

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

### EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques

Présenté par :

*BOUDISSA Loubna & BOUNAB Khaoula*

### *Thème*

*Etude de l'effet des extraits de Pinus halepensis Mill. et  
Pinus pinea L. sur la glycémie post prandiale chez des souris  
non diabétiques*

Soutenu le : .../.../2017

Devant le jury composé de :

*Nom et Prénom*

*Grade*

<i>M. REMINI Hocine</i>	<i>Maitre assistant "B"</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>Maitre de conférences "A"</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M. CHERGUI Achour</i>	<i>Maitre assistant "A"</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>
<i>M<sup>me</sup>. AMROUCHE-SOBHI Widad</i>	<i>Maitre de conférences "A"</i>	<i>Univ. de Sétif</i>	<i>Co-promotrice</i>

Année Universitaire : 2016/2017

# *Dédicaces*

*Avant tout, je remercie le Dieu tout puissant, qui m'a donné la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.*

## *Je dédie ce travail*

*A mes chers parents Boubaker et Sonia.*

*Toute ma gratitude pour leurs soutient tout au long de mes études, que dieu les garde pour moi.*

*A ma très chère grand-mère et mon grand-père*

*A mes frères et mes sœurs : Fouad, Rania,  
Aymen , Maram*

*Un grand merci à ma tante Sabrina qui m'a beaucoup soutenu.*

*A toi mon binôme Khaoula et ta famille.*

*Mes chaleureux dédicaces à vous mes amis*

*A tous les professeurs et les étudiants de la promotion de  
« analyse biologique et biochimique 2017 ».*

*A ceux qui me sont chères, que j'aime et qui m'aime et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.*

*Loubna. B*

# *Dédicaces*

*Avant tout, je remercie le Dieu tout puissant, qui m'a donné la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.*

## *Je dédie ce travail*

*A mes chers parents Brahim et Fatima.*

*Toute ma gratitude pour leurs soutient tout au long de mes études, que dieu les garde pour moi.*

*A mes frères et mes sœurs : Abd-elhakim, Abd-eljalil ,Imen , Romaiïssa, Anfel.*

*Un grand merci à ma tante Nora qui m'a beaucoup soutenu.*

*A toute la famille Bounab et Hemma*

*A toi mon binôme Loubna et ta famille.*

*Mes chaleureuses dédicaces à Ikram seddiki.*

*A tous les professeurs et les étudiants de la promotion de « analyse biologique et biochimique 2017 ».*

*A ceux qui me sont chers, que j'aime et qui m'aime et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.*

*Khacoula. B*

# Remerciement

*Avant tout nous remercions le Dieu qui nous a guidés vers le chemin du savoir et qui nous a donné la force et le courage pour arriver à terme de ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à :*

♥ *Notre promoteur, Mr KADRI NABIL pour avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour ses conseils et ses orientations.*

♥ *Notre co-promotrice, M<sup>me</sup> AMROUCHE Née SOBHI. W pour ses conseils et ses orientations.*

♥ *Les membres du jury : Mr REMINI Hocine de présider le jury, Mr CHERGUI Achour pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

♥ *Notre sincère remerciements vont aussi à : Mr Lekhmici Arrar le directeur du laboratoire de biochimie Appliquée, Université Ferhat Abbas Sétif qui nous a donné l'opportunité d'effectuer notre stage, et leur gentillesse.*

♥ *Nos vifs remerciements à vous les techniciennes de laboratoire*

♥ *Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux vont, également, à toutes les personnes qui ont cru en nous et qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

**Merci.**



# *Table des matières*

**Liste abréviation**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Introduction..... 1**

**Synthèse bibliographique**

## **Chapitre I : Etude botanique**

<b>I.</b>	Etude botanique.....	<b>2</b>
<b>I.1.</b>	Généralités .....	<b>2</b>
<b>I.2.</b>	Répartition géographique.....	<b>2</b>
<b>I.3.</b>	Description botanique des plantes étudiées.....	<b>3</b>
<b>I.3.1.</b>	<i>Pinus halepensis</i> Mill. ....	<b>3</b>
<b>I.3.2.</b>	<i>Pinus pinea</i> L. ....	<b>3</b>
<b>I.4.</b>	Taxonomie.....	<b>4</b>
<b>I.5.</b>	Utilisations traditionnelles.....	<b>4</b>
<b>I.6.</b>	Composition physico-chimique .....	<b>5</b>
<b>I.7.</b>	Propriétés biologique	<b>6</b>

## **Chapitre II : Généralités sur le diabète**

<b>II.1.</b>	Introduction.....	<b>8</b>
<b>II.2.</b>	Epidémiologie.....	<b>8</b>
<b>II.2.1.</b>	Dans le monde.....	<b>8</b>
<b>II.2.2.</b>	En Algérie et dans les pays du Maghreb.....	<b>9</b>
<b>II.3.</b>	Critères de diagnostic.....	<b>9</b>
<b>II.3.1.</b>	Glycémie à jeun.....	<b>9</b>
<b>II.3.2.</b>	Glycémie postprandiale ou l'HGPO.....	<b>9</b>
<b>II.3.3.</b>	Hémoglobine glyquée HB1C.....	<b>10</b>
<b>II.4.</b>	Classification.....	<b>10</b>
<b>II.4.1.</b>	Le diabète insulino-dépendant (DID).....	<b>10</b>
<b>II.4.2.</b>	Diabète non insulino-dépendant (DNID).....	<b>10</b>

II.4.3.	Diabète gestationnel.....	10
II.5.	Le pancréas et l'insulino-sécrétion.....	11
II.5.1	Insuline .....	11
II.6.	Physiopathologie de diabète.....	12
II.6.1.	Physiopathologie de diabète de type 1.....	12
II.6.1.1.	Facteurs génétiques... ..	12
II.6.1.2.	Facteurs immunitaires.....	13
II.6.1.3.	Facteurs environnementaux.....	13
II.6.2.	Physiopathologie de diabète de type 2.....	13
II.6.2.1.	Facteurs génétiques.....	14
II.6.2.2.	Facteurs environnementaux.....	14
II.6.2.3.	Dysfonctionnement des cellules bêta.....	14
II.7.	Classes thérapeutiques de diabète.....	14
II.7.1.	Inhibiteurs des $\alpha$ -glucosidases.....	15
II.7.2.	Biguanides et glitazones.....	15
II.7.3.	Sulfamides hypoglycémiants et glinides.....	15
II.7.4.	Analogues du GLP1 et inhibiteurs de a DPP4.....	16
II.8.	Plantes antidiabétiques .....	16
II.8.1.	Cibles thérapeutiques dans le traitement du diabète.....	17
II.8.2.	Enzymes digestives comme cible thérapeutique.....	17
II.8.2.1.	$\alpha$ -glucosidase .....	19
II.8.2.2.	Inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase .....	19

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre III : Matériels et méthodes**

III.1.	Matériel.....	22
III.1.1.	Matériel végétal.....	22
III.1.2.	Animaux de laboratoire.....	22
III.1.3.	Réactifs chimiques.....	22
III.1.4.	Autres matériels.....	22
III.2.	Méthodes.....	22
III.2.1.	Préparation de la plante.....	22

III.2.2.	Extraction.....	23
III.2.3.	Dosage des phénols totaux.....	24
III.2.4.	Dosage des flavonoïdes.....	24
III.2.5.	Effet des extraits sur l'α- glucosidase.....	25
III.2.5.1.	Préparation des solutions.....	25
III.2.5.2.	Procédé expérimentale.....	25
III.2.6.	Etude de l'effet de l'extrait aqueux de <i>Pinus halepensis</i> Mill. et <i>Pinus pinea</i> L. sur la glycémie post- prandiale.....	26
III.2.6.1.	Animaux et conditions d'hébergement.....	26
III.2.6.2.	Procédé expérimentale.....	28

#### **Chapitre IV : Résultats et discussion**

IV.1.	Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.....	29
IV.2.	Evaluation l'effet inhibiteur de la glycémie post-prandiale des extraits aqueux des graines de <i>P. halepensis</i> Mill., et <i>P.pinea</i> L.....	30
IV.2.1	Effet des extraits sur l'α-glucosidase.....	30
IV.3.	Etude de l'effet des extraits, <i>Pinus pinea</i> L. et <i>Pinus halepensis</i> Mill. sur la glycémie post-prandiale.....	33
	<b>Conclusion.....</b>	38

#### **Références bibliographiques**

**Annexe**

**Résumé**

## Liste des abréviations

**Abs:** Absorbance.

**Al Cl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium.

**C<sup>0</sup>** : Degré Celsius.

**CAM** : Membrane Corioallantoïdienne de Poulet..

**DG** : Diabète gestationnel.

**DID** : Diabète insulino-dépendant.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DNID** : Non-insulino-dépendant.

**DPP4** : la dipeptidyl peptidase-4.

**EQ** : Equivalent de la quercétine.

**Glut** : Glucose Transporter.

**GLP1** : glucagon-like peptide-1.

**HB1C** : Hémoglobine glyquée.

**HIV** : Humman immunodeficiency virus .

**HGPO** : Hyperglycémie postprandiale.

**HLA** : Human leucocyte antigen.

**IDF** : International Diabet Federation.

**M** : Molaire.

**MODY**: Maturity onset diabetes of the young.

**mM** : Milli molaire.

**nm** : Nanomètre.

**MO**: microscope optique.

**OHA**: Oral hypoglycémiant agent.

**ONAB** : Office National des Aliments du Bétail.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**P-NPG**: *p*-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside.

**PM** : Poids moléculaire.

**S** : Seconde.

**T** : Température.

**V** : Volume.

**$\mu$ g** : Microgramme

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre du tableau</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Position taxonomique de <i>Pinus halepensis</i> Mill, <i>Pinus pinea</i> L.	<b>4</b>
<b>II</b>	Caractéristique physico–chimique des graines de <i>P. halepensis</i> Mill., <i>P. pinea</i> de l’Algérie	<b>5</b>
<b>III</b>	Activité antimicrobienne de l’huile essentielle du <i>P. halepensis</i> Mill. provenant de l’ouest d’Algérie	<b>6</b>
<b>IV</b>	Activité antifongique de l’huile essentielle du <i>P. halepensis</i> Mill.	<b>7</b>
<b>V</b>	Différentes enzymes présentes dans le tube digestif.	<b>18-19</b>
<b>VI</b>	Schéma expérimental de l’étude <i>in vivo</i> .	<b>28</b>
<b>VII</b>	Effet des extraits sur la glycémie.	<b>35</b>

## Liste des figures

N°	Titre de la figure	page
1	Aire de répartition naturelle des <i>Pinus</i> .	2
2	Arbre de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	3
3	Aiguilles et cônes de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	3
4	Aiguilles de <i>Pinus pinea</i> L.	4
5	Fruits de <i>Pinus pinea</i> L.	4
6	Arbre de <i>Pinus pinea</i> L.	4
7	Les systèmes endocriniens du pancréas.	11
8	La différence entre une coupe histologique de pancréas d'individus sain et d'une autre coupe de pancréas d'individus atteint de diabète type 1	12
9	Structure de l'alpha-glucosidase de <i>S. cerevisiae</i> .	20
10	Structure des inhibiteurs de $\alpha$ -glucosidase.	21
11	Gavage gastrique des solutions préparées.	27
12	mesure de la glycémie après la prise du sang par incision au niveau de la veine de la queue sur les souris non anesthésiées.	28
13	taux des phénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait des graines du genre <i>Pinus</i> .	29
14	Pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par l'acarbose.	30
15	Pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par l'extrait de <i>Pinus Halpensis</i> Mill.	31
16	Pourcentage d'inhibition de l'enzyme alpha glucosidase par l'extrait de <i>Pinus pinea</i> L.	32
17	Inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale de l'extrait <i>Pinus halepensis</i> Mill (600 mg) chez les souris normales.	34
18	Inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale de l'extrait <i>Pinus pinea</i> L (600 mg) chez les souris normales.	35

# Introduction

### Introduction :

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

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques ; plus de 1000 plantes différentes, ont été décrites comme un traitement traditionnel du diabète **(Oubré et al., 1997)**. Il paraît difficile, voire impossible de répertorier la totalité des plantes actives et efficaces sur ce genre de pathologie.

Le genre *Pinus* fait partis des plantes les plus utilisées de façon traditionnelle pour ses effets bénéfiques telles que : Antiseptique à action dynamisante recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires. Considérer comme très efficace dans les affections pulmonaires: la grippe, la sinusite, les rhumatismes son rôle hypoglycémiant est dû généralement aux métabolites secondaires qu'il contient, notamment les flavonoïdes **(Lucienne, 2010)**.

Toutes ces vertus thérapeutiques nous ont orientés vers une exploration large de leurs propriétés biologiques et pharmaceutiques, le choix s'est porté sur l'étude des graines de deux espèces de ce genre, *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. qui sont très utilisées de façon traditionnelle pour leur richesse en huiles et en flavonoïdes sur la hyperglycémie post prandiale.

La présente étude, consiste en premier lieu à déterminer la teneur en phénols totaux et flavonoïdes des deux graines de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L., en second lieu, à tester l'effet antidiabétique des extraits *in vitro* et l'inhibition de la glycémie post-prandiale des extraits aqueux sur des souris non diabétiques.

**Synthèse**  
**bibliographique**

# Chapitre I

## I. Etude botanique :

### I.1. Généralités :

Le genre *Pinus* appartient à la famille des *Pinaceae*, répartie dans le monde entier et essentiellement autour des côtes méditerranéennes (Ching et al., 2010). Ce sont des arbres ou plus rarement des arbustes persistants, monoïques, aux rameaux régulièrement verticillés, avec des feuilles en forme d'aiguilles qui sont persistantes (Farjon, 1990).

Les pinacées sont des conifères c'est-à-dire des plantes portant des cônes (Ching et al., 2010). Le bois est recherché tant pour les usages industriels et aussi médicaux. Cette famille compte 220 à 250 espèces réparties en 11 genres (*Abies*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudolarix*, *Peudotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Ketelaria*, *Nothotsuga*)(Mathilde, 2002).

En Algérie, ils sont connus localement sous le nom vernaculaire de : Senouber (الصنوبر) (Lucienne, 2010). on trouve trois genres qui sont (Quèzel and Santa, 1963) :

- Genre *Abies* (le sapin) ;
- Genre *Cerdu*(le cèdre) ;
- Genre *Pinus* (les pins).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés de près à deux plantes du nord Algérien et plus précisément à Bejaia qui sont : *Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L.

### I.2. Répartition géographique :

Le genre *Pinus* se répartie dans le monde. Nous le trouvons dans des régions assez variées et essentiellement autour des côtes méditerranéennes, plus particulièrement en Afrique du nord et en Espagne. En Algérie, les *Pinus* font partis de la richesse floristique à cause de la nature du climat et du sol qui s'y prête bien. En effet, ils préfèrent les zones à climat tempéré-froid de l'hémisphère septentrional, où ils occupent tous les étages de végétation, du niveau de la mer jusqu'à la limite supérieure des forêts, même en terrain en permanence gelé (Liston et al., 2003).

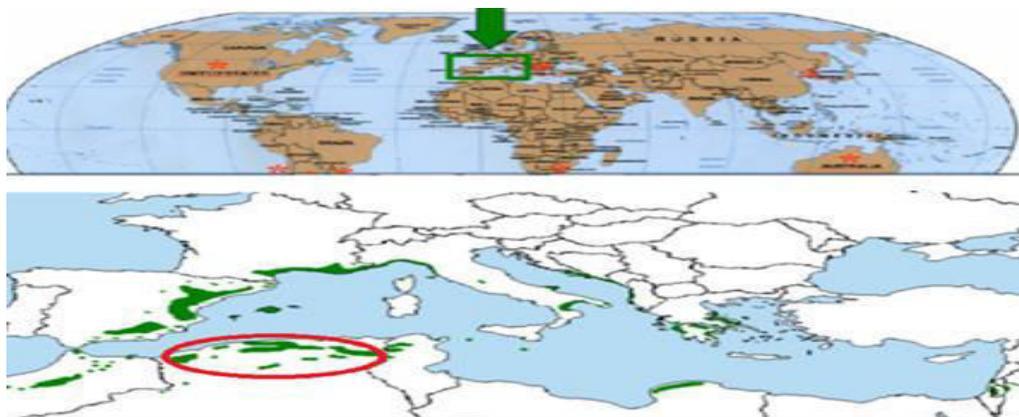


Figure1 : Aire de répartition naturelle des *Pinus*.

### I.3. Description botanique des plantes étudiées :

#### I.3.1. *Pinus halepensis* Mill.

C'est l'arbre le plus répandu en Algérie, avec une surface qui avoisine 900 000 hectares. La hauteur du pin d'Alep est très variable, de 6 à 20 mètres dans les conditions de milieux les plus diversifiées. L'écorce des jeunes sujets est lisse, de couleur gris argenté; celle des arbres adultes est épaisse, profondément crevassée, de couleur noirâtre à rougeâtre. Les feuilles sont fines, longues de 5 à 10 cm, réunies par deux dans une même gaine, larges au plus de 1 mm, d'un vert clair. Les cônes persistent indéfiniment sur l'arbre après avoir perdu leurs graines.

Le cône est long de 8 à 12 cm, large de 3,5 à 4,5 cm, d'abord vert, puis devient rouge violacé, finalement arrivé à maturité brun rougeâtre à jaunâtre (**Fig. 2, 3**).

Le Pin d'Alep s'étend dans toute la région méditerranéenne. En Algérie, on le trouve depuis le littoral jusqu'à 2000 mètres d'altitude, dans l'Atlas Saharien (**Quèzel and Santa, 1963**).



**Figure 2:** Arbre de *Pinus halepensis* Mill.

**Figure 3:** Aiguilles et cônes de *Pinus halepensis* Mill.

#### I.3.2. *Pinus pinea* L. (Pin parasol) :

Comme l'indique son nom, ce Pin a un port se terminant par une cime en parasol (**Fig. 4- 6**).

- Les feuilles sont assez longues, de 8 à 20 cm, réunies par deux et quelques fois par trois.
- Les cônes sont aussi très caractéristiques de ce Pin, presque globuleux, long de 8 à 15 cm, large de 7 à 10 cm, composés d'écailles à larges écussons. Les graines sont grosses de 1,5 à 2 cm, longues avec une coque dure.

La graine appelée "Zgougou" est comestible, utilisée dans la pâtisserie. Il a été introduit en Algérie, a donné de bon résultat avec une croissance plus que satisfaisante (**Quèzel and Santa, 1963**).



**Figure 4:** Aiguilles de *P. pinea* L. **Figure 5:** Fruit de *P. pinea* L. **Figure 6 :** Arbre de *P. pinea* L.

#### I.4. Taxonomie :

La place de *Pinus* dans la taxonomie botanique est représentée dans le **Tableau I**:

**Tableau I :** Position taxonomique de *Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L. (Smaïhi, 2009).

Taxonomie	Description
Règne	<i>Plante</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes (phanérogames)</i>
Sous-embranchement	<i>Gymnospermes</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinale</i>
Famille	<i>Pinacée</i>
Sous-famille	<i>Pinoidée</i>
Genre	<i>Pinus</i>
Sous-genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i> Mill., <i>Pinus pinea</i> L.

#### I.5. Utilisations traditionnelles :

Le genre *Pinus* est très connu pour ses propriétés en médecine traditionnelle algérienne comme (Lucienne, 2010):

- Antiseptique puissant à action dynamisante ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires.
- Rubéfiant et balsamique, efficace dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes.
- Les sirops, les infusions, les tisanes, les jus de *Pinus halepensis* Mill. sont connus par leur effet balsamique pour vaincre les affections catarrhales du système respiratoire.
- On utilise les bourgeons de cette espèce en parfumerie et en savonnerie.

### I.6. Composition physico-chimique :

Le genre *Pinus* a fait l'objet de beaucoup d'études publiées se rapportant à la chimie et à la pharmacologie de ses extraits bruts ou purifiés. Plusieurs équipes de recherche ont mené des études sur la chimie de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. Permettant ainsi l'isolation d'un grand nombre de métabolites secondaires. (Kadri et al., 2015)

Les graines de *Pinus* d'Algérie (*P. halepensis* Mill., *P. pinea* L.) possèdent une très large échelle des nutriments bénéfiques pour la santé humaine, ils constituent une source importante de sucres, protéines et acides gras (Tableau II).

**Tableau II** : caractéristique physico-chimique des graines de *P. halepensis* Mill., *P. pinea* L. (Kadri et al., 2015)

Caractéristiques	<i>Pinus halepensis</i> Mill.	<i>Pinus pinea</i> L
<b>Caractéristiques physiques</b>		
-volume des graines (cm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	<b>51,00 ± 0,816</b>	<b>904,33 ± 1,299</b>
-index des graines (g) <sup>b</sup>	<b>26,63 ± 0,236</b>	<b>608,90 ± 0,123</b>
Masse volumique	<b>0,52 ± 0,004</b>	<b>0,67 ± 0,003</b>
<b>Caractéristiques chimique (%)</b>		
Humidité	<b>7,86 ± 0,042</b>	<b>8,47 ± 0,840</b>
Matériel sec	<b>92,12 ± 0,042</b>	<b>91,52 ± 0,840</b>
Teneur en lipide	<b>36,73 ± 1,420</b>	<b>19,78 ± 0,497</b>
Teneur en sucre	<b>5,55 ± 0,113</b>	<b>1,16 ± 0,173</b>
Teneur en sucre réducteur	<b>0,15 ± 0,001</b>	<b>0,45 ± 0,002</b>
Sucrose	<b>5,13 ± 0,108</b>	<b>0,68 ± 0,162</b>
Teneur en protéine	<b>26,62 ± 0,129</b>	<b>14,25 ± 0,034</b>
Teneur en phénols totaux	<b>3,71 ± 0,434</b>	<b>7,99 ± 0,211</b>
Concentration des flavonoïdes	<b>0,80 ± 0,048</b>	<b>2,17 ± 0,118</b>

<sup>a</sup> volume des graines = volume de 1000 graines dans cm<sup>3</sup> / <sup>b</sup> indice des graines = la masse de 1000 graines dans gramme.

Ils sont aussi une source non négligeable des complexes phénoliques et des huiles essentielles qui sont des bons agents thérapeutiques qui peuvent être orientés vers l'utilisation de ces graines dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques. (Kadri et al., 2015).

Les graines de *Pinus* Algérienne sont très riches en huile totaux de 36,73 %, 19,78 % . Elles peuvent représenter source importante en acides gras essetielles notamment les insaturés et par conséquent une bonne source d'énergie (**Kadri et al., 2015**).

### I.7. propriétés biologique :

L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Pinus pinea* L. ont montré une inhibition significative de la croissance de dix champignons pathogènes des plantes.

De plus, une étude réalisée en 2012 révèle qu'elles ont des propriétés herbicides. En effet, testées sur *Sinapis arvensis* L., *Lolium rigidum* Gaud. et *Raphanus raphanistrum* L., les résultats montrent une inhibition complète de la germination des graines à des concentrations élevées. D'autre part à de faibles doses, les huiles agissent en retardant la germination et en inhibant la croissance des semis de toutes les mauvaises herbes testées (**Amri et al., 2012**).

#### I.7.1. Activité antimicrobienne :

L'huile essentielle des épines de *P. halepensis* Mill. provenant de l'ouest d'Algérie a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque contre 11 bactéries. Les tests ont montré que l'huile a une activité antibactérienne variable contre les souches testées. La zone maximale d'inhibition a été enregistrée contre les cinq souches mentionnées dans le **tableau II**.

**Tableau III** : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *P. halepensis* Mill. provenant de l'ouest d'Algérie (**Macchioni et al., 2002**):

Micro-organismes	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	9,0
<i>Lysteria monocytogenes</i>	10,0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,5
<i>Citrobacter freundii</i>	8,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,0

**I.7.2. Activité antifongique :**

L'huile essentielle de *P. halepensis* Mill. extraite à partir des aiguilles montre une activité antifongique contre les champignons suivants.

**Tableau IV:** Activité antifongique de l'huile essentielle du *P. halepensis* Mill. (Fekih et al., 2014):

Champignons	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Aspergillus niger</i>	3,75
<i>Fusarium oxysporum</i>	9
<i>Rhizopus tolonifer</i>	3,5

**I.7.3. Activité anti angiogénique :**

D'après (Kadri et al., 2014), les fractions lipidiques polaires (glycolipides et phospholipides) et apolaires (lipides neutres) des graines de *P. halepensis* Mill. présentent une activité anti angiogénique très importante sur CAM (Membrane Corioallantoidienne de Poulet) et sur Matrigel et une activité cytotoxicité très faible.

# Chapitre II

## II.1.Introduction :

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides entraînant une hyperglycémie (**Wang et al., 2010**).

Il est dû à une insuffisance ou une mauvaise utilisation de l'insuline caractérisée par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L vérifiée à deux reprises (**Cefalu, 2006**).

C'est une des pathologies chroniques les plus répandues dans le monde et constitue donc un danger pour la santé publique. En effet, l'OMS souligne une incidence mondiale progressive du diabète. De 30 millions de diabétiques répertoriés en 1985, les chiffres sont respectivement passés à 135 millions en 1995, 177 millions en 2000 et 347 millions en 2011. On estime que d'ici 2030, 438 millions d'individus en seront atteints (**American Diabetes Association 2010**).

En fonction de son étiologie, on distingue le diabète sucré de type 1 insulino-dépendants (DID) représente 15 % des diabétiques et résultant d'une destruction sélective et auto-immune des cellules  $\beta$  du pancréas.

Le diabète sucré de type 2 non insulino-dépendants (DNID) représente 85 % des diabétiques caractérisé par une résistance à l'insuline ou un défaut de sécrétion de cette hormone. Il existe d'autres types spécifiques de diabète comme le diabète gestationnel dont la fréquence d'apparition est faible (**Spinass et Lehman, 2001**).

La prise en charge thérapeutique du diabète repose actuellement sur des régimes alimentaires stricts et la prise d'antidiabétique oraux.

## II.2. Epidémiologie :

### a- Dans le monde :

Le diabète est une maladie mondialement répandue, dont la prévalence est importante, Cette pandémie mondiale concerne principalement le diabète de type 2 qui représente environ 80% de l'ensemble des diabétiques et le type 1 environ 15 %, les autres formes étant plus rare ou exceptionnelles (**Chevenne and Fonfrède, 2001**).

Le nombre de décès attribués au diabète se situe aux alentours de quatre millions par an, soit 9% de la mortalité totale. Chaque minute, de par le monde six personnes meurent du diabète. L'OMS prévoit que ces décès vont augmenter de plus de 50% au cours des dix prochaines années (**Bernheim et al., 2008**).

**b- En Algérie et dans les pays du Maghreb :**

En Algérie, le diabète de type 2 occupe la quatrième place parmi les maladies non transmissibles. D'après le registre national du diabète de l'année 2005, l'incidence du diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents est de 9 pour 100 000 et quelques cas de diabète de type 2 commencent à être recensés chez les enfants (**Boudiba et al., 2008**).

Au Maroc, selon une enquête nationale menée en 2000, la prévalence de diabète était de 6,6 % dans la population âgée de 20 ans et plus (**Tazi et al., 2003**).

Alors qu'en Tunisie, le diabète représente une véritable épidémie. La prévalence déclarée est de 9,9% (10,1 chez la femme et 9,5% chez l'homme) (**Bouguerra et al., 2007**).

**II.3.Critères de diagnostic :****II. 3. 1. Glycémie à jeun :**

La glycémie est dosée presque uniquement par la méthode spécifique au glucose oxydase qui est la plus précise et remplace les autres méthodes. Normalement les valeurs de la glycémie plasmatique à jeun sont comprises entre 0,80 g/L (3.85 mMol/L) et 1,20 g/L (6,6 mMol/L). Après les repas, les valeurs ne dépassent pas 1,60 g/L (8,8 mMol/L) quels que soient l'horaire du dosage et la nature du repas (**Perlemuter et al., 2003**).

**II. 3. 2. Glycémie postprandiale ou l'HGPO :**

L'Hyperglycémie Provoquée par Voie Orale (HGPO) consiste en un dosage de la glycémie au temps zéro puis toutes les 30 minutes pendant 2 heures chez un sujet au repos ayant ingéré 75 g de glucose (**Perlemuter et al., 2003**).

Le test de l'HGPO doit être fait en dehors d'une prise médicamenteuse hyperglycémiant, d'une affection aiguë ou d'un stress majeur. La détermination d'une l'hyperglycémie à jeun diabétique et une glycémie à la 2<sup>ème</sup> heure de l'HGPO, supérieure ou égale à 2g/l sont satisfaisantes pour établir un diagnostic sur le plan épidémiologique. En pratique clinique, on a rarement besoin de recourir à l'HGPO pour poser le diagnostic de diabète (**Drouin et al., 2008**).

### II. 3. 3. Hémoglobine glyquée HB1C :

L'hémoglobine se trouve dans les globules rouges du sang. Elle a la particularité de capter une partie du sucre présent dans le sang. La part de l'hémoglobine qui capte le sucre est appelée « hémoglobine glyquée » (**Mario and Lasnier, 2006**).

La glycémie varie tout au long de la journée en fonction de l'apport alimentaire, de l'activité physique réalisée et la prise des médicaments. L'hémoglobine glyquée, en revanche, n'est pas influencée par ces facteurs. Elle est le reflet du taux moyen de sucre dans le sang (glycémie) sur une durée d'environ 3 mois, ce qui correspond à la durée de vie moyenne d'un globule rouge, c'est l'indicateur clé de l'équilibre du diabète. Elle s'exprime en pourcentage, plus les glycémies ont été élevées pendant cette période, plus le taux d'hémoglobine glyquée est élevé (**Mario and Lasnier, 2006**).

### II.4. Classification :

Plusieurs mécanismes physiologiques distincts peuvent aboutir au syndrome biologique commun à tous les types de diabète sucré: hyperglycémie. Ce sont ces entités physiopathologiques qui permettent de définir le type de diabète (**Drouin et al., 2008**).

#### II.4.1. Diabète insulino-dépendant (DID) :

Concerne le plus souvent les enfants, mais il peut survenir à tout âge. Les cellules qui sécrètent l'insuline sont détruites jusqu'à 90% de leur quantité normale (causes auto-immunes ou idiopathiques). Il est lié à un déficit en insuline (**Calop et al., 2008**).

#### II.4.2. Diabète non insulino-dépendant (DNID) :

Ce type de diabète débute généralement après l'âge de 40 ans et représente 90% de l'ensemble des cas mondiaux (**Buyschaert, 2006**). Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline. L'insuline est soit basse ou soit élevée (insulinorésistance prédominante ou insulinopénie prédominante) (**Calop et al., 2008**).

#### II.4.3. Diabète gestationnel (DG) :

Le diabète gestationnel est un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quels que soit le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum (**Rodier, 2001**).

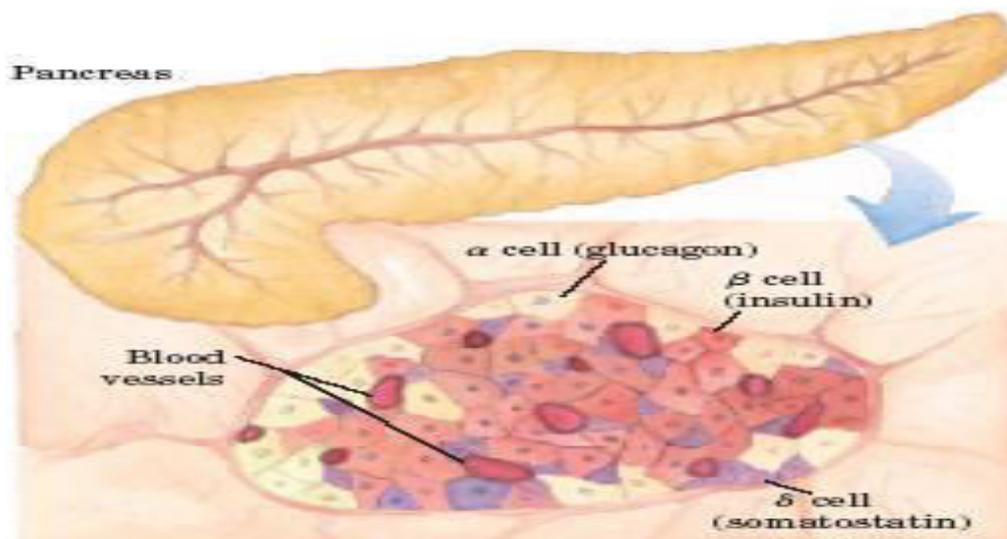
Il s'agit d'un diabète touchant 3% des femmes enceintes, il guérit habituellement après l'accouchement mais constitue cependant un facteur de risque pour un diabète non

insulinodépendant (DNID) ultérieur. Les raisons de sa survenue demeurent en grande partie inexplicées (**Buyschaert, 2006**).

### II.5. Le pancréas et l'insulino-sécrétion :

Bien que les apports de glucose soient très variables dans le temps, la glycémie reste toujours comprise entre 0.7 et 0.8 g/l (**Racah, 2004b**) . Cette régulation est assurée par les sécrétions endocrines du pancréas qui pénètrent dans le flot sanguin par la veine mésentérique (**Buyschaert, 2006**). Le pancréas est une glande double, à la fois exocrine et endocrine, située dans une anse du duodénum. La glande endocrine est représentée par de petits îlots cellulaires disséminés dans le parenchyme exocrine, les îlots de Langerhans, dont le diamètre varie de 100 à 300  $\mu$ m et dont le total ne représente guère que 1% environ de la glande, soit un poids total de 1 à 2 g. Les sécrétions de l'insuline rejoignent la circulation sanguine via le foie.

Le pancréas sécrète plusieurs hormones : l'insuline, le glucagon et la somatostatine (**Nelson and Cox, 2004**).



**Figure 7:** Les systèmes endocriniens du pancréas (**Nelson and Cox, 2004**).

**II.5.1.**L'insuline : hormone peptidique synthétisée dans les glandulaires des îlots de langerhans ou cellules Bêta. L'incapacité de ces cellules à produire suffisamment l'insuline, entraîne un diabète. Cette fragilité intervienne dans les mécanismes qui conduisent à la destruction de la cellule bêta, sous l'effet d'agents diabétogènes, comme l'Alloxane (**Oberley, 1988**). Au niveau des cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans les cellules en augmentant la perméabilité de leur membrane via des récepteurs au glucose exemple GLUT 4 (**Oberley, 1988**).

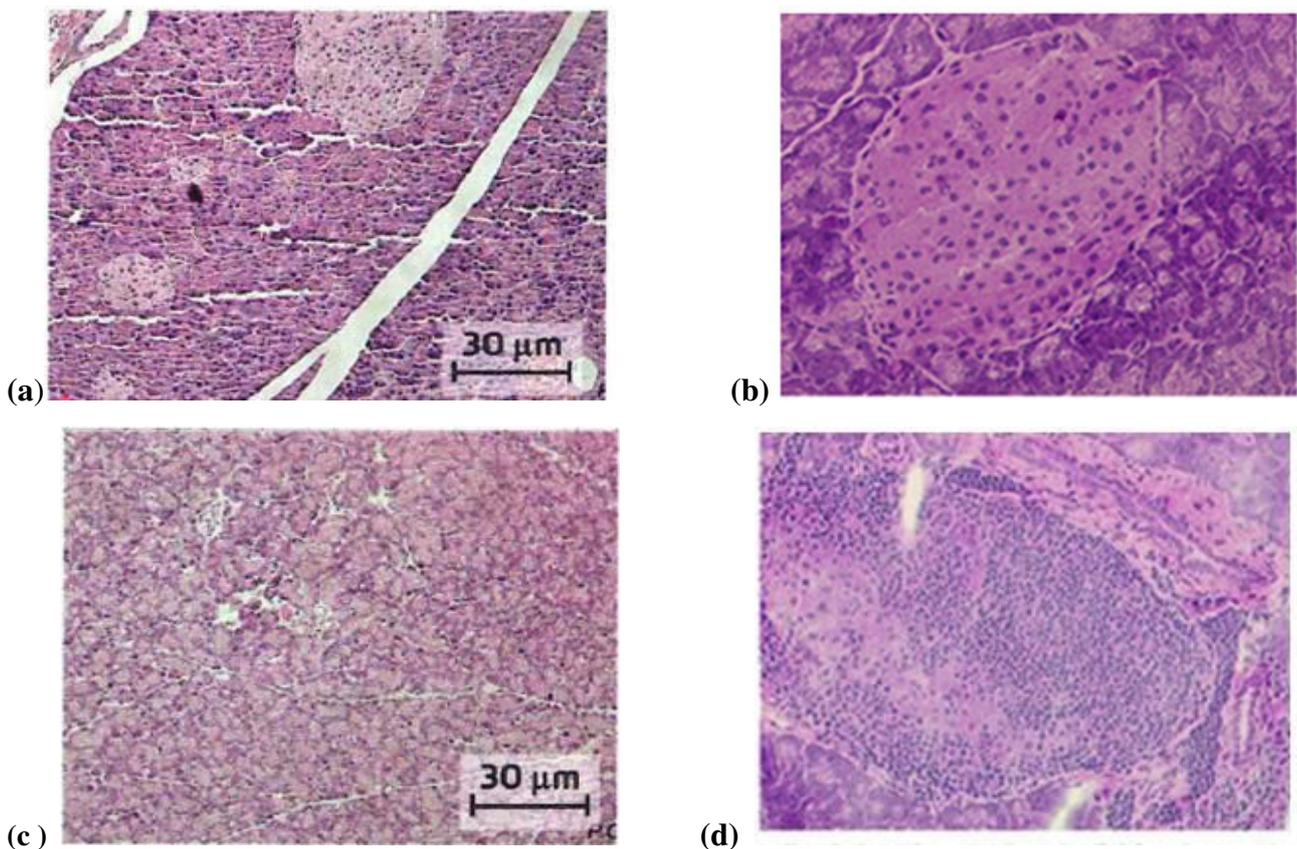
Au niveau du foie, elle stimule la glycogénogenèse. La capacité, plus ou moins grande, de l'insuline à favoriser l'utilisation du glucose par les tissus périphériques définit le degré de sensibilité à l'insuline d'une personne (Weaber, 2007).

## II.6. Physiopathologie du diabète :

### II.6.1. Physiopathologie de diabète de type 1.

Le diabète de type 1 est la conséquence d'un processus lent et progressif de destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas endocrine, initiée par activation d'une réaction auto-immune. Les mécanismes moléculaires initiaux qui conduisent à cette destruction auto-immune ne sont toujours pas entièrement identifiés (Spinas and Lehmann, 2001).

La différence entre une coupe histologique de pancréas d'individus sain et d'une autre coupe de pancréas d'individus atteint de diabète type 1 présentée dans les figures suivantes (figure 8) (HAS, 2007).



**a** : coupe de pancréas (MO) d'individus sain **b** : Ilot de Langerhans sain **c** : coupe de pancréas (MO) d'individus atteint de diabète type I **d** : Ilot de Langerhans dans le diabète type I

**Figure 8** : La différence entre une coupe histologique de pancréas d'individus sain et d'une autre coupe de pancréas d'individus atteint de diabète type 1

### II.6.1.1. Facteurs génétiques :

Plusieurs gènes sont impliqués dans la prédisposition à développer un diabète de type 1, notamment les gènes codant pour les antigènes HLA DR3 ou DR4 du système HLA de classe II (Abner, 2002). Le risque pour une mère DID d'avoir un enfant diabétique est environ 2% alors que le risque est de 4 à 5 % lorsque c'est le père qui est diabétique ID (Raverot, 2005) .

### II.6.1.2. Facteurs immunitaires :

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immunitaire due à la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans par des cellules T. Bien que la destruction des cellules  $\beta$  par médiation des cellules T, l'implication des anticorps ont été d'une grande importance, permettant un diagnostic précis et la prédiction des individus risquant de développer ce type de diabète (Ongagna and Sapin, 2004).

### II.6.1.3. Facteurs environnementaux :

La prédisposition génétique n'est pas seule responsable du diabète de type 1 ; car la concordance pour cette maladie chez les jumeaux monozygotes ne dépasse pas 40%.

Ceci souligne le rôle non exclusif de la génétique et la probable responsabilité de l'environnement.

Expérimentalement, le diabète de type 1 peut être induit chez l'animal par une infection virale. Chez l'homme, le rôle des virus est suggéré par des observations de diabète survenu au cours des infections virales (oreillons, rubéole congénitale, etc.) (van der Werf et al., 2007).

La toxicité des nitrosamines a été avancée car il a été observé, en Islande, que les enfants dont les mères ont consommé de la viande fumée au cours de leur grossesse font plus souvent un diabète de type 1 (Rodier, 2001).

Dans les pays scandinaves, il a été noté une prévalence plus élevée de diabète type 1 chez les nourrissons nourris au lait de vache que chez ceux qui étaient allaités par leurs mères. La démonstration de la présence, au diagnostics d'anticorps anti-albumine bovine a fait suspecter un rôle toxique de certaines protéines du lait de vache. En fait, une partie de la molécule d'albumine bovine présenterait des analogies de structure avec certaines protéines des cellules  $\beta$  et pourraient ainsi s'avérer immunogène (Rodier, 2001).

## II.6.2. Physiopathologie de diabète de type 2 :

Plusieurs facteurs interviennent dans l'éthiopathogénie du diabète de type 2. Il est probable qu'un individu hérite la susceptibilité de développer un diabète de type 2, et qu'un ou plusieurs facteurs environnementaux sont déterminants pour en favoriser l'expression clinique (DeFronzo, 1997).

#### **II.6.2.1. Facteurs génétiques :**

La place des facteurs génétiques est soulignée par les études familiales. La concordance se situe selon les études entre 60 et 100% pour les jumeaux monozygotes. Le risque pour les apparentés au premier degré des sujets diabétiques de type 2 de développer à leur tour un DNID est d'environ 40 %. Toutes les études convergent pour affirmer que le diabète de type 2 est une maladie polygénique; il existe sans doute un très grand nombre de gènes de prédisposition au diabète de type 2 (Franc, 2010).

#### **II.6.2.2. Facteurs environnementaux :**

- **L'obésité :** Elle augmente considérablement le risque de survenue d'un diabète de type 2, particulièrement lorsqu'il s'agit d'une obésité androïde (Raverot, 2005).
- **Sédentarité :** L'inactivité physique est source d'insulino-résistance. Des études ont montré que l'augmentation modérée de l'activité physique (30 à 45 minutes de marche par jour) dans un groupe à risque prévenait ou retardait l'apparition d'un diabète de type 2 (Raverot, 2005).
- **Autres facteurs :** la prévalence augmente avec l'âge, du fait de l'augmentation de la masse grasse et de l'insulinorésistance (Raverot, 2005) et selon certains auteurs le tabagisme est considéré comme un facteur déclencheur de cette maladie (Magis et al., 2002) .

#### **II.6.2.4. Dysfonctionnement des cellules bêta :**

La sécrétion de l'insuline suite à une charge en glucose se fait en deux phases. La première phase, précoce, dure quelques minutes et la seconde phase, plus tardive, persiste pendant toute la durée de la stimulation par le glucose. La première phase évite l'élévation de la glycémie postprandiale ; cette phase est précocement perdue chez le diabétique de type 2 (Abulafia-lapid et al., 1999).

## II.7. Classes thérapeutiques de diabète :

Lorsque les règles hygiéno-diététiques ne sont pas suivies ou insuffisantes, un traitement médicamenteux peut devenir nécessaire. Ces médicaments agissent par différents mécanismes d'actions : augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline, diminution de l'absorption de glucose ou augmentation de la sécrétion de l'insuline. Plusieurs familles d'anti-diabétiques oraux existent. Des mesures diététiques adjacentes doivent être appliquées afin de réduire l'apport glucidique. Une insulinothérapie est parfois nécessaire en complément du traitement oral, surtout après quelques années d'évolution de la maladie quand le malade devient insulino- nécessitant.

### II.7.1. Inhibiteurs des alpha-glucosidases :

La famille des inhibiteurs des alpha-glucosidases, compte deux représentants : l'acarbose et le miglitol. Ils inhibent de façon réversible des enzymes responsables de la dégradation des glucides complexes et, par conséquent, leur assimilation, leur durée de digestion est ainsi augmentée. Il en découle une baisse de la glycémie à jeun et post-prandiale sans hyperinsulinémie associée. Leurs effets secondaires sont surtout digestifs et s'expliquent par l'absence de clivage des glucides complexes provoquant des troubles intestinaux, des diarrhées et des flatulences (Alice et al., 2004).

### II.7.2. Biguanides et glitazones :

Les biguanides sont représentés par une unique molécule actuellement commercialisée : la metformine. Son action consiste à inhiber la néoglucogénèse hépatique et musculaire, ainsi que l'absorption intestinale de glucose. Elle possède également un rôle hypolipémiant sans la présence d'un effet hypoglycémiant (Alice et al., 2004).

Les glitazones sont des antagonistes sélectifs des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$ . Ils augmentent la sensibilité tissulaire à l'insuline au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux. Une diminution de la production hépatique de glucose et une augmentation de son utilisation périphérique en cas d'insulinorésistance sont également observées.

Les glitazones ne sont pas insulinosécrétrices, d'où l'absence d'hypoglycémie lors de leur administration (You et al., 2012).

### II.7.3. Sulfamides hypoglycémiants et glinides :

Les sulfamides hypoglycémiants ou sulfonylurés constituent la famille ayant le plus de représentants parmi lesquels on cite : le glibenclamide, le glibornuride, le gliclazide, le carbutamide. Ils potentialisent l'action insulinosécrétante du glucose, d'où une stimulation de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans non contenue par le niveau glycémique d'où le risque d'hypoglycémie (You et al., 2012).

Les glinides sont actuellement représentés par une unique molécule : le répaglinide, qui est un insulinosécrétagogue oral non sulfamidé à action rapide. Le répaglinide abaisse fortement la glycémie (faible risque hypoglycémique) en stimulant la production d'insuline par le pancréas, cet effet dépend du bon fonctionnement des cellules  $\beta$ .

#### II.7.4. Analogues du GLP1 et inhibiteurs de la DPP4 :

Les analogues du GLP1 et les composés qui prolongent son action composent une nouvelle classe de médicaments anti-diabétiques qui corrigent à la fois le défaut de sécrétion d'insuline et la réduction de la masse de cellules  $\beta$  (Buteau, 2008). Le GLP1 améliore la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, rétablit la compétence au glucose des cellules  $\beta$  résistantes au glucose, stimule l'expression et la biosynthèse d'insuline. Les analogues du GLP1 inhibent également la sécrétion du glucagon et diminuent la vidange gastrique (Gautier *et al.*, 2008).

En raison du fait que le GLP1 est rapidement dégradé par une enzyme la DPP4, son action est trop courte pour qu'il puisse être utilisé à des fins thérapeutiques. Pour éviter cette difficulté, des inhibiteurs de la DPP4 sont utilisés. Les inhibiteurs hautement sélectifs réduisent la dégradation endogène de GLP1, et possédant des effets similaires au GLP1 avec moins d'effets secondaires (Scheen *et al.*, 2007).

#### II.8 .Plantes antidiabétiques :

Pour pallier aux effets secondaires des traitements antidiabétiques, les recherches scientifiques portent sur 1123 plantes utilisées traditionnellement contre le diabète (Raccah, 2004a).

La minorité étudiée concerne les plantes suivantes : *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus*, *Trigonella foenum-greacum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, et autres (Al-Achi, 2005).

Les guanidines furent extraits la première fois à partir de *Galega officinalis*, qui constituent une source naturelle pour la semi-synthèse des Biguanides les moins toxiques que les guanidines (Dey Lucey *et al.*, 2002). D'autres composés végétaux montrent une activité biologique comme :

**Polypeptide p** : composé polypeptidique de *Momordica charantia* qui est une petite plante annuelle, gracile, grimpante qui recouvre le grillage des clôtures ou pousse au bord des chemins dans de nombreux pays tropicaux. La substance active probable est un peptide analogue de l'insuline. Des essais cliniques ont montré que l'administration régulière d'extrait de *Momordica charantia* par voie sous cutanée chez des diabétiques de type1 entraîne une baisse significative de la glycémie (Marles and Farnwork, 1994).

**Charantine** : *Momordica charantia* (Dey Lucey *et al.*, 2002) et *Momordica foetida* (Marles and Farnwork, 1994) contiennent le charantine qui est un hétéroside stéroïdique, leur mécanisme d'action exacte reste inconnu. Des études ont rapporté que le jus de *M.charantia* peut améliorer la

tolérance au glucose chez les diabétiques de type 2 (36) et l'extrait aqueux de *M charantia* diminue la glycémie post prandial avec une réduction du taux HbA1c (Srivastava et al., 1993).

Il Augmente aussi l'utilisation hépatique du glucose et inhibe la néoglucogenèse, il réprime l'insulinorésistance en augmentant le taux de transporteurs membranaire de glucose (Al-Achi, 2005).

**Allyl-propyl disulfide** : dérivés de la cystéine *d'Allium cepa*, ce composé semble agir par compétition avec l'insuline sur son récepteur (Dey Lucey et al., 2002; Marles and Farnwork, 1994).

**Ginsenosides** : est un hétéroside stéroïdique du *Panax ginseng*, cette plante provoque une augmentation du nombre des transporteurs de glucose au niveau du foie avec stimulation de la synthèse de l'insuline (Al-Achi, 2005).

### II.8.1. Cibles thérapeutiques dans le traitement du diabète:

Plusieurs modes d'action des plantes médicinales ayant un effet sur le diabète ont été rapportés suite à des études pharmacologiques. Les plantes médicinales ou leurs extraits utilisés dans le traitement du diabète peuvent agir par différents mécanismes. Certaines plantes ont une action sur les enzymes hépatiques en stimulant la glycogénogenèse et/ou l'inhibition de la glycogénolyse (Kameswara Rao et al., 1999).

D'autres ont une action sur le pancréas par stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules  $\beta$  et/ou induisent également leur régénération ou par action par l'apport d'éléments nécessaires ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) au fonctionnement des cellules  $\beta$ , et également la revitalisation et/ou l'hyperplasie de ces cellules (Akhtar, 1999) .

D'autres encore agissent par inhibition des transporteurs du glucose au niveau de la barrière intestinale limitant ainsi l'absorption intestinale du glucose, ou par stimulation de la captation du glucose par les adipocytes ou les cellules musculaires (Gray and Flatt, 1998) ou par diminution de la sécrétion du glucagon en induisant une diminution de l'absorption intestinale du glucose et/ou une réduction de l'utilisation périphérique du glucose (Dedola et al., 2010).

### II.8.2. Enzymes digestives comme cible thérapeutique :

Les protéines, les glucides et les lipides ingérés sont dégradés en nutriments dans le tube digestif et absorbés par l'intestin grêle. Les nutriments ainsi absorbés sont ensuite distribués dans

l'organisme via la circulation sanguine ou le système lymphatique (Senol dane and Hanninen, 2013). De la bouche à l'anus, la nourriture subit de multiples transformations chimiques et mécaniques, ces organes jouent des rôles particuliers dans la digestion des aliments grâce à leurs mouvements et sécrétions respectifs. Le tableau suivant résume les différentes enzymes agissant sur les nutriments dans plusieurs endroits de tube digestif (Senol dane and Hanninen, 2013).

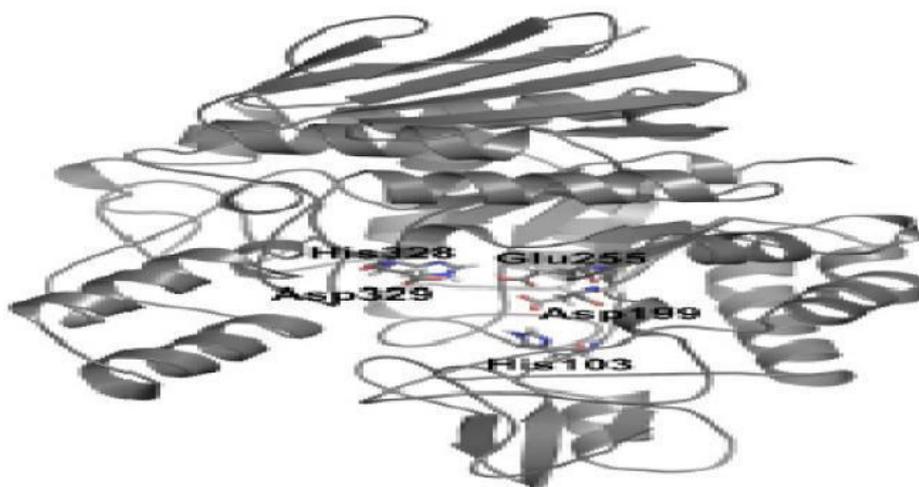
**Tableau V:** Différentes enzymes présentent dans le tube digestif (Senol dane et al., 2013)

Source	Enzyme	Substrat	Action	Produit
Glandes salivaires	Alpha-amylase salivaire.	Amidon	Hydrolyse les liaisons $\alpha$ 1-4	Dextrines, Maltotriose et maltose.
Glandes linguales	Lipase linguale.	Triglycérides	-	Acides gras et 1,2- diacylglycérol
Estomac	Pepsine.	Protéines et polypeptides	Clive les liaisons peptidiques proches des acides aminés aromatiques	Protéoses, polypeptides
	Lipase gastrique.	Triglycérides	Lipolyse	Acides gras et glycérol
Pancréas	Trypsine endopeptidase et Chymotrypsine.	Protéines et polypeptides	Clive les liaisons proches de l'arginine ou lysine	Polypeptides et aminoacides
	Elastase.	Elastines et autres protéines	Clive les liaisons proches des acides aminés aliphatiques	Polypeptides et aminoacides

	Carboxypeptidase A.	Protéines et polypeptides	Clive l'acide aminé C-terminal aromatique ou branché	Polypeptides et aminoacides
	Carboxypeptidase B.	Protéines et polypeptides	Clive l'acide aminé C-terminal possédant des	Polypeptides et aminoacides
	Colipase.	Gouttelettes lipidique	Facilite l'exposition des sites actifs de la lipase pancréatique	-
	Lipase pancréatique.	Triglycérides	Lipolyse	Monoglycérides et acides gras
	Alpha amylase pancréatique.	Amidon	Hydrolyse les liaisons $\alpha$ 1-4	Dextrines, maltotriose et maltose.
	Phospholipase A2.	Phospholipides	-	Acides gras
Muqueuse intestinale	Dipeptidase.	Dipeptides	-	Acides aminés
	Maltase.	Maltose et maltotriose	-	Glucose
	Lactase.	Lactose	-	Galactose et glucose
	Saccharase.	Saccharose	-	Fructose et glucose
	Nucléase et Enzymes reliées	Acides nucléiques		Pentoses et bases purines et pyrimidines

### II.8.2.1. $\alpha$ -glucosidase :

L' $\alpha$ -glucosidase [EC 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glucosidase glucohydrolyse] est une enzyme secrétée par les animaux et les levures. Chez les animaux, elle est située à la surface des villosités de l'intestin grêle, elle transforme les polysaccharides en monosaccharides (**Terra and Ferreira, 1994**). Les  $\alpha$ -glucosidases est un groupe d'enzymes exo-carbohydrolases. Elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides. Les membres de cette classe d'enzymes partagent une capacité de libérer le glucose terminale de l'extrémité non réductrice des polymères de glucides, leurs substrats. La comparaison des structures des différentes glycosidases montre une variabilité significative dans l'ordre des acides aminés et dans la spécificités de ces enzymes vis-à-vis des glucides (**Vanderkraan et al., 1994**). L' $\alpha$ -glucosidase est responsable de l'hydrolyse de la liaison osidique liant les monomères d'oses. L'affinité de l'enzyme varie selon le nombre de monosaccharides, la position de la liaison osidique et la configuration des groupements hydroxyles dans le substrat(**Simone et al., 2010**) .



**Figure 9:** Structure de l'  $\alpha$ -glucosidase de *S. cerevisiae* (**Bharatham et al., 2008**)

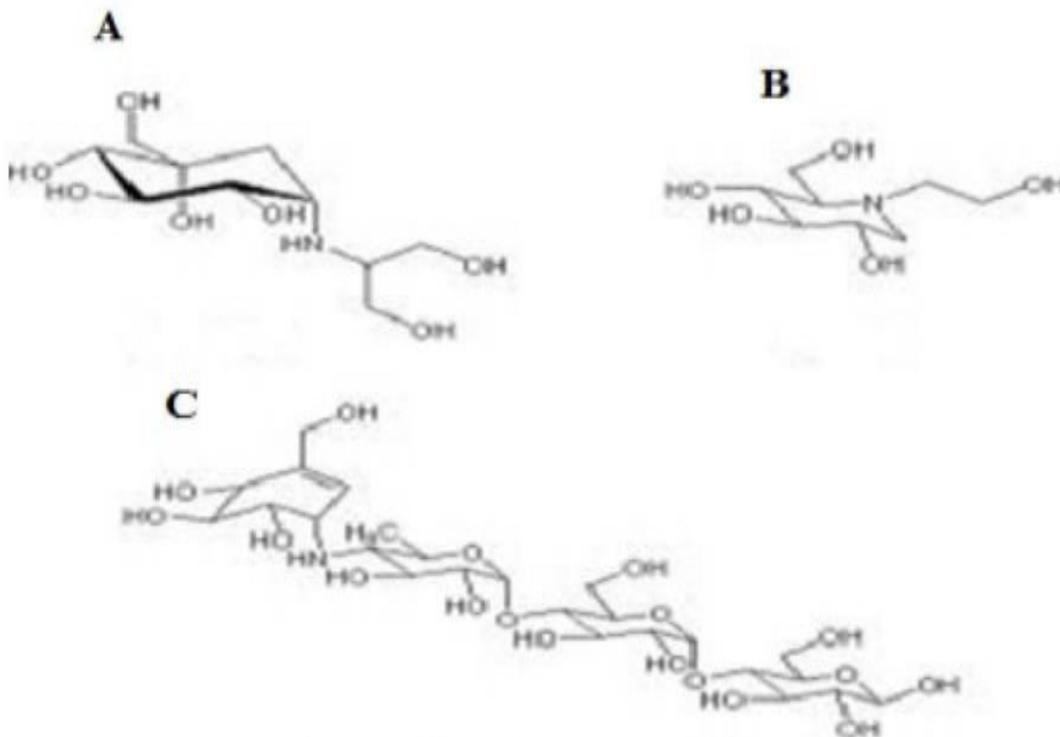
### II.8.2.2. Inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase :

Ce sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles des  $\alpha$ -glucosidases intestinales : ces pseudotétracosaccharides d'origine bactérienne jouent un rôle de faux substrats, retardant ainsi l'hydrolyse des glucides complexes et réduisant l'hyperglycémie postprandiale. Plusieurs inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase ont été mis au point à partir des sources naturelles (**Shim et al., 2003**).

L'acarbose (Glucor®), le miglitol (Diastable®) et le voglibose sont des dérivés de sucres utilisés en médecine pour traiter l'hyperglycémie postprandiale, le HIV et les maladies liées, les dérivés des chalcones sulfonamides sont des inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase de nature non sucrés récemment découverts et les dérivés des immunocyclitols inhibiteurs potentiels avec des activités expérimentales dans l'ordre dans micromolaires (Bharatham et al., 2008) .

L'acarbose (prandase®) est un pseudotétracosaccharides qui diffère des oligosaccharides de notre alimentation par l'attachement d'un groupe aminoglucidique sur le groupe alpha-glucopyranose. Cette molécule se lie sur la bordure des microvillosités de l'intestin grêle ce qui provoque un ralentissement de l'absorption des sucres (Shim et al., 2003).

La fixation de L'acarbose entraine une diminution du pic de production d'insuline secondaire à une concentration de glucose postprandial. Son pic sanguin est atteint au bout d'une heure et sa durée d'action est de 2 heures. L'acarbose est habituellement utilisé en combinaison avec l'insuline chez les diabétiques de type II (Alice et al., 2004) .



**Figure 10 :** Les structures des inhibiteurs de l' $\alpha$ - glucosidase : (A) voglibose, (B) miglitol, (C) acarbose (Lysek et al., 2006).

# Partie expérimentale

# Chapitre III

### III. Matériels et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire pédagogique de biochimie de l'université Ferhat Abbas de Sétif sous la co-direction du Dr Amorouche-Sobhi Widad.

#### III. 1. Matériel :

##### III.1.1. Matériel végétal :

Notre étude est portée sur les extraits aqueux de plantes de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus penia* L., récoltées dans la wilaya de Bejaïa en mars 2017. Seules les graines des deux plantes ont été utilisées lors de la présente étude.

##### III.1.2. Animaux de laboratoire :

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris femelles, *Swiss albinos* dont le poids varie entre 25 et 30g, procurés aux prés de l'Institut Pasteur d' Alger. Les animaux sont hébergés dans des cages, ils sont utilisés après une période d'adaptation de 7 jours, ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

##### III.1.3. Réactifs chimiques :

Les sels utilisés pour la préparation de tampon phosphate :  $\text{Na}_2 \text{H}_2\text{PO}_4$  et  $\text{Na} \text{H}_2\text{PO}_4$ . Eau distillé, DMSO,  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20, G5003), p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucoside (pNPG), acarbose, ethanol, réactif de Folin Cieucalteu, carbonate de sodium (20%), l'acide gallique, chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$ , l'acétate de sodium cristallin, quercètine.

##### III.1.4. Autres matériels :

Le pH mètre, spectrophotomètre, bain marine, vortex, centrifugeuse, sonde de gavage, l'étuve, broyeur électrique, balance électronique,

### III.2. Méthodes :

#### III.2.1. Préparation de la plante :

Les cônes de *Pinus halipensis* Mill. et *Pinus penia* L. ont été cueillies, puis lavées afin d'éliminer toutes traces de poussières et d'impuretés. Elles ont été séchées à l'étuve à une température de  $40^\circ \text{C}$  pendant 48 heures, les deux plantes ont été ensuite broyées à l'aide d'un

broyeur électrique. La poudre obtenue a été conservée dans un récipient en verre et stockées à l'abri de la lumière et de l'humidité.

### III.2.2. Extraction :

La méthode de Ferreira et al. (2006) avec quelques modifications, en utilisant 20 g de chaque poudre de *Pinus penia* L. et *Pinus halepensis* Mill. ont été solubilisés à 200 ml d'eau distillée, le mélange a été mis en température 60 C<sup>0</sup> pendant 15 min après a été soumis à une agitation magnétique, puis on l'a laissé décanter pendant quelques heures.

Ensuite le mélange a été filtré sur papier filtre et débarrassé des cires, des lipides et de la chlorophylle par deux lavages successifs avec de l'hexane. Les deux phases (aqueuse et organique) ont été séparées après décantation. La phase organique a été séchée à l'air libre pendant une journée pour éliminer les lipides et cires.

La phase aqueuse a été reprise avec de l'eau chaude et épuisée avec de l'éther diéthylique pour obtenir les deux phases (aqueuse et éthylique). La phase aqueuse a été lyophilisée, l'extrait sec à conserver.

Le taux d'extraction a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = M_1 / M_0 \times 100$$

M<sub>1</sub> : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M<sub>0</sub> : Masse en gramme du matériel végétale à traiter.

### III.2.3. Dosage des phénols totaux :

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdène-phosphotungstène du réactif de Folin Cieucalteu par les phénols donnant un complexe de couleur bleue dont la concentration peut être suivie par mesure de l'absorbance (Djeridane et al., 2006).

Un volume de 100 µl d'extrait a été mélangé avec 500 µl de réactif de Folin –Cieucalteu dilué à 1/10 et 1ml d'eau distillé. Après agitation et incubation pendant 1 minute à température ambiante, 1.5 ml de carbonate de sodium (20%) a été ajouté et le mélange a été incubé pendant 2h à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance a été ensuite mesurée à 765 nm.

Les concentrations des phénols totaux ont été déterminées en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec calculé en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec l'acide gallique comme phénol standard.

Le taux de phénols totaux a été déterminé selon la formule suivante :

$$TP(mg/g) = \frac{x(mg) \times D}{P_{essai}}$$

**TP**: représente la teneur en phénols totaux, **X**: représente la masse en phénols totaux déterminés à partir de la courbe d'étalonnage, **D**: représente le facteur de dilution, **P<sub>essai</sub>**: représente la masse en gramme de la prise d'essai

#### III.2.4. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode du chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  suivant le protocole de Maksimović et al. (2005) élaboré par Mimica-dukic et al. (1992).

Les flavonoïdes forment des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (133 mg de chlorure d'aluminium cristallin et 400 mg de l'acétate de sodium cristallin ont été dissous dans 100 ml de solvant d'extraction), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont l'absorbance maximale est à 430 nm.

2ml d'extrait méthanolique ont été mélangés avec 1ml de la solution de chlorure d'aluminium. Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes ont été déterminées en **mg** équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec calculées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec la quercétine comme standard.

Le taux de flavonoïdes a été déterminé selon la formule suivante:

$$TF(mg/g) = \frac{x(mg) \times D}{P_{essai}}$$

**TF**: représente la teneur en flavonoïdes, **X**: représente la masse de flavonoïdes déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, **D**: représente le facteur de dilution, **P<sub>essai</sub>**: représente la masse en gramme de la prise d'essai

### III.2.5. Effet des extraits sur l' $\alpha$ -glucosidase :

#### III.2.5.1. Préparation des solutions :

La préparation de l' $\alpha$ -glucosidase et de son substrat le *p*-NPG (*p*-nitrophényl-  $\alpha$ -D-glucopyranoside, sigma) a été réalisé selon la méthode de Kim et al. (2005) avec quelques modifications.

La solution enzymatique ( $\alpha$ -D-glucopyranosidase maltase from yeast, Sigma) à été préparée en solubilisant l'enzyme dans du tampon phosphate (0,1 M, pH= 6,9) à une concentration de 65  $\mu$ g/ml. Le substrat, *p*-NPG a été solubilisé dans le tampon phosphate (0,1M, pH= 6,9) à une concentration de 1,9 mg/ml.

L'extrait a été solubilisé dans du tampon phosphate à une concentration de 2 mg/ml avec l'addition du DMSO à 20% (200  $\mu$ l DMSO/ 800  $\mu$ l tampon phosphate). Des dilutions de 50 :50 ont été réalisées afin d'obtenir une série de dilution : (2 mg/ml, 1 mg/ml, 500  $\mu$ l/ml, 250  $\mu$ g/ml, 125  $\mu$ g/ml, 62,5  $\mu$ g/ml). .

#### III.2.5.2. Procédé expérimentale :

Dans un tube à essai, des concentrations différentes des extraits ont été préparées. Un volume de 130  $\mu$ l de chaque tube a été prélevé et ajouté à 500  $\mu$ l d'enzyme dans un autre tube à essai. Le mélange d'enzyme et d'extrait a été ensuite homogénéisé et incubé à 37 C° pendant 10 minutes. Après incubation, un volume de 130  $\mu$ l de substrat a été ajouté au mélange précédent, et une lecture de l'absorbance à 405 nm par spectrophotomètre a été effectuée immédiatement après l'addition du substrat.

L'activité enzymatique a été obtenue en utilisant un test enzymatique sans extrait.

La lecture effectuée par spectrophotomètre consiste à suivre la cinétique de la réaction enzymatique. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivant :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left( (Abs \text{ control} - Abs \text{ échantillon}) / Abs \text{ control} \right) \times 100$$

### III.2.6. Etude de l'effet de l'extrait aqueux de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. sur la glycémie post- prandiale :

#### III.2.6.1. Animaux et conditions d'hébergement :

Cette étude a été réalisée au laboratoire pédagogique de biochimie de l'Université de Sétif sur des souris *Albinos* femelles fournies par l'Institut Pasteur d'Alger pesant en moyenne 30 g. Les souris été âgées de 2 mois. Tous les animaux été de statut sanitaire EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques).

Dès leur réception, les souris ont été placées aléatoirement en 4 lots contenant 5 souris ; distribués comme suit : 2 lots tests pour les extraits et 1 lot témoin positif (acarbose) et l'autre pour témoins négatif dans des cages standards munies d'une étiquette où est mentionné le nom du lot, pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans les différentes expériences.

Pendant cette période, les animaux ont un accès libre à la nourriture (croquettes provenant de l'ONAB de Béjaïa (Office National des Aliments du Bétail). La salle est maintenue à température constante de  $22\pm 2$  C°. Les autres conditions comme l'éclairage et la ventilation n'ont pas été prises en considération. La litière utilisée est la sciure du bois. Elle est renouvelée chaque jour ou chaque deux jour pour tous les groupes de souris.

Le traitement des animaux selon le lot se résume comme suit

- Animaux traités avec l'extrait d'*Pinus pinea* L. +glucose.
- Animaux traités avec l'extrait d'*Pinus halepensis* Mill. +glucose.
- Animaux traités avec l'eau physiologique + glucose.
- Animaux traités avec Acarbose +glucose.



**Figure 11:** gavage gastrique des solutions préparées .

### III.2.6.2.Procédé expérimentale :

Les prélèvements et les dosages de la glycémie ont été effectués aux intervalles de temps suivants :

$G_0$  = Glycémie g/L à jeun

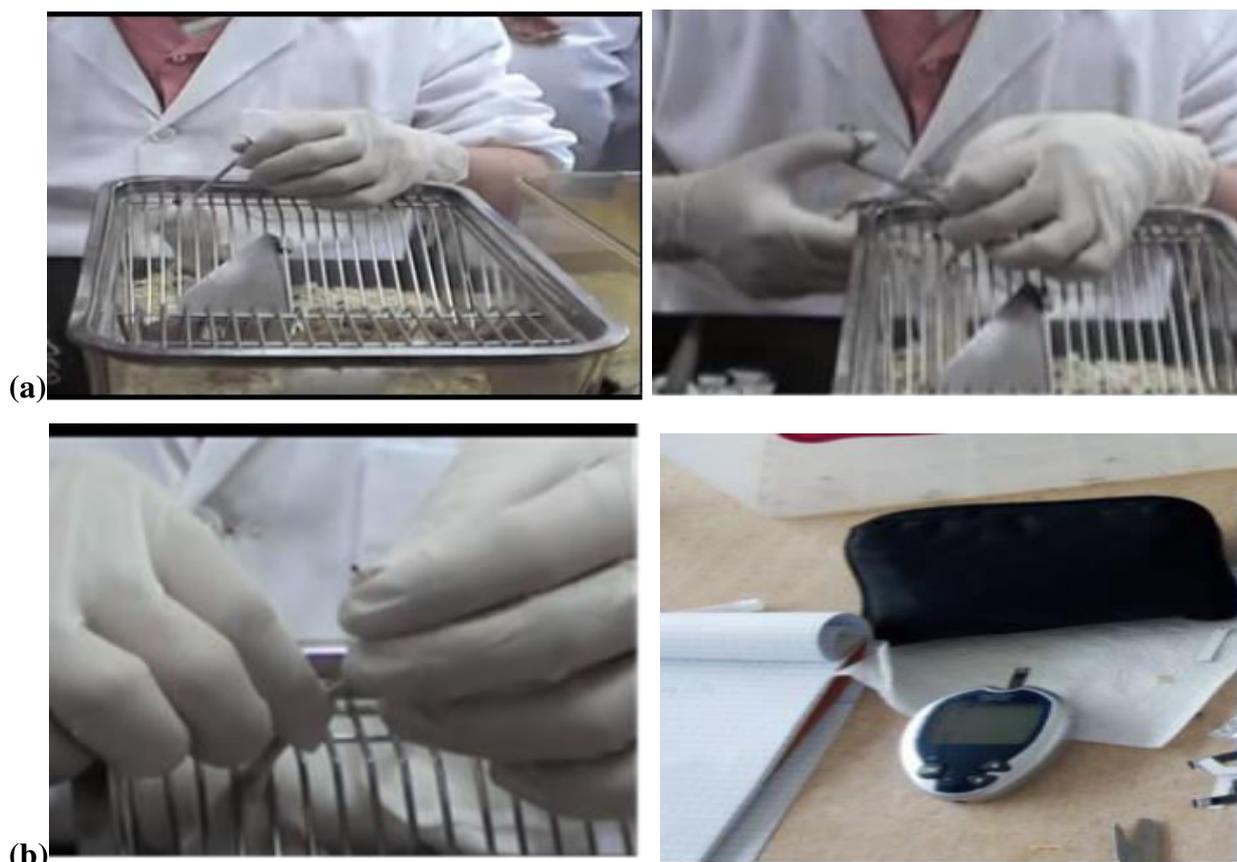
$G_{30}$  = Glycémie g/L à 30 min.

$G_{60}$  = Glycémie g/L à 60 min

$G_{120}$  = Glycémie g/L à 120min.

La prise de sang se fait par incision au niveau de la veine de la queue sur les souris non anesthésiées. Les différents prélèvements sont effectués en utilisant une seringue stérile.

La glycémie a été mesurée à jeun à l'aide d'un glucomètre OneTouch® en utilisant des bandelettes de la marque OneTouch®.



(a) : la prise du sang par incision au niveau de la veine de la queue . (b) : mesure de la glycémie par glucomètre

**Figure12** : Mesure de la glycémie après la prise du sang par incision au niveau de la veine de la queue sur les souris non anesthésiées.

La veille de l'étude *in vivo*, tous les animaux ont été mis à jeun ( $G_0$ ). En leur laissant un accès libre pour l'eau. La durée de la mise à jeun a été d'environ 18 h. Au début du test, la glycémie a été mesurée à jeun. Les extraits ont été administrés par gavage intra-gastrique on utilisant une sonde gastrique. 5 min après, la solution de glucose a été introduite.

La glycémie a été mesurée après 30, 60 et 120 min. Le groupe 3 (Témoin) a été traité uniquement avec de l'eau physiologique à la place de l'extrait. Le dernier groupe (le groupe 4) a été traité avec de l'acarbose. Le schéma expérimental est présenté dans le tableau ci-dessous :

**Tableau VI**: Schéma expérimentale de l'étude *in vivo*.

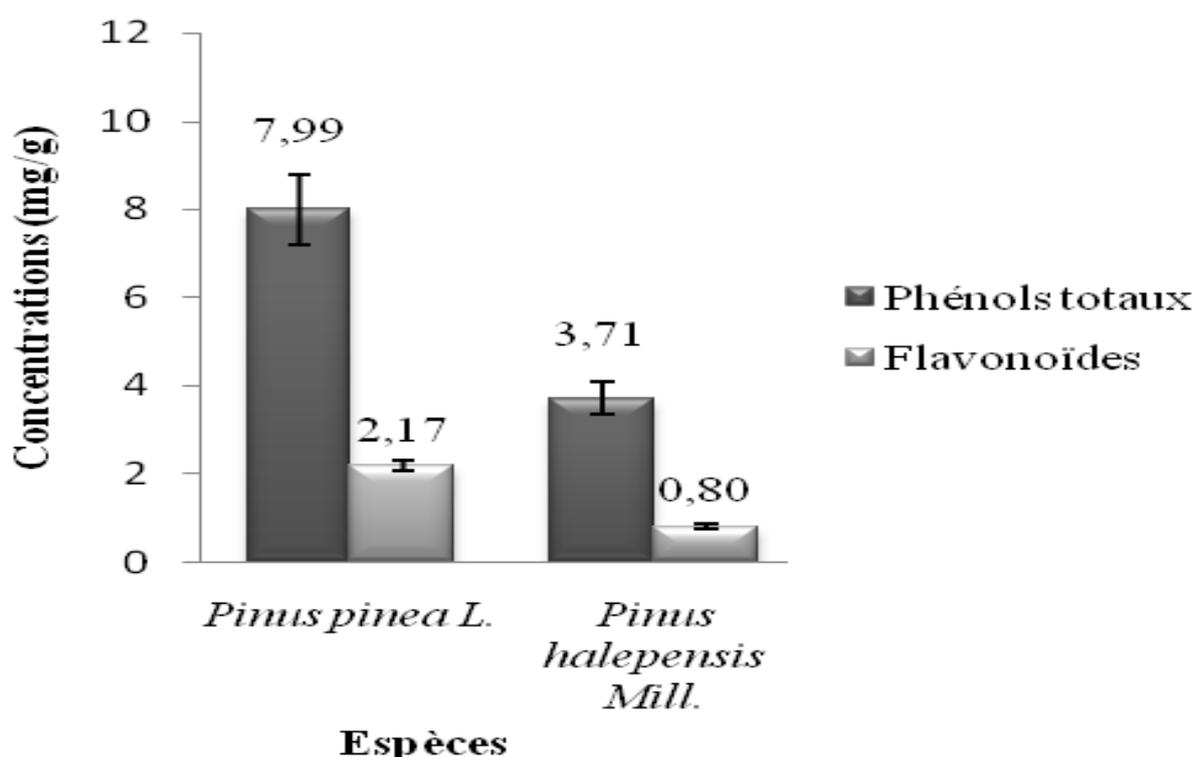
<b>Lot 1 : Glucose.</b>	<b>Lot 2 : Extrait de <i>Pinus pinea</i> L. (36mg/ml Ep).</b>	<b>Lot 3 : Extrait de <i>Pinus halepensis</i> Mill. (36mg/ml)</b>	<b>Lot 4 : Acarbose.</b>
500 $\mu$ l d'Eau physiologique après 5 min : gavage de 500 $\mu$ l du glucose (2 g/kg).	500 $\mu$ l d'extrait de <i>Pinus pinea</i> L. (600 mg/kg) après 5min gavage de 500 $\mu$ l du glucose	500 $\mu$ l d'extrait de <i>Pinus halepensis</i> Mill. (600 mg/kg) après 5min gavage de 500 $\mu$ l du glucose	500 $\mu$ l d'acarbose (25 mg/kg) après 5min gavage de 500 $\mu$ l du glucose (2 g/kg).

# Chapitre IV

#### IV. Résultats et discussion:

##### IV.1.Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes:

Le taux des phénols totaux et de flavonoïdes dans l'extrait des graines du genre *Pinus* varie d'une espèce à l'autre (**Figure 13**). Les taux les plus élevés en composés phénoliques totaux ont été détectés dans les graines de *Pinus pinea*L. (7,99 mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec). Par contre, les graines de *Pinus halepensis* Mill.contiennent le taux le plus faible (3.71 mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec).



**Figure 13:** taux des phénols totaux et de flavonoïdes dans l'extrait des graines du genre *Pinus*.

Par comparaison aux résultats donnés par l'équipe Nasri et al. (2004) qui a montré que les graines de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. cultivées en Tunisie représentent 0.26 et 0.23 mg/g de poudre respectivement, on en déduit que les mêmes espèces de graines cultivées au Nord d'Algérie sont beaucoup plus riches en composés phénoliques avec (3.71 mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec et 7.99 mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec) si on tient compte des conditions climatiques qui se ressemblent entre les deux pays. Les résultats de Haddada et al. (2007) Zarrouk et al. (2008) confirment l'influence de la variété sur la composition quantitative en composés phénoliques dans l'huile d'olive.

Si on compare, le taux de flavonoïdes mesuré avec ceux des phénols totaux, on en déduit que les graines des deux espèces sont constituées majoritairement d'acides phénoliques.

Le rapport taux de flavonoïdes/taux de polyphénols des graines de deux espèces, montre que la fraction de flavonoïde la plus élevée est celle de *P. halepensis* Mill., par rapport à *P. pinea* L.

On peut considérer, d'après la moyenne de la consommation des flavonoïdes par l'être humain à 100 voir 1000 mg/jour que les deux graines étudiées sont une bonne source en flavonoïdes .

### IV.3. Evaluation l'effet inhibiteur de la glycémie post-prandiale des extraits aqueux des graines de *P. halepensis* Mill., et *P. pinea* L.

L'évaluation du potentiel inhibiteur des extraits aqueux récupérés à partir des graines de *P. halepensis* Mill., et *P. pinea* L. a été réalisée en se référant à deux tests principaux : l'inhibition de l'enzyme principale qui intervient dans la dégradation du glucose ( $\alpha$ -glucosidase), et dosage de la glycémie à des temps bien déterminées allant de 0 à 120 min d'alimentation *in vivo* sur des souris *Swissalbinos*.

#### IV.3.1. Effet des extraits sur l'alpha-glucosidase :

L'étude de l'effet des extraits flavonoïdiques de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. sur l' $\alpha$ -glucosidase a été réalisée selon la méthode de Kim et al. (2005).

On comparant avec le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase, par l'acarbose c'est le contrôle positif de l'inhibition de l'enzyme à faible dose.

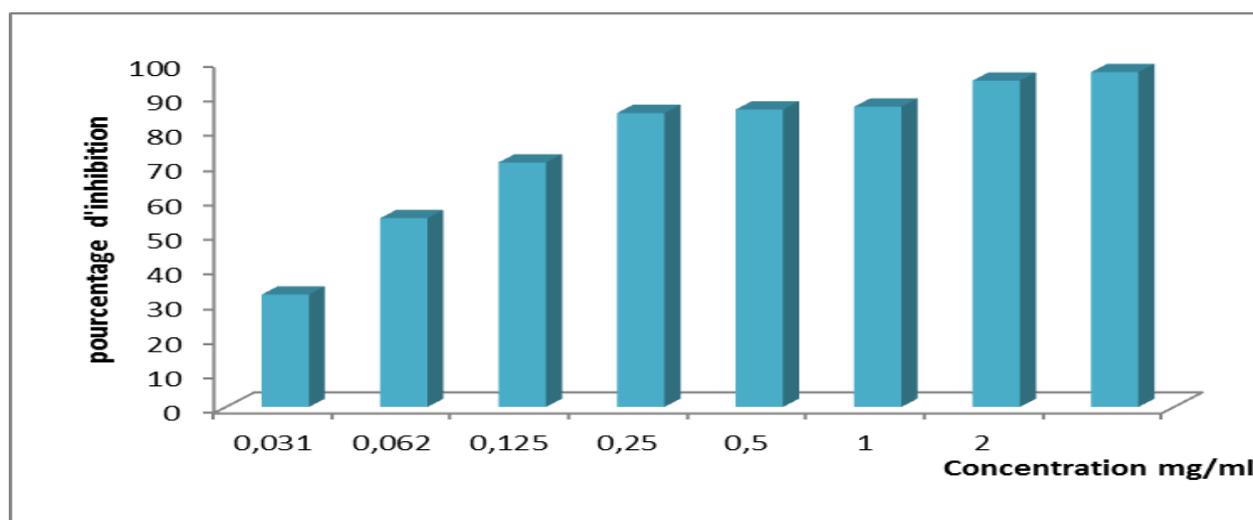
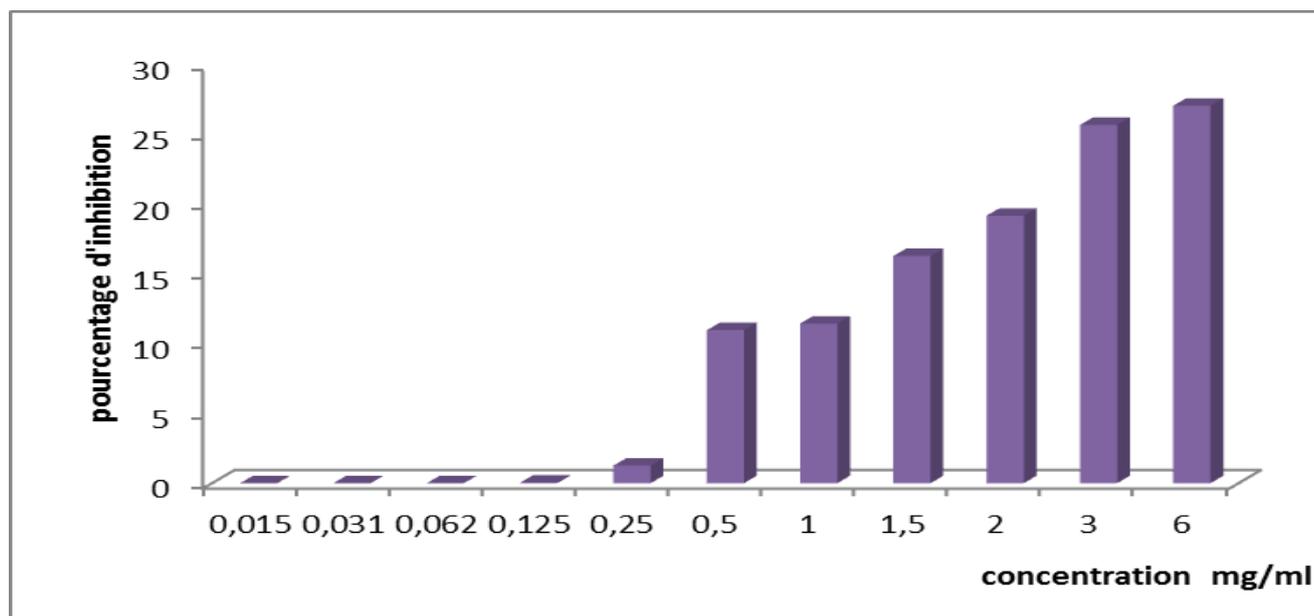


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par l'acarbose

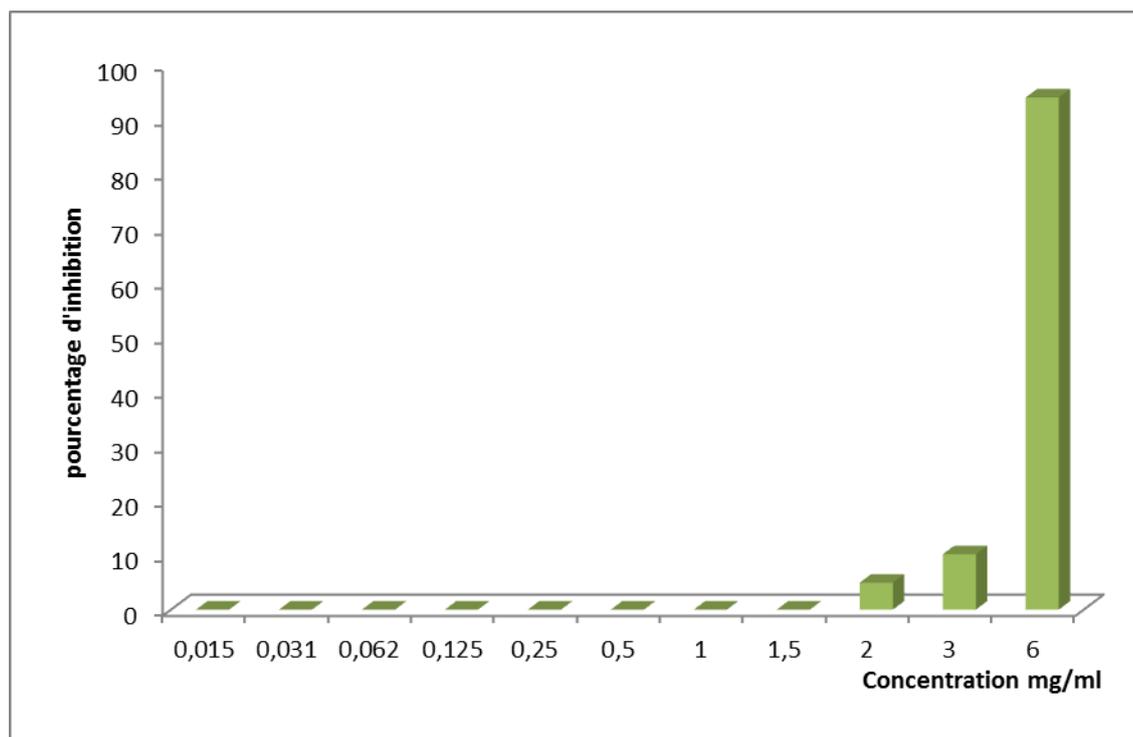
La **figure 15** présente le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase, par l'extrait de *Pinus halepensis* Mill. À différentes concentrations.



**Figure15:** Pourcentage d'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase par l'extrait de *Pinus halpensis* Mill.

Les résultats montrent que l'effet inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase par les extraits aqueux de *Pinus halepensis* Mill. est dépendant de la concentration. La plus forte concentration étant de 6mg/ml, présente un taux d'inhibition enzymatique de 27,08% de l'enzyme et la plus faible concentration testée (0,015 mg/ml) ne présente aucun effet inhibiteur apparent.

La concentration qui donne un début de l'effet inhibiteur de 2% est de 0,25mg/ml. Cet effet inhibiteur maximal est largement inférieur à celui trouvé pour l'extrait aqueux de *Pinus pinea* L. ou on observe une inhibition qui atteint un taux de 94,01% (**Figure 16**).



**Figure16:** Pourcentage d'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase par l'extrait de *Pinus pinea*L .

Les résultats montrent que l'effet inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase par les extraits aqueux de *Pinus pinea*L. est aussi dépendant de la concentration. En outre, la plus faible concentration testée (0,015 mg/ml) ne présente aucun effet inhibiteur mais le début de l'activité inhibitrice est observé à la concentration de 2mg/ml. L'inhibition maximale observée de l'enzyme (94,01%) est atteinte à la même concentration de 6mg/ml.

Les effets inhibiteurs l'alpha glucosidase observés peuvent s'expliquer d'une part, par la présence excessive de flavonoïdes car l'effet principale de l'inhibition peut être justifié par la forte teneur en flavonoïdes présents dans les graines de *Pinus* étudiées, particulièrement *Pinus Pinea* L. avec 2, 17%. Les effets des flavonoïdes sur l' $\alpha$ -glucosidase ont fait l'objet de plusieurs études. **Tadera et ses collaborateurs, 2006 et Wang et ses collaborateurs (2010)** montrent que de nombreux flavonoïdes inhibent cette enzyme expliquent l'effet de ces flavonoïdes par la fixation et la formation de complexe avec l' $\alpha$ -glucosidase (**Heo et al., 2009**).

Dans une étude plus récente, (**You et al., 2012**) démontrent que les flavonoïdes: la catéchine, la quercétine et l'acide ellagique inhibent l' $\alpha$ -glucosidase selon un mode compétitif.

D'autres part, les concentrations inhibitrice moins de 50% ( $IC_{50}$ ) de l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase *in vitro* par les deux extraits de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. indiquent ces deux

extraits ne présentent pas vraiment une inhibition significative de l'enzyme vu les concentrations importantes testées qui sont de l'ordre de mg/ml. L'inhibition de l'enzyme par les extraits aqueux de *Pinus pinea* L. à une concentration de 6mg/ml qui est de 94,01% peut être expliquée par une forte concentration de l'extrait qui bloque presque la totalité des sites actifs de l'enzyme.

### IV.3.2. Etude de l'effet des extraits, *Pinus pinea* L. et *Pinus halepensis* Mill. sur la glycémie post-prandiale :

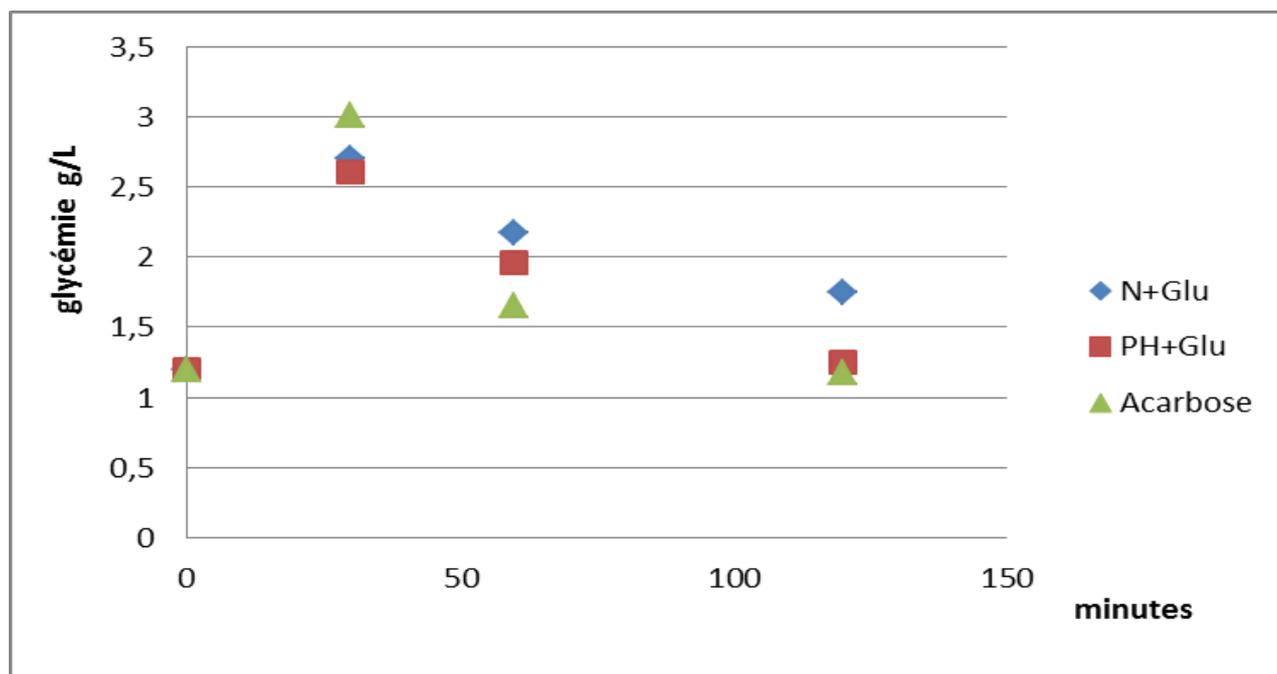
L'un des aspects auxquels nous nous sommes intéressés dans cette étude est la glycémie post-prandiale. Ce paramètre s'avère important, car l'augmentation du taux de glucose après les repas est l'une des causes principales des problèmes associés au diabète.

La recherche d'inhibiteurs des alpha-glycosidases intestinales est une approche incontournable pour le contrôle de la glycémie post-prandiale et les complications qu'elle entraîne.

L'acarbose ( $C_{25}H_{43}NO_{18}$ ), tetraholoside, est un antidiabétique commercial utilisé pour le traitement du diabète de type 2. C'est un inhibiteur des enzymes glycosides hydrolases nécessaires à la digestion des carbohydrates (sucres), notamment l' $\alpha$ -glucosidase intestinale et l'alpha-amylase pancréatique.

Ces enzymes hydrolysent les oligosaccharides, trisaccharides et disaccharides en glucose et autres monosaccharides au niveau de l'intestin grêle. L'inhibition de ces enzymes réduit la digestion des complexes carbohydratés.

L'étude de l'effet post-prandial des extraits a été évaluée avec une concentration de 600 mg/kg, laquelle a été administrées aux souris, préalablement mises à jeun par gavage gastrique. Les résultats sont présentés sur les **figures 17 et 18**.



**Figure 17 :** Inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale de l'extrait *Pinus halepensis* Mill. (600 mg/kg) chez les souris normales.

Après traitement des différents lots de souris, les glycémies évoluent en fonction de temps comme suit :

**À t 0 min :** Toutes les glycémies à jeun sont normales 1,2g/L.

**À t 30 min :** Soit 30 min après l'administration de l'extrait suivie de l'administration de glucose à 2g/kg, la glycémie des 3 groupes évolue différemment. Le groupe non traité (glucose unique) affiche une augmentation de la glycémie 2,71 g/L. Cette élévation se traduit par le passage du glucose par la lumière intestinale, conséquence d'une digestion du glucose par l' $\alpha$ -glucosidase et libération de ce dernier dans la circulation sanguine.

La glycémie dans le groupe traité par l'acarbose évolue ( $G_0=1,2$ g/l ;  $G_{30}=3,01$  g/L) et ceux traité par les extraits de *Pinus halepensis* Mill. évolue ( $G_0= 1,2$  g/L ;  $G_{30}= 2,61$  g/L).

Le groupe traité avec l'extrait *Pinus halepensis* Mill. présente un effet positif sur la glycémie post-prandiale car il permet de maintenir une glycémie de (2,61g/L) soit nettement inférieure à celle observée chez les souris normales ayant ingéré uniquement le glucose (2,71g/L).

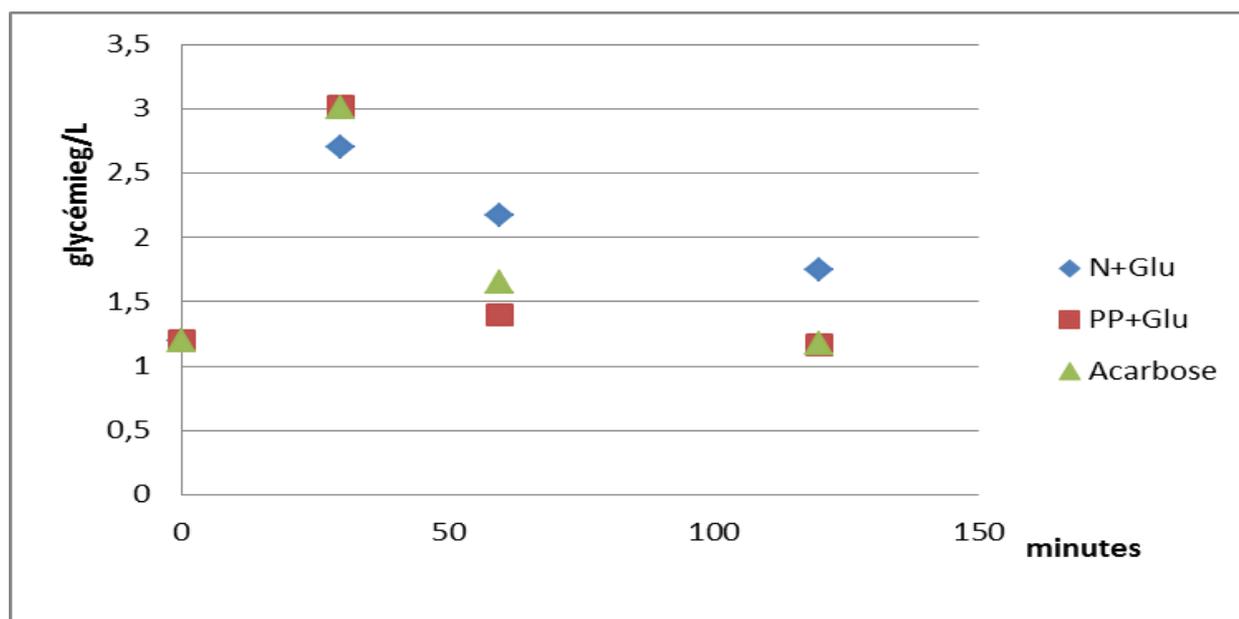
**À t 60 min :** Les glycémies des groupes traités par l'acarbose et par l'extrait de *Pinus halepensis* Mill. sont stables par rapport à leurs valeurs à 30 min. Le groupe traité uniquement par le glucose donne une diminution de la glycémie 1 heure après l'administration de ce sucre, ce qui peut être expliqué par le fait que ces souris sont normales,

d'oula régulation normale de la glycémie après 60 min.

Le groupe traité avec l'extrait *Pinus halepensis* Mill. présente un effet positif sur la glycémie post-prandiale car il permet de maintenir une glycémie de (1,96 g/L) soit nettement inférieure à celle observée chez les souris normales ayant ingérés uniquement le glucose (2,17 g/L) et inférieure à celle observée chez les souris traitées par l'Acarbose (1,65 g/L).

**À t 120 min :** On constate que le groupe traité par l'acarbose garde toujours une glycémie basse stable (effet de l'acarbose dans le temps), ce qui confirme l'effet post-prandiale de l'acarbose comme un médicament type (1,18 g/L). L'extrait de *Pinus halepensis* Mill. diminue la glycémie jusqu'à 1,25 g/L, les souris traitées uniquement par le glucose ont une glycémie plus forte (1,75 g/L).

L'effet inhibiteur de la glycémie post prandiale observé sur des groupes de souris traités par les extraits de *Pinus pinea* L. est nettement supérieur à celui observé pour les groupes de souris traités par les extraits aqueux de graines de *Pinus halepensis* Mill. (**Figure 17**)



**Figure 18 :** Inhibition de la glycémie post prandiale de l'extrait *Pinus pinea* L. (600 mg/kg) chez les souris normales.

**À t 0 min :** Toutes les glycémies à jeun sont normales 1,2 g/l.

**À t 30 min :** Soit 30 min après l'administration de l'extrait *Pinus pinea* L. suivie de l'administration de glucose à 2 g/kg, la glycémie des 3 groupes évolue différemment.

Le groupe non traité (glucose unique) affiche une augmentation de la glycémie 2,71 g/L. Cette élévation se traduit par le passage du glucose par la lumière intestinale, conséquence

d'une digestion du glucose par l'alpha-glucosidase et libération de ce dernier dans la circulation sanguine.

La glycémie dans le groupe traité par l'acarbose évolue ( $G_0=1,2$  g/L;  $G_{30}=3,01$ g/L) et ceux traités par l'extrait de *Pinus pinea* L. évolue ( $G_0=1,2$ g/L ;  $G_{30}=3,02$ g/L) de la même manière.

**À t 60 min** : Les glycémies des groupes traitées par l'acarbose et par l'extrait de *Pinus pinea* L. sont stables par rapport à leurs valeurs à 30 min. Le groupe traité uniquement par le glucose donne une diminution de la glycémie 1 heure après l'administration de ce sucre, ce qui peut être expliqué par le fait que ces souris sont normales, d'où la régulation normale de la glycémie après 60 min.

Le groupe traité avec l'extrait *Pinus pinea* L. présente un effet positif sur la glycémie post-prandiale car il permet de maintenir une glycémie de (1,40g/L) soit nettement inférieur à celle observée chez les souris normales ayant ingérés uniquement le glucose (2,71g/L) et inférieure à celle observée chez les souris traitées par l'Acarbose (1,65g/L).

**À t 120 min** : On constate que le groupe traité par l'acarbose garde toujours une glycémie basse stable (effet de l'acarbose dans le temps), ce qui confirme l'effet post-prandiale de l'acarbose (1,18g/L) comme un médicament type. L'extrait de *Pinus pinea* L. diminue la glycémie jusqu'à 1,17g/L, les souris traités uniquement par le glucose ont une glycémie plus forte (1,75g/L).

De ce qui précède, il en sort que :

L'effet d'extrait de *Pinus pinea*L. est significativement positif et plus que l'effet d'extrait *Pinus halepensis*Mill .ce qui confirme les résultats trouvés sur l'inhibition de la alpha glucosidase. Le tableau 7 résume l'effet inhibiteur comparatif entre les deux extraits des deux graines.

**Tableau VII** : Effet des extrais sur la glycémie.

Espèces	$\Delta G$ 30	$\Delta G$ 60	$\Delta G$ 120
<i>Pinus halepensis</i> Mill 500mg/kg	2.61g/L	1.96 g/L	1.25 g/L
<i>Pinus pinea</i> L. 500mg/kg	3.02g/L	1.4g/L	1.17 g/L

Le but du traitement dans le cas du diabète est de maintenir une glycémie proche de la normale à jeun et post-prandiale. Dans cette étude, nous avons testé l'effet inhibiteur des extraits aqueux de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. contre l' $\alpha$ glucosidase pour élucider la possibilité de leur utilisation comme un agent anti-hyperglycémique et leur activité inhibitrice contre l' $\alpha$ glucosidase par rapport à l'inhibiteur commerciale de cette enzyme, l'acarbose.

Les résultats indiquent que l'extrait de *Pinus pinea*L. peut ralentir l'absorption de sucres dans l'intestin et évite l'augmentation de la glycémie post-prandiale plus que l'extrait de *Pinus halepensis*Mill. Etant donné que les deux extraits n'ont pas vraiment d'effet inhibiteur sur l' $\alpha$ glucosidase, la diminution de la glycémie post prandiale observée pour les deux extraits aqueux de graines testés est probablement due à un mécanisme d'action différent au mécanisme enzymatique testé ou ils peuvent agir sur les différents récepteurs hormonaux.

Vu que les graines des deux pinacées présentent une teneur non négligeable en flavonoïdes particulièrement *Pinus pinea* L. Les résultats trouvés sur l'effet hypoglycémiant post prandiale *in vivo* va dans le même sens que ceux trouvés sur l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase *in vitro*. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études menées sur l'effet des flavonoïdes des autres plantes antidiabétiques comme l'*Ajugaiva* sur la glycémie post-prandiale.(**El-Hilaly et al., 2004**)ont montré que l'extrait aqueux d'*Ajugaiva*testé chez les rats diabétiques réduit significativement la glycémie post-prandiale. Dans une autre étude, (**Chongming et al., 2012**)ont montré que les flavonoïdes exercent un effet inhibiteur sur la glycémie post-prandiale chez les souris normales.

# Conclusion

### Conclusion :

La présente étude a été portée sur les extraits aqueux des graines de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L., utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'extraction des polyphénol totaux, des flavonoïdes et leur dosage, et évaluation de leur activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase *in vitro* et hypoglycémique post prandiale *in vivo*.

Les taux les plus élevés en composés phénoliques totaux ont été détectés dans les graines de *P. pinea* L. (7,99 mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec) par contre, les graines de *P. halepensis* Mill. contiennent le taux le plus faible (3.71 mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec). Le rapport taux de flavonoïdes/taux de polyphénols des graines de deux espèces, montre que la fraction de flavonoïde la plus élevée est celle de *P. halepensis* Mill., par rapport à *P. pinea* L. On peut considérer, d'après la moyenne de la consommation des flavonoïdes par l'être humain que les deux graines étudiées sont une bonne source en flavonoïdes.

Les extraits de *P. halepensis* Mill. et *P. pinea* L. ; ont été testés *in vitro* sur l'inhibition d' $\alpha$ - glucosidase et les résultats montrent un effet inhibiteur peu significatif. L'étude *in vivo* menée sur les souris *Swiss albinos* confirme l'effet bénéfique sur la glycémie post- prandiale. L'effet le plus important sur l'activité anti-hyperglycémique a été observé pour l'extrait *P. pinea* L. à la dose de 500 mg/kg par apport au l'extrait de *Pinus halepensis* Mill.

En perspective, il serait intéressant de donner suite à ce travail en

- Testant la toxicité des extrait et déterminer la dose létale.
- Purifiant les extraits pour mettre en évidence toutes les molécules actives agissant sur l'activité anti-hyperglycémique ;
- Pratiquant une étude histologique et enzymologique pour explorer le mécanisme d'action de ces extraits sur le diabète et définir le site d'action

# Références bibliographiques

- **Abner, L.N., 2002.** Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *Biol Chem Biodivers* 277, 43545-43548.
- **Abulafia-lapid, R., Elias, D., Raz, I., Keren-Ur, Y., Atlan, H., Cohen, I.R., 1999.** T cell proliferative responses of type1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. 12, 121-129.
- **Akhtar, M., 1999.** Plant growth and nematododynamics in response to soilamendments with neemproducts, urea and compost. *Bioresource Technology* 69, 181- 183.
- **Al-Achi, A., 2005.** Herbs that affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care* 8(7), 325-330.
- **Alice, P., Cheng, M.D., Frcpc., Robert, G., Josse, M.F., 2004.** Les inhibiteurs de l'absorption intestinale dans la prévention et le traitement du diabète de type 2, Conférence scientifique, endocrinologie, Volume 4, numéro7.
- **American Diabtes Association 2010.** Standars of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*,33(1 suppl) S11-4.
- **Bernheim, P., Bastard, J.-C., Brack, M., Carrare, I., Fanton, B., Giusti, V., Pampurik, J., Philippe, J., von der Weid, N., Ceriello, A., Colagiuri, S., 2008.** Essentielles, le magazine de la pharmacie principale., numéro 47.
- **Bharatham, K., Bharatham, N., Park, K.H., Lee, K.W., 2008.** Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26, 1202-1212.
- **Boudiba, A., Mimouni-Zerguini, Safia, 2008.** Améliorer la prévention et les soins du diabète en Algérie. *Diabetes voice* Vol 53. numéro2.
- **Bouguerra, R., Alberti, H., Salem, L.B., Rayana, C.B., Atti, J., Gaigi, S., Slama, C.B., Zouari, B., Alberti, K., 2007.** The global diabetes pandemic: the Tunisian experience. *European journal of clinical nutrition* 61, 160-165.
- **Buyschaert, M., 2006.** Diabétologie clinique, 3ème Ed. ed. De Boeck P: 4-5-12.

- **Calop, J., Limat, S., Fernandez, C., 2008.** pharmacie clinique et thérapeutique, 3ème ed. Masson, Paris p:417-427.
- **Cefalu, W.T., 2006.** Animal Models of Type 2 Diabetes: Clinical Presentation and Pathophysiological Relevance to the Human Condition. ILAR Journal Volume 47, Number 3. PP : 186-198.
- **Chevenne, D., Fonfrède, M., 2001.** Actualité sur les marqueurs biologiques du diabète. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée 16, 215-229.
- **Chongming, W., Shen, J., He, P., Chen, Y., Li, L., Zhang, L., Li, Y., Fu, Y., Dai, R., Meng, W., 2012.** The  $\alpha$ -glucosidase inhibiting isoflavones isolated from *Belamcanda chinensis* leaf extract. Rec Nat Prod 6, 110-120.
- **Dedola, S., Hughes, D.L., Nepogodiev, S.A., Rejzek, M., Field, R.A., 2010.** Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -d-glucopyranosyl triazoles by CuAAC 'click chemistry': reactant tolerance, reaction rate, product structure and glucosidase inhibitory properties. Carbohydrate research 345, 1123-1134.
- **DeFronzo, R.A., 1997.** metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes, in: Rev, D. (Ed.), Pathogenesis of type 2 diabetes, pp. 877-894.
- **Dey Lucey, M.D., Anaja, S., Attele, D.D.S., Chun-SuYuan, M.D., 2002.** Alternative therapy for type 2 diabetes. Alternative Medecine Review. 7(1). PP:45-48.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food chemistry 97, 654-660.
- **Drouin, P., Blickle, J., Charbonnel, B., Eschwege, E., Guillausseau, P., Plouin, P., Daninos, J., Balarac, N., Sauvanet, J., 2008.** Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères.
- **El-Hilaly, J., Lyoussi, B., Wibo, M., Morel, N., 2004.** Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. Journal of ethnopharmacology 93, 69-74.

- **Ferreira, A., Batra, R., Roque, C., Qian, L., Jorge, R., 2006.** Natural frequencies of functionally graded plates by a meshless method. *Composite Structures* 75, 593-600.
- **Franc, S., 2010.** Génétique du diabète de type 2: comment évaluer l'héritabilité de la capacité sécrétoire de la cellule  $\beta$ ? *Diabetologia Notes de lecture* 2, 11-12.
- **Gray, A., Flatt, P., 1998.** Insulin-releasing and insulin-like activity of *Agaricus campestris* (mushroom). *Journal of Endocrinology* 157, 259-266.
- **Haddada, F.M., Manai, H., Oueslati, I., Daoud, D., Sánchez, J., Osorio, E., Zarrouk, M., 2007.** Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 10941-10946.
- **HAS, 2007.** Diabète de type 1 de l'adulte et Diabète de type 2. Guides médecin.
- **Heo, S.-J., Hwang, J.-Y., Choi, J.-I., Han, J.-S., Kim, H.-J., Jeon, Y.-J., 2009.** Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European journal of pharmacology* 615, 252-256.
- **Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., Montero, J.-L., 2014.** Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial Crops and Products* 54, 6-12.
- **Kadri, N., Bachra, K., Yasmine, A., Souraya, K., Widad, S., Veronique, B.-M., 2015.** Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food Chemistry* 188 184–192.
- **Kameswara Rao, B., Kesavulu, M.M., Giri, R., Appa Rao, C., 1999.** Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica cymbalaria* Hook. Fruit powder in alloxan-diabetic rats *Vol* 67,103–109.
- **Kim, Y.-M., Jeong, Y.-K., Wang, M.-H., Lee, W.-Y., Rhee, H.-I., 2005.** Inhibitory effect of pine extract on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 21, 756-761.

- **Lucienne, A., 2010.** Les plantes médicinales d'Algérie, Betri 2<sup>ème</sup> ed, Alger .
- **Lysek, R., Schutz, C., Favre, S., O-Sullivan, A., Pillonel, C., Krulle, T., Jung, P., Clotet-Codina, I., Este JA, V.P., 2006.** new N-substituted valienamine and conduramine F-1 derivatives, Search for alpha-glucosidase inhibitors, pp. 6255-6282.
- **Magis, D., Geronooz, I., Scheen, A., 2002.** Tabagisme, insulinoresistance et diabete de type 2. Revue Médicale de Liège 57, 575-581.
- **Maksimović, Z., Malenčić, Đ., Kovačević, N., 2005.** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. Bioresource Technology 96, 873-877.
- **Mario, N., Lasnier, E., 2006.** Les difficultés d'interprétation du dosage de l'hémoglobine A1c. Revue Francophone des Laboratoires 2006, 39-43.
- **Marles, R.J., Farnwork, N.R., 1994.** Plants as sources antidiabeticagents. Ed con Med Plant Res;PP:179-187.
- **Mimica-Dukic, N., Gasic, O., Adamovic, D., 1992.** Variability of content and composition of essential oil of different *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* cultivars. Journal of Essential Oil Research 4, 49-56.
- **Nasri, N., KHALDI, A., TRIKI, S., 2004.** Variabilité morphologique des cônes et graines de pin d'Alep et pin pignon en Tunisie. Revue forestière française 56, 22-28.
- **Nelson, D.L., Cox, M., 2004.** Lehninger Principles of Biochemistry, Ed. W H Freeman and Co. Ltd, 4<sup>th</sup> edition ed, Newyork.p. 881-901.
- **Oberley, L.W., 1988.** Free radicals and diabetes. 5: 113-124.
- **Ongagna, J.C., Sapin, R., 2004.** Diabète de type 1 et autoimmunité. biotribune 9, P: 42-43.
- **Oubré, A.Y., Carlson, T.J., King, S.R., Reaven, G.M., 1997.** From plant to patient: anethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. 40,614–617.
- **Perlemuter, L., Collin de l'Hortet, G., Sélam, J.L., 2003.** Diabète et maladies métaboliques, 3<sup>ème</sup> ed, Paris.

- **Peter-Riesch, B., Philippe, J., Stalder, H., 2002.** Découverte d'un diabète sucré. *PrimaryCare* 2:284–290.
- **Raccah, D., 2004.** Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. 29-42.
- **Raccah, D., 2004.** Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie* 1, 29-42.
- **Raverot, G., 2005.** Diabète sucré de types 1 et 2 de l'enfant et de l'adulte. Hippocrate, Paris.
- **Rodier, M., 2001.** Le diabetes de type1. *Med Nucl.*25, 95-101.
- **Senol dane, Hanninen, O., 2013.** Physiology and maintenance. *Enzyme of digestion* II.
- **Shim, Y.-J., Doo, H.-K., Ahn, S.-Y., Kim, Y.-S., Seong, J.-K., Park, I.-S., Min, B.-H., 2003.** Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of ethnopharmacology* 85, 283-287.
- **Simone, D., David, L., Hughes., Sergey, A., Nepogodiev, R., M., Robert, A., Field., 2010.** Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucopyranosyl triazoles by CuAAC 'click chemistry': reactant tolerance, reaction rate, product structure and glucosidase inhibitory properties. *Carbohydrate research* Vol 345,1123-1134.
- **Spinas, G., Lehmann, R., 2001.** Diabète sucré: diagnostic, classification et pathogénese. *Abteilung Endokrinologie und Diabetologie* 20, 519-525.
- **Srivastava, Y., Venkatakrishna-Bhatt, H., Verma, Y., 1993.** Antidiabetic and adaptogenic properties of *Momorica charantia* extract. An experimental and clinical evaluation *Phytother Res.* 7,285-289.
- **Tazi, M.A., Abir-Khalil, S., Chaouki, N., Cherqaoui, S., Lahmouz, F., Sraïri, J.E., Mahjour, J., 2003.** Prevalence of the main cardiovascular risk factors in Morocco: results of a National Survey, 2000. *Journal of hypertension* 21, 897-903.

- **Terra, W.R., Ferreira, C., 1994.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109, 1-62.
  
- **van der Werf, N., Kroese, F.G., Rozing, J., Hillebrands, J.L., 2007.** Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 23, 169-183.
  
- **Vanderkraan, M., Kroos, M., Joosse, M., Bijvoet, A., Verbeet, M.P., Kleijer, W., Reuser, A., 1994.** Deletion of exon 18 is a frequent mutation in glycogen storage disease type II. *Biochemical and biophysical research communications* 203, 1535-1541.
  
- **Wang, H., Du, Y.-J., Song, H.-C., 2010.**  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food chemistry* 123, 6-13.
  
- **Weaber, G., 2007.** **Diabétologie expérimentale.** *Revue médicale de la Suisse Romande* 120 :907-913.
  
- **You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y., Lin, S., 2012.** Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *LWT-Food Science and Technology* 46, 164-168.
  
- **Zarrouk, W., Haddada, F.M., Baccouri, B., Oueslati, I., Taamalli, W., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Daoud, D., Zarrouk, M., 2008.** Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. *European journal of lipid science and technology* 110, 81-88.

# Annexes

## Annexe 1 :

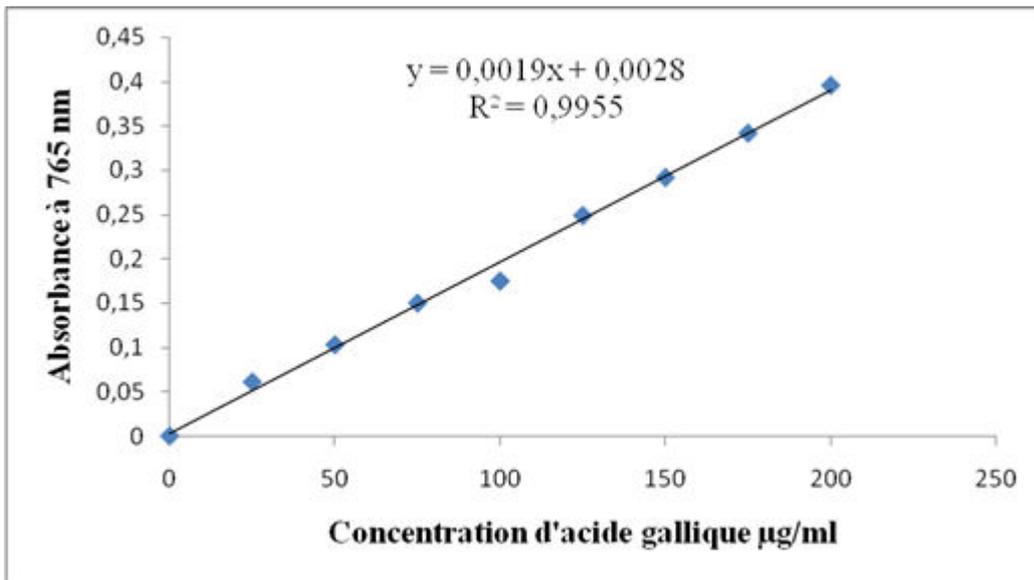


Figure 1: Courbe d'étalonnage des phenols totaux

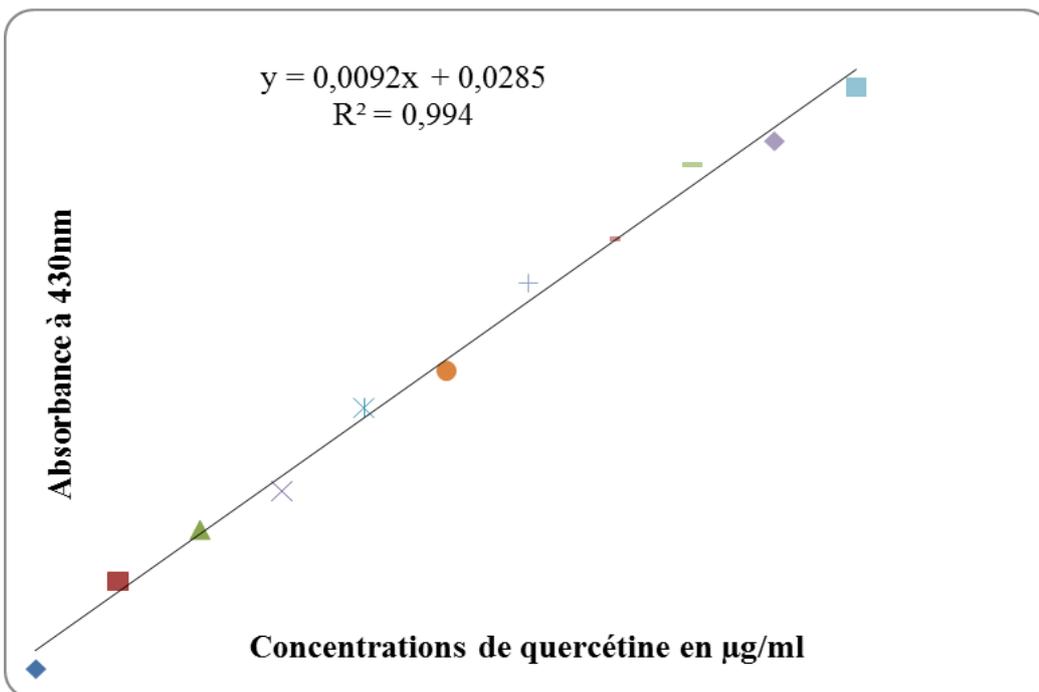


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Annexe 2 :

Préparation des solutions :

1- Préparation de solution tampon phosphate :

$$(\text{Na H}_2\text{PO}_4) = 23+2+31+64 = 120 \text{ g}$$

$$1 \text{ M} \longrightarrow 120 \text{ g} / 1000 \text{ ml}$$

$$0.1 \text{ M} \longrightarrow x / 1000 \text{ ml}$$

$$X = 12 \text{ g}$$

$$12 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$x \longrightarrow 250 \text{ ml}$$

$$x = 3 \text{ g} / 250 \text{ ml}$$

$$(\text{Na}_2 \text{H PO}_4) = 46+1+31+64 = 142 \text{ g}$$

$$1 \text{ M} \longrightarrow 142 \text{ g}$$

$$0.1 \longrightarrow x$$

$$x = 14.2 \text{ g}$$

$$14.2 \longrightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \longrightarrow 250 \text{ ml}$$

$$X = 3.55 \text{ g} / 250 \text{ ml}$$

2- Préparation des solution enzymatique de l' $\alpha$ - glucosidase . ( 65  $\mu\text{g} / \text{ml}$  )

$$38 \text{ essais } 65 \times 38 = 2470 \mu\text{g}$$

$$2470 \mu\text{g} \longrightarrow 38 \text{ ml}$$

3- Préparation de PNPG : (1.9 mg/ml) :

$$1.9 \times 38 = 72.2 \text{ mg}$$

$$72.2 \text{ mg} \longrightarrow 38 \text{ ml}$$

**Résumé :** L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est due en générale aux métabolites secondaires qui les constituent. Le genre *Pinus*. est parmi les plantes qui confirment son usage empirique dans le traitement du diabète. Dans notre étude une extraction des phénols totaux et des flavonoïdes sur les graines de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. a été réalisée par des solvants organiques et aqueux. Les effets de ces extraits sur l'inhibition d' $\alpha$ -glucosidase *in vitro* et leurs rôles dans l'inhibition de la glycémie post-prandiale *in vivo* ont été évalués expérimentalement. Les résultats obtenus montrent que l'extrait *Pinus pinea* L. présente la teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux (7,99 mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec). L'effet inhibiteur d' $\alpha$ -glucosidase des extraits *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. n'est pas vraiment significatif avec des concentrations inhibitrice moins de 50 % (IC50). L'extrait de *Pinus pinea* L. peut ralentir l'absorption de sucres dans l'intestin et évite l'augmentation de la glycémie post-prandiale plus que l'extrait de *Pinus halepensis* Mill. La diminution de la glycémie post prandiale observée pour les deux extraits aqueux de graines testés est probablement due à un mécanisme d'action différent au mécanisme enzymatique testé ou ils peuvent agir sur les différents récepteurs hormonaux.

**Mots clés :** Diabète, *Pinus halepensis* Mill, *Pinus pinea* L,  $\alpha$ -glucosidase, phénols totaux ,flavonoïdes, post-prandiale.

**Abstract :** The use of medicinal plants for therapeutic purposes is generally due to secondary metabolites that constitute them. The genus *Pinus*. Is among the plants that confirm its empirical use in the treatment of diabetes. In our study the extraction of total phenols and flavonoids from the seeds of *Pinus halepensis* Mill and *Pinus pinea* L is achieved by organic and aqueous solvents solvent. The effects of these extracts on the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase *in vitro* and their role in the inhibition of post-prandial glucose *in vivo* are demonstrated and proven experimentally. The results show that the *Pinus pinea* L extract has the highest total phenolic content (7.99 mg equivalent of gallic acid per gram of dry extract). The inhibitory effect of  $\alpha$ -glucosidase in *Pinus halepensis* Mill and *Pinus pinea* L extracts is not really significant with inhibitory concentrations less than 50% (IC50). *Pinus pinea* L. extract can slow the absorption of sugars in the intestine and prevents the increase of postprandial glucose more than the extract of *Pinus halepensis* Mill. The decrease in postprandial blood glucose observed for the two aqueous seed extracts tested is probably due to a different mechanism of action to the enzymatic mechanism tested or they can act on the different hormonal receptors.

**Keywords:** Diabetes, *Pinus halepensis* Mill, *Pinus pinea* L,  $\alpha$ -glucosidase, total phenols, flavonoids, post-prandial.

#### ملخص :

يرجع استخدام النباتات الطبية للأغراض العلاجية عموماً إلى الأيضات الثانوية التي تشكلها. الصنوبر من بين النباتات التي تؤكد استخدامها التجريبي في علاج مرض السكري. في دراستنا تم استخلاص الفينولات الاجمالية والفلافونويد من بذور الصنوبر الحلبي و الصنوبر الثمري بواسطة مذيبات عضوية أظهرت آثار هذه الخلاصات على تثبيط ألفا جلوكوزيد في المختبر ودورها في تثبيط سكر الدم بعد الأكل في الوسط الحيوي التي تم اثباتها بالتجربة. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن مستخلص الصنوبر الثمري يحتوي على نسبة من إجمالي المركبات الفينولية (7.99 ملغ تعادل حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص الجاف)

(. التأثير المثبط لألفا جلوكوزيد بواسطة مستخلص الصنوبر الحلبي و الصنوبر الثمري ليس كبيراً حقاً مع وجود تراكيزات المثبطة أقل من 50% (IC50). مستخلص الصنوبر الثمري يمكن أن يبطئ من امتصاص السكريات في الأمعاء ويمنع زيادة نسبة السكر في الدم بعد الأكل أكثر من مستخلص الصنوبر الحلبي انخفاض مستوى السكر في الدم بعد الأكل الملاحظ من طرف المستخلصات المائية للبذور المختبرة يعود الى اليات عمل مختلفة عن آلية الانزيمية المختبرة , او يمكنها التأثير على المستقبلات الهرمونية المختلفة .

**كلمات البحث:** مرض السكري، صنوبر حلبي، الصنوبر الثمري، ألفا جلوكوزيد، مجموع الفينولات، الفلافونويد، نسبة السكر بعد الأكل.