



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES.
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Végétale et Environnement

Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes.

Intitulé

Contribution à l'étude des activités biologiques de deux plantes médicinales algériennes à effet antidiabétique.

Présenté par : M^{elle} OUCHTATI Sara

Membres du Jury

Président	Mr. TAHAR Ali	Professeur	Université Annaba
Promotrice	Mme.SERIDI Ratiba	Professeure	Université Annaba
Co-promoteur	Mr. EL-SHORA Hamed	Professeur	Université El-Mansoura Egypte
Examineur	Mr.TERFAYA Moncef	MCA	Université Annaba Mokhtar
Examineur	Mr.BOUGHENDJIOUA Hicham	MCA	ENSET Skikda
Examinatrice	Mme. SERIDI Saida	MCA	Université Guelma

Année universitaire : 2019 -2020

Production scientifique

✓ **Publication:**

Ouchtati S. Seridi R et El-Shora H. 2019. Influence of *Rhamnus alaternus* L leaf extract on normal and alloxane-induced Diabetic rats. Bioscience Research Journal, 2019 16(2): 2009-2016.

✓ **Communications Internationales :**

Ouchtati S. Sofiane I et Seridi R. 2014. Etude phytochimique et anatomique de *Citrullus colocynthis* L. de la région de Boussaâda d'Algérie. AF100. III^{ème} Congrès International de l'Association Tunisienne de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR) de 21 au 23 Mars 2014, Hôtel Itropika– Tabarka

Ouchtati S. Sofiane I. Sassoui D et Seridi R. 2015. Screening chimique et extraction des principes actifs de *Citrullus colocynthis* L. de la région de Boussaâda, d'Algérie. International Seminar on the valuation of aromatic and Medicinal Plants of the Mediterranean. Algeria, Blida, 11 and 12 november 2015.

Ouchtati S. El-Shora H et Seridi R. 2018. Activité antimicrobienne des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus* L .AF 266. VI^{ème} congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 mars 2018 à Tabarka.

✓ **Communication Nationale :**

Ouchtati S. Seridi R. et EL-Shora H. 2019. Effet allélopathique de l'extrait aqueux de feuille de *Citrullus colocynthis* L. sur *Chenopodium album*. Second National Symposium Plant Protection in Arid Regions Tuesday, November 12, 2019. Biskra. Algeria.

A mes très chers parents

A mes sœurs Houda et Assia

A mes frères Yacine, Nasesreddine , et Mohamed Lamine

A mes neveux Abdel Rhamane, Wassim et Abdelbrahim

A mes nièces Istarek, Israa, Assil et Saja

A Toute ma famille

A tous mes amis

Je dédie cette thèse

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire de Biologie Végétale et Environnement Université Annaba, le Laboratoire de Pharmacologie de Centre de Recherche et de Développement Saidal, Alger, et le Laboratoire de Physiologie Végétale Université Mansorah, Egypte.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à ma directrice de thèse et directrice de laboratoire de Biologie Végétale, Axe: Plantes Médicinale, madame la Professeur e Seridi Ratiba qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail je lui exprime mes sentiments de reconnaissance les plus s'incères pour sa précieuse aide, et de m'avoir accordé sa confiance et guidé dans mon travail tout au long de ces années.

J'exprime mes sincères remerciements à mon Co-encadreur Professeur Hamed El-Shora, qui a permis le bon déroulement de ma thèse dans des meilleures conditions, je le remercie chaleureusement de sa contribution effective à ce travail, en veillant au bon déroulement de mes expériences dans son laboratoire de Physiologie Végétale à l'université d'Al-Mansourah en Egypte.

Je remercie également mes dames Azine Kinza chef de laboratoire de Pharmacologie à Saidal (Alger), et Boubakeur S.Chef de laboratoire de Chimie Analytique à Saidal, pour leurs accueils et leurs aides, hommage respectueux.

Je remercie tous les membres de jury qui ont accepté de juger la qualité de ce travail

Monsieur Tahar Ali Professeur au département de Biologie à l'université d'Annaba qui m'a soutenu scientifiquement et

moralemment je le remercie chaleureusement, c'est grâce a lui que j'ai appris l'étude statistique.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements à Dr. Boughendjoua Hicham Maître de Conférence Classe A à L'Ecole Normale Supérieure D'enseignement Technologique De Skikda (ENSET) pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier Madame Seridi Saida Maître de Conférence Classe A à l'université de Guelma pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Résumé :

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude de deux espèces médicinales algériennes : *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L., espèces réputées pour leurs vertus curatives, nous avons ainsi étudié l'anatomie des organes, la composition phytochimique, la toxicité aiguë et l'activité biologique *in vitro* et *in vivo* chez le rat.

La composition chimique de l'EMR et l'EMC par HPLC a révélé la présence de 16 composants phénoliques pour le *Rhamnus* et 12 pour le *Citrullus*. Le composant dominant est la rutine. L'analyse chromatographique des acides aminés a révélé que la proline était l'acide aminé le plus dominant dans les feuilles des deux espèces avec d'autres acides aminés pour chacune des deux espèces.

L'activité antimicrobienne des extraits organiques de feuilles des deux espèces vis-à-vis des souches pathogènes testées, indique que l'extrait de méthanol était l'inhibiteur le plus fort pour les deux espèces. Cependant, les extraits de *Rhamnus alaternus* L. ont montré un effet inhibiteur plus faible que celui de *Citrullus colocynthis* L.

L'activité anti-oxydante des divers extraits de feuilles des deux espèces avec des concentrations croissantes qui a été étudiée à l'aide du DPPH montre que les trois extraits présentaient des activités de piégeage appréciables et l'activité anti-radicalaire augmente proportionnellement à la concentration de ces trois extraits. Les extraits de la coloquinte présentent une activité piégeante supérieure à celle des extraits de nerprun alaterne.

L'étude de toxicité orale aiguë de l'extrait méthanolique de coloquinte et de nerprun alaterne sur des souris albinos a montré une DL50 de 720mg/kg pour l'EMC et 680,79 mg/kg pour l'EMR; selon l'échelle de la toxicité ces deux extraits sont considérés comme des extraits "presque non toxiques".

L'activité antidiabétique a été testée par l'EMR et l'EMC sur des rats normaux et des rats rendus diabétique par l'alloxane. L'EMR a montré une réduction non significative de la glycémie ($P > 0,05$). Cet extrait a également réduit le poids corporel des rats de manière très significative ($p < 0,0001$). En outre, ces deux extraits ont amélioré d'autres paramètres biochimiques tels que l'urée sérique, la protéine sérique, la créatinine sérique, le cholestérol sérique et les triglycérides sériques. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par l'EMC.

Mots clés: *Citrullus colocynthis* L., *Rhamnus alaternus* L., HPLC., étude *in vitro*, activité antidiabétique.

ملخص :

يهدف هذا العمل الى دراسة نوعين من النباتات الطبية الجزائرية هما *Rhamnus* و *Citrullus colocynthis* *alaternus* L و المعروفين بخصائصهما الطبية العلاجية الفعالة, في هذه الدراسة قمنا بعمل مقاطع عرضية لاعضاء كلا النباتين لمعرفة انسجتها الخلوية كما تطرقنا الى عمل تحليل كيميائي لمعرفة تركيبتهما الكيميائيتين الضوئيتين, قمنا كذلك بدراسة درجة السمية للمستخلص الميثانولي لكلا النباتين كما قمنا بعدة تجارب مخبرية على الميكروبات و الالفيران للتعلمق في مدى فعالية مستخلصات النباتين.

كشف التركيب الكيميائي لـ *EMR* و *EMC* بواسطة *HPLC* عن وجود 16 مكوناً فينولياً لـ *Rhamnus* و 12 مكوناً من الفينول لسيترولس ، أهمها روتين. كشف التحليل الكروماتوجرافي للأحماض الأمينية أن البرولين هو أكثر الأحماض الأمينية السائدة في أوراق نوعين من الأحماض الأمينية الأخرى لكل نوع.

أشار النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات الأوراق العضوية لنوعين ضد السلالات الممرضة التي تم اختبارها إلى أن مستخلص الميثانول كان أقوى المانع لكلا النوعين. ومع ذلك ، أظهرت مقتطفات من *Rhamnus alaternus* L تأثير مثبط أقل من تلك *Citrullus colocynthis* L.

يظهر نشاط مضادات الأكسدة في المستخلصات الورقية المختلفة لنوعين بتركيزات مختلفة والتي تمت دراستها باستخدام DPPH أن المستخلصات الثلاثة أظهرت أنشطة محاصرة ملحوظة وأن النشاط المضاد للجذور يزداد بزيادة التركيز كما اثبتت الدراسة ان المستخلصات العضوية لنبات *Citrullus colocynthis* L لديها نشاط محاصرة متفوقه اكثر من مستخلصات نبات *Rhamnus alaternus* L.

أظهرت دراسة السمية الحادة عن طريق الفم لمستخلص الميثانول للنباتين على في الفئران البيضاء أن المستخلص الميثانولي لكلا النباتين يعتبر غير سام كما ان النسب التي تقتل نصف عدد الفئران المستعملة في الدراسة لكلا النباتين قدرت ب 720 مغ/كغ بالنسبة لنبات *Rhamnus alaternus* L و 680.79 مغ/كغ بالنسبة لنبات *Citrullus colocynthis* L.

النشاط المضاد لمرض السكر الذي تم اختباره بواسطة مستخلص الميثانول لاوراق *Citrullus colocynthis* L. ومستخلص الميثانول لاوراق *Rhamnus alaternus* L. على الجرذان العادية و الرذان المصابة بالسكري تحت تأثير alloxan أظهران مستخلص الميثانول من *Rhamnus alaternus* L. خفض نسبة الجلوكوز في الدم ($P > 0.05$). يقلل هذا المستخلص أيضاً قام بتخفيض كبير في وزن الجسم (ع > 0.0001) بالإضافة إلى انه قام بتحسين العديد من العوامل الكيميائية الحيوية الأخرى مثل البول والمصل والبروتين والكرياتينين والكوليسترول في الدم الدهون الثلاثية في الدم.

تعتبر هذه النتائج مشابهة كثيراً للنتائج المتحصل عليها من طرف المستخلص الميثانولي لنبات *Citrullus colocynthis* L.

الكلمات المفتاحية: *Citrullus colocynthis* L. ، *Rhamnus alaternus* L. ، *HPLC*، لدراسة مختبرية ، نشاط مضاد لمرض السكر.

Abstract :

In this work we are interested in the study of two Algerian medicinal species including *Citrullus colocynthis* L. and *Rhamnus alaternus* L., species known for these healing virtues, we thus studied the anatomy of its organs, its photochemical compositions, its acute toxicities and its biological activities *in vitro* and *in vivo* in rats.

The chemical composition of the EMR and the EMC by HPLC revealed the presence of 16 phenolic components for *Rhamnus alaternus* L. and 12 phenolic components for *Citrullus colocynthis* L., the main ones being rutin. Chromatographic analysis of amino acids revealed that proline was the most dominant amino acid in the leaves of two species with other amino acids for each species.

The antimicrobial activity of the organic leaf extracts of two species against the pathogenic strains tested indicated that the methanol extract was the strongest inhibitor for both species. However, extracts of *Rhamnus alaternus* L. showed a lower inhibitory effect than those of *Citrullus colocynthis* L.

The antioxidant activity of the various leaf extracts of two species at different concentrations that was studied using DPPH shows that the three extracts exhibited appreciable trapping activities and the anti-radical activity increases with increasing concentration of these three extracts. The extracts of the colocynth have a trapping activity superior to that of *Rhamnus* extracts.

The acute oral toxicity study of the methanolic extract of colocynth and alaterne buckthorn in albino mice showed an LD50 of 720mg / kg for EMC and 680.79 mg / kg for EMR according to the toxicity these two extracts are considered almost nontoxic extracts.

The antidiabetic activity that was tested by EMR and EMC on normal rats and made diabetes by alloxane, revealed that the methanol extract from leaves of *Rhamnus alaternus* L. showed a non-significant reduction in blood sugar ($P > 0.05$). This extract also reduced body weight in a very highly significant way ($p < 0.0001$) as well as improved other biochemical parameters such as serum urea, serum protein, serum creatinine, serum cholesterol and serum triglycerides. These results are similar to that the methanol extract from leaves of *Citrullus colocynthis* L.

Key words: *Citrullus colocynthis* L., *Rhamnus alaternus* L., HPLC., *In vitro* study, antidiabetic activity.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Partie I : Etude bibliographique.....	4
Chapitre I : Aperçu sur <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	5
1.1. <i>Citrullus colocynthis</i> L.	5
1.1.1. Généralités sur la famille des Cucurbitacées.....	5
1.1.2. Position dans la systématique botanique de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	5
1.1.3. Nomenclature de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	5
1.1.4. Caractères botaniques de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	6
1.1.5. Répartition géographique de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	7
1.1.6. Utilisation traditionnelle de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	8
1.1.7. Toxicité de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	8
1.2. <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	9
1.2.1. Généralités sur la famille des Rhamnacées	9
1.2.2. Position systématique de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	9
1.2.3. Nomenclature de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	10
1.2.4. Caractères bontaniques de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	10
1.2.5. Répartition géographique de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	11
1.2.6. Utilisation traditionnelle de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	11
1.2.7. Toxicité de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	12
Chapitre II : Les métabolites secondaires.....	13
2.1. Composés phénoliques	13
2.1.1. Flavonoïde.....	13
2.1.2. Les tanins	13
2.1.3. Les anthocyanes.....	13
2.1.4. Les coumarines.....	13
2.1.5. Les saponosides.....	13
2.2. Les alcaloïdes.....	14
2.3. les huilles essentielles.....	14
2.4. Les enzymes antioxydants.....	14
2.4.1.Le superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.11).....	14
2.4.2. La catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	15
2.4.3. L'ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11)	15

2.4.4. La glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.7)	15
5. L'acide ascorbique	15
6. Le glutathion	16
Chapitre III : Les activités biologiques	17
3.1. L'activité antimicrobienne	17
3.1.1. Les principales substances antimicrobiennes	17
✓ Les antibiotiques	17
✓ Les composés phénoliques	17
3.1.2. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens.....	18
✓ <i>Escherichia coli</i>	18
✓ <i>Staphylococcus aureus</i>	18
✓ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
✓ <i>Bacillus cereus</i>	18
✓ <i>Bacillus subtilis</i>	18
✓ <i>Candida albicans</i>	19
✓ <i>Aspergillus sp</i>	19
3.2. Activité antioxydante	19
3.3. Activité antidiabétique.....	20
3.3.1. Types des diabètes sucrés.....	21
✓ Le diabète de type 1.....	21
✓ Le diabète de type 2.....	21
✓ Le diabète gestationnel.....	22
✓ Autre type de diabète sucré.....	22
3.3.2. Critères diagnostiques de diabète sucré.....	23
3.3.3. Hyperglycémie chronique et complications organiques.....	23
3.3.4. le diabète et le stress oxydatif.....	23
Partie II : Etude expérimentale	24
1. Présentation des stations d'étude de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L..	25
1.1. Présentation de Boussaâda Station d'étude de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	24
1.2. Présentation de la péninsule de l'Edough Station d'étude de <i>Rhamnus alaternus</i> L..	24
2. Matériel végétal	26
2.1. Choix, identification et récolte de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L	26
2.1.1. Traitement des échantillons :(séchage, broyage).....	26

2.2. Méthodes d'analyse	27
2.2.1 Etude anatomique de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.	27
2.2.2. Etude phytochimique de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	28
2.2.3 Analyse qualitatives (screening chimique) de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.	28
✓ Tanins	28
✓ Anthocyanes	28
✓ Leuco-anthocyanes	28
✓ Saponosides.....	29
✓ Alcaloïdes	29
✓ Flavonoïdes.....	29
✓ Cardinolides.....	29
✓ Terpènes et stérols	29
✓ Quinones.....	29
✓ Amidon.....	30
✓ Coumarine.....	30
2.2.4. Analyse quantitative.....	30
Tanins.....	30
✓ Flavonoïdes	31
✓ Polyphénols totaux.....	32
✓ Ascorbate.....	33
✓ Le glutathion.....	34
✓ Protéines totaux.....	35
✓ Proline libre.....	35
2.2.5. Evaluation des activités enzymatiques.....	36
✓ L'ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11).....	36
✓ La catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	36
✓ Le superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	37
✓ La glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.7).....	37
2.2.6. Analyse chromatographique des phénols totaux et des flavonoïdes	37
2.2.7. Composition de <i>Citrullus colocynthis</i> L et <i>Rhamnus alaternus</i> L en acides aminés...	38
2.2.8. Etude in vitro.....	38

2.2.8.1. Activité antimicrobienne des extraits organiques de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	38
• Activité antibactérienne.....	39
• Activité antifongique	39
2.2.8.2. Activité anti-oxydante des extraits organiques de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L. par le radicale libre DPPH	39
2.2.9. Etude in vivo.....	40
2.2.9.1. Toxicité aigue des extraits de méthanol de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	41
2.2.9.2 Activité hypoglycémiante des extraits de méthanol de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L. (Test de tolérance de glucose).....	42
❖ Analyse statistique.....	44
2.2.9.3. Etude à long terme de l'activité antidiabétique des extraits méthanoliques de <i>C. colocynthis</i> L (EMC) et <i>R. alaternus</i> L (EMR) chez des rats normaux (sains) et des rats diabétiques	44
✓ Dosage de la glycémie.....	46
✓ Dosage de l'urée.....	47
✓ Dosage de cholestérol	47
✓ Dosage de triglycérides	48
✓ Dosage des protéines.....	48
❖ Analyse statistique	49
Partie III : Résultats et Discussion.....	50
1. Histologie des deux espèces	51
1.1. Structure anatomique des organes de <i>Citrullus colocynthis</i> L (Feuilles, tiges).....	51
✓ Histologie de la feuille de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	51
✓ Histologie de la tige de <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	53
1.2. Structure anatomique des organes de <i>Rhamnus alaternus</i> L.(Feuilles, tiges).....	55
✓ Histologie de la feuille de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	55
✓ Histologie de la tige de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	58
2. Screening phytochimique de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	59
2.1. <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	59
2.2. <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	60
3. Variation des teneurs en métabolites secondaires de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et de	

<i>Rhamnus alaternus</i> L.....	63
3.1. Teneur en Tanins dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	63
3.2. Teneur en flavonoïdes dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	64
3.2. Teneur en polyphénol totaux dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	66
3.3. Teneur en ascorbate total dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles <i>Rhamnus alaternus</i> L.	69
3.4. Teneur en glutathion dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	69
3.5. Teneur de la proline dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	71
3.6. Evaluation des activités enzymatiques des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	72
3.6.1. L'ascorbate peroxydase (APX).....	72
3.6.2. Le catalase (CAT).....	73
3.6.3. Le superoxyde dismutase (SOD).....	74
3.6.4. Le glutathion réductase (GR).....	75
3.7. Composition chimique en poly-phénols des extraits de méthanol des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	76
3.7.1. <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	76
3.7.2. <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	77
3.8.. Composition chimique en flavonoïdes des extraits de méthanol des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	79
3.8.1. <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	79
3.8.2. <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	80
3.9. Composition chimique en acides aminés contenus dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	81
3.9.1. <i>Citrullus colocynthis</i> L.....	81
3.9.2. <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	83
4. Activité antimicrobienne des extraits organiques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L et de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L	85

4.2.Activité antibactérienne des extraits organiques des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	85
4.3.Activité antifongique des extraits organiques des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L..	86
4.4.Activité antifongique des extraits organiques des feuilles de. <i>Rhamnus alaternus</i> L.	88
5.Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	90
5.1.Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L..	90
5.2.Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L	91
6.Toxicité aigue des extraits de méthanol de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	94
7. Tolérance de glucose (test de surcharge) des extraits méthanoliques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et de feuilles <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	96
7.1. Effet de l'EMC suite à un test de tolérance orale de glucose.....	96
7.2.. Effet de l'EMR suite à un test de tolérance orale de glucose	97
8.Activité antidiabétique à long terme des extraits méthanoliques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. (EMC) et de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.(EMR).....	98
8.1. Effet de l'EMC sur les rats normaux et diabétiques traité par l'alloxane.....	98
8.1.1. Evaluation du poids corporel.....	98
8.1.2. Effet de l'EMC sur la glycémie à juin des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane.....	100
8.1.3.Effet de l'EMC sur l'urée des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane...	101
8.1.4.. Effet de l'EMC sur la protéine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	101
8.1.5. Effet de l'EMC sur la créatine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane.....	102
8.1.6. Effet de l'EMC sur le cholestérol des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	102
8.1.7. Effet de l'EMC sur les triglycérides des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	103
8.2.Effet de l'EMR sur les rats normaux et diabétiques traité par l'alloxane.....	104
8.2.1. Evaluation du poids corporel.....	104

8.2.2. Effet de l'EMR sur la glycémie à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane.....	105
8.2.3.Effet de l'EMR sur l'urée des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane...	106
8.2.4.Effet de l'EMR sur la protéine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	107
8.2.5. Effet de l'EMR sur la créatine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	107
8.2.6.Effet de l'EMR sur le cholestérol des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	108
8.2.7. Effet de l'EMR sur les triglycérides des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	109
Conclusion générale.....	
Références bibliographiques.....	
Annexes	

Les abréviations

SOD : le superoxide dismutase

CAT : La catalase

APX : L'ascorbate peroxydase

GR : La glutathion réductase

OMS : organisation mondial de la santé

ADA : association américaine de diabète

DG : Le diabète gestationnel

ROS : espèces réactives de l'oxygène

R. alaternus L. : *Rhamnus alaternus L.*

C. colocynthis L. : *Citrullus colocynthis L.*

GSSG : glutathion oxydée

HPLC : Chromatographie en phase liquide

CRD : Centre de Recherche et de Développement

EMC : Extrait méthanolique de *Citrullus colocynthis L.*

EMR : Extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus L.*

ERO : Espèces réducteurs de l'oxygène

DL50 : dose létale 50

ST+ : lot des rats sains témoins positifs

ST- : lot des rats sains témoins négatifs

D+ : lot des rats diabétiques témoins positifs

D- : lot des rats diabétiques témoins négatifs

SC : lot des rats sains subis l'extrait de coloquinte

DC : lot des rats diabétiques subis l'extrait de coloquinte

SR : lot des rats sains subis l'extrait de nerprun alaterne

DR : lot des rats diabétiques subis l'extrait de nerprun alaterne

TTGO : test de tolérance orale au glucose

EMC 250 : extrait méthanolique de coloquinte à 250 mg/kg.pc

EMC 500 : extrait méthanolique de coloquinte à 500 mg/kg.pc

EMR 300 : extrait méthanolique de nerprun alaterne à 300 mg/kg.pc

EMR 600 : extrait méthanolique de nerprun alaterne à 600 mg/kg.pc

NG300 : rats normaux subit 300 mg/kg.pc de Glibenclamide

DG300 : rats diabétique subit 300 mg/kg.pc de Glibenclamide

NNaCl : rats normaux subit 10ml/kg.pc de Nacl

DNaCl : rats diabétique subit 10ml/kg.pc de Nacl

NC250 : rats normaux subit 250 mg/kg.pc d'extrait méthanolique de coloquinte

DC250 : rats diabétiques subit 250 mg/kg.pc d'extrait méthanolique de coloquinte

NR300 : rats normaux subit 300 mg/kg.pc d'extrait méthanolique de nerprun alaterne

ND300 : rats diabétiques subit 300 mg/kg.pc d'extrait méthanolique de nerprun alaterne

Liste des figures

1	Les organes de <i>Citrullus colocynthis</i> L. (a):Aspect générale de <i>Citrullus colocynthis</i> L. (b): fleurs et feuilles. (c): fruit et feuilles. (d) : fruit détaillé.	7
2	Feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	11
3	Fleurs de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	11
4	Fruits de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	11
5	Localisation géographique du site d'étude de <i>Citrullus colocynthis</i> L. Source : Google maps	25
6	Localisation géographique du site d'étude de <i>Rhamnus alaternus</i> L. Source : Google maps	26
7	Séchage des feuilles et tige de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	27
8	Séchage des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	27
9	Forme libre et réduite du DPPH	40
10	Gavage de souris par l'EMR (toxicité aigue)	41
11	Mesure de la glycémie (activité hypoglycémiante)	44
12	Induction de diabète expérimental par l'alloxane	45
13	Prélèvement du sang par voie rétro-orbitaire	46
14	Coupe transversale de feuille de <i>Citrullus colocynthis</i> L. A : vue générale de la feuilles (G×10), B : Nervure principale de feuille de coloquinte (G×40), C: Limbe de feuille de coloquinte (G×40). Ep inf : épiderme inférieur ; Ep sup : épiderme supérieur ; Sc : sclérenchyme ; Pa : parenchyme ; Pam : parenchyme à méat, XyI : xylème primaire ; Xy II : xylème secondaire ; PhI : phloème primaire ; Ph II : phloème secondaire ; Ca : cambium ; Pt : poil tecteur.	52
15	Coupe transversale de tige de <i>Citrullus colocynthis</i> L. A : vue générale de la tige (G×10), B : cortex de coloquinte (G×40), C: poils tecteur de coloquinte (G×40). Ep inf : épiderme inférieur ; Ep sup : épiderme supérieur ; Sc : sclérenchyme ; Pa : parenchyme ; Pam : parenchyme à méat, XyI : xylème primaire ; Xy II : xylème secondaire ; PhI : phloème primaire ; Ph II : phloème secondaire ; Ca : cambium ; Pt : poil tecteur.	54
16	Coupe transversale de la feuille [ES : Epiderme supérieur, PP : Parenchyme palissadique, PL : Parenchyme lacuneux , NP : Nervure principale, EI : Epiderme inférieur, CU : Cuticule, PT : Poil tecteur, CE : cellules épidermiques, X : Xylème, PH : Phloème, CO : collenchyme, SC :	56

	Sclérenchyme, S : stomate] , (G) : coupe transversale de la feuille ; le limbe [ES : Epiderme supérieur, PP : Parenchyme palissadique, EI :Epiderme inferieur (X 04, X10, X40)	
17	(A), (B), (C), (D), (E), (F) : coupes transversales de la tiges.[PT :poil tecteur CU : cuticule, E : Epiderme, PC : Parenchyme Cortical, FCV : Faisceaux cribro-vasculaire, X : xylème, PH : Phloème, M : moelle (X 04, X10, X40)	57
18	Teneur en tanins dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	63
19	Teneur en flavonoïdes dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	65
12	Teneur en polyphénols totaux dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.	66
21	Teneur de l'ascorbate dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	69
22	Teneur en glutathion dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	70
23	Teneur de la proline dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	71
24	Activité de l'APX dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	73
25	Activité de CAT dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	74
26	Activité de SOD dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	75
27	Activité de GR dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	76
28	Compositions chimique de l'EMC en polyphénols	77
29	Composition chimique de l'EMR en polyphénols	78
30	Composition chimique de l'EMC en flavonoïdes.	79
31	Composition chimique de l'EMR en flavonoïdes.	80
32	Composition chimique des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. en acides aminés.	82
33	Composition chimique de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L. en acide aminées	83

34	Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	85
35	Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	87
36	Activité antifongique des extraits organiques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	88
37	Activité antifongique des extraits organiques de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	89
38	Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	91
39	Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	92
40	Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de <i>Citrullus colocynthis</i> L. (EMC) et soumis à un test de tolérance orale de glucose	96
41	Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de <i>Rhamnus alaternus</i> L. (EMR) et soumis à un test de tolérance orale de glucose.	98
42	Variation de poids corporels des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane traités par EMC pendant 14 jours	99
43	Variation de la glycémie à jeun des rats normaux et rendus diabétique par l'alloxane traités par EMC	100
44	Variation de poids corporels des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane traités par EMR pendant 14 jours	105
45	Variation de poids corporels des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane traités par EMR pendant 14 jours $p > 0.05$	106

Liste des tableaux

1	Critères diagnostiques de diabète sucré	23
2	La gamme d'étalonnage de la quercétine	32
3	La gamme d'étalonnage de l'acide gallique	33
4	Doses testés de la toxicité aigue	41
5	Répartition par lot des rats seins (normaux) et diabétiques utilisés dans le test d'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits de méthanol des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L et <i>Rhamnus alaternus</i> L à long terme .	45
6	Screening chimique de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	59
7	Screening chimique de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	60
8	Composition chimique de <i>Citrullus colocynthis</i> L et <i>Rhamnus alaternus</i> L	62
9	Teneur en tanins dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	63
10	Teneur en flavonoïdes dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	65
11	Teneur en polyphénols totaux dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et <i>Rhamnus alaternus</i> L.	66
12	Teneur de l'ascorbate dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	69
13	Teneur en glutathion dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	70
14	Teneur en proline dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	71
15	Activité de l'APX dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	72
16	Activité de CAT dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	73
17	Activité de SOD dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	74
18	Activité de GR dans les feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. et dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	75

19	Compositions chimique de l'EMC en polyphénols	77
20	Composition chimique de l'EMR en polyphénols	78
21	Composition chimique de l'EMC en flavonoïdes.	79
22	Composition chimique de l'EMR en flavonoïdes.	80
23	Composition chimique des feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L. en acides aminés	82
24	Composition chimique des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L. en acide aminées	83
25	Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	85
26	Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i>	86
27	Activité antifongique des extraits organiques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i>	88
28	Activité antifongique des extraits organiques de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	89
29	Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i>	90
30	Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i>	92
31	Echelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs selon Hodge et Sterner	94
32	Pourcentage de mortalité des souris suite à une administration d'EMC	94
33	Pourcentage de mortalité des souris suite à une administration d'EMR	95
34	Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de <i>Citrullus colocynthis</i> L. (EMC) et soumis à un test de tolérance orale de glucose	96
35	Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de <i>Rhamnus alaternus</i> L. (EMR) et soumis à un test de tolérance orale de glucose	97
36	Effet de l'EMC sur la variation de poids corporel à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	99
37	Effet de l'EMC sur la glycémie à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	100
38	Variation de l'urée chez les rats normaux et diabétiques traités par EMC	101
39	Variation de la protéine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMC	102
40	Variation de la créatine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par l'EMR	102
41	Variation du cholestérol sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par	103

	l'EMC	
42	Variation du triglycéride sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par l'EMC	103
43	Effet d'EMR sur le poids corporel des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	104
44	Effet l'EMR sur la glycémie à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	105
45	Variation de l'urée chez les rats normaux et diabétiques traités par l'extrait d'EMR	107
46	Variation de la protéine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par l'EMR	107
47	Variation de la créatine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMR	108
48	Variation du cholestérol sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par l'EMR	108
49	Variation du triglycéride sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par l'EMR	109

Introduction générale

Introduction

Dans les pays en voie de développement, entre 70 et 95% de la population a recours aux Plantes Médicinales pour les soins primaires par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. Il est estimé qu'au moins de 25% de tous les médicaments modernes sont dérivés directement ou indirectement des plantes, et ceci grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs. Ces derniers tournent vers des soins moins agressifs. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (**Fiaud C., 1990**).

Toutes les régions d'Afrique subsaharienne ont une diverses formes de savoirs locaux qui permettent encore une gestion saine et durable des terroirs et diversité végétale. D'après la **FAO (1996)**, le professeur Auguste Chevalier premier explorateur botaniste du Burkina Faso déclare qu'il n'y a pas une plante sur la terre qui n'ait quelques rapports avec les besoins de l'Homme et ne serve quelque partie à sa table, à son vêtement, à son toit, à ses plaisirs, à ses remèdes ou au moins à son foyer. Cette affirmation prouve qu'il est nécessaire de comprendre les relations des populations avec l'environnement et plus précisément avec les plantes.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan. En effet, le développement de la résistance de certains microorganismes pathogènes aux antibiotiques ainsi que l'apparition des effets secondaires de certains médicaments a conduit à la recherche de nouveaux agents antimicrobiens, principalement parmi les extraits de plantes à la recherche de nouvelles molécules bioactives naturelles plus efficaces (**Al-Hajj et al., 2014**). Ainsi, les plantes médicinales naturelles renferment de nombreux principes actifs qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques. Ces molécules actives ont été largement étudiées et incorporées de nos jours dans de nombreux médicaments et présentent moins d'effets secondaires que le médicament chimique (**Thurzovol et al., 1978**).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'actualité malgré son ancienneté. Ceci est attribué au fait que le règne végétal représente une source importante d'une grande variété de molécules bioactives (**Bahorun et al., 1996**). Selon la Fédération française du diabète, 425 millions de personnes dans le monde sont atteintes de diabète. Cela qualifie le phénomène de véritable pandémie car la progression est considérable. Par exemple, l'OMS estime à 622 millions le nombre de diabétiques à l'horizon 2040 (Atlas IDF 201). Diabetes Atlas (2017) déficit en sécrétion d'insuline (**Alberti et Zimmet, 1998**)

Dans certaines régions de l'Algérie pour un grand nombre de la population, la médecine traditionnelle demeure le pilier des soins de santé et la plupart des médicaments et des remèdes proviennent de plantes. En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. C'est dans cette optique que s'inscrit la présente étude qui a pour but de comprendre le lien "population-plantes" à travers une étude qui consiste à déterminer les caractéristiques physicochimique et anatomiques de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. des activités biologiques de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L., récoltées du nord algérien, et d'évaluer les activités biologiques: antimicrobienne, antioxydante, et antidiabétique des extraits de ces deux espèces. Ces deux dernières sont utilisées en médecine traditionnelle algérienne pour traiter plusieurs maladies notamment le diabète. A notre connaissance, il existe peu de précédents travaux sur les activités biologiques de *Rhamnus alaternus* L. Ce présent travail est donc motivé par la curiosité scientifique de vérifier l'utilisation traditionnelle de ces deux plantes. Pour cela, nous avons structuré notre travail comme suit : Une partie bibliographique qui comporte ; des généralités sur les espèces étudiées, généralité sur les métabolites secondaires et une synthèse sur les activités biologiques. Une partie expérimentale qui comporte : une étude histologique des différents tissus (feuilles, tiges), caractérisation physicochimique de deux espèces étudiées, et évaluation de plusieurs activités biologiques *in vivo* et *in vitro* de *Citrullus colocynthis* et *Rhamnus alaternus* à fin d'avoir une idée sur ses propriétés thérapeutiques et ses effets sur l'Homme.

Partie I : Etude Bibliographique

Chapitre 1 :

**Aperçus sur *Citrullus colocynthis* L. et
Rhamnus alaternus L.**

Chapitre I : Aperçu sur *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

1.1. *Citrullus colocynthis* L.

1.1.1. Généralités sur la famille des Cucurbitacées

La famille des cucurbitacées est une famille des herbes annuelles ou vivaces, rampantes ou grimpantes, plus ou moins ligneuses, avec des vrilles à la base du pétiole placées à l'équerre du plan tige-feuille. Tige anguleuse. Cette famille comprend 90 -100 genre les plus importants sont : *Bryonia*, *Carpaponia*, *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Melothrea*..., répartie en 700-850 espèces.

Elle est ré pondue dans les régions tropicales, peu représentée en Australie, Asie et les régions tempérées. (Spichiger et al, 2000).

Le genre *Citrullus* (pastèque), comprend quatre espèces originaires d'Afrique tropicale, donne des fruits très recherchés dans les régions chaudes à cause de leur richesse en eau ; leur amertume disparaît dans les races nouvellement créées. Quelques variétés de Pastèques ont des fruits très colorés qui sont ornementaux. (Anonyme, 1973).

La coloquinte officinale est une plante vivace, herbacée, croissant des zones arides du Nord de l'Afrique, en Iran, en Inde. Son nom souligne la ressemblance morphologique et la coloration comparable de la coloquinte et du citron. (Anonyme, 2001).

1.1.2. Position dans la systématique botanique de *Citrullus colocynthis* L.

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous Classe : *Cucurbitoidae*

Ordre : *Cucurbitales* / *Violales*

Famille : *Cucurbitaceae*

Genre : *Citrullus*

Espèce : *Citrullus colocynthis* L. Schrad. , 1838

1.1.3. Nomenclature de *Citrullus colocynthis* L.

Les noms vernaculaires de la coloquinte sont :

Arabe: Handal, Hadag, Handhal; Hantal, Hadjja;

Berber : Taberka, Tefersite, Tadjellet,

Français : coloquinte, chicotin

Anglais : Colocynth, bitter apple, bitter gourd, egusi (Claude Hammer, 2018).

1.1.4. Caractères botaniques de *Citrullus colocynthis* L.

La coloquinte est une plante entièrement procombante, rampante herbacée, annuelle ou vivace aux tiges rayonnant à partir d'un rhizome vivace tubéreux. **(Burrie et al, 2005).**

Les tiges sont angulaires, rugueuses, rampantes ou migrantes et rudes.

Les feuilles, alternes, arrondies en cœur à leur base, sont nettement échancrées en 3 ou 5 lobes **(Anonyme, 2001)**. Les fleurs de cette espèce sont monoïque à unisexuées. Les fleurs mâles sont de couleur jaune et portées par un long pédoncule. Elles ont environ 3,5 cm de diamètre. Leurs pétales sont soudés à la base. Les fleurs femelles, jaunes également, sont portées par un pédoncule plus court. Elles ont un diamètre qui varie de 1,7 à 2,4 cm. La base de la fleur femelle qui contient l'ovaire est fortement renflé (Figure 1).

Les fruits sphérique de la grosseur d'une orange, ce sont des baies de 7 à 10 cm de diamètre, ressemblant à une petite pastèque, de couleur verte panachée de jaune clair, devient complètement jaune à maturité. Leur chair légère spongieuse, blanche, inodore, à la fois mucilagineuse et d'une amertume extrême. D'où la formule : amer comme chicotin.

La coloquinte est une plante produit 15 à 30 fruits. La pulpe est blanchâtre légère et amère **(Bezanger et al, 1990).**

Les graines de petite taille (6mm de longueur), ovoïdes et aplaties, lisse, de couleur variant de l'orange au noirâtre et ont une saveur amère **(Duke, 1983).**



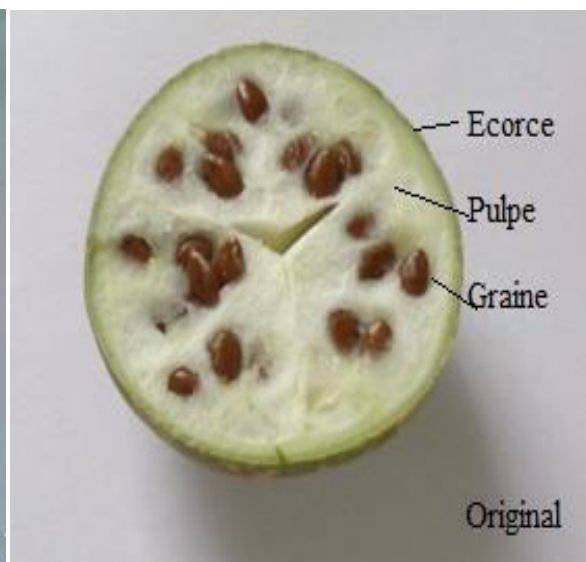
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig.1 les organes de *Citrullus colocynthis* L. (a):Aspect générale de *Citrullus colocynthis* L.

(b): fleurs et feuilles. (c): fruit et feuilles. (d) : fruit détaillé.

1.1.5. Répartition géographique de *Citrullus colocynthis* L.

La coloquinte, originaire des sols arides, est très fréquente dans les régions tropicales humides ou modérément sèches, elle est peu présente dans les zones tempérées

(**Bruneton, 1996**). Elle occupe une région très vaste qui s'étend du Nord Africain, du Sahara, Egypte, Arabie Saoudie jusq'au Inde, ainsi que la région méditerranéenne (**John et Cincinnati, 1898**).

Les fruits sont récoltés à l'hotomme lorsqu'ils commencent à jaunir, ils sont pelés au cauteau et séchés au soleil ou à l'aire libre (**Paris et Moyes, 1971**).

1.1.6. Utilisation traditionnelle de *Citrullus colocynthis* L.

L'utilisation traditionnelle de la coloquinte varie dans le monde d'une région à l'autre en fonction du climat et son écologie. Cette plante est citée sous le nom de Coloquintida dans le capitulaire De Villis (un acte législatif daté de l'an 812 recommandant la culture d'un certain nombre de plantes potagères) parmi les plantes recommandées pour les jardins du royaume. Des sculptures de coloquintes ornaient le Temple de Salomon à Jérusalem (la Bible). La coloquinte est utilisée par de nombreuses peuplades (notamment en Irian-Jaya et Papouasie Nouvelle-Guinée) pour confectionner des étuis péniens (poche à urine masculine). Hippocrate recommandait déjà les fruits de coloquinte pour se purger. On l'utilisa jusqu'à la fin du XIX siècle lorsqu'une révulsion violente était nécessaire, apoplexie, congestion cérébrale, etc. Pour les personnes qui étaient mordus par une vipère, les Arabes donnaient un breuvage composé d'ail et de coloquinte broyé dans l'eau.

Les fruits de la coloquinte sont largement répandus dans la médecine traditionnelle, car ils possèdent diverses propriétés thérapeutiques : purgatives, anti-tumorale (**Abdel-Hassan et al., 2000; Ziyat et al., 1997**), anti-inflammatoire (**Al Ghaithi et al., 2004 ; Barth, et al., 2002**), antirhumatismal, laxative (**Ziyat et al., 1997 ; Al Faraj, 1995**) et contre les trouble urogénitaux, la leucémie, l'ictère la fièvre, l'ascite, les désordres biliaires, les hémorroïdes,...(**Duke,1978; Ziyat et al., 1997**). Des études récentes ont montré que la coloquinte peut avoir un antidiabétique, cancérigènes, antioxydant, des effets antibactériens et toxiques (**Al-Ghaithi et al., 2004; Deghani et al., 2008; Kumar et al., 2009; Dallak et al., 2009; Memon et al.,2003**).

Les racines sont employées dans les traitements de l'ictère, les maladies urinaires et le rhumatisme, les douleurs de joint, l'inflammation et extérieurement dans les maladies ophtalmiques. On les préconisait contre la jaunisse, et les maladies urinaires, elles ont des propriétés purgatives. Les feuilles sont employées pour le traitement de l'ictère et l'asthme (**Kirtikar et Basu, 2001**).

1.1.7. Toxicité de *Citrullus colocynthis* L.

Certaines espèces de la famille des cucurbitacées contiennent des principes amers toxiques, les cucurbitacines, qui sont des triterpènes tetracycliques. Ils sont présents dans toute la plante à concentrations variables car ils se forment localement dans les tissus lors de la croissance. Ils sont généralement sous forme glycosylée et associés à une β glucosidase très active. A noter dans cette famille que les graines de *Curcubita pepo* L. ne sont pas toxiques et

contiennent des dérivés stéroïdiques indiqués dans les troubles de l'hypertrophie de prostate, après vérification de son caractère bénin.

Toute les organes de coloquinte sont toxique, mais en particulier le fruit qui risque d'être consommé en quantité. L'ingestion de grande quantité malgré l'amertume du fruit provoque des diarrhées pseudomembraneuses sanglantes très violentes, des vomissements, dans un état confusionnel. On retrouve parfois l'ingestion de lait concomitante dans ces intoxications, en utilisation traditionnelle de certains pays. Les feuilles et fruits sont mortels pour les moutons. (Claude Hammer, 2018).

1.2. *Rhamnus alaternus* L.

1.2.1. Généralités sur la famille des Rhamnacées

La Famille des *Rhamnaceae* (A. L. de Jessieu 1789), très ancienne (Crétacé supérieur), renferme 950 espèces, réparties en 45 genres dont nous citerons les principaux : *Rhamnus* (150 espèces), *Phyllica* (150 espèces), *Zizyphus* (100 espèces), *Gouania* (60 espèces), *Pomaderris* (55 espèces dont 50 sont endémiques d'Australie) et *Ceanothus* (50 espèces).

Cette famille est divisée en 11 tribus repartis en trois sous-familles: les Ziziphoides les Rhamnoides et les Ampelozizyphoides.

En Algérie, 9 espèces végétales appartenant à 3 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques Quasi cosmopolites, cette famille est particulièrement diversifiée dans les régions tropicales, y compris quelques espèces dans les régions arides caractéristiques des sols calcaires.

Les *Rhamnaceae* sont des arbres, arbustes, souvent épineux, ou des lianes à vrilles, volubiles, ou étayée par les branches axillaires, parfois à nodules symbiotiques abritant des bactéries fixatrices d'azote du genre *Frankia*. Les feuilles possèdent des stipules, parfois épineuses. Ces feuilles sont alternes ou plus rarement opposées ou palmées, à réseau tertiaire souvent grillagé et en relief (Quezel et Santa, 1963).

1.2.2. Position systématique de *Rhamnus alaternus* L.

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Rhamnales*

Famille : *Rhamnaceae*

Genre : *Reynosia*

Sous genre : *Rhamnus*

Espèce : *Rhamnus alaternus* L. (Quezel et Santa, 1963)

1.2.3. Nomenclature de *Rhamnus alaternus* L.

Le nom de genre *Rhamnus* vient du grec *rabdos* qui signifie *baguette*, en référence à la Flexibilité des rameaux. Le nom vernaculaire *Nerprun* correspond au latin populaire *niger prunus* qui veut dire prunier noir, évoquant la couleur des baies (Anonyme, 2012).

Nom vernaculaire arabe : Aouid elkheir, Qaced, Méliles.

Nom targui ou berbère : Ajroudj, Khalis n'imidekh, Amliles (Beloued, 2005). N'chem dans la région de l'Edough (Hamel, 2013).

En anglais : Buckthorn. En Français : Nerprun. En Allemand : Kreülzdorn. En Espagnol : Aladierna, Cosco Unia, Sanguino de Andalucia. En Italien : Alaterno, Legno Puzzo (Gubb, 1913).

1.2.4. Caractères botaniques de *Rhamnus alaternus* L.

Le nerprun alaterne, *Rhamnus alaternus* L. est un Arbuste toujours vert, parfois très grand , à feuilles luisantes, ovoïdes ou lancéolées, sont alternes, lisses, pétiolées (3-6 cent, sur 2-3), à bords cartilagineux et dentées, Elles restent sur l'arbre pendant deux années environ, coriaces, à nervure médiane épaisse, trinervées à la base; stipules linéaires, caduques; grappes axillaires plus longues que le pétiole, multiflores (figure 2,3) (Battandier, 1888).

Ces fleurs jaunâtres sont très petites dépourvus de pétales .Situées a l'aisselle des feuilles est groupées en bouquets, elles s'ouvrent en mars – avril. Ces fruits apparaissent en octobre - novembre .Ce sont de petites baies d'abord rouges puis noirs, à 4 noyaux groupés en bouquets compacts. .La tige est dressée et rameuse ; les rameaux sont alternes, non épineux (Figure 4) (Chancerel, 1920).

La croissance de nerprun alaterne est lente, sa longévité est considérable (100ans). Son bois est à fibre courte et cassante, très lourd, très homogène, d'un grain fin, blanc jaunâtre à l'état d'aubier, brun clair ou foncé à l'état parfait comme le chêne. Il prend beaucoup de retrait et exhale, quand on le travail, une odeur désagréable (Mathieu, 1860).



Fig.2 Feuilles de *Rhamnus alaternus* L.



Fig.3 Fleurs de *Rhamnus alaternus* L.



Fig.4 Fruits de *Rhamnus alaternus* L.

1.2.5. Répartition géographique de *Rhamnus alaternus* L.

Le nerprun alaterne se trouve en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et au sud de l'Europe. En Algérie, elle pousse dans les garrigues et les coteaux calcaires bien ensoleillés.

Cet arbrisseau est caractéristique de la zone littorale et, uni aux lentisques, à l'arbousier, au myrte et à d'autres plantes à feuilles persistantes, il joue un rôle important dans la composition des maquis qui couvrent une bonne partie du littoral et des îles de la Méditerranée (**Penzig, 1902**).

Rhamnus alaternus L. habite les coteaux secs et calcaires du Sud de la France, de la Corse, de l'Algérie, du Nord de la Tunisie (**Chancerel, 1920**). Il s'est naturalisé en Australie et Nouvelle-Zélande. Il est utilisé dans les programmes de reforestation (**Kheireddine, 2012**).

1.2.6. Utilisation traditionnelle de *Rhamnus alaternus* L.

En médecine traditionnelle *R. alaternus* L. a été employé en tant que digestif, diurétique, laxatif, hypotensif et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (**Bhouri et al, 2012**). Cet arbrisseau possède également des caractéristiques cholagogues.

Les baies de *R. alaternus* ont une action purgative, d'une saveur âpre, employés en médecine vétérinaire (**Gubb, 1913**).

Les feuilles en infusion constituent des gargarismes astringents (**Chancerel, 1920**).

Tiges et feuilles en décoction, sont utilisées également en phytothérapie traditionnelle par la population locale du haute Moulouya (Maroc), contre l'anémie (**Benlamdini et al, 2014**). Aussi toute la partie aérienne utilisée par la population locale de la ville de Laghouate (Algerie) en tant que plante antidiabétique (**Khecheba et Benammar, 2008**).Egalement utilisée par celle de la ville de Tlemcen. Comme elle est indiquée aussi pour les traitements des maladies cardiaques et l'athérosclérose.

A cause de son feuillage persistant, touffu et sombre, *Rhamnus alaternus* L. est souvent cultivé dans les parcs, comme plante ornementale, pour former des passifs ou des haies compactes; il fait un très joli effet, surtout lorsqu'il est chargé de ses fruits qui sont des baies globuleuses, luisantes et rouges. Son bois, d'un grain fin et compact, peut servir à des travaux de menuiserie (**Penzig, 1902**), c'est un petit arbrisseau charmant, très recherché pour la décoration des jardins et des bosquets. Il fleurit vers la fin du printemps (**Bergeret et al. 1909**).

1.2.7. Toxicité de *Rhamnus alaternus* L.

Cette espèce est faiblement toxique. Les parties toxiques de la plante sont les fruits murs et l'écorce. Cette plante contient d'hétérosides anthracéniques laxatifs dans l'écorce, les fruits et les graines. La Toxicité est provoquée dès la consommation de 20 drupes chez l'enfant et 30 drupes chez l'adulte. L'ingestion des fruits provoque des coliques, vomissements, diarrhées, éventuellement lésions rénales avec néphrite (oligurie, protéinurie), mydriase, céphalées, vertiges. (**Claude, 2018**).

Chapitre II :

Les métabolites secondaires

Chapitre II : Les métabolites secondaires

2.1. Composés phénoliques

2.1.1. Flavonoïde

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils ont des rôles variés dans les plantes. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Brunton, 1999**). Ils sont impliqués dans les processus de défense contre les UV, la stimulation des nodules pour la fixation de l'azote et la résistance aux maladies (**Chira et al., 2008**).

Les flavonoïdes comprennent 15 atomes de carbone formant une structure de base C6-C3-C6 (**Chira et al., 2008**), constituée de deux cycles benzéniques (A et B) liés par un hétérocycle pyrane (C) (**Cushnie et Lamb, 2005**).

2.1.2. Les Tanins

Les tanins sont des substances d'origine organique que l'on trouve pratiquement dans tous les végétaux et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuille, etc.) (**Michellin, 2009**).

Ce sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (**Kamra et al., 2006**), ils peuvent former des complexes avec les protéines grâce à la présence de plusieurs groupements hydroxyles phénoliques (**Amlan et Patra, 2010**). Deux groupes de tanins différant aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique sont distingués : les tanins hydrolysables et les tanins vrais. Certains tanins auraient des propriétés antioxydants (**Michellin, 2009**).

2.1.3. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments qui confèrent leur couleur aux fruits et aux légumes. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines), et changent de couleur en fonction de leur pH.

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanides (flavonoïdes proches des flavones) (**Iserin, 2007**).

2.1.4. Les coumarines

Elles dérivent des acides hydroxy-cinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Près de 1000 composés cumoniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. (**Macheix et al., 2005**).

2.1.5. Les saponosides

Les saponosides sont des métabolites secondaires hétérosidiques présents dans de nombreuses plantes (**Iserin, 2007**). Le mot saponine est dérivé du mot latin « sapo ». Les saponines ont reçu leur nom du fait qu'elles produisent une mousse semblable à celle du savon (**Hart et al.,**

2008). Les saponines sont des glycosides à poids moléculaires élevé, regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules tri-terpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou tri-terpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile (**Wallace, 2004**). Ils sont très largement répandus dans le règne végétal, ils présentent des propriétés antivirales, antifongiques, antibactériennes et sont toxiques pour les animaux à sang froid (**Élisabeth et al., 2000**).

2.2. Les alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de caractère alcalin et de structure complexe (noyau hétérocyclique) ; on les trouve dans plusieurs familles des plantes. La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques.

Certains alcaloïdes sont utilisés comme moyen de défense contre les infections microbiennes (nicotine, caféine, morphine). On distingue trois grandes classes qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct et qu'ils comportent ou non un azote dans un hétérocycle : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes, les proto-alcaloïdes (**Wichtlet, 2009**).

2.3. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires, de composition généralement assez complexe, renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux (**Bruneton, 1999**). Elles sont obtenues à partir de la fraction volatile de la plante par distillation par la vapeur. Les huiles essentielles ont une grande variété d'effets sur la santé, les plus importants sont les effets antiseptiques et antimicrobiens (**Calsamiglia et al., 2007**).

2.4. Les enzymes antioxydants

2.4.1. Le superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.11)

Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et son activité est affectée par plusieurs facteurs abiotiques tels que le refroidissement, le stress thermique, le rayonnement ultraviolet, Les métaux lourds (**Chung et al., 2006, al., Lim et al., 2004**).

Par exemple, **Chung et al., 2006** enregistre une forte augmentation de l'activité de la SOD chez *Rehmannia glutinosa* cultivée sous l'eau et les contraintes thermiques. Auparavant, **Prida et al., 2004** ont démontré une augmentation de la SOD dans la plante *Bruguiera parviflora* soumise à un stress salin. De même, **Kim et al., 2004** ont signalé une élévation importante de l'activité de la SOD dans les *Oryza sativa* sensibles au sel et les plantes tolérantes au sel d'*Eschinochlaa oryzicola*.

2.4.2. La catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Elle catalyse la réduction du H_2O_2 en H_2O et en oxygène, et empêche ainsi la contrainte oxydante du H_2O_2 sur les composants cellulaires. **Prochazkova et al., 2001** ont rapporté que l'activité de CAT était singulièrement augmentée pendant le stress oxydatif. De nombreux auteurs ont signalé que le stress thermique a stimulé l'activité de la CAT dans les plants serval, y compris le pois (**Hernandez et al., 2000**), le blé et le *Zea mays* (**Prochazkova et al., 2001**). D'autre part, **Dat et al., 1998** ont enregistré une diminution de l'activité CAT en réponse au stress thermique.

2.4.3. L'ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11)

Il est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes des plantes qui détoxifie le H_2O_2 en utilisant l'ascorbate comme réducteur via le cycle ASA-GSSG. **Asada, 1999** et **Panchuk et al., 2002**, ont conclu que les enzymes impliquées dans le cycle ascorbate-glutathion (ASA-GSSG), l'activité APX cellulaire totale, semblaient être plus sensibles au stress thermique comparativement aux enzymes GR et SOD.

Il a été rapporté que l'activité APX, dans différentes espèces végétales, augmente en réponse à un certain nombre de stress environnementaux, y compris la sécheresse, le refroidissement, les intensités lumineuses élevées, le stress salin, l'ozone et le stress thermique.

2.4.4. La glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.7)

Elle joue un rôle important dans le contrôle de la teneur en H_2O_2 endogène à travers un cycle d'oxydo-réductase impliquant le glutathion et l'ascorbate (**Edwards et al., 1991**) et maintient le ratio élevé de GSH / GSSG dans Plantes utilisant $NADPH^+ + H^+$ (**Sudhakar et al., 2001**). Plusieurs études ont montré une modulation de l'activité du GR en réponse à différentes contraintes environnementales telles que le stress thermique (**Dat et al., 1998**), l'acclimatation à basse température (**Wang, 1995**), le stress salin (**Kim et al. 2004**) et le rayonnement UV (**Edwards et al., 1994**). Il a été rapporté que des niveaux constitutifs plus élevés de GR ont été liés à la tolérance au refroidissement (**Kocsy et al., 1996**) et une expression accrue de GR peut améliorer la tolérance au stress oxydatif chez diverses espèces.

5. L'acide ascorbique

Il est un petit antioxydant hydrosoluble moléculaire qui agit comme un substrat primaire dans la voie cyclique pour la désintoxication enzymatique du peroxyde d'hydrogène. En outre, il agit directement pour neutraliser les radicaux superoxydes, l'oxygène singulet et comme anti oxydant secondaire lors du recyclage réducteur de l'oxydé à partir de l' α -tocophérol, une autre molécule antioxydante lipophile (**Asada, 1994**). **Perez et al. 2002** ont rapporté que l'acide ascorbique peut protéger les membranes contre les dommages causés par les radicaux libres

en régénérant le tocophérol à partir du radical tocopheroxyl qui se forme lors de l'inhibition de la peroxydation lipidique par la vitamine E.

6. Le glutathion

Le glutathion est une protéine naturellement produite par l'organisme. Il s'agit d'un tripeptide, composé de trois acides aminés : le glutamate (acide glutamique), la cystéine et la glycine. Il intervient dans le transport de l'hydrogène. On le trouve dans les cellules des plantes, des animaux et des champignons. Il existe sous forme réduite (communément nommée GSH) et sous une forme oxydée (GSSG), ces deux formes s'équilibrent l'une l'autre **(Noctor et Foyer, 1998)**.

Chapitre III :
Les activités biologiques

Chapitre III :
Les activités biologiques

Partie II : Etude Expérimentale

1. Présentation des stations d'étude de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

1.1. Présentation de Boussaâda Station d'étude de *Citrullus colocynthis* L.

La région de BouSaâda est une commune de la wilaya de M'Sila située au sud-ouest du Hodna dans les Hauts Plateaux, au pied des monts des Ouled Naïl de l'Atlas saharien. Elle est distante de la capitale Alger de 250 km par les gorges de Lakhdaria et de 237 km par les monts de Tablat. Elle est bordée au Nord par Bouira et Sidi Aissa, au sud par Ain Elmaleh, au l'Est par Bordj Bou Arreridj, M'Sila, Barika, Batna, Ben Srour et Biskra, et en Ouest par Djelfa, Laghouat Ain Ouassara, Sour Elghozlane, Tablat, et Alger (Fig 5).



Fig.5 Localisation géographique du site d'étude de *Citrullus colocynthis* L. Source : Google maps

1.2. Présentation de la péninsule de l'Edough Station d'étude de *Rhamnus alaternus* L.

La péninsule de l'Edough est située au Nord-Est algérien, elle est bordée au Nord et au Nord-Est par le lac Fetzara et les plaines d'Annaba, par la plaine de Senhadja et les massifs de Chétaibi au Nord-Ouest (Fig.6).



Fig.6 Localisation géographique du site d'étude de *Rhamnus alaternus* L. Source : Google maps

2. Matériel végétal

2.1. Choix, identification et récolte de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

Nous avons choisis deux espèces *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. qui prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. *Citrullus colocynthis* L., a été récolté à maturité, durant les années 2013 et 2014, la première récolte est effectuée fin de mois de Aout 2013, 2014 dans la région de Boussaada; *Rhamnus alaternus* L., a été récoltée en pleine floraison, le 25 Mars 2015 dans la péninsule de l'Edough région de Seraidi Nord- Est Algérien, entre 8H et 11H. L'échantillonnage a été effectué au hasard.

L'identification botanique de ces espèces a été faite sur site par Dr. HAMEL. T. Enseignant botaniste au niveau du département de biologie à l'Université Badji Mokhtar Annaba. Des échantillons de référence sont conservés au niveau de laboratoire.

2.1.1. Traitement des échantillons :(séchage, broyage)

Les échantillons récoltés pour chaque espèce sont traités séparément selon leurs utilités.

Nous avons réservé feuilles et tiges dans le méthanol pour l'étude histologique

Nous avons conservé également des échantillons frais pour le dosage enzymatique

Après nettoyage et séparation ; des échantillons ont été mis à sécher séparément à l'air libre durant deux à trois semaines puis broyé en poudre ; ainsi, nous avons conservé les poudres dans des flacons en verre jusqu'à leur utilisation.

Nous avons enfin préparé des extraits des feuilles pour tester de multiples activités biologiques.



Fig.7 Séchage des feuilles et tige de *Citrullus colocynthis* L.



Fig. 8 Séchage des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

2.2. Méthode d'analyse

2.2.1. Etude anatomique de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

Afin de permettre une meilleure identification des structures anatomique des espèces étudiées nous avons utilisé la technique vitale de la double coloration. Cette technique consiste, en une coloration de la cellulose en rouge par le rouge de Congo et la lignine en vert par le vert de méthyl. (Roger *et al.*, 2001)

Sur les deux espèces récoltées, nous avons effectué des coupes histologiques au niveau des feuilles et des tiges comme suit :

- Réalisation de coupes transversales fines au niveau des organes (feuille et tige) à l'aide d'une lame de rasoir.

- Trempage des coupes dans de l'eau de javel, pendant 15mn,
- Traitement des coupes avec de l'acide acétique dilué pendant 1mn,
- Coloration des coupes au vert de méthyle pendant 10mn.
- Coloration des coupes dans le rouge du Congo pendant 20mn.
- Les échantillons sont placés entre lame et lamelle, avons l'observation des coupes au microscope optique (modèle Sinal).

2.2.2. Etude phytochimique de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

Les plus importants des constituants bioactifs des plantes sont : les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes, les saponines et des composés phénoliques.

Dans le but de caractériser les extraits préparés à partir des deux espèces, des analyses qualitatives (présence marqué positive : + ou absence marqué : -) et quantitatives ont été effectuées.

2.2.3. Analyse qualitatives (screening chimique) de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

Nous avons réalisé un screening chimique de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. afin de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans les organes (feuilles, tiges).

Les tests préliminaires pour la détermination des groupes chimiques majeurs ont été réalisés selon **SOLFO (1973) ; HARBORNE (1989)**.

Préparation de l'infusé de deux espèces, 10 g de drogue broyé sont placés dans 100ml d'eau bouillante, après 15mn nous avons filtré et recueilli l'infusé.

✓ Tanins

Nous avons pris 5ml de l'infusé auquel nous avons ajouté goutte à goutte 1ml d'une solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 1%.L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques, bleu noirâtre indique la présence de tanins galliques.

✓ Anthocyanes

Nous avons ajoutés à 5 ml de l'infusé quelques gouttes de l'acide chlorhydrique (HCL) pur. Ensuite, nous avons rajouté quelques gouttes d'ammonium (NH_4OH), le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

✓ Leuco-anthocyanes

Nous avons pris 5ml de l'infusé que nous avons et mélangé avec 4ml d'alcool chlorhydrique (éthanol /HCL pur 3v/v).Après chauffage au bain marie à 50°C, pendant quelques minutes. L'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco-anthocyanes.

✓ Saponosides

Nous avons versé, dans un tube à essais, 10 ml de l'extrait total aqueux. Le tube était agité pendant 15 secondes puis laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indiquait la présence des saponosides.

A partir de la poudre, nous avons déterminé le reste des groupes chimiques suivant :

✓ Alcaloïdes

05 g de la poudre mélangée avec 50 ml d'HCl à 1% dans un récipient. Après une macération, nous avons filtré le mélange et additionnés au filtrat quelques gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orangé indique la présence des alcaloïdes.

✓ Flavonoïdes

10g de la poudre sont macérées dans 150ml d'HCl à 1% pendant 24h. Après avoir filtré le mélange, nous avons pris 10ml du filtrat auquel on a ajouté du NH₄OH, puis mis en repos 3h. L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

✓ Cardinolides

01g de la poudre est macéré dans 20ml d'eau distillée pendant 3h. Après filtration, nous avons prélevé 10ml de filtrat et mélangé avec une solution de 10ml de CHCl₃ et de C₂H₅OH. Ensuite nous avons évaporé la phase organique dans un bain de sable à 90°C. Le précipité est dissout dans 3ml de CH₃COOH glacial, en ajoutant quelques gouttes de FeCl₃, suivi de 1ml d'H₂SO₄ concentré sur les parois du tube. L'apparition d'une couleur verte bleue dans la phase acide indique la présence des Cardinolides.

✓ Terpènes et stérols

A partir de 0.5g de la poudre, qui a été macérée dans 20 ml d'éther de pétrole et après avoir filtré puis évaporé la phase organique dans un bain de sable à 90°C, le résidu obtenu est dissout dans 5 ml d'acide acétique en ajoutant 1ml d'H₂SO₄ concentré. Dans la zone de contact entre les deux liquides, il se forme un cercle marron ou violet qui vire au gris. Ce changement de couleur indique la présence des terpènes et stérols.

✓ Quinones

Nous avons pris 01g de la poudre, puis nous l'avons macérée dans 30 ml d'éther éthylique pendant 24h. Après filtration, nous avons rajouté quelques gouttes de NaOH à 1N. Le virage de la phase au rouge indique la présence des quinones.

✓ Amidon

Nous avons pris 01g de la poudre, puis nous l'avons macérée dans 30 ml d'eau distillée chaude pendant 01h. Après filtration, nous avons rajouté à la solution aqueuse quelques gouttes de réactif d'amidon (liqueur de Fehling). L'apparition d'une couleur bleue violacé indique la présence de l'amidon.

✓ Coumarine

1g de la poudre est mélangée avec quelques gouttes d'eau dans un tube à essai. Le tube est recouvert avec de papier imbibé de NaOH dilué, et est porté à ébullition. Toute inflorescence jaune témoigne de la présence des coumarines après examen sous UV.

2.2.4. Analyse qualitative

• Extraction

Les feuilles de *Citrullus colocynthis* L et *Rhamnus alaternus* séchées à l'ombre ont été broyées, pulvérisées puis extraites par des différents solvants organiques : le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Après 3 heures de macération sous agitation continue à 200 tours/min, le mélange est filtré. Le filtrat est évaporé à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C. Cette opération est répétée quatre fois avec renouvellement du solvant afin d'épuiser le marc et augmenter le rendement. Les extraits sont ensuite conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation (**Pharmacopée française**).

✓ Tanins

L'estimation de la teneur en tanins totaux contenus dans les extraits est réalisée selon la méthode de **Hagerman et Butler (1989)**

• Principe

Les tanins sont connus par leur propriété principale, qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA dans le dosage des tannins en milieu acide a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique (FeCl₃) réagit avec les tannins (en milieu alcalin : SDS/TEA pour former des chélates de couleur violette.

• Mode opératoire

1mL d'extrait et 2 mL de la solution de BSA (boeuf serum albumine) 1mg/mL sont préparés dans le tampon acétate 0,4M, pH= 6) ont été mélangés. Après 24 heures d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min. Le précipité est dissout dans 4 mL de la solution tampon : SDS/TEA puis mis à l'obscurité pendant 15mn ,1 mL de la solution de chlorure ferrique (0,1N) est ajouté. Après une incubation de 15 min, la lecture de l'absorbance est effectuée à 510 nm.

La concentration en tannins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide tannique. Les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide tannique par 100g du PF (**mg EqC/100 gr d'extrait**).

(Voir annexes pour courbe d'étalonnage de l'acide tannique)

✓ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe d'antioxydant, d'absorbance à 430nm, les études réalisées soupçonnent que ces flavonoïdes sont à l'origine des propriétés anti-inflammatoires (**Yi et al, 2007**).

• Principe

La coloration jaunâtre obtenue dans cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. La méthode du trichlorure d'aluminium (**Yi et al, 2007**) est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de feuilles.

• Mode opératoire

1ml de l'échantillon (préparé dans le méthanol) est ajouté à 1ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à **430nm**.

Une courbe d'étalonnage ($Y=ax+b$) établie par la quercitrine (0-40 $\mu\text{g/ml}$), servira à la quantification des flavonoïdes.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EqQ}/100\text{g d'ext}$).

• Préparation de la courbe d'étalonnage de la quercétine :

Une gamme de 10 concentration de la quercétine allant de 2,5 à 40 $\mu\text{g/ml}$ a été préparée à partir d'une solution mère de 400 $\mu\text{g/ml}$ de concentration (tableau 2)

Solution mère de standard : 40mg de quercétine dessous dans 100ml de méthanol (60/40) (V/V)

Tableau 2 La gamme d'étalonnage de la quercétine

N) des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume pris de la solution mère (en ml)	0	0,125	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2
Volume ajouté de méthanol (en ml)	20	19,875	19,75	19,5	19,25	19	18,75	18,5	18,25	18
Concentration finale de quercétine (en µg/ml)	0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40

(Voir annexes courbe d'étalonnage de la quercétine)

✓ Polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été effectuée spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (**Singleto et al., 1999**)

• Principe

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans les extraits. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides), un mélange d' $H_3PW_{12}O_{40}$ et de $H_3PMO_{12}O_{40}$. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) de molybdène (Mo_8O_{23}) (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**).

En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleue. (**Dels-rakotoarison , 1999**)

Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à **760nm**.

• Mode opératoire

A 0,2 ml des extraits organiques a été ajouté 0,8 ml de la solution de Na_2CO_3 à 7,5% après agitation, 1ml de la solution de Folin Ciocalteu (à 10ml du réactif Folin Ciocalteu on a ajouté 90ml d'eau distillée) est additionnée. Après 2h d'incubation à la température ambiante, l'absorbance est lue à 760nm contre un blanc sans extrait.

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire, établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0-200 mg/ml), comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait de feuilles (**mg eq AG/100g d'extrait**).

- **Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

Une gamme de onze concentrations d'acide gallique allant de 0 à 2 mg/ml a été préparée à partir d'une solution mère de 0,2mg/ml de concentration (tableau)

Solution mère de standard : 40mg de l'acide gallique dessous dans 200ml de méthanol (60/40) (V/V).

Tableau 3 La gamme d'étalonnage de l'acide gallique

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Volume pris de la solution mère (en ml)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
Volume de méthanol ajouté (en ml)	25	22,5	20	17,5	15	12,5	10	7,5	5	2,5	0
Concentration finale de l'acide gallique en (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2

(Voir annexes courbe d'étalonnage de l'acide gallique)

- ✓ **l'ascorbate**

Les fractions d'ascorbate ont été extraites et mesurées selon la méthode de **Kampfenkel et al., (1995)**.

- **Extraction**

On a broyé de la poudre fine (0,5 g) de matière foliaire congelée dans un mortier préchauffé avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à 16% (P/ V), on a laissé homogénéiser dans un bain de glace pendant 15 min. L'homogénat a été ajusté à un volume de 2 ml avec du TCA à 6% (P / V). L'homogénat a été centrifugé pendant 5 minutes à 15 000 tours/min (4° C) et le surnageant a été transféré dans le récipient de réaction (sur de la glace) et a été immédiatement dosé pour la détermination du contenu en ascorbate (ASA) et en déshydroascorbate (DHASA).

- **Détermination**

L'ascorbate (ASC) et le déshydroascorbate (DHA) ont été déterminés par Kampfenkel et *al.* (1995). Cette analyse est basée sur la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} de l'acide ascorbique (ASC), suivie par la détermination spectrophotométrique de l'ion Fe^{2+} complexé avec le 2,2-dipyridil. L'acide déhydroascorbique (DHA) est réduit en ASC par incubation avec du dithiothréitol (DDT). L'excès de DDT est éliminé avec du N-éthylmaléimide (NEM) et l'ASC total est déterminé selon la méthode au 2,2 dipyridil. La concentration de DHA est calculée par différence entre l'ASC total et l'ASC (sans traitement au DDT).

L'ASC total a été déterminé dans un mélange réactionnel de 1,0 ml contenant 50 μ l de fluide apoplastique, 100 μ l de tampon au phosphate 0,2 M (pH 7,4), 50 μ l de DDT 10 mM. Après agitation et incubation pendant 20 min à 42 ° C dans un bain-marie, 50 μ l de NEM à 0,5% ont été ajoutés, puis incubés pendant 1 min à température ambiante. Les taux d'ASC ont été déterminés de la même manière, à l'exception de l'augmentation du DDT et du NEM qui ont été remplacés par de l'eau. La coloration a été obtenue en ajoutant 250 μ l d'acide trichloroacétique à 10%, 200 μ l d'acide phosphorique à 42%, 200 μ l de dipyridil dissous dans de l'éthanol à 70% et 100 μ l d'acide phosphorique à 3%. Après agitation, un mélange a été incubé pendant 40 min à 42 ° C et les valeurs d'absorbance des solutions colorées finales ont été enregistrées à 525 nm (**Kampfenkel et al., 1995**).

- ✓ **Le glutathion**

Cela inclut le glutathion total (TG), le glutathion oxydé de (GSSG) et le glutathion réduit de (GSH).

- **Extraction**

La teneur totale en glutathion (GSH) et en glutathion oxydée (GSSG) a été déterminée selon la méthode de (**Griffith, 1980**). Feuilles fraîches ont broyées manuellement avec 1 ml 1 ml d'acide sulfo-salicylique à 5%, le mélange est centrifugé à 10 000 tours/min pendant 5 min puis l'extrait végétal obtenu est conservé dans l'azote liquide jusqu'à son utilisation.

- **Détermination**

300 μ l de l'extrait végétal a été éliminé et neutralisé à pH 7,0 par addition de NaCl. Un échantillon de 150 μ l a été utilisé pour la détermination du glutathion total (GSH + GSSG). Un autre échantillon de 150 μ l a été prétraité avec 3 ml de 2-vinylpyridine pendant 60 min à 20 ° C pour masquer GSH et permettre la détermination de GSSG. Des aliquotes de 50 μ l des deux types d'échantillons ont été mélangées avec 700 μ l de NADPH 0,3 mM, 100 μ l mM d'acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) et 150 μ l de Na_3PO_4 125 mM et tampon EDTA 6,3 mM, pH 6,5. On ajoute 10 μ l de glutathion réductase (50 μ l -1) et on contrôle le

changement d'absorbance à 412 nm. Une courbe standard préparée $y = ax + b$ en utilisant GSH et GSSG a été utilisée pour calculer les quantités de glutathion total, de glutathion GSH réduite et de GSSG de glutathion oxydé.

✓ **Protéine totaux**

Celles-ci comprennent à la fois les fractions de protéine totale (PT) et de protéine soluble (PS).

• **Extraction**

La fraction protéique totale (TP) a été extraite en ajoutant 10 ml de NaOH 0,5 N à 100 mg de la matière végétale séchée à l'aire libre. L'extrait a été complété pour connaître le volume avec de l'eau distillée (**Rausch, 1981**).

Extrait la fraction de protéine soluble (SP) en ajoutant 20 ml d'eau distillée à 100 mg de matière végétale séchée, puis fait bouillir pendant 5 minutes. Après refroidissement et centrifugation, l'extrait a été achevé pour connaître le volume avec de l'eau distillée.

• **Détermination**

Selon la méthode décrite par **Hartee (1972)**. On mélange 1 ml de l'extrait végétal (de la protéine totale ou soluble) dans un tube avec 0,9 ml de réactif A et on incube dans un bain d'eau à 50 ° C pendant 10 minutes. Après refroidissement à la température ambiante, 0,1 ml de réactif B a été ajouté. Après avoir bien mélangé, les tubes ont été laissés au repos pendant 10 minutes. 3ml de réactif C ont été ajoutés rapidement en mélangeant à l'aide d'un mélangeur à vortex. Les tubes ont ensuite été incubés à 50 ° C pendant 10 minutes et la couleur a été mesurée à 650 nm et la concentration a été lue à partir d'une courbe standard faite avec de l'albumine de sérum et exprimée en g de protéine kg⁻¹ d.m. La fraction de protéine insoluble (InsP) a été éliminée par différence.

(Voir annexes courbe d'étalonnage de l'albumine).

✓ **Proline libre**

• **Extraction**

La méthode décrite par **El-Sharkawi et Michel (1977)** a été utilisée. Un gramme d'échantillons frais (feuilles) a été broyé dans 10 ml d'acide sulfo-salicylique à 3% et centrifugé à 7000 tour/min pendant 20 minutes. Le surnageant est décanté puis stocké. La matière résiduelle précipitée dans le tube de centrifugation est transférée de nouveau au mortier et extraite à nouveau avec de l'acide sulfo-salicylique, puis centrifugée. Les extraits combinés ont été ajustés à un volume connu avec de l'acide sulfo-salicylique à 3%

- **Détermination**

La détermination de la proline libre a été effectuée en utilisant la méthode de la minhydrine acide décrite par **Bates et al, (1973)**. Deux ml de l'extrait préparé précédemment ont été mélangés avec 2 ml du réactif minhydrine acide fraîchement préparé plus 2 ml d'acide acétique glacial dans un tube à essai et maintenus pendant une heure dans un bain d'eau bouillante puis la réaction a été terminée par refroidissement du mélange dans un bain de glace. Ajouté 4 ml de toluène et on l'a mélangé énergiquement en utilisant un vortex pendant 20 secondes. Aspiré la couche de toluène colorée dans un tube à essai séparé et on l'a réchauffée jusqu'à la température ambiante, puis on a lu son absorbance à 520 nm en utilisant du toluène comme ébauche.

La concentration en proline a été déterminée à partir d'un courbe étalon de la leucine.

- ❖ **Analyses statistiques**

Tous les traitements ont été répétés trois fois et les résultats sont donnés en moyenne plus au moins l'écart type.

2.2.5. Evaluation des activités enzymatiques

- **Extraction**

Des feuilles fraîches de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. sont lavées à l'eau distillée et 1000 mg de chaque espèce sont pesées précisément puis triturés dans un mortier avec 4 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7.0) contenant 1mM d'EDTA, dans des conditions glacées. L'homogénat a été centrifugé à 1500 tr / min, à 4 ° C pendant 20 minutes. Le surnageant a été stocké à 20° C et utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique (**Rhios-Gonzalez et al, 2002**).

- ✓ **L'ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11)**

Le dosage de l'ascorbate peroxydase se fait selon la méthode de **Nakano et Asada (1981)**. Le mélange réactionnel pour la peroxydase contient 50 mM de tampon de phosphate de potassium (pH 7,0), 0,5 mM d'ascorbate, 0,1 mM de peroxyde d'hydrogène, 0,1 mM d'EDTA et 50µl d'extrait d'enzyme dans un volume total de 3 ml. La diminution de l'absorbance à 290 nm pendant 1 min a été enregistrée et la quantité d'ascorbate oxydé a été calculée à partir du coefficient d'extinction 2,8 mM cm⁻¹.

- ✓ **La catalase (CAT, EC 1.11.1.6)**

Selon la méthode de **Havir et McHale (1987)** l'activité de la catalase a été déterminée en ajoutant 50 µl d'extrait enzymatique à la solution réactionnelle contenant 50 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7,0) et 20 mM H₂O₂ dans un volume total de 3 ml.

L'activité a été dosée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm et à 30 ° C.

L'activité enzymatique a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire 36×10^3 mM⁻¹ et exprimé en mmol de H₂O₂ oxydé g⁻¹ d.m.min⁻¹.

✓ **Le superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

Selon la méthode de **Beauchamp et Fridovich (1971)**. L'activité du superoxyde dismutase (SOD) a été mesurée par la méthode du tétrazolium nitro-bleu (TNB). Le mélange réactionnel contenant 45 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 13 mM methionine, 0,17 Mm dans l'éthanol et 0,007 mM riboflavine. On a commencé la réaction en ajoutant 50µl d'extrait d'enzyme pour atteindre un volume total de 3 ml. Les ébauches ont été conservées dans l'obscurité et les autres ont été éclairées pendant 15 minutes dans une boîte garnie de feuilles d'aluminium contenant deux lampes fluorescentes 20 W à 25 ° C. L'augmentation de l'absorbance due à la formation de formazan a été lue à 560 nm. L'augmentation de l'absorbance sans l'extrait enzymatique est prise à 100% et l'activité enzymatique est calculée en déterminant le pourcentage d'inhibition par minute. Cinquante pour cent de l'inhibition a été considérée comme équivalente à une unité d'activité de SOD (**Gonzalez et al., 2002**).

✓ **La glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.7)**

La glutathion réductase catalyse la réaction du glutathion oxydé (GSSG). Le dosage de la glutathion réductase se fait spectrophotométriquement, la diminution de l'absorbance du NADH pour générer le NADT⁺ à 340 nm selon la méthode de **Goldberg et Spooner (1983)**. Le mélange réactionnel est constitué de tampon phosphate de potassium 120 mM (pH 7,2), EDTA 15 mM, glutathion oxydé 65,3 mM (GSSG), NADPH 9,6 Mm et 50 µl d'extrait enzymatique pour atteindre le volume final de 3 ml. L'activité de la glutathion réductase est calculée sur la base du coefficient d'extinction molaire du NADPH qui à 340 nm est égal à 6220 M⁻¹ cm⁻¹. Une unité de l'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui a oxydé 1 µ mol de NADPH par minute.

2.2.6. Analyse chromatographique des phénols totaux et des flavonoïdes

La détermination des composés phénoliques, et des composés de flavonoïdes dans les extraits de méthanol de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. se fait par la chromatographie en phase liquide (HPLC)

Méthode d'essai:

- Note d'application Agilent, numéro de publication 5991-3801FR, 2014
- Note d'application Agilent, numéro de publication 5990-9547FR, 2011

État de l'instrument pour les composés phénoliques: Agilent1260 infinity HPLC Series (Agilent, États-Unis), équipé d'une pompe quaternaire, une colonne Zorbax Eclipse plusC18 de 100 mm x 4,6 mm i.d. (Agilent technologies, USA), fonctionnant à 25°C.

La séparation est réalisée en utilisant un gradient d'éluion linéaire ternaire avec (A) de l'eau de qualité HPLC 0,2% H₃PO₄ (v / v), (B) méthanol et (C) acétonitrile. Le volume injecté était de 20 µL. Détection: détecteur VWD réglé à 284 nm. Condition de l'objet d'essai: -21 ° C.

Condition de l'instrument pour les flavonoïdes:

HPLC, Smart line, Knauer, Allemagne., Équipée d'une pompe binaire, une colonne Zorbax Eclipse plusC18 de 150 mm x 4,6 mm i.d., (Agilent technologies, USA), fonctionnait à 35 ° C. Eluant: méthanol: H₂O avec 0,5% H₃PO₄, 50:50 avec débit 0,7 ml / min, Le volume injecté était de 20 µL. Détection: Détecteur UV réglé à 272 nm pour Neringenin et 370 nm pour les autres flavonoïdes et intégration des données par claritychrom @ Logiciel.

Conditions environnementales:

✚ Température: 17°C

✚ Humidité: 40

2.2.7. Composition de *Citrullus colocynthis* L et *Rhamnus alaternus* L en acides aminés

Un poids connu de l'échantillon de plante (par exemple 10 mg) a été placé dans un tube d'hydrolyse de verre à paroi épaisse. Suivie par l'addition de 5 ml d'acide chlorhydrique 6,0N. Le tube a ensuite été évacué, scellé et placé dans un four à 110 ° C pendant 24 heures. Le tube a ensuite été retiré du four et centrifugé pendant 5 minutes à 3000 tours par minute, après quoi le surnageant d'hydrolysate a été recueilli. L'excès d'acide chlorhydrique est évaporé. Le résidu a été dissous dans la plus petite quantité d'eau distillée qui a été de nouveau éliminée par évaporation. Ce processus a été répété plusieurs fois jusqu'à ce que l'hydrolysate soit libéré de l'acide chlorhydrique. Le résidu dissous dans 5 ml d'eau distillée et les acides aminés ont été déterminés en utilisant un analyseur d'acides aminés de haute performance HPLC.

Modèle Beckman Sysem 7300 et système de données 7000. Colonne Na-A / B: D25 cm.

2.2.8. Etude in vitro

2.2.8.1. Activité antimicrobienne des extraits organiques de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

Notre étude a été réalisée dans le but de valoriser l'activité antimicrobienne des extraits organiques de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. Des extraits de méthanol, d'acétone et d'éthanol préparés à partir de feuilles de deux espèces ont été testés pour leur activité antibactérienne et antifongique.

- **Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne de divers extraits de plantes a été déterminée par la méthode de diffusion de puits d'agar selon **Shinde et Mulay (2015)** Un échantillon de 0,1 ml de culture fraîchement développée d'organismes testés a été étalé de manière aseptique sur la surface des plaques d'agar stérile Muller Hinton. Des puits de 6 mm de diamètre ont été fabriqués dans une plaque de gélose à l'aide d'un perce-bouchon stérile. Cinquante microlitres des différents extraits de plantes et le même volume de solvant d'extraction pour le contrôle négatif ont été ajoutés dans les puits à l'aide d'une micropipette.

Les cinq souches bactériennes testées étaient *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'ampicilline a été utilisée comme témoin positif pour les organismes testés. Les plaques ont été conservées pendant un certain temps à 4 ° C jusqu'à ce que l'extrait soit diffusé dans le milieu avec le couvercle fermé et incubé pendant 24 h à 37 ° C. Les plaques ont été examinées pour la zone d'inhibition. L'effet de l'activité antibactérienne a été évalué en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition par rapport aux pathogènes bactériens testés. Chaque test de cette expérience a été répliqué trois fois (**Jain et al, 2009**)

- **Activité antifongique**

Méthode de diffusion de puits d'agar (**Shinde et Mulay 2015**) a été suivie pour déterminer l'activité antifongique. Trois Champignons ont été testés *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Des plaques d'agar de dextrose de pomme de terre (PDA) ont été tamponnées (écouvillons de coton stériles) avec une culture de champignons âgés de 8 h. Des puits (10 mm de diamètre et environ 2 cm de partie) ont été réalisés dans chacune de ces plaques à l'aide d'un perce-bouchon stérile. Une solution mère d'extrait végétal a été préparée à une concentration de 1 mg / ml dans différents extraits végétaux de méthanol, d'éthanol et d'acétone.

Environ 100 ul de diverses concentrations d'extraits de solvants végétaux ont été ajoutés par une seringue stérile dans les puits et laissés diffuser à température ambiante pendant 2 heures. Le fluconazole a été utilisé comme témoin positif. Les plaques ont été incubées à 28 ° C pendant 48 h pour les pathogènes fongiques. Le diamètre de la zone d'inhibition (mm) a été mesuré.

2282. Activité anti-oxydante des extraits organiques de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. par le radicale libre DPPH :

C'est une activité du balayage des radicaux libre qui a été mesurée en employant le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH : C₁₈H₁₂N₅O₆) c'est l'un des

principaux essais employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbe comme antioxydants (Markowicz *et al.*,2007)

- **Principe**

En présence des piègeurs de radicaux libre, le DPPH 2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl de couleur violette se réduit en 2.2 diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*,2006)



Fig.9 Forme libre et réduite du DPPH

Selon Turkmen *et al.*,(2005)2 mL de DPPH (0,15 mmol / L) sont mélangés avec 1 mL de chaque extrait. L'ensemble est mélangé à l'aide d'un vortex pendant 30 s, puis porté à l'obscurité à température du laboratoire pendant 20 min. Après cette durée, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

L'activité anti-radicalaire est exprimée en pourcentage d'inhibition de DPPH selon l'équation suivante :

$$I\% = 1 - \frac{\text{Abs de contrôle} - \text{abs de l'extrait}}{\text{Abs l'extrait}} \times 100$$

2.2.9. Etude *in vivo*

- ❖ **Préparation des extraits méthanoliques :**

Des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. et des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. séchées à l'ombre ont été broyées, pulvérisées et extraites avec du méthanol. Après 3 h de macération sous agitation continue à 200 tr / min, le mélange a été filtré. Le filtrat a été évaporé à sec sous vide en utilisant un évaporateur rotatif. Cette opération est répétée quatre fois avec

renouvellement du solvant pour augmenter le rendement. L'extrait a ensuite été conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

2.2.9.1. Toxicité aiguë des extraits de méthanol de feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Notre étude expérimentale a été réalisée sur des souris albinos suisses (24-30 g) des deux sexes. L'étude pharmacologique se déroule dans le laboratoire de Pharmacologie du Centre de Recherche et de développement (CRD), SAIDAL Alger. Les souris sont mises dans des cages en polypropylène transparent avec un couvercle en acier inoxydable. Ils sont maintenus dans des conditions de l'animalerie température, humidité et nourriture (20-24°C et 50% d'humidité, eau de robinet et litière composée de sciure de bois renouvelée tous les deux jours).

L'étude de toxicité aiguë a été réalisée sur des souris albinos suisses. Pour déterminer la toxicité, une administration orale unique d'extrait de méthanol de feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. à différentes doses (Voir tableau 4, et figure 10) qui ont été administrée à différents groupes d'animaux. Ensuite, les animaux ont été observés continuellement pendant trois heures pour des profils comportementaux, neurologiques et autonomiques généraux, puis toutes les 30 minutes pendant les trois heures suivantes et finalement pour la mortalité après 24 heures jusqu'à 14 jours (Vanden et al., 1990; Whitehead et al., 1992).

Tableau 4 Doses testées de la toxicité aiguë

Extraits	Doses (mg/kg.pc)
EMC	150, 250, 500, 600
EMR	150, 300, 450, 600
Paramètres déterminés chez les rats	Signes de toxicité, mort, DL50



Fig. 10 Gavage de souris par l'EMR (toxicité aiguë)

Détermination de la DL50 :

Après administration des différentes doses des extraits de méthanol à tester par voie orale pour chaque lot, on évalue la DL 50 (dose létale 50) c'est-à-dire la dose unique qui détermine dans un délai de 14 jours la mort de 50 % des animaux traités. A partir de ces données, on trace la courbe : nombre de rats morts = f (log dose mg/kg).

La DL50 et son intervalle de confiance sont calculés par la méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon.

La formule suivante a été utilisée pour calculer la DL50 :

Log DL50= log Da+d (f+1) pour K=3. (Weil,1952)

DL50 : La dose la plus faible qui devrait tuer 50% des animaux qui la reçoivent.

Da: La plus petite dose testée.

d= log R,

avec **R** le facteur géométrique qui relie les doses testées.

f : facteur déduit de la table de Weil.

k: degré de liberté.

L'intervalle de confiance à 95% de la DL50 est calculé par la formule suivante:

$$\text{Anti log} = [\log \text{DL50} \pm 2 \alpha \log m] \text{ (Weil, 1952).}$$

$\alpha \log m$ =d α f,

α f facteur déduit de la table de Weil.

2.2.9.2 Activité hypoglycémiant de extraits de méthanol de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. (Test de tolérance de glucose)

Notre étude expérimentale a été réalisée sur des rats Wistar femelles, âgés de 2 à 3 mois avec un poids corporel de 130 à 175g. L'étude pharmacologique se déroule dans le laboratoire de Pharmacologie du Centre de Recherche et de développement (CRD), SAIDAL Alger. Les rats sont placés dans des cages en polypropylène transparent avec un couvercle en acier inoxydable. Ils sont maintenus dans des conditions de l'animalerie température, humidité et nourriture (20-24°C et 50% d'humidité, eau de robinet et litière composée de sciure de bois renouvelée tous les deux jours). Le protocole expérimental a été approuvé par le Centre de Recherche et de Développement CRD.

✓ Mise en place de modèle diabétique :

Le diabète a été provoqué par administration par voie orale à l'aide une seringue munie d'une sonde œsophagique, 4g/Kg de glucose à 50%.

✓ Détermination de la glycémie :

La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre de type Contour plus (voir figure 11). La goutte de sang ponctionnée au niveau de queue du rat, est déposée sur la zone active d'une bandelette. Le taux de glycémie est affiché 45 secondes après le dépôt de la goutte du sang. Le résultat est exprimé en g/l. ce taux est suivi pendant deux heures après l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale. Le pourcentage de diminution de la glycémie est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de diminution de la glycémie} = \frac{[\text{glycémie finale} - \text{glycémie initiale}]}{\text{glycémie initiale}} \times 100$$

✓ Préparation des rats en lots

Pour appliquer les traitements, 30 rats ont été repartis en 6 groupes de 5 rats après un jeun non hydrique de 16 heures.

Lot1 : un lot témoin négatif constitué de rats ayant reçu uniquement 10 ml/kg de poids corporel, de l'eau physiologique par voie orale, administré 1h, 30min 90 min à avant l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale.

Lot 2 : un lot référence, les rats de ce lot ont reçu 0,3mg/kg de PC de glibenclamide, administré 1h : 30min (T90) avant l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale, ceci, afin de faire coïncider le moment d'activité maximale hyperglycémiant de glibenclamide.

Lot 3 : 3, 4, 5, 6 : Quatre lots tests. Les rats de ces quatre lots ont subi un traitement à base des extraits méthanoliques bruts de *Citrullus colocynthis* L et *Rhamnus alaternus* L à des doses respectives de 250, 500 et 300, 450 g/kg de poids corporel.

Des prélèvements sanguins ont été effectués pour chaque lot, au temps T0 (glycémie de base), au temps T-90min, puis toutes les 30 minutes pendant deux heures après la surcharge en glucose.

La glycémie des rats des trois lots a été mesurée à l'aide d'un glucomètre de type (Contour plus). La goutte de sang ponctionnée au niveau de la veine caudale de rat, est déposée sur la zone active d'une bandelette. Le taux de la glycémie est affiché 45 secondes après le dépôt de la goutte du sang. Le résultat est exprimé en g/l.



Fig. 11 Mesure de la glycémie (activité hypoglycémiante)

❖ Analyse Statistique

Toutes les données ont été représentées par la moyenne \pm écart-type.

- ✓ La comparaison statistique des données par période et par catégorie des rats des paramètres sanguins a été faite par le Minitab 16 français
- ✓ La comparaison entre les lots pour chaque temps par : Test d'ANOVA

2293 Activité antidiabétique (Etude à long terme) des extraits méthanoliques de *C. colocynthis* L (EMC) et *R. alaternus* L (EMR) chez des rats normaux (sains) et des rats diabétiques :

✓ Rats expérimentaux :

Notre étude expérimentale a été réalisée sur des rats Wistar mâles, âgés de 2 à 3 mois avec un poids corporel de 130 à 175g. L'étude pharmacologique se déroule dans le laboratoire de Pharmacologie du Centre de Recherche et de développement (CRD), SAIDAL Alger. Les rats sont placés dans des cages en polypropylène transparent avec un couvercle en acier inoxydable. Ils sont maintenus dans des conditions de l'animalerie : température, humidité et nourriture (20-24°C et 50% d'humidité, eau de robinet et litière composée de sciure de bois renouvelée tous les deux jours). Le protocole expérimental a été approuvé par le Centre de Recherche et de Développement CRD.

✓ Induction de diabète expérimental

Des rats Wistar mâles maintenus à jeun pendant 16h ont été traités par une dose intrapéritonéale unique de l'alloxane monohydrate ($\geq 98,0\%$) à 150mg/kg. Pc (voir figure 12) ; préparé juste avant l'injection dans une solution saline normale Na Cl (0,9%) Alarcon-Aquilar JF et *al.*, 2000.

Car l'alloxane est capable de produire une hyperglycémie mortelle à la suite d'une libération massive d'insuline pancréatique, Les rats ont été alors traités avec 30% de solution de glucose par voie orale à un intervalle de temps différents après 6h de l'induction de l'alloxane et une

solution de glucose à 5% a été conservée dans des biberons dans leur cages les 24 heures suivantes.

Après 72 heures de l'injection de l'alloxane, les rats qui ont une glycémie supérieure ou égale à 280 mg/dl, sont considérés comme diabétiques et sont utilisés pour cette expérience.



Fig. 12 Induction de diabète expérimental par l'alloxane

✓ Préparation des rats en lots

40 rats males Wistar 20 sains et 20 diabétique ont été répartie en 8 groupes n=5, 4 lots témoins et 4 lots expérimentaux (tableau 5)

Tableau 5: Répartition par lot des rats sains (normaux) et diabétiques utilisés dans le test d'évaluation de l'activité antidiabétique des extraits de méthanol des feuilles de *Citrullus colocynthis* L et *Rhamnus alaternus* L à long terme .

N° de lots	Groupes	Effectifs des rats	Poids (g)	Solutions gavées	Doses gavées (mg/kg. pc)
1	ST+	5 sains	133.00±3.26	Glibenclamide	300
2	DT+	5 diabétiques	142.9.±2.15	Glibenclamide	300
3	ST-	5 sains	139.76±1.50	Sérum physiologique	1ml Na Cl à 0,9%
4	DT-	5 diabétiques	172.86±1.65	Sérum physiologique	1 ml Na Cl à 0,9%
	SC	5 sains	129.42±1.24	EMC	250
	DC	5 diabétiques	136.20±0.80	EMC	250
	SR	5 sains	131.08±1.67	EMR	300
	DR	5 diabétiques	138.20±0.80	EMR	300

Des prélèvements sanguins rétro-orbitaire sont effectués pour chaque lot, au temps Jour 0 (Glycémie de base), J3, J7 et Jour 14 (voir figure 13). Et un dosage de quelques paramètres sanguins a été réalisé. Le but de cette expérience a été de voir l'effet de l'extrait sur le taux de la glycémie, de l'urémie, de triglycérides, de la cholestérolémie, de la créatinine et de la protéine.



Fig.13 Prélèvement du sang par voie rétro-orbitaire

Le principe de chaque méthode est donné ci- après

✓ Dosage de la glycémie

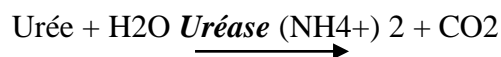
Du sang total a été utilisé pour le dosage de la glycémie, La mesure de la glycémie a été réalisée par électrochimie en utilisant un glucomètre à bandelettes réactives (Contour plus). Sur la zone réactive de chaque bandelette on dépose une goutte de sang total qui se met en contact direct avec le glucose oxydase (GOD), cette dernière par double réaction assure l'oxydation du glucose en gluconolactone et la réduction du ferricyanure en ferrocyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + e^- \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)

Grâce au courant induit par le chrono ampèremètre du glucomètre, le ferrocyanure est ré-oxydé et libère des électrons qui sont ensuite captés par l'électrode de mesure. La mesure de la glycémie est ainsi directement proportionnelle au courant mesuré. Le courant électronique produit au cours de cette réaction électrochimique est transmis dans le moniteur où il est traduit en lecture à l'écran du glucomètre exprimé en mg/dl. Les résultats obtenus de la glycémie correspondent aux valeurs dans le plasma selon la fédération international de chimie clinique (Dufaitre-Patouraux et al., 2003).

La valeur usuelle de la glycémie chez le rat Wistar mâle âgé de 8 à 16 semaines est de : 0.7 à 2.08 g/l (Giknis et Clifford, 2008).

✓ Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par méthode enzymatique colorimétrique à l'uréase (Kit SPINREACT) selon la méthode de **Berthelot 1960**. L'intensité de la coloration développée au cours de la réaction est proportionnelle à la concentration en urée exprimé en mg/dl. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 580 nm contre un blanc.



La valeur usuelle de l'urée chez le rat Wistar mâle âgé de 8 à 16 semaines est de : 1.32 à 2.46 g/l (**Giknis et Clifford, 2008**).

✓ Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine sérique a été réalisé par une méthode chimique colorimétrique et cinétique en milieu alcalin selon la méthode de **Jaffé 1886**. L'absorbance du picrate de créatinine est mesurée au spectrophotomètre à 492 nm contre un blanc. Les résultats sont exprimés en mg/dl.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (**Murray et al., 1984**).

Réactif 1 : acide picrique 17,5 mM/L

Réactif 2 : réactif alcalin (NaOH) 0,29 mM/L

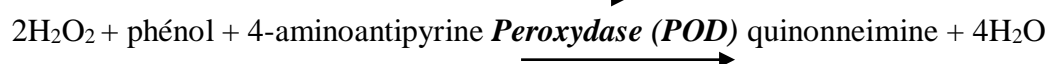
Réactif 3 : étalon de créatinine 2 mg/dl.

La valeur usuelle de la créatinine chez le rat Wistar mâle âgé de 8 à 16 semaines est de : 0.20 à 0.50 g/l (**Giknis et Clifford, 2008**).

✓ Dosage de cholestérol

La détermination du cholestérol dans le sang se fait par des dosages enzymatiques selon la méthode de **Fasce, 1982**.

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. Le cholestérol estérase hydrolyse les esters. H₂O₂ est formé dans l'oxydation enzymatique consécutive du cholestérol par le cholestérol oxydase selon les réactions suivantes :



Réactif 1: Tampon pH 6.9.

Réactif 2: Enzyme (CHE: *Cholestérol estérase*, CHOD: *Cholestérol Oxydase* et POD: *Peroxydase*).

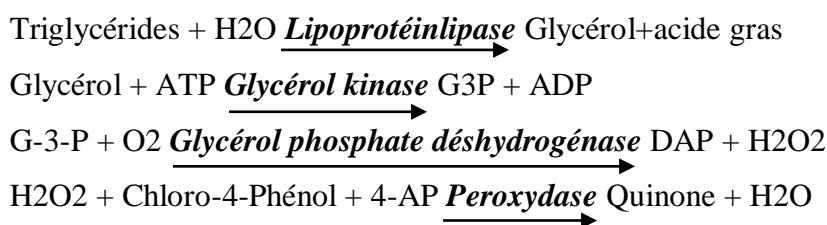
Réactif 3 : Etalon de cholestérol (2 g/l)

Valeurs usuelles du cholestérol chez le rat Wistar mâle âgé de 8 à 16 semaines est de : 0.37 à 0.85 g/l (**Giknis et Clifford, 2008**).

✓ **Dosage de triglycérides**

La détermination des triglycérides dans le sang se fait par des dosages enzymatiques selon la méthode de **Bucolo et David (1973)** et **Fossati et Prencipe (1982)**.

L'échantillon de triglycérides incubé avec lipoprotéinlipase (LPL), permet de libérer le glycérol et des acides gras. Le glycérol est transformé en glycérol-3-phosphate(G3P) et adénosine diphosphate (ADP) par le glycérol kinase (GK) et l'ATP. Glycérol-3-phosphate(G3P) est ensuite transformée par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagi avec 4-amino-phénazone (4-AP) et p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner une couleur rouge :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans l'échantillon du sérum.

Réactif 1 : Tampon pH 7.5 et p-chlorophénol ;

Réactif 2 : enzymes (LPL, GK, GPO, POD) et 4-AP et ATP.

Réactif 3 : Etalon de triglycérides (2 g/l).

Valeurs usuelles des triglycérides chez le rat Wistar mâle âgé de 8 à 16 semaines est de : 0.20 à 1.14 g/l (**Giknis et Clifford, 2008**).

✓ **Dosage des protéines**

La détermination des protéines dans le sang se fait par des dosages enzymatiques selon la méthode de **Biuret (1985)**.

En milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins 4 liaisons peptidiques forment avec les ions cuivre II (Cu²⁺) un complexe bleu-violet dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines. Cette coloration varie également en fonction de la nature des protéines à doser, de l'alcalinité du milieu, de la concentration en sulfate de cuivre et de la température. Un dosage colorimétrique est donc possible à 540 nm. Le réactif de coloration utilisé est le réactif de Gornall, composé :

- De sulfate de cuivre, qui donne la coloration bleue au réactif due aux ions cuivre à 3 mmol/L.
- D'une solution d'hydroxyde de sodium (soude) à 0,2 mol/L, qui rend le milieu basique ;
- de tartrate double de sodium et de potassium, qui « chélate » (piège) les ions Cu^{2+} et évite leur précipitation en milieu alcalin sous forme d'hydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insoluble ;
- d'iodure de potassium, pour éviter la réduction des ions cuivriques avant le dosage.

La valeur usuelle de la protéine chez le rat Wistar mâle âgé de 8 à 16 semaines est de : 0.52 à 0.71 g/l (**Giknis et Clifford, 2008**).

❖ Analyse Statistique

Toutes les données étaient représentées par la moyenne \pm écart-type.

- ✓ la comparaison statistique des données par période et par catégorie des rats des paramètres sanguins a été faite par le Minitab en utilisant l'ANOVA.
- ✓ La comparaison entre lots des rats normaux et les rats diabétiques par Test de Student.

Partie III :
Résultats et discussion

1. Histologie des deux espèces

L'étude histologique a été effectuée sur des coupes transversales des différents organes de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. (feuilles, tiges), les observations microscopiques des différentes coupes ont été effectuées au moyen d'un microscope optique avec différents grossissements x04, x10, x40.

1.1. Structure anatomique des organes de *Citrullus colocynthis* L.

✓ Histologie de la feuille

L'observation microscopique d'une coupe transversale de feuille de *Citrullus colocynthis* L. de l'extérieure vers l'intérieure montre qu'elle est caractérisée par la présence de :

La cuticule : couche externe, généralement résistante et imperméable, recouvrant la paroi des végétaux.

L'épiderme supérieur et inférieur : est une assise continue de cellules qui recouvre les organes aériens et les protège contre la dessiccation et les agressions extérieures tout en permettant de réguler les échanges gazeux avec l'atmosphère. C'est un tissu vivant constitué d'une assise unique de cellules de revêtement jointives, de cellules stomatiques dont la paroi externe de ces cellules est le plus souvent épaissie par un dépôt de cutine (matière cireuse de nature lipidique) constituant la cuticule.

Le parenchyme à méat à cellules cubiques qui sont disposées l'une à côté de l'autre.

Le collenchyme et le sclérenchyme qui sont des tissus de soutien de l'organe

Le collenchyme est constitué de cellules vivantes montrant des épaississements non homogènes, uniquement celluloseux, des parois.

La nervure principale disposée au milieu comprend du xylème et du phloème superposés.

Le xylème : est un constituant des tissus végétaux formé de l'association de vaisseaux, il conduit donc la sève brute.

Le phloème : tissu vasculaire servant à la distribution des éléments nutritifs

Le cambium : des cellules méristématiques joue le rôle de régénération des tissus de xylème et de phloème.

Le Poil tecteur : une expansion des cellules épidermiques de forme allongée, jouant un rôle dans la protection de la plante (**Speranza et Calzoni, 2004**) Voir figure 14.

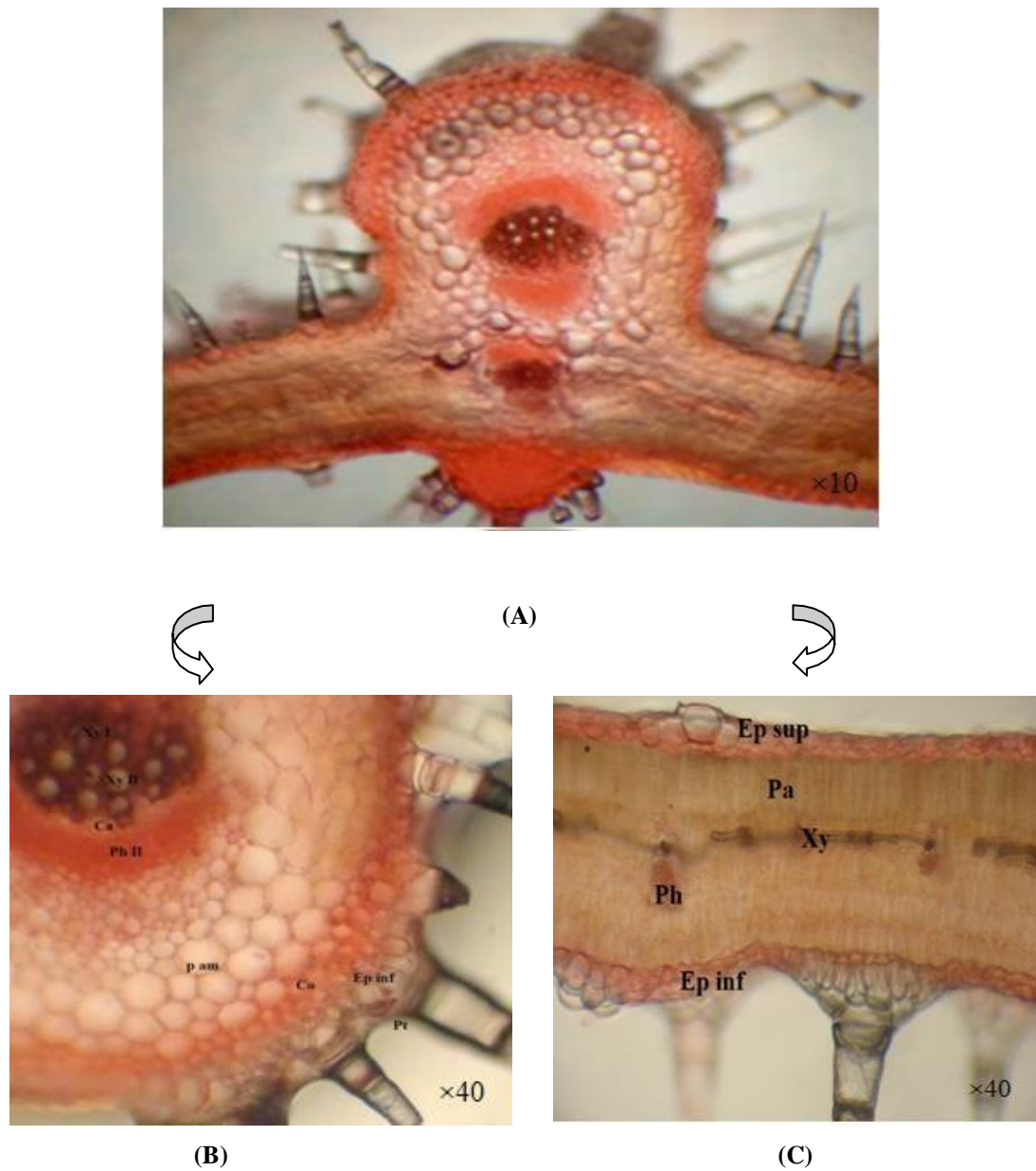


Fig14. Coupe transversale de feuille de *Citrullus colocynthis* L. A : vue générale de la feuilles (G×10), B : Nervure principale de feuille de coloquinte (G×40), C: Limbe de feuille de coloquinte (G×40). Ep inf : épiderme inférieur ; Ep sup : épiderme supérieur ; Sc : sclérenchyme ; Pa : parenchyme ; Pam : parenchyme à méat, XyI : xylème primaire ; Xy II : xylème secondaire ; PhI : phloème primaire ; Ph II : phloème secondaire ; Ca : cambium ; Pt : poil tecteur.

✓ **Histologie de la tige**

L'observation microscopique d'une coupe transversale de la tige *Citrullus colocynthis* L. de l'extérieur vers l'intérieur montre :

L'épiderme : renferme une assise de cellule épidermique recouverte de la cuticule

Le collenchyme constitué par cinq couches de cellules arrondies

Le parenchyme à méats constitué par quatre cellules plus au moins allongées

Le sclérenchyme formé de trois à cinq couches de cellules annulaires.

Poil tecteur : une expansion des cellules épidermiques allongées

Le xylème : est un constituant des tissus végétaux formé de l'association de vaisseaux, on observe deux type primaire et secondaire.

Le phloème : tissu conducteur servant à la distribution des éléments nutritifs, il peut être d'origine primaire ou secondaire (**Speranza et Calzoni, 2004**). Voir figure 15.

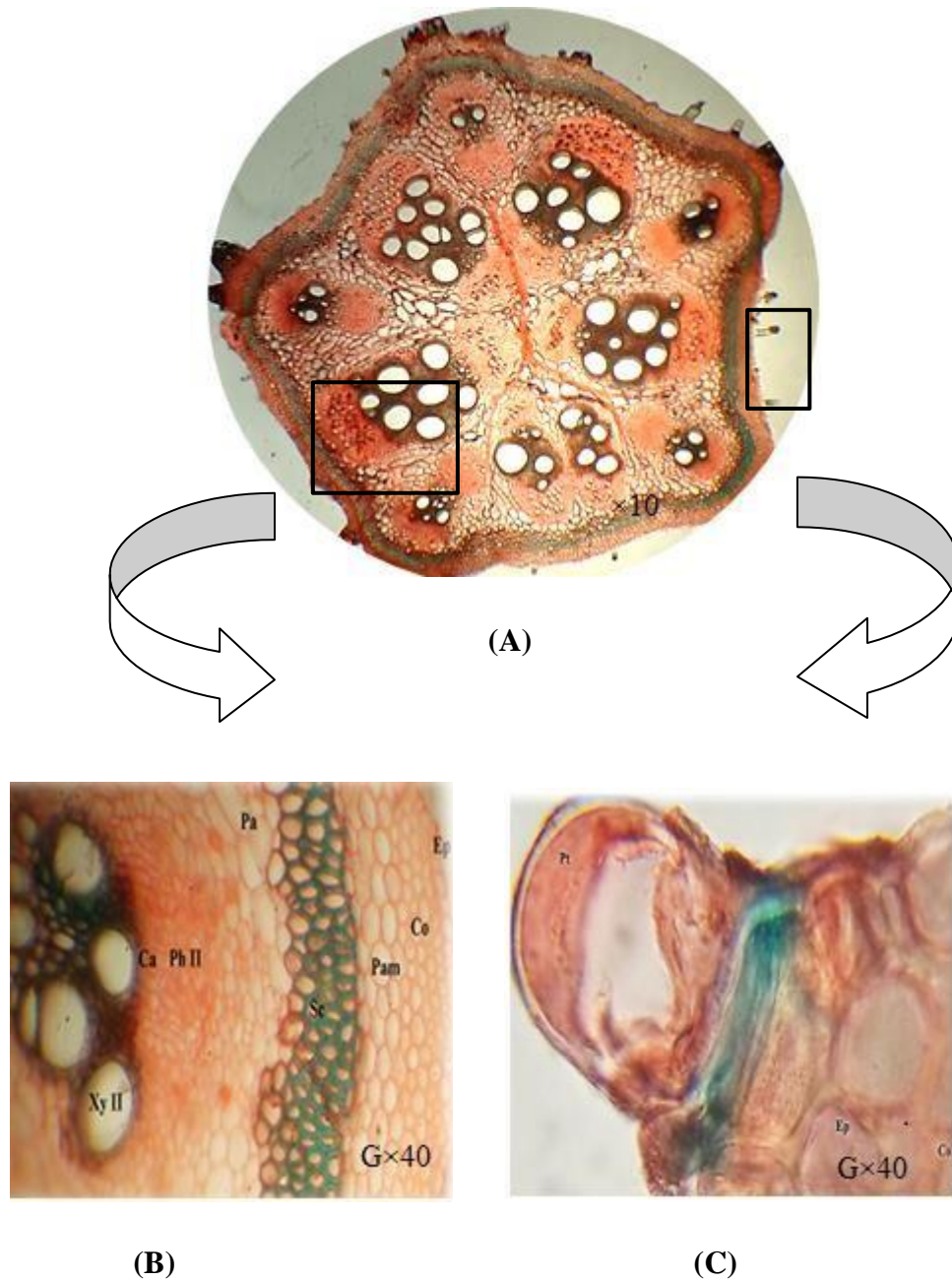


Fig.15 Coupe transversale de tige de *Citrullus colocynthis* L. A : vue générale de la tige (G×10), B : cortex de coloquinte (G×40), C: poils tecteur de coloquinte (G×40). Ep inf : épiderme inférieure ; Ep sup : épiderme supérieure ; Sc : sclérenchyme ; Pa : parenchyme ; Pam : parenchyme à méat, Xyl I : xylème primaire ; Xyl II : xylème secondaire ; Ph I : phloème primaire ; Ph II : phloème secondaire ; Ca : cambium ; Pt : poil tecteur.

1.2. Structure anatomique des organes de *Rhamnus alaternus* L.

❖ Histologie de la feuille

L'observation microscopique d'une coupe transversale de la feuille de la plante *Rhamnus alaternus* L. de l'extérieure vers l'intérieure montre la succession des tissus suivants :

La cuticule : couche externe, généralement résistante et imperméable, recouvrant la paroi des végétaux.

L'épiderme est un tissu formé par une seule assise cellulaire, qui est recouverte par une cuticule mince.

Le mésophile est constitué par deux types de parenchymes : parenchyme palissadique à cellules allongées et le parenchyme à méat à cellules cubiques qui sont disposées l'une à l'autre est constituée aussi par un sclérenchyme, ce dernier entoure la nervure principale.

La nervure principale disposée au milieu comprend du xylème et du phloème superposés.

Le Poil tecteur : une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la protection de la plante.

Le xylème : est un constituant des tissus végétaux formé de l'association de vaisseaux, il conduit donc la sève brute.

Le phloème : tissu vasculaire servant à la distribution des éléments nutritifs, il peut être d'origine primaire ou secondaire le liber (**Frits Hans Schweingruber et al., 2013**). Voir figure 16.

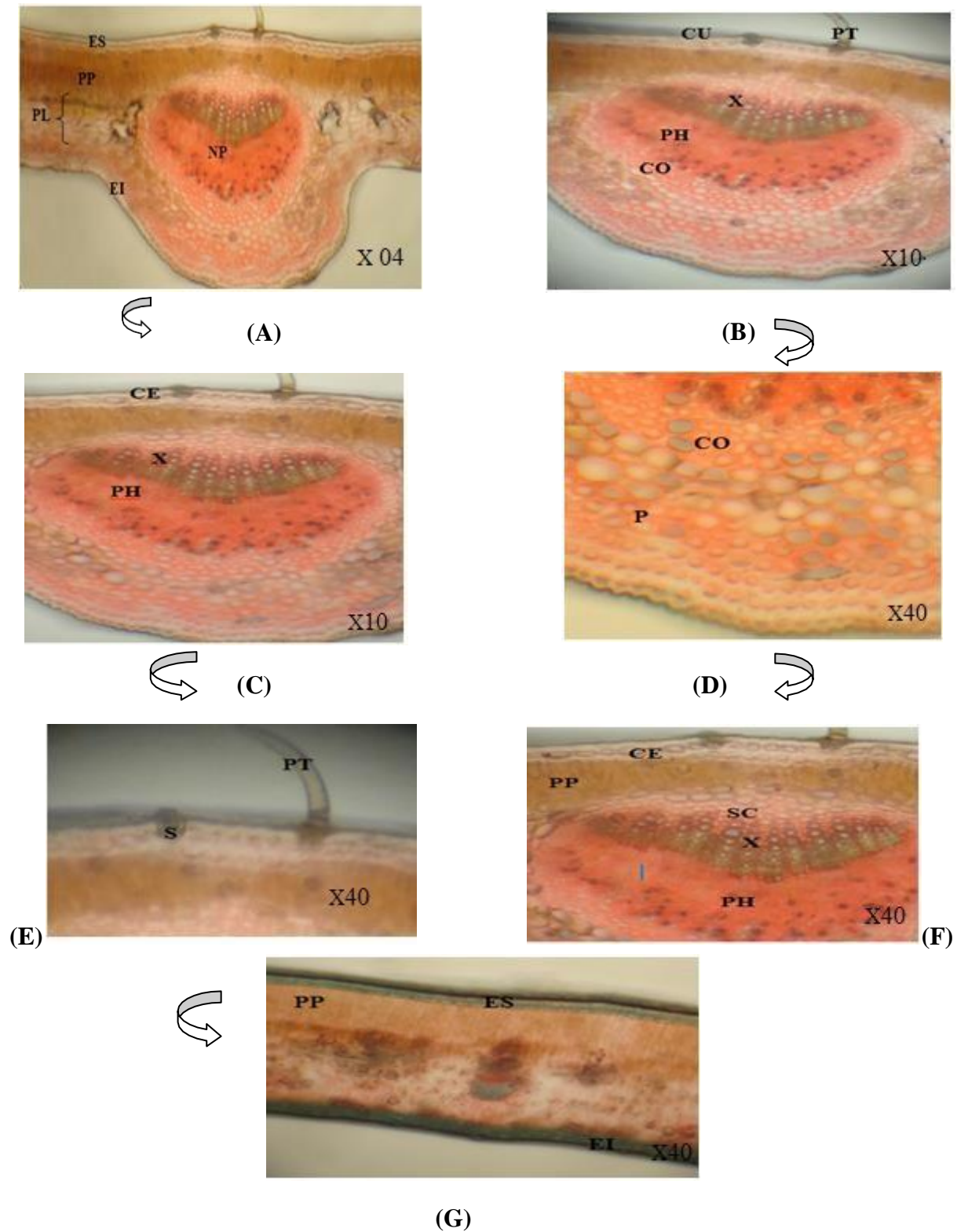


Figure.16 (A), (B), (C), (D),(E), (F) et (G) coupe transversale de la feuille [**ES** : Epiderme supérieur, **PP** : Parenchyme palissadique, **PL** : Parenchyme lacuneux , **NP** : Nervure principale, **EI** : Epiderme inférieur, **CU** : Cuticule, **PT** : Poil tecteur, **CE** : cellules épidermiques, **X** : Xylème, **PH** : Phloème, **CO** : collenchyme, **SC** : Sclérenchyme, **S** : stomate], (G) : coupe transversale de la feuille ; le limbe [**ES** : Epiderme supérieur, **PP** : Parenchyme palissadique, **EI** : Epiderme inférieur (X 04, X10, X40)

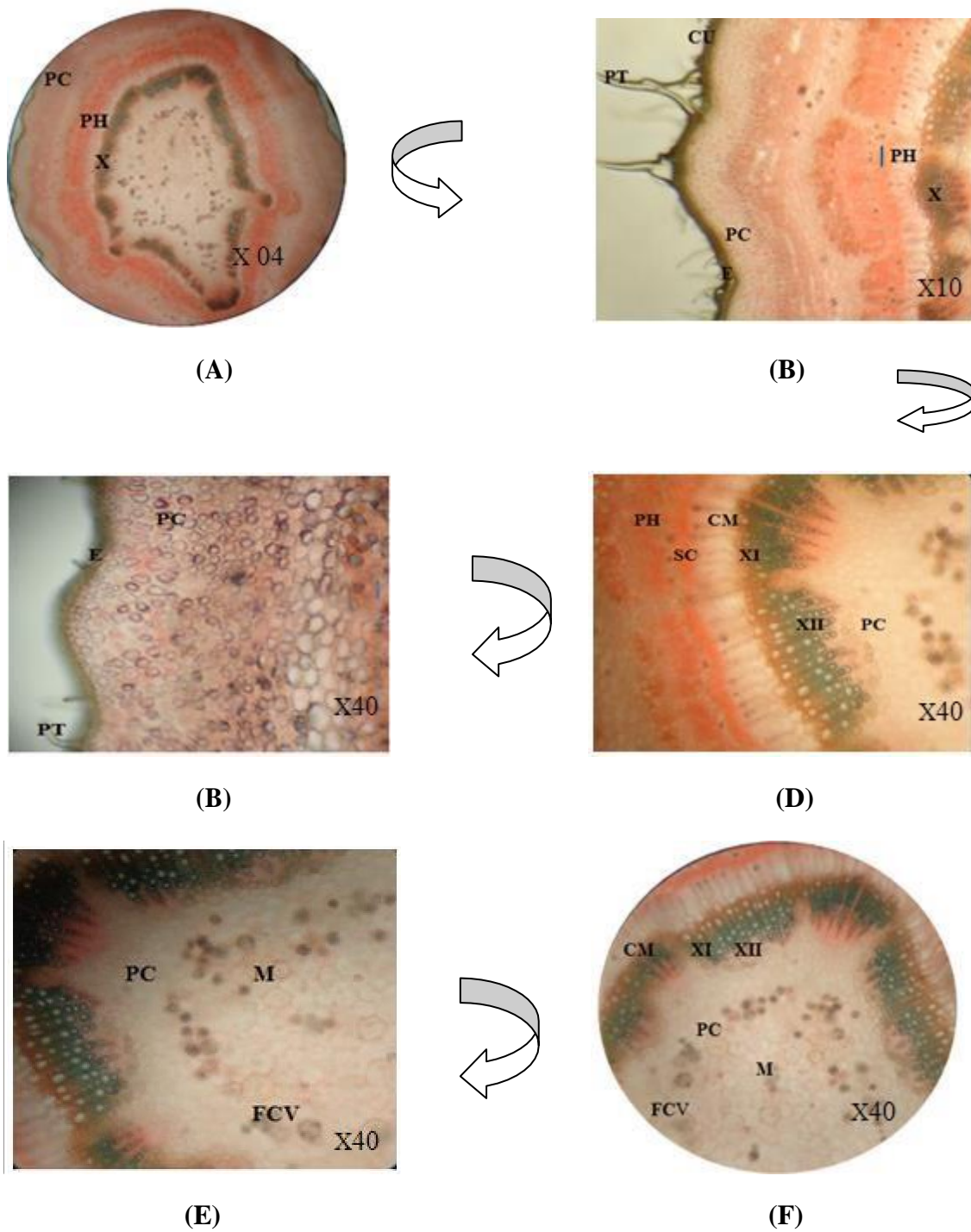


Figure.17 (A), (B), (C), (D), (E), (F) : coupes transversales de la tiges.[PT :poil tecteur CU : cuticule, E : Epiderme, PC : Parenchyme Cortical, FCV : Faisceaux cribro-vasculaire, X : xylème, PH : Phloème, M : moelle (X 04, X10, X40)

❖ Histologie de la tige

L'observation microscopique d'une coupe transversale de la tige de *Rhamnus alaternus* L. de l'extérieure vers l'intérieure montre :

- Une zone externe formée par :

Poils tecteurs : une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la protection de la plante, notamment contre la dessiccation.

La cuticule : couche externe, généralement résistante et imperméable, recouvrant la paroi des végétaux.

L'épiderme est le tissu le plus externe, formé par une seule assise cellulaire, qui est constitué par une paroi épaisse recouverte d'une cuticule mince et des stomates.

- La deuxième zone est le cortex, composée de deux tissus (soutien et remplissage) : sclérenchyme et le parenchyme.

Le sclérenchyme : est formé par deux à trois couches de cellules qui présenté à forme angulaire.

Le parenchyme cortical évolue en collenchyme, ce dernier est situé sous l'épiderme.

- La troisième zone est constituée par les faisceaux cribro-vasculaire, chaque faisceaux est composé d'un xylème et phloème.

Les faisceaux cribro-vasculaire sont répartis sur deux cycles, les uns de grande taille, les autres, plus petits, réunis entre eux par un ruban de sclérenchyme (la formation secondaire de dicotylédone) et comprennent du xylème et du phloème superposées. Chaque faisceau présente vers l'intérieur un petit triangle de xylème et vers l'extérieur, superposé au xylème, un petit massif de phloème, et entre les deux se situent la formation secondaire, du cambium (centrifuge).

Le xylème est constitué de protoxylème et métaxylème, de même on distingue un Protophloème et un métaphloème de structure plus complexe.

Le Phloème ou tissu conducteur et de tubes criblés de cellules parenchymateuses (rôle de réserve)

Cambium : est une fine de couche de cellules méristématiques, il se forme à partir du procambium, couche unicellulaire.

La moelle enfin occupe le centre, le parenchyme médullaire sclérifié a large cellules enterrant les vaisseaux cribro-vasculaire de rayon médullaire (**Frits Hans Schweingruber et al., 2013**).

Voir figure 17.

2. Screening phytochimique de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

2.1. *Citrullus colocynthis* L.

Les résultats des tests phytochimiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* L., sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 Screening phytochimique de *Citrullus colocynthis* L.

Groupement chimique	Feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L.
Tanins Gallique	+
Anthocyanes	+
Leuco-anthocyanes	-
Saponosides	+
Alcaloïdes	+
Flavonoïdes	+
Cardinolides	-
Terpènes et Stérols	-
Quinones	-
Amidon	-

Signification des signes (+) : présence, et (-) : absence

❖ Interprétation des résultats :

Le screening chimique a été réalisé sur les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. pour détecter la présence ou l'absence de différents métabolites secondaires.

D'après les résultats obtenus nous avons révélé la présence des alcaloïdes dans les feuilles de coloquinte. **Power et Moore, (1908) in [Paris et Moyes, 1971]** ont signalé la présence d'un alcaloïde dans la coloquinte. Plusieurs autres travaux ont confirmé la présence des alcaloïdes dans la coloquinte tel que : **Abed, et al (2000)** qu'ont testé l'effet de l'extrait aqueux des alcaloïdes d'écorce de *Citrullus colocynthis* L. sur l'activité hypoglycémique ainsi que **(Marzouk et al, 2010)**, qui ont déterminé la teneur en alcaloïdes dans les graines de *Citrullus colocynthis* L.

Nous avons noté également la présence des flavonoïdes dans les feuilles de coloquinte. Cela a été montré par **Harsh et al, (1988)** qui ont révélé la présence des flavonoïdes antimicrobiens **Bezanger et al, (1990)**, **Marzouk et al (2010)** ont confirmé la présence des flavonoïdes dans la graine de coloquinte.

L'analyse qualitative a révélé la présence de saponine dans les feuilles de la coloquinte. **Gurudeeban et al (2010)** ont déclaré la présence des saponines dans les feuilles, **Vipin et al, (2012)** ont montré que les racines de coloquinte contiennent des saponines.

Nous avons révélé également la présence des tanins galliques au niveau des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. **Jayaraman et al, 2009** ont souligné la présence des tanins dans les fruits de la coloquinte, alors que **Gurudeeban et al,(2010)** ont confirmé la présence des tanins dans les feuilles de cette même espèce.

Par contre le test des terpènes et stérol est négatifs dans les feuilles **Jayaraman et al, (2009)** ont révélé la présence des terpènes dans les fruits de *Citrullus colocynthis* L. Alors que **Guredeeban et al, (2010)** ont déclaré la présence des terpènes dans les feuilles, **Vipin et al, (2012)** ont souligné la présence des triterpènes dans les racines de *Citrullus colocynthis* L.

Le test des anthocyanes est positif, nous avons marqué leurs présences dans les feuilles de la coloquinte

D'autre part, nous avons détecté l'absence des leuco-anthocyanes, des cardinolides des quinones, et d'amidon dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

2.2. *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats des tests phytochimiques des organes de *Rhamnus alaternus* L., sont présentés dans le tableau 7.

Tableau .7 Screening chimique de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Principes actifs	Feuille
Tanins	+
Anthocyanes	+
Leuco- anthocyanes	-
Coumarines	+
Saponosides	+
Alcaloïdes	+
Flavonoïdes	+
Terpènes et stérols	+
Quinones	+
Anthraquinones	+
Amidon	-

Signification des signes (+) : présence, et (-) : absence

❖ Interprétation des résultats :

Le screening chimique qui a été réalisé sur les feuilles de *Rhamnus alaternus* L., nous a montré que cette espèce renferme divers principes actifs :

Les tests révèlent la présence des tanins galliques dans les feuilles. Selon **Ben Ammar et al, 2008** l'espèce *Rhamnus alaternus* L. renferme en grande quantité des Tanins. **Hamida, (2012)** a mis en évidence la présence des tanins avec une teneur de $5,976 \pm 1,880$ en mg d'Eq / 100g d'extrait.

Nous avons noté également la présence des Anthocyanes dans les feuilles de *Rhamnus alaternus*.

L'apparition d'une fluorescence sous UV nous révèle la présence des coumarines dans les feuilles de nerprun alaterne

Nous avons remarqué la présence des saponosides .Nos résultats corroborent avec ceux de **Hamida (2012)** qui mentionne la présence des saponosides dans notre espèce avec une teneur de 23,05%.

Le test de Dragendorff révèle la présence des alcaloïdes dans les feuilles. (**Beloued, (2005)** a signalé que les drupes, les feuilles et les tiges de *Rhamnus alaternus* L sont riches en Alcaloïdes. **Hamida, (2012)** a mis en évidence la présence des alcaloïdes avec une teneur de 10,06 %.

Nous avons noté la présence des flavonoïdes ; **Marzouk et al (1999)** ont signalé que certaines espèces du genre *Rhamnus* contiennent des flavonoïdes. **Hamida, (2012)** a mis en évidence la présence des flavonoïdes avec une teneur de $2,77 \pm 0,28$ mg d'Eq /100g d'extrait. Ce pendant **Ben Ammar et al., 2009** ont pu isoler Trois flavonoïdes tri-glycosidiques à partir des feuilles de *R. alaternus*, notamment :

- ✚ Kaempferol 3-O-β-isorhamninoside,
- ✚ Rhamnocitrin 3-O- β –isorhamninoside.
- ✚ Rhamnetin-3- O – β –isorhamninoside,

En revanche, dans notre espèce trois flavonoïdes aglycones ont été identifiés :

l'apigénine, le kaempferol et la quercétine.

Nous avons détecté la présence des Terpènes et stérols dans les feuilles de *Rhamnus*. La présence des Quinones a été également notée. Nous avons détecté la présence des Anthraquinones dans les feuilles et les fleurs de *Rhamnus* **Ben Ammar et al(2008)** ont signalé également cette présence, (**Wei et al, 1992**) ont aussi mentionné que généralement, les espèces du genre *Rhamnus* contiennent des anthraquinones telles que l'émodine ou chrysophanol.

Dans une autre étude **Abou-chaar et Shamlian** , (1980) ont signalé que quatre anthraquinones aglycones ont été isolées à partir de la partie aérienne de la plante : l'émodyne était l'aglycone le plus abondant, il a été trouvé dans toutes les parties examinées de la plante, en même temps, c'est le seul aglycone détecté dans les graines et dans le péricarpe mûr, le Chrysophanol existe abondamment dans les parties les plus jeunes de la plante mais totalement absent dans les feuilles entièrement mûres. L'Alaternin atteint sa concentration maximale dans l'écorce. La quatrième anthraquinone, le Physcion a été trouvé dans toutes les parties de la plante à l'exception des graines et du péricarpe mûr.

D'autre part nous avons détecté l'absence des leuco-anthocyanes, de l'amidon, dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Tableau 8 Composition chimique de *Citrullus colocynthis* L et *Rhamnus alaternus* L

Groupement chimique	Feuilles de <i>Citrullus colocynthis</i> L.	Feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.
Tanins Gallique	+	+
Anthocyanes	+	+
Leuco-anthocyanes	-	-
Coumarine	-	+
Saponosides	+	+
Alcaloïdes	+	+
Flavonoïdes	+	+
Cardinolides	-	-
Terpènes et Stérols	-	+
Quinones	-	+
Amidon	-	-

Signification des signes (+) : présence, et (-) : absence

❖ Conclusion

Les tests phytochimiques ont révélé la richesse des deux espèces objets de cette étude en métabolites secondaires (tableau 8) tel que les alcaloïdes, les polyphénols, et les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins qui sont des données propriétés médicinales et qui ont très bénéfique pour la santé humaine.

3. Variation des teneurs en métabolites secondaires de *Citrullus colocynthis* L. et de *Rhamnus alaternus* L.

3.1. Teneur en Tanins dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les tanins sont un ensemble de polymères phénoliques qui selon leur concentration dans un produit, développent une note organoleptique positive ou négative, ils ont soluble dans l'eau et les solvants organiques (Bruneton , 2009).

Les résultats de l'analyse quantitative des tanins des extraits organiques de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. sont présentés dans le tableau 9 et la figure 18.

Tableau 9 Teneur en tanins dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Espèces	Tanins ($\mu\text{g EqQ}/100\text{g d'extract}$)		
	Méthanol	Ethanol	Acétone
<i>Citrullus colocynthis</i> L	8.3 ± 0.4	5.7 ± 0.3	3.1 ± 0.2
<i>Rhamnus alaternus</i> L	6.0 ± 0.5	4.1 ± 0.4	2.0 ± 0.3

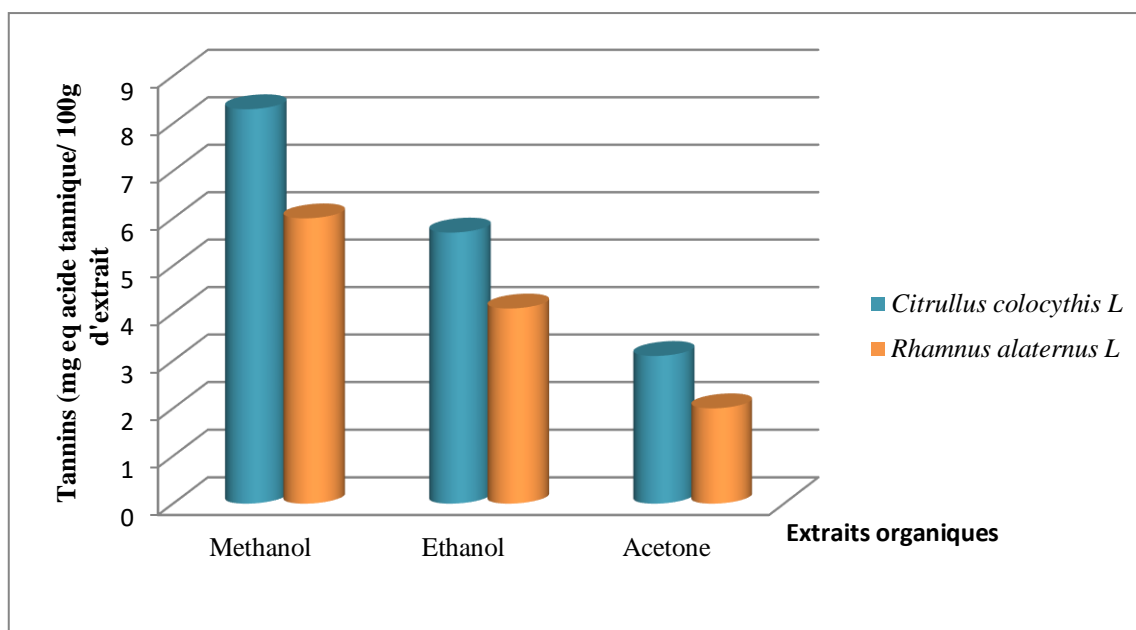


Fig.18 Teneur des Tanins dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

✓ Interprétation des résultats

L'expérience a été réalisée pour estimer la teneur en tanin dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. L'estimation a été réalisée pour les trois extraits : le méthanol, l'acétone et l'éthanol.

Selon les résultats on distingue que les extraits organiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. sont plus riches en tanins en comparaison avec la teneur des tanins dans les extraits organiques de *Rhamnus alaternus* L. dont les teneurs obtenus sont :

8.3± 0.4 mg équivalent d'acide tannique /100g d'extrait pour l'extrait de méthanol de feuille de *Citrullus colocynthis* L.

5.7± 0.3 mg équivalent d'acide tannique /100g d'extrait pour l'extrait de l'éthanol de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

3.1± 0.2 mg équivalent d'acide tannique /100g d'extrait pour l'extrait de l'acétone de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

6.0± 0.5 mg équivalent d'acide tannique /100g d'extrait pour l'extrait de méthanol de feuille de *Rhamnus alaternus* L.

4.1± 0.4 mg équivalent d'acide tannique /100g d'extrait pour l'extrait de l'éthanol de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

2.0± 0.3 mg équivalent d'acide tannique /100g d'extrait l'extrait de l'acétone de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats obtenues sont ressemblent à ceux de **Hamida, (2011)**, qui a trouvé la teneur en tanins condensés dans l'infusé de *Rhamnus alaternus* L. de l'ordre de 5.976± 1.88 mg équivalent d'acide tannique /100g d'extrait. **Mercy et al.,(2018)**, ont également analysé les tanins dans des graines de quelques cucurbitacées de Cameroun (*Cucumeropsis mannii*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Lagenaria siceraria* et *Cucumis sativus*,) et ils ont trouvé une teneur en tanins variant entre 46.23 et 89.41 mg par 100g de matière sèche.

Les résultats dans le tableau 8 et la figure 14 illustrent ces résultats. Le premier point était que les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. présentaient un contenu plus élevé que celui des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. Le deuxième est l'extrait de méthanol de chaque espèce était meilleur que l'extrait d'éthanol et d'acétone.

3.2. Teneur en flavonoïdes dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles *Rhamnus alaternus* L.

Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux. De nombreuses études indiquent que les flavonoïdes présents dans notre alimentation pourraient

jouer un rôle important dans la prévention de diverses pathologies, en raison de leurs effets antioxydants, pseudo-oestrogéniques, anti-tumoraux, etc., (Gazengel et Orecchioni , 2013). Les résultats de l'analyse quantitative des flavonoïdes des extraits organiques de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. sont indiqués dans le tableau 10 et la figure 19.

Tableau 10 Teneur en flavonoïdes dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L

Espèces	Flavonoïdes (mg Eq quercétine /100g d'extrait)		
	Méthanol	Ethanol	Acétone
<i>Citrullus colocynthis</i> L	64.8 ± 1.8	49.2 ± 0.6	23.7 ± 0.6
<i>Rhamnus alaternus</i> L	44.6 ± 0.9	28.8 ± 0.7	17.6 ± 0.5

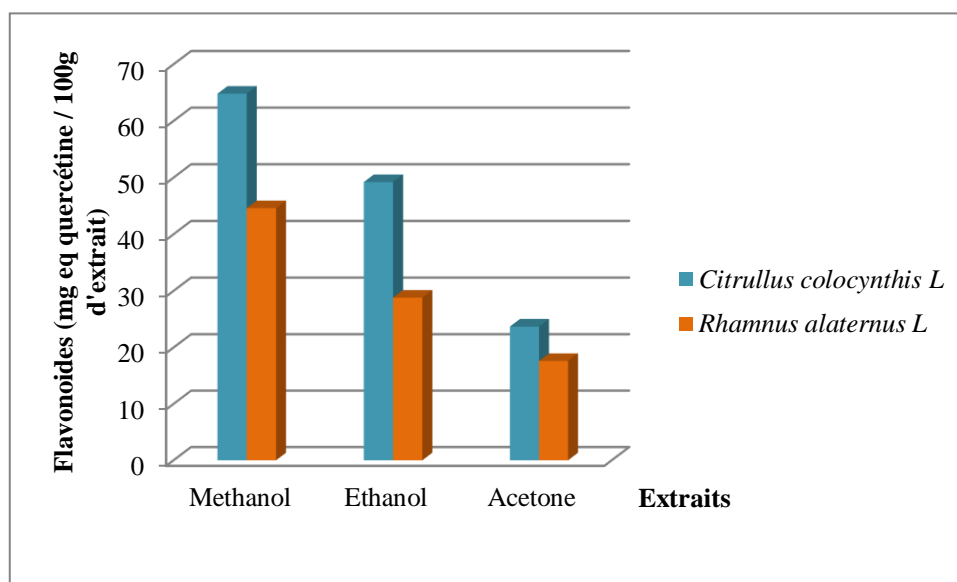


Fig.19 Teneur en flavonoïdes dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

✓ **Interprétation des résultats :**

Cette expérience visait à estimer la teneur totale en flavonoïdes dans trois extraits préparés à partir des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et de *Rhamnus alaternus* L.

D'après les résultats obtenus l'extrait de méthanol de *Citrullus colocynthis* L. est très riche en flavonoïdes (64.8±1.8 mg eq/100g de l'extrait), suivie par l'extrait de l'éthanol de *C. colocynthis* L. (49,2± 0.6 mg eq/100g de l'extrait), suivie par l'extrait de méthanol de *Rhamnus alaternus* L. (44.6±0.9 eq/100g de l'extrait). Ces résultats sont différents de ceux de **Hamida (2011)** qui a trouvé une faible teneur en flavonoïdes lorsqu'il a analysé l'infusé de nerprun alaterne (2.77± 0.28 mg eq/100g de l'extrait). Cette différence de résultats peut

expliquer par la capacité de chaque solvant de capter le maximum des radicaux donc la polarité de chaque solvant. La richesse de la coloquinte en flavonoïdes est expliquée par son effet antibactérien (Marzouk et al., 2010). En outre, il a été observé à partir des résultats de la présente étude que l'extrait méthanolique exprimait la teneur la plus élevée en flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Sahreen et al. (2010) qui ont trouvé que l'extrait de méthanol présentait la teneur la plus élevée en phénol total et en flavonoïde total par rapport aux autres solvants organiques.

3.3. Teneur en polyphénols totaux dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

Les polyphénols sont des composés très précieux, présents spécifiquement chez les végétaux et jouent un rôle antioxydant puissant (Bruneton, 2009). Les résultats de l'analyse qualitative des polyphénols totaux des extraits organiques de *Rhamnus alaternus* L. sont présentés dans le tableau 11 et la figure 20.

Tableau 11 Teneur en polyphénols totaux dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L.

Espèces	Polyphénols totaux (mg eq acide gallique/100g d'extrait)		
	Methanol	Ethanol	Acetone
<i>Citrullus colocynthis</i> L	114.6 ± 2.1	94.6 ± 1.7	74.7 ± 0.6
<i>Rhamnus alaternus</i> L	79.8 ± 1.9	51.4 ± 1.3	32.4 ± 0.6

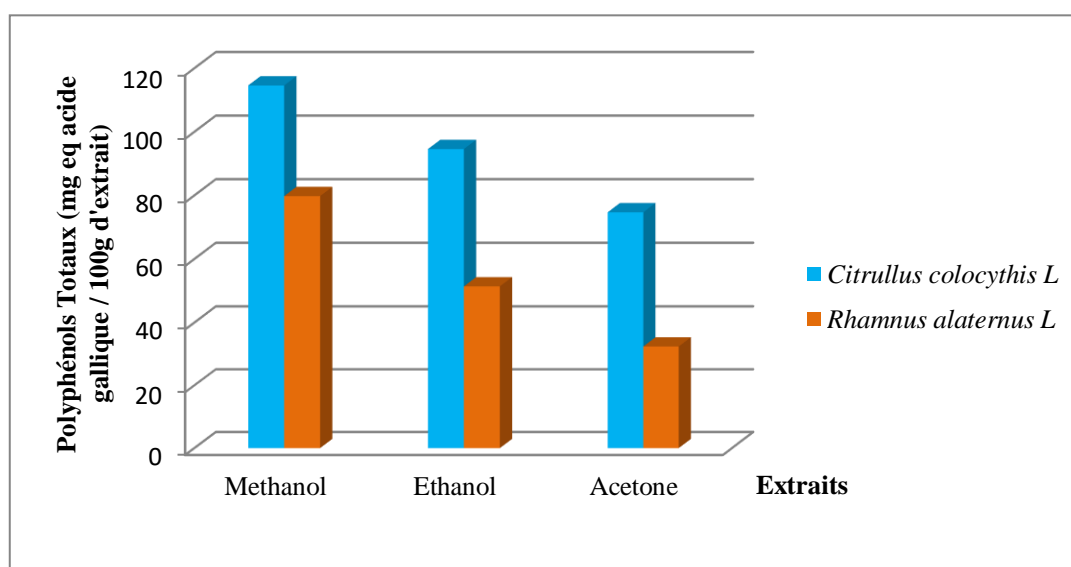


Fig.20 Teneur en polyphénols totaux dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

✓ Interprétation des résultats

Cette expérience a été réalisée pour déterminer la teneur totale en phénol des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. La teneur totale en phénol a été estimée dans les trois extraits préparés avec de l'acétone, du méthanol et de l'éthanol.

Selon les résultats obtenus on observe que les extraits organiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. sont très riches en composés polyphénoliques dont les teneurs calculé sont : 114.6± 2.1 mg équivalent d'acide gallique pour 100 l'extrait de méthanol de feuille de *Citrullus colocynthis* L.

94.6± 1.7 mg équivalent d'acide gallique pour 100 l'extrait de l'éthanol de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

74.7± 0.6 mg équivalent d'acide gallique pour 100 l'extrait de l'acétone de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Les résultats du tableau 11 et de la figure 20 montrent que la teneur en phénols totaux des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. était supérieure à celle des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. En outre, il était clair que l'extrait de méthanol était le plus efficace que l'éthanol et l'acétone pour libérer la teneur totale en phénol, qui diffère d'une plante à une autre et aussi dans la même plante avec des différents extraits, selon le solvant utilisé et sa polarité ou bien la capacité de capter les radicaux libre (**Francis et al , 1996**). Les composés phénoliques servent d'antioxydants en raison de leur activité de piégeage des radicaux libres ou de leur capacité de chélation des métaux (**Lou et al., 2014**). Par conséquent, la teneur élevée en composés phénoliques dans l'extrait des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. pourrait entraîner une activité anti-oxydante élevée.

Une justification possible serait due à la formation de complexes par une partie des composés phénoliques qui sont plus extractibles dans le méthanol que dans d'autres solvants (**Esmaeili et al., 2015**).

Des composés phénoliques, des tanins et des flavonoïdes ont été décrits pour avoir des effets biologiques multiples, y compris des activités antioxydantes et antimicrobiennes. (**Murugan et Parimelozh, 2014**)

Des données récentes suggèrent que les régimes riches en composés polyphénoliques jouent un rôle important contre les troubles liés au stress oxydatif en raison de leurs activités antioxydantes. Par conséquent, les constituants polyphénoliques du *Citrullus colocynthis* L. qui contiennent une teneur élevée en polyphénoliques peuvent avoir la propriété de contrer les découvertes liées au stress oxydatif.

Les phénols, les flavonoïdes et les saponines ont la capacité d'inhiber les cations et d'autres biomolécules sont capables de protéger les molécules protéiques de la dénaturation (Oyedapo, 2001).

✓ **Conclusion**

Dans la présente étude, Le méthanol et l'éthanol se sont révélés être des solvants efficaces pour extraire les composés phénoliques (Siddhuraja et Becker, 2003). Si l'on considère les extraits de méthanol et d'éthanol, l'extrait de méthanol est plus polaire que l'éthanol (Shi et al., 2005). L'extrait d'éthanol est également un bon extrait de solvant pour l'obtention de composés polyphénoliques et est sans danger pour la consommation humaine (Shi et al., 2005).

33. Teneur en ascorbate total dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et dans les feuilles *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats de la teneur en ascorbate dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L. ont montré dans le tableau 12 et la figure 21.

Tableau 12 Teneur de l'ascorbate dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Espèces	Ascorbate total (mg/ /100g de feuilles)
<i>Citrullus colocynthis</i> L.	96.8±1.7
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	64.5±1.1

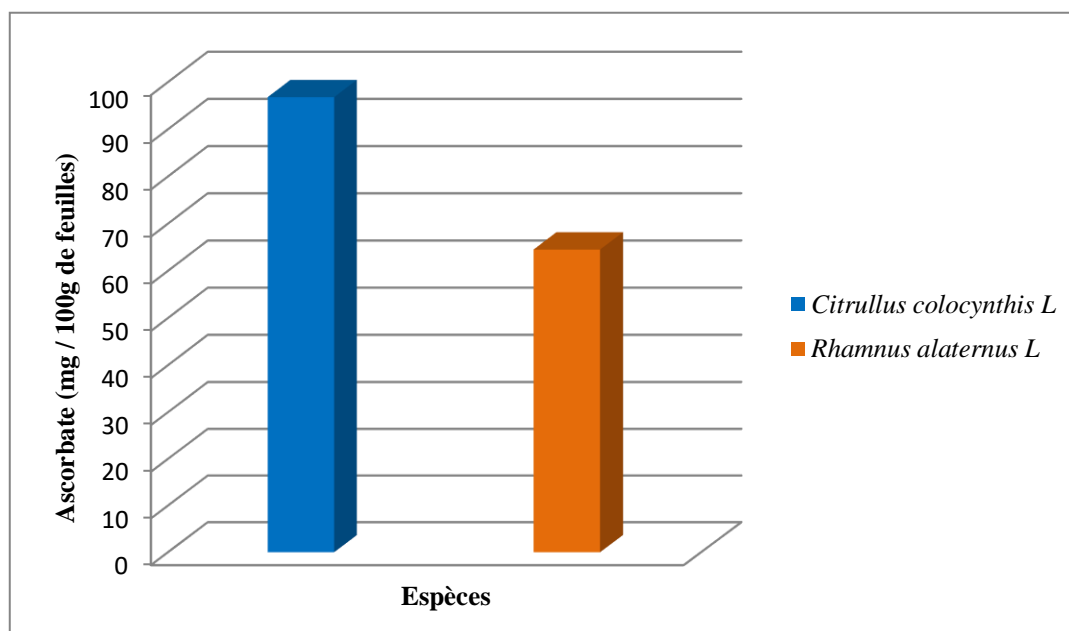


Fig.21 Teneur en ascorbate dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

34. Teneur en glutathion dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats de la teneur en glutathion dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. sont montrés dans le tableau 13 et la figure 22.

Tableau 13 Teneur en glutathion dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Espèces	Glutathion (mg /g- de feuille)
<i>Citrullus colocynthis</i> L	146.6±1.3
<i>Rhamnus alaternus</i> L	95.8±2.6

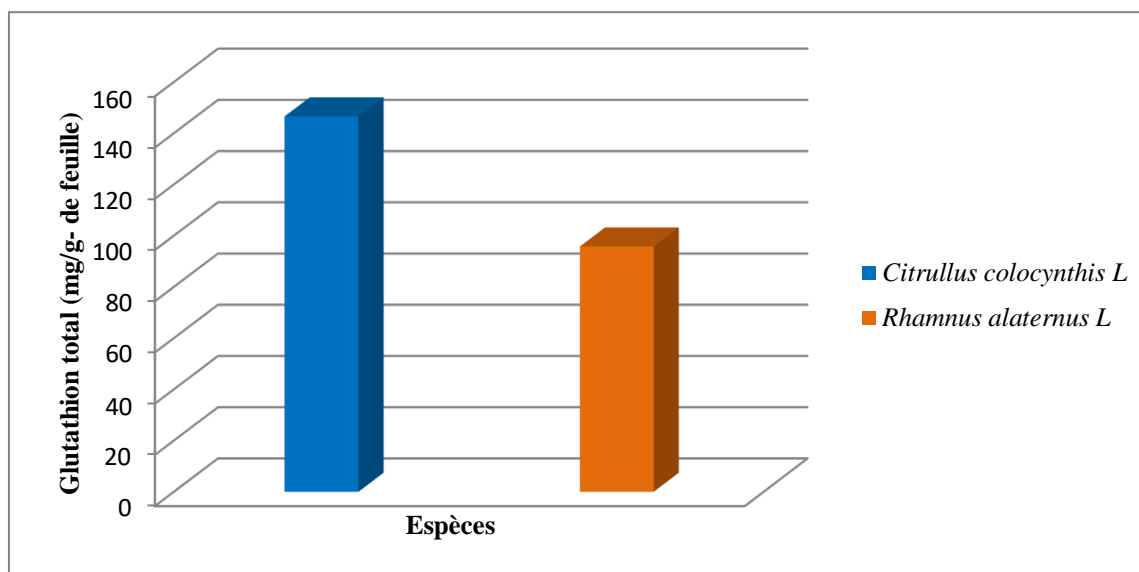


Fig.22 Teneur en glutathion dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

✓ **Interprétation des résultats**

Cette expérience a pour objectif d'estimer les teneurs en ascorbate et glutathion dans les feuilles de deux espèces végétales la coloquinte et le nerprun alaterne. Les résultats obtenus dans les tableaux 12, 13 et les figures 21, 22 montrent la richesse de ces deux espèces en ascorbate et en glutathion. La teneur en ascorbate est plus élevée dans les feuilles de la coloquinte par rapport au nerprun alaterne de même que la teneur en glutathion.

La teneur de *Citrullus colocynthis* L. en ascorbate est de l'ordre de 96.8 ± 1.7 mg/g⁻¹ de feuilles fraîches. Chez les cucurbitacées, grâce à une exsudation importante, la concentration des exsudats en vitamine C a pu être estimée. La vitamine C est présente à des concentrations comprises entre 0,5 et 1,4 mg g⁻¹ MF (soit 2,8 à 8,2 mM) pour des concentrations en sucres solubles totaux dans le phloème variant de 10 à 23 mg g⁻¹ MF (Hancock et al., 2003). Hancock et al.(2007) ont démontré le transport de la vitamine C vers les organes pourrait expliquer les fortes teneurs en vitamine C de certains fruits, mais il

reste très peu étudié et l'on ne sait pas encore s'il peut être modifié par des facteurs environnementaux ou génétiques.

3.5. Teneur de la proline dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats de la teneur en proline dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. sont montrés dans le tableau 14 et la figure 23.

Tableau 14 Teneur en proline dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Espèces	Proline (mg eq leucine/ 100g des feuilles)
<i>Citrullus colocynthis</i> L	24.8±0.6
<i>Rhamnus alaternus</i> L	13.4±0.7

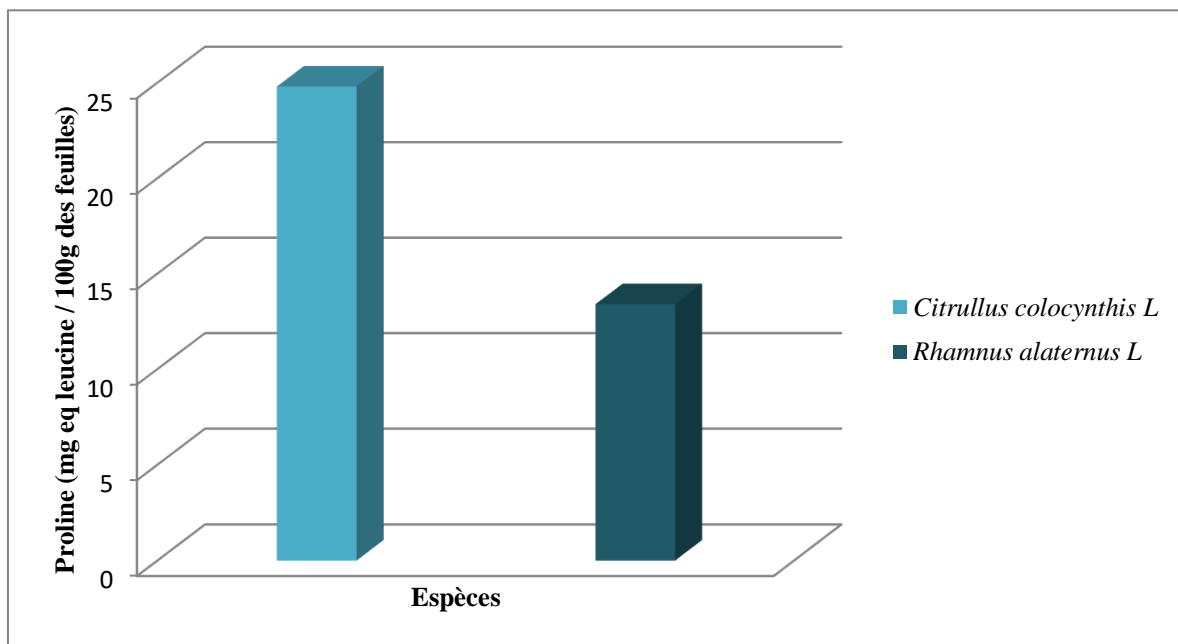


Fig.23 Teneur en proline dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

✓ Interprétation des résultats :

Nos résultats montrent que la proline était plus élevée chez le *Citrullus colocynthis* L que chez le *Rhamnus alaternus* L. La proline pourrait être utilisée comme indicateur de la résistance au stress dû à la sécheresse par implication dans l'osmorégulation (**Kurakawa et al, 2007**).

La proline fait partie des solutés compatibles qui sont une variété de petits métabolites organiques très solubles dans l'eau et non toxiques à des concentrations élevées (**Bohnert et al., 1995**).

Généralement, des solutés compatibles protègent les plantes du stress par différents mécanismes, notamment la contribution au réglage osmotique cellulaire, l'accélération des systèmes de balayage des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la protection de l'intégrité de la membrane et la stabilisation des enzymes / protéines (**Ashrat et Foolad, 2007**).

Chookhampaeng (2011) a indiqué que l'accumulation des solutés compatibles contenant de l'azote, y compris la proline, avait des effets bénéfiques sur l'ajustement osmotique, la protection des macromolécules cellulaires contre les dommages causés par le stress, le stockage de l'azote et le piégeage des radicaux libres.

De nombreuses plantes accumulent la proline en tant qu'osmolyte protecteur et non toxique dans des conditions de stress (**Lacerda et al., 2005**)

3.6 Evaluation des activités enzymatiques dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

3.6.1. L'ascorbate peroxydase (APX)

Les résultats de l'activité enzymatique de l'APX des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L. sont montrés dans le tableau 15 et la figure 24.

Tableau 15 Activité de l'APX dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Espèces	Activité de l'APX (Umg ⁻¹ protéine)
<i>Citrullus colocynthis</i> L	36.8±0.7
<i>Rhamnus alaternus</i> L	18.6±04

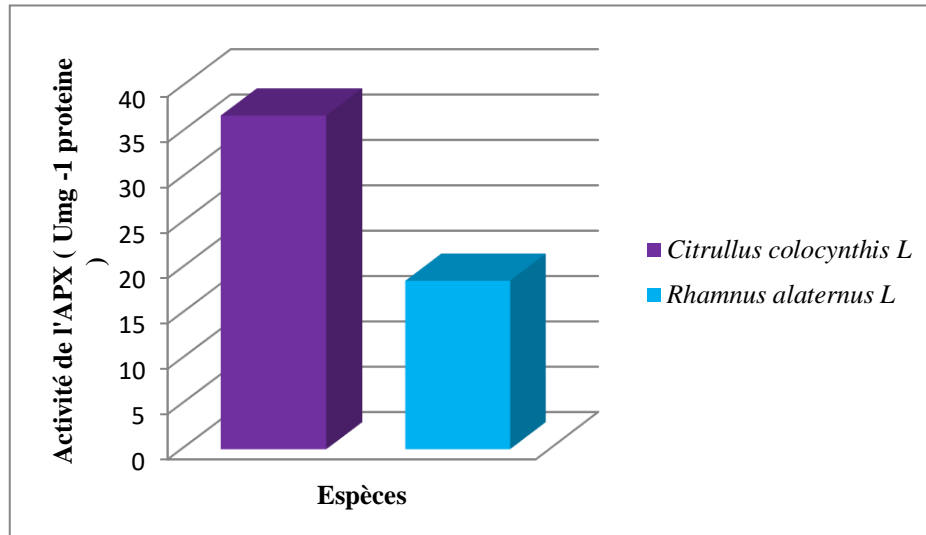


Fig.24 Activité de l'APX dans les feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

3.6.2. Le catalase (CAT)

Les résultats de l'activité enzymatique de CAT des feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et *Rhamnus alaternus L.* sont montrés dans le tableau 16 et la figure 25.

Tableau 16 Activité de CAT dans les feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

Espèces	Activité de CAT (Umg ⁻¹ protéine)
<i>Citrullus colocynthis L.</i>	76.8±0.9
<i>Rhamnus alaternus L.</i>	28.7±05

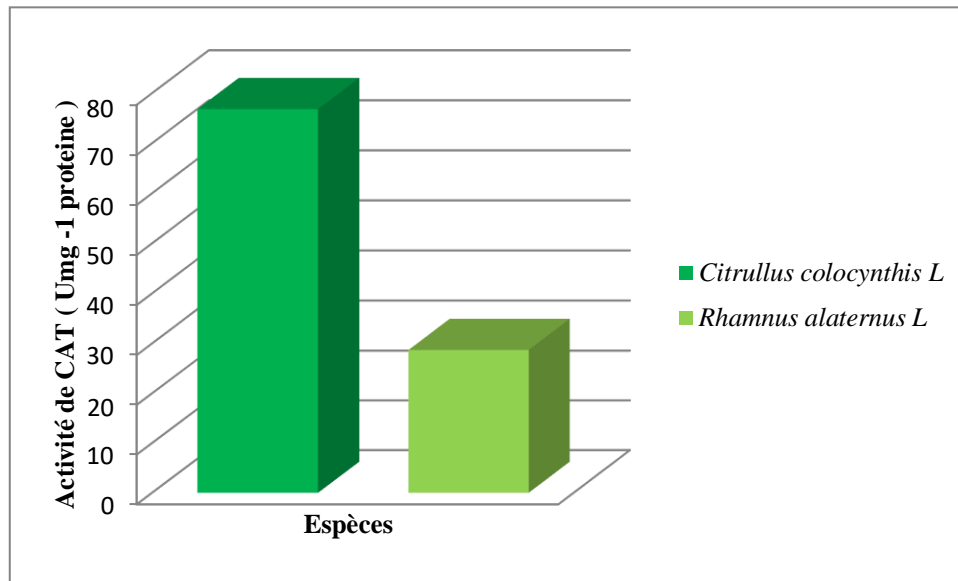


Fig.25 Activité de CAT dans les feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

3.6.3. La superoxyde dismutase (SOD)

Les résultats de l'activité enzymatique de SOD des feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et *Rhamnus alaternus L.* sont montrés dans le tableau 17 et la figure 26.

Tableau 17 Activité de SOD dans les feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

Espèces	Activité de SOD (Umg ⁻¹ protein)
<i>Citrullus colocynthis L.</i>	55.6±0.9
<i>Rhamnus alaternus L.</i>	11.4±04

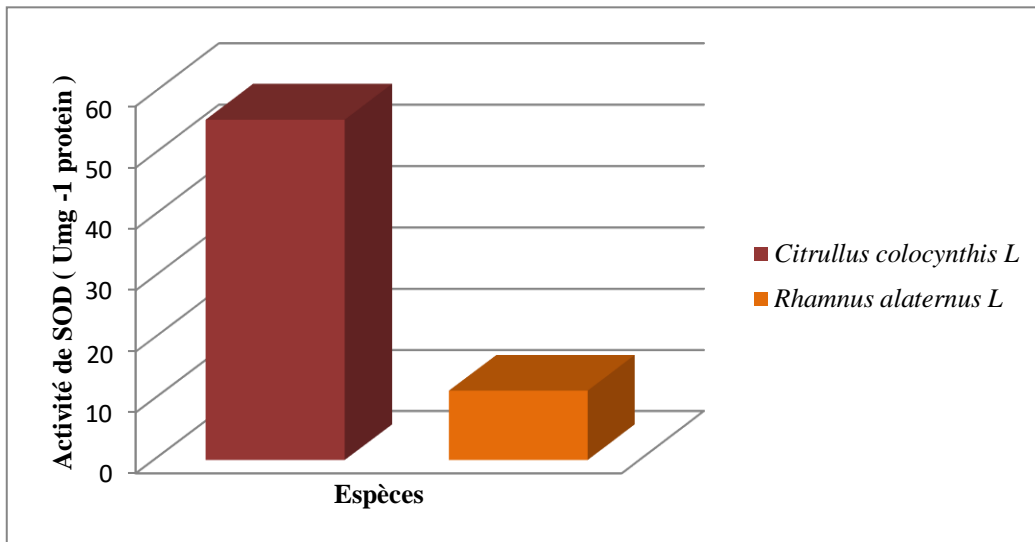


Fig.26 Activité de SOD dans les feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

3.6.4. La glutathion réductase (GR)

Les résultats de l'activité enzymatique de GR des feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et les feuilles de *Rhamnus alaternus L.* sont montrés dans le tableau 18 et la figure 27.

Tableau 18 Activité de GR dans les feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

Espèces	Glutathione reductase (Umg ⁻¹ protein)
<i>Citrullus colocynthis L</i>	36.7±0.6
<i>Rhamnus alaternus L</i>	15.4±04

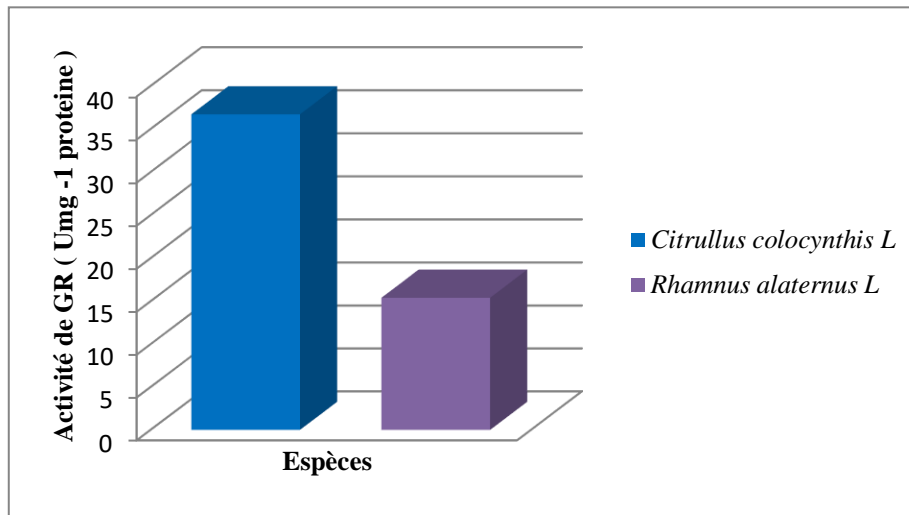


Fig.27 Activité de GR dans les feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

✓ **Interprétation des résultats :**

Dans cette étude, les résultats ont montré que les quatre enzymes antioxydantes: superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX) et glutathion réductase (GR) exprimaient des activités appréciables à la fois chez *Citrullus colocynthis L.* et chez *Rhamnus alaternus L.* Leurs activités étaient plus élevées chez *Citrullus colocynthis L.* que chez *Rhamnus alaternus L.*

La catalase exprime l'activité la plus élevée stimulée par le superoxyde dismutase qui lui est stimulé par l'ascorbate peroxydase et la glutathion réductase. Ceci indique que la superoxyde dismutase végétale agit sur les radicaux potentiellement dangereux ($O_2^{\cdot-}$) et que la catalase est plus active que l'ascorbate pour éliminer H_2O_2 et la convertir en H_2O et en oxygène et atténuer ainsi les dommages cellulaires (Jahan et al., 2014).

3.7. Composition chimique en poly-phénols des extraits de méthanol des feuilles de *Citrullus colocynthis L.* et de feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

3.7.1. *Citrullus colocynthis L.*

L'extrait méthanolique de feuilles de *Citrullus colocynthis L.* a été soumis à une analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC) pour identifier ces différents composants phénoliques. 12 substances ont été identifiées dont les données sont présentées par temps de rétention, surface, quantité, nom, formule moléculaire et concentration en mg / 100g d'extrait dont les principaux sont la rutine, l'acide vanillique, l'acide benzoïque et l'acide salicylique. La liste complète des substances identifiées dans l'extrait de *Citrullus colocynthis L.* est présentée dans le tableau 19 et la figure 28.

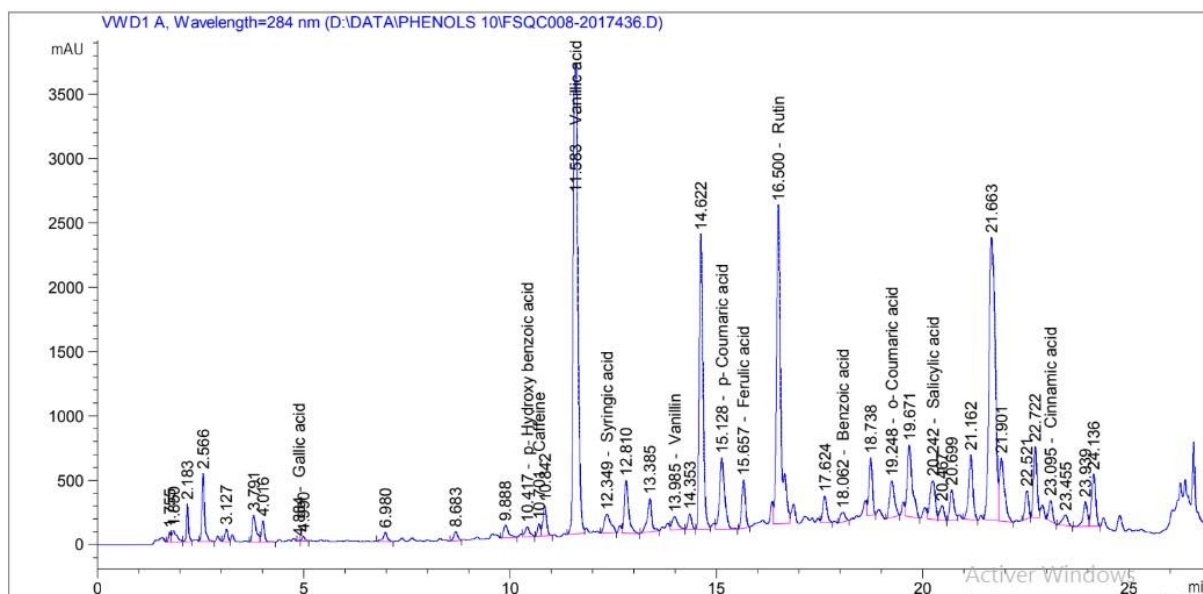


Fig.28 Compositions chimique de l'EMC en polyphénols

Tableau 19 Composition chimique de l'EMC en polyphénols

RetTime [min]	Area[Mau*s]	Amount [ug/ml]	Name	Molecular formula	Conc. Mg/100g
4.884	14.27417	1.06118e-1	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	0.18
9.004	-	-	Catechol	C ₆ H ₆ O ₂	ND
10.417	632.61639	14.60293	p- Hydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	24.34
10.701	460.22672	3.73400	Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	6.22
11.583	2.90861e4	241.21158	Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	402.02
12.120	-	-	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	ND
13.985	995.40649	5.01541	Vannilin	C ₈ H ₈ O ₄	8.36
15.128	4794.10205	13.66779	p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	22.78
15.657	2283.79321	12.10537	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	20.18
16.500	1.78917e4	4002.81441	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1350.76
17.142	-	-	Ellagic	C ₁₄ H ₆ O ₈	ND
18.062	638.94806	50.16508	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	83.61
19.248	2353.01758	7.63913	O-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	12.73
20.242	2628.53149	43.10782	Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	71.85
23.095	990.19495	3.37813	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	5.63

3.7.2. *Rhamnus alaternus* L.

L'extrait méthanolique de feuilles de *R. alaternus* L. (EM) a été soumis à une analyse par chromatographie liquide (HPLC) pour identifier ces différents composants phénoliques, 16 substances ont été identifiées dont les données sont présentées par temps de rétention, surface,

quantité, nom, formule moléculaire et concentration en mg / 100g d'extrait (voir tableau 20). Les principaux composants de l'extrait de *R. alaternus* sont la rutine, l'acide cinnamique, l'acide benzoïque et l'acide ellagique. La liste complète des substances identifiées dans l'extrait de *Rhamnus alaternus* L. est présentée dans le tableau 20 et la figure 29.

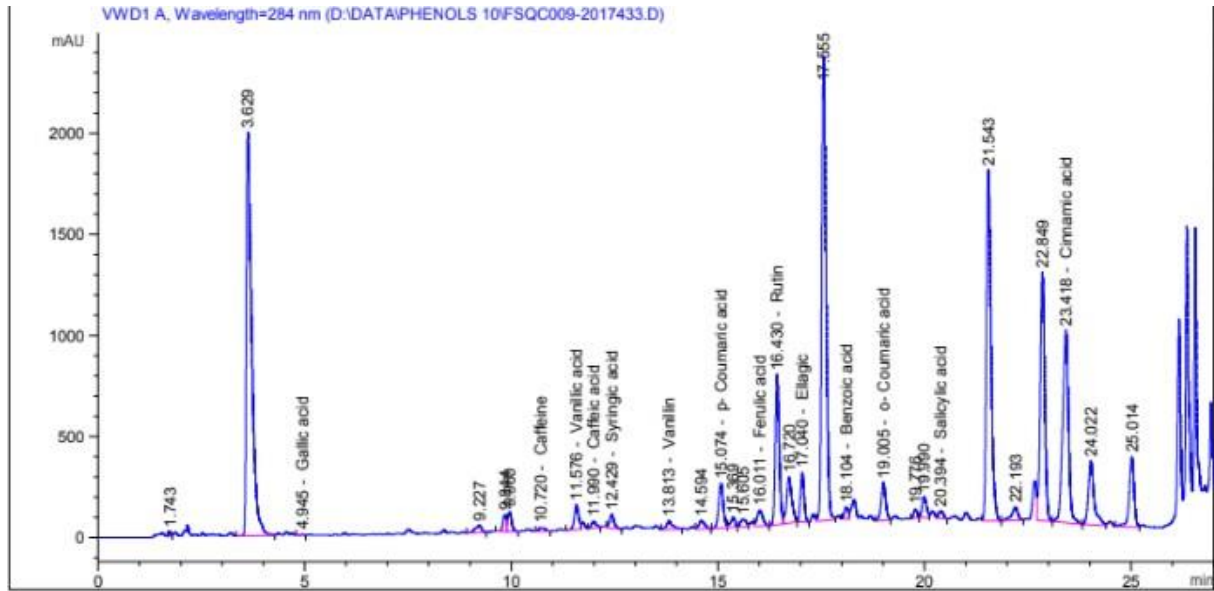


Fig.29 Composition chimique de l'EMR en polyphénols

Tableau 20 Composition chimique de l'EMR en polyphénols

RefTime [min]	Area[Mau*s]	Amount [ug/ml]	Name	Molecular formula	Conc. Mg/100g
4.945	23.69825	1.62334e-1	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	0.27
9.004	-	-	Catechol	C ₆ H ₆ O ₂	ND
10.395	-	-	p- Hydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	ND
10.720	186.0243	1.50699	Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	2.51
11.576	885.83978	7.35340	Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	12.26
11.990	216.25833	1.03343	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	1.72
12.429	531.07904	3.08806	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	5.15
13.813	429.64291	2.16553	Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	3.61
15.074	1745.08740	4.97898	p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	8.30
16.011	755.71997	4.00358	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	6.67
16.430	4929.67773	110.97772	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	671.36
17.040	1513.43726	22.16.35	Ellagic	C ₁₄ H ₆ O ₈	36.93
18.104	370.06271	29.04409	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	48.41
19.005	1393.65222	4.55254	O-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	7.59
20.394	305.46872	4.99870	Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	8.33
23.418	9422.40430	32.66224	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	54.44

3.8 Composition chimique en flavonoïdes des extraits de méthanol des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

3.8.1. *Citrullus colocynthis* L.

L'extrait méthanolique de feuilles de *C. colocynthis* L. (EMC) a été soumis à une analyse par chromatographie liquide pour identifier ces différents composants phénoliques, 4 substances ont été identifiées dont les données sont présentées par temps de rétention, surface, quantité, nom, formule moléculaire et concentration en mg / 100g d'extrait. Les principaux composants de l'extrait de *C. colocynthis* L. sont la rutine, la myricétine, la quercétine et la naringénine . Les résultats obtenus par HPLC sont présentés dans le tableau 21 et la figure 30.

Tableau 21 Composition chimique de l'EMC en flavonoïdes.

	Reten Time (min)	Height (mAU)	Response	Amount (ug/ml)	Compound Name	Conc.mg/100g
3	3.500	320.176	4299.990	2103.734	Rutin	1350.76
5	5.233	24.441	697.345	36.090	Myricetin	60.15
8	7.917	6.977	293.416	11.868	Quercetin	19.78
9	9.217	28.135	818.987	51.837	Neringenin	86.40
	Total	397.724		2203.529		

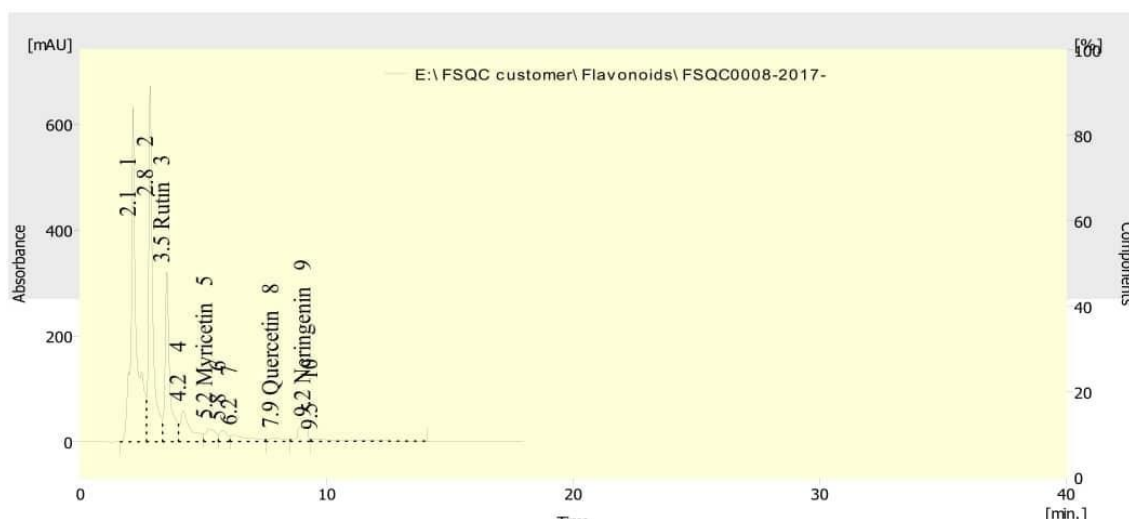


Fig. 30 Composition chimique de l'EMC en flavonoïdes.

3.8.2. *Rhamnus alaternus* L.

L'extrait méthanolique de feuilles de *R. alaternus* L. a été soumis à une analyse par chromatographie liquide pour identifier ces différents composants phénoliques, 3 substances ont été identifiées dont les données sont présentées par temps de rétention, surface, quantité, nom, formule moléculaire et concentration en mg / 100g d'extrait. Les principaux composants de l'extrait de *R. alaternus* L. sont la rutine, la myricétine, la quercétine.

Les résultats obtenus par HPLC sont présentés dans le tableau 22 et la figure 31.

Tableau 22 Composition chimique de l'EMR en flavonoïdes.

	Reten Time (min)	Height (mAU)	Response	Amount (ug/ml)	Compound Name	Conc.mg/100g
2	3.850	351.656	5889.427	2881.352	Rutin	671.36
3	4.600	650.180	7878.998	407.764	Myricetin	679.61
5	8.017	3.750	63.413	2.566	Quercetin	12.83
	Total	1005.586		3291.682		

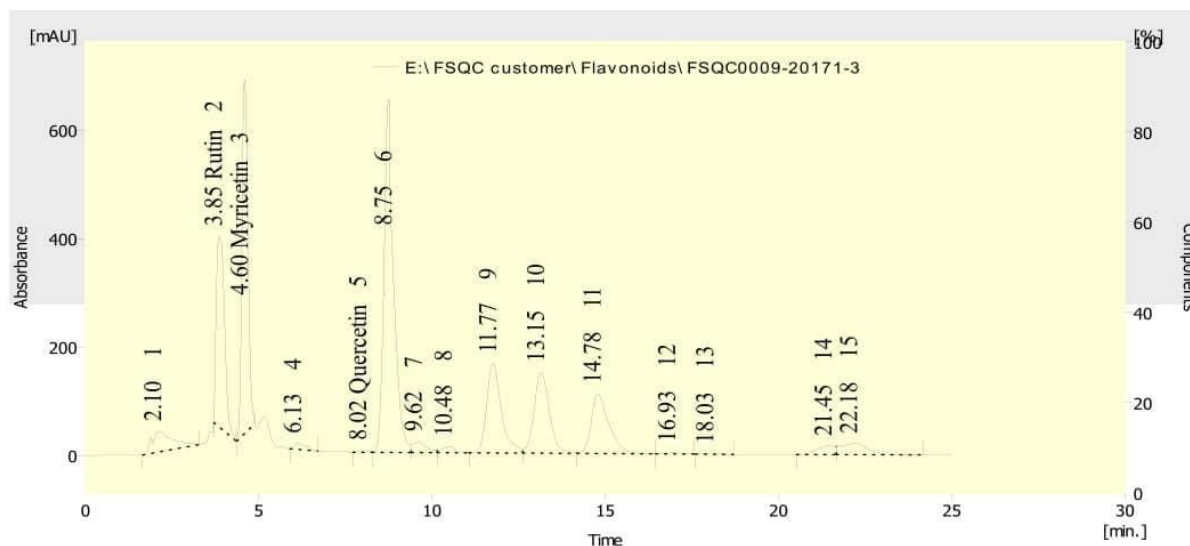


Fig. 31 Composition chimique de l'EMR en flavonoïdes

✓ **Interprétation des résultats :**

L'analyse chromatographique montre que le composant prédominant de l'EMR et l'EMC est la rutine qui est un flavonoïde répandu dans la nature. C'est l'un des composés

phytochimiques les plus attrayants en raison de ses nombreuses propriétés; il est en effet considéré comme l'un des flavonoïdes les plus importants utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Plus de 130 médicaments à base de rutine ont été enregistrés dans le Monde. La rutine a une activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, neuroprotectrice. Elle serait également bénéfique dans certaines maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires ou le diabète. Le caractère anti-diabétique de la rutine a été mis en évidence en 2007 par le groupe Stanley Mainzen Prince (**Matough 2012**), sur l'amélioration de l'homéostasie du glucose chez les rats diabétiques. Dans cette étude, l'administration orale de rutine (100 mg / kg) à des rats diabétiques sur une période de 45 jours a entraîné une diminution de la glycémie et une augmentation des taux d'insuline, avec une augmentation du glycogène dans le foie et les muscles. Il y avait aussi une diminution de la teneur en glycogène dans les reins. La glycémie à jeun a été réduite en augmentant l'activité de l'hexakinase. De plus, l'étude histopathologique du pancréas a révélé le rôle protecteur de la rutine (**Stanley et Kamalakkannan , 2006**).

Parmi les principaux composants de l'EMC on distingue l'acide vanillique. Il a été démontré que les propriétés antibactériennes sont dus à l'acide vanillique isolé d'un extrait à l'éther de latex. (**Anonyme, 2008**), **Fernandez et al, (1996)** ont confirmé le pouvoir antibactérien de l'acide vanillique et d'autre fraction phénolique.

Parmi les principaux composants de l'EMR. L'acide cinnamique, qui appartient à la classe des auxines, également reconnu comme une hormone végétale régulant la croissance et la différenciation cellulaire (**Sharma et Sharma ,2011**). L'acide cinnamique est un composé organique naturel, il est reproduit dans beaucoup d'épices (cannelle, clou de girofle), canneberges et pruneaux, et il fournit une protection naturelle contre les organismes pathogènes. L'acide cinnamique et ses dérivés sont étudiés pour les diverses activités biologiques comme antioxydant, hépatoprotecteur, antioxydant, insectifuge, antidiabétique et anticholestérolémique (**Jean-Jacques et al.,2005**).

3.9. Composition chimique en acides aminés contenus dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L et dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

3.9.1. *Citrullus colocynthis* L.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique des acides aminés des feuilles de *Citrullus colocynthis* L sont présentés dans le tableau 23 et la figure 32.

Tableau 23 Composition chimique des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. en acides aminés

Acides aminés	% Total de l'acide aminé
Cysteine	13
Methionine	10,1
Phenylalanine	1,9
Thyrosine	3,8
Lysine	4,7
Leucine	4,9
Isoleucine	3,3
Vane	3,5
Histidine	2,9
Threonine	5,3
Aalanine	3,4
Aspartique	3,3
Serine	4,2
Arginine	3,6
Glutamique	9,7
Proline	12,9
Glycine	8,4
Total	98,9

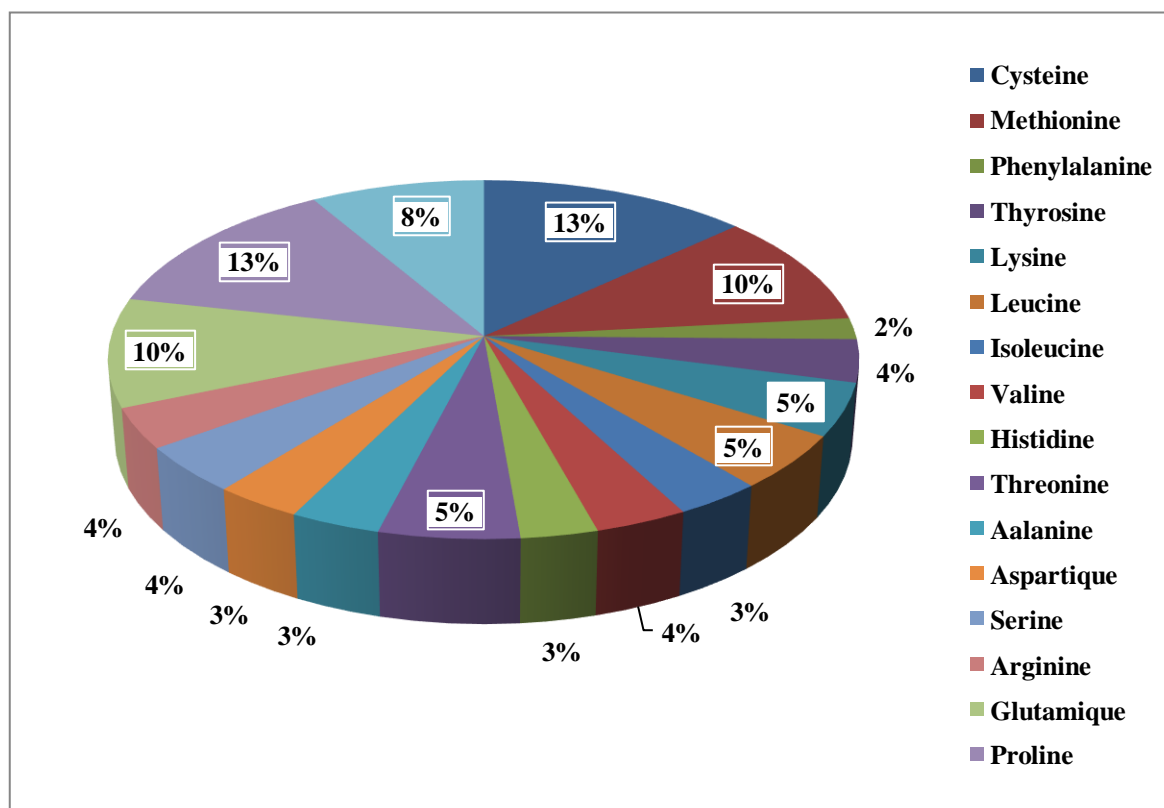


Fig.32 Composition chimique des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. en acide aminés

La composition en acides aminés des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. a été réalisée par chromatographie en phase liquide

Les résultats du tableau 23 et de la figure 32 indiquent que la cystéine (13%), la méthionine (10%), la proline (13%) et l'acide glutamique (10%) sont les plus dominants, l'autre acide aminé restant exprimant divers pourcentages.

3.9.2. *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique des acides aminés des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. sont présentés dans le tableau 24 et la figure 33.

Tableau 24 Composition chimique de feuilles de *Rhamnus alaternus* L. en acide aminées

Acide aminés	% des acides aminés
Cysteine	5
Methionine	4
Phenylalanine	3
Thyrosine	6,8
Lysine	2,7
Leucine	7,9
Isoleucine	7,3
Valine	7,5
Histidine	7,9
Threonine	4,3
Aalanine	5,4
Aspartique	7,3
Serine	6,3
Arginine	8,6
Glutamique	6,7
Proline	4,9
Glycine	3,4
Total	99

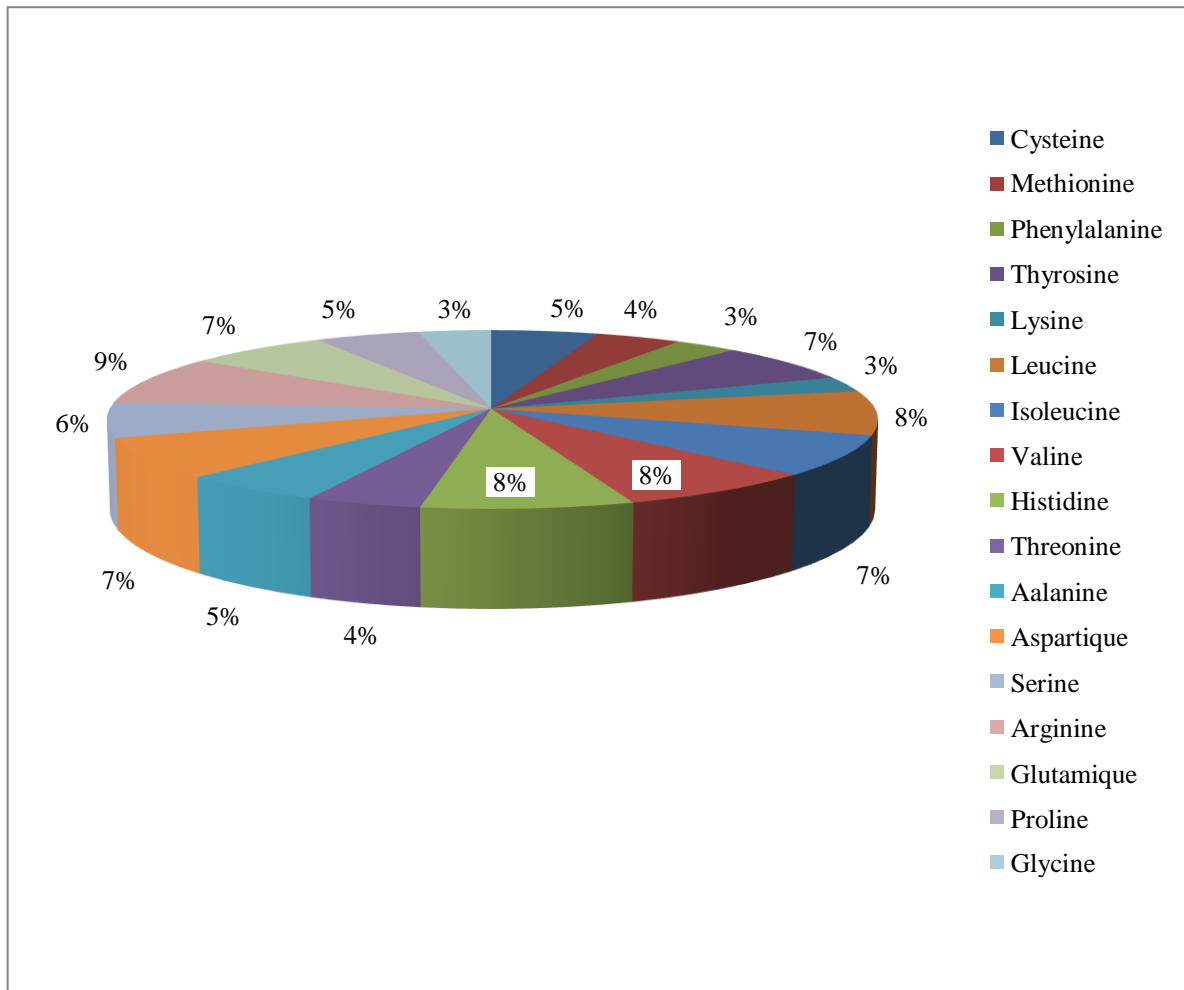


Fig. 33 Composition chimique de feuilles de *Rhamnus alaternus* L. en acide aminées

La composition en acides aminés de *Rhamnus alaternus* L. a été réalisée par la même procédure que celle adoptée pour les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. en utilisant un analyseur d'acides aminés à haute performance.

Les résultats du tableau 24 et de figure 33 montrent que l'arginine, l'histidine, la leucine et le l'isoleucine et l'acide glutamique sont les plus dominants, les autres acides aminé restant exprimant divers pourcentages.

✓ **Interprétation des résultats :**

L'analyse des acides aminés dans les feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et de *Rhamnus alaternus* L. a révélé que la proline était l'acide aminé le plus dominant avec la cystéine et la méthionine chez *Citrullus colocynthis* L. La prédominance de ces deux acides aminés pourrait être attribuée au fait que *Citrullus colocynthis* L. croît dans des conditions de sécheresse et la proline est considérée comme un osmolyte et comme un piègeur de radicaux libres (El-Shora et al., 2016). En outre, la cystéine est un osmolyte peut être utilisé dans les cellules végétales

dans la synthèse du glutathion réduit qui est l'un des antioxydants non enzymatiques. Le glutathion réduit peut piéger les radicaux libres produits sous un stress extrême.

La teneur en méthionine de *Citrullus colocynthis* L. est supérieure à celle de *Rhamnus alaternus* L., ce qui pourrait être attribué au fait que cet acide aminé est un précurseur de polyamines qui sont d'autres types d'antioxydants (El-Shora et al., 2016).

4. Activité antimicrobienne des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L et de feuilles de *Rhamnus alaternus* L

4.1. Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits organiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. sont présentés dans le tableau 25 et la figure 34.

Tableau 25 Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Organismes	Diamètre de zone d'inhibition (mm)			
	Ampicilline	Acétone	Méthanol	Ethanol
<i>E. coli</i>	17 ± 0,7	14 ± 0,6	16 ± 0,5	12 ± 0,6
	Très sensible	Moyen sensible	Très sensible	Sensible
<i>B. subtilis</i>	19 ± 0,6	16 ± 0,7	17 ± 0,7	10 ± 0,5
	Tres sensible	Très sensible	Très sensible	Sensible
<i>S. aureus</i>	21 ± 0,7	16 ± 0,5	18 ± 0,5	11 ± 0,3
	Très sensible	Très sensible	Très sensible	Sensible
<i>B. cereus</i>	16 ± 0,6	15 ± 0,4	17 ± 0,9	12 ± 0,4
	Très sensible	Très sensible	Très sensible	Sensible
<i>P. aeruginosa</i>	18 ± 0,5	13 ± 0,5	16 ± 0,8	13 ± 0,5
	Très sensible	Sensible	Très sensible	Sensible

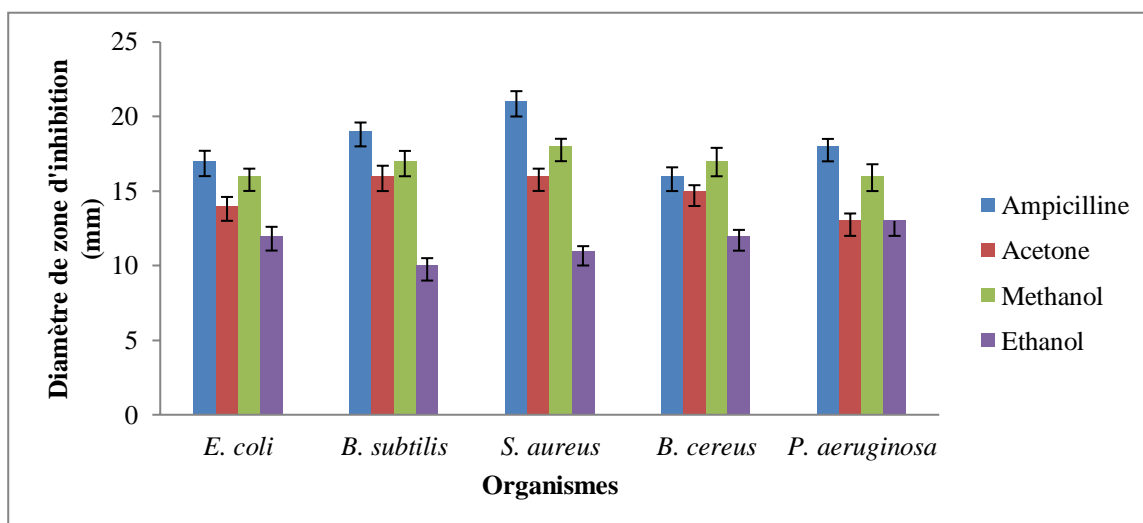


Fig.34 Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Dans cette expérience, l'activité antibactérienne des extraits de feuilles a été étudiée. Les souches bactériennes utilisées étaient *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* et *P. aeruginosa*. Les extraits ont été préparés dans de l'acétone, du méthanol et de l'éthanol. L'ampicilline a été testée comme standard de comparaison. Les résultats du tableau 25 et de la figure 34 indiquent que :

Tous les souches pathogènes testées sont très sensible vis-à-vis l'extrait de méthanol, les diamètres des zones d'inhibitions sont proche à celle de l'antibiotique testé l'ampicilline. Ces résultats sont rassemble à celle de **Gurudeeban et al, (2010)** qui ont testé l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de coloquinte sur plusieurs souche pathogène et ont trouvé que l'extrait de méthanol a une forte activité antibactérienne sur les souches ; *B. subtilis* , *S. pyongens* *B. cereus* *B subtilis* et *S. aureus* sont très sensible vis-à-vis l'extrait de l'acétone.

Toutes les souches testées sont sensible vis-à-vis l'extrait de l'éthanol. **Memon et al, (2003)** ont testé l'extrait de méthanol de différents organe de coloquinte sur des souches gramme positive et ont trouvé une forte activité antibactérienne de cet extrait vis-à-vis ces souche tel que *B. Pumilis* et *S. aureus*.

L'extrait au méthanol de feuilles de *Citrullus colocynthis* L. était l'inhibiteur le plus fort. L'acétone arrive en deuxième position, suivie par l'éthanol.

En outre, ces extraits étaient efficaces en comparaison avec l'ampicilline.

4.2. Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits organiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. sont présentés dans le tableau 26 et la figure 35.

Tableau 26 Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Organismes	Diamètres de zone d'inhibition (mm)			
	Ampicilline	Acétone	Méthanol	Ethanol
<i>E. coli</i>	17 ± 0,7	12 ± 0,6	14 ± 0,5	11 ± 0,6
	Très sensible	sensible	Moyen sensible	Sensible
<i>B. subtilis</i>	19 ± 0,6	14 ± 0,7	16 ± 0,7	9 ± 0,5
	Très sensible	Moyen sensible	Très sensible	Sensible
<i>S. aureus</i>	21 ± 0,7	15 ± 0,5	17 ± 0,5	10 ± 0,3
	Très sensible	Très sensible	Très sensible	Sensible
<i>B. cereus</i>	16 ± 0,6	13 ± 0,4	15 ± 0,9	10 ± 0,4
	Très sensible	Moyen sensible	Très sensible	Sensible
<i>P. aeruginosa</i>	18 ± 0,5	11 ± 0,5	14 ± 0,8	9 ± 0,5
	Très sensible	sensible	Moyen sensible	Sensible

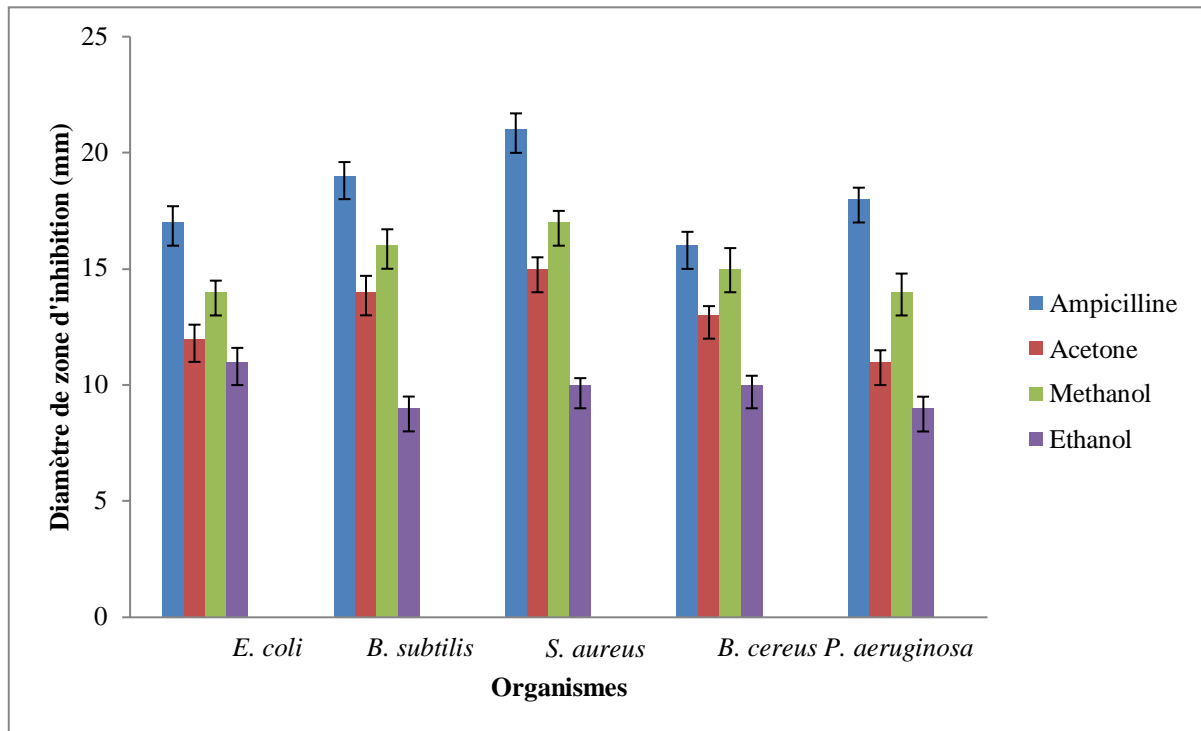


Fig.35.Activité antibactérienne des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus*

Cette expérience a été conçue pour étudier l'effet antibactérien de trois extraits dont le méthanol, l'acétone et l'éthanol préparés à partir de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats du tableau 26 et de la figure 35 montrent des résultats similaires à ceux obtenus pour *Citrullus colocynthis* L. l'extrait de méthanol était le meilleurs inhibiteur par rapport au deux autres extraits testés. Cependant, les extraits de *Rhamnus alaternus* L. ont montré un effet inhibiteur plus faible que ceux de *Citrullus colocynthis* L.

Harrar (2012) a testé l'extrait brut de méthanol de *R. alaternus* L. sur 5 bactéries *E.coli*, *S.aureus*, *K. pneumoniae*, *E.faecalis* et *P.aeruginosa*. . Il a trouvé que *E. faecalis* est la souche la plus sensible, à 200 mg/ml le diamètre d'inhibition est de 21 mm, suivie de *S.aureus* avec un diamètre de 19 mm, puis *P.aeruginosa*, *E.coli* et *K. pneumoniae* avec les diamètres d'inhibition de 14, 13 et 10 mm respectivement.

4.3. Activité antifongique des extraits organiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Les résultats de l'activité antifongique des extraits organiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* sont présentés dans le tableau 27 et la figure 36.

Tableau 27 Activité antifongique des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Diamètre de zone d'inhibition (mm)				
Organismes	Fluconazole	Acétone	Méthanol	Ethanol
<i>Candida albicans</i>	13 ± 0,5 Moyen sensible	10 ± 0,3 Sensible	12 ± 0,4 Moyen sensible	8 ± 0,5 Résistante
<i>Aspergillus niger</i>	15 ± 0,6 Très sensible	8 ± 0,4 Résistante	11 ± 0,6 sensible	7 ± 0,3 Résistante
<i>Aspergillus flavus</i>	15 ± 0,5 Très sensible	10 ± 0,3 Sensible	12 ± 0,4 sensible	9 ± 0,6 Sensible

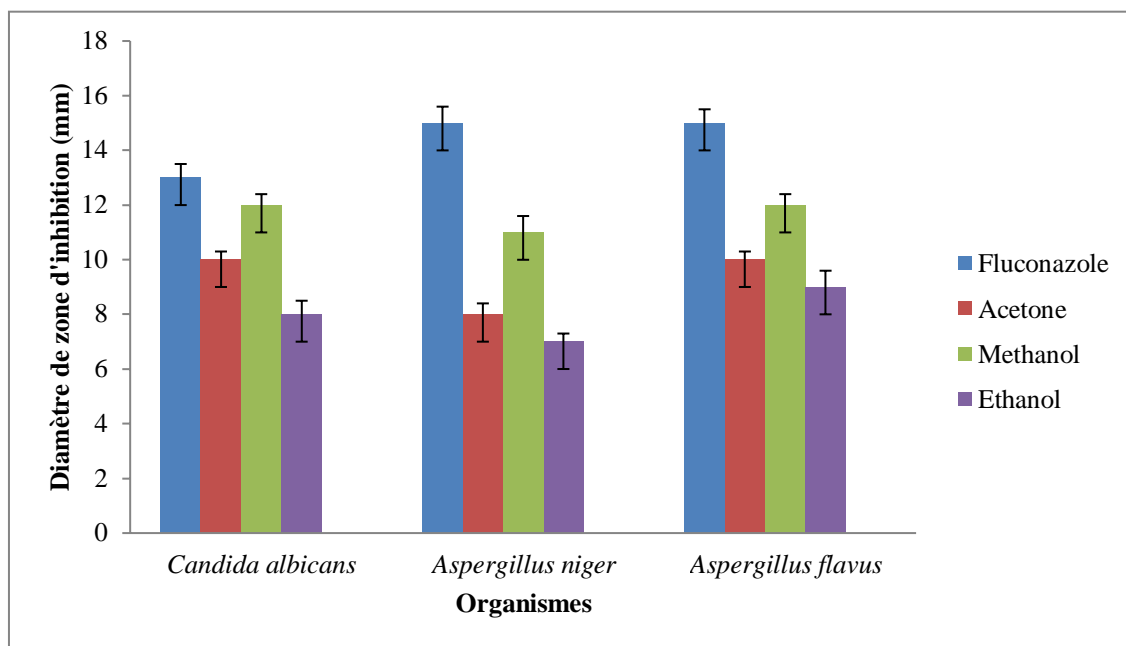


Fig. 36 Activité antifongique des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Dans cette expérience, les trois extraits préparés dans l'acétone, le méthanol et l'éthanol à partir des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. ont été testés en ce qui concerne leurs effets sur *C. albicans*, *A. niger*, *A. flavus*, Fuconazole comme standard de comparaison.

Les résultats du tableau 27 et de la figure 36 indiquent que les trois extraits ont inhibé les trois organismes, en particulier le méthanol suivi par l'acétone.

4.4. Activité antifongique des extraits organiques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats de l'activité antifongique des extraits organiques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. sont présentés dans le tableau 28 et la figure 37.

Tableau 28 Activité antifongique des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Diamètre de zone d'inhibition (mm)				
Organismes	Fluconazole	Acétone	Méthanol	Ethanol
<i>Candida albicans</i>	13 ± 0,5 Moyen sensible	8 ± 0,3 Résistante	10 ± 0,4 sensible	6 ± 0,3 Résistante
<i>Aspergillus niger</i>	15 ± 0,6 Très sensible	6 ± 0,3 Résistante	10 ± 0,3 sensible	6 ± 0,2 Résistante
<i>Aspergillus flavus</i>	15 ± 0,5 Très sensible	8 ± 0,4 Résistante	9 ± 0,3 sensible	7 ± 0,3 Résistante

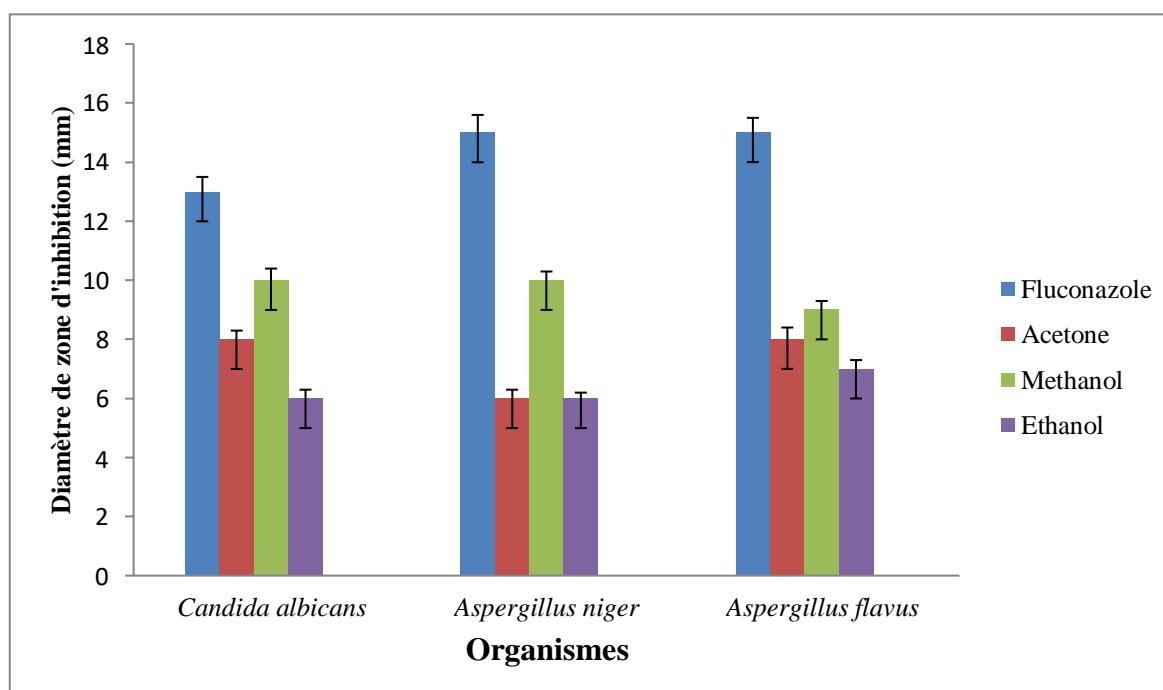


Fig.37 Activité antifongique des extraits organiques de feuille de *Rhamnus alaternus* L.

Les résultats du tableau 28 et de la figure 37 indiquent la capacité des trois extraits de feuilles de *Rhamnus alaternus* L. dont l'acétone le méthanol et l'éthanol à inhiber la croissance de trois champignons *C. albicans*, *A. niger* et *A. flavus*.

Cependant, l'effet antifongique des trois extraits (méthanolique, éthanolique et acétonique) étaient inférieurs à celui du standard le fluconazole. Il a été observé que l'extrait méthanolique était le meilleur inhibiteur par rapport aux extraits d'acétone et d'éthanol.

✓ **Interprétation des résultats :**

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les

hypothèses avancée, nous distinguons l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Jungkind, 1995**). Les polyphénols exercent un effet majeur sur les caractères organoleptiques d'un grand nombre de produits de par leurs propriétés antiseptiques, antibactériennes, antifongiques (**Amarowicz et al, 2008**).

La capacité complexante des tanins (polyphénol) est réactive avec la paroi cellulaire des bactéries et les enzymes extracellulaires sécrétées. Les tanins agissent comme inhibiteurs de croissance vis-à-vis de nombreux micro-organismes, y compris les bactéries, les levures et les champignons, en inhibant le transport des nutriments dans la cellule et en retardant la croissance de l'organisme. Lorsque les tanins sont complexés avec des protéines microbiennes ou des polysaccharides, les interactions formées sont souvent irréversibles, et cette caractéristique confère des propriétés bactéricides et bactériostatiques. Tous les extraits présentaient une activité antimicrobienne contre tous les micro-organismes utilisés dans l'étude (**Arjit et al, 2012** et **Amanda et al, 2014**).

5. Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et *Rhamnus alaternus* L. par DPPH :

5.1. Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

Les résultats de l'activité anti-oxydante des extraits organiques des feuilles de *Citrullus colocynthis* sont présentés dans le tableau 29 et la figure 38.

Tableau 29 Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L

Balayage de l'activité (%)			
Concentration (µg ml⁻¹)	Méthanol	Ethanol	Acétone
50	18,3±0.6	11,7±0.6	15,40±0.6
100	27,8±0.5	18,4±0.4	20,8±0.5
150	42,4±0.8	27,4±0.5	30,7±0.7
200	78,3±1.2	43,5±0.7	55,6±1.0
250	94,6±1.8	65,6±1.0	89,7±1.7

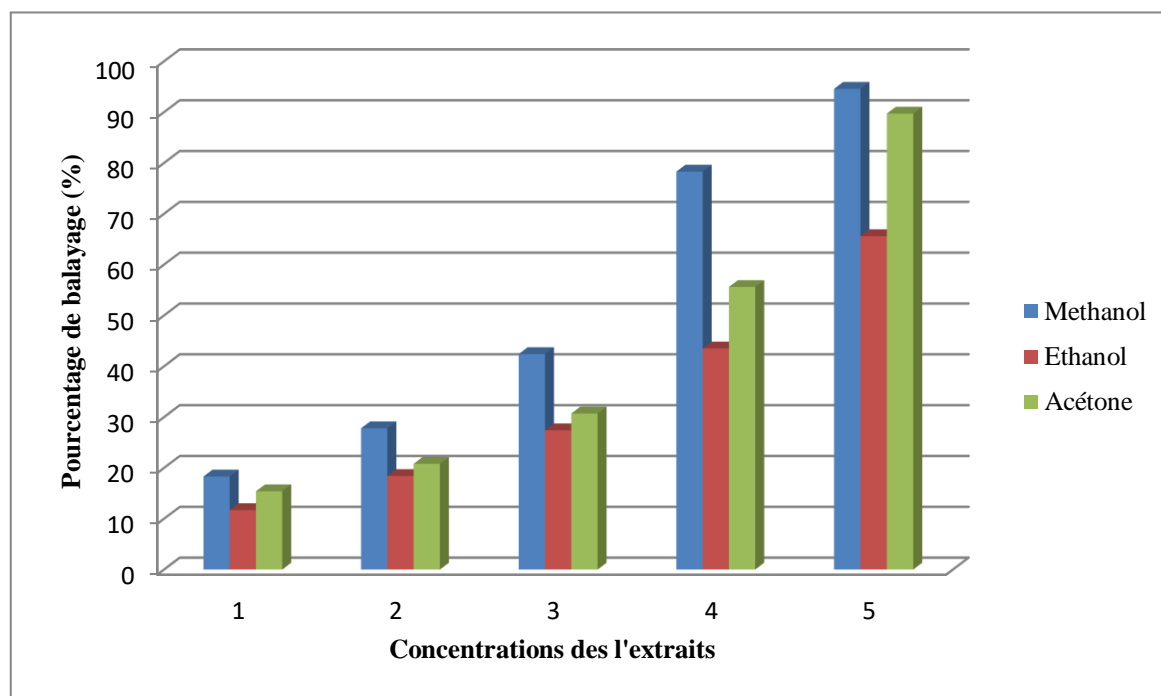


Fig.38 Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L.

L'activité anti-oxydante des divers extraits de feuilles de *Citrullus colocynthis* L, notamment des extraits d'acétone, de méthanol et d'éthanol, a été étudiée à l'aide du DPPH.

L'activité anti-oxydante a été testée à différentes concentrations de chacun des trois extraits. Les concentrations étaient de 50, 100, 150, 200 et 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les trois extraits présentaient des activités de piégeage appréciables et l'activité anti-radicalaire augmente avec la concentration de ces trois extraits. Il était évident que l'extrait méthanolique était le meilleur par rapport à l'acétone et à l'éthanol.

5.2. Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus* L

Les résultats de l'activité anti-oxydante des extraits organiques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. sont illustrés dans le tableau 30 et la figure 39.

Tableau 30 Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus* L

Balayage de l'activité (%)			
Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Méthanol	Ethanol	Acétone
50	14,0 \pm 0.7	9,4 \pm 0.3	12,40 \pm 0.7
100	19,3 \pm 0.8	11,4 \pm 0.4	15,6 \pm 0.8
150	34,0 \pm 0.8	16,8 \pm 0.5	24,3 \pm 0.7
200	51,6 \pm 1.1	22,7 \pm 0.7	34,4 \pm 0.9
250	74,4 \pm 1.2	32,7 \pm 0.9	59,9 \pm 1.1

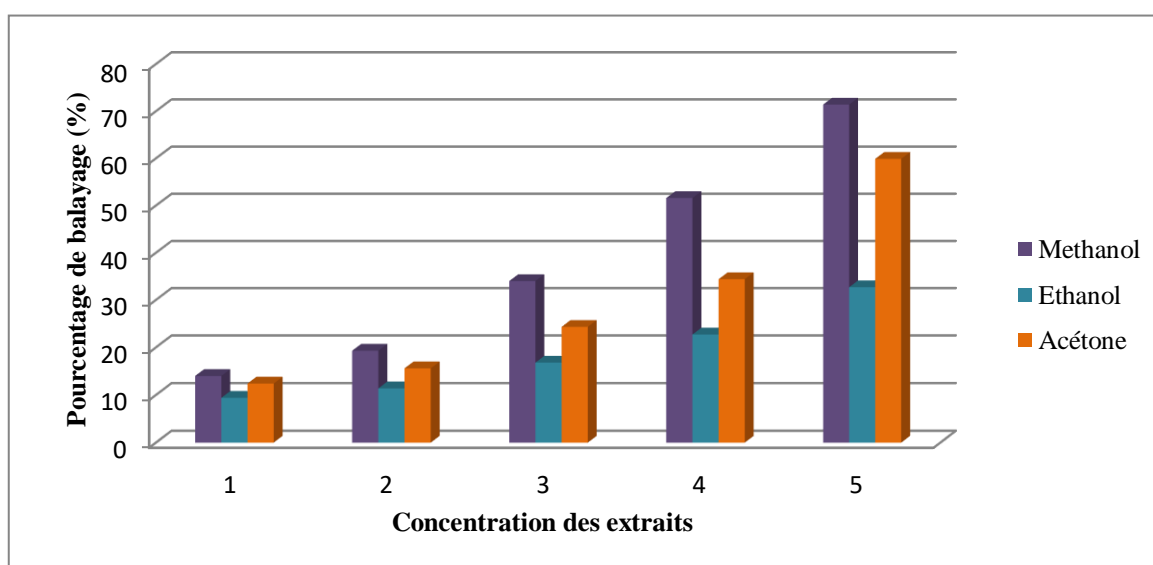


Fig.39 Activité anti-oxydante des extraits organiques de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

L'activité anti-oxydante de trois extraits de feuilles de *Rhamnus alaternus* L. a été étudiée pour la coloquinte en utilisant les mêmes concentrations croissantes 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Les résultats du tableau 30 et de la figure 39 montrent que les différents extraits (d'acétone, de méthanol et d'éthanol) ont manifesté des activités de piégeage appréciables. Il a été observé que l'extrait de méthanol présentait l'activité anti-oxydante la plus élevée par rapport à l'extrait acétonique et éthanolique.

Nous constatons aussi que l'activité anti-radicalaire augmente avec la concentration de chaque extrait.

✓ **Interprétation des résultats**

Le radical DPPH est un radical libre organique stable avec une bande d'absorption à 517 nm. Il perturbe cette absorption lors de l'acceptation d'un électron ou d'une espèce de radicaux libres, ce qui entraîne une décoloration visuellement perceptible du violet au jaune. Il peut contenir de nombreux échantillons pendant une période qui est suffisamment sensible pour détecter les ingrédients actifs à faible concentration (**Hsreu et al., 2008**).

Nos résultats ont révélé que le DPPH piégeait les activités des extraits d'une manière dépendante de la concentration.

Il existe de nombreuses techniques de récupération des antioxydants qui dépendent non seulement de la méthode d'extraction, mais aussi du solvant utilisé pour l'extraction. La présence de divers composés antioxydants ayant des caractéristiques chimiques et des polarités différentes est ou peut ne pas être soluble dans un solvant particulier (**Thurkmen et al., 2006**)

Nos résultats montrent que le méthanol était le meilleur solvant comparé à l'acétone et à l'éthanol pour la détermination de l'activité anti-oxydante des deux plantes de notre étude. *Citrullus colocynthis* L a exprimé une activité piégeante supérieure à celle du *Rhamnus alaternus* L. Les solvants polaires sont fréquemment utilisés pour la récupération de polyphénols à partir de matrices végétales (**Do et al., 2014**).

Dans le présent travail, il a été observé que le méthanol était le meilleur en raison de sa forte polarité. Les résultats de cette étude sont en accord avec l'extraction de certaines plantes médicinales (**Sultana et al., 2009**).

6. Toxicité aigue des extraits de méthanol de feuilles de *Citrullus colocynthis* L. et de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Malgré leur effet hypoglycémiant, les plantes médicinales peuvent avoir des effets toxiques, classiquement, la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité, et en particulier, par l'évaluation de la dose létale (la dose qui provoque la mortalité de 50% des animaux) la DL50. On administre ainsi à l'animal, rat ou souris, des doses croissantes d'extraits, jusqu'à la mortalité.

La DL50 a une valeur très limitée, car elle ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes et la nature des liaisons (Lapointe, 2004).

La mesure de la DL 50 peut établir un classement pour ces substances plus elle est faible, plus la substance est toxique, et l'inverse est juste (voir tableau 31).

Tableau 31 Echelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs selon Hodge et Sterner (Frank,1992)

DL 50	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg/kg	Extrêmement toxique
1 à 50mg/kg	Hautement toxique
50 à 500mg/kg	Modérément toxique
500 à 5000mg/kg	Légèrement toxique
5000 à 15000mg/kg	Presque pas toxique
Plus de 15000mg/kg	Relativement inoffensif

Afin de déterminer la DL50 des extraits de *Citrullus colocynthis* L et *Rhamnus alaternus* L. 4 doses ont été choisies pour chacune des espèces végétales. Les pourcentages de taux de mortalité observé au cours de cette expérience sont reportés dans les tableaux 32 et 33.

Tableau 32 Pourcentage de mortalité des souris suite à une administration d'EMC

lot	Nombre des souris	Dose	% de mortalité
Témoins	10	0	0
1	10	150	0
2	10	250	0
3	10	500	20
4	10	600	40

Tableau 33 Pourcentage de mortalité des souris suite à une administration d'EMR

lot	Nombre des souris	Dose	% de mortalité
Témoins	10	0	0
1	10	150	0
2	10	300	10
3	10	450	30
4	10	600	40

Après avoir utilisé la méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon nous avons calculé les DL50 des deux espèces étudiées : DL50 de EMC= 720mg/kg

$$DL50 \text{ de EMR} = 680,79 \text{ mg/kg}$$

Selon l'échelle de la toxicité l'EMC avec une DL50 égal à 720mg/kg administré par voie orale classé comme un extrait presque non toxique de même que l'EMR avec une DL50 égal à 680,79 mg/kg administré par voie orale.

Ce résultat est le même que celui de **Vipin , et al., (2012)** qui ont testé la toxicité aigue de l'extrait de racines de *Citrullus colocynthis* L. sur des souris albinos suisses par la méthode de fixe dose (2000mg/kg.pc) et n'ont pas remarqué des mortalité pendant les 14 jours de l'expérience.

D'après **Dragstedt et Lang**, tout animal ayant survécu à une dose donnée aurait survécu à toute dose inférieure à celle-ci

Ces résultats diffèrent de ceux de **Boussahel (2016)** qui a testé la toxicité aiguë de l'extrait méthanolique d'écorce de *R. alaternus* avec une dose fixe (2 000 mg / kg ou 5 000 mg / kg de poids corporel) chez les rats et aucun signe toxique ni mortalité n'a été enregistré. Par conséquent, à partir de ce résultat et selon la classification de **Diezi (1989)**, nous concluons que l'écorce de *Rhamnus alaternus* L. est considérée comme non toxique.

7. Tolérance de glucose (test de surcharge) des extraits méthanoliques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L et de feuilles *Rhamnus alaternus* L

7.1. Effet de l'EMC suite à un test de tolérance orale de glucose

Les résultats de l'effet de l'EM de *C. colocynthis* L. à des doses de 250 et 500 mg/kg, sur la glycémie des rats normaux soumis à un test de tolérance orale au glucose (TTOG), sont montrés dans le tableau 34 et la figure 40.

Tableau 34 Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de *Citrullus colocynthis* L. (EMC) et soumis à un test de tolérance orale de glucose

T (min)	0	90	120	150	180	210
Lots						
NaCl 0.9% 10 ml	0,98 ± 0,17	1,02 ± 0,14*	1,7 ± 0,1***	1,49 ± 0,07**	1,39 ± 0,2***	1,26 ± 0,02***
Gli 300mg/kg.pc	0,85 ± 0,18	0,86 ± 0,11*	1,16 ± 0,07***	1,06 ± 1,15**	0,93 ± 0,04***	0,83 ± 0,3***
EMC 250 mg/kg.pc	0,75 ± 0,1	0,79 ± 0,11*	1,49 ± 0,2***	1,28 ± 0,27**	1,22 ± 0,15***	1,09 ± 0,11***
EMC500 mg/kg.pc	0,76 ± 0,03	0,83 ± 0,1*	1,33 ± 0,2***	1,27 ± 0,8**	1,08 ± 0,17***	1,06 ± 0,19***

Moyenne ± SEM; n=5, (NS) Non significatif, (*) significatif, (**) hautement significatif, (***) très hautement significatif.

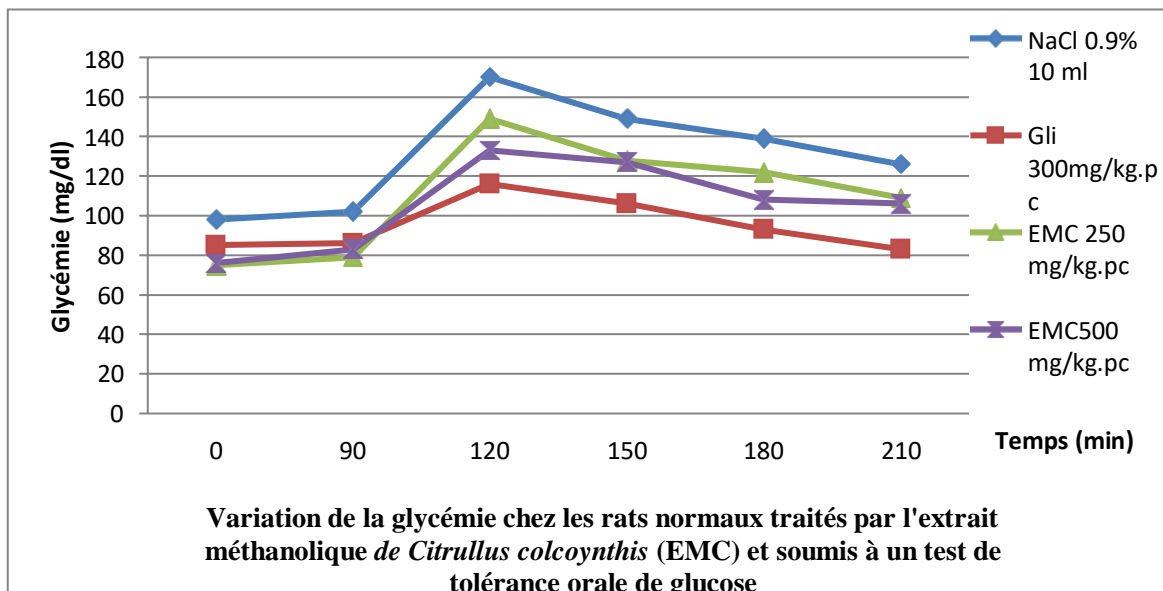


Fig. 40 Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de *Citrullus colocynthis* L. (EMC) et soumis à un test de tolérance orale de glucose.

La courbe représentant la glycémie en fonction du temps, suite à une administration d'une solution de glucose aux rats préalablement traités par l'extrait EMC (250 et 500 mg/kg p.c), suit le même profil des rats traités par le NaCl (0,9% 10 ml/kg.pc).

Une augmentation statistiquement significative de la glycémie ($P < 0.01$) 30 minute après le gavage du glucose a été noté, puis une diminution progressive qui tente à atteindre son taux initial à 210 min.

A noter aussi que l'EMR à 250 mg/kg.pc provoque une hyperglycémie statistiquement très hautement significative 90 min après sont gavage ($p < 0.0001$).

7.2. Effet de l'EMR suite à un test de tolérance orale de glucose

Les résultats de l'effet de l'EM de *R. alaternus* L. aux doses de 300 et 450 mg/kg, sur la glycémie des rats normaux soumis à un test de tolérance orale au glucose (TTOG), sont montrés dans le tableau 35 et la figure 41.

Tableau 35 Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de *Rhamnus alaternus* L. (EMR) et soumis à un test de tolérance orale de glucose

T (min)	0	90	120	150	180	210
Lots						
NaCl 0.9% 10 ml	0,98 ± 0,17*	1,02 ± 0,14*	1,7 ± 0,1***	1,49 ± 0,07**	1,39 ± 0,2*	1,26 ± 0,02***
Gli 300mg/kg.pc	0,85 ± 0,18*	0,86 ± 0,11*	1,16 ± 0,07***	1,06 ± 1,15**	0,93 ± 0,04*	0,83 ± 0,3***
EMC 250 mg/kg.pc	0,74 ± 0,1*	0,81 ± 0,07*	1,39 ± 0,08***	1,25 ± 0,16**	1,04 ± 0,06*	0,99 ± 0,10***
EMC500 mg/kg.pc	0,63 ± 0,08*	0,72 ± 0,05*	1,25 ± 0,16***	1,40 ± 0,11**	1,05 ± 0,29*	1,02 ± 0,18***

Moyenne ± SEM; n=5, (NS) Non significatif, (*) significatif, (**) hautement significatif, (***) très hautement significatif.

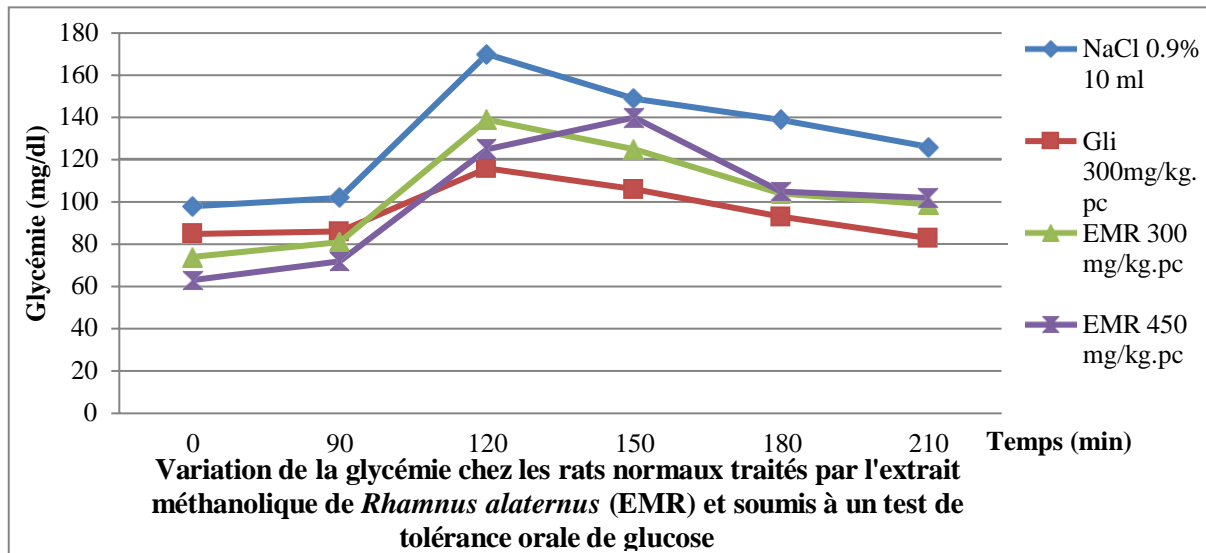


Fig.41 Variation de la glycémie chez les rats normaux traités par l'extrait méthanolique de feuille de *Rhamnus alaternus* L. (EMR) et soumis à un test de tolérance orale de glucose

La courbe représentant la glycémie en fonction du temps, suite à une administration d'une solution de glucose aux rats préalablement traités par l'extrait EMR (300 et 450 mg/kg p.c), suit le même profil des rats traités par le NaCl (0,9% 10 ml/kg.pc).

Une augmentation statistiquement significative de la glycémie ($P < 0.01$) 30 minute après le gavage du glucose a été noté, puis une diminution progressive qui tente à atteindre son taux initial à 210 min.

A noter aussi que l'EMR à 450 mg/kg.pc provoque une hyperglycémie statistiquement très hautement significative 120 min après sont gavage ($p < 0.0001$).

8. Activité antidiabétique à long terme des extraits méthanoliques de feuilles de *Citrullus colocynthis* L. (EMC) et de feuilles de *Rhamnus alaternus* L.(EMR)

8.1. Effet de l'EMC sur les rats normaux et diabétiques traités par l'alloxane

8.1.1. Evaluation du poids corporel

Le poids corporel est l'un des paramètres les plus importants pour l'étude de l'activité antidiabétique. Le suivie de poids des animaux durant les 14 jours nous a amené à obtenir les valeurs citées dans la figure 42 et tableau 36.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré un gain régulier du poids corporel des rats normaux traités par l'extrait de *Citrullus colocynthis* L. de même que les rats de groupes témoins positifs et témoins négatifs. Cette augmentation de poids est très hautement significative tout au long de l'expérience $p < 0.0001$, sauf chez les rats traités par l'EMC et durant le 3^{ème} jour de traitement on observe une augmentation significative ($p < 0.1$)

L'injection de l'alloxane de la dose de 150g/kg.pc par voie intra-péritonéal a induit une perte de poids chez les rats diabétiques. Cette diminution de poids corporel est très hautement significative $p < 0.0001$. Après une semaine de traitement par l'extrait de *C. colocynthis* L. nous avons remarqué une augmentation très hautement significative de poids corporel des rats ils ont suivis la même voie que les groupes control positif et control négatif.

Tableau 36 Effet de l'EMC sur la variation de poids corporel à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

Groupes	Poids corporel (mg)			
	J0	J3	J7	J14
I	133.00±3.26***	136.30 ± 3.11***	141.62± 3.24***	148.65 ± 1.31***
II	142.90± 2.15***	137.06 ± 1.43***	135.54± 1.75***	153.80 ±2.36***
III	139.76± 1.50***	146.64 ± 1.30***	157.06± 1.06***	163.70± 2.27***
IV	172.86± 1.65***	166.76 ± 1.05***	162.60 ±1.54***	157.32 ± 1.56***
V	129.42± 1.24***	131.24± 1.03*	139.94± 1.15***	147.64±1.72***
VI	136.20± 0.80***	129.28± 1.50*	128.38± 1.12***	139.20 ± 0.52***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type n=5, très significatif (*) : $p < 0.1$ très hautement significative (***): $p < 0.0001$.

Groupe I: Normaux Glibenclamide, groupe II: Diabétique Glibenclamide, groupe III: Normaux NaCl, groupe IV: Diabétique NaCl, groupe V: Normaux EMC, groupe VI: Diabétique EMC

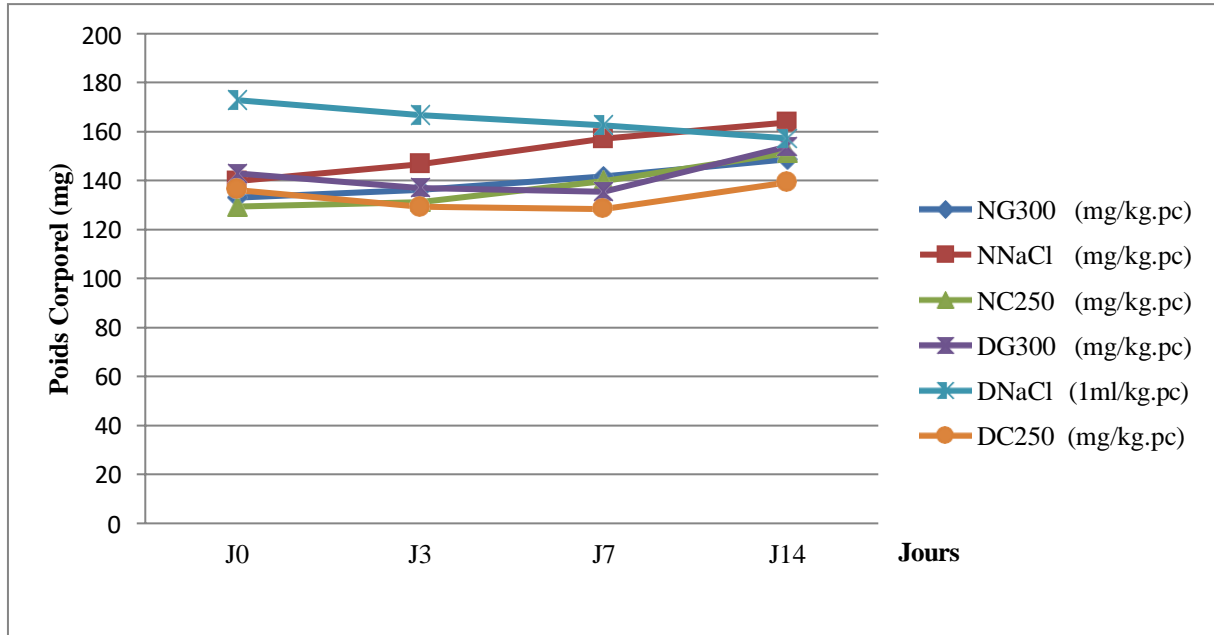


Fig. 42 Variation de poids corporels des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane traités par EMC pendant 14 jours

8.1.2. Effet de l'EMC sur la glycémie à juin des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

L'effet de l'extrait de *Citrullus colocynthis* L. Administrée par voie orale, sur la **glycémie à jeun** des rats normaux et les rats rendus diabétiques par l'injection intra-péritonéale de 150 g/kg.pc de l'alloxane est montré dans le tableau 37 et la figure 43.

Tableau 37 Effet de l'EMC sur la glycémie à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

Groupes	Glycémie (mg/dl)			
	J 0	J 3	J 7	J 14
I	77.4 ± 6.27	89.00 ± 7.78	82.40 ± 7.92	77.60 ± 8.08
II	81.80 ± 9.36	327.20 ± 3.24	298.80 ± 43.80	232.00 ± 52.40
III	78.40 ± 10.90	88.40 ± 7.89	83.60 ± 6.35	81.40 ± 8.26
IV	84.80 ± 5.45	307.60 ± 2.52	282.20 ± 18.50	256.80 ± 32,0
V	79.80 ± 9.78	82.60 ± 10.10***	80.80 ± 9.68***	77.60 ± 6.31***
VI	79.80 ± 4.87	321.60 ± 9.10***	288.60 ± 36.0***	229.80 ± 4.49***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type n=5, non significative (NS) : p > 0.05, très hautement significative (***): p < 0.0001

Groupe I: Normaux Glibenclamide, groupe II: Diabétique Glibenclamide, groupe III: Normaux NaCl, groupe IV: Diabétique NaCl, groupe V: Normaux EMC, groupe VI: Diabétique EMC

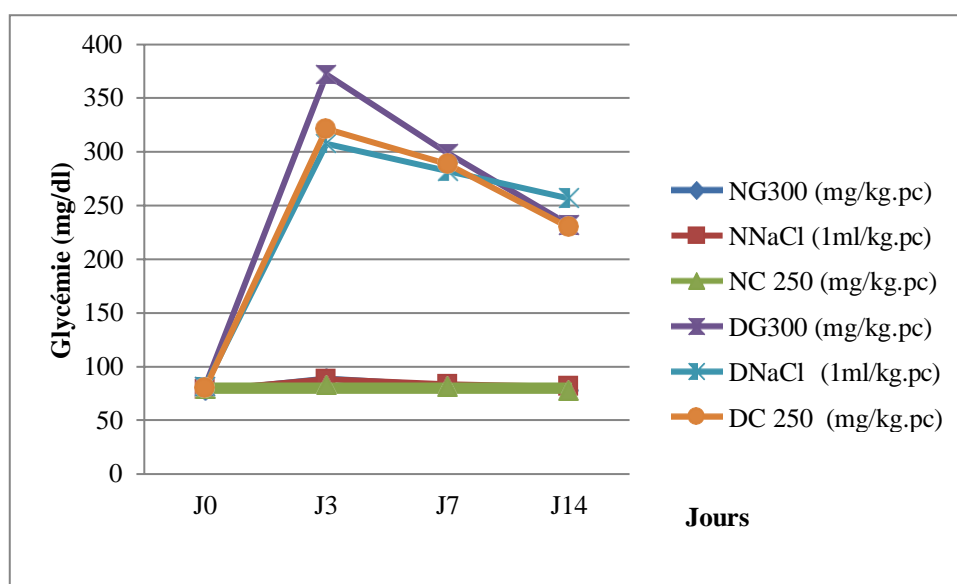


Fig. 43 Variation de la glycémie à juin des rats normaux et rendus diabétique par l'alloxane traités par EMC

D'après les résultats obtenus il n'existe pas de différence significative entre les rats normaux et les rats diabétiques traités par 300mg/kg.pc de la Glibenclamide soit par le Na Cl (1ml/kg.pc) pendant les 14 jours de l'expérience.

La glycémie à jeun a été stable durant les 14 jours du traitement pour les rats normaux traités par l'EMC et a suivie la même voie que les rats normaux de lots témoins positif et négatif.

Durant deux semaines de suivis des rats diabétiques, une hyperglycémie a été notée suite au traitement préalable des rats par l'alloxane (150mg/kg.pc). Une augmentation de la glycémie à jeun de 4 fois à été remarquée depuis l'injection de l'alloxane. Le traitement quotidien des rats par l'EMC a réussi à diminuer cette hyperglycémie, une différence très hautement significative a été observée dans cette expérimentation entre les rats traités par l'extrait de *Citrullus colocynthis* L. normaux et diabétiques.

Les rats diabétiques traités par l'EMC ont subis la même voie que les rats diabétiques traités par 300mg/kg.pc de Glibenclamide, nous avons remarqué également d'après les résultats obtenus que l'EMC est plus efficace que le contrôle Glibenclamide, en ce qui concerne la diminution de l'hyperglycémie causé par l'injection de 150mg/kg.pc de l'alloxane par voie intraperitonéal

8.1.3. Effet de l'EMC sur l'urée des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation de l'**urée sérique** est indiquée dans le tableau 38 Nous avons souligné une augmentation non significative $p > 0.05$ de l'urée chez les rats diabétique en comparaison avec les rats normaux traités par l'extrait de *C. colocynthis* L., de même que les rats traités par le glibenclamide. Nous avons remarqué aussi une augmentation très hautement significative $p < 0.0001$ de sérum urinaire entre les rats normaux et les rats diabétiques subit 1ml de Na Cl à 0.9%.

Tableau 38 Variation de l'urée chez les rats normaux et diabétiques traités par EMC

Groupes	Urée sérique (mg/dl)
I	40.40± 7.40
II	45.60± 4.88
III	46.40± 3.65**
IV	76.80± 2.59**
V	38.80± 4.21
VI	43.40± 3.21

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type. (Test de Student: $p > 0.05$, ** $p < 0.0001$, groupes comparés aux témoins)

8.1.4. Effet de l'EMC sur la protéine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation de la **protéine sérique** est indiquée dans le tableau 39. Les résultats montrent que les taux des protéines totales ont été très voisins chez les six groupes expérimentaux. L'étude statistique de ces résultats n'a révélé aucune différence significative entre les rats normaux et diabétiques traités par le glibenclamide et le NaCl à 0.9% $p > 0.05$, et une

différence très significative ($p < 0.001$) en protéine entre les le taux de protéine des rats normaux et diabétiques traités par l'extrait de *C.colocynthis* L.

Tableau 39 Variation de la protéine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMC

Groupes	Protéine sérique (g/dl)
I	8.20± 0.10
II	8.01± 0.19
III	8.47± 0.13
IV	8.59± 0.10
V	7.99± 0.11*
VI	8.44± 0.11*

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type. (Test de Student: $p > 0.05$, * $p < 0.001$, groupes comparés aux témoins)

8.1.5. Effet de l'EMC sur la créatine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation de **sérum de la créatinine** est indiquée dans le tableau 40. Nous avons souligné une augmentation non significative $p > 0.05$ de la créatinine entre les rats diabétiques en comparaison avec des rats normaux traités par l'extrait de *C. colocynthis* L. Pour les lots traités par le glibenclamide on observe une augmentation significative $p < 0.01$ entre les rats diabétiques et normaux de ces lots. Enfin il existe une augmentation très hautement significative $p < 0.0001$ entre les rats normaux et les rats diabétiques qui ont subit 1 ml de NaCl à 0.9% par voie oral.

Tableau 40 Variation de la créatine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMC

Groupes	Créatine sérique(mg/dl)
I	0.67± 0.04*
II	0.72± 0.01*
III	0.69± 0.03***
IV	1.24± 0.03***
V	0.71± 0.01
VI	0.71± 0.01

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type. (Test de Student: $p > 0.05$, * $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$, groupes comparés aux témoins)

8.1.6. Effet de l'EMC sur le cholestérol des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

D'après les résultats obtenue dans le tableau 41, nous avons souligné une augmentation très hautement significative ($p < 0.0001$) du **cholestérol sérique** chez les rats diabétiques traités par l'extrait de *R. alaternus* L. par rapport au rats normaux traités par ce même extrait. Cette

augmentation est de l'ordre de 164 ± 14.05 par rapport aux rats normaux qui est de l'ordre de 59.20 ± 4.09 .

Cette augmentation est supérieure à celle des rats traités par le glibenclamide qui est de l'ordre de 83.80 ± 9.55 chez les rats diabétique et 54.00 ± 3.16 chez les rats normaux. Toutes ces observations obtenues sont très hautement significatives $p < 0.0001$.

Tableau 41 Variation du cholestérol sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMC

Groupes	cholesterol sérique (mg/dl)
I	$54.00 \pm 3.16^{***}$
II	$83.80 \pm 9.55^{***}$
III	$56.00 \pm 1.58^{***}$
IV	$215.00 \pm 15.89^{***}$
V	$59.20 \pm 4.09^{***}$
VI	$164.00 \pm 14.05^{***}$

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Ecart type. (Test de Student: $***p < 0.0001$, groupes comparés aux témoins)

8.1.7. Effet de l'EMC sur les triglycérides des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation du **triglycéride sérique** est indiquée dans le tableau 42. Les résultats montrent que le taux en triglycérides chez les rats diabétiques traités par l'extrait de *Citrullus* à augmenté de manière très hautement significative $p < 0.0001$ par rapport au rats normaux traités par ce même extrait. Elle est de l'ordre de 75.60 ± 8.71 mg/dl chez les rats diabétique par rapport au rats normaux 57.00 ± 7.07 mg/dl.

Cette augmentation est inférieure en comparaison avec celle de rats diabétiques traités par le glibenclamide qui est de l'ordre de 148.80 ± 39.20 mg/dl par rapport au rats normaux 62.60 ± 5.68 mg/dl. On outre il existe une augmentation de triglycéride sérique très hautement significative entre les rats normaux et diabétiques de groupes control négative.

Tableau 42 Variation du triglycéride sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMC

Groupes	Triglyceride sérique (mg/dl)
I	$62.60 \pm 5.68^{***}$
II	$148.80 \pm 39.20^{***}$
III	$70.40 \pm 6.58^{***}$
IV	$220.00 \pm 16.97^{***}$
V	$57.00 \pm 7.07^{***}$
VI	$75.60 \pm 8.71^{***}$

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Ecart type. (Test de Student: $***p < 0.0001$, groupes comparés aux témoins)

8.2. Effet de l'EMR sur les rats normaux et diabétiques traité par l'alloxane

8.2.1. Evaluation du poids corporel

La variation du poids corporel des rats constitue un paramètre très important. Le suivie régulier des animaux nous a amené à obtenir les valeurs présentées dans la figure 44 et le tableau 43.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré un régulier du poids corporel des rats normaux traités par l'extrait de *Rhamnus alaternus* L. de même que les rats de groupes témoins positifs et témoins négatifs. Cette augmentation de poids est très hautement significative tout au long de l'expérience $p < 0.0001$.

L'injection de l'alloxane à la dose de 150 g/kg.pc par voie intra-péritonéal à induit une perte du poids chez les rats diabétiques. Cette diminution de poids corporel est très hautement significative $p < 0.0001$. Après une semaine de traitement par l'extrait de *R. alaternus* L. nous avons remarqué une augmentation très hautement significative de poids corporel des rats diabétiques traités par l'extrait de *R. alaternus* L., ils ont suivis la même voie que les groupes contrôlent positifs et control négatif.

Tableau 43 Effet d'EMR sur le poids corporel des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

Groupes	Poids corporel (mg)			
	J0	J3	J7	J14
I	133.00± 3.26***	136.30 ± 3.11***	141.62± 3.24***	148.65 ± 1.31***
II	142.90± 2.15***	137.06 ± 1.43***	135.54± 1.75***	153.80 ± 2.36***
III	139.76± 1.50***	146.64 ± 1.30***	157.06± 1.06***	163.70± 2.27***
IV	172.86± 1.65***	166.76 ± 1.05***	162.60 ± 1.54***	157.32 ± 1.56***
V	131.08± 1.67***	131.36± 1.32***	139.24± 1.38***	147.62± 1.45***
VI	138.20± 0.80***	131.34± 1.44***	131.24± 0.65***	141.20 ± 0.52***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type n=5, très hautement significative (***) : $p < 0.0001$.

Groupe I: Normaux Glibenclamide, group II: Diabétique Glibenclamide, groupe III: Normaux NaCl , groupe IV: Diabétique NaCl , groupe V: Normaux EMR, groupe VI: Diabétique EMR

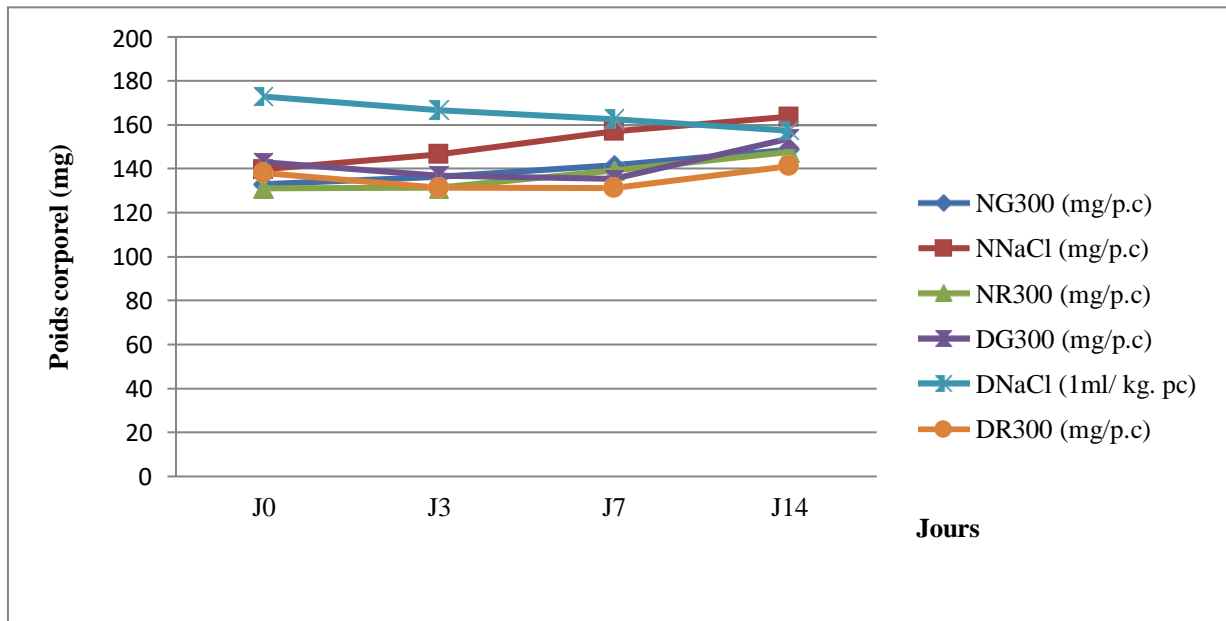


Fig. 44 Variation de poids corporels des rats normaux et des rats rendus diabétiques par l'alloxane traités par EMR pendant 14 jours

8.2.2. Effet de l'EMR sur la glycémie à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

L'effet de l'extrait de *Rhamnus alaternus* L., administré par voie orale sur la **glycémie à jeun** des rats normaux et des rats rendus diabétiques par l'injection intrapéritonéale de 150g/kg.pc de l'alloxane est montré dans le tableau 44 et la figure 45.

Tableau 44 Effet l'EMR sur la glycémie à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

Groupes	Glycémie (mg/dl)			
	J 0	J 3	J 7	J 14
I	77.4 ± 6.27	89.00 ± 7.78	82.40 ± 7.92	77.60 ± 8.08
II	81.80 ± 9.36	327.20 ± 3.24	298.80 ± 43.80	232.00 ± 52.40
III	78.40 ± 10.90	88.40 ± 7.89	83.60 ± 6.35	81.40 ± 8.26
IV	84.80 ± 5.45	307.60 ± 2.52	282.20 ± 18.50	256.80 ± 32,0
V	81.80 ± 5.76	84.60 ± 3.97	88.20 ± 12.90	88.00 ± 4,69
VI	80.20 ± 9.50	352.80 ± 36.80	292.60 ± 9.10	264.40 ± 28.4

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type n=5, non significative (NS): $p > 0.05$, Groupe I: Normaux Glibenclamide, groupe II: Diabétique Glibenclamide, groupe III: Normaux NaCl, groupe IV: Diabétique NaCl, groupe V: Normaux EMR, groupe VI: Diabétique EMR

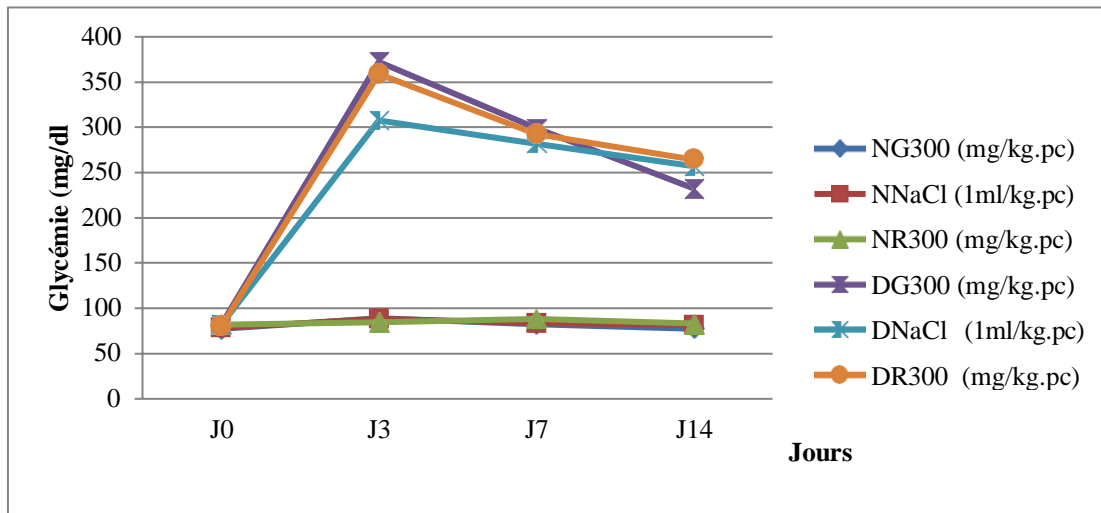


Fig. 45 Variation de poids corporels des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane traités par EMR pendant 14 jours $p > 0.05$

D'après les résultats obtenus, il n'existe pas de différence significative entre les rats normaux traités par l'extrait de *Rhamnus alaternus* L. et les rats normaux témoins positifs et négatifs. La glycémie à jeun a été stable durant les 14 jours du traitement a suivie la même voie que les rats de lots témoins positif et négatif.

Durant deux semaines de suivis des rats diabétiques, une hyperglycémie a été notée suite au traitement préalable des rats par l'alloxane (150mg/kg.pc). Une augmentation de la glycémie à jeun de 4 fois à été remarquée depuis l'injection de l'alloxane. Le traitement quotidien des rats par l'EMR a réussi à diminuer cette hyperglycémie. Aucune différence significative n'a été observée dans cette expérimentation entre les rats diabétiques traités par l'extrait de *Rhamnus alaternus* L. et les rats diabétiques témoins positifs et négatifs.

8.2.3. Effet de l'EMR sur l'urée des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation de l'urée sérique est indiquée dans le tableau 45.

Nous avons souligné une augmentation significative $p < 0.01$ de l'urée chez les rats diabétique par rapport au rats normaux traités par l'extrait de *R. alaternus* L., une augmentation très hautement significative $p < 0.0001$ de sérum urinaire entre les rats normaux et les rats diabétiques qui ont subi 1ml de Na Cl à 0.9%, et enfin une augmentation non significative $p > 0.05$ de sérum de l'urée entre les rats normaux et les rats diabétiques traités par 300mg/kg.pc de l'extrait de *R. alaternus* L.

Tableau 45 Variation de l'urée chez les rats normaux et diabétiques traités par l'extrait d'EMR

Groupes	Urée sérique (mg/dl)
I	40.40± 7.40
II	45.60± 4.88
III	46.40± 3.65***
IV	76.80± 2.59***
V	40.60± 2.41**
VI	49.60± 1.67**

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type. (Test de Student: $p > 0.05$, $p^{**} < 0.001$, $p^{***} < 0.0001$, groupes comparés aux témoins)

8.2.4. Effet de l'EMR sur la protéine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation de la **protéine sérique** est indiquée dans le tableau 46. Les résultats montrent que les taux des protéines totales ont été très voisins chez les six groupes expérimentaux. L'étude statistique de ces résultats n'a révélé aucune différence significative entre les rats normaux et diabétiques traités par le glibenclamide et le NaCl à 0.9% $p > 0.05$, et une différence très hautement significative ($p < 0.0001$) en protéine entre les rats normaux et diabétiques traités par l'extrait de *R. alaternus* L.

Tableau 46 Variation de la protéine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMR

Groupes	Protéine sérique (g/dl)
I	8.20± 0.10
II	8.01± 0.19
III	8.47± 0.13
IV	8.59± 0.10
V	8.03± 0.13**
VI	8.45± 0.09**

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type. (test de Student: $p > 0.05$, $p^{**} < 0.001$ groupes comparés aux témoins)

8.2.5. Effet de l'EMR sur la créatinine des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation de **sérum de la créatinine** est indiquée dans le tableau 47. Nous avons souligné une augmentation non significative $p > 0.05$ de la créatinine entre les rats diabétiques en comparaison avec des rats normaux traités par l'extrait de *R. alaternus* L. Pour les lots traités par le glibenclamide on observe une augmentation significative $p < 0.01$ entre les rats diabétiques et normaux. Enfin il existe une augmentation très hautement significative

p<0.0001 entre les rats normaux et les rats diabétiques qui ont subit 1 ml de NaCl à 0.9% par voie oral.

Tableau 47 Variation de la créatine sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMR

Groupes	Créatine sérique(mg/dl)
I	0.67± 0.04*
II	0.72± 0.01*
III	0.69± 0.03***
IV	1.24± 0.03***
V	0.73± 0.01
VI	0.74± 0.01

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type. (Test de Student: p >0.05, *p< 0.01 ***p<0.0001, groupes comparés aux témoins)

8.2.6. Effet de l'EMR sur le cholestérol des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

D'après les résultats obtenus dans le tableau 48, nous avons constaté une augmentation très hautement significative (p<0.0001) du **cholestérol sérique** chez les rats diabétiques traités par l'extrait de *R. alaternus L.* par rapport aux rats normaux traités par ce même extrait. Cette augmentation est de l'ordre de 173 ± 14.17 par rapport aux rats normaux qui est de l'ordre de 55.6 ± 2.88.

Cette augmentation est supérieure à celle des rats traités par le glibenclamide qui est de l'ordre de 83.80 ± 9.55 chez les rats diabétique et 54.00± 3.16 chez les rats normaux. Les résultats obtenus sont très hautement significatifs p<0.0001, sauf que chez les rats qui ont subit par voie oral 1ml de NaCl à 9%, l'augmentation du taux de cholestérol sérique est non significative p> 0.05.

Tableau 48 Variation du cholestérol sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMR

Groupes	cholesterol sérique (mg/dl)
I	54.00 ± 3.16
II	83.80 ± 9.55
III	56.00 ± 1.58***
IV	215.00 ± 15.89***
V	55.60 ± 2.88***
VI	173.40 ± 14.47***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type. (Test de Student: p> 0.05 ***p<0.0001)

8.2.7. Effet de l'EMR sur les triglycéride à jeun des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane

La variation du **triglycéride sérique** est indiquée dans le tableau 49. Les résultats montrent que le taux en triglycérides chez les rats diabétiques traités par l'extrait de *Rhamnus* a augmenté de manière significative $p < 0.01$ par rapport aux rats normaux traités par ce même extrait. Elle est de l'ordre de 77.80 ± 8.70 mg/dl chez les rats diabétiques par rapport aux rats normaux (59.00 ± 5.16 mg/dl).

Cette augmentation est inférieure en comparaison à celle des rats diabétiques traités par le glibenclamide qui est très significative $p < 0.001$ et de l'ordre de 148.80 ± 39.20 mg/dl par rapport au rats normaux 62.60 ± 5.68 mg/dl. On outre il existe une augmentation de triglycéride sérique très hautement significative entre les rats normaux et diabétiques des groupes control négatif.

Tableau 49 Variation du triglycéride sérique chez les rats normaux et diabétiques traités par EMR

Groupes	Triglyceride sérique (mg/dl)
I	$62.60 \pm 5.68^{**}$
II	$148.80 \pm 39.20^{**}$
III	$70.40 \pm 6.58^{***}$
IV	$220.00 \pm 16.97^{***}$
V	$59.00 \pm 5.61^*$
VI	$77.80 \pm 8.70^*$

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Ecart type. (Test de Student: $*p < 0.01$
 $***p < 0.0001$)

✓ Interprétation des résultats

Depuis la nuit des temps, l'homme a toujours cherché à se servir des plantes pour s'alimenter d'abord, mais aussi pour se soigner. La phytothérapie constitue une alternative sérieuse ou tout au moins un complément appréciable à la pharmacie classique issue de la chimie moderne. De nombreux remèdes prescrits ont des principes actifs d'origine naturelle. (Schawenberg et Ferdinand., 1977 ; Bézanger-Beauquesne, 1996). Dans la tradition populaire, certaines plantes sont mentionnées pour être des remèdes de différentes maladies parmi lesquelles le diabète. Nous nous sommes intéressés à l'activité antidiabétique, et cela à cause de l'ampleur que prend le diabète sucré comme maladie à l'échelle mondiale. Plusieurs plantes connues pour leur pouvoir antidiabétique. Parmi lesquelles deux espèces du nord Algérien *Citrullus colocynthis* L., une espèce très connue dans les hauts plateaux algériens pour ses multiples vertus médicinales, et une deuxième espèce *Rhamnus alaternus* L. moins connue par la population algérienne. Plusieurs travaux se sont intéressés à ces deux

espèces et plusieurs activités ont été étudiées à travers le monde scientifique. **Dallak et Bin (2010)** ont étudié l'activité anti-oxydante de l'extrait des pulpes de coloquinte sur des rats rendus diabétique par l'alloxane.

Des activités biologiques : antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire, antidiabétique et anticancéreuse de *Citrullus colocynthis* font l'objet de plusieurs travaux de **Gurudeeban et al, (2010)**. **Marzouk et al, (2010)** ont étudiés l'activité anti-inflammatoire de la coloquinte de sud tunisien. Harrar (2012) a testé le pouvoir antioxydant et antimicrobien des extrait de nerprun alaterne. **Ben Ammar et al, (2008)** ont étudiés les ctivités antiprolifératives, antioxydantes et antimutagènes d'extraits enrichis en flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* tunisien.

L'activité antidiabétique de nerprun alaterne et de coloquinte a été évaluée in vivo chez des rats Wistar normaux et rendus diabétique par l'alloxane. Un seul extrait a été testé l'extrait méthanolique des feuilles de ces deux espèces et deux procédure ont été suivies. La première procédure consiste à tester l'effet des deux plantes sur la l'hyperglycémie provoquée chez des rats normaux, suite à une charge orale en glucose : ainsi tout extrait ou molécule capable de diminuer l'hyperglycémie, peuvent intervenir en inhibant l'absorption intestinale du glucose, en favorisant l'utilisation du glucose par muscle et le tissus adipeux, ou en stimulant la sécrétion de l'insuline par le pancréas (**Shrayyef et Gerich, 2010**).

Tandis que la deuxième procédure est testée l'effet des deux plantes suite à une administration quotidienne des extraits, à des rats normaux et des rats rendus diabétique par l'alloxane.

Chez les rats diabétiques l'absence importante de l'insuline crée une hyperglycémie permanente, dans ce cas toute molécule antidiabétique, doit limiter l'effet de l'insuline, en agissant par l'augmentation de l'absorption du glucose et de la libération de la production hépatique du glucose et de la libération des acides gras libres (**Shrayyef et Gerich, 2010**).

Le diabète expérimental est crée chez les rats par l'alloxane ou mésoxalyturée qui est un composé organique basée sur un squelette pyrimidine hétérocyclique découvert en 1818 et de façon indépendante par **Gaspard Brugnatelli et William Prout**, par oxydation de l'acide urique par l'acide nitrique. L'alloxane est sélectivement toxique pour les cellules β du pancréas, ce qui provoque le diabète chez les animaux de laboratoire. Cette substance est alors devenue d'un grand intérêt pour les diabétologistes, devenant un outil standard pour l'induction du diabète chez les animaux (**Lenzen et al, 1996**).

L'alloxane, par une analogie structurale au glucose, pénètre à travers les transporteurs de glucose GLUT2 des cellules β pancréatiques. Dans le cytosol, l'alloxane est réduit en acide

dialurique. Cette réduction est assurée par plusieurs agents tels que le glutathion réduit, la cystéine, l'acide ascorbique et les groupements SH des protéines (**Lenzen et al, 1998**). L'alloxane exerce son action diabétogène quand il est administré par voie parentérale: intraveineuse, intra péritonéale ou sous-cutanée. La dose requise de l'alloxane pour induire un diabète dépend de l'espèce animale, la voie d'administration et l'état nutritionnel. Les îlots de l'espèce humaine sont nettement plus résistants à l'alloxane que ceux du rat et de la souris. La dose intra-péritonéale inférieure à 150 mg / kg en poids brut peut être insuffisante pour induire un diabète chez le rat. Les animaux à jeun sont plus sensibles à l'alloxane, alors que l'augmentation du glucose dans le sang fournit une protection partielle (**Szkudelski, 2001**).

Le dose de l'alloxane utilisée dans notre expérience a été efficace pour créer un état diabétique caractérisé par une hyperglycémie de $327,30 \pm 31,35$ mg/dl (n=20), après 72h de l'injection 150 mg/kg.pc d'alloxane par voie intra-péritonéale.

L'utilisation des solvants ayant des propriétés chimiques et physiques différentes dans les procédés d'extractions a permis l'obtention des extraits avec une composition en métabolites secondaires et activités biologiques différentes et c'est pour cela que nous avons choisi le méthanol comme solvant parce qu'il est le plus polaire par rapport aux deux autres solvants que nous avons utilisés dans cette études (méthanol, et acétone).

L'extrait méthanolique de coloquinte (EMC) et de nerprun alaterne (EMR) a été testé chez les rats normaux et les rats diabétiques, pour confirmer son effet antidiabétique proclamé dans les études ethnobotaniques (**Benkhniue et al, 2014, Calvo et Caverro 2014**).

Le test de tolérance oral du glucose, d'EMC et EMR montre l'efficacité de ces deux extraits sur l'hyperglycémie temporaire. Cette efficacité peut se traduire par la composition chimique de ces deux extraits et l'existence de plusieurs molécules responsables de l'activité hypoglycémique les alcaloïdes, les polyphénols les flavonoïdes on citant la rutine qui est un composé majeur de l'EMR et l'EMC et qui a une action remarquable sur la diminution de la glycémie et l'augmentation des taux d'insuline des rats diabétiques (**Matough ,2012**).

Le traitement des rats normaux et diabétiques par l'EMC et l'EMR pendant 14 jours, a montré l'efficacité des deux extraits chez les rats ayant un diabète modéré.

L'injection de l'alloxane à la dose de 150g/kg.pc par voie intra-péritonéal à induisait une perte de poids chez les rats diabétiques. Après une semaine de traitement par l'EMR et l'EMC nous avons remarqué une augmentation de poids corporel des rats. Selon **khettal et al, (2014)**

L'analyse statistique de données d'évolution de la masse corporelle des souris à alimentation enrichie en carbohydrates et ayant eu comme aditif alimentaire différents quantité d'extrait méthanolique de *Rhamnus* a démontré que *Rhamnus alaternus* L. diminue significativement le poids de ses souris.

D'après **Gurudeeban et al, (2010)** L'administration orale de l'extrait aqueux de coloquinte (250mg/kg.pc et 500mg/kg.pc) pendant 60 jours a entraîné une réduction considérable de la glycémie (de 381±34 à 105±35), l'hémoglobine glycosylée provoque une augmentation des activités du glucose-6-phosphate et du fructose 1-6biphosphate et une augmentation de l'activité de hexokinase du foie. Les résultats de notre étude ont confirmé les affirmations anti-diabétiques de *Citrullus colocynthis* L.

Le gavage quotidien et pendant 14 jours de l'EMR et l'EMC chez les rats normaux et diabétiques diminue le taux de cholestérol sérique.

Il a été signalé que la présence de grandes quantités de saponines dans *C. colocynthis* pourrait contribuer à la réduction du taux de cholestérol en réduisant l'absorption du cholestérol, en augmentant le rejet de l'estrol féccéique et en provoquant une diarrhée en raison d'une augmentation du péristaltisme (**Milgate et Roberts, 1995**). Il est donc raisonnable de supposer que l'effet de *C. colocynthis* L. sur le profil lipidique du sang chez les rats pourrait également être dû à la présence de ces saponines.

D'après l'analyse qualitative le nerprun alaterne et la coloquinte sont riches en glutathion. Il a été déclaré que le glutathion intervient aussi dans la régulation du bon cholestérol.

Marziyeh et al,(2007) a testé l'effet anti-hyperlipidémique des extraits méthanolique à 70ù sur des lapins pendant 12 jours, ils ont conclu que l'utilisation de *C. colocynthis* L. a entraîné une réduction significative du cholestérol sérique total et du C-LDL dans les groupes recevant les extraits.

Il a été constaté que les taux sériques de créatinine et d'urée augmentaient considérablement chez les rats diabétiques. Les animaux traités à l'extrait ont présenté une inversion significative des taux par rapport aux rats diabétiques. L'extrait aqueux de racines de *C. colocynthis* L. a montré une capacité décroissante, une augmentation significative a également été observée au niveau de protéines sériques (**Vipin et al, 2012**).

❖ Conclusion

A la lumière des résultats obtenus nous pouvons conclure que l'EMR et l'EMC améliorent les paramètres biochimiques tel que, la glycémie à jeun, l'urée, la protéine, sérique, la

créatinine sérique, le cholestérol et les triglycérides sériques ainsi que le poids corporels des rats diabétiques.

Conclusion générale

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans le présent travail, une étude des propriétés antimicrobienne, antioxydante et antidiabétique a concerné deux espèces du nord algérien. L'une appartient à la famille des cucurbitacées (*Citrullus colocynthis* L.), la coloquinte et l'autre à la famille des Rhamnacees (*Rhamnus alaternus* L.), le nerprun alaterne; employées toutes les deux en Algérie pour leurs propriétés thérapeutiques. Qualitativement le screening phytochimique a révélé la présence de nombreux métabolites secondaires dont les alcaloïdes, les saponines, les tanins, les anthocyanes, les coumarines, les polyphénols et les flavonoïdes dans les feuilles des deux espèces. Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux et des flavonoïdes par HPLC révèle la présence des quantités importantes en polyphénols et en flavonoïdes. L'analyse chromatographique montre que le composant prédominant de l'EMR et l'EMC est la rutine. Le potentiel anti-radicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des «espèces réactives à l'oxygène (ERO)» et peuvent donc être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention de nombreuses maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires...

Dans la présente étude, le méthanol et l'éthanol semblaient être les meilleurs solvants pour extraire les composés phénoliques. L'analyse chromatographique montre que le composant prédominant de l'EMR et l'EMC est la rutine qui est un flavonoïde répandu dans la nature. La proline dans la présente étude était plus élevée dans le *Citrullus colocynthis* L. que dans le *Rhamnus alaternus* L. L'analyse chromatographique des acides aminés des feuilles de *Citrullus colocynthis* L. indique que la cystéine, la méthionine, la proline et l'acide glutamique sont les acides aminés dominants. L'analyse chromatographique des acides aminés des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. indique que l'arginine, l'histidine, la leucine et l'isoleucine et l'acide glutamique sont les acides aminés dominants. Le dosage enzymatique a montré que les quatre enzymes antioxydantes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion réductase (GR) exprimaient des activités appréciables à la fois chez *Citrullus colocynthis* L. et chez *Rhamnus alaternus* L.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobien de trois extraits organiques: méthanolique, éthanolique et l'extrait d'acétone vis-à-vis de 5 bactéries et 3 champignons pathogènes. Les résultats microbiologiques ont montré que les extraits de

R. alaternus L. ont une action faible sur les champignons et les espèces bactériennes testées. L'extrait méthanolique de deux espèce montrait des activités intéressantes par rapport au deux autres extraits testés. Ces composés peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens dans de nouveaux médicaments pour le traitement de maladies infectieuses causées par des agents pathogènes. Les résultats de l'activité antioxydante montrent que le méthanol était le meilleur solvant comparé à l'acétone et à l'éthanol pour la détermination de l'activité anti-oxydante des deux espèces étudiées. *Citrullus colocynthis* L. a exprimé une activité piégeante supérieure à celle de *Rhamnus alaternus* L.

L'étude de la toxicité orale a montré que l'extrait méthanolique de *C. Colocynthis* L. (EMC) est classé comme un extrait «presque toxique» avec une DL50 égale à 720mg/kg de même que l'extrait méthanolique de *R. alaternus* L. (EMR) avec une DL50 égale à 680,79 mg/kg administré par voie orale selon l'échelle de la toxicité. L'étude de l'activité antidiabétique des rats normaux et des rats rendus diabétique par l'alloxane (150 mg/kg.pc) à courte durée et à long terme montre que l'EMC et l'EMR améliorent les paramètres biochimiques, à savoir la glycémie à jeun, l'urée, la protéine sérique, la créatinine sérique, le cholestérol et les triglycérides sériques ainsi que le poids corporels des rats diabétiques.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir important de métabolites secondaires ayant des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent à être exploitées par les recherches, à cet effet, nous proposons comme perspective: La détermination de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de la santé et être un alternatif des médicaments synthétiques.

Références bibliographiques

A

Abdel-Hassan I., Abdel-Barry J.A et Mohammeda S.T. 2000. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*; 71: 325-330.

Abou-chaar C. I., Shamlian S. N. 1980. Chromatographic Study of the Anthraquinones of *Rhamnus alaternus* L. I. Extraction. Isolation and Identification of the Aglycones. *Pharmaceutical Biology*. 18: 49-55.

ADA 2014. American Diabetes Association *Diabetes Care* 2014 Jan; 37(Supplement 1): S14-S80.

Alberti, K.G. and Zimmet, P.Z. 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. *Diabetic Medicine*, 15, 539-553.

Al-Hajj N.Q.M., Wang H.X. Ma., Lou C., Bashari M.2014. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of aromatic medicinal plants (*Pulicariainuloides*-Asteraceae and *Ocimumforskolei*-Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (9):1287-1293.

Al-Faraj, S. 1995. Haemorrhagic colitis induced by *Citrullus colocynthis*. *Ann Trop Med. Parasitol*,89(6): 695-696.

Al-Ghaithi, F., El-Ridi, M.R., Adeghate, E., Amiri, M.H. 2004. Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 261:143–149.

Amanda R.D.S, Ana Cláudia B.S, Miquéas J.G, Marcelo R. F.M, Tonny C.C L, Keila A. M, Sandra A.A.2014. Production, Characterization and Application of a Thermostable Tannase from *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114. *Food Technol Biotechnol*. 2014 Dec; 52(4): 459–467.

Amlan K., Patra J.S. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.

Amarowicz R., Dykes G.A. and Pegg R.B. 2008. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia* 79(3): 217-219.

Anonyme., 2012. Guide illustré de la flore algérienne, presse de l'imprimerie de l'est Ternes, Paris. 76 p.

Anonyme, 2001. *Plantes Médicinales du Monde*. Ed. STEM. 636 p.

Anonyme, 1973. *La grande Encyclopédie*. Ed. Larousse, 3788 p.

Arijit J., Chiranjit M., Suman K. H., Bikas R.P, Keshab C.M. , and Pradeep K.D.M .2012. Rapid screening of tannase producing microbes by using natural tannin. *Braz J Microbiol.* 2012 Jul-Sep; 43(3): 1080–1083.

Asada K (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Mol Biol* 50: 601-639.

Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.

B

Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M . Cazin, C. And Pinkas, M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.

Barth, A., Muller, D., Durriling, K. 2002.In vitro investigation of a standardized dried extract of *Citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats.*Exp. Toxicol. Pathol* , 54 (3): 223-30.

Bates L.S, Waldren R.P, Teare I. D.1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Planet Soil.* August 1973, Volume 39, Issue 1, 205–207.

Battandier JA. , 1888 Flore de l'Algérie. Ed. A. Jourdan. Alger. 189 p.

Beauchamp C, Fridovich I.1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971 Nov; 44(1):276-87.

Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. 2008 .Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol.*; 31: 61-80.

Beloued A. 2005. Plantes médicinales de l'Algérie. Office des publications universitaires. 142 p.

Benkhiguel O. Ben Akka F et Salhi S, 2014. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc) *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2014. Vol.23, Issue 1: 3539-3568.

Benlamdinin N., Elhafian M., Rochdi A., Lahcen Zidane. 2014. Etude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya), Maroc. *Journal of Applied Biosciences* 78: 6771 – 6787.

Bergeret JP, Bergeret E., Bergeret G.1909. Flore des Basses-Pyrénées. Ed. Imprimerie-stéréotype Garet, Pau. 230-231.

Bergogne - Berezin. E, Della Monica. P. 1995. Antibiothérapie en pratique clinique. Masson. Paris.

Bezanger-Beauques Pinkas M., Torck M. et Trotin F. 1990. Plantes Médicinales des régions tempérées. Ed. Maloine. Paris.395 p.

Bhourri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. 2012. Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-B -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside. S. Afr. J. Bot. 80: 57-62.

Billing J, Sherman PW. 1998. Antimicrobial functions of spices : why some like it hot. Pup. Med Q Rev Biol. 1998 Mar; 73(1):3-49.

Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. 1995. Adaptationsto environmental stresses. Plant Cell 7, 1099-1111

Boussahel. 2016. Study of the phytochemical composition and biological activities of *Rhamnus alaternus* and *Retama sphaerocarpa*.

Bruneton J. 1996. Plantes Toxiques : végétaux dangereux pour l'home et les animaux. Technique & documentation. 529 p.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. Ed. Médicales internationales editions Technique & Documentation. Cachan. 647 p.

Bruneton, J. 2009. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 2009,(ISBN 978-2-7430-1188-8), 1288 p.

C

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L and Ferret A. (2007). Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. Journal of Dairy Science. 90, 2580-2595.

Calvo M.I. Caverob. R.Y.2014. Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. Journal of ethnopharmacology. 157:268-273.

Chancerel L. 1920. Flore forestière du globe. Ed. Gauthier-Villars, Paris. 561-562.

Chung IM, Kim JJ, Lim JD, Yu CY, Kim SH, Hahn SJ (2006). Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmanina glutinosa* under temperature and water stress. Environ Exp Bot 56: 44-53

- Chira K, Suh JH, Saucier C, Teissédre PL. 2008.** Les polyphénols du raisin. *Phytonutrition fondamentale*. 6, 75-82.
- Chookhampaeng S. 2011.** The Effect of Salt Stress on Growth, Chlorophyll Content Proline content and antioxidative enzymes of Pepper (*Capsicum Annuum L.*) seedling.
- Claude Hammer, 2018.** Les Plantes Toxiques V4.1
- Cowan MM. 1999.** Plants products as antimicrobial agent. *Pub Med. Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct; 12(4):564-82.
- Cushnie TPT and Lamb AJ. 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26, 343-356

D

- Dacosta Y. 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.
- Dallak M, Bin-Jalia I. 2010.** Antioxidant Activity of *Citrullus Colocynthis* Pulp Extract In The Rbc's Of Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Pak J Physiol* ; 6(1).
- Dallak, M., et Abbas M. Bachir N. 2009.** Concomitant Down Regulation of Glycolytic Enzymes, Upregulation of Gluconeogenic Enzymes and Potential Hepato-Nephro-Protective Effects Following the Chronic Administration of the Hypoglycemic, Insulinotropic *Citrullus colocynthis* Pulp Extract. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4): 153-161.
- Dat JF, Foyer CH Scott IM (1998 a).** Changes in salicylic acid and antioxidants during introduction of thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol* 118: 1455-1461
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM. 1988.** Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant physiol* 116: 1351-1357.
- Delorme C., Robert A., 1997.** Mycologie médicale. Décarie Editeur, Québec, 1997.
- Daels rakotoarison D. 1999.** Extraits phénoliques d'aubépine, de cola et d'églantier. Thèse de doctorat, université de Lille-II, France.
- Desai, M. R., Ghosh, S. K. 2003.** Occupational exposure to airborne fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. flavus* strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10: 159-162.
- Dromigny 2008.** *Bacillus cereus*. Collection « Monographies de microbiologie ». Éditions Lavoisier Paris.
- Drouin P. Charbonnel B. et Eschwege E. 1999.** Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères 12 janv. 2014 - 1999, 25, 72-83.
- A. flavus* strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10: 159–162.

flavus strains. Ann. Agric. Environ. Med. **Duke, J.A. 1983.** *Citrullus colocynthis* (L.) Shrad Handbook of Energy Crops, 10: 159–162

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. 2006. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Ed. Springer.

E

Edwards E, Enard C, Creissen G, Mullineaux P (1994). Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* 192: 137-143.

Élisabeth G., Michel S., Marie P.O. 2000. Les préparations en pharmacie Dossier 2 : Botanique-Pharmacognosie, Phytothérapie-Homéopathie. Edition : Technique et documentation, 273 p.

El-Sharkawi, H.M. Michel, B.E.1977. Effects of soil water matric potential and air humidity on CO₂ and water vapor exchange in two grasses.[1977]. Food and Agriculture Organisation of united Nations. 2013. 176.182.

El-Shora HM, El-Farrash AH, Kamal H, Abdelrazek A.2015. Enhancement of antioxidant defense system by UV radiation in fenugreek as medical plant. *Inter. J. Sci. Res.* 2015; 3: 529-535.

El-Shora, H. M., El-amier, Y. A., and Awad, M. H. 2016. Compartine Phytochemical Studies on *Zygophyllum coccineum* L. from different habitats, Egypt. *British Journal of Applied Sciences and Technology*, 15 (4): 1-9.

Esmaeili, A. K., Taha, R. M., Mohajer, S. and Banisalam, B. 2015. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown *Trifolium paratense* L. (Red Clover). *Bio Med Research International*. [http:// dx. Doi. Org/ 101155/ 2015/ 643285](http://dx.doi.org/101155/2015/643285).

Essawi T. and Srour M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*2000; 70: 343-349.

F

Favier, A. 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

FAO, 1996. La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture. ISSN0251-1460.

Fernandez-Carmona, J.; Cervera, C.; Blas, E., 1996. Prediction of the energy value of rabbit feeds varying widely in fibre content. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 64 (1): 61-75.

Fiaud Christian, 1990.Inhibiteur de Corrosion. Réf : COR1005 V1

Francis A. Carey Richard J. Sundberg. 1996. Chimie organique avancée Tome 1 Paru.

Frank CLU.1992. Toxicologie, Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Paris, 202 p.

G

Gaspard Brugnatelli et William Prout.1881. Annales de Chimie et de Physique 1818, 8, 201-206.

Gazengel J-M, Orecchioni A-M. 2013. Le préparateur en pharmacie (2e ed.) (Coll. Guide théorique et pratique)Lavoisier Tech et Doc (2013). 1761 p.

Giknis, M.L.A., Clifford, C.B.2008. The correctional modification of inflammatory response at the experimental acute pancreatitis. Bioscience and Biotechnology, Vol.3 No.4A, August 24, 2012.

Goldberg D, Spooner R. 1983. Glutathione reductase. *In* Bergemeyer HU, ed, Methods in Enzymol, Vol 3. Verlag Chemie, Basel, 258-265.

Griffith OW. 1980. Determinated of glutathion and glutathion disulfide using glutathione reductaseand 2-vinylpyridine. Anal Biochem.1980 jul15, 106(1):207-12.

Guerci,B.,Bohme,P.,Kearney-Schwartz,A.,Zannad,F., Drouin,P.,2001.Endothelial dysfunctionand type2diabetes.DiabetesMetab.27, 436-447

Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. 2005. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole2005; 554-558

Gubb AS. 1913. La flore algérienne, naturelle et acquise. Ed. A. Jourdan, Alger. 16-17.

Gurudeeban S. Satyavani K. Ramanathan T 2010. Bitter Apple (*Citrullus colocynthis*): An Overview of chemical Composition and Biomedical Potentials. Asian of Plant Sciences 9 (7): 394-401, 2010.

H

Hagerman, AE. 2002. Tanins Handbook Miami University, Oxford OH 45056

Hammel T., 2013. Contribution à l'étude de l'endémisme chez les végétaux vasculaires dans la péninsule de l'Edough (Nord – Est algérien), Thèse de Doctorat 3ème cycle LMD. 242 p.

Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R.2003. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. BMC Plant Biology, 3:7.

Hancock RD, Walker PG, Pont SDA, Marquins N, Vivera S, Gordon SL, Brennau RM, Viola R.2007. L-ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by in situ biosynthesis via the L-galactose pathway. Functional Plant Biology, 34: 1080-1090.

Harborne JB, 1998. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman et Hall Thomson Science (UK), 234 p.

Harrar A., 2012. Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de magister. UFAS. 57 p.

Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., MeEwan N.R., WewboldC.j. 2008. Plant extraction to manipulate rumen fermentation. *Animal feed science and technology*. 147: 8-35.

Hartee EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 1972 Aug; 48(2):422-7

Havir, E.A. McHale, N.A. 1987. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*, 84, 450-455. <http://dx.doi.org/10.1104/.84.2.450>

Hernandez J, Jimenez A, Mullineaux P and Sevilla F (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ* 23: 853-862.

Huang,D.J., Lin,C.D., Chen,H.J., Lin,Y.H., 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 179-186.

I

Issa abed Abdel-Hassan, Jamel Ahmed Abdel-Bary, Sarah Tariq Mohammeda. 2000. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of ethnopharmacology*. PubMed. 71(1-2):325-30 · July 2000

Iserin P. 2007. Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins. (ed.). Larousse. 14-15.

J

Jahan, A. A., Anis , M. and Aref, I.M. 2014. Relative examination of antioxidative enzymatic activities in plants of *Cardiospermum halicacabum* L. Differentiated from hypocotyls in vivo and ex. Vitro environment: *Biotechnology Reports*, 4: 66-72.

Jayaraman1.R, Arihara Shivakumar, Anitha T, Vishal D. Joshi1, Narahari N. Pale.2009. Antidiabetic effect of petroleum ether Extract of *Citrullus colocynthis* Fruits against Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats. *ROM. J. BIOL. – PLANT BIOL.*, VOLUME 54, No 2, 127–134.

Jean-Jacques Macheix, Annie Fleuriet, Christian Jay-Allemand.2005. Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Librairie Eyroulles.

John U., Cincinnati O., 1898. *Citrullus colocynthis*. Reprinted from the Western druggist. Chicago.

Jungkind DL. 1995. Antimicrobial resistance : a crisis in health care ; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a Crisis in Health Care -Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11-12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania]. Ed. Plenum Press, New York, NY [u.a.], 248 p.

K

Kamra D.N., Agarwal N., Choudhary L.C. 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. International Congress Series, 1293: 156-163.

Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D .1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Anal. Biochem. 225:165-167.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL, 2004. Pathogenic *Escherichia Coli*. Pub Med. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb; 2(2):123-40.

Khettal B., Zaidi. A. Tacherfiout. M. Sobhi W. 2014. Effet des extraits de feuilles de *Rhamnus Alaternus* à activités antioxydant et antilipasique sur la masse corporelle et le métabolisme des lipides des souris nourries avec un régime enrichie en carbohydrates. Volume 28, Supplement 1, December 2014, Pages S149-S150.

Khachba I., Benamar H., 2008. Effet de quelques plantes médicinales locales sur l'Alpha amylase. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. UATL.

Kheirredine H., 2012. Comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales de l'Algérie .Mémoire de magister .UMBB . 95 p.

Kim Y, Arihara J, Nakayama, T, Nakayama N, Shidama S, Usui K (2004). Antioxidative responses and their relation to salt tolerance in *Echinochloa oryzicola* Vasing and *Setaria viridis* (L.) Beauv. Plant Growth Regul 44: 87-92

Kirtikar, KR, Basu, BD. 2001. Indian medicinal plants with illustration, Oriental enterprises. Uttranchal, 7:1594-1598.

Koscy G, Brunner M, Ruegsegger A, Stamp P, Brunold C (1996). Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. Planta 198: 365-370

Kone D. 2009. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes, extraction, identification d'alcaloïdes, caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leurs activités antioxydant. Thèse de doctorat chimie organique. Université de Bamako. 157 p.

Krishnan A, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Han CD, Lee MC, Yu SM, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, et al 2009. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol* 149: 165–170

Kumar ,S. et al., 2009. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis*(L.)Schrad. methanolic fruit extract.*Acta Pharmaceutica*,58:215-221.

Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J.2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Pub Med.Nature*. 2007 Feb 8; 445(7128):652-5.

L

Lacerda, C. H. F. ; Hayashi, C. ; Soares, C. M. ; Boscolo, W. R. ; Kavata, L. C. B., 2005. Replacement of corn *Zea mays* L. by cassava *Manihot esculenta* crants meal in grass-carp *Ctenopharyngodon idella* fingerlings diets. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 27 (2): 241-245.

Lapointe G. 2004. Notions de Toxicologie. Commission de la santé et de la sécurité du travail. Québec, Canada, 67 p.

Lim J, Yu C, Kim M, Yun S, Lee S, Kim N, Chung I (2004). Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various korean medicinal plants; *Kor J Med Crop Sci* 12: 191-202.

Lise AD et al., 2006. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study *Pediatrics* 2006; 118 (4):1510-1518.

Lenzen S., Tiedge M., Jorns A., Munday R. 1996. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan.

Lenzen S., Freytag S., Panten U. 1998. Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol*.

Lou S.-N., Lin Y.-S., Hsu Y.-S., Chiu E.-M., Ho C.-T. 2014. Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. *Food Chem*. 161 246–253. 10.1016

M

Macheix J., Fleuriet A., Jay Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes : 192 p.

Marzyieh Zamani ; Alireza O. Rahimi; Reza Mahdavi; Mohammed Nikbakhsh; Morteza V. Jabbari; Hassan Rezazadeh; Abbas Delazar; Lutfun Nahar; Satyajit D.

Sarker.2007. Assessment of anti-hyperlipidemic effect of *Citrullus colocynthis*. Rev. bras. farmacogn. Vol.17 no.4 João Pessoa Oct./Dec. 2007.

Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N. 2007. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*.12: M-Culvier , sage and rosmary phenolic antioxidants, *JAOCS*,1996, Vol(73). 423-432.

Mathieu A., 1860. Flore forestière; description et histoire des végétaux ligneux qui croissent spontanément en France et des essences importantes de l'Algérie. Suivies d'une méthode analytique pour en déterminer les principales espèces. Ed. Ancienne maison Grimblot et cie, N. Grosjean, successeur, Nancy. 52-53.

Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J.2012. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2012 Feb; 12(1):5-18. Epub 2012 Feb 7.

Memon M.C. A.H. Brohi S. W. Ahmed. I 2003. Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis* . *Pak. J. Pharm.Sci.*, 16: 1-6.

Mercy B, A, L. Razikou A. et al, 2018. Dietary fibre and vitamin e contents of five cucurbitaceae oilseeds from different regions in Cameroon. *Nternational Journal of Current Researchin Life Sciences* Vol. 07, No. 12, 2863-2871.

Metzger BE RA Yiagnigni , G. Yadang Souley , E. Fokou. 2002. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991

Michellin Kansole R. 2009. Etude ethnobotanique phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso. Diplôme d'études approfondies (D.E.A). Université Ouagadougou, 76 P.

Milgate J, Roberts DCK 1995. The nutritional and biological significance of saponins. *Nutr Res* 15: 1223-1249.

Memon, U. et Brohi A.H. 2003. Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *Pak J Pharm Sci.*,16 (1): 1-6.

Murray, M.A., Schubiger, M., Palka, J. 1984. Neuron differentiation and axon growth in the developing wing of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 104(2): 259--273.

Murrugan R. Parimelazhagan T. 2014. Comparative evolution of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – An in vitro approach. *Journal of King Saud University–Science* 26:267-275.

N

Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH (1998). Glutathione: biosynthesis, Metabolism and relationship to stress tolerance explored in transgenic plants. *J Exp Bot* 49: 632-647.

O

Oyedapo, O-O. 2004. Biological activity of *Pyllanthus amarus* extracts on Pragerow-Dawley rats. *Nig. J. Biochem. Mol. Biol.*, 83-86.

P

Panchuk II, Wolvok RA, and Shoffl f (2002). Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiol* 129: 838-853

Parida A, Das A, Mohanty P (2004). Defense potentials to NaCl in a mangrove *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *J Plant Physiol* 161:531-554

Paris. R. et Moyes.H, 1971. Matière Médicale. Tome III.Ed. Masson et C^{ie}. 509 p.

Percival, S.L., Chalmers, R.L., Embrey, M., Hunter, P.R., Sellwood, J. et Wyn-Jones, P. (2004). Microbiology of waterborne diseases. Elsevier Academic Press, San Diego, Californie

Perez F, Villegad D, Mejia N (2002). Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves. *Phytochem* 60: 573-580.

Pincemail,J., Meurisse,M., Limet,R., Defraigne,J.O., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'unindividu : une réalité pour le médecin.Vaisseaux, Coeur, Poumons4(5).

Penzig O., 1902. Flore coloriée de poche du littoral méditerranéen. Ed. P. Klincksieck.

Phillipe, J., Marinii, M. Et Pometta, D.Le. 1994. Diabète Guide du praticien Genève : Médecine et Hygiène Sa, 15 p.

Prochazkova D, Sairam RK, Skulachev CG, Singh DV (2001). Oxidative Stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci* 161: 765-771

Punitha, I.S.R., Rajendran, K., Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., 2005. Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *CAM.* 2 (3), 375-381.

Q

Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, Claude Hammer, 2018. Les Plantes Toxiques Vol 4. 1617-620.

R

Rausch Thomas,1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*. March 1981, Volume 78, Issue 3, 237–251.

Ribereau-Gayon J. Ribereau-Gayon P. Peynaud E. Sudraud P. 1972. *Traité d'œnologie* _Science et techniques du Vin, tome 1 : Analyse et contrôle des Vins, Dunod, Paris, 671 p.

Rios-Ganzalez k, Erdei L, Lips S. 2002. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Sci* 162: 923-930

Roger P, Gilles F, Jean-Pierre R. 2001. Colorations de cellulose et lignine, Planet-Vie, Lundi 1 octobre 2001.

S

Sahreen, S. Khan, M. R. and Khan , R. A. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry* 122: 1205-1211.

Sharma P, Sharma R.2011. Toxic optic neuropathy. *Indian J Ophthalmol*. 2011 Mar-Apr;59(2):137-41. doi: 10.4103/0301-4738.77035.

Stanley Mainzen Prince P, Kamalakkannan N.2006. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *J Biochem Mol Toxicol*. 2006; 20(2):96-102.

Schweingruber Fritz Hans, Börner Annett, Schulze Ernst-Detlef.2013. *Atlas of stem anatomy in herbs, shrubs and trees*, Softcover reprint of the original 1st ed. 2013
Volume 2. 415 p.

Singleton,V.L.,Orthofer,R.,Lamuela-Raventos,R.M. 1999.Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299, 152-178.

Solfo RR, 1973. Etude d'une plante médicinale malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses variétés. O.R.S.T.O.M.

Speranza A, Calzoni G.L, 2004.Atlas de la structure des plantes. Ed. Belin Paris.223 P.

Spichiger R.E., Savolainen V.V. et Figeat M., 2000. *Botanique systématique des plantes à fleurs*. Ed. Presse Polytechniques et Universitaires Romandes, 372 P.

Sudhakar C, Lakshmi A, Giridamakumar (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under Na Cl salinity. *Plant Sci* 161: 613-619.

Szkudelski T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* , 2001 ;50: 536-546.

T

Takahashi T, et al. 2004. Isolation and characterization of sake yeast mutants deficient in gamma-aminobutyric acid utilization in sake brewing. *J Biosci Bioeng* 97(6):412-8.

Thomas, C.C. and Philipson, L.H. 2015. Update on Diabetes Classification. *Medical Clinics of North America*, 99, 1-16.

Thurzovol L., Kresanek I., Mika K.1978. Les plantes de santé qui poussent autour de nous. Édition Elsevier Séquoia, Bruxelles, 260 p.

U

Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Jak__bkiewicz - Banecka J. and W_Âgrzyn G. 2007. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia* ; 62: 132-135.

V

Van Delden C, Iglewski BH.1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Pub Med Emerg Infect Dis.* 1998 Oct-Dec;4(4):551-60.

Vipin a, Ashish K, S. Anush U. Gopendra S. Rajiv G. 2012. Hypoglycemic effects of *Citrullus colocynthis* roots. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Reaserch*, Vol. 69 No. 1 .75-79.2012.

W

Wächter G. A., Hoffmann J. J., Furbacher T., Blake M. E. and Timmermann B. N. 1999. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem.* ; 52: 1469-1471

Wallace R.J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of Nutrition Society.* (63): 621-629.

Wang CY, (1995). Temperature preconditioning effects glutathione antioxidant system in chilling resistance in tomato. *J Plant Physiol* 145: 148-152

Wei B L., Lin C N., Won S.J., 1992. Nakahalene and Cytotoxic principles of Formosan *Rhamnus Species*. *Journal of Natural Products.* 55: 967-969

Weil, C.S. 1952. Tables for Convenient Calculation of Median-Effective Dose (LD50 or ED50) and Instructions in Their Use. *Biometrics*, 8, 249-263.

Wichtl M., Anton R. 2009. Plantes thérapeutiques : Traditions, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition Lavoisier, Paris. 38- 41.

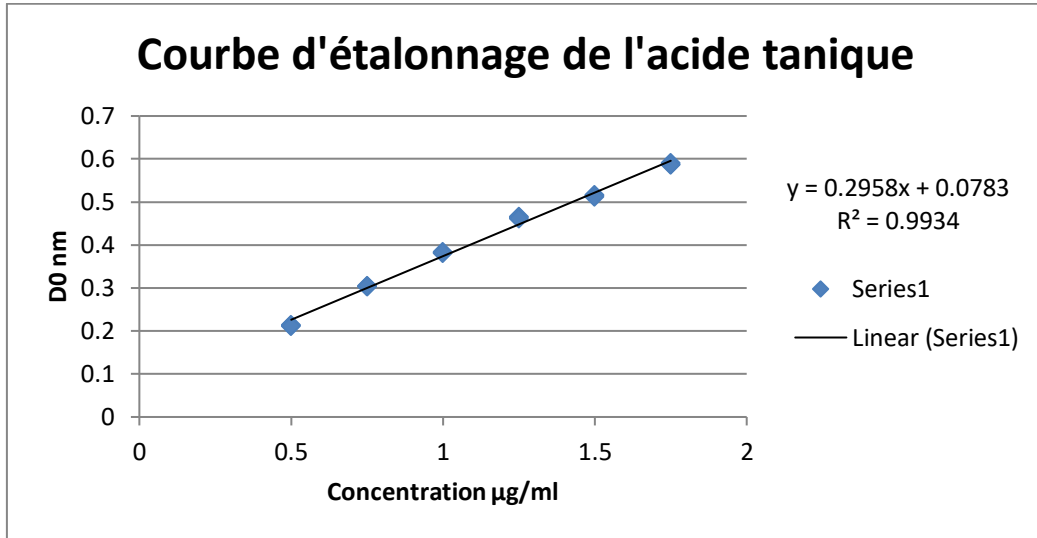
Y

Yi Z-B, Yu Y, Liang Y-Z, Zeng B. 2007. In vitro antioxydant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, LWT-Food Science and Technology.4: 1000-1016.

Z

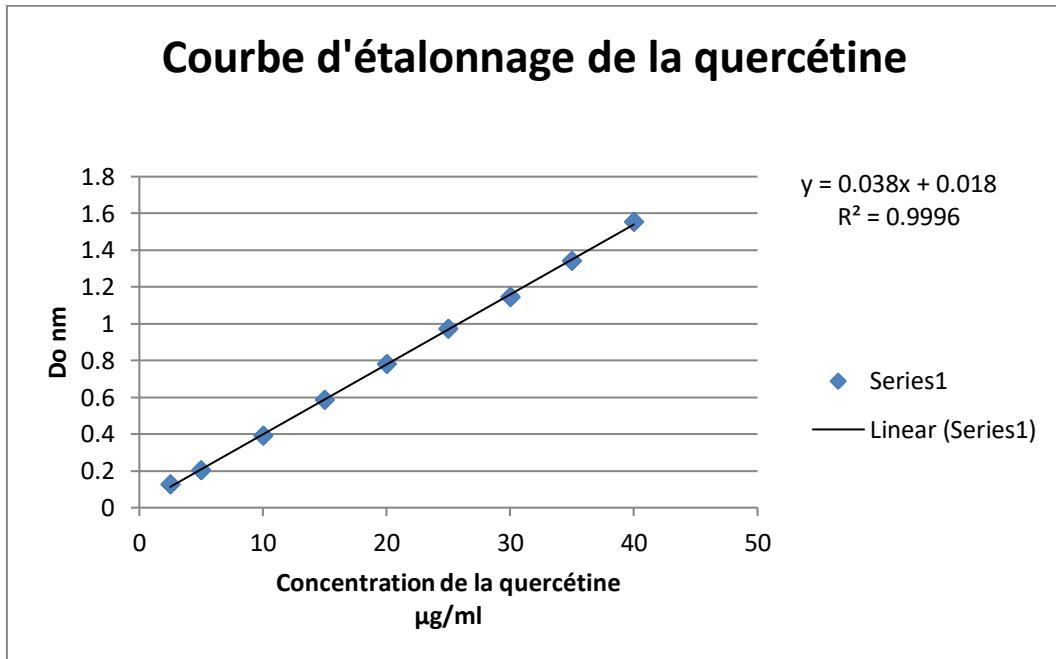
Ziyyat A. Mekhfi H et Benjelloun W. 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. Journal of Ethnopharmacology; 58: 45-54.

Annexe : 1



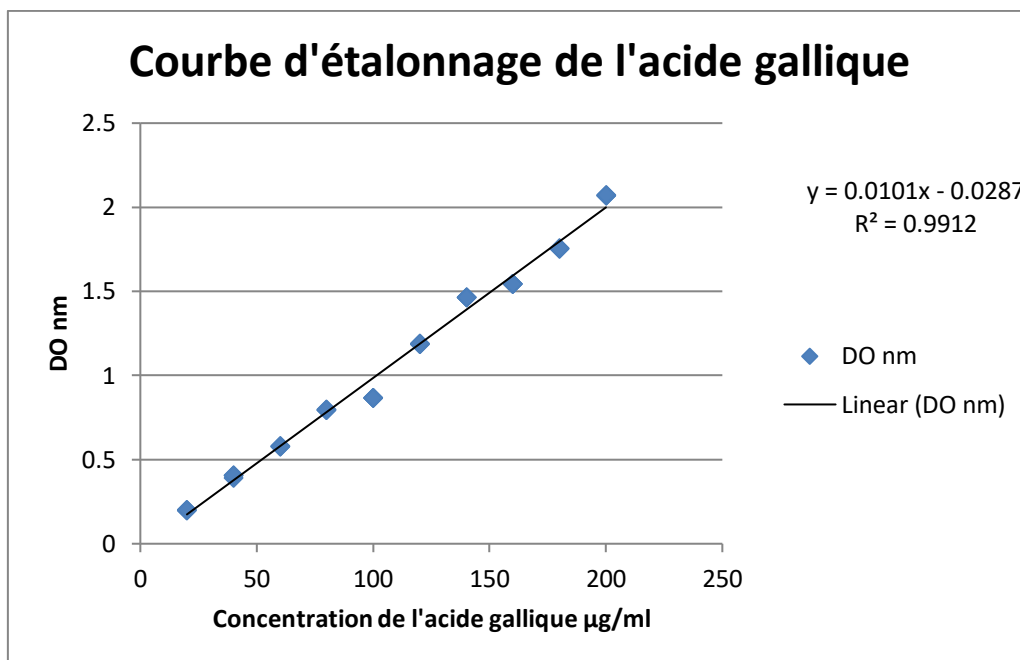
Courbe d'étalonnage de l'acide tanique

Annexe : 02



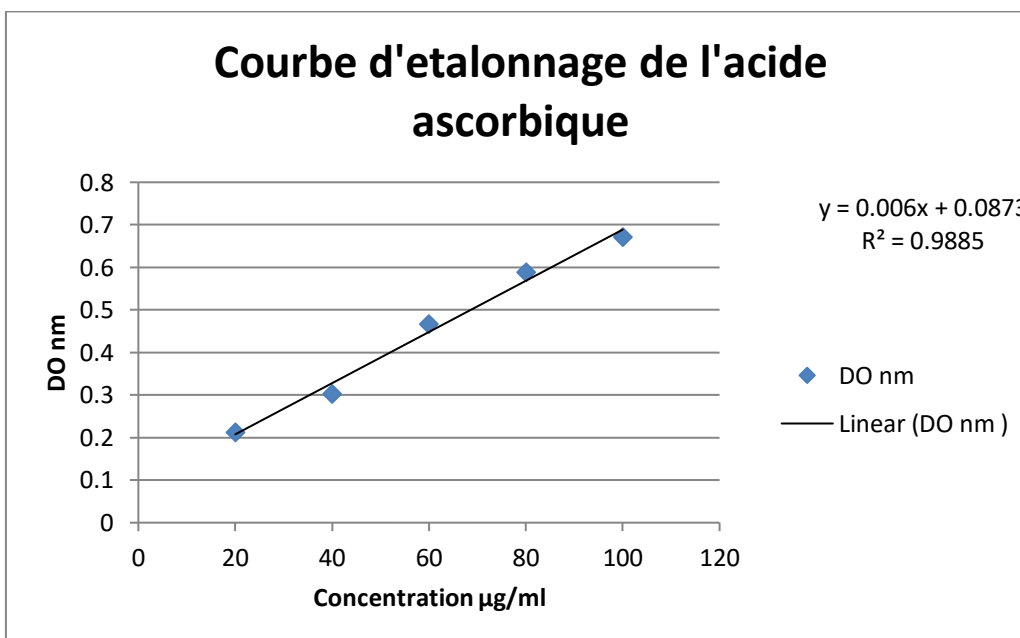
Courbe d'étalonnage de la quercétine

Annexe : 3



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Annexe : 4



Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique



Available online freely at www.isisn.org

Bioscience Research

Print ISSN: 1811-9506 Online ISSN: 2218-3973

Journal by Innovative Scientific Information & Services Network



RESEARCH ARTICLE

BIOSCIENCE RESEARCH, 2019 16(2): 2009-2016.

OPEN ACCESS

Influence of *Rhamnus alaternus L* leaf extract on normal and alloxane-induced Diabetic rats

Ouchtati Sara¹, Seridi Ratiba¹ and Hamed M El-Shora²

¹Laboratory of Plant Biology and Environment. Faculty of Science. Department of Biology. University BADJI Mokhtar - Annaba. Bp 12, 23000 Annaba. **Algeria**.

² Department of Botany, Faculty of Science, Mansoura University, **Egypt**.

*Correspondence: ouchtatisara@yahoo.com Accepted: 21 May, 2019 Published online: 08 June 2019

The present study aimed to test the influence of methanol extract from *Rhamnus alaternus L.* leaves on the biochemical parameters of normal and diabetic rats. Diabetes mellitus was induced by an intra-peritoneal injection of 150 mg / kg.bw of alloxane monohydrate after 72 hr of the injection. Rats with a blood glucose level greater than or equal to 280 Mg/dl were considered diabetic. Blood glucose concentration of the tested animals were measured at the beginning as well as on the 3rd, 7th and 14th day after the start of the experiment. On day 14, retro-orbital blood samples taken under anesthesia with petroleum ether. Chromatographic analysis of the crude methanol extract of *Rhamnus alaternus L* leaves revealed the presence of multiple phenolic components in the major ones: rutin, cinnamic acid, ellagic acid, benzoic acid, and vanillic acid. The methanol extract from leaves of *Rhamnus alaternus L.* showed a non-significant reduction in blood sugar ($P > 0.05$). This extract also reduced body weight in a very highly significant way ($p < 0.0001$) as well as improved other biochemical parameters such as serum urea, serum protein, serum creatinine, serum cholesterol and serum triglycerides.

Keywords: *Rhamnus alaternus L.*, Methanol extract, Diabetic effect, Liquid chromatography, Biochemical parameters

INTRODUCTION

Studying the chemistry of plants is always burning news despite its seniority. This is attributed to the fact that the plant kingdom represents an important source of a wide variety of bioactive molecules (Bahorun et al., 1996)

According to the French Diabetes Federation, 425 million people worldwide have diabetes. This qualifies the phenomenon as a real pandemic because the progression is considerable. For example, WHO estimates 622 million diabetics by 2040 (Atlas IDF 201) Diabetes Atlas (2017)

Diabetes mellitus is a metabolic disorder of a multiple etiology characterized by chronic hyperglycemia, which affects carbohydrate, protein as well as lipid metabolism and which results from a deficiency of insulin secretion (Alberti and Zimmet, 1998)

Rhamnus Alaternus L. belongs to *Rhamnaceae* family and present in North Africa, the Middle East and the south of Europe. In Algeria, it grows in scrubland and limestone hills very sunny.

In traditional medicine *R. alaternus L.* has been used as a hypotensive, digestive, laxative, diuretic and for the treatment of hepatic and dermatological complications (Bhouri et al., 2012)

These berries have a purgative action, a bitter taste, used in veterinary medicine Gubb AS. (1913). The leaves are astringent gargles (Jacques et al., 2005) Also, all the aerial parts are used by the local population of Laghouate city (Algeria) as an antidiabetic plant (Khachba and Benamar 2008).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Our study is carried out on the leaves of *Rhamnus alaternus L* harvested at maturity during 2015 in the region of Seraidi wilaya of Annaba, Northeast of Algeria.

Preparation of *Rhamnus alaternus L* extract

The shade-dried plant leaves were crushed, pulverized and extracted with methanol. After 3 h of maceration with continuous stirring at 200 rpm, the mixture was filtered. The filtrate was evaporated to dryness under vacuum using a rotary evaporator. This operation is repeated four times with renewal of the solvent to increase the yield. The extract was then stored in the refrigerator until used.

Test animals

The present study was carried out on female Wistar rats, aged 2 to 3 months with a body weight of 130 -175g, and adult albino mice with a body weight of 24-27g. The pharmacological study was carried out in the laboratory of Pharmacology of the Research and Development Center (CRD), SAIDAL Algiers. The rats were housed in transparent polypropylene cages with a stainless steel lid. They were kept under favorable breeding conditions (20-24 ° C and 50% humidity) and arranged with tap water and standard food, litter composed of sawdust renewed every other day. The experimental protocol has been proven by the CRD.

Determination of phenols compounds in *Rhamnus alaternus L* extract

This was done by HPLC liquid chromatography, using the method of Agilent Application Note, (Publication number 5991-3801EN, 2014).

Instrument condition for phenolic compounds

Agilent1260 infinity HPLC Series (Agilent, USA), equipped with Quaternary pump, a Zorbax Eclipse plusC18 column 100 mm x 4.6 mm i.d., (Agilent technologies, USA), operated at 25 °C. The separation is achieved using a ternary linear elution gradient with (A) HPLC grade water 0.2 % H₃PO₄ (v/v), (B) methanol and (C) acetonitrile. The injected volume was 20 µL . Detection: VWD detector set at 284 nm .Condition of test item: - 21°C.

Acute toxicity determination

The albinos mice female, 2-3 month old with an average weight of 24 à 27 g, were used for the study. To determine the toxicity, a single oral administration of methanol extract of *Rhamnus alaternus L*. leaves in different dose (150, 300,450, and 600 mg/kg) were administrated to different groups of animals. Mortality and general behavior of animals were observed periodically for the next 48 hr during the 14 days.

Effect of *Rhamnus alaternus L*. leaf extracts on alloxane-induced diabetic rats

Fasting Wistar rats (16h) were treated with a single intra-peritoneal dose of alloxan monohydrate (≥98.0%) at 150mg / kg. PC prepared just before injection into a normal saline solution NaCl (0.9%)(Alarcon-Aguilar et al.,2000) Because alloxane is capable of producing lethal hyperglycemia following massive release of pancreatic insulin, the rats were then treated with 30% glucose solution orally at a different time interval after 6 hours of treatment. Induction of alloxane and a 5% glucose solution was stored in baby bottles in their cages for the next 24 hours. After 72 hours of alloxane injection, rats with blood glucose level greater than or equal to 280 mg / dl were considered diabetic and are used for this experiment. 30 normal and diabetic rats were divided into 6 groups of 5 rats for each of these groups (n = 5). The rats were treated with a single daily dose orally for 14 days.

Group I: Normal rats: positive control served as 300 mg/kg.bw of glibenclamide

Group II: Diabetic rats: positive control served as 300 mg/kg.bw of glibenclamide

Group III: Normal rats: negative control served as 1ml NaCl 0.9%

Group IV: Diabetic rats: negative control served as 1ml NaCl 0.9%

Group V: Normal rats: served as 300 mg/kg.bw of *Rhamnus alaternus L*. extract of leaves

Group VI: Diabetic rats: served as 300 mg/kg.bw of *Rhamnus. alaternus L*. extract of leaves

Retro-orbital blood samples are taken for each lot at 0 day (Basal Glycemia), 3rd day 7th day and 14th day. Whole blood was used for the blood glucose measurement using a glucometer, while for the assay of the other blood parameters, at the 14th day of the study, blood was recovered in tubes containing heparin, and then centrifuged at 1000 rpm for 15min. The recovered plasma was assayed for serum urea, serum creatinine, serum protein, serum triglycerides and serum cholesterol.

Statistical analysis

Data were represented as the mean \pm SEM. Statistical comparison of data was made by means of one way ANOVA using Student's test to compare two lots. The following notation is used for any significant difference: Not significant (*): $p > 0.05$, Significant (**): $p < 0.01$, Very significant (***): $p < 0.001$ highly significant (****): $p < 0.0001$

RESULTS

The acute oral toxicity study of the methanolic extract of leaves from *Rhamnus alaternus L.* showed median lethal LD50 of 680.79 mg / kg p.c administered orally in albino mice. Alloxane is widely used to induce experimental diabetes in animals. The mechanism of their action in pancreatic B cells has been extensively studied and is now fairly well understood. The cytotoxic action of this diabetogenic agent is mediated by reactive oxygen species. Alloxan and the product of its reduction, dialuric acid, establish a redox ring with formation of superoxide radicals. These radicals undergo a disproportionation with hydrogen peroxide. Then, highly reactive hydroxyl radicals are formed by the Fenton reaction. The action of reactive oxygen species with a simultaneous massive increase in cytosolic calcium concentration causes rapid destruction of B cells Szkudelski (2001).

The variation in body weight of rats is a very important parameter. The regular monitoring of the animals led us to obtain the values relating to Table 1 and Figure 1. From the results obtained, we recorded a regular gain of body weight of normal rats treated with *Rhamnus alaternus L.* extract as well as positive and negative control groups. This increase in weight is very highly significant throughout the experience $p < 0.0001$.

It was observed that injection of alloxane at a dose of 150g / kg.bw intraperitoneally induced weight loss in diabetic rats. This decrease in body weight is very highly significant $p < 0.0001$. After one week of treatment with *Rhamnus alaternus L.* extract, we observed a very highly significant increase in body weight in diabetic rats treated with *R. alaternus L.* extract, following the same route as the positive and negative control.

The effect of the *Rhamnus alaternus L.* extract leaves administered orally on the fasting blood glucose in normal rats and diabetic rats by the intra-peritoneal injection of 150 g / kg.bw of alloxane was shown in Table 2. The results obtained show that there is no significant difference $p > 0.05$ between normal rats treated with *Rhamnus alaternus L.* extract and normal

positive and negative control rats. Fasting blood glucose was stable during the 14 days of treatment and followed the same route as rats in positive and negative control groups.

During a two-week follow-up of diabetic rats, hyperglycemia was noted following the pretreatment of the rats with alloxane (150 mg / Kg.bw). A 4-fold increase in fasting blood glucose has been noted since the injection of alloxane. The daily treatment of the rats by the methanol extract succeeded in reducing this hyperglycemia. No significant difference $p > 0.05$ was observed in this experiment between the diabetic rats treated with the *Rhamnus alaternus L.* extract and the positive and negative control diabetic rats.

Alloxane resulted in the establishment of a diabetic syndrome characterized by polyphagia, polyuria, polydipsia and weight loss and the rats exhibited a table characterized by hyperglycemia, hypercholesterolemia, hypertriglyceredemia in rats Kebieche, M (2009)

The variation of serum urea was shown in Table 3. We noted a significant $p < 0.01$ increase of urea in diabetic rats compared to normal rats treated with *Rhamnus alaternus L.* extract, very highly significant increase $p < 0.0001$ urinary serum between normal rats and diabetic rats underwent 1ml of NaCl to 0.9%, and finally a non-significant $p > 0.05$ increase in urea serum between normal rats and diabetic rats treated with 300mg / kg.bw of *Rhamnus alaternus L.* extract.

The variation in serum protein is shown in Table 3. The results show that total protein levels were very similar in all six experimental groups. The statistical study of these results revealed no significant difference between normal and diabetic rats treated with glibenclamide and NaCl 0.9% $p > 0.05$, and a very highly significant difference ($p < 0.0001$) in protein between normal and diabetic rats treated with *Rhamnus alaternus L.* extract.

Serum creatinine variation was shown in Table 3. We noted a non-significant $p > 0.05$ increase in creatinine between diabetic rats compared to normal rats treated with *Rhamnus alaternus L.* extract. The groups treated with glibenclamide showed a significant increase $p < 0.01$ between the diabetic and normal rats of these lots. Finally, there was a very highly significant increase $p < 0.0001$ between normal rats and diabetic rats that have undergone 1 ml of 0.9% NaCl orally.

From the results obtained in Table 4 we highlighted a very highly significant ($p < 0.0001$) increase of serum cholesterol in diabetic rats treated with *Rhamnus Rhamnus alaternus L.*

extract compared to normal rats treated with this same extract.

Table 1. The effect of *Rhamnus alaternus L.* extract on body weight in normal rats and diabetic rats

Group	Body weight (mg)			
	0 day	3 rd day	7 th day	14 th day
I	133.00± 3.26****	136.30 ± 3.11****	141.62± 3.24****	148.65 ± 1.31****
II	142.90± 2.15****	137.06 ± 1.43****	135.54± 1.75****	153.80 ±2.36****
III	139.76± 1.50****	146.64 ± 1.30****	157.06± 1.06****	163.70± 2.27****
IV	172.86± 1.65****	166.76 ± 1.05****	162.60 ± 1.54****	157.32 ± 1.56****
V	131.08± 1.67****	131.36± 1.32****	139.24± 1.38****	147.62±1.45****
VI	138.20± 0.80****	131.34± 1.44****	131.24± 0.65****	141.20 ± 0.52****

Values are the mean ± SEM; n=5, Highly significant (****): p <0.0001. Group I: Normal positive control, group II: diabetic positive control, group III: normal negative control, group IV: diabetic negative control, group V: normal *Rhamnus* extract, group VI: diabetic *Rhamnus* extract

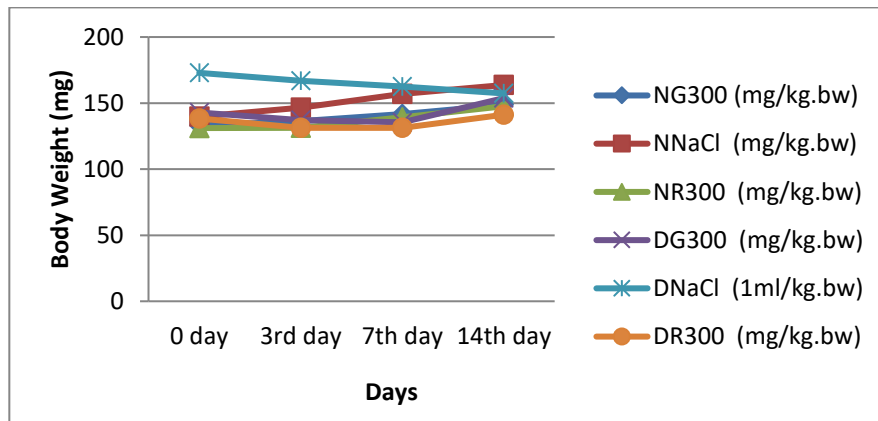


Figure 3. Variation of body weight in normal (N) and diabetic (D) rats treated with methanol extract of *Rhamnus alaternus L* for 14 days. p <0.0001

Table 2. The effect of *Rhamnus alaternus L.* Extract on blood glucose level in normal rats and diabetic rats

Group	Blood glucose level (mg/dl)			
	0 day	3 rd day	7 th day	14 th day
I	77.4 ± 6.27*	89.00 ± 7.78*	82.40 ± 7.92*	77.60 ± 8.08*
II	81.80 ± 9.36*	372.20 ± 3.24*	298.80 ± 43.80*	232.00 ± 52.40*
III	78.40 ± 10.90*	88.40 ± 7.89*	83.60 ± 6.35*	81.40 ± 8.26*
IV	84.80 ± 5.45*	307.60 ± 2.52*	282.20 ± 18.50*	256.80 ± 32.0*
V	81.80 ± 5.76*	84.60 ± 3.97*	88.20 ± 12.90*	88.00 ± 4.69*
VI	80.20 ± 9.50*	352.80 ± 36.80*	292.60 ± 9.10*	264.40 ± 28.4*

Values are the mean ± SEM; n=5, Not significant (*): p > 0.05, Group I: Normal positive control, group II: diabetic positive control, group III: normal negative control, group IV: diabetic negative control, group V: normal *Rhamnus* extract, group VI: diabetic *Rhamnus* extract.

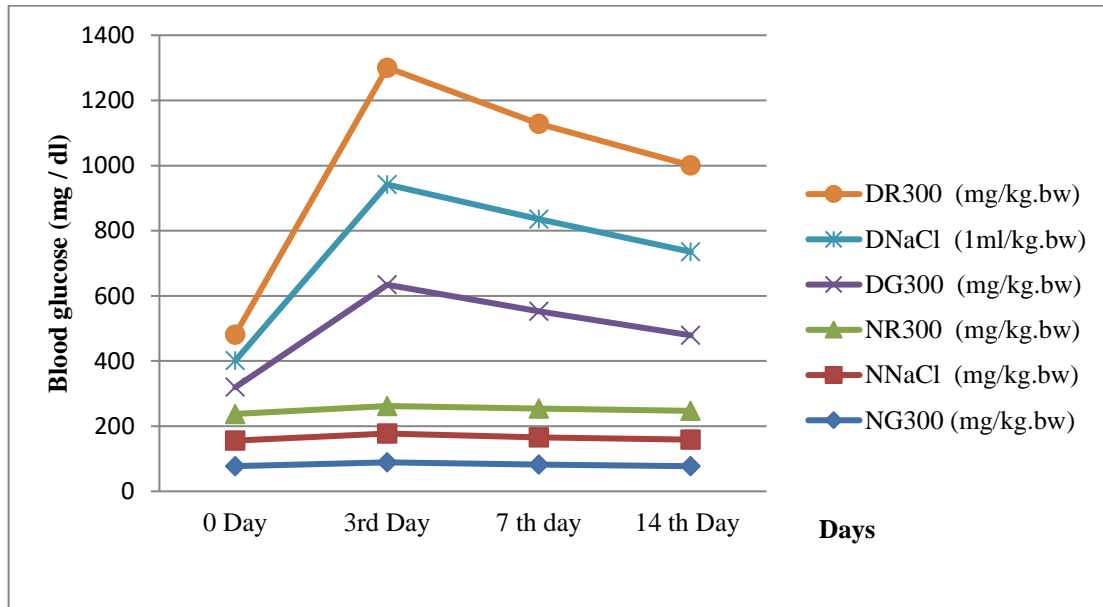


Figure 2. Variation of blood glucose levels in normal (N) and diabetic (D) rats treated with methanol extract of *Rhamnus alaternus L* for 14 days. $p > 0.05$.

Table 3. Effect of *Rhamnus alaternus L*. extract on serum urea, serum protein and serum creatinine in normal rats and diabetic rats

Group	Blood parameter		
	Serum urea (mg/dl)	Serum protein (g/dl)	Serum creatinine (mg/dl)
I	40.40± 7.40 *	8.20± 0.10*	0.67± 0.04**
II	45.60± 4.88*	8.01± 0.19*	0.72± 0.01**
III	46.40± 3.65****	8.47± 0.13*	0.69± 0.03****
IV	76.80± 2.59****	8.59± 0.10*	1.24± 0.03****
V	40.60± 2.41***	8.03± 0.13***	0.73± 0.01*
VI	49.60± 1.67***	8.45± 0.09***	0.74± 0.01*

Values are the mean ± SEM, n=5, Student's test. Not significant (*): $p > 0.05$, Significant (**): $p < 0.01$, Very significant (***): $p < 0.001$ Highly significant (****): $p < 0.0001$. Group I: Normal positive control, group II: diabetic positive control, group III: normal negative control, group IV: diabetic negative control, group V: normal *Rhamnus* extract, group VI: diabetic *Rhamnus* extract.

Table 4. Effect of *Rhamnus alaternus L*. extract on serum triglycerides and serum cholesterol, in normal rats and diabetic rats

Group	Lipid blood parameter	
	Serum triglycerides (mg/dl)	Serum cholesterol (mg/dl)
I	62.60 ± 5.68***	54.00 ± 3.16*
II	148.80 ± 39.20***	83.80 ± 9.55*
III	70.40 ± 6.58****	56.00 ± 1.58****
IV	220.00 ± 16.97****	215.00 ± 15.89****
V	59.00 ± 5.61**	55.60 ± 2.88****
VI	77.80 ± 8.70**	173.40 ± 14.47****

Values are the mean ± SEM, n=5, Student's test. Not significant (*): $p > 0.05$, Significant (**): $p < 0.01$, Very significant (***): $p < 0.001$ Highly significant (****): $p < 0.0001$. Group I: Normal positive control, group II: diabetic positive control, group III: normal negative control, group IV: diabetic negative control, group V: normal *Rhamnus* extract, group VI: diabetic *Rhamnus* extract.

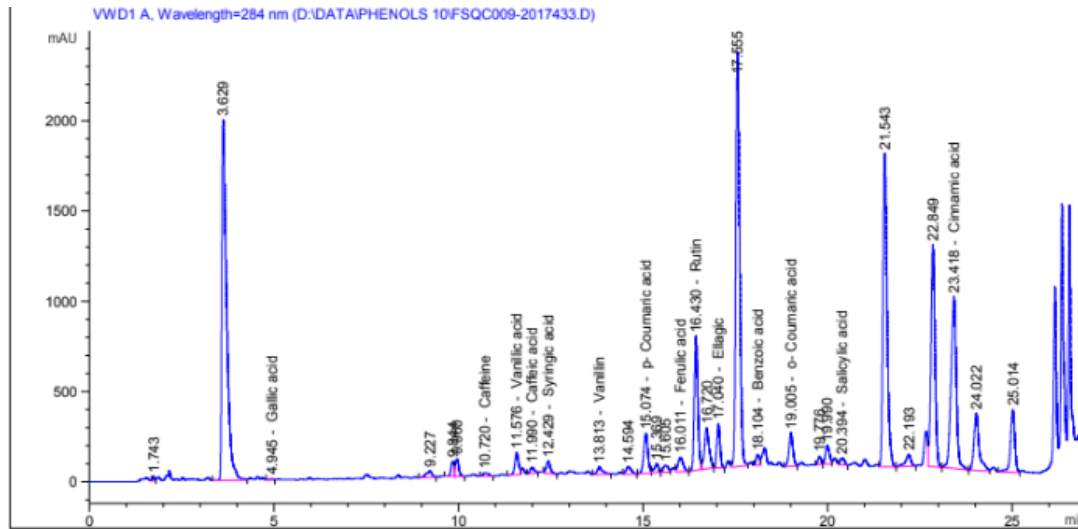


Figure 3. The HPLC of the methanol *Rhamnus alaternus L* leaves extract

Table 5. Phenol compounds of *Rhamnus alaternus L* leaves methanol extract.

Ret Time [min]	Area[Mau*s]	Amount ug/ml]	Name	Molecular formula	Conc. Mg/100g
4.945	23.69825	1.62334e-1	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	0.27
9.004 1	-	-	Catechol	C ₆ H ₆ O ₂	ND
10.395	-	-	p- Hydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	ND
10.720	186.0243	1.50699	Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	2.15
11.576	885.83978	7.35340	Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	12.26
11.990	216.25833	1.03343	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	1.72
12.429	531.07904	3.08806	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	5.15
13.813	429.64291	2.16553	Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	3.61
15.074	1745.08740	4.97898	p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	8.30
16.011	755.71997	4.00358	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	6.67
16.430	4929.67773	110.97772	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	671.36
17.040	1513.43726	22.16.35	Ellagic	C ₁₄ H ₆ O ₈	36.93
18.104	370.06271	29.04409	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	48.41
19.005	1393.65222	4.55254	O-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	7.59
20.394	305.46872	4.99870	Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	8.33
23.418	9422.40430	32.66224	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	54.44

This increase was 173 ± 14.17 mg/dl compared to normal rats which are 55.6 ± 2.88 mg/dl. This increase is greater than that of rats treated with glibenclamide, which are 83.80 ± 9.55 mg/dl in diabetic rats and 54.00 ± 3.16 mg/dl in normal rats.

All these obtained observations were very highly significant $p < 0.0001$, except that in rats that undergone oral 1ml of 0.9% NaCl, the

increase in serum cholesterol was not significant $p > 0.05$.

The variation of serum triglyceride was shown in Table 4. The results showed that the serum triglycerides level in diabetic rats treated with *Rhamnus* extract increased significantly $p < 0.01$ compared to normal rats treated with this same extract. It is was 77.80 ± 8.70 mg / dl in diabetic rats compared to normal rats 59.00 ± 5.16 mg / dl. This increase was lower compared to that of

diabetic rats treated with glibenclamide which was very significant $p < 0.001$ it is 148.80 ± 39.20 mg / dl compared to normal rats 62.60 ± 5.68 mg / dl. In addition, there was a very highly significant increase in serum triglyceride between normal rats and diabetic negative control groups.

The methanol extract of *Rhamnus. alaternus* leaves was subjected to liquid chromatography analysis to identify the different phenolic components (Fig.3). Sixteen compounds were identified whose data were presented by retention time, area, amount, name, molecular formula and concentration in mg/100g extract. The major detected components of *Rhamnus. alaternus* extract were rutin, cinnamic acid, benzoic acid and ellagic. The complete list of compounds identified in the extract of *Rhamnus alaternus* L. were listed in Table 5.

Chromatographic analysis showed that the predominant component was rutin which is a flavonoid widespread in nature. It is one of the most attractive phytochemicals because of its properties. In fact it is considered one of the most important flavonoids used in the pharmaceutical industry. More than 130 rutin-based medicines have been registered around the world. Rutin is characterized by its anti-oxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activities. It would also be beneficial in certain chronic diseases such as cardiovascular diseases or diabetes. The anti-diabetic character of rutin was highlighted in 2007 by the Stanley Mainzen Prince group (Matough, et al., 2012) for improvement of glucose homeostasis in diabetic rats. In this study, oral administration of rutin (100 mg / kg) to diabetic rats over a period of 45 days resulted in decreased plasma glucose and increased insulin levels, with increased glycogen content the liver and muscles. There was also a decrease in the glycogen content in the kidneys. Fasting blood glucose was reduced by increasing the activity of hexokinase. In addition, the histopathological study of the pancreas revealed the protective role of rutin (Stanley et al., 2006)

Among the major components of *R. alaternus* L. extract is cinnamic acid, which belongs to the class of auxins, is also recognized as a plant hormone regulating cell growth and differentiation Sharma P. (2011). Cinnamic acid is a natural organic compound, it is replicated in many spices cinnamon, clove, cranberries and prunes. It provides natural protection against pathogenic organisms. Cinnamic acid and its derivatives were studied for its various biological activities as antioxidant, hepatoprotective, antioxidant, insect

repellent, antidiabetic and anti cholesterolemic Kebieche, M (2009)

CONCLUSION

The present work was an investigation to confirm the traditional use of *Rhamnus alaternus* L. leaf to decrease blood sugar levels in people with diabetes in the Algerian population. In light of these results we can conclude that methanol extract of *Rhamnus. alaternus* L leaves was rich in phenolic compounds that represent a source of bioactive molecules. The methanol extract of *Rhamnus alaternus* improved the biochemical parameters such as serum glucose, urea, serum protein, serum creatinine, serum cholesterol and serum triglycerides as well as the body weight of diabetic rats.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that present study was performed in absence of any conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to express their grateful to University BADJI Mokhtar, Annaba, Algeria and to Botany Department, Faculty of Science, Mansoura University, Egypt.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Seridi Ratiba and Hamed M El-Shora and Ouchtati Sara designed and performed the experiments and wrote the manuscript. Also, all authors read and approved the final version.

Copyrights: © 2019 @ author (s).

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

REFERENCES

- Alarcon-Aguilar F.J., Jimenez-Estrad, M. and Reyes-Chilpa R. (2000). Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. J. Ethnopharmacol, 72: 21–7
- Alberti, K. G. M. M. and Zimmet, P. F. (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. *Diabetic Medicine*, 15: 539-55
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*, 46: 1086-1089. <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/definition-diabete/chiffres-monde>
- Bhouri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K. and Chekir-Ghedira L. (2012). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-B-isorhamnoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamnoside. *S. Afr. J. Bot.* 80: 57-62.
- Chancerel L. (1920). Flore forestière du globe. Ed. Gauthier-Villars, Paris. pp 561-562.
- Diabetes Atlas IDF 8e Edition 2017. *in* Diabetes Atlas IDF 8e Edition 2017
- Gubb AS. (1913). La flore algérienne, naturelle et acquise. Ed. A. Jourdan, Alger. pp 16-17.
- Jean-Jacques M., Annie F. and Christian J. (2005). Phenolic compounds of plants. An example of secondary metabolites of economic importance, Lausanne, Presses Polytechniques and universitaires romandes, P 192 , Biology Collection.
- Kebieche, M (2009) . Biochemical activity of flavonoid extracts of the plant *Ranunculus repens* L: Effect on experimental diabetes and Epirubicin-induced hepatotoxicity. Doctoral thesis . Mentouri Constantine University.
- Khachba I. and Benamar H. (2008). Effet de quelques plantes médicinales locales sur l'Alpha amylase. Mémoire d'ingénieur en Biologie. UATL.
- Matough, F. A., Budinb, S. B., Hamid Z. A., Alwahaibi, N. and Mohamed, J. (2012). The Role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* février, 12: 5-18.
- Sharma P. (2011). *J Chem. Pharm. Res.* 3: 403-424.
- Stanley, M., Prince, P. and Kkannan, N. (2006). Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20: 96-102.
- Szkudelski T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50: 537-46.