résultats

1. Activités antidiabétiques *in vitro*

Le pouvoir inhibiteur de l' α -glucosidase et de l' α -amylase de l'extrait aqueux d'*A. unedo* et de l'acarbose est présenté dans le tableau 7. L'effet inhibiteur de l' α -glucosidase a été plus remarquable que l'effet de l' α -amylase, avec une IC_{50} de $94,81 \pm 5,99 \mu\text{g/mL}$ et $730,15 \pm 0,25 \mu\text{g / mL}$, respectivement, et significativement plus puissant que la molécule d'acarbose ($P < 0,05$) avec une IC_{50} de $199,53 \pm 1,12 \mu\text{g / mL}$ et de $396,42 \pm 5,16$ respectivement pour les deux enzymes.

Tableau 7: Effet d'extraits aqueux d'*A.unedo* sur les activités de l' α -amylase et de l' α -glucosidase

| | $IC_{50}(\mu\text{g/mL})$ | |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | α -amylase | α -glucosidase |
| Extrait aqueux d' <i>A. unedo</i> | 730.15 ± 0.25 | 94.81 ± 5.99 |
| Acarbose | 396.42 ± 5.16 | 199.53 ± 1.12 |

2. Toxicité aigue

Aucun signe de toxicité aiguë ou de mortalité à la dose (2000 mg / kg p.c) après 15 jours d'observation n'a été observé. Les animaux traités n'ont montré aucun changement dans leur comportement. Ainsi, aucun changement pathologique indésirable n'a été enregistré.

3. Activité antidiabétique *in vivo*

3.1 Effet anti-hyperglycémiant

Les effets de l'extrait aqueux et de la metformine utilisé comme témoin positif, sur la glycémie chez les souris diabétiques sont présentés dans le tableau 8. Après une semaine, aucune différence statistique n'a été observée entre les concentrations de glucose sanguin des souris diabétiques témoins et les souris diabétiques traitées avec l'extrait étudié ou avec la metformine ($P > 0,05$). Après deux semaines de traitement par l'extrait aqueux d'*A.unedo*, une

diminution significative de la glycémie a été observée ($P < 0,05$); la valeur de la glycémie exposée était similaire à celle montrée par les souris traitées à la metformine, mais toujours plus élevée que celle des animaux normaux. Après 30 jours, la glycémie des animaux traités avec l'extrait testé a diminué pour atteindre celle des animaux normaux et des souris traitées à la metformine. Ainsi, l'extrait aqueux d'*A.unedo* a exercé une activité anti-hyperglycémique notable similaire à celle de la metformine.

Tableau 8: Effet de l'extrait des racines d'*A.unedo* sur la glycémie à jeun chez les souris rendues diabétiques par la STZ

| Taux de glycémie à jeun (mg / dL) | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Groupes | 7 ^{ème} jour | 14 ^{ème} jour | 30 ^{ème} jour |
| Normaux non Traités | 97.83±4.40 ^a | 101.67±5.43 ^a | 99.83±1.47 ^a |
| Diabétiques non Traités | 250.33±11.71 ^b | 280.17±32.41 ^c | 196.83±24.12 ^b |
| Diabétiques Traités par EA _{AU} (500mg/kg) | 237.00±39.91 ^b | 135.00±13.64 ^b | 104.83 ±5.04 ^a |
| Diabétiques Traités par la metformine (300mg/kg) | 253.17±29.47 ^b | 143.83±20.27 ^b | 104.67±4.08 ^a |

Une même lettre est affectée aux valeurs de la même ligne qui ne présente pas une différence significative ($P > 0,05$).

3.2. Effet sur le poids corporel

Le poids corporel de tous les groupes d'animaux aux 7^{ème}, 14^{ème} et 30^{ème} jours du traitement est présenté dans le tableau 9. Au cours de la première et deuxième semaine, aucun changement n'a été observé parmi les groupes ($P > 0,05$). Au 30^{ème} jour, une diminution significative du poids corporel des animaux diabétiques non traités (de $32,72 \pm 1,67$ g du jour 7 à $23,57 \pm 1,11$ g au jour 30) a été observée par rapport aux animaux normaux ($P < 0,05$). En d'autres termes, les souris témoins diabétiques ont subi une perte de poids significative (29,15%) pendant toute la période expérimentale par rapport à leur poids initial, alors que les souris normales prenaient du poids (9,97%) et les souris traitées ont maintenu un poids stable par rapport à leur poids initial. Les groupes d'animaux diabétiques traités avec l'extrait aqueux d'*A. unedo* et ceux traités avec la metformine ont eu un changement de poids corporel comparable pendant la période expérimentale. En effet, du 7^{ème} au 30^{ème}, les deux groupes d'animaux traités ont un poids corporel relativement constant. De plus, comme le montre le tableau 11, une comparaison du poids corporel de tous les groupes au 30^{ème} jour montre une différence significative entre les animaux diabétiques non traités et les groupes traités avec l'extrait étudié et la metformine ($P < 0,05$).

Tableau 9: Effet d'*A.unedo* sur le poids corporel des souris rendues diabétiques par la STZ

| Poids corporel (g) | | | |
|---|-----------------------|------------------------|---------------------------|
| Groupes | 7 ^{ème} jour | 14 ^{ème} jour | 30 ^{ème} jour |
| Normaux non Traités | 32.37 ± 1.35 | 33.33 ± 1.68 | 35.60 ± 0.60 ^c |
| Diabétiques non Traités | 32.72 ± 1.67 | 31.91 ± 2.43 | 23.57 ± 1.11 ^a |
| Diabétiques Traités par EA _{AU} (500mg/kg) | 32.80 ± 1.44 | 32.33 ± 1.22 | 32.50 ± 1.24 ^b |
| Diabétiques Traités par la metformine(300mg/kg) | 32.43 ± 1.48 | 31.70 ± 1.29 | 31.21 ± 1.67 ^b |

Une même lettre est affectée aux valeurs de la même ligne qui ne présente pas une différence significative ($P > 0,05$).

3.3. Effet sur les paramètres biochimiques

Les agents thérapeutiques utilisés dans l'induction et le traitement des maladies diabétiques devraient également influencer l'ASAT, l'ALAT, le cholestérol total, les triglycérides et l'acide urique (Chen et al., 2007). Les effets de l'extrait aqueux d'*A.unedo* sur ces paramètres biochimiques ont été étudiés et les résultats sont présentés dans le tableau 10.

D'après les résultats obtenus, nous n'avons noté aucune différence statistique entre tous les groupes ($P > 0,05$) au niveau de taux des protéines totales, l'urée, le cholestérol total et l'acide urique. Contrairement aux animaux témoins diabétiques, qui présentent les taux de créatinine les plus élevés (3,83 mg/L), les animaux traités avec l'extrait étudié et avec la metformine présentent des concentrations plus faibles (3,66 mg/L) statistiquement semblables aux taux de créatinine chez les animaux normaux.

Concernant les triglycérides, les souris diabétiques non traitées présentent le taux le plus élevé (1,29 g / L). De plus, le taux de triglycérides chez les animaux traités avec l'extrait aqueux d'*A.unedo* était de 0,70 g / L, statistiquement similaire à celui du contrôle normal à 0,60 g / L ($P > 0,05$). En comparaison, le niveau présenté par les animaux traités à la metformine a été supérieur à celui des témoins normaux ($P < 0,05$).

Concernant le taux d'ASAT, les résultats ont montré que le contrôle normal et les souris diabétiques traitées avec l'extrait testé sont presque égaux (137,17 et 135,5 UI / L, respectivement), tandis que les souris traitées à la metformine ont un niveau supérieur à ces 2

groupes. Le niveau d'ASAT des souris témoins diabétiques est le plus élevé parmi les groupes avec une valeur de 389,67 UI / I.

De même, les niveaux d'ALAT du contrôle normal et les souris diabétiques traitées avec l'extrait testé présentent presque les mêmes niveaux (40,67 et 41,50 UI / I, respectivement), mais il n'y a pas de différence significative entre eux et les souris traitées avec la metformine (50,67 UI / I) ($P > 0,05$). On constate que les animaux diabétiques présentent le taux d'ALAT le plus élevé.

Tableau 10: Effets de l'extrait d'*A. unedo. L* sur des paramètres biochimiques sur des souris diabétiques induites par le STZ

| Groupes / Paramètres | Normaux non Traités | Diabétiques non Traités | Diabétiques Traités par EA _{AU} | Diabétiques Traités par la metformine |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|--|---------------------------------------|
| Protéines totaux | 62.33 ± 8.24 ^a | 57.17 ± 6.55 ^a | 62.83 ± 7.60 ^a | 55.17 ± 4.71 ^a |
| Urée mg/dL | 0.28 ± 0.06 ^a | 0.32 ± 0.07 ^a | 0.23 ± 0.03 ^a | 0.31 ± 0.09 ^a |
| Cholestérol g/L | 1.03 ± 0.19 ^a | 1.09 ± 0.13 ^a | 0.90 ± 0.11 ^a | 1.07 ± 0.16 ^a |
| Creatinine mg/L | 3.83 ± 0.41 ^a | 4.66 ± 0.52 ^b | 3.83 ± 0.41 ^a | 3.66 ± 0.52 ^a |
| Triglycéride g/L | 0.60 ± 0.07 ^a | 1.29 ± 0.17 ^c | 0.70 ± 0.23 ^{a,b} | 0.90 ± 0.34 ^b |
| Acide urique mg/L | 26.00 ± 5.37 ^a | 26.60 ± 3.36 ^a | 27.33 ± 5.16 ^a | 30.00 ± 5.48 ^a |
| ASAT UI/I | 137.17 ± 28.39 ^a | 389.67 ± 142.43 ^c | 135.50 ± 26.44 ^a | 283.17 ± 54.87 ^b |
| ALAT UI/I | 40.67 ± 6.02 ^a | 315.00 ± 120.10 ^b | 41.50 ± 4.42 ^a | 50.67 ± 8.02 ^a |

Une même lettre est affectée aux valeurs de la même ligne qui ne présente pas une différence significative ($P > 0,05$).

3.4. Étude histologique

La structure du pancréas des souris témoins et des souris diabétiques traitées est présentée sur la figure 19. Le pancréas des animaux témoins normaux a montré des acini pancréatiques (PA) présentant un aspect histologique normal et des espaces inter-acini et interlobulaires normaux. De plus, l'îlot de Langerhans était normal et présentait un nombre normal de noyaux de cellules et uniformément répartis dans l'îlot et espacés les uns des autres par des cytoplasmes et des bordures de cellules indistinctes, homogènes et amorphes (*figure 19A, flèche F2*). Les noyaux cellulaires étaient ronds et de taille moyenne avec suffisamment de chromatine finement granulaire (*figure 19A, flèche F1*).

Concernant le pancréas du groupe diabétique non traité, figure 19.B a montré des acini pancréatiques, des canalicules pancréatiques et des vaisseaux sanguins avec une architecture et une structure histologique normale, tandis que les îlots de Langerhans ont présenté une hypercellularité marquée et une distribution cellulaire désorganisée avec des cellules disposées et emballées sous forme d'agrégats cellulaires en particulier à la périphérie des îlots (*flèche F1*). Les noyaux cellulaires étaient ronds et ovales avec une taille relativement accrue et présentaient un aspect clair et vacuolaire (*flèche F2*). De plus, le cytoplasme et les limites des cellules indistinctes sont considérés comme une matrice intercellulaire dense et fragmentée (*flèche F3*).

En ce qui concerne le pancréas des animaux traités par la metformine, la figure 19C montre des canalicules pancréatiques, des vaisseaux sanguins et des acini pancréatiques avec un aspect histologique normal. Les îlots de Langerhans ont des changements similaires à ceux décrits pour le pancréas des souris diabétiques non traitées. Le pancréas des animaux diabétiques traités avec AEAU, comme celui du témoin normal, a montré des acini pancréatiques présentant des espaces inter-acini et un aspect histologique normal. Les îlots de Langerhans étaient également normaux, avec un nombre normal de cellules uniformément réparties dans l'îlot et espacées les unes des autres par un cytoplasme et des bordures de cellules indistinctes, homogènes et amorphes (*figure 19D, flèche F*). Les noyaux cellulaires étaient ronds et de taille moyenne avec suffisamment de chromatine finement granulaire (*figure 19D*). En outre, un traitement avec l'extrait aqueux d'*A.unedo* (500 mg / kg de poids corporel) semblait augmenter le nombre d'îlots par rapport à celui des animaux diabétiques.

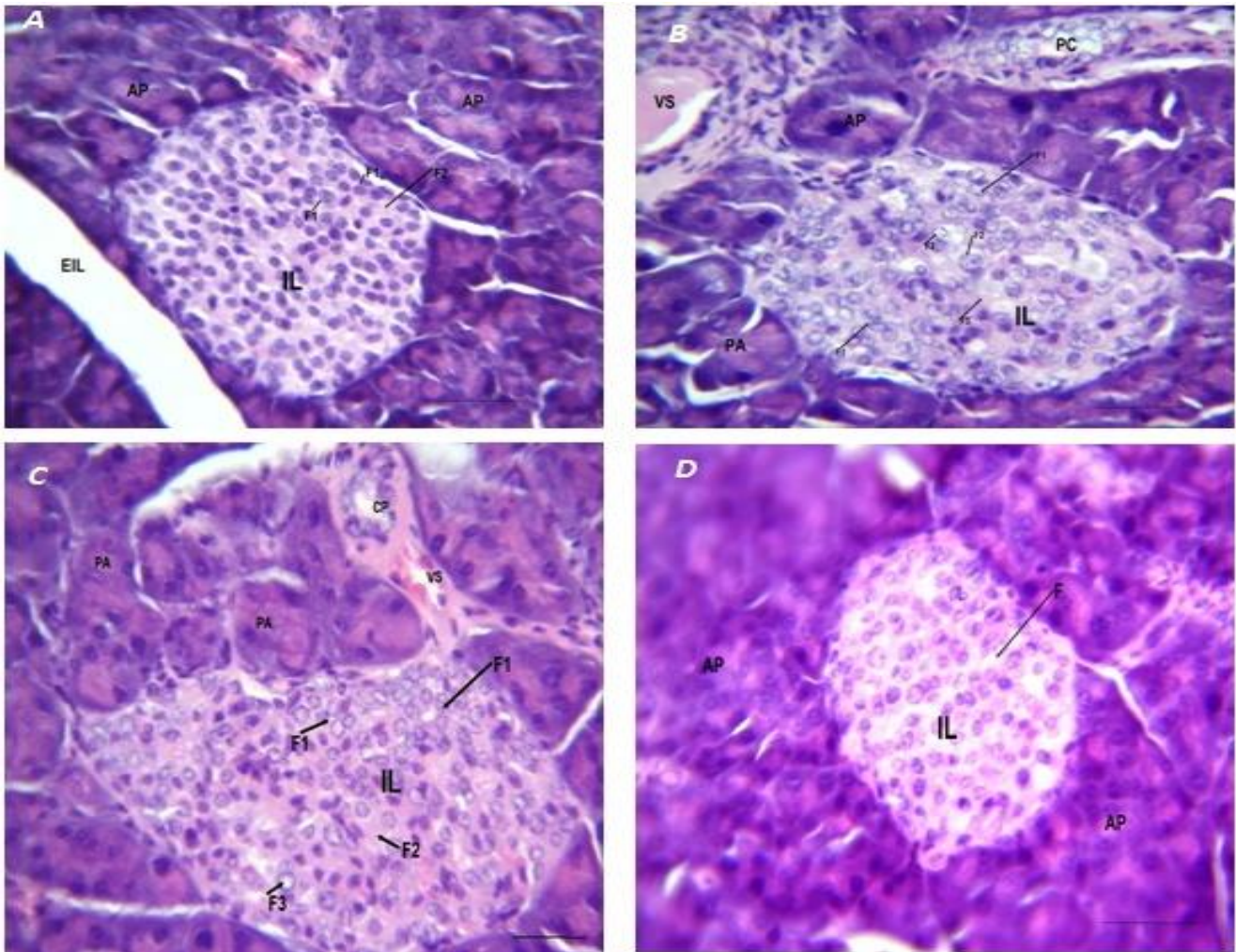


Figure 19: Examens histologiques du pancréas de souris au 30^{ème} jour d'expérimentation

(A) Pancréas de souris témoin normal montrant des cellules β normales abondantes réparties uniformément dans les îlots. (B) Pancréas de souris diabétique montrant un nombre accru de cellules β pancréatiques avec une distribution désorganisée. (C) Pancréas de souris diabétiques traitées à la metformine (300mg/kg), montrant des cellules β pancréatiques similaires à celles du contrôle diabétique. (D) Pancréas de souris diabétique traité par l'extrait aqueux des racines d'*A. unedo* (500 mg / kg), montrant des cellules β pancréatiques presque similaires en nombre et en distribution à celles du contrôle normal. (Les chiffres sont en grossissement 10x).

4. Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo*

4.1. Activité du superoxyde dismutase

L'activité enzymatique de la SOD sur les tissus hépatiques et rénaux (foie, rein) a significativement diminué chez les souris diabétiques non traités par rapport à celle mesurée chez les témoins normaux non traités ($p < 0,05$).

L'activité enzymatique de ce système antioxydant est conservée à son niveau normal chez le groupe diabétique traité par l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* et de la metformine n'ont aucune différence significative par rapport à celle obtenue avec les souris témoins normaux ($p > 0,05$). Les résultats obtenus sont enregistrés dans le tableau 11.

Tableau 11: L'effet d'*A.unedo* sur l'activité de Superoxyde dismutase

| Groupes SOD (U/g tissu) | Normaux non Traités | Diabétiques non Traités | Diabétiques Traités par EA _{AU} (500mg/kg) | Diabétiques Traités par la metformine (300mg/kg) |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|---|
| Foie | 927.775±93.864 ^a | 700.2±51.4 ^b | 918.5±89.5 ^a | 904.3±78.10 ^a |
| Rein | 842.030±56.996 ^a | 616.9±42.8 ^b | 841.8±92.3 ^a | 832.1±49.2 ^a |

Une même lettre est affectée aux valeurs de la même ligne qui ne présente pas une différence significative ($P > 0,05$).

4.2. Effet d'*A.unedo* sur la peroxydation lipidique

Le tableau 12 montre l'effet de l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* sur la variation du MDA dans les tissus hépatiques et rénaux chez les souris rendues diabétique par la STZ.

Nous avons constaté une élévation significative ($p < 0.001$) du MDA dans le foie et les reins des souris diabétiques non traités (0.503 ± 0.055 nmol ; 0.296 ± 0.058) respectivement par rapport au groupe témoin normal (0.105 ± 0.005 ; 0.019 ± 0.007 nmol). Par ailleurs, aucune variation significative du MDA n'est constatée chez les souris diabétiques traités par l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* et la metformine (leurs valeurs respectives 0.149 ± 0.027 nmol ; 0.055 ± 0.022 nmol et 0.141 ± 0.035 nmol ; 0.041 ± 0.011 nmol n'ont aucune différence significative avec celle obtenue avec le témoin normal). Ce résultat explique probablement la protection des animaux par *A.unedo* contre le stress oxydatif.

Tableau 12: L'effet d'*A.unedo* sur la production MDA dans les tissus hépatiques et rénaux

| Groupes MDA nmol/g de tissu | Normaux non Traités | Diabétiques non Traités | Diabétiques Traités par EAAU (500mg/kg) | Diabétiques Traités par la metformine (300mg/kg) |
|--|--------------------------------------|--|--|---|
| Foie | 0.105±0.005 ^a | 0.503±0.055 ^b | 0.149±0.027 ^a | 0.141±0.035 ^a |
| Rein | 0.019±0.007 ^a | 0.296±0.058 ^b | 0.055±0.022 ^b | 0.041±0.011 ^b |

Une même lettre est affectée aux valeurs de la même ligne qui ne présente pas une différence significative ($P > 0,05$).

IV. Discussion

Le diabète sucré est le résultat d'un déséquilibre dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, suivi d'une sécrétion d'insuline ou d'une action de l'insuline défectueuses ou des deux. Actuellement, sa gestion par extrait végétal est devenue une tendance, et plusieurs extraits végétaux sont dotés de propriétés hypoglycémiques considérables (Diniz et al., 2016; Helal et al., 2015).

L'évaluation de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux d'*A.unedo* confirme que son utilisation peut être saine et sans aucun effet indésirable, autre raison qui nous a poussé d'évaluer son activité hypoglycémiant réalisée en deux étapes : *in vitro* et *in vivo*.

La capacité de l'extrait aqueux à inhiber l' α -amylase et l' α -glucosidase a été testée. En fait, les deux enzymes ont été inhibées. Ce qui confirme que les composés responsables de l'activité antidiabétique de la racine sont extractibles dans l'eau, ce qui soutient l'utilisation traditionnelle de cette plante dans le traitement du diabète. En fait, plusieurs métabolites secondaires, tels que les terpénoïdes, les quinine libres et l'antraquinone, ont été examinés dans le chapitre précédent, d'autres, tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins, ont été quantifiés dans l'extrait aqueux de racine d'Arbousier. Son activité antioxydante a également été évaluée. L'effet inhibiteur sur l' α -glucosidase de certains de ces composés a été démontré par (Kumar et al., 2011) . De plus, l'activité antioxydante des composés phénoliques de l'extrait est également liée à leur effet hypoglycémique, qui agissent sur le diabète au niveau cellulaire en favorisant l'action de l'insuline (Kim et al., 2016). De plus, parmi les composés abondants déjà identifiés dans cet extrait, il y avait la catéchine (Castaldi et al., 2009), qui démontrait moins la capacité d'inhiber l' α -amylase que l' α -glucosidase (Yilmazer-Musa et al., 2015).

Dans la deuxième étape, l'induction du diabète de type 2 a été réalisée avec succès en utilisant la STZ et la nicotinamide, ce qui contribue à la destruction partielle des cellules bêta des îlots de Langerhans (Szkudelski, 2012). Les souris témoins diabétiques induites par STZ-nicotinamide présentaient une hyperglycémie significative par rapport aux souris normales. L'hyperglycémie pourrait également favoriser une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant une dégradation incontrôlée des tissus et présentant ainsi des complications diabétiques. Ainsi, la déficience en insuline peut s'accompagner d'une augmentation significative des triglycérides et du cholestérol total chez les souris diabétiques.

En fait, l'induction du diabète a influencé le poids et certains paramètres biochimiques des souris.

Une administration quotidienne d'extrait aqueux d'*A.unedo* a montré une diminution significative de la glycémie qui ressemble à celle du médicament standard au bout de 30 jours. Le mécanisme possible qu'*A.unedo* provoque son action hypoglycémique chez les souris diabétiques peut être en potentialisant l'effet insulinique du plasma en augmentant soit la sécrétion pancréatique d'insuline par les cellules bêta existantes, soit par sa libération de la forme liée (Shirwaikar et al., 2004) .

La perte de poids peut s'expliquer par l'inhibition de la croissance et l'atrophie musculaire, une conséquence possible de l'état diabétique. Cette perte de poids chez les animaux diabétiques est probablement due à une carence en insuline, ce qui entraîne une diminution de l'absorption des acides aminés par les tissus et une diminution de la synthèse des protéines, ce qui freine la croissance et entraîne une atrophie musculaire (Vasudevan and Sreekumari, 2007) . Des études suggèrent que la perte de poids chez les souris diabétiques peut s'expliquer par un catabolisme accru des lipides et des protéines dû au manque de glucides à utiliser pour l'énergie (Sathishsekar and Subramanian, 2005). La diminution du poids corporel dans le diabète sucré est également attribuée à la stimulation de la gluconéogenèse. En effet, l'accélération du catabolisme des protéines et des graisses conduit à une perte de poids caractéristique après une augmentation de l'atrophie musculaire et une perte de protéines tissulaires (Daisy and Jeeva Kani, 2012) .

Le traitement avec l'extrait de racine d'*A. unedo* a amélioré le poids corporel chez les souris diabétiques dans notre étude. La capacité de l'extrait aqueux de racine d'*A.unedo* à protéger contre la perte massive de poids corporel semble être due à sa capacité à réduire l'hyperglycémie, qui est une indication de l'utilisation adéquate du glucose (Pari and Satheesh, 2004), ainsi que son effet protecteur contre le contrôle du renouvellement des protéines et / ou l'amélioration des troubles associés au diabète sucré (Nutr et al., 2008; Oyedemi et al., 2012).

La perte de poids peut également être liée à la déshydratation de la créatine dans les cellules musculaires qui produisent de la créatinine. Cela sera éliminé dans l'urine. Le taux de créatinine dans le sang dépend de la capacité d'élimination des reins et de la masse musculaire. Cependant, la diminution de poids observée chez les souris non traitées peut expliquer l'augmentation de leur créatinine sanguine (Nutr et al., 2008). La concentration de créatinine est souvent considérée comme un paramètre clinique pour la détection des effets

toxiques liés au traitement des reins chez les animaux de laboratoire (Fuchs and Hewitt, 2011). Ceci justifie la quantification des paramètres de l'urée et de l'acide urique pour confirmer l'état sain des reins. Une réduction significative du taux de créatinine chez les souris diabétiques traitées avec l'extrait aqueux d'*A.unedo* a été notée pendant le protocole de 4 semaines. L'extrait aqueux d'*A.unedo* a amélioré les modifications rénales chez ce groupe de souris diabétiques, ou il a diminué le catabolisme de la créatine et de la phosphocréatine dans les muscles. Ces résultats concordent avec ceux de Shirwaikar et al., (2005).

Concernant le profil lipidique, le taux d'augmentation des triglycérides après induction du diabète corrobore les résultats obtenus dans d'autres études menées sur le diabète sucré. Le diabète sucré était associé à une hyperlipidémie qui a provoqué des perturbations profondes de la concentration et de la composition des lipides. En outre, comme indiqué ci-dessus, la carence en insuline entraîne l'incapacité d'activer la lipoprotéine lipase, provoquant ainsi hypertriglycémie et hypercholestérolémie (Shirwaikar et al., 2005) car l'insuline inhibe la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase (HMG-COA réductase), une enzyme clef dans la biosynthèse du cholestérol. Cependant, dans certains cas, une augmentation du cholestérol est liée à un diabète induit par la STZ et un régime riche en graisse (Antony et al., 2017). Ce test a été réalisé sur des souris ayant un faible poids comparé aux rats hypercholestérolémiques pendant l'induction du diabète ; par conséquent, aucune anomalie du taux de cholestérol n'a été observée.

Les résultats obtenus dans notre étude n'ont révélé aucune différence dans la protéinémie dans tous les groupes. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de plusieurs autres études (Daisy et al., 2009; Luke et al., 2013; Rawi et al., 2011; Sivajothi et al., 2008), qui ont montré une diminution significative des taux de protéines. Ces études ont suggéré que la diminution des niveaux de protéines totaux peut être due à plusieurs facteurs, tels qu'une augmentation de la conversion et une augmentation de la conversion du taux d'acides aminés glycoéniques avec CO₂ et H₂O. De même, un autre groupe de chercheurs indiquent un qui a expliqué la diminution des niveaux de protéines totales en diminuant la quantité et la disponibilité de l'ARNm, réduisant ainsi la synthèse des protéines ribosomiques en raison de la carence en insuline (Rawi et al., 2011). Cette différence pourrait être expliquée par le fait que nous n'avons pas donné suffisamment de temps pour mieux voir les conséquences de l'hyperglycémie sur d'autres fonctions physiologiques et sur l'altération d'autres métabolismes, notamment lipidiques et protéiques, intimement liés au métabolisme des glucides.

L'augmentation de l'ASAT et de l'ALAT retrouvée dans cette étude peut être interprétée comme une conséquence de la destruction des cellules hépatiques ou des changements de perméabilité membranaire, indiquant une altération hépatocellulaire sévère induite par le diabète (El-Demerdash et al., 2005; Harris, 2005; Kade et al., 2009).

Il y a une amélioration notée dans les niveaux d'ASAT et d'ALAT qui résultent de l'amélioration du métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des protéines due à la thérapie de l'extrait aqueux d'*A.unedo*. La restauration de l'ASAT et de l'ALAT à leurs niveaux normaux pourrait être due à la présence de flavonoïdes dans l'extrait aqueux d'*A.unedo*, qui seraient des agents hépatoprotecteurs (Sivajothi et al., 2008). En ce qui concerne les modifications pathologiques observées chez les souris diabétiques non traitées (hypercellularité et répartition inégale des cellules au îlots de Langerhans), le traitement par la metformine, bien qu'il soit associé à une glycémie normale, n'a pas permis de restaurer l'architecture histologique normale des îlots de Langerhans. Cependant, le traitement avec l'extrait testé a entraîné une glycémie normale et régulée et la restauration de l'architecture et de la structure normales des îlots de Langerhans. Cela peut être considéré comme une régénération bien régulée et harmonisée de la population de cellules des îlots de Langerhans, suggérant ainsi la présence de cellules stables avec une capacité de régénération dans les îlots (De Fronzo et al., 1997).

Ceci suggère également que l'extrait de plante à la dose testée a la capacité d'induire des cellules quiescentes à proliférer et à remplacer les cellules perdues de manière harmonieuse et régulée. Le mécanisme exact de ce processus n'est pas entièrement compris, mais la fraction flavonoïde de cet extrait de plante a été documentée pour diminuer la glycémie et augmenter le nombre de cellules β (Chakravarthy et al., 1980). Bien que le mécanisme exact reste inconnu, il est évident que l'extrait aqueux d'*A.unedo* est capable de provoquer la régénération des cellules β pancréatiques à une dose de 500 mg / jour par kg de poids corporel par ses constituants actifs agissant individuellement ou ensemble.

L'effet d'*A.unedo* sur les souris a dépassé l'activité antidiabétique à une protection antioxydante. En fait, le test de l'effet antioxydant *in vivo* de l'extrait aqueux d'*A. unedo* a montré des résultats pertinents.

Les résultats obtenus du dosage des superoxydes dismutases (SOD) qui est une composante essentielle du mécanisme d'élimination des radicaux libres ; tendent à être similaires à ceux rapportés (Harani et al., 2012). La tendance à la baisse de l'activité SOD

peut être dû à l'inactivation causée par l'excès de radicaux libres et / ou par la glycation non enzymatique due à l'hyperglycémie persistante, qui a été largement rapportée à se produire dans le diabète (Maritim et al., 2003; Rains and Jain, 2011). Comme elle pourrait être également un excès de disponibilité d'O₂ et H₂O₂, qui, à son tour génère des radicaux hydroxyles, entraînant l'initiation et la propagation de la peroxydation lipidique (Kinalski et al., 2000; Maritim et al., 2003). Dans notre étude, on a observé une diminution de l'activité SOD dans le foie et les reins de souris diabétiques associées à une augmentation concomitante de la peroxydation lipidique dans ces tissus. Corroborant avec d'autres études qui ont démontré que l'activité des enzymes antioxydantes, telles que la SOD est réduite dans les tissus des rats diabétiques. Cela peut entraîner un certain nombre d'effets délétères dus à l'accumulation des ROS (Stevens, 2005).

La quantification de l'effet antioxydant de l'extrait aqueux *in-vivo* a été aussi évaluée par le dosage du malondialdéhyde qui est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Des preuves abondantes ont démontré que l'augmentation de la peroxydation lipidique joue un rôle important dans la progression du diabète en modifiant le gradient de fluidité de la couche intermédiaire, ce qui pourrait entraver les activités des enzymes et des récepteurs membranaires (Dmitriev and Titov, 2010; Giacco and Brownlee, 2010). Des études où une augmentation de la peroxydation lipidique dans de nombreux tissus tels que le foie, les reins, le pancréas et le cerveau de rats soumis à un modèle expérimental de diabète a été décrite (Maritim et al., 2003; Punithavathi et al., 2011). La peroxydation lipidique favorise le potentiel membranaire, l'augmentation de la perméabilité et la rupture cellulaire (Esteghamati et al., 2013). A cet égard, l'oxydation des lipides ou la peroxydation des lipides a une importance cruciale dans la pathogenèse et les complications du diabète.

Les résultats obtenus suggèrent qu'*A.unedo* peut renforcer le système de défense enzymatique antioxydant, réduire les radicaux libres et atténuer les dommages au foie et aux reins causés par le stress oxydatif chez les souris diabétiques.

V. Conclusion

L'extrait de la plante *A.unedo* a eu des effets bénéfiques potentiels sur l'abaissement de la glycémie chez les souris diabétiques, justifiant ainsi les revendications folkloriques. Cet extrait a été capable d'ajuster certains paramètres biochimiques sériques, en particulier les niveaux de triglycérides, ASAT et ALAT. Il a également provoqué une restauration de l'architecture histologique des îlots de Langerhans. De plus, un effet inhibiteur prometteur sur l' α -glucosidase et l' α -amylase a été démontré par l'extrait étudié. Par conséquent, les résultats de cette étude suggèrent que l'extrait de racine d'*A.unedo* pourrait être considéré comme une alternative dans le traitement du diabète sucré et gérer le stress oxydant accompagnant. D'autres études sont nécessaires pour identifier la ou les molécules bioactives responsables de l'effet antidiabétique obtenu de la racine d'*A.unedo* et pour mieux comprendre le mécanisme de son action.

Chapitre 4

Chambre Ussing : Mécanisme hypoglycémiant

I. Introduction

Une activité hypoglycémiant remarquable a été démontrée dans le chapitre précédent, à la fois *in vitro* ou *in vivo*. Cette étude pourra être approfondit par l'élucidation d'un mécanisme expliquant cette activité. Toutefois, l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase ; deux enzymes qui agissent au niveau d'intestin ; oriente l'étude à penser à un mécanisme qui se produit au niveau de ce dernier. C'est pour cette raison que nous avons pensé à évaluer l'absorption intestinale du glucose en utilisant la chambre Ussing.

Cette chambre a été créée en 1950 par Hans Ussing, dans le but d'étudier le flux des ions Na^+ à travers une peau de grenouille afin de déterminer sa part d'implication dans le potentiel membranaire (Mathieu et al., 2008). Par la suite, cette technique a été adaptée pour étudier le transport de molécules à travers les barrières physiologiques de différentes natures telles que l'épithélium intestinal (Schultz and Zalusky, 1964). Les chambres d'Ussing représentent un système *in vitro* actuellement utilisé dans le domaine pharmaceutique car il permet de déterminer assez aisément la perméabilité intestinale des molécules actives ainsi que d'identifier ses différentes composantes telles que la nature du transfert (passif ou actif), la présence et l'intensité d'éventuels mécanismes d'efflux, l'incidence du métabolisme entérocytaire sur les flux d'absorption, notamment (Brown and O'Grady, 2008; He et al., 2013).

La chambre d'Ussing permet également de mesurer en permanence les paramètres électriques caractéristiques de la préparation intestinale tels que la différence de potentiel (ddp) et l'intensité du courant de court-circuit (I_{sc}).

Ces charges électriques entre le coté muqueux et séreux de la membrane épithéliale sont mesurées à l'aide de circuit bien établi :

En circuit ouvert, la différence de potentiel (ddp) du tissu intestinal (exprimée en millivolts) reflète l'asymétrie des charges électriques de part et d'autre du fragment intestinal. Elle est mesurée par un millivoltmètre grâce à deux électrodes au calomel reliées aux deux demi-

chambres par deux ponts d'agar saturés en KCl baignant dans les compartiments muqueux, et séreux opposés. La ddp spontanée tissulaire est annulée en fermant le circuit à l'aide d'électrodes de courant en argent connectés à un micro-ampèremètre et reliées aux demi-chambres par deux autres ponts d'agar. On mesure ainsi un courant de court-circuit (I_{sc}) qui est exprimé en micro-ampères par unité de surface intestinale exposée.

Ce circuit est relié à un voltmètre à haute impédance (TBC-Biomécatronics SAS, France) qui fait aussi voltage-Clamp pour les mesures de courant de court-circuit. Toutes les mesures sont ensuite enregistrées de façon continue sur un ordinateur à l'aide d'un logiciel BiodacqSoft (TBC-Biomécatronics SAS, France) (figure 20).

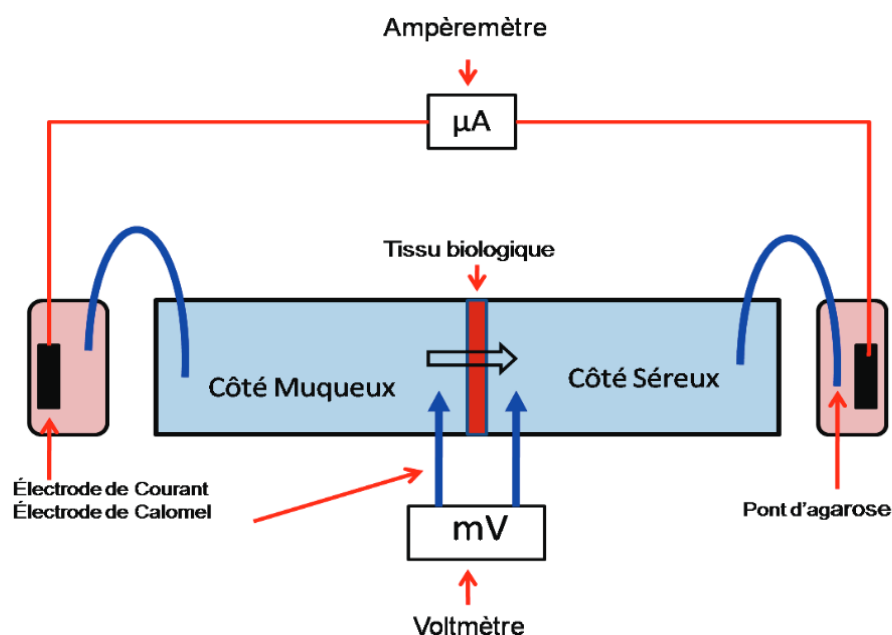


Figure 20: Schéma du principe de la chambre de perméation d'Ussing (Bruno ETO, 2011)

Avant le montage de la préparation intestinale et en présence de liquide de survie seul, l'annulation de la résistance générée par tous les constituants du système est nécessaire pour mesurer correctement les paramètres électriques caractéristiques du tissu intestinal étudié. Il s'agit de la résistance générée par les fluides, celle générée par les jonctions électriques et la solution physiologique. Toutes ces résistances sont annulées grâce au voltage clamp, de façon à avoir seulement la résistance générée par le Tissu d'intérêt.

L'extrait aqueux d'*A.unedo* est pris par voie orale, il passe par l'intestin avant d'être transporté par le système sanguin jusqu'au lieu où il doit agir. Ainsi, l'objectif de notre étude à vérifier si l'extrait d'*A.unedo* a une action sur l'absorption intestinale du glucose. Celle-ci est

déterminée par les paramètres électriques générés par le flux des ions à travers la paroi intestinale. C'est le courant de court-circuit ou I_{sc} encore nommé courant de base qui a été étudié. Une augmentation de l'intensité de ce courant traduit une absorption de cation(s) et/ou une sécrétion d'anion(s) par l'anthérocyte. Il représente la somme des flux ioniques nets qui traversent la membrane. Ce sont principalement, les flux nets de sodium, de chlorure et de bicarbonate.

$$I_{sc} = J = J_{Na+net} + J_{Cl-net} + J_{HCO_3-net} - J_{résiduel}$$

En d'autres termes, la migration de ces ions dans le milieu muqueux vers le milieu séreux et inversement va créer un courant (I) qui peut être mesuré par le système de voltage clamp. Ce courant est régi par la loi d'Ohm.

$$\text{Loi d'Ohm : } U = R \times I = (1/G) \times I$$

Avec : U = différence de potentiel (DDP) en millivolts (mV),

R = résistance du tissu,

I = intensité du courant, en microampère ($\mu A/cm^2$).

II. Matériel et méthodes

1. Appareillage

- ✓ Le système de chambre d'Ussing biomécatronics comprend un ensemble de deux demi- chambres, un support chauffant, et un humidificateur.
- ✓ Une bouteille de carbogène (O₂/ CO₂).

2. Solutions utilisées

- ✓ Solution physiologique de Ringer, dont la composition est la suivante : 115mM NaCl ; 25mM NaHCO₃ ; 1,3mM MgCl₂ ; 1,2mM CaCl₂ ; 2,4mM K₂HPO₄ ; 0,4mM KH₂PO₄, a été utilisée comme solution de survie en chambre d'Ussing.
- ✓ Une solution de l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo*
- ✓ Une solution de glucose et une solution de mannitol de concentrations respectives de 25 mM ont été préparées chacune avec la solution physiologique de Ringer.
- ✓ Une solution de carbachol est préparée pour avoir une concentration finale de 10⁻⁴M dans les chambres. Cette solution sert à stimuler le canal des ions chlorures (Cl⁻).
- ✓ Une solution de Phloridzine (PHZ) est aussi préparée pour obtenir une concentration finale de 10⁻⁵M dans les chambres d'Ussing. La phloridzine est inhibiteur compétitif du Co- transporteur Na⁺ /glucose(SGLT).

Toutes ces molécules de références viennent de l'entreprise Sigma-Aldrich, France.

3. Animal

Les modèles animaux utilisés sont les souris mâles de souche C57BL/6JRJ. Elles proviennent de la société d'Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle France).

4. Extraction du matériel végétal

Voir chapitre 2 (page : 66).

5. Préparation du tissu

Les souris sont mises à jeun pendant au moins 16h. Ensuite, elles sont sacrifiées par dislocation cervicale. Puis l'espace en dessous de la cage thoracique est ouverte à l'aide des ciseaux approprié en faisant très attention à ne pas abimer les viscères.

L'intestin grêle est composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, et fait suite à l'estomac. Le jéjunum est prélevé et placé dans du liquide physiologique de survie (solution de Ringer) et conservé à froid à 4°C.

6. Montage du tissu

Le jéjunum prélevé est coupé en petit bout d'environ 1cm. Le cylindre obtenu est ensuite ouvert longitudinalement le long de la bordure mésentérique. Le fragment de tissu ainsi obtenu est très délicatement étalé sur la surface d'échange de l'une des deux demi-chambres d'Ussing de façon à ce qu'une fois les demi-chambres réunies, le côté muqueux et le côté séreux du tissu étudié délimitent le point d'échange entre les deux demi-chambres. L'autre demi-chambre est superposée à la première et le tout est vissé par deux vices. De part et d'autre du tissu, les demi-chambres sont remplies de la solution de Ringer (4mL/demi-chambre). Ce liquide est tamponné à pH = 7,6 tempéré à 37° C. L'oxygénation du milieu est assurée par un bullage permanent de carbogène. Le carbogène est un mélange gazeux composé d'oxygène et de dioxyde de carbone dans les proportions 95% d'O₂ et 5% de CO₂.

7. Etude d'effet d'*A.unedo* sur l'absorption intestinale du glucose

Après la stabilisation des paramètres électriques des tissus, 25 mM de la solution de D-glucose a été introduit dans les compartiments muqueux 5min après l'introduction d'une solution de mannitol dans les mêmes concentrations dans les compartiments séreux pour éviter la pression osmotique engendrée par l'introduction du D-glucose dans le compartiment muqueux. Les variations des paramètres électriques sont ensuite relevées puis enregistrés sur l'ordinateur.

L'ajout du glucose côté muqueux induit une augmentation du courant de court-circuit (I_{sc}) qui atteint un palier et se stabilise. Ensuite différentes concentrations d'extrait d'*A.unedo* ont été introduit dans le compartiments côté muqueux, suivi de la phloridzine 10⁻⁵M.

En effet, la phloridzine est un inhibiteur du co-transporteur Na⁺/glucose. Son effet et celui du glucose (agoniste) sont considérés comme maximal sur le co-transporteur Na⁺/glucose.

8. Statistiques

Les résultats, montrés sur les figures annexées, sont rapportés en moyenne (M) de mesures plus l'écart type (M ± ET). Toutes les déterminations ont été faites avec une moyenne d'au moins de 7 morceaux de tissu (n). L'analyse de la variance a une voie été effectuée suivi du test de Dunnett grâce au logiciel GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc. CA 92037 USA).

III. Résultats

I. L'effet inhibiteur d'*A.unedo* sur l'absorption du glucose

Nous avons utilisé une technique de court-circuit dans la chambre d'Ussing pour caractériser l'effet de l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* sur le transport du glucose intestinal.

Une fois que la préparation a atteint un enregistrement stable de paramètres électriques, 25 mM de D-glucose a été ajouté au côté muqueux de la préparation afin de stimuler le transport de D - glucose couplé à Na⁺. L'augmentation de du courant de court-circuit (Isc) reflète l'absorption de sodium électrogène liée au glucose par le co-transporteur sodium-glucose 1(SGLT-1) (*figure 21A*).

La Figure 21B montre que lorsqu'on ajoute l'extrait d'*A.unedo* à différentes concentrations, on observe une réduction du courant de court- circuit (Isc). Cette réduction d'Isc est dose-dépendante. La concentration qui provoque l'inhibition maximale d'Isc est 1,5 mg/mL et représentait 80% de l'inhibition induite par 0,5 mM de phloridzine

L'introduction de concentrations cumulatives de l'extrait aqueux d'*A.unedo* a provoqué une réduction du courant de court- circuit (Isc) en état basal avec une IC₅₀ = 216,8 ± 4,1 µg / mL comme le montre la figure 21C.

L'ajout de la phloridzine à la fin de chaque expérience inhibe complètement le SGLT1; cela permet d'exprimer le résultat en% d'inhibition maximale d'Isc. Cette méthode permet de réduire le coefficient de détermination de différentes valeurs pour une meilleure expression des résultats.

L'effet inhibiteur de l'extrait aqueux brut d'*A.unedo* sur l'absorption de la muqueuse intestinale du glucose ne s'est pas révélé dépendant de la concentration de glucose, mais à la même concentration, l'inhibition électrogénique de l'absorption du glucose a été réduite de 2 fois du côté séreux du tissu.

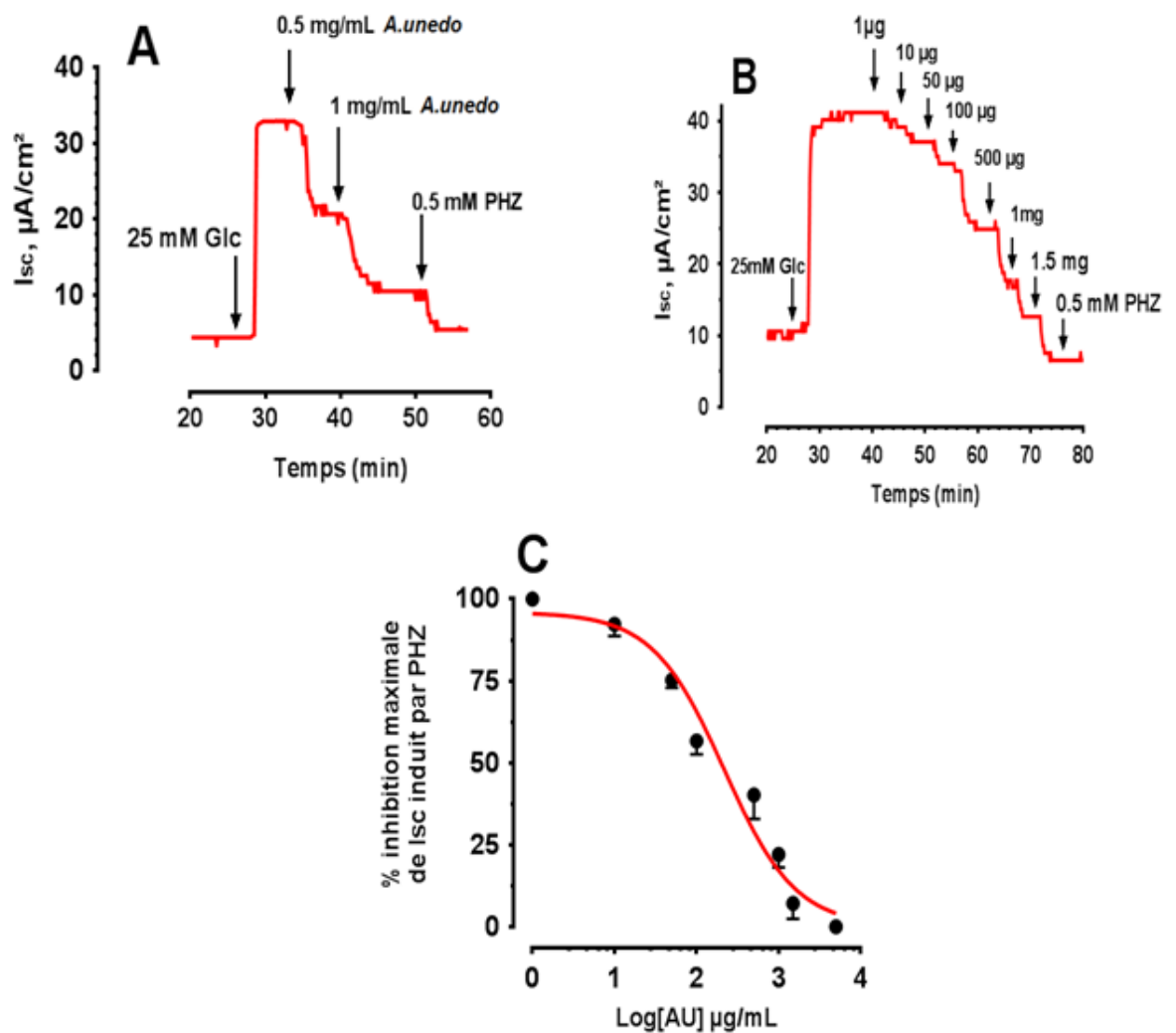


Figure 21: Effet de l'extrait aqueux d'*A. unedo* sur l'Isc induite par le glucose

(A) Enregistrement typique d'Isc ($\mu\text{A} / \text{cm}^2$); (B) Courbe réponse de concentration cumulative de l'extrait d'*A.unedo*; (C) L'inhibition de la concentration d'Isc induite par le glucose est exprimée en % de l'effet maximal induit par 0,5 mM de phloridzine (PHZ); $n = 6-7$ tissus étudiés.

IV. Discussion

Le résultat de la présente étude indique que l'extrait aqueux des racines d'*A. unedo* inhibe directement l'absorption intestinale de glucose par voie électrogène. Ces résultats concordent avec l'inhibition ou la réduction de l'absorption intestinale du glucose en tant que nouvelle stratégie de traitement du diabète.

En effet, l'extrait brut aqueux d'*A.unedo* utilisé dans cette étude ont une composition riche en polyphénols dont certains ont fait preuve de leur potentiel bénéfique dans l'amélioration de la glycémie du diabète de type 2 (Kim et al., 2016) parmi lesquels la quercétine (Harbilas et al., 2009; Spoor et al., 2006). De nombreuses études ont montré que ce polyphénol à une action hypoglycémiant très impressionnante (Dhanya et al., 2017; Piyasi and Prajapat, 2015). C'est aussi le cas du resvératrol, autre polyphénol dont les effets bénéfiques ont été démontré dans bon nombre de pathologies dont le diabète, a montré son potentiel dans l'inhibition du l'alanine et le glucose au niveau intestinal (Klinger and Gerhard, 2018). De même, la phloridzine un autre polyphénol utilisé ici comme témoin positif, diminue ou inhibe l'absorption du glucose intestinal (Johnston et al., 2005; Kwon et al., 2007) en interférant avec le co-transporteur du glucose (Na^+ /glucose)(Kanda et al., 2017; Ohgaki et al., 2016).Il a été noté que les concentrations micromolaires de phlorizine inhibaient le transport du sucre dans le rein et l'intestin grêle (Francisco and Robert, 1962) tandis que des concentrations plus élevées interféraient avec le métabolisme aérobie et produisaient un gonflement mitochondrial (Keller and Lotspeich, 1959). Francisco et Robert ,1962 ont démontré que la phloridzine bloque l'absorption du glucose par inhibition compétitive pour un site de transport sur un support dans les membranes de la bordure en brosse. Ses applications cliniques sont limitées car la phloridzine est moins efficace si elle est administrée par voie orale, probablement en raison de l'hydrolyse intestinale par la β -glucosidase (Malathi and Crane, 1969; Tsujihara et al., 1996). Des dérivés de la phlorizine ont été synthétisés et testés comme inhibiteurs du SGLT1 (Castaneda et al., 2007; Hongu et al., 1998). Dans une étude clinique incluant 86 participants adultes il a été démontré qu'un régime riche en polyphénol réduit la glycémie par une sécrétion précoce de l'insuline (Kim et al., 2016).

V. Conclusion

Cette étude en chambre d'Ussing confirme les études *in vivo* déjà effectuées et notamment, donne une indication en ce qui concerne le mode d'action qui montre que l'extrait de la racine d'*A. unedo* inhibe le co-transporteur Na⁺/glucose au niveau intestinal et par conséquent ralentit l'absorption intestinal du glucose. Ces observations indiquent que les effets de la racine d'*A.unedo* peuvent en effet retarder le développement des complications diabétiques et ses anomalies sous – jacentes.

Chapitre 5

Caractérisation chimique

I. Introduction

Les produits phytopharmaceutiques jouent un rôle essentiel en médecine, car la nécessité de rechercher des médicaments très efficaces et sans danger pour le traitement du diabète sucré reste un défi majeur pour la médecine moderne. En fait, les plantes médicinales offrent une excellente occasion de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques naturelles. Certaines de ces molécules peuvent avoir des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose chez les patients diabétiques sans entraîner les effets indésirables actuellement observés dans les antidiabétiques modernes. La recherche sur les plantes médicinales a généralement commencé avec des procédures d'extraction qui jouent un rôle crucial dans les résultats de l'extraction, par exemple les rendements et la qualité des composés phytochimiques produits. De nos jours, une large gamme de technologies avec différentes méthodes d'extraction est disponible. La technologie d'extraction ASE (extraction accélérée de solvant) est l'une des méthodes les plus efficaces d'extraction qui offre la récupération qualitative et quantitative maximale, avec le minimum d'opérations, de solvants, de manipulation et de temps requis.

Arbutus unedo possède diverses propriétés thérapeutiques dans la médecine traditionnelle, l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* a montré un effet antidiabétique intéressant dans les deux chapitres précédents, pourrait être mieux exploitée en développant d'un médicament, surtout par la purification du principe actif.

La présente étude visait à isoler le composé pharmacologiquement actif dans l'extrait aqueux des racines d'*A. unedo* et de déterminer sa structure chimique à l'aide de différentes méthodes analytiques instrumentales, ainsi qu'à évaluer son activité antidiabétique.

II. Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

Les racines d'*A. unedo* ont été collectées dans la région de Beni Mellal, au Maroc, en octobre 2016. Le spécimen de référence a été déposé à l'herbier du département de botanique de l'Institut scientifique de Rabat / Maroc, puis le code de spécimen de référence est (RAB 101548). Les racines ont été naturellement séchées l'ombre à la température ambiante pendant 2–3 semaines.

2. Procédures d'extraction

Les racines sèches d'*A. unedo* ont été pulvérisées mécaniquement et le matériel végétal (30g) a été extrait avec 200 mL d'eau à 100 °C sous pression d'azote statique (100 bars) en utilisant l'extraction par ASE (Extraction Accélérée par Solvant) (figure 22). L'extrait aqueux obtenu a été évaporé et lyophilisé pour donner une poudre brune qui a produit 7,12 g de rendement (23,7%). Après cela 1 g de ce dernier extrait a été adsorbé par l'ambre de XAD -16 qui a été préalablement lavé au méthanol.



Figure 22: Extracteur à solvant accéléré (ASE –Dionex)

3. Méthodes analytiques

3.1 HPLC analytique

Une chaîne HPLC Alliance® Waters W2695 équipée d'un détecteur PDA Waters 2996 équipé d'une colonne en phase inverse Sunfire III C-18 (4,6 x 150 mm) 3,5 μm (Waters). Ce système chromatographique est couplé à un détecteur de diffusion de lumière Waters 2424 (DEDL). Le système HPLC est contrôlé par le logiciel Empower 3 (Waters). Dans l'eau ultrapure (MilliQ), 0,1% l'acide formique / acétonitrile et 0,1% d'acide formique étaient les solvants utilisés. De plus, le gradient était de 0 à 100% d'acétonitrile en 40 min + 10 min à 100% d'acétonitrile avec un débit de 0,7 mL / min (Nothias et al., 2017).

3.2 HPLC semi préparative

Les composés présents dans la racine d'*A. unedo* (résine extrait-méthanol) ont été isolés par une chaîne HPLC semi préparative équipée d'un échantillonneur automatique Waters 717, d'une pompe Waters 600, d'un détecteur PDA Waters 2998 DEDL Waters 2420 et d'un dégazeur AF Waters. La colonne utilisée est une Sunfire III C18 (10 x 250mm) 5 μm . Le système HPLC est contrôlé par le logiciel Empower 2 (Waters). Alors que l'eau ultrapure (MilliQ) + 0,1% d'acide formique / acétonitrile + 0,1% d'acide formique étaient les solvants utilisés avec un débit de 4 mL / min (Nothias et al., 2017).

4. Test d'inhibition enzymatique

Voir chapitre 3 (page 88 et 89).

5. Analyse RMN

Les spectres RMN ^1H (300MHz) et RMN ^{13}C (75MHz) ont été enregistrés sur spectromètre Bruker avec des valeurs de déplacement chimique (δ) données en partie par million (ppm) par rapport au TMS (0.00 ppm) et en utilisant MeOD comme solvant, les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz) et singulet (s), doublet (d) et doublet d'un doublet (dd) ainsi que le multiplet (m). L'analyse des spectres de masse à haute résolution (HRMS) a été réalisée en mode négatif en balayage de masse (m / z 100 à 600 amu) en utilisant un spectromètre de masse Orbitrap Thermo Scientific Exactive équipé d'une source d'ionisation par électrospray chauffée (HESI) et la résolution était 1000 (Junior et al., 2017).

6. Analyses statistiques

La détermination de l'activité inhibitrice de la α -glucosidase a été réalisée en triple pour chaque échantillon. Les résultats obtenus ont été présentés en tant que moyennes \pm écart type (SD) et ont ensuite été comparés à l'aide d'un test de studentt non apparié. Les différences à $P < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III. Résultats

Les résultats de la présente étude ont montré que l'extraction de racines d'*A. unedo* par le prototype Dionex-ASE (extraction accélérée par solvant) produisait un rendement élevé de 23,7%. Le chromatogramme HPLC de l'extrait aqueux de racines d'*A.unedo* a montré que cet extrait contient plusieurs composés phytochimiques, comme le montre la figure 23A, ce qui rend difficile l'identification du principe pharmacologiquement actif. Cela nous a obligé à rechercher une autre méthode expérimentale d'extraction à partir de laquelle nous pouvons obtenir la molécule thérapeutique. Des résultats satisfaisants ont été obtenus en utilisant la résine XAD-16. Après adsorption sur la résine XAD-16, le composé attendu de l'extrait a été séparé en utilisant une HPLC semi-préparative et identifié comme indiqué sur la figure 23B.

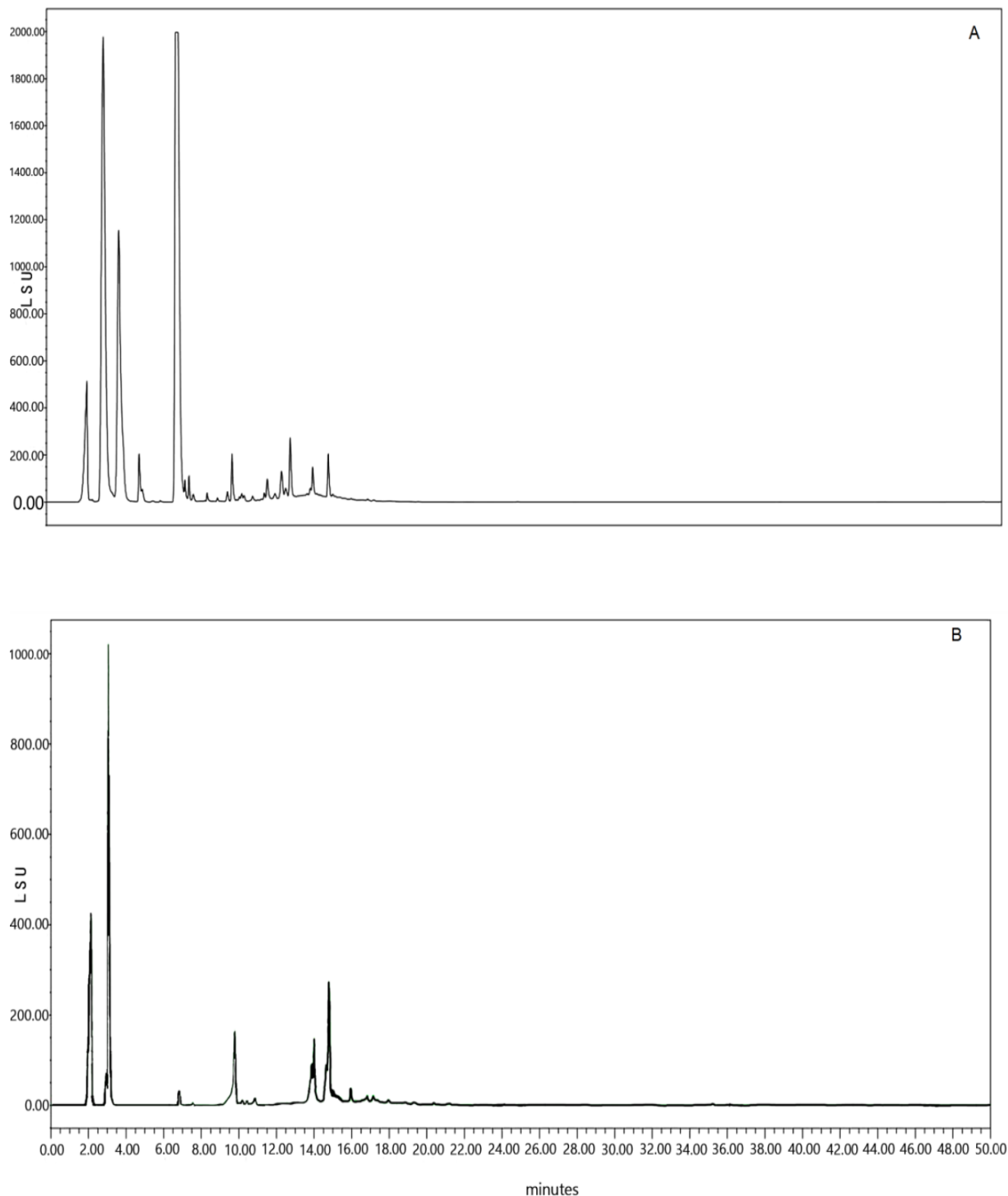


Figure 23: (A) Analyse par HPLC de l'extrait aqueux de racines d'*A. unedo* (B) L'extrait aqueux de racines d'*A. unedo* adsorbé par l'ambrelite XAD -16 (temps de rétention de 2 à 16 min)

Le composé isolé a montré une activité inhibitrice intéressante de la α -glucosidase le montre le tableau 13 par rapport à la molécule de référence (acarbose). Ces résultats nous ont incités à identifier et à caractériser la structure de ce composé (*figure 24*) à l'aide d'analyses par spectrométrie de masse à haute résolution et RMN (^1H et ^{13}C). L'analyse HRESIMS à ions négatifs a donné la formule moléculaire $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ sur la base de m/z 289.10 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6$) contenant neuf insaturations. Alors que les spectres RMN ^1H et ^{13}C montrent les signaux suivants :

^1H NMR (MeOD, 300MHz): 2.46-2.54 (m, 1H, CH_2 (2)); 2.81-2.88 (m, 1H, CH_2 (2)); 3.29 (s, 1H, $\text{OH}_{(a)}$); 3.97 (dd, 1H, $\text{CH}-\text{OH}_{(1)}$, $J = 7.5\text{Hz}$, $J = 2.4\text{Hz}$); 4.57 (d, 1H, $\text{O}-\text{CH}_{(9)}$, $J = 7.5\text{Hz}$); 4.85 (s, 4H, $4\text{OH}_{(b,c,d,e)}$); 5.86 (d, 1H, $\text{CH}_{(5)}$, $J = 2.4\text{Hz}$); 5.93 (d, 1H, $\text{CH}_{(7)}$, $J = 2.1\text{Hz}$); 6.69-6.78 (m, 2H, $2\text{CH}_{(14,15)}$); 6.84 (d, 1H, $\text{CH}_{(11)}$, $J = 1.8\text{Hz}$).

^{13}C NMR (MeOD, 75MHz): 27.09 (CH_2 (2)); 67.40 ($\text{CH}_{(1)}$); 81.43 ($\text{CH}_{(9)}$); 94.17 ($\text{CH}_{(7)}$); 94.96 ($\text{CH}_{(5)}$); 99.49 ($\text{C}_{(3)}$); 113.89 ($\text{CH}_{(11)}$); 114.76 ($\text{CH}_{(14)}$); 118.69 ($\text{CH}_{(15)}$); 130.82 ($\text{C}_{(10)}$); 144.81 ($\text{C}_{(13)}$); 144.84 ($\text{C}_{(12)}$); 155.51 ($\text{C}_{(8)}$); 156.15 ($\text{C}_{(4)}$); 156.39 ($\text{C}_{(6)}$).

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont indiqués dans l'Annexe supplémentaire 3.

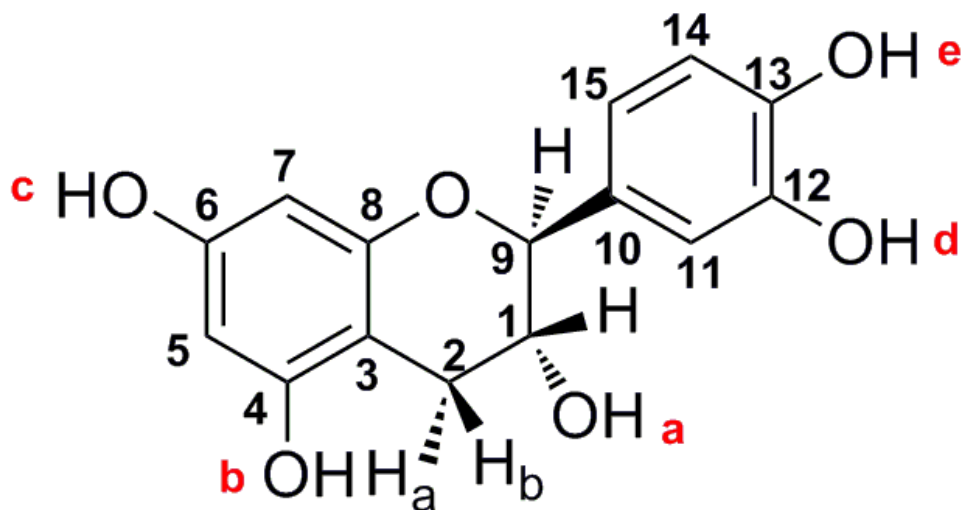


Figure 24 : Structure de la catéchine

La spectrométrie de masse à haute résolution et le spectre RMN ont montré des résultats similaires à ceux de la catéchine (Cushnie and Lamb, 2005). Ces composés ont été évalués pour leur activité inhibitrice de l' α -glucosidase et se sont avérés inhiber l'activité de l' α -glucosidase avec $\text{IC}_{50} = 87,55 \pm 2,23 \mu\text{g} / \text{mL}$ contre $199,53 \pm 1,12 \mu\text{g} / \text{mL}$ pour l'acarbose (*tableau 13*).

Tableau 13: L'effet inhibiteur de la catéchine sur l' α -glucosidase

| Composés | α -glucosidase IC ₅₀ ($\mu\text{g} / \text{mL}$) |
|-----------|--|
| Catechine | 87.55 ± 2.23^b |
| Acarbose | 199.53 ± 1.12^a |

IV. Discussion

En raison des problèmes liés aux températures élevées de traitement et aux temps de traitement longs des méthodes d'extraction classiques, susceptibles de se dégrader ou de subir des processus d'oxydation indésirables, il est indispensable de promouvoir le développement

et l'application de techniques d'extraction alternatives pour les composés phénoliques. L'extraction accélérée au solvant est une alternative écologique prometteuse offrant une séparation et une protection exceptionnelles contre la dégradation des polyphénols instables. L'étude en cours a révélé que la méthode d'extraction de la racine d'*A.unedo* à l'aide du l'ASE (extraction accélérée par solvant), produisait un rendement élevé en extrait d'eau. Plusieurs études ont montré que les technologies modernes, qui ont remplacé les techniques traditionnelles, incluent l'extraction accélérée au solvant, la micro-onde assistée, l'extraction de fluide supercritique, l'extraction de fluide sous pression et l'extraction par ultrasons. Ces techniques alternatives ont permis d'augmenter les rendements d'extraction de polyphénols, de réduire considérablement l'utilisation de solvants et d'accélérer le processus d'extraction.

Flavonoïdes une classe de composés polyphénoliques d'origine végétale, qui ont divers caractères physico-chimiques et la structure chimique et inclus dans de nombreux types de régime alimentaire humain. Les résultats de spectrométrie de masse à haute résolution et de RMN ont révélé la présence de catéchine dans les racines de l'extrait d'*A. unedo*. Ces résultats sont similaires à ceux de Junior et al. En effet, les fruits d'*A. unedo* sont considérés comme une source alternative de flavan-3-ols, en particulier la catéchine et ses dérivés (Albuquerque et al., 2016). Cependant, l'effet inhibiteur de la catéchine sur l'enzyme α -glucosidase a été évalué dans plusieurs études précédemment conduites qui avaient initialement démontré que la catéchine inhibait préférentiellement la maltase plutôt que la sucrase dans un système d'inhibition de l' α -glucosidase immobilisée (Bhandari et al., 2008; Justino et al., 2018; Matsui et al., 2007). Ceci suggère que l'inhibition de la α -glucosidase par la catéchine est étroitement associée à la présence d'un groupe hydroxyle libre à la position 3 de cette molécule (Matsui et al., 2007). La catéchine est un métabolite très répandu et largement répandu dans le règne végétal. L'utilisation traditionnelle d'*A.unedo* en tant qu'agent antidiabétique peut être associée à d'autres phytoconstituants, car de nombreuses plantes contiennent de la catéchine. Par conséquent, la propriété biologique élevée de cette plante est due à l'ensemble du phytocomplexe, et pas seulement à une seule molécule (Ettorre et al., 2010; Giovannini et al., 2016).

En outre, plusieurs études menées précédemment ont souligné l'intérêt de l'utilisation de la catéchine pour de nombreux avantages pour la santé, tels que les objectifs anticancéreux, antifongiques, antioxydants et antidiabétiques (Higdon and Frei, 2003; Malongane et al., 2017).

Cependant, dans une étude établie par Albuquerque et al. (2016), ils ont tenté d'optimiser l'extraction de cette molécule en utilisant différentes méthodes d'extraction, telles que la

macération et les techniques par micro-ondes, et étaient capables de produire respectivement $1,38 \pm 0,1$ et $1,70 \pm 0,3$ mg / g poids sec de catéchine en utilisant les conditions d'extraction optimales. Ces méthodes d'extraction se sont avérées être les méthodes les plus efficaces. Le rendement en catéchine de la racine d'*A. unedo* dans la présente étude était de 95 mg/g de poids sec de la plante. Ce haut rendement obtenu par l'ASE (Extraction accélérée par solvant), en plus de la résine XAD-16, qui a été utilisée comme une option adéquate pour une étape de nettoyage efficace pour la purification et l'isolation du composé de catéchine pure à partir de l'extrait de racine de plante (Selga and Torres, 2005). Ce rendement a été jugé élevé par rapport aux méthodes d'extraction précédemment utilisées (Albuquerque et al., 2016). De plus, les racines d'*A. unedo* étaient considérées comme la meilleure source d'isolement de la catéchine, une molécule pharmacologiquement active, par rapport aux procédures d'isolement de la catéchine de différentes sources précédemment menées (Albuquerque et al., 2016). Cependant, de nombreuses études ont démontré que la méthode Zippertex était respectueuse de l'environnement, que son coût et ses besoins en solvants étaient faibles, ce qui réduisait la durée de la procédure d'extraction et combinait étapes d'extraction / filtration (Matsui et al., 2007).

L'effet inhibiteur de la catéchine sur l' α -glucosidase a été déjà documenté ; cependant, la méthode de purification avancée utilisée, avec un pourcentage de rendement supérieur, est nouvelle.

À notre connaissance, la présente étude est la première qui est portée d'isoler le composé thérapeutiquement actif dans l'extrait aqueux de racines d'*A. unedo* et de rechercher la meilleure méthode pour isoler la catéchine dès cette plante. De plus, cette étude a approuvé l'utilisation antidiabétique traditionnelle des racines d'*A. unedo*. En outre, des essais *in vivo* sont nécessaires pour soutenir cette utilisation thérapeutique et pour concevoir une forme posologique appropriée pour la production de nouveaux médicaments ou suppléments à partir d'extrait de racines de plantes d'*A. unedo*, afin de contribuer à la réduction du taux de glucose dans le sang et de ses complications.

V. Conclusion

En raison de la croissance récente d'un certain nombre de patients diabétiques dans le monde qui a poussé les scientifiques à rechercher de nouveaux composés naturels biologiquement actifs avec une activité inhibitrice de l' α -glucosidase est devenue une tâche très importante. La

technologie d'extraction ASE avec la résine XAD-16 offrait une récupération qualitative et quantitative maximale de la catéchine, avec un minimum d'opérations, de manipulation, de solvant et de temps par rapport aux autres méthodes d'extraction et d'isolation utilisées. De plus, l'activité inhibitrice de la catéchine isolée à partir de racines d'*A.unedo* sur l' α -glucosidase a montré un effet inhibiteur potentiel par rapport à l'acarbose, ce qui explique leur utilisation traditionnelle en tant que plante hypoglycémique. En outre, le haut rendement obtenu à partir de cet extrait de racine favorise ses utilisations commerciales comme agent antidiabétique potentiel.

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail était la vérification de l'usage traditionnel d'*Arbutus unedo* L. Dans notre étude nous nous sommes intéressés surtout à l'étude de l'effet antidiabétique et antioxydant, ainsi que son mécanisme d'action, parce qu'elle a montré une activité antioxydante très intéressante ainsi des effets bénéfiques sur l'abaissement de la glycémie chez les souris diabétiques.

L'évaluation de la toxicité de cette plante a prouvé qu'elle n'est pas toxique même à forte dose pour l'extrait aqueux. Cela est cohérent avec l'usage quotidien de cette plante par la population marocaine.

Les résultats obtenus mettent en évidence la grande teneur d'*Arbutus unedo* L en polyphénols, flavonoïdes (divers composés chimiques identifiés) qui peuvent être responsables des effets biologiques trouvés de cette plante.

L'injection intrapéritonéale de la streptozotocine à la dose de 200 mg/kg de poids corporel chez les souris mâles adultes a induit des perturbations métaboliques : glucidique, lipidique et dans le fonctionnement de certains organes. En revanche le traitement des souris diabétiques par l'extrait aqueux d'*A. unedo* L corrige ces perturbations et améliorent la résistance contre le diabète et le poids corporel chez les souris diabétiques, ainsi Cet extrait a été capable d'ajuster certains paramètres biochimiques sériques, en particulier les niveaux de triglycérides, ASAT et ALAT. Il a également provoqué une restauration de l'architecture histologique des îlots de Langerhans.

De plus, un effet inhibiteur prometteur sur l' α -glucosidase et l' α -amylase a été démontré par l'extrait étudié. Ainsi la quantification de l'effet antioxydant de l'extrait aqueux *in vivo* a été aussi évaluée par le dosage du MDA et le dosage du SOD où cet extrait a montré des résultats pertinents.

En conclusion nous pouvons dire que l'extrait aqueux d'*A. unedo* peut renforcer le système de défense enzymatique antioxydant, peut jouer un rôle préventif dans le développement du diabète sucré par l'amélioration des métabolismes glucidique, lipidique et il peut être utilisé comme un antioxydant.

Pour nos perspectives, on envisage de tester la molécule active isolée sur un modèle animal diabétique et comprendre le ou les mécanismes d'action de toutes les voies antidiabétiques impliquées.

Il serait intéressant de faire des formulations à partir des plantes médicinales déjà évaluées sur l'activité antidiabétiques au sein de notre laboratoire de Pharmacologie toxicologie, afin d'étudier et de chercher un effet de synergie ou bien de potentialisation qui va être utile pour la fabrication d'un complément alimentaire ou d'un phytomédicament.

Cependant cette orientation doit s'accompagner d'une gestion rigoureuse en termes d'environnement et de renouvellement d'espèces.

Références

1. Abbott, C., Vileikyte, L., Williamson, S., Carrington, A., Boulton, A., 1998. Multicenter study of the incidence of and predictive risk factors for diabetic neuropathic foot ulceration. *Diabetes Care*. 21, 1071–5.
2. Abdel-Hameed, E., 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem*. 114, 1271–1277.
3. ADA, 2014. Standards of Medical Care in Diabetes—2014, in: *Diabetes Care*. p. S14–S80.
4. ADA, 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, in: *Diabetes Care*. pp. 62–69.
5. Alberti, K., Zimmet, P., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15, 539–53.
6. Alberti, M.M.K., 2010. *The classification and diagnosis of diabetes mellitus.*, 4th Editio. ed, John Wiley Sons Ltd.
7. Albuquerquea, B.R., Prieto, M., Maria, F.B., Alírio, R., Curranf, T.P., Lillian, B., Isabel C.F.R., F., 2016. Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Ind. Crop. Prod.* doi:10.1016/j.indcrop.2016.10.050
8. Alves, C., Casqueiro, J., Casqueiro, J., 2012. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16, 27. doi:10.4103/2230-8210.94253
9. Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G., Cooney, D.A., 1974. Streptozotocin diabetes: correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.* 54, 672–677. doi:10.1172/JCI107805
10. Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A., 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind Crop. Prod* 30, 165–167.
11. Annapurna, A., Kanaka, M., Murali, K., 2001. Antidiabetic activity of a polyherbal preparation (tincture of punchparna) in normal and diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* B 500–502.
12. Antony, P.J., Gandhi, G.R., Stalin, A., Balakrishna, K., Toppo, E., Sivasankaran, K., Ignacimuthu, S., Al-Dhabi, N.A., 2017. Myoinositol ameliorates high-fat diet and

- streptozotocin-induced diabetes in rats through promoting insulin receptor signaling. *Biomed. Pharmacother.* 88, 1098–1113. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.170
13. Anyinam, C., 1995. Ecology and ethnomedicine: exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. *Soc. Sci. Med.* 40, 321–9.
 14. APG III, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc* 161, 105–121.
 15. Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2012. Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. *Cell* 148, 1160–1171. doi:10.1016/j.cell.2012.02.010
 16. Asrafuzzaman, M., Cao, Y., Afroz, R., Kamato, D., Gray, S., Little, P.J., 2017. Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of Type 2 diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 89, 1242–1251. doi:10.1016/j.biopha.2017.03.010
 17. Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-wenzig, E., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant- derived natural products : A review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1582–1614. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.Discovery
 18. Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanen, M., 2000. Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits. *J. Food Compos. Anal.* 13, 171–177.
 19. Azzouzi, F. El, Zidane, L., 2015. La flore médicinale traditionnelle de la région de Béni-Mellal (Maroc). *J. Appl. Biosci.* 91, 8493–8502.
 20. Bailey, C.J., 2008. Metformin: Effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 22, 215–224. doi:10.1007/s10557-008-6092-0
 21. Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H., Msanda, F., 2017. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *J. Ethnopharmacol.* doi:10.1016/j.jep.2017.01.023
 22. Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44, 276–287.
 23. Begossi, A., Hanazaki, N., Tamashiro, J.Y., 2002. Medicinal Plants in the Atlantic Forest (Brazil): Knowledge , Use , and Conservation. *Hum. Ecol.* 30, 281–299.
 24. Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., Khaldi, A., Hamimed, A., 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria),. *Journal of Ethnopharmacology.* Elsevier. doi:10.1016/j.jep.2015.09.030
 25. Bhandari, M.R., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., Kawabata, J., 2008. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*,

- Haw.). *Food Chem.* 106, 247–252. doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.077
26. Black, C., Donnelly, P., Mcintyre, L., Royle, P., Jj, S., Thomas, S., 2009. Meglitinide analogues for type 2 diabetes mellitus (Review).
 27. Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyayat, A., 2002a. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab.* 10, 33–50.
 28. Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyayat, A., 2002b. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab.* 10, 33–50.
 29. Boizot, N., Charpentier, J., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier.
 30. Boulanger, E., Dequiedt, P., Wautier, J.-L., 2002. Advanced glycation end-products (AGEs): New toxins? | Les produits de glycation avancée (AGE): De nouvelles toxines? *Néphrologie* 23, 349–357.
 31. Brothers, K.J., Wu, S., Divall, S.A., Messmer, M.R., Kahn, C.R., Miller, R.S., Radovick, S., Wondisford, F.E., Wolfe, A., 2010. Rescue of obesity-induced infertility in female mice due to a pituitary-specific knockout of the insulin receptor. *Cell Metab.* 12, 295–305. doi:10.1016/j.cmet.2010.06.010
 32. Brown, D., O'Grady, S., 2008. The Ussing chamber and measurement of drug actions on mucosal ion transport. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 41, 7–12.
 33. Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615–25.
 34. Bunce, C., Richard, W., 2006. Leading causes of certification for blindness and partial sight in England & Wales. *BMC Public Health* 58.
 35. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74, 2157–2184. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.047
 36. Califf, R.M., Boolell, M., Haffner, S., Bethel, M., McMurray, J., Duggal, A., 2008. Prevention of diabetes and cardiovascular disease in patients with impaired glucose tolerance: rationale and design of the Nateglinide and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research (NAVIGATOR) Trial. *Am. Heart J.* 156, 623 – 632.
 37. Castaldi, S., Carfora, A., Fiorentino, A., Natale, A., Messere, A., Miglietta, F., Cotrufo, M.F., 2009. Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: Possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*. *Plant Soil* 315, 273–283. doi:10.1007/s11104-008-9750-x
 38. Castaneda, F., Burse, A., Boland, W., Kinne, R.K.H., 2007. Thioglycosides as inhibitors

- of hSGLT1 and hSGLT2: potential therapeutic agents for the control of hyperglycemia in diabetes. *Int. J. Med. Sci.* 4, 131–9.
39. Celikel, G., Demirsoy, L., Demirsoy, H., 2008. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Sci. Hort.* (Amsterdam). 118, 115–119. doi:10.1016/j.scienta.2008.05.028
 40. Cha, D., Kim, N., Yoon, J., Jo, S., Cho, W., Kim, H., Won, N., 2000. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 77, S104-12.
 41. Chakravarthy, B.K., Gupta, S., Gambhir, S.S., 1980. Pancreatic beta cell regeneration: A novel antidiabetic mechanism of *Pepercarpus marsupium*. *Indian J. Pharmacol.* 12, 123–128.
 42. Chang, M., Johnson, M., 1980. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J. Nutr.* 110, 931–6.
 43. Chen, L., Zhu, W., Chen, Z., Dai, H., Ren, J., Chen, J., Chen, L., Fang, L., 2007. Relationship between hyperuricemia and metabolic syndrome. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8, 593–598. doi:10.1631/jzus.2007.B0593
 44. Chen, V., Ianuzzo David, C., 1982. Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration Introduction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1251-1236.
 45. Chun, Y., Hanbin, L., Zhihai, W., Wanying, Z., Kun, Z., Jianhua, M., Ying, Z., Jing, P., Xiaofeng, L., Hongyan, L., Xiaofeng, J., 2012. Glycated albumin is a potential diagnostic tool for diabetes mellitus. *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London* 12, 568–571.
 46. Čolak, E., Majkić-Singh, N., 2009. The effect of hyperglycemia and oxidative stress on the development and progress of vascular complications in type 2 diabetes. *J. Med. Biochem.* 28, 63–71. doi:10.2478/v10011-009-0006-y
 47. Creusot, R., BATTAGLIA, M., RONCAROLO, M.-G., FATHMAN, C.G., 2016. Cell-Based Therapies and Other Non-Traditional Approaches for Type 1 Diabetes REMI.
 48. Cushnie, T., Lamb, A., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 26, 343–56.
 49. Daisy, P., Jeeva Kani, F.G., 2012. Evaluation of antidiabetic activity of various extracts of *Cassia auriculata* Linn. bark on streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 312–318.
 50. Daisy, P., Santosh, K., Rajathi, M., 2009. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of *Clitoria ternatea* Linn. in alloxan-induced diabetic rats. *African J. Microbiol. Res.* 3, 287–291.

51. Danielle, R., Odile, C., 2007. Botanique Pharmacognosie Phytothérapie, 3ème édit. ed.
52. Davidoff, A.J., Davidson, M.B., Carmody, M.W., Davis, M., Ren, J., 2004. Diabetic cardiomyocyte dysfunction and myocyte insulin resistance : Role of glucose-induced PKC activity. *Mol. Cell. Biochem.* 262, 155–163.
53. De Fronzo, R.A., Bonadonna, R.C., Ferannini, E., 1997. Pathogenesis of NIDDM, *International textbook of Diabetes Mellitus*, 2nd ed. England.
54. Defraigne, J.O.D., 2005. Un Mécanisme Physiopathologique Central À L ' Origine Des Complications Du Diabète ?
55. Dewanto, V., Wu, X., Liu, R., 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 50, 4959–64.
56. Dhanya, R., Arya, A., Nisha, P., Jayamurthy, P., 2017. Quercetin, a Lead Compound against Type 2 Diabetes Ameliorates Glucose Uptake via AMPK Pathway in Skeletal Muscle Cell Line. *Front Pharmacol.* 8, 336.
57. Dhital, S., Lin, A.H., Hamaker, B.R., Gidley, M.J., Muniandy, A., 2013. Mammalian Mucosal alpha Glucosidases Coordinate with alpha Amylase in the Initial Starch Hydrolysis Stage to Have a Role in Starch Digestion beyond Glucogenesis. *PLoS One* 8, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0062546
58. Dib, M.A., Djabou, N., Allali, H., Tabti, B., 2010. Identification of phenolic compounds and antimicrobial activity of roots of *Arbutus unedo* L. *Asian J. Chem.* 22, 4045–4053.
59. Dib, M.A., Llali, A.H., Tabti, B., Bendiabdellah, A., Djabou, N., 2008. A New Proanthocyanidins from *Arbutus unedo* L. Stems. *Asian J. Chem.* 20, 3926–3934.
60. Diniz, G., Coelho, P., Martins, V.S., Vieira, L., Novaes, R.D., Sarandy, M.M., Gonçalves, R.V., 2016. Applicability of Isolates and Fractions of Plant Extracts in Murine Models in Type II Diabetes : A Systematic Review. *hindawi Publ. Corp.* 2016.
61. Djabou, N., Dib, M.E.A., Allali, H., Benderb, A., Kamal, M.A., Ghalem, S., Tabti, B., 2013. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the phenolic composition of Algerian *Arbutus unedo* L. roots. *Pharmacogn. J.* 5, 275–280. doi:10.1016/j.phcgj.2013.09.003
62. Dmitriev, L., Titov, V., 2010. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 9, 200–10.
63. Doukani, K., Tabak, S., 2015. Nature & Technology Profil Physicochimique du fruit “ Lendj ” (*Arbutus unedo* L .). *Nat. Technol.* 53–66.
64. Ducobu, J., 2003. Oral antidiabetics in 2003 [Les antidiabétiques oraux en 2003]. *Rev.*

- Med. Brux. 24, A361–A368.
65. Eddouks, M., Lemhadri, A., Zeggwagh, N.A., Michel, J.B., 2005. Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 67, 189–195. doi:10.1016/j.diabres.2004.07.015
 66. Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.-L., Jouad, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J. Ethnopharmacol.* 82, 97–103. doi:10.1016/S0378-8741(02)00164-2
 67. Eidi, A., Eidi, M., Sokhteh, M., 2007. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) seeds on serum parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.* 27, 728–733. doi:10.1016/j.nutres.2007.09.006
 68. El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., El-Naga, N.I.A., 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 43, 57–63. doi:10.1016/j.fct.2004.08.012
 69. El Haouari, M., López, J.J., Mekhfi, H., Rosado, J.A., Salido, G.M., 2007. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacol.* 113, 325–331. doi:10.1016/j.jep.2007.06.016
 70. Emanuele, N., Sacks, J., Klein, R., Reda, D., Anderson, R., Duckworth, W., Abaira, C., 2005. Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. *Diabetes Care.* 28, 1954–8.
 71. Esteghamati, A., Eskandari, D., Mirmiranpour, H., Noshad, S., Mousavizadeh, M., Hedayati, M., Nakhjavani, M., 2013. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clin Nutr* 32, 179–85.
 72. Ettorre, A., Frosali, S., Andreassi, M., Di Stefano, A., 2010. Lycopene phytocomplex, but not pure lycopene, is able to trigger apoptosis and improve the efficacy of photodynamic therapy in HL60 human leukemia cells. *Exp. Biol. Med.* 235, 1114–1125.
 73. Fagot-campagna, A., Romon, I., Fosse, S., Roudier, C., 2010. Prévalence et incidence du diabète , et mortalité liée au diabète en France d ' origine et de la zone, Institut de veille sanitaire.
 74. Fah, L., Klotoé, J., Dougnon, V., Koudokpon, H., Fanou, V., C, D., F, L., 2013. Étude ethnobotanique des plantes utilisées dans le traitement du diabète chez les femmes enceintes à Cotonou et ... Étude ethnobotanique des plantes utilisées dans le traitement du

- diabète chez les femmes enceintes à Cotonou et Abomey-Calavi (Bénin). *J. Anim. & Plant Sci.* 18, 2647–2658.
75. Favier, A., 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, in: *Actualité Chimique*,. p. 108–115.
 76. Fennane, M., Ibn Tatt ou, M., Mathez, J., Ouyahya, A., El Oualidi, J., 1999. *Flore Pratique du Maroc – Manuel de détermination des plantes vasculaires. Vol. I. Trav. Inst. Sci. Rabat, série botanique 36.*
 77. Fézan, H.Tra., IRIÉ, G.M., N’GAMAN, K.C.C., MOHOU, C.H.B., 2008. Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l ’ hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d ’ Ivoire. *Sci. Nat. Vol. 5*, 39–48.
 78. Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P.M., Mcdougall, G., Stewart, D., Ferreira, R.B., Santos, C.N., 2010. Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients* 2, 214–229. doi:10.3390/nu2020214
 79. Francisco, A., Robert, K.C., 1962. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine, in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 56, 170–172.
 80. François, P., Jacques, B., 2013. Acidose lactique sous metformine, un risque à ne pas négliger.
 81. Fuchs, T.C., Hewitt, P., 2011. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *AAPS J.* 13, 615–31. doi:10.1208/s12248-011-9301-x
 82. Gheith, O., Farouk, N., Nampoory, N., Halim, M.A., Al-Otaibi, T., 2016. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephroarmacol.* 5, 49–56.
 83. Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *J Circ. Res* 107, 1058–70.
 84. Giorgino, F., Laviola, L., Perin, C., Solnica, B., Fuller, J., Chaturvedi, N., 2004. Factors associated with progression to macroalbuminuria in microalbuminuric type 1 diabetic patients: the EURODIAB prospective Complications Study. *Diabetologia* 47, 1020 – 1028.
 85. Giovannini, D., Gismondi, A., Basso, A., Canuti, L., Braglia, R., Canini, A., Mariani, F., Cappelli, G., 2016. *Lavandula angustifolia* Mill. Essential oil exerts antibacterial and

- anti-inflammatory effect in macrophage mediated immune response to *Staphylococcus aureus*. *Immunol. Investig.* 45, 11–28.
86. Girard, J., 2001. Mécanisme d'action des thiazolidinediones. *Diabetes Metab* 27, 271–278.
 87. Gomes, M.F.F.N., 2011. Strategies for the Improvement of *Arbutus unedo* L. (Strawberry Tree): In vitro Propagation, Mycorrhization and Diversity Analysis. Universidade de Coimbra.
 88. Graham, M.L., Janecek, J.L., Kittredge, J.A., Hering, B.J., Schuurman, H., 2011. The Streptozotocin-Induced Diabetic Nude Mouse Model: Differences between Animals from Different Sources. *Comp. Med.* 61, 356–360.
 89. Grant, P.J., 2003. Beneficial effects of metformin on haemostasis and vascular function in man. *Diabetes Metab.* 29, 6S44–6S52. doi:10.1016/S1262-3636(03)72787-6
 90. Gribble, F.M., Reimann, F., 2003. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* 875–891. doi:10.1007/s00125-003-1143-3
 91. Grimaldi, A., 2011. L' éducation thérapeutique du patient diabétique, ou apprendre à gérer l' incertitude. doi:10.1016/S1957-2557(11)70332-7
 92. Grover, J.K., Yadav, S., Vats, V., 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J. Ethnopharmacol.* 81, 81–100. doi:10.1016/S0378-8741(02)00059-4
 93. Gunjan, M., Ravindran, M., Jana, G., 2011. A review on some potential traditional phytochemistry with antidiabetic properties. *Int. J. Phytomedicine* 3, 448–458.
 94. Hachi, M., Hachi, T., Belahbib, N., Dahmani, J., Zidane, L., 2015. Contribution a l'étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale utilisée au niveau de la ville de Khénifra (Maroc). *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 11, 754–770.
 95. Haleng, J., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.O., CHARLIER, C., CHAPELLE, J.P., 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 62, 628–638. doi:10.1016/j.immbio.2006.02.001
 96. Hansen, T.K., Moller, N., 2010. Acute Metabolic Complications of Diabetes: Diabetic Ketoacidosis and Hyperosmolar Hyperglycemia., In *Textboo.* ed.
 97. Harani, H., Otmane, A., Makrelouf, M., Ouadahi, N., Abdi, A., Berrah, A., Zenati, A., Alamir, B., Koceir, E.A., 2012. Preliminary evaluation of the antioxidant trace elements in an Algerian patient with type 2 diabetes: special role of manganese and chromium. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 70, 669–677. doi:10.1684/abc.2012.0763
 98. Harbilas, D., Martineau, L., Harris, C., Adeyiwola, Spoor, D., Saleem, A., Lambert, J., Caves, D., Johns, T., Prentki, M., Cuerrier, A., Arnason, J., Bennett, S., Haddad, P., 2009. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the

- Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Can J Physiol Pharmacol* 87, 479–92.
99. Harding, S., Greenwood, R., Aldington, S., Gibson, J., Owens, D., Taylor, R., Kohner, E., Scanlon, P., Leese, G., 2003. Grading and disease management in national screening for diabetic retinopathy in England and Wales. *Diabet Med.* 20, 965–71.
100. Harmon, D.L., Mcleod, K.R., 2001. Glucose uptake and regulation by intestinal tissues : Implications and whole-body energetics. *J. Anim. Sci.* 79, E59–E72. doi:10.2527/jas2001.79E-SupplE59x
101. Harris, E.H., 2005. Elevated Liver Function Tests in Type 2 Diabetes. *Clin. Diabetes* 23, 115–119. doi:10.2337/diaclin.23.3.115
102. Hashim, A., Khan, M.S., Khan, M.S., Baig, M.H., Ahmad, S., 2013. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory property of *phyllanthus virgatus* L.: An in vitro and molecular interaction study. *Biomed Res. Int.* 2013, 12. doi:10.1155/2013/729393
103. He, Y., Fang, J., Taatjes, D., Nogales, E., 2013. Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature* 495, 481–6.
104. Helal, E.G.E., Abou-Aouf, N., Khattab, A.S.M., 2015. A Possible Hypoglycemic and Antioxidant Effect of Herbal Mixture Extraction in Diabetic Rats. *Egypt. J. Hosp. Med.* 58, 109–119. doi:10.12816/0009365
105. Higdon, J. V., Frei, B., 2003. Catechins and Polyphenols: Health Tea Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 89–143. doi:10.1080/10408690390826464
106. Hmamouchi, M., 2001. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines., 2^{ème} Edition.
107. Holloway, W.D.B.S., Tasman-Jones, F.R.C.P. F.R.A.C.P., Lee, S.P.M.R.A.C.P., 1978. Digestion of certain fractions of dietary fiber in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 31, 927–930.
108. Holman, R., Paul, S., Bethel, M., Neil, H., Matthews, D., 2008. Long-term follow-up after tight control of blood pressure in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 359, 1565 – 1576.
109. Hongu, M., Funami, N., Takahashi, Y., Saito, K., Arakawa, K., Matsumoto, M., Yamakita, H., Tsujihara, K., 1998. Na⁺-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetic agents. III. Synthesis and pharmacological properties of 4-dehydroxyphlorizin derivatives modified at the OH groups of the glucose moiety. *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1545–1555.
110. Hosseinian, F.S., Li, W., Hydamaka, A.W., Tsopmo, A., Lowry, L., Friel, J., Beta, T.,

2007. Proanthocyanidin profile and ORAC values of Manitoba berries, Chokecherries, and Seabuckthorn. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6970–6976. doi:10.1021/jf071163a
111. Huang, B., Ke, H., He, J., Ban, X., Zeng, H., Wang, Y., 2011. Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. *Food Chem. Toxicol.* 19, 185–190.
112. Hundal, R.S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., Inzucchi, S.E., Schumann, W.C., Petersen, K.F., Landau, B.R., Shulman, G.I., 2000. Mechanism by Which Metformin Reduces Glucose Production in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 49, 2063–2069.
113. Ihara, Y., Toyokuni, S., Uchida, K., Odaka, H., Tanaka, T., Ikeda, H., Hiai, H., Seino, Y., Yamada, Y., 1999. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 927–32.
114. Inzucchi, S.E., M.D., D., G. Maggs, M.D., GERALYN R. Spollett, A.P.R.N., Stephanie L. Page, R.N., Frances S. Rife, R.N., Veronika Walton, B.A., and Gerald I. Shulman, M.D., P.D., 1998. Efficacy and Metabolic Effects of Metformin and Troglitazone in Type II Diabetes Mellitus. *New Engl. J. Med.* 339, 867–872.
115. Ishola, I.O., Oreagba, I.A., Adeneye, A.A., Adiriye, C., Oshikoya, K.A., Ogunleye, O.O., 2014. survey of herbal treatment of malariaEthnopharmacological a in Lagos , Southwest Nigeria. *J. Herb. Med.* 4, 224–234. doi:10.1016/j.hermed.2014.08.001
116. Jarald, E., Joshi, S.B., Jain, D.C., 2008. Diabetes and Herbal Medicines. *Iran. J. Pharmacol. Ther.* 97–106.
117. Jemai, H., Feki, A.E.L., Sayadi, S., 2009. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8798–8804. doi:10.1021/jf901280r
118. Johnston, K., Sharp, P., Clifford, M., Morgan, L., 2005. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 579, 1653–1657.
119. Julkunen-Tiitto, R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213–217.
120. June, M.-, Kimani, C.N., Mbaria, J.M., Suleiman, M., Gakuya, D., Kiama, S.G., 2015. Antihyperglycemic activity of *Zanthoxylum chalybeum* stem bark extract in diabetic rats. *J. Phytopharm.* 4, 183–189.
121. Junior, O.V., Dantas, J.H., Barão, C.E., Zanoelo, E.F., Cardozo-Filho, L., de Moraes, F.F., 2017. Formation of inclusion compounds of (+) catechin with β -cyclodextrin in different complexation media: Spectral, thermal and antioxidant properties. . *J. Supercrit.*

- Fluids 121, 10–18.
122. Justino, A.B., Miranda, N.C., Franco, R.R., Martins, M.M., Silva, N.M. da, Espindola, F.S., 2018. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomed. Pharmacother.* 100, 83–92. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.172
123. Kade, I.J., Borges, V.C., Savegnago, L., Ibukun, E.O., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2009. Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 415–424. doi:10.1007/s10565-008-9095-5
124. Kadir, M.F., Karmoker, J.R., Alam, M.R., Jahan, S.R., Mahbub, S., Mia, M.M.K., 2015. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers and indigenous people in Chittagong Hill Tracts, Bangladesh, for the treatment of snakebite. Evidence-based Complement. *Altern. Med.* 2015, 23. doi:10.1155/2015/871675
125. Kadowaki, T., Kasugas, M., Akanuma, Y., Ezaki, O., Takaku, F., 1984. Decreased Autophosphorylation of the Insulin Receptor-Kinase in Streptozotocin-diabetic Rats *. *J. Biol. Chem.* 259, 14208–14216.
126. Kanda, H., Kaneda, T., Kawaguchi, A., Sasaki, N., Tajima, T., Urakawa, N., Shimizu, K., Suzuki, H., 2017. Phloridzin inhibits high K⁺-induced contraction via the inhibition of sodium: glucose cotransporter 1 in rat ileum. *J Vet Med Sci.* 79, 593–601.
127. Kar, A., Choudhary, B.K., Bandyopadhyay, N.G., 2003. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 84, 105–108. doi:10.1016/S0378-8741(02)00144-7
128. Karimulla, S., Kumar, B.P., 2011. Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology Anti diabetic and Anti hyperlipidemic activity of bark of *Bruguiera gymnorrhiza* on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian J. Pharm. Sci. Technol.* 1, 4–7.
129. Karou, S.D., Tchacondo, T., Tchibozo, M.A.D., Abdoul-rahaman, S., Anani, K., Koudouvo, K., Batawila, K., 2011. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus and hypertension in the Central Region of Togo. *Pharm. Biol.* 49, 1286–1297. doi:10.3109/13880209.2011.621959
130. Kee, K.T., Koh, M., Oong, L.X., Ng, K., 2013. Screening culinary herbs for antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 1884–1891.

- doi:10.1111/ijfs.12166
131. Keller, D.M., Lotspeich, W.D., 1959. Effect of phlorizin on the osmotic behavior of mitochondria in isotonic sucrose. *J. Biol. Chem.* 234, 991–994.
 132. Keller, U., Szinnai, G., Bilz, S., Berneis, K., 2003. Effects of changes in hydration on protein, glucose and lipid metabolism in man: impact on health. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, S69–S74. doi:10.1038/sj.ejcn.1601904
 133. Keter, L.K., Mutiso, P.C., 2012. Ethnobotanical studies of medicinal plants used by Traditional Health Practitioners in the management of diabetes in Lower Eastern Province, Kenya. *J. Ethnopharmacol.* 139, 74–80. doi:10.1016/j.jep.2011.10.014
 134. Khalil, N.S.A., Abou-elhamd, A.S., Wasfy, S.I.A., Mileegy, I.M.H. El, Hamed, M.Y., Ageely, H.M., 2016. Antidiabetic and Antioxidant Impacts of Desert Date (*Balanites aegyptiaca*) and Parsley (*Petroselinum sativum*) Aqueous Extracts: Lessons from Experimental Rats. *J. Diabetes Res.* 10. doi:10.1155/2016/8408326
 135. Khanbabaee, K., van Ree, T., 2001. Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18, 641–649. doi:10.1039/b101061l
 136. Kim, Y., Keogh, J.B., Clifton, P.M., 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients* 2471. doi:10.3390/nu8010017
 137. Kimmel, B., Inzucchi, S.E., 2005. Oral Agents for Type 2 Diabetes: An Update. *Clin. Diabetes* 23, 64–76. doi:10.2337/diaclin.23.2.64
 138. Kinalski, M., Kinalska, A., Śledziwski, B., Zarzycki, W., Telejko, I., 2000. Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol.* 37, 179–183.
 139. Kissela, B., Khoury, J., Kleindorfer, D., Woo, D., Schneider, A., Alwell, K., 2005. Epidemiology of ischemic stroke in patients with diabetes: the Greater Cincinnati and Northern Kentucky Stroke Study. *Diabetes Care* 28, 355 – 359.
 140. Kitabchi, A., Umpierrez, G., Fisher, J., Murphy, M., Stentz, F., 2008. Thirty years of personal experience in hyperglycemic crises: diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1541–52. doi:10.1210/jc.2007-2577.
 141. Klinger, S., Gerhard, B., 2018. Resveratrol Inhibits Porcine Intestinal Glucose and Alanine Transport: Potential Roles of Na⁺/K⁺-ATPase Activity, Protein Kinase A, AMP-Activated Protein Kinase and the Association of Selected Nutrient Transport Proteins with Detergent Resistant Membranes. *Nutrients.* 10, 302.
 142. Kolling, M., Winkley, K., von Deden, M., 2010. “For someone who’s rich, it’s not a problem”. Insights from Tanzania on diabetes health-seeking and medical pluralism

- among Dar es Salaam's urban poor. *Global Health* 6, 8. doi:10.1186/1744-8603-6-8
- 143.** Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z., Ashtary-larky, D., Asadi-samani, M., Branch, A., Plant, M., 2016. The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electron. Physician* 8, 1832–1842.
- 144.** Koschinsky, T., He, C., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Heitmann, K., Vlassara, H., 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 6474–9.
- 145.** Kpodar, M.S., Lawson-evi, P., Bakoma, B., Eklu-gadegbeku, K., Agbonon, A., Aklikokou, K., Gbeassor, M., 2015. Ethnopharmacological survey of plants used in the treatment of diabetes mellitus in south of Togo (Maritime Region). *J. Herb. Med.* doi:10.1016/j.hermed.2015.06.002
- 146.** Kraus, T.E.C., Zasoski, R.J., Dahlgren, R.A., 2004. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil.* 262, 95–109.
- 147.** Kumar, V., Prakash, O., Kumar, S., Narwal, S., 2011. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn. Rev.* 5, 19. doi:10.4103/0973-7847.79096
- 148.** Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C.P., Lee, J.H., Kruhlak, M., Levine, M., 2007. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 21, 366–77.
- 149.** Laar, F.A. Van De, 2008. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 1189–1195.
- 150.** Lecleire, S., 2008. Digestion et absorption des nutriments. *Cah. Nutr. Diet.* 43, 45–50. doi:10.1016/S0007-9960(08)70279-7
- 151.** Lee, A., Chung, S., 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13, 23–30.
- 152.** Lenzen, S., Freytag, S., Panten, U.W.E., 1988. Inhibition of Glucokinase by Alloxan through Interaction Groups in the Sugar-Binding Site of the Enzyme. *Mol Pharmacol* 34, 395–400.
- 153.** Lima, C.F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2005. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 97, 383–389. doi:10.1016/j.jep.2004.11.029
- 154.** Lister, E., Wilson, P., 2001. Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity. *J Food Technol.* 8, 131.

155. Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K., Bíró, L., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biol. Szeged.* 47, 119–125.
156. Luke, U.O., Robert, A.E., Egbung, G.E., 2013. Effect of ethanolic root and twig extracts of *Vernonia amygdalina* (etidot) on liver function parameters of streptozotocin induced hyperglycaemic and normal wistar rats. *Eur Sci J* 9, 199–211.
157. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Christian, J.-A., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: Presses polytechniques et universitaires romandes.
158. Madhusudhan, T., Kirankumar, H., 2015. In-vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. and *Celosia argentea* Linn. extracts and fractions. *Indian J Pharmacol.* 47, 425–429. doi:10.4103/0253-7613.161270
159. Maessen, D., Stehouwer, C., Schalkwijk, C., 2015. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond).* 128, 839–61.
160. Mahler, R., Adler, M., 1999. Type 2 diabetes mellitus: Update on diagnosis, pathophysiology and treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 24–29.
161. Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N., 2013. Etude de l ' extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d ' artichaut (*Cynara scolymus* L .). *Nat. Technol.* 35–40.
162. Malathi, P., Crane, R.K., 1969. Phlorizin hydrolase: a α -glucosidase of hamster intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 173, 245–256.
163. Malek, M., Khamseh, M., Aghili, R., Emami, Z., 2012. Medical management of diabetic retinopathy: an overview. *Arch. Intern. Med.* 15, 635–640.
164. Maleš, C., T, D.Š., T, M.B., 2013. Quantitative Determination of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves of *Arbutus unedo* L . Using Thin Layer Chromatography. *J. Anal. Chem.* 2013, 1–5.
165. Maleš, Ž., Plazibat, M., Vundać, V.B., Žuntar, I., 2006. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree—*Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm* 56, 245–250.
166. Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., Pereira, J.A., 2012. *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Ind. Crops Prod.* 37, 473–478. doi:10.1016/j.indcrop.2011.07.023
167. Malongane, F., McGaw, L.J., Mudau, F.N., 2017. The synergistic potential of various teas, herbs and therapeutic drugs in health improvement: A review. *J. Sci. Food Agric.* 97, 4679–4689.

168. Maritim, A., Sanders, R., Watkins, J., 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 17, 24–38.
169. Marmouzi, I., El Madani, N., Charrouf, Y., Cherrah, Y., Faouzi, M.E.A., 2015. Analyse approximative et composition en acides gras et minéraux de *Chenopodium quinoa* Willd. Marocain, et propriétés antioxydantes selon la polarité. *Phytothérapie* 13, 110–117.
170. Márquez-García, B., Fernández, M.A., Córdoba, F., 2009. Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian southwestern Pyritic Belt. *Bioresour. Technol.* 100, 446–451.
171. Marze, S., 2017. Chapter 14 – Modeling of Food Digestion, in: *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes*. Elsevier Inc., pp. 353–374. doi:10.1016/B978-0-12-804595-4.00014-6
172. Mathieu, M., Mammari, S., Eto, B., 2008. Automated measurement of intestinal mucosa electrical parameters using a new digital clamp. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30, 591–598.
173. Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A., Tamaya, K., Miyata, Y., Tanaka, K., Matsumoto, K., 2007. alpha-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J Agric Food Chem.* 55, 99–105.
174. Mberdoun, M., 2015. Composés organiques et activités antioxydantes de *Ampelocissus multistriata* du Tchad. *J. Appl. Biosci* 91, 8470–8479.
175. Medjdoub, H., Selles, C., Tabti, B., 2013. MEDICINAL PLANTS: A METHODOLOGY FOR STUDYING THEIR ANTI-DIABETIC ACTIVITY. *Int. J. Med. Pharm. Sci.* 3, 169–178.
176. Mendes, L., De Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, M., 2011. comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2285–2291. doi:10.1016/j.fct.2011.06.028
177. Mhamdi Takrouni, M., Ben El Haj Ali, I., Messaoued, C., Boussaid, M., 2012. Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 146, 92–98. doi:10.1016/j.scienta.2012.08.005
178. Michael, J., Fowler, M., 2008. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clin. Diabetes* 26, 77–82.
179. Miguel, M.G., Faleiro, M.L., Guerreiro, A.C., Antunes, M.D., 2014. *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties. *Molecules* 19, 15799–15823.

- doi:10.3390/molecules191015799
180. Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., Birnbaum, M.J., 2013. Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 494, 256–260. doi:10.1038/nature11808. Biguanides
 181. Moller, N., Foss, A., Gravholt, C., Mortensen, U., Poulsen, S., Mogensen, C., 2005. Myocardial injury with biomarker elevation in diabetic ketoacidosis. *J Diabetes Complicat.* 19, 361–3.
 182. Monnier, L., Thuan, J., 2007. Type 1 diabetes of the child and the adult. Type 2 diabetes of the adult. *Complications of diabetes. Rev Prat* 57, 653–64.
 183. Morales, P., Ferreira, I.C.F.R.; Carvalho, A.M.; Fernández-Ruiz, V.; Sánchez-Mata, M.C.; Câmara, M., Morales, R., Tardio, J., 2013. Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115, 176–185.
 184. Mota, L., Boeing, T., Somensi, B., Cury, B.J., Steimbach, M.B., De, A.C., 2015. EVIDENCE OF GASTRIC ULCER HEALING ACTIVITY OF *Maytenus robusta* Reissek: in vitro AND in vivo STUDIES. *J. Ethnopharmacol.* doi:10.1016/j.jep.2015.09.006
 185. Naczki, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1523–1542. doi:10.1016/j.jpba.2006.04.002
 186. Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.059
 187. Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian J. Pharmacol.* 33, 2–16.
 188. Nistor Baldea, L.A., Martineau, L.C., Benhaddou-Andaloussi, A., Arnason, J.T., Lévy, É., Haddad, P.S., 2010. Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *J. Ethnopharmacol.* 132, 473–482. doi:10.1016/j.jep.2010.07.055
 189. Nothias, L.F., Boutet-Mercey, S., Cachet, X., De La Torre, E., Laboureur, L., Gallard, J.F., Retailleau, P., Brunelle, A., Dorrestein, P.C., Costa, J., Bedoya, L.M., Roussi, F., Leyssen, P., Alcami, J., Paolini, J., Litaudon, M., Touboul, D., 2017. Environmentally Friendly Procedure Based on Supercritical Fluid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry Molecular Networking for the Discovery of Potent Antiviral Compounds

- from *Euphorbia semiperfoliata*. *J. Nat. Prod.* 80, 2620–2629. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00113
190. Nutr, J.C.B., Saeed, M.K., Deng, Y., Dai, R., 2008. Attenuation of Biochemical Parameters in Streptozotocin-induced Diabetic Rats by Oral Administration of Extracts and Fractions of *Cephalotaxus sinensis* 21–28.
191. Ohgaki, R., Wei, L., Yamada, K., Hara, T., Kuriyama, C., Okuda, S., Ueta, K., Shiotani, M., Nagamori, S., Kanai, Y., 2016. Interaction of the Sodium/Glucose Cotransporter (SGLT) 2 inhibitor Canagliflozin with SGLT1 and SGLT2. *J Pharmacol Exp Ther.* 358, 94–102.
192. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351–358.
193. Oliveira, I., Baptista, P., Bento, A., Pereira, J.A., 2011. *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *J. Food Nutr. Res.*
194. Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J., Baptista, P., 2009. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *J Ethnopharmacol* 94, 317–322.
195. OMS, 2016. RAPPORT MONDIAL sur le diabete.
196. OMS, 2002. Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002 – 2005 267.
197. Orban, J.C., Ichai, C., 2008. Complications métaboliques aiguës du diabète. *Reanimation* 17, 761–767. doi:10.1016/j.reaurg.2008.09.006
198. Orch, H., Douira, A., ZIDANE, L., 2015. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète , et des maladies cardiaques dans la région d ' Izarène (Nord du Maroc). *J. Appl. Biosci.* 7940–7956.
199. Ouhaddou, H., Boubaker, H., Msanda, F., A, E.M., 2014. An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants of the Agadir Ida Ou Tanane Province (Southwest Morocco). *J. Appl. Biosci.* 84, 7707–7722. doi:10.4314/jab.v84i1.5
200. Oyedemi, S., Bradley, G., Afolayan, A., 2012. Antidiabetic Activities of Aqueous Stem Bark Extract of *Strychnos henningsii* Gilg in Streptozotocin-nicotinamide Type 2 Diabetic Rats 11, 221–228.
201. Özcan, M.M., Haciseferogullan, H., 2007. The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *J. Food Eng.* 78, 1022–1028. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.12.014
202. Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J.C., del Castillo, M.D., Cano, M.P., de Pascual-Teresa, S., 2008. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo*

- L.) fruits. *J. Food Compos. Anal.* 21, 273–281. doi:10.1016/j.jfca.2007.11.006
- 203.** Pan, S.Y., Zhou, S.F., Gao, S.H., Yu, Z.L., Zhang, S.F., Tang, M.K., Sun, J.N., Ma, D.L., Han, Y.F., Fong, W.F., Ko, K.M., 2013. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM'S outstanding contribution to modern therapeutics. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013, 25. doi:10.1155/2013/627375
- 204.** Pareek, H., Sharma, S., Khajja, B.S., Jain, K., Jain, G.C., 2009. Evaluation of hypoglycemic and anti-hyperglycemic potential of *Tridax procumbens* (Linn.). *BMC Complement. Altern. Med.* 9, 48. doi:10.1186/1472-6882-9-48
- 205.** Pari, L., Satheesh, M.A., 2004. Antidiabetic activity of *Boerhaavia diffusa* L.: effect on hepatic key enzymes in experimental diabetes 91, 109–113. doi:10.1016/j.jep.2003.12.013
- 206.** Pavlović, D.R., Branković, S., Kovačević, N., Kitić, D., Veljković, S., 2011. Comparative study of spasmolytic properties, antioxidant activity and phenolic content of *arbutus unedo* from Montenegro and Greece. *Phyther. Res.* 25, 749–754. doi:10.1002/ptr.3460
- 207.** Pavlović, D.R., Lakušić, B., Došlov-Kokoruš, Z. Kovačević, N., 2009. Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Pharmazie* 64, 656–659.
- 208.** Pillon, F., Tan, K., Jouty, P., Frullani, Y., 2014. Le traitement médicamenteux du diabète de type 2, *Actualités pharmaceutiques*. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.actpha.2014.10.005
- 209.** Pimpão, R.C., Dew, T., Oliveira, P.B., Williamson, G., Ferreira, R.B., Santos, C., 2013. Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4053–4062.
- 210.** Pinget, M., 2002. Les bases physiologiques des troubles de l'insulinosécrétion. *Diabetes Metab* 26, 21–32.
- 211.** Pirot, P., Cardozo, A.K., Eizirik, D.L., 2008. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52, 156–165. doi:10.1590/S0004-27302008000200003
- 212.** Piyasi, M., Prajapat, A.K., 2015. Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers – a review. *RSC Adv.* 5, 97547–97562.
- 213.** Prabhakar, P.K., Doble, M., 2011. Mechanism of Action of Natural Products Used in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Chinese J. Integr. Tradit. West. Med.* 17, 563–574. doi:10.1007/s11655-011-0810-3
- 214.** Preethi, P.J., 2013. Herbal medicine for diabetes mellitus: A Review. *Int. J. Phytofarm.*

- 3, 1–22.
- 215.** Pullerits, R., Bokarewa, M., Dahlberg, L., Tarkowski, A., 2005. Research article Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res. Ther.* 7, 817–824. doi:10.1186/ar1749
- 216.** Punithavathi, V., Prince, P., Kumar, R., Selvakumari, J., 2011. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 650, 465–71.
- 217.** Raccach, D., 2004. Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC - Endocrinol.* 1, 29–42. doi:10.1016/j.emcend.2003.10.003
- 218.** Rahmatullah, M., Azam, M.N.K., Khatun, Z., Seraj, S., Islam, F., Rahman, M.A., Jahan, S., Aziz, M.S., 2012. MEDICINAL PLANTS USED FOR TREATMENT OF DIABETES BY THE MARAKH SECT OF THE GARO TRIBE LIVING IN MYMENSINGH DISTRICT, BANGLADESH. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 9, 380–385.
- 219.** Rains, J., Jain, S., 2011. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 50, 567–75.
- 220.** Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., Ravi, K., Subramanian, S., 2004. Hypoglycemic effect of Aloe vera gel on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. *J. Med. Food* 7, 61–66. doi:10.1089/109662004322984725
- 221.** Ramachandran, A., Snehalatha, C., Latha, E., Manoharan, M., Vijay, V., 1999. Impacts of urbanisation on the lifestyle and on the prevalence of diabetes in native Asian Indian population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 44, 207–213. doi:10.1016/S0168-8227(99)00024-8
- 222.** Rawi, S.M., Mourad, I.M., Dawlat, A.S., 2011. Biochemical changes in experimental diabetes before and after treatment with mangifera indica and psidium guava extracts. *Int J Pharm Biomed Sci* 2, 29–41.
- 223.** Risérus, U., Willett, W.C., Hu, F.B., 2009. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog. Lipid Res.* 48, 44–51. doi:10.1016/j.plipres.2008.10.002
- 224.** Riturparna, M., Neeraj, K., 2007. Artherosclerosis in DM: Role of inflammation. *Indian J. Med. Sci.* 61, 292–306.
- 225.** Rodier, M., 2001. M . Rodier Définition et classification du diabète . Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire - Imag. Fonct. métabolique* 25, 91–93.
- 226.** Rohilla, A., Ali, S., 2012. Alloxan Induced Diabetes : Mechanisms and Effects. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 3, 819–823.

227. Ruiz-Rodríguez, B.M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M., Tardío, J., 2011. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Res. Int.* 44, 1244–1253. doi:10.1016/j.foodres.2010.11.015
228. Salhi., S., Fadl ., I., Zidane., L., Douira., A., 2010. Études floristique et ethnobotaniques des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa* 31, 133–146.
229. Sathishsekar, D., Subramanian, S., 2005. Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 14, 153–158. doi:10.1248/jhs.52.283
230. Scheen, A.J., 2014. COMMENT JE TRAITE ... Le choix entre un sulfamide hypoglycémiant et une gliptine pour traiter le diabète de type 2.
231. Scheen, A.J., 2012. DPP-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes: A critical review of head-to-head trials. *Diabetes Metab.* 38, 89–101.
232. Schultz, Zalusky, 1964. ION TRANSPORT IN ISOLATED RABBIT ILEUM. II. THE INTERACTION BETWEEN ACTIVE SODIUM AND ACTIVE SUGAR TRANSPORT. *J Gen Physiol.* 47, 1043–59.
233. Şeker, M., Toplu, C., 2010. Determination and Comparison of Chemical Characteristics of *Arbutus unedo* L. and *Arbutus andrachnae* L. Family Ericaceae Fruits. *J. Med. Food* 13, 1013–1018. doi:10.1089/jmf.2009.0167
234. Selga, A., Torres, J.L., 2005. Efficient preparation of catechin thio conjugates by one step extraction/ depolymerization of pine (*Pinus pinaster*) bark procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7760–7765.
235. Semenya, S., Potgieter, M., Erasmus, L., 2012. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Bapedi healers to treat diabetes mellitus in the Limpopo Province , South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 141, 440–445. doi:10.1016/j.jep.2012.03.008
236. Shaw, J., Zimmet, P., Gries, F., Ziegler, D., 2003. Epidemiology of diabetic neuropathy., Textbook o. ed. In: Gries F.A., Cameron.
237. Shirwaikar, A., Rajendran, K., Kumar, C.D., Bodla, R., 2004. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin – nicotinamide type 2 diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 91, 171–175. doi:10.1016/j.jep.2003.12.017
238. Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punitha, I.S.R., 2005. Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 97, 369–374. doi:10.1016/j.jep.2004.11.034

239. Simoneau, E., Garand, C., 2011. Le diabète 2.
240. Singh, L.W., 2011. Traditional medicinal plants of Manipur as anti- diabetics. *J. Med. plant Res.* 5, 677–687.
241. Sivajothi, V., Dey, A., Jayakar, B., Rajkapoor, B., 2008. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effect of *Phyllanthus rheedii* on streptozotocin induced diabetic rats. *Iran. J. Pharm. Res.* 7, 53–59.
242. Spoor, D., Martineau, L., Leduc, C., Benhaddou-Andaloussi, A Meddah, B., Harris, C., Burt, A., Fraser, M., Coonishish, J., Joly, E., Cuerrier, A., Bennett, S., Johns, T., Prentki, M., Arnason, J., Haddad, P., 2006. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 847–58.
243. Stevens, M., 2005. Redox-Based Mechanisms in Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 11–12.
244. Stratton, I., Kohner, E., Aldington, S., Turner, R., Holman, R., Manley, S., Matthews, D., 2001. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 44, 156–63.
245. Stumvoll, M., Goldstein, B.J., Van Haeften, T.W., 2005. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333–1346. doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X
246. Subramanian, R., Asmawi, M.Z., Sadikun, A., 2008. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochim. Pol.* 55, 391–398.
247. Subramanion, J., Zuraini, Z., Yeng, C., Yee Ling, L., Lachimanan, Yoga Latha Sreenivasan, S., 2011. Acute Oral Toxicity of Methanolic Seed Extract of *Cassia fistula* in Mice. *Molecules* 16, 5268–5282.
248. Sun, Y., Oberley, L., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34, 497–500.
249. Szkudelski, T., 2012. Streptozotocin – nicotinamide-induced diabetes in the rat . *Exp. Biol. Med.* 481–490. doi:10.1258/ebm.2012.011372
250. Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x
251. Takahashi, A., Nagashima, K., Hamasaki, A., Kuwamura, N., 2007. Sulfonylurea and glinide reduce insulin content, functional expression of KATP channels, and accelerate apoptotic b-cell death in the chronic phase. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77, 343–350. doi:10.1016/j.diabres.2006.12.021
252. Tesfamariam B., 1994. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic*

- Biol Med 16, 383–91.
253. Timbrell, J., Waterfield, J., Delaney, J., 1996. Correlation between in vivo and in vitro toxic effects of foreign compounds. *Comp. Haematol. Int.* 6, 232–236.
254. Tiwari, A.K., Rao, J.M., 2002. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. *Curr. Sci.* 83, 30–38. doi:10.1016/j.diabet.2013.11.005
255. Tobian, L., MacNeill, D., Johnson, M., Ganguli, M., Iwai, J., 1984. Potassium protection against lesions of the renal tubules, arteries, and glomeruli and nephron loss in salt-loaded hypertensive Dahl S rats. *Hypertension.* 6, 170–6.
256. Torpy, J.M., Lynn, M., Cassio, M., Richard Glass, M., 2007. Type 1 Diabetes. *Hypertension* 1–3. doi:10.1161/01.HYP.0000252408.63189.15
257. Tortora, G., Grabowski, S., 2001. Principe d'anatomie et de physiologie, Du renouveau. ed.
258. Tripathi, B., Srivastava, A., 2006. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit* 12, 130–47.
259. Tsujihara, K., Hongu, M., Saito, K., Inamasu, M., Arakawa, K., Oku, A., Matsumoto, M., 1996. Na⁺-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetics. I. Synthesis and pharmacological properties of 4-dehydroxyphlorizin derivatives based on a new concept. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 1174–1180.
260. Usi, H., 2014. Coma hyperosmolaire.
261. Vaccaro, I., Licenced, N., 2010. Prevalence of Overweight and Obesity Among Adults With Diagnosed Diabetes — United States , 1988-1994.
262. Vasudevan, D., Sreekumari, S., 2007. Text Book of biochemistry for medical students. Japee Brothers Medical Publishers, new delhi.
263. Viala, A., Botta, A., 2007, 2007. Toxicologie, Lavoisier, ed.
264. Vincent, H., Taylor, A., 2006. REVIEW Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes.* 30, 400–418. doi:10.1038/sj.ijo.0803177
265. Watkins, D., Cooperstein, S., Lazarow, A., 1964. Effect of alloxan on permeability of pancreatic islet tissue in vitro.
266. Whiting, D., Guariguata, L., Weil, C., Shaw, J., 2011. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pr.* 94, 311–21.
267. WHO, 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. doi:WHO/NCD/NCS/99.2
268. WHO, 1980. classification of diabetes [WWW Document].

269. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., Hilary, K., 2004. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047–1053. doi:10.2337/diacare.27.5.1047
270. Williams, G.M., 1994. Interventive prophylaxis of liver cancer,. *Eur. J. Cancer Prev.* 3, 89–100.
271. Wright, E.M., Loo, D.D., Panayotova-Heiermann, M., Lostao, M.P., Hirayama, B.H., Mackenzie, B., Boorer, K., Zampighi, G., 1994. “Active” sugar transport in eukaryotes. *J. Exp. Biol.* 196, 197–212.
272. Xin, H., Zhou, F., Liu, T., Li, G., Liu, J., Gao, Z., 2012. Icariin Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetic Retinopathy in Vitro and in Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 866–878. doi:10.3390/ijms13010866
273. Yaseen, G., Ahmad, M., Sultana, S., Kayani, S., 2015. Traditional management of diabetes in Pakistan: Ethnobotanical investigation from traditional health Practitioners. *J. Ethnopharmacol.* doi:10.1016/j.jep.2015.07.041
274. Yetein, M.H., Houessou, L.G., Loughégnon, T.O., Teka, O., Tente, B., 2013. Ethnobotanical study of medicinal plants used for the treatment of malaria in plateau of Allada, Benin (West Africa). *J. Ethnopharmacol.* 146, 154–163. doi:10.1016/j.jep.2012.12.022
275. Yilmazer-Musa, M., Griffith, A.M., Michels, A.J., Schneider, E., Frei, B., 2015. Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase Activity by Tea and Grape Seed Extracts and their Constituent Catechins. *J. Agric. food chemistry* 60, 8924–8929. doi:10.1021/jf301147n.Inhibition
276. Zeng, L., Alongkronrusmee, D., van Rijn, R.M., 2017. An integrated perspective on diabetic, alcoholic, and drug-induced neuropathy, etiology, and treatment in the US. *J. Pain Res.* 10, 219–228. doi:10.2147/JPR.S125987
277. Ziyayat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 58, 45–54.
278. Zupkó, I., Hohmann, J., Rédei, D., Alkay, G., Anicsák, G., Máthé, I., 2001. Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta Med.* 67, 366–368

Résumé

Le diabète sucré est une maladie très fréquente dans le monde entier. Il est traité par l'insuline et les antidiabétiques oraux qui peuvent causer des effets secondaires graves. Pour cette raison et vu leur indisponibilité dans certains cas, les diabétiques se soignent par les plantes médicinales. Notre thème de recherche s'articule autour de plusieurs axes. Le premier était une enquête ethnobotanique menée dans la province de Beni Mellal, nous a conduit à l'investigation de 45 plantes médicinales utilisées traditionnellement pour traiter le diabète surtout de type 2. Parmi ces plantes, *Arbutus unedo* L.

Le présent travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antidiabétique d'*A.unedo* ; espèce vivace qui est très abondante dans la région de Beni Mellal(Maroc). Nous avons réalisé dans un premier temps un screening phytochimique des racines et des feuilles. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative, en fonction de la mesure des composés phénoliques totaux, flavonoïdes et des tanins. Nos résultats ont révélé la présence des tanins, des anthraquinones, des terpénoïdes, des flavonoïdes, et des quinones libres. Les tests de dosage ont montré que l'extrait des racines représente l'extrait le plus riche.

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur la valorisation de l'extrait aqueux d'*A.unedo*, Pour ce faire, nous avons étudié l'activité antioxydante en utilisant le test de piégeage du radical DPPH. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux d'*A.unedo* est associé à une activité antioxydante très intéressante. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antidiabétique *in vitro*, en mesurant l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase et l' α -amylase, et *in vivo* en utilisant le modèle animal STZ/NA-Souris. Nos résultats ont montré que l'extrait aqueux des racines d'*A.unedo* est doué d'un effet inhibiteur remarquable sur l'activité de l' α -amylase et de l' α -glucosidase avec des valeurs, respectivement, d'IC₅₀ de $730,15 \pm 0,25$ et $94,81 \pm 5,99$. De plus, l'extrait a induit une diminution significative de la concentration de glucose dans le sang chez les souris diabétiques. L'étude histologique a montré des changements régénératifs des cellules des îlots pancréatiques à une dose de 500 mg / kg / jour.

A la lumière de ces résultats, nous avons opté à l'explication de l'effet antidiabétique de l'extrait aqueux d'*A.unedo* en mesurant son effet sur l'absorption intestinale du glucose au moyen des Chambres d'Ussing. Nos résultats ont montré que l'extrait de la racine d'*A. unedo* inhibe le co-transporteur Na⁺/glucose au niveau intestinal et par conséquent ralentit

l'absorption intestinal du glucose. Cette étude nous a poussé d'isoler le composé pharmacologiquement actif à partir de racines d'*A.unedo* par la technologie ASE –dionex et HPLC-MS.

Les résultats que nous avons obtenus confirment de façon favorable l'utilisation d'*A.unedo* en médecine traditionnelle marocaine pour le traitement du diabète.

Mots clés : *Arbutus unedo* L, diabète, extrait aqueux, streptozotocine.

Abstract

Diabetes mellitus is a very common disease worldwide. It is treated with insulin and oral antidiabetic drugs that can cause serious side effects. For this reason and given their unavailability in some cases, diabetics are treated with medicinal plants. Our research theme is structured around several axes. The first was an ethnobotanical survey conducted in the province of Beni Mellal, led us to the investigation of 45 medicinal plants traditionally used to treat diabetes mostly type 2. Among these plants, *Arbutus unedo* L.

The present work aims to evaluate the antidiabetic activity of *A. unedo*; perennial species that is very abundant in the region of Beni Mellal (Morocco). We first performed a phytochemical screening of the roots and leaves. This was confirmed by a quantitative analysis, based on the measurement of the total phenolic compounds, flavonoids and tannins. Our results revealed the presence of tannins, anthraquinones, terpenoids, flavonoids, and free quinones. The assay tests showed that the root extract is the richest extract.

Subsequently, we focused on the valorisation of the aqueous extract of *A.unedo*. To do this, we studied the antioxidant activity using the DPPH radical scavenging test. The results obtained showed that the aqueous *A.unedo* extract is associated with a very interesting antioxidant activity. In a second step, we studied the antidiabetic activity in vitro, by measuring the inhibitory activity of α -glucosidase and α -amylase, and in vivo using the animal model STZ / NA-Mouse. Our results showed that *A.unedo*'s aqueous root extract is endowed with a remarkable inhibitory effect on the activity of α -amylase and α -glucosidase with IC50 values, respectively. 730.15 ± 0.25 and 94.81 ± 5.99 . In addition, the extract induced a significant decrease in glucose concentration in the blood in diabetic mice. The histological study showed regenerative changes in pancreatic islet cells at a dose of 500 mg / kg / day.

In the light of these results, we opted for the explanation of the antidiabetic effect of the aqueous extract of *A.unedo* by measuring its effect on the intestinal absorption of glucose by means of the Ussing Chambers. Our results showed that the root extract of *A. unedo* inhibits the co-transporter Na⁺ / glucose intestinal level and therefore slows the intestinal absorption of glucose. This study prompted us to isolate the pharmacologically active compound from *A.unedo* roots using Dionex-ASE and HPLC-MS technology.

The results we obtained confirm favorably the use of *A. unedo* in traditional Moroccan medicine for the treatment of diabetes.

Key words: *Arbutus unedo* L, diabetes, aqueous extract, streptozotocin

ملخص

داء السكري مرض شائع جدا في جميع أنحاء العالم. يتم علاجه بالأنسولين والأدوية المضادة عن طريق الفم والتي يمكن أن تسبب آثارًا جانبية خطيرة. لهذا السبب، ونظرا لعدم توافرها في بعض الحالات، يتم علاج مرضى السكري بالنباتات الطبية. يتمحور موضوع بحثنا حول عدة محاور. الأول كان مسحًا عرقيًا في محافظة بني ملال، قادنا إلى البحث في 45 نوعًا من النباتات الطبية المستخدمة عادة لعلاج مرض السكري من النوع 2. و من بين هذه النباتات، *Arbutus unedo L*.

يهدف هذا العمل إلى تقييم نشاط مضاد السكري لـ *A.unedo* والذي يعتبر من الأنواع المعمرة الغزيرة جدا في منطقة بني ملال (المغرب). أجرينا أولاً الفحص الكيميائي النباتي للجذور والأوراق. وقد تأكد هذا من خلال التحليل الكمي، استنادا إلى قياس مجموع الفينول، الفلافونويد والتانينات. وكشفت نتائجنا عن وجود التانينات، أنثراكينون، تريبيونيد، فلافونويد، و كوينون الحرة. وأظهرت اختبارات الفحص أن مستخلص الجذر هو أغنى خلاصة.

بعد ذلك، ركزنا على تحديد قيمة المستخلص المائي لـ *A.unedo*، ولتحقيق ذلك، قمنا بدراسة نشاط مضادات الأكسدة باستخدام اختبار الكسح الجذري DPPH. النتائج التي تم الحصول عليها أظهرت أن مستخلص *A.unedo* مائي مرتبط بنشاط مضاد للأكسدة. في الخطوة الثانية، درسنا النشاط المضاد لمرض السكر في المختبر، وقياس النشاط التثبيطي لألفا - أميلاز و ألفا - جلوكوسيداز، وفي الجسم الحي باستخدام نموذج حيواني STZ / NA - ماوس. أظهرت نتائجنا أن مستخلص جذور *A.unedo* المائي له تأثير مثبط ملحوظ على نشاط ألفا - أميلاز و ألفا - جلوكوسيداز مع قيم IC_{50} ، على التوالي. من 0.25 ± 730.15 و 5.99 ± 94.81 . إضافة إلى ذلك، تسبب المستخلص في حدوث انخفاض معنوي في تركيز الجلوكوز في الدم لدى الفئران المصابة بداء السكري، وأظهرت الدراسة النسيجية تغيرات متجددة في خلايا الجزيرة البنكرياسية بجرعة 500 ملغم / كغ / يوم.

في ضوء هذه النتائج، اخترنا تفسير التأثير المضاد لمرض السكر لمستخلص مائي من *A.unedo* من خلال قياس تأثيره على الامتصاص المعوي للجلوكوز عن طريق غرف الاستخدام. أظهرت نتائجنا أن مستخلص الجذر من *A.unedo* يمنع الناقل المشترك المشارك في $Na +$ مستوى الأمعاء الجلوكوز، وبالتالي يبطئ امتصاص الأمعاء من الجلوكوز. هذه الدراسة دفعتنا إلى عزل المركب الفعال دوائيا من جذور *A.unedo* باستخدام ASE-dionex و HPLC-MS.

النتائج التي حصلنا عليها تؤكد بشكل إيجابي استخدام *A.unedo* في الطب المغربي التقليدي لعلاج مرض السكري.

الكلمات المفتاحية: *Arbutus unedo L*، السكري، المستخلص المائي، الستربتوزوتوسين.

Utilisez-vous les plantes traditionnelles pour traiter le diabète ?

Oui

Non

Si oui, les quelles ?

| Plante | Partie utilisée | Mode de préparation |
|--------|-----------------|---------------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Dose utilisée : Pincée poignée Cuillerée

• Dose précise : Quantité en g / verre

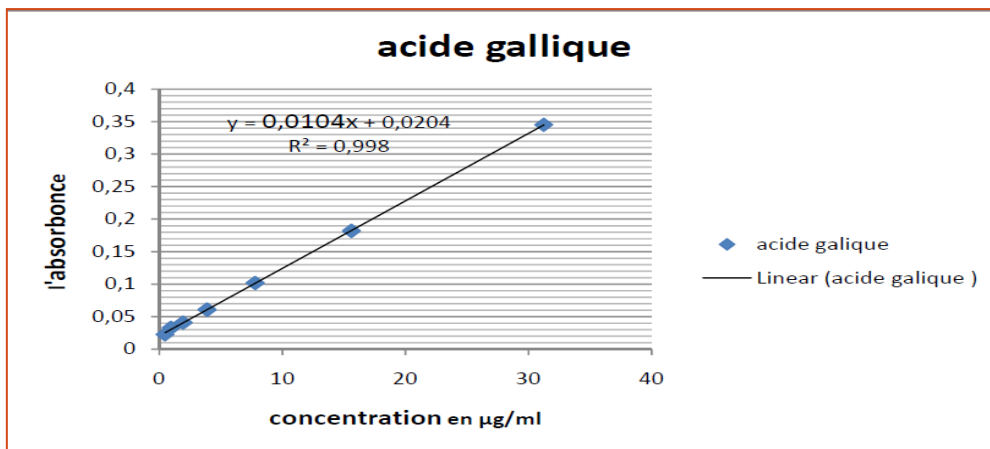
Quantité en g/ litre

Autres.....

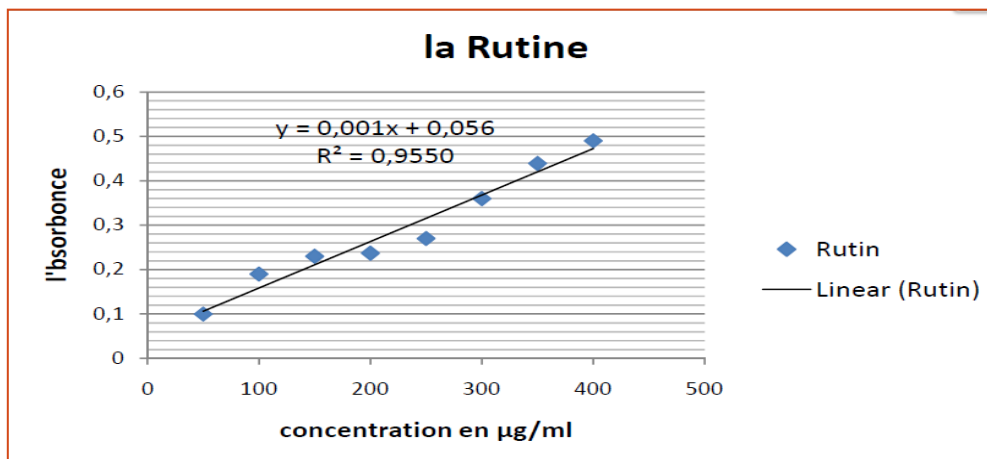
Mode d'administration : Oral Massage Rinçage

Badigeonnage Autres

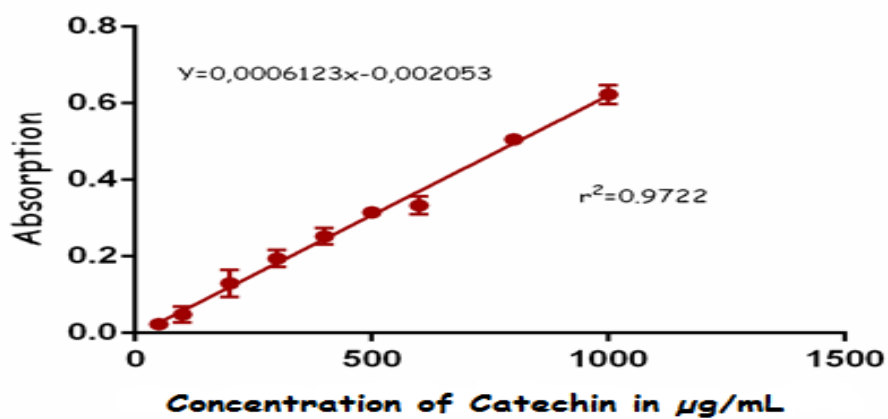
Annexe 2



Courbe de l'étalonnage de l'acide gallique



Courbe de l'étalonnage de la Rutine



Courbe de l'étalonnage de la catéchine

Annexe 3

