

Université de Montréal

**Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le  
transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12  
via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie  
insulino-indépendante de l'AMPK**

par

Mohamed Amine Ben Abdennebi

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en pharmacologie

Juin, 2012

Mohamed Amine Ben Abdennebi<sup>©</sup>, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK**

Présenté par :

Mohamed Amine Ben Abdennebi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Hélène Girouard, président-rapporteur

Dr Pierre Haddad, directeur de recherche

Dr Mohamed Benderdour, membre du jury

# Résumé

---

Le diabète est reconnu comme un problème majeur de santé publique causant des conséquences humaines et économiques redoutables. La phytothérapie s'offre comme une nouvelle avenue thérapeutique pour le contrôle de la glycémie. Le grenadier, *Punica granatum*, a servi de remède contre le diabète dans le système Unani de la médecine pratiquée en Inde et au Moyen Orient. Des études ont démontré un effet hypoglycémiant des extraits de grenadier via divers mécanismes notamment par une amélioration de la sensibilité à l'insuline et la régénération des cellules bêta-pancréatiques. Cependant, aucune étude n'a démontré à ce jour, l'effet de grenadier sur le transport de glucose dans le muscle, étape cruciale dans la régulation de l'homéostasie glucidique postprandiale. De plus, l'effet de la maturation sur le potentiel antidiabétique du fruit de grenadier n'a pas été étudié. Ainsi, le but de ce projet est d'évaluer l'effet antidiabétique des extraits de grenadier sur le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 en fonction de la variété et du stade de maturation du fruit et d'élucider les mécanismes d'action. Le choix des variétés du grenadier tunisien (Espagnoule [EP] et Gabsi [GB]) a été orienté pour leur pouvoir antioxydant et leur consommation locale. Deux parties de la plante ont été utilisées, les fleurs et les fruits à 3 stades de maturation soit 2, 4 et 6 mois. Les résultats ont montré que seule la variété du grenadier Gabsi stimule significativement le transport de glucose par rapport au contrôle (DMSO), et ceci sans être toxique. Cet effet est plus prononcé au stade de fruit mûr (à 6 mois) que celui de la fleur. De plus, l'extrait de fleurs stimule la voie insulino-indépendante de l'AMPK et augmente le niveau d'expression des transporteurs spécifiques de glucose (GLUT-4). Par contre, l'extrait de fruits mûrs, en plus de ces deux mécanismes, active fortement aussi la voie insulino-dépendante de l'AKT. En conclusion, cette étude présente un nouveau mécanisme d'action antidiabétique de grenadier (plus

particulièrement du fruit mûr) qui est dépendant de la variété. Subventionné par les IRSC et le Gouvernement de la Tunisie.

**Mots-clés** : Grenadier, *Punica granatum*, transport de glucose, muscle, Akt, AMPK, GLUT-4, diabète, médecine traditionnelle.

# Abstract

---

Diabetes is a major public health problem worldwide with astounding human and economic consequences. The seed and the flower of pomegranate (*Punica granatum*), a native plant of Central Asia and the Mediterranean regions, exhibited a hypoglycaemic effect in *in vivo* studies. However, the underlying mechanisms have not yet been elucidated. The aim of this project was to evaluate the effect of the flower and the fruit (at 3 maturation stages) of pomegranate on glucose transport in skeletal muscle cells and to determine the molecular mechanisms involved in this effect. To accomplish this, we chose two varieties of pomegranate cultivated in Tunisia (Gabsi [GB] and Espagnoule [EP]), which have been shown to be highly consumed in that area and to possess high antioxidant activity. Differentiated C2C12 cells were treated for 18 hours with 80% ethanolic extract of the flowers and fruits (at 2, 4, and 6 months) of each variety. Our results showed that the Gabsi variety of pomegranate significantly enhances glucose uptake, without any toxicity. This effect is more pronounced in the ripe fruit (6 months) than in the flower. In parallel, the ripe fruit stimulated both the insulin-dependent pathway (Akt) and the insulin-independent pathway (AMPK), while the flower stimulated the latter only. In addition, both flower and ripe fruit treatment resulted in enhanced expression level of GLUT-4 glucose transporter in the muscle. Hence, these results suggest that regulation of glucose transport in skeletal muscle is one of the components involved in the anti-diabetic effect of Tunisian pomegranate. Funded by CIHR and the Government of the Tunisia.

**Keywords:** Pomegranate, *Punica granatum*, glucose uptake, muscle, Akt, AMPK

# Table des matières

---

|  |      |
|--|------|
| Résumé.....  | i    |
| Abstract.....  | iii  |
| Table des matières.....  | iv   |
| Liste des tableaux.....  | viii |
| Liste des figures.....   | ix   |
| Liste des abréviations.....  | xi   |
| Remerciements.....   | xiii |
| Dédicaces.....   | xv   |
| Introduction générale.....   | xvii |
| Introduction.....  | 1    |
| 1. DIABÈTE : ÉPIDÉMIOLOGIE, DEFINITION ET CLASSIFICATION.....            | 2    |
| 1.1. Épidémiologie du diabète.....                                       | 2    |
| 1.1.1. Données sur la prévalence et incidence du diabète au Canada.....  | 2    |
| 1.1.2. Données sur la prévalence et incidence du diabète en Tunisie..... | 3    |
| 1.2. Définition du diabète.....  | 3    |
| 1.3. Classification étiologique des diabètes sucrés.....                 | 4    |
| 1.3.1. Diabète de type 1.....  | 4    |
| 1.3.2. Diabète de type 2.....  | 4    |
| 1.3.3. Diabète gestationnel.....   | 5    |
| 1.3.4. Diabètes secondaires.....   | 5    |
| 2. RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE.....                           | 7    |
| 2.1. Principaux flux de glucose au sein de l'organisme.....              | 7    |
| 2.2. Organes contrôlant la glycémie.....                                 | 7    |
| 2.2.1. Le foie.....  | 7    |
| 2.2.2. Le pancréas.....  | 8    |
| 2.2.3. Le muscle squelettique.....                                       | 8    |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.2.4.   | Le tissu adipeux.....   | 9  |
| 2.3.     | Système hormonal contrôlant la glycémie.....  | 9  |
| 2.3.1.   | Glucagon et Catécholamines.....   | 9  |
| 2.3.2.   | Insuline.....   | 9  |
| 2.3.2.1. | Structure, biosynthèse et sécrétion.....  | 9  |
| 2.3.2.2. | Récepteur de l'insuline et les voies de signalisation.....                            | 10 |
| 2.3.2.3. | Effets biologiques de l'insuline.....   | 11 |
| 3.       | MUSCLE SQUELETTIQUE, TRANSPORT DE GLUCOSE ET LES GLUT.....                            | 12 |
| 3.1.     | La famille GLUT des transporteurs de glucose.....                                     | 12 |
| 3.2.     | Le transport de glucose au niveau du muscle squelettique.....                         | 13 |
| 3.3.     | Mécanismes de régulation du transport de glucose dans le muscle squelettique.....     | 14 |
| 3.3.1.   | Voie insulino-dépendante.....   | 14 |
| 3.3.2.   | Voie insulino-indépendante.....   | 15 |
| 3.3.3.   | Voies de signalisation alternatives.....  | 15 |
| 4.       | TRAITEMENT DU DIABETE.....  | 16 |
| 4.1.     | Diététique et hygiène de vie.....   | 16 |
| 4.2.     | Insulinothérapie.....   | 17 |
| 4.3.     | Traitements oraux du diabète de type 2.....   | 17 |
| 4.3.1.   | Insulinosensibilisateurs.....   | 17 |
| 4.3.1.1. | Metformine.....   | 17 |
| 4.3.1.2. | Thiazolidinediones (TZD) ou glitazones.....   | 18 |
| 4.3.2.   | Insulinosécréteurs.....   | 19 |
| 4.3.2.1. | Sulfamides hypoglycémiantes.....  | 19 |
| 4.3.2.2. | Glinides.....   | 19 |
| 4.3.2.3. | Incrétinomimétiques et incrétinopotentialisateurs.....                                | 19 |
| 4.3.3.   | Inhibiteurs des $\alpha$ -glucosidases.....   | 20 |
| 5.       | MEDECINE ALTERNATIVE : APPORTS DE LA PHYTOTHERAPIE DANS LE TRAITEMENT DU DIABETE..... | 20 |
| 5.1.     | Histoire des plantes médicinales.....   | 20 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 5.2.     | Rôle des plantes médicinales antidiabétiques.....  | 22 |
| 5.3.     | Le grenadier : <i>Punica granatum</i> .....  | 23 |
| 5.3.1.   | <i>Punica granatum</i> dans l’histoire.....  | 23 |
| 5.3.2.   | Aspects ethnobotaniques de <i>P. granatum</i> .....  | 24 |
| 5.3.2.1. | Classification botanique.....  | 24 |
| 5.3.2.2. | Description de la plante.....  | 24 |
| 5.3.2.3. | Distribution de <i>P. granatum</i> .....   | 24 |
| 5.3.3.   | Phytochimie de <i>P. granatum</i> .....  | 25 |
| 5.3.4.   | Activités thérapeutiques de <i>P. granatum</i> .....   | 26 |
| 5.3.4.1. | Activité antioxydante de <i>P. granatum</i> .....  | 27 |
| 5.3.4.2. | Activité anti-inflammatoire de <i>P. granatum</i> .....  | 27 |
| 5.3.4.3. | Activité anticarcinogénique de <i>P. granatum</i> .....  | 28 |
| 5.3.4.4. | Activité antidiabétique de <i>P. granatum</i> .....  | 28 |
|          | Matériels et méthodes.....   | 30 |
| 1.       | Extraction et préparation des plantes .....  | 31 |
| 2.       | Culture cellulaire.....  | 31 |
| 3.       | Essai de cytotoxicité à la LDH.....  | 32 |
| 4.       | Essai du transport de glucose .....  | 33 |
| 5.       | Immunobuvardage (Western Blot).....  | 34 |
| 6.       | Analyse statistique.....   | 35 |
|          | Résultats.....   | 36 |
|          | Les extraits de grenadier ne sont pas toxiques pour les cellules musculaires C2C12.....  | 37 |
|          | Le grenadier Gabsi stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12..   | 38 |
|          | Voies de signalisation impliquées dans le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 stimulées par le grenadier Gabsi.....                           | 41 |
|          | Seul le fruit mûr du grenadier Gabsi active la voie de l’Akt pour stimuler partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 .....         | 42 |
|          | La fleur et le fruit mûr du grenadier Gabsi activent la voie de l’AMPK pour médier partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 ..... | 44 |

|   |    |
|---|----|
| Le grenadier Gabsi augmente l'expression des transporteurs GLUT-4 dans les cellules musculaires C2C12 ..... | 47 |
| Discussion et perspectives.....   | 49 |
| Bibliographie.....  | 56 |

# Liste des tableaux

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1</b> : Drogues végétales utilisées dans le diabète .....  | 23 |
| <b>Tableau 2</b> : Principaux constituants des différentes parties du grenadier .....   | 26 |
| <b>Tableau 3</b> : Différentes études montrant l'effet antidiabétique du <i>P.granatum</i> et les différents mécanismes d'action proposés ..... | 29 |

# Liste des figures

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1:</b> Classification étiologique des diabètes sucrés.....  | 6  |
| <b>Figure 2 :</b> Principaux flux de glucose dans l’organisme .....   | 8  |
| <b>Figure 3 :</b> Représentation schématique des éléments de signalisation intracellulaire activés via le récepteur de l’insuline menant à la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique des cellules musculaires..... | 14 |
| <b>Figure 4 :</b> Vue microscopique du processus de différenciation des myoblastes en myotubes .....  | 32 |
| <b>Figure 5 :</b> Principe schématique de la mesure du transport spécifique de glucose dans les cellules musculaires C2C12 .....  | 33 |
| <b>Figure 6 :</b> Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la translocation des transporteurs de glucose GLUT-4 à la surface cellulaire dans le muscle squelettique.  | 52 |

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Résultat Figure 1 :</b> Test de cytotoxicité à la LDH des extraits des grenadiers Gabsi et Espagnoule dans les cellules musculaire C2C12. ....   | 38 |
| <b>Résultat Figure 2 :</b> Courbe dose-réponse du transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 stimulées par les extraits des grenadiers Gabsi et Espagnoule ....                             | 39 |
| <b>Résultat Figure 3:</b> Effet de la variété et du stade de maturation des extraits des grenadiers Gabsi et Espagnoule sur le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 .....             | 41 |
| <b>Résultat Figure 4 :</b> L’extrait de fruits mûrs du grenadier Gabsi active la voie de l’Akt pour stimuler partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12..                  | 43 |
| <b>Résultat Figure 5 :</b> L'extrait de fleurs et de fruits mûrs du grenadier Gabsi activent la voie de l’AMPK pour médier partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12..... | 46 |

**Résultat Figure 6** : Effet de l'extrait du grenadier Gabsi sur le niveau d'expression du  
transporteur GLUT-4 dans les cellules musculaires C2C12. .... 48

# Liste des abréviations

---

**BSA:** Bovine Serum Albumin  
**CAP:** Cb1-Associated Protein  
**CC:** Compound C  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMSO:** DiMethyl SulfOxide  
**DPP-4:** DiDeptidyl Peptidase-4  
**eNOS :** endothelial Nitric Oxide Synthase  
**EP :** variété « Espagnoule »  
**FBS:** Fetal Bovine Serum  
**GB:** variété « Gabsi »  
**GIP:** Glucose Dependent Insulinotropic Polypeptide  
**GLP1:** Glucagon-Like-Peptide-1  
**GLUT :** Glucose Transporter  
**HGOP :** Hyper Glycémie Provoquée Orale  
**HS:** Horse Serum  
**IRS:** Insulin Receptor Substrate  
**LDH:** Lactate déshydrogénases  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MODY:** Maturity Onset Diabetes of the Youth  
**NS :** Non Significatif  
**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé  
**PDK :** Phosphoinositide-Dependant protein Kinase  
**PI-3 kinase :** PhosphoInositide 3-kinase  
**PS:** Penicillin-Streptomycin  
**RIPA:** RadioImmunoPrecipitation Assay

**S:** Stade

**SH :** Sulfamides Hypoglycémiantes

**SHC :** Src Homology 2/ $\alpha$  Collagen-related

**SNSD :** Système national de surveillance du diabète

**TZD:** Thiazolidinediones

**ZDF:** Zucker Diabetic Fatty

# Remerciements

---

***A MON MAITRE ET DIRECTEUR DE RECHERCHE  
DR PIERRE HADDAD***

Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité  
avec lesquelles vous avez voulu diriger ce travail.

Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction  
et trouvé auprès de vous le conseil et le guide  
qui nous a reçu en toutes circonstances  
avec sympathie, sourire et bienveillance.

Nous voudrions être digne de la confiance que vous  
nous avez accordé et vous prie, cher maître,  
de trouver ici le témoignage de notre sincère  
reconnaissance et profonde gratitude.

***MA RECONNAISSANCE LA PLUS SINCÈRE S'ADRESSE À  
DRE LINA MUSALLAM***

Nous vous remercions pour vos conseils inestimables, votre entière  
disponibilité et le grand professionnalisme que vous nous aviez témoigné tout  
au long de cette recherche et qui ont énormément contribué à ce travail.

***AUX DR MOHAMED MARS ET DR JALILA BAKIR***

Nous vous remercions pour votre collaboration à l'élaboration de ce travail.

***A MADAME LA PRÉSIDENTE DU JURY DRE HÉLÈNE***

***GIROUARD***

Nous sommes très honorés de vous avoir  
comme présidente du jury de notre mémoire.

**AU DR MOHAMED BENDERDOUR**

C'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger parmi ce jury.

**A TOUTE L'ÉQUIPE DU LABORATOIRE DE PRODUITS DE  
SANTÉ NATURELS ET MALADIES MÉTABOLIQUE : DIANE  
VALLERAND, ANTOINE BRAULT, ABIR NACHAR, NAN  
SHANG, DESPINA HARBILAS, MERIEM OUCHFOUN ET  
HODA EID**

Veillez accepter nos remerciements les plus sincères.

# Dédicaces

---

Nulle expression ne saurait exprimer mes profonds sentiments envers tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont apporté, tout au long de mes études : Soutien, aide, réconfort et conseils et pour qui je porte du respect, de l'affection et de la reconnaissance.

C'est à travers ces mots que je dédie ce travail :

## **A mon cher père Lotfi**

Aucune dédicace ne pourrait exprimer toute ma reconnaissance pour le soutien moral et matériel que tu n'as cessé de prodiguer. Je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as su me soutenir et tu n'as cessé de m'encourager à réaliser ce travail.

Je suis très fière d'avoir réalisé ce que tu as tant attendu de moi.

Que Dieu te préserve pour nous et t'accorde santé, bonheur et prospérité.

## **A ma chère mère Najoua**

Tu as tout fait pour mon bonheur et ma réussite. Que ce travail, qui t'est particulièrement dédié et qui représente l'aboutissement de tes sacrifices et encouragements, soit le modeste témoignage de ma grande affection, mon éternel amour et mon obéissance. Sans toi, je ne serais jamais ce que je suis.

Que Dieu te préserve pour nous et t'accorde bonne santé et longue vie.

## **A ma sœur aînée Aroua et sa petite famille**

Vous m'avez toujours aidé avec tant de patience, de tendresse, de générosité et d'encouragement. Au-delà du bien être moral dont vous m'avez entouré, vous avez toujours su me soutenir même à distance et m'épauler avec amour et tendresse.

## **A ma Grand-mère Sofia**

Vous avez contribué à l'élaboration de ce travail par votre aide et soutien. Rien ne saurait exprimer l'amour, l'attachement et la tendresse que j'ai pour vous. Que Dieu vous garde et vous alloue bonne santé et tout le bonheur du monde.

## **A la mémoire de mes grands-parents**

En souvenir de leur Bonté et de leur Humour, mon profond amour.

## **A tous les membres de ma famille étendue**

Nous vous remercions pour votre aide et soutien moral.

## **A tous mes amis**

En souvenir de notre complicité et des bons moments passés ensemble  
Nulle expression ne saurait exprimer mes sentiments envers vous tous.

# Introduction générale

---

Le diabète est la septième cause de décès dans le monde. Chaque année, plus de 4 millions de personnes meurent du diabète, tandis que des dizaines de millions subissent des complications invalidantes. À l'échelle mondiale, les gouvernements éprouvent des difficultés à couvrir le coût des soins aux diabétiques vu que ces coûts sont sans cesse en perpétuelle augmentation. Le diabète, en particulier le diabète de type 2, s'associe à d'autres complications métabolique et hémodynamique. La première partie du développement est dévolue à la définition et la classification du diabète sucré ainsi qu'aux aspects épidémiologiques de cette maladie. La seconde partie décrit tout d'abord les systèmes de régulation mis-en en jeu dans l'homéostasie glucidique. Dans un second temps, elle présente le rôle crucial de l'insuline dans le maintien de la balance métabolique.

Les complications du diabète sont imputées à une mauvaise sensibilité périphérique des tissus à l'insuline connu sous le nom de résistance à l'insuline. L'augmentation de la captation de glucose par le muscle squelettique constitue l'étape limitante dans la régulation de l'homéostasie glucidique de l'organisme. La troisième partie est consacrée à la description des mécanismes cellulaire et moléculaire mis en jeu dans la régulation de la captation musculaire de glucose.

Plusieurs nouvelles classes thérapeutiques sont venues enrichir la pharmacopée du diabète de type 2 au cours de la dernière décennie. L'approche thérapeutique fait appel à l'hygiène de vie et trois grandes classes d'hypoglycémifiants oraux qui sont discutés dans la quatrième partie du développement.

L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels et la forte incidence des effets secondaires qui leur sont associés ainsi que la difficulté d'accès et le coût élevé des médicaments dans certains pays expliquent le recours de plus en plus à la médecine naturelle pour se soigner. Ainsi, la cinquième partie est consacrée dans un premier temps à la définition de la médecine alternative et à la présentation de quelques exemples de plantes médicinales utilisées pour traiter le diabète. Dans un second temps, elle se focalise sur l'étude du grenadier, *Punica granatum*, plante native de l'Himalaya et cultivée depuis des siècles dans les régions méditerranéennes en étayant ses aspects ethnobotaniques et phytochimiques ainsi que ses vertus thérapeutiques particulièrement son activité antidiabétique.

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet antidiabétique du grenadier. Cependant, aucune étude n'a démontré à ce jour, l'effet du grenadier sur le transport de glucose dans le muscle, étape cruciale dans la régulation de l'homéostasie glucidique postprandiale. De plus, l'effet de la maturation sur le potentiel antidiabétique du fruit du grenadier n'a pas été étudié. Ainsi, le **but de ce projet** est d'évaluer l'effet antidiabétique des extraits du grenadier tunisien sur la captation de glucose dans le muscle en fonction de la variété et du stade de maturation du fruit et d'élucider les mécanismes d'action. On s'est penché tout d'abord sur l'étude du transport de glucose dans les cellules musculaires différenciées C2C12 de deux variétés du grenadier tunisien. Par la suite, on a choisi la variété la plus active pour élucider les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la régulation de l'homéostasie glucidique musculaire (voies insulino-dépendante et insulino-indépendante).

# Introduction

---

# **1. DIABÈTE : ÉPIDÉMIOLOGIE, DEFINITION ET CLASSIFICATION**

## **1.1. Épidémiologie du diabète**

Le diabète sucré est un véritable problème de santé publique et il est considéré aujourd'hui comme une épidémie. Selon la Fédération Internationale de Diabète (FID), la prévalence de cette maladie chez les adultes ( $\geq 20$  ans) à l'échelle mondiale était de 8.3% en 2011, soit 366 millions de personnes diabétiques. Cette prévalence est en constante croissance et devrait s'accroître à 9.9% en l'an 2030, ce qui veut dire que le nombre de personnes diabétiques peut atteindre 552 millions (1, 2). Compte tenu des modifications du mode de vie, il n'est pas surprenant que plusieurs régions du monde soient affectées par cette maladie, y compris nos sociétés industrialisées et les pays en voie de développement. En effet, des facteurs comme l'adoption de vie sédentaire, la réduction de l'activité physique, la surconsommation de graisses et d'aliments à haute densité calorique et l'augmentation de la prévalence de l'obésité jumelée à l'augmentation de l'espérance de vie contribuent à cette prévalence importante de diabète dans le monde.

### **1.1.1. Données sur la prévalence et incidence du diabète au Canada**

Au Canada, le diabète est aussi à la hausse où la prévalence ajustée pour l'âge a augmenté de 21% de 2002-2003 à 2006-2007 (Système national de surveillance du diabète; SNSD). Il est estimé que 2.6 millions de canadiens vivent avec le diagnostic de diabète à l'heure actuelle (3). Il est à noter, cependant, qu'environ 80% des néo-canadiens sont issus de populations présentant un risque plus élevé de développer le diabète de type 2. Ces personnes sont de descendance autochtone, latino-américaine, asiatique, sud-asiatique ou africaine (3).

### **1.1.2. Données sur la prévalence et incidence du diabète en Tunisie**

Selon une étude multicentrique de dépistage du diabète de type 2 entamée en 2003 chez les patients à risque, la moitié des tunisiens dépistés (âgés entre 35 et 98 ans) présentait plus d'un facteur de risque. De plus, selon une étude récente du Dre Nadia Ouamara, directrice médicale Novo Nordisk Tunisie, 10% (soit plus que 1,2 millions) des tunisiens (tous âges confondus) étaient atteints par la maladie en 2009. Cette prévalence est bien supérieure à celle observée dans les autres pays arabes (le Maroc: 8,1%; l'Egypte: 9,3%) (4). Les mutations économiques et le vieillissement de la population ont fait exploser le nombre des tunisiens atteints par cette pathologie.

Finalement, cette «épidémie de diabète» va engendrer des coûts majeurs, humains et financiers, nécessaires à la prise en charge multidisciplinaire des complications considérables de cette maladie. De plus, les coûts indirects (pensions d'invalidité, arrêts de travail répétés...), plus difficiles à quantifier, ne doivent pas être négligés.

## **1.2. Définition du diabète**

Le diabète est une affection métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique résultante d'une déficience de sécrétion d'insuline, d'anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles, ou de l'association de ces deux facteurs.

Cette hyperglycémie est associée, à des degrés divers et par des mécanismes encore mal connus, à des complications à long terme touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins. Ces complications font l'essentiel de la gravité de la maladie et du poids qu'elle représente en santé publique.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diagnostic de diabète peut être retenu dans quatre situations différentes (5) :

1. Présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) ;
2. Glycémie<sup>1</sup> à jeun  $\geq 1,26$  g/L (7,0 mmol/L) ;
3. Glycémie mesurée au hasard  $\geq 2,00$  g/L (11,1 mmol/L) ;
4. Glycémie deux heures après ingestion de 75 g de glucose (test d'hyperglycémie provoquée orale, HGPO)  $\geq 2,00$  g/L (11,1 mmol/L).

En 2011, les critères de diagnostic de l'OMS ont été révisés et la mesure de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieure à 48 mmol/mol (soit 6.5%) a été ajoutée (6).

### **1.3. Classification étiologique des diabètes sucrés**

La classification des diabètes s'est fondée depuis 1997 sur la physiopathologie des différentes formes cliniques et génétiques de la maladie (5, 7). La classification étiologique des diabètes sucrés proposée par l'ADA (American Diabetes Association) et l'OMS est illustrée dans la figure 1.

#### **1.3.1. Diabète de type 1**

Le diabète de type 1 correspond à la destruction de la cellule  $\beta$  pancréatique aboutissant habituellement à une carence absolue en insuline. Ce type de diabète représente 5 à 10% de tous les diabètes diagnostiqués (5). On distingue deux catégories : la forme auto-immune, qui inclut d'une part le diabète classique du sujet jeune et le diabète auto-immun lent de l'adulte et, d'autre part, le diabète de type 1 idiopathique (sans cause connue). L'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux est à l'origine du processus étiologique du diabète de type 1, dont l'évolution aboutit à une dépendance envers l'administration exogène de l'insuline.

#### **1.3.2. Diabète de type 2**

Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par la conjonction d'une insulino-résistance (moindre sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline) et d'un défaut de sécrétion bêta-pancréatique. Ce type de diabète apparaît comme un processus en deux temps : d'abord insulino-résistance, mais normoglycémie maintenue au prix d'une

---

<sup>1</sup> Toutes les mesures de glycémie sont effectuées sur plasma veineux.

hyperinsulinémie compensatrice ; puis basculement dans le diabète proprement dit, quand le pancréas n'arrive plus à fournir la quantité d'insuline nécessaire pour maintenir l'homéostasie des métabolismes insulino-dépendants. 90% des personnes diabétiques sont diagnostiqués pour le diabète de type 2 ce qui représente l'essentiel du problème de santé publique (5). Le diabète de type 2 est une maladie assez mal définie, longtemps asymptomatique, qui survient typiquement après la cinquantaine, tout particulièrement chez des personnes en surpoids ou qui ont des antécédents familiaux de la même maladie.

### **1.3.3. Diabète gestationnel**

Le diabète gestationnel apparaît chez 2 à 4% des femmes au cours de la grossesse. Il est caractérisé par une intolérance au glucose et une insulino-résistance (due à la production d'hormones placentaires) entraînant une hyperglycémie qui peut parfois avoir des conséquences néfastes aussi bien sur le bébé que sur la mère (5).

### **1.3.4. Diabètes secondaires**

Les diabètes secondaires résultent d'une pathologie ou d'un traitement associés directement responsables de l'hyperglycémie. Plusieurs formes existent:

- Génétiques - diabète de type MODY : Maturity Onset Diabetes of the Youth
- Pancréatopathies - pancréatites, néoplasies, mucoviscidose, hémochromatose, exérèse chirurgicale
- Endocrinopathies responsables d'une hypersécrétion d'hormone hyperglycémisante (cortisol, hormone de croissance, glucagon, hormones thyroïdiennes, phéochromocytome)
- Causes iatrogènes : corticoïdes, interféron, antirétroviraux .....

| <b>Classification étiologique des diabètes sucrés</b>   |  |
|---|--|
| <p><b>I. Diabète de type 1</b><br/>(destruction des cellules <math>\beta</math>, conduisant habituellement à une carence en insuline absolue)</p> <p>A. D'origine immunologique</p> <p>B. Idiopathique</p> <p><b>II. Diabète de type 2</b><br/>(spectre variable, d'une résistance à l'action de l'insuline prédominante avec déficit insulinosécrétoire relatif à un déficit insulinosécrétoire prédominant avec résistance à l'action de l'insuline)</p> <p><b>III. Autres types de diabète spécifiques</b></p> <p>A. Défauts génétiques de la fonction des cellules <math>\beta</math></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Chromosome 12, HNF-1<math>\alpha</math> (anciennement MODY 3)</li> <li>2. Chromosome 7, glucokinase (anciennement MODY 2)</li> <li>3. Chromosome 20, HNF-4<math>\alpha</math> (anciennement MODY 1)</li> <li>4. Mutation de l'ADN mitochondrial</li> <li>5. Autres</li> </ol> <p>B. Défaut génétiques de l'action de l'insuline</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Insulinorésistance de type A</li> <li>2. Lépréchaunisme</li> <li>3. Syndrome de Rabson-Mendenhall</li> <li>4. Diabète lipotrophique</li> <li>5. Autres</li> </ol> <p>C. Diabètes pancréatiques</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pancréatites</li> <li>2. Traumatisme/pancréatectomie</li> <li>3. Cancer du pancréas</li> <li>4. Mucoviscidose</li> <li>5. Hémochromatose</li> <li>6. Pancréatite fibrocalculeuse</li> <li>7. Autres</li> </ol> <p>D. Endocrinopathies</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acromégalie</li> <li>2. Syndrome de Cushing</li> <li>3. Glucagonome</li> <li>4. Phéochromocytome</li> <li>5. Hyperthyroïdie</li> <li>6. Somatostatine</li> <li>7. Hyperaldostéronisme primaire</li> <li>8. Autres</li> </ol> | <p>E. Diabètes induits par des médicaments ou des toxiques</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vacor (raticide)</li> <li>2. Pentamidine</li> <li>3. Acide nicotinique</li> <li>4. Glucocorticoïdes</li> <li>5. Hormones thyroïdiennes</li> <li>6. Diazoxide</li> <li>7. Agonistes <math>\beta</math>-adrénergiques</li> <li>8. Diurétiques thiazidiques</li> <li>9. Diphenylhydantoïne</li> <li>10. Interféron-<math>\alpha</math></li> <li>11. Autres</li> </ol> <p>F. Infections</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rubéole congénitale</li> <li>2. Cytomégalovirus</li> <li>3. Autres</li> </ol> <p>G. Formes rares de diabètes liés à une pathologie du système immunitaire</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. « Stiff-man » syndrome (syndrome de l'homme raide)</li> <li>2. Anticorps dirigés contre le récepteur de l'insuline</li> <li>3. Autres</li> </ol> <p>H. Autres syndromes génétiques s'accompagnant parfois d'un diabète</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Syndrome de Down (trisomie du chromosome 21)</li> <li>2. Syndrome de Klinefelter</li> <li>3. Syndrome de Turner</li> <li>4. Syndrome de Wolfram</li> <li>5. Ataxie de Friedreich</li> <li>6. Chorée de Huntington</li> <li>7. Syndrome de Lawrence-Moon-Biedl-Bardet</li> <li>8. Dystrophie myotonique (Steinert)</li> <li>9. Porphyrries</li> <li>10. Syndrome de Prader-Willi-Labhart</li> <li>11. Autres</li> </ol> <p>IV. Diabète gestationnel</p> |

Modifiée d'après ref (1).

**Figure 1:** Classification étiologique des diabètes sucrés (5)

## **2. RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE**

Le système de régulation responsable de l'homéostasie glucidique met en œuvre le système hormonal et plusieurs organes pour maintenir constants les niveaux sanguins de glucose et par conséquent l'apport énergétique aux organes. Tout déséquilibre de ces mécanismes entraîne une augmentation ou une diminution de la glycémie. Cette dernière doit être maintenue dans des limites assez strictes : 80 mg/dL (4.4 mM) en période de repos et 120 mg/dL (6.6 mM) en période postprandiale (5). Ceci est crucial pour éviter les troubles liés à l'hypo- et l'hyperglycémie.

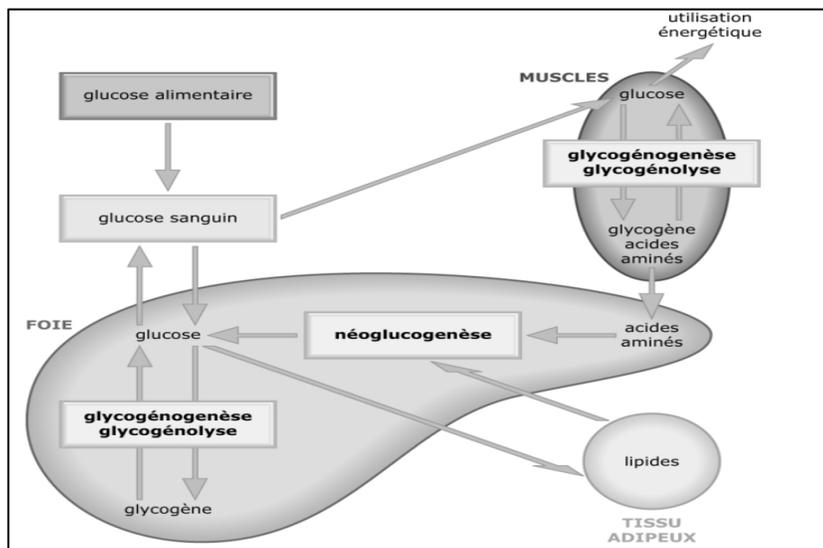
### **2.1. Principaux flux de glucose au sein de l'organisme**

Le glucose est un glucide présent aussi bien dans le règne animal que végétal et qui est la principale source d'énergie de l'organisme. La principale source de glucose pour l'organisme est constituée par les sucres provenant de l'alimentation, notamment des polysides comme l'amidon, polymère de glucose. Les polysides sont hydrolysés dans l'intestin et les molécules de glucose qui en résultent sont absorbées puis passent dans le sang. Cependant, le foie, les reins et l'intestin sont capables de produire du glucose en cas de besoin.

### **2.2. Organes contrôlant la glycémie**

#### **2.2.1. Le foie**

Le foie joue un rôle crucial dans l'homéostasie glucidique en régulant la production et l'entreposage de glucose. En fait, il reçoit le glucose provenant de l'intestin (issu de l'alimentation) et maintient la glycémie constante après un repas riche en synthétisant un polymère de réserve, le glycogène (glycogénogenèse). D'autre part, il est capable de libérer du glucose en période de jeûne soit à partir de l'hydrolyse du glycogène (glycogénolyse) ou de synthèse de novo (néoglucogenèse) (Fig 2).



**Figure 2** : Principaux flux de glucose dans l'organisme (8)

### 2.2.2. Le pancréas

Le pancréas exocrine produit des enzymes de digestion importantes qui sont sécrétées dans l'anse duodénale. Le pancréas endocrine sécrète des hormones hypoglycémiantes (insuline) et hyperglycémiantes (glucagon) qui maintiennent les niveaux de glucose sanguin stables. Celles-ci seront discutées dans la section système hormonal.

### 2.2.3. Le muscle squelettique

Le muscle squelettique représentant 40 à 60% de la masse totale du corps humain est le site majeur de l'utilisation de glucose où il est responsable de 85% de l'absorption de glucose postprandial (9). Le muscle squelettique strié est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. La fibre musculaire est une cellule allongée plurinucléée qui résulte de la fusion de myoblastes (cellules mononucléées) durant la différenciation.

Les mécanismes de régulation de la glycémie par le muscle seront discutés dans la section 3.

#### **2.2.4. Le tissu adipeux**

Le tissu adipeux est un véritable organe endocrine qui joue un rôle crucial dans la régulation de la balance énergétique ainsi que dans la médiation des complications métaboliques et cardiovasculaires associées à l'obésité. Parmi les nombreuses substances sécrétées par les adipocytes, l'adiponectine et la résistine, semblent participer à la pathogenèse de la résistance à l'insuline associée à l'excès de graisse viscérale (10).

### **2.3. Système hormonal contrôlant la glycémie**

#### **2.3.1. Glucagon et catécholamines**

Le glucagon et les catécholamines sont sécrétés durant le stress, le jeûne et l'hypoglycémie et ils induisent l'hyperglycémie. Le glucagon est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules  $\alpha$  du pancréas et des cellules intestinales qui agit au niveau hépatique en stimulant la glycogénolyse. Le glucagon a surtout été impliqué dans le cas de diabète insulino-dépendant associé d'une hyperglucagonémie. Les catécholamines stimulent essentiellement la glycogénolyse hépatique et la lipolyse au niveau des adipocytes blancs (5).

#### **2.3.2. Insuline**

L'insuline est une hormone peptidique d'environ 6 kDa sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Elle est la seule hormone capable de diminuer la glycémie en inhibant la production hépatique de glucose et augmentant la consommation cellulaire de glucose. De plus, l'insuline arrête l'utilisation des lipides comme source d'énergie en inhibant la sécrétion du glucagon.

##### **2.3.2.1. Structure, biosynthèse et sécrétion**

L'insuline mature est synthétisée à partir d'une molécule précurseur, la proinsuline, suite à l'action des enzymes protéolytiques les prohormone-convertases 1 et 2 (PC1 et PC2) puis de la carboxypeptidase exoprotease E dans les cellules  $\beta$  du pancréas. Ces modifications retirent la partie centrale de la molécule (i.e. le peptide C). Les polypeptides

restants (chaines A et B) sont liés entre eux par des ponts disulfures. L'insuline mature et le peptide C sont emmagasinés dans des granules de sécrétion au niveau de l'appareil de Golgi. Ces granules s'accumulent dans le cytoplasme à l'état de repos. Lorsque la cellule  $\beta$  est stimulée (e.g. augmentation des taux de glucose sanguins), l'insuline est relâchée par exocytose où elle diffuse vers la circulation sanguine.

### **2.3.2.2. Récepteur de l'insuline et les voies de signalisation**

L'action de l'insuline sur les tissus cibles résulte d'une cascade d'agents de signalisation qui s'initie par la liaison de l'insuline à son récepteur et qui prend fin par un certain nombre de réponses biologiques.

Le récepteur de l'insuline est exprimé sur la plupart des cellules, mais il est présent en plus grande quantité dans les tissus cibles des effets métaboliques de l'hormone qui sont le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Le récepteur de l'insuline est une glycoprotéine tétramérique, formée de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires et de deux sous-unités  $\beta$  intracellulaires contenant un domaine tyrosine kinase. La liaison de l'insuline à son récepteur induit des modifications conformationnelles des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , qui permettent l'accès au site catalytique et la phosphorylation des résidus tyrosine des sous-unités  $\beta$ . La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'activation du récepteur, qui va alors pouvoir phosphoryler ses substrats intracellulaires. Les effets maximum de l'insuline sont observés alors qu'une faible proportion (1%) des récepteurs a lié l'hormone, ce qui suggère qu'il existe un mécanisme d'amplification du signal trans-phosphorylation des récepteurs libres par les récepteurs activés (11).

La stimulation du récepteur par l'insuline induit la phosphorylation d'un certain nombre de protéines intracellulaires. Les protéines IRS (*insulin receptor substrate 1 et 2*) dont vont dépendre les effets métaboliques et les protéines SHC (Src homology 2/ $\alpha$  collagen-related) qui activent la voie des MAP Kinases conduisant aux effets mitogéniques de l'insuline (12).

Les souris transgéniques déficientes des récepteurs de l'insuline au niveau du foie sont diabétiques (11). Mais chez l'homme, les mutations du récepteur de l'insuline sont

exceptionnelles, responsables de syndromes d'insulinorésistances rares. Au cours du diabète de type 2, le nombre de récepteurs de l'insuline présents à la surface des cellules est suffisant; 10% des récepteurs occupés entraînent une action maximale (11).

La stimulation du récepteur de l'insuline est à l'origine de l'activation de deux principales voies de signalisation, la voie des MAP Kinases et la voie de PI-3 Kinase, qui conduisent schématiquement aux effets mitogéniques et métaboliques de l'hormone.

### **2.3.2.3. Effets biologiques de l'insuline**

Les effets de l'insuline sont multiples car ils concernent à la fois le métabolisme (anabolisme) des trois familles de nutriments: glucides, lipides et protides essentiellement au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle.

- Au niveau glucidique, son rôle principal est de favoriser l'entrée du glucose dans les cellules des tissus insulinosensibles. Au niveau de ces cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans le cytoplasme en augmentant la perméabilité de leur membrane au moyen d'un recrutement des transporteurs de glucose. Au niveau des cellules hépatiques, l'insuline stimule la glycogénogenèse par activation de la glycogène synthétase. L'insuline stimule l'utilisation de glucose par la glycolyse ou son oxydation par la voie des pentoses-phosphates et inhibe la production de glucose à partir d'acides aminés gluco-formateurs (néoglucogénèse) et sa sortie du foie. Cette hormone inhibe aussi l'hydrolyse du glycogène en glucose en inhibant la glycogène phosphorylase.
- Au niveau lipidique, l'insuline exerce une action anti-lipolytique en diminuant la libération des acides gras libres et du glycérol du tissu adipeux. Dans les adipocytes, elle favorise la captation des triglycérides en augmentant l'activité de la lipoprotéine lipase et augmente la synthèse de ces derniers à partir du glucose ou de l'acétate. L'entrée des lipoprotéines sériques dans ces cellules est également stimulée par l'insuline.

- Au niveau protidique, l'insuline est responsable du maintien de la balance azotée. Elle exerce son action anabolique au niveau musculaire et hépatique selon deux voies : stimulation de la synthèse protéique à partir des acides aminés plasmatiques (effets dépendant de l'AMP cyclique) et inhibition du catabolisme protéique (diminution de la synthèse d'urée) et de la gluconéogenèse à partir d'acides aminés glucoformateurs.

En plus de ces effets anaboliques, l'insuline joue un rôle de facteur de croissance. Elle stimule la prolifération des cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin humain (jejunum et colon) au cours de l'embryogénèse. Pendant la croissance, l'insuline agit en stimulant la formation de somatomédines, médiateurs de l'effet de l'hormone de croissance.

### **3. MUSCLE SQUELETTIQUE, TRANSPORT DE GLUCOSE ET LES GLUT**

#### **3.1. La famille GLUT des transporteurs de glucose**

Le transport de glucose à l'intérieur des cellules est l'étape limitante de l'utilisation de glucose. Le glucose est une molécule organique hydrosoluble qui ne peut pas traverser la double couche lipidique de la membrane plasmique. Par conséquent, les molécules de glucose doivent utiliser des protéines transporteurs spécifiques qui permettent uniquement au glucose (et certaines d'autres molécules qui lui sont apparentées) de traverser la membrane cytoplasmique. Les membres de la famille de transporteurs GLUT assurent ce transport facilité de glucose. Ce sont des protéines membranaires qui sont organisées en 12 hélices transmembranaires avec les extrémités C- et N-terminales situées dans le cytoplasme. À date, treize membres de la famille GLUT sont identifiés et présentent des

différences importantes au niveau de la spécificité de substrat, des propriétés cinétiques, du profil d'expression tissulaire et des mécanismes de régulation.

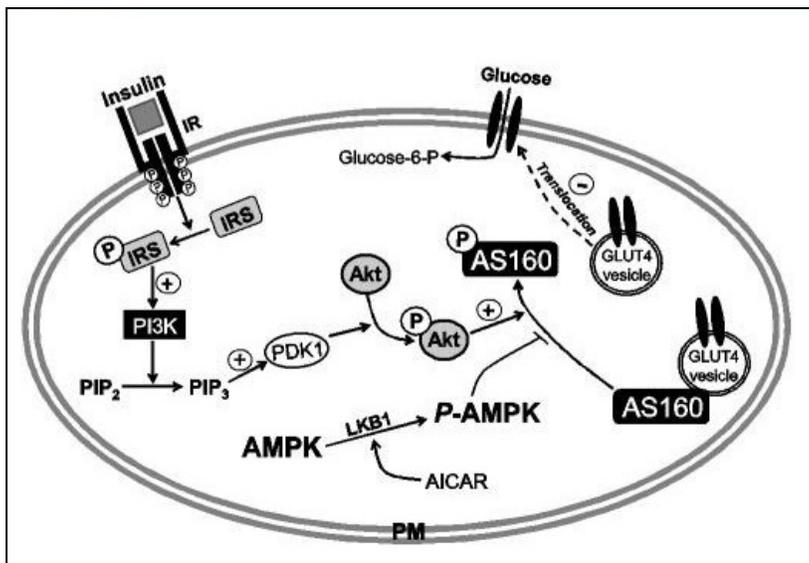
### **3.2. Le transport de glucose au niveau du muscle squelettique**

Le muscle squelettique exprime les transporteurs de glucose GLUT-1 et GLUT-4. GLUT-4 constitue le principal transporteur de glucose responsable de l'augmentation de la captation de glucose induite par l'insuline ou la contraction musculaire. Il représente plus de 90% de la totalité des transporteurs de glucose exprimés dans le muscle squelettique (13). GLUT-1 compte pour seulement 5 à 10% de l'expression total des transporteurs (13) et il est responsable du transport non spécifique de glucose.

La vitesse de transport de glucose dans le muscle squelettique augmente par la stimulation avec l'insuline ou la contraction musculaire grâce à la présence des transporteurs GLUT-4. La capacité, plus au moins grande, de l'insuline à favoriser l'utilisation de glucose par les tissus périphériques définit le degré de sensibilité à l'insuline d'une personne (13). Chez les personnes obèses et/ou diabétiques, l'action de l'insuline est grandement réduite, et cette perturbation serait due à un défaut au niveau du transport de glucose (14). Par contre, l'augmentation de l'expression de GLUT-4 dans le muscle réduit l'hyperglycémie et augmente la sensibilité à l'insuline chez les souris diabétiques (15).

À l'état basal (bas niveaux d'insuline), la majorité des transporteurs GLUT-4 est séquestrée dans des vésicules intracellulaires (14). Lorsque les niveaux d'insuline augmentent, ces vésicules migrent vers la membrane plasmique, où suite à la fusion des vésicules avec la membrane, les GLUT-4 y sont insérés et deviennent disponibles pour le transport de glucose selon son gradient de concentration. Ce processus, appelé translocation, était mis en évidence par Suzuki et Kono (16) qui ont démontré qu'en absence d'insuline, les transporteurs étaient situés dans les vésicules intracellulaires et qu'en présence d'insuline, ces transporteurs étaient retrouvés sur la membrane plasmique. De plus, l'insuline augmente également les capacités intrinsèques des transporteurs de glucose dans la membrane plasmique (augmentation de la quantité de glucose transporté par chaque transporteur et par unité de temps) (14). Il est à noter que l'activité physique

stimule aussi la translocation des vésicules intracellulaires de GLUT-4 vers la membrane plasmique pour moduler le transport de glucose.



**Figure 3** : Représentation schématique des éléments de signalisation intracellulaire activés via le récepteur de l'insuline menant à la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique des cellules musculaires (17)

### 3.3. Mécanismes de régulation du transport de glucose dans le muscle squelettique

#### 3.3.1. Voie insulino-dépendante

La stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline nécessite l'activation de la protéine tyrosine kinase Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase). Le rôle crucial de cette enzyme a été prouvé en utilisant deux inhibiteurs de la PI-3 kinase qui sont structurellement différents, la wortmannine et le LY294002. En effet, ces deux composés inhibent le transport de glucose stimulé par l'insuline autant dans les cellules en culture que dans des préparations *in vitro* de cellules adipeuses et de muscle squelettique (18). D'autre part, l'expression d'une PI-3 kinase constitutivement active induisait la translocation de GLUT-4 en absence d'insuline (19).

La liaison de l'insuline à son récepteur stimule l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur lui permettant de s'autophosphoryler sur des résidus tyrosines qui serviront de points d'ancrage pour des protéines adaptatrices telles que les protéines IRS-1 et 2. La PI-3 kinase est recrutée alors à la membrane où elle est phosphorylée par le récepteur à l'insuline et ainsi activée. La production de PI (3, 4,5) P3 par l'enzyme permet l'activation de la 3'-phosphoinositide-dépendant protein kinase (PDK-1/2) qui phosphoryle l'Akt (Thr308 et Ser473) et la PKC- $\zeta/\lambda$  (Thr410) (Fig 3). Ces kinases ont été proposées comme médiateurs en aval de la PI-3 kinase responsables de la translocation de GLUT-4 suite à une stimulation insulinique (15, 19).

### **3.3.2. Voie insulino-indépendante**

L'exercice physique, à l'instar de l'insuline, augmente la captation de glucose dans le muscle squelettique chez l'animal et l'homme sain ou diabétique (20). Les effets de l'activité physique ne s'associent pas à une modification de la clairance de l'insuline ou une modification de la liaison de l'insuline à son récepteur et ne font pas participer la voie IRS-PI-3 kinase (20). Des études ont suggéré que l'AMP-activated protein kinase (AMPK) est impliquée dans le transport de glucose dans le muscle squelettique (Fig 3). L'AMPK est en effet activée dans le muscle en réponse à la contraction, ce qui entraîne une stimulation du transport de glucose (21). L'AICAR (22), un activateur de l'AMPK, et la metformine (23) augmentent la translocation de GLUT-4 dans le muscle. D'autre part, il a été confirmé que l'augmentation du transport de glucose dans la cellule musculaire par l'exercice physique ou l'AICAR n'est pas inhibée par la wortmannine, suggérant ainsi un mécanisme indépendant de la PI-3 kinase (24).

### **3.3.3. Voies de signalisation alternatives**

Des travaux ont mis en lumière l'existence d'une nouvelle voie de signalisation dépendante de l'insuline. Cette cascade de signalisation serait initiée par la phosphorylation de la protéine Cbl sur des résidus tyrosine par le récepteur de l'insuline. La protéine Cbl est recrutée au récepteur de l'insuline où elle s'associe à la protéine CAP (Cbl-associated protein). Une fois phosphorylé, le complexe Cbl-CAP migre vers une région de la

membrane plasmique enrichie en cavéoline et en flotilline pour former un complexe tertiaire avec cette dernière pour induire la translocation de GLUT-4 vers la membrane cellulaire indépendamment de la PI-3 kinase. L'importance quantitative de cette voie de signalisation par rapport à la voie classique est encore mal étudiée (13).

## **4. TRAITEMENT DU DIABETE**

L'objectif du traitement du diabète est le contrôle strict du taux de sucre dans le sang pour prévenir la survenue des complications aiguës et chroniques liées à la maladie. Le traitement du diabète varie selon chaque personne et selon le type de diabète. Il repose en premier lieu sur des mesures diététiques et d'hygiène de vie du patient diabétique et au recours aux traitements médicamenteux en deuxième lieu.

### **4.1. Diététique et hygiène de vie**

Les mesures diététiques et le contrôle de l'alimentation ainsi que les activités physiques sont souvent suffisants pour équilibrer le diabète. La prise en charge des patients diabétiques doit commencer par la prescription nutritionnelle. Dans le diabète de type 1, elle permet de standardiser les quantités de glucides qui seront apportées à chaque repas pour ne faire varier que les quantités d'insuline qui seront mises en adéquation avec l'activité physique et autres variables. Dans le diabète de type 2, elle cherche à lutter contre les facteurs influençant l'insulinorésistance. La prescription diététique doit répondre à trois objectifs :

- Limiter les épisodes d'hyperglycémie qui constituent un facteur de complication de microangiopathie ;
- Réduire les facteurs alimentaires qui favorisent l'athérosclérose ;
- Assurer une adaptation à l'état physiologique du sujet (poids, activité physique, croissance, grossesse) et à sa sensibilité à l'insuline (25).

Pratiquer une activité régulière (au moins trente minutes d'activité physique d'intensité modérée, comme la marche, sont nécessaires presque à tous les jours) améliore

le contrôle glycémique par une augmentation de la sensibilité à l'insuline. La pratique de l'exercice physique associée à une prise en charge diététique retarde la progression de l'état pré-diabétique vers le diabète. Lorsque les mesures précédentes n'apportent pas un contrôle suffisant de la glycémie, l'introduction d'un traitement médicamenteux s'avère nécessaire (26).

## **4.2. Insulinothérapie**

L'insulinothérapie est le traitement du diabète par injection d'insuline, elle dépend du type de diabète et des choix thérapeutiques faits par le médecin en collaboration avec la personne diabétique. Toutes les personnes diabétiques de type 1 doivent s'injecter de l'insuline quotidiennement. Les personnes atteintes du diabète de type 2 peuvent avoir recours à l'insuline lorsque le plan d'alimentation, la perte de poids, l'activité physique et les antidiabétiques oraux ne permettent pas d'atteindre les objectifs glycémiques. Il existe différentes sortes d'insuline en fonction de leur durée d'action (rapides, retard, analogues lents, mélanges d'insuline) présentes sous forme de flacon, cartouche, stylo injectable ou seringue.

## **4.3. Traitements oraux du diabète de type 2**

Compte tenu de la complexité de la physiopathologie du diabète de type 2 et son évolution naturelle dans le sens d'une détérioration de l'équilibre glycémique lié à un épuisement progressif de la sécrétion insulinique résiduelle, sa prise en charge nécessite le recours à des combinaisons d'agents thérapeutiques ayant des cibles différentes. On peut diviser les hypoglycémisants oraux en 3 catégories.

### **4.3.1. Insulinosensibilisateurs**

#### **4.3.1.1. Metformine**

La metformine (Glucophage®) est le seul biguanide actuellement disponible. Elle réduit l'hyperglycémie des patients diabétiques de type 2 sans augmenter leur insulémie,

mais une sécrétion résiduelle d'insuline est nécessaire à son action. L'effet anti-hyperglycémiant de la metformine résulte essentiellement de la réduction de la production hépatique de glucose, principalement par inhibition de la néoglucogenèse et, à moindre degré, par inhibition de la glycolyse (27).

En outre, elle potentialise l'effet de l'insuline sur la captation musculaire et adipocytaire de glucose. Dans le muscle, elle favorise le stockage de glucose sous forme de glycogène mais n'augmente pas son oxydation. Au niveau intestinal, la metformine réduit l'absorption de glucose mais cela ne participe probablement que de façon marginale à son effet thérapeutique (27).

L'activation de la protéine kinase AMPK ainsi que la réduction de l'activité du facteur de transcription SREBP-1c semblent être les mécanismes moléculaires de la metformine (26).

#### **4.3.1.2. Thiazolidinediones (TZD) ou glitazones**

Les glitazones constituent une nouvelle classe d'hypoglycémiants oraux actuellement représentés par la rosiglitazone et la pioglitazone. Les TZD sont des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR- $\gamma$  induisant la différenciation adipocytaire et agissant sur le métabolisme lipidique par un stockage plus efficace des acides gras libres dans le tissu adipeux et une sécrétion plus importante d'adiponectine, et moindre d'adipokines délétères sur le plan de la sensibilité à l'insuline. Il en résulte une meilleure utilisation périphérique de glucose et une moindre accumulation d'acides gras libres dans les tissus où ils sont susceptibles d'exercer des effets toxiques sur le foie, le muscle strié et les cellules  $\beta$  pancréatiques. Tous ces effets métaboliques prennent 3 à 4 semaines pour se développer (26).

## **4.3.2. Insulinosécréteurs**

### **4.3.2.1. Sulfamides hypoglycémiants**

L'effet insulino-sécréteur est le mécanisme d'action principal des sulfamides hypoglycémiants (SH). Il résulte d'une réduction de la perméabilité de la membrane de la cellule  $\beta$  au potassium. Cet effet, bien que potentialisé par l'hyperglycémie, persiste à glycémie basse. Il correspond à une libération d'insuline préformée et non à une augmentation de sa synthèse. Une réduction de la clairance hépatique de l'insuline est aussi observée avec les SH (26).

### **4.3.2.2. Glinides**

L'effet insulino-sécréteur des glinides fait intervenir les mêmes acteurs que celui des SH, mais il semble que le site de liaison soit différent. Ils se fixent avec une grande affinité et se détachent très rapidement de leur liaison. Ce qui explique qu'ils stimulent plus vite la sécrétion d'insuline pendant un temps plus court (26).

### **4.3.2.3. Incrétinomimétiques et incrétinopotentialisateurs**

Les incréтины sont des hormones récemment découvertes, capables de diminuer la glycémie. C'est une innovation de grande importance dans le traitement du diabète de type 2. Ce sont des hormones sécrétées par l'intestin en réponse à l'ingestion des glucides, elles amplifient la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Le concept d'incrétine est né de l'observation que l'effet insulino-sécréteur de glucose donné par voie orale était nettement supérieur à celui de glucose administré par voie intraveineuse de façon à reproduire la courbe d'hyperglycémie orale. Cette différence de sécrétion de l'insuline est due au passage du glucose dans l'intestin: le glucose active 2 hormones intestinales qui, en passant dans le sang, stimulent certains récepteurs des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas et amplifient la sécrétion d'insuline. Les incréтины diminuent également la sécrétion du glucagon, sécrété par les cellules alpha du pancréas, lorsque la glycémie est trop basse. Les principales hormones responsables de l'effet incrétine sont : Le GLP1 (Glucagon-Like-

Peptide-1) sécrété par des cellules de l'iléon et le GIP (Glucose Dependent Insulinotropic Polypeptide) sécrété dans le duodénum (28).

L'action des incrétines est dépendante du glucose. Non seulement les incrétines sont sécrétées en réponse à l'ingestion de glucides, mais elles ne stimulent pas la production d'insuline et ne réduisent pas la production de glucagon que lorsqu'il y a une hyperglycémie. Elles ne stimulent pas la production d'insuline si la glycémie est normale, d'où le faible risque d'hypoglycémie que devrait représenter les thérapeutiques visant à amplifier leur action. Ces incrétines sont dégradées en quelques minutes par l'enzyme DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) (28).

De ce fait, deux approches ont été développées en thérapeutique dans le but de renforcer la voie des incrétines chez les diabétiques :

- La production d'analogues ou d'agonistes du GLP-1 insensibles à l'action de la DPP-4 ;
- L'inhibition compétitive de l'enzyme DPP-4 qui permet de prolonger la durée de vie et l'effet du GLP-1 et du GIP endogènes) (29).

### **4.3.3. Inhibiteurs des $\alpha$ -glucosidases**

Les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases inhibent de façon réversible les  $\alpha$ -glucosidases de la bordure en brosse qui interviennent dans le clivage de nombreux disaccharides alimentaires et des résidus de la digestion de l'amidon. Il en résulte un retard à l'absorption des glucides alimentaires et ainsi une réduction du pic d'hyperglycémie postprandiale et une moindre stimulation de l'insulino-sécrétion prandiale. L'effet sur la glycémie à jeun est en revanche modeste (26).

## **5. MEDECINE ALTERNATIVE : APPORTS DE LA PHYTOTHERAPIE DANS LE TRAITEMENT DU DIABETE**

### **5.1. Histoire des plantes médicinales**

L'histoire des plantes médicinales est associée à l'évolution des civilisations. L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique aussi vieille que l'histoire de l'humanité. Le savoir ancestral représente une mine d'informations extrêmement précieuses pour tous les chercheurs. En effet, c'est seulement au cours des dernières décennies que les recherches scientifiques ont confirmé les vertus thérapeutiques de plusieurs des plantes médicinales, utilisées de façon empirique depuis des millénaires.

L'expression «médecine traditionnelle» se rapporte aux pratiques, méthodes, savoirs et croyances en matière de santé qui impliquent l'usage à des fins médicinales de plantes, de parties d'animaux et de minéraux, de thérapies spirituelles et de techniques pour soigner, diagnostiquer et prévenir les maladies ou préserver la santé (30).

Le monde végétal constitue la source majeure de médicaments grâce à la richesse de produits appelés métabolites secondaires, des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal. Les plantes médicinales demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives (tanins, glucosides, flavonoïdes, saponines, résines...) et qui procurent des propriétés curatives appréciables qu'aucune chimie synthétique et combinatoire ne peut nous offrir.

Une nouvelle approche voit le jour, l'«ethnopharmacologie», visant l'évaluation scientifique de l'ensemble des pratiques traditionnelles relatives à la médication par les plantes et la mise en évidence de leurs propriétés curatives. Cette approche constitue la principale voie de découverte de nouvelles molécules candidates à servir de médicaments (30).

## 5.2. Rôle des plantes médicinales antidiabétiques

Le diabète est une maladie ancienne dont les symptômes classiques faim et soif importants avec augmentation du volume d'urine, maigreux ou au contraire obésité sont bien connus par la majorité des guérisseurs. Ainsi, le traitement traditionnel de cette maladie était particulièrement axé sur le traitement de ses symptômes externes. Comme traitement du diabète, les médecins grecs préconisaient alors à leurs patients un traitement de la soif intense (31).

Plusieurs enquêtes ethnobotaniques dans plusieurs régions du monde estiment que plus de 1200 espèces végétales sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes (31, 32). Les investigations ethnobotaniques sont actuellement centrées sur la validation expérimentale des propriétés curatives de ces plantes. Dans 81% des cas, les indications traditionnelles de plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées (32).

L'exemple le plus connu est celui de *Galega officinalis*, une plante largement utilisée dans le traitement du diabète en Europe médiévale. Les premières investigations ont révélé la présence de guanidines en forte concentration dans cette plante. Plus tard, les propriétés hypoglycémiantes des guanidines ont été mises en évidence, ce qui a conduit à la découverte d'une nouvelle molécule en 1929, la metformine, et qui a fait son apparition sur le marché dans les années 1950 aux Etats Unis. La metformine reste de nos jours le traitement le plus efficace du diabète de type 2 (32).

L'action hypoglycémiante des plantes peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes. Ainsi, deux types de substances végétales semblent intéressantes : celles qui agissent comme l'insuline ou d'autres médicaments hypoglycémiantes (en empêchant l'absorption intestinale du glucose ou en augmentant la sécrétion de l'insuline pancréatique). D'autres, principalement des tanins, agissent sur le diabète lui-même au niveau cellulaire en favorisant l'action de l'insuline (en diminuant la résistance à l'insuline) et sur les complications du diabète par leur pouvoir antioxydant neutralisant l'effet des radicaux libres et limitant l'inflammation dans les différents tissus. Certains extraits de plantes contiennent parfois ces deux types de substances.

La phytothérapie joue un grand rôle dans le prédiabète en association avec un régime pauvre en glucides et en lipides. Elle sera souvent une médication d'accompagnement du traitement conventionnel. En pratique, les extraits de plantes antidiabétiques peuvent être utilisés sous diverses formes galéniques. Le tableau 1 illustre quelques exemples de plantes utilisées dans le traitement du diabète.

**Tableau 1** : Drogues végétales utilisées dans le diabète (33)

| <b>Plantes utilisées</b>                 | <b>Drogue</b> | <b>Dose journalière</b> |
|--|---------------|-------------------------|
| Ail ( <i>Allium sativum</i> )            | Bulbe         | 4g                      |
| Artichaut ( <i>Cynara scolymus</i> )     | Feuilles      | 4 à 9g                  |
| Fenugrec ( <i>Trigonella graecum</i> )   | Semences      | 6g                      |
| Gymnema ( <i>Gymnema sylvestre</i> )     | Feuilles      | 500mg (extrait sec)     |
| Galéga ( <i>Galega officinalis</i> )     | Feuilles      | 2g                      |
| Guar ( <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> ) | Semences      | 15g                     |
| Jamboul ( <i>Jambos vulgaris</i> )       | Semences      | 2 à 4g                  |
| Melon ( <i>Cucumis melo</i> )            | Semences, jus | 300mg (lyophilisat)     |
| Olivier ( <i>Olea europaea</i> )         | Feuilles      | 600mg (extrait sec)     |
| Opontia ( <i>Opuntia humifusa</i> )      | Cladodes      | 3g                      |

### **5.3. Le grenadier : *Punica granatum***

#### **5.3.1. *Punica granatum* dans l'histoire**

Le grenadier est un arbre fruitier appartenant à la famille des Punicacés qui comprend 3 espèces différentes : *Punica protopunica*, *Punica nana* et *Punica granatum*, espèce la plus commune. Le nom du genre, *Punica*, a été l'appellation romaine de la ville de Carthage (banlieue nord de la Tunisie) où poussaient les meilleurs grenadiers. Le grenadier est cultivé depuis la plus haute Antiquité pour ses fruits comestibles (les grenades) et pour les qualités ornementales de ses grandes fleurs (34).

Durant l'histoire, la grenade était connue et appréciée de tous les peuples antiques, par les juifs, par les égyptiens, par les phéniciens et par les grecs et les romains pour ses

qualités médicinales et gastronomiques. Dans la Bible on parle très explicitement du « must de grenade », ce qui démontre que les juifs buvaient le jus de grenade après qu'ils l'aient laissé fermenter (34).

### 5.3.2. Aspects ethnobotaniques de *P. granatum*

#### 5.3.2.1. Classification botanique

- Règne : *Plantae*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Ordre : *Myrtales*
- Famille : *Punicaceae*
- Genre : *Punica*
- Espère : *P. granatum*



#### 5.3.2.2. Description de la plante

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune-beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre.

#### 5.3.2.3. Distribution de *P. granatum*

Le grenadier est une espèce originaire d'Asie occidentale (de l'Himalaya au nord de l'Inde jusqu'en Iran), mais elle a été cultivée et naturalisée depuis les temps anciens dans les régions du bassin méditerranéen. Elle est aussi cultivée dans tous les continents dans des zones tempérées chaudes : comme le Proche orient, Chine, Sud-est des États-Unis, Chili, Argentine. La ville de Grenade en Espagne doit son nom au grenadier.

La culture du grenadier est très ancienne en Tunisie. Elle date, au moins, de l'époque phénicienne. Cette culture s'étend sur l'ensemble du pays sauf dans les zones à altitude. La production de grenades continue à augmenter considérablement. La majeure partie de cette production est destinée au marché local. Les quantités exportées restent relativement faibles et ne dépassent pas 1% de la production totale (35). Les fruits mûrissent en automne et sont récoltés pour être utilisés directement ou commercialisés. Les variétés de grenadier cultivées en Tunisie sont toutes locales, très nombreuses et sont en quasi-totalité des « variétés populations » sur lesquelles il n'y a pas des travaux de sélection.

La nomenclature est purement locale. Plusieurs régions donnent leurs noms aux variétés cultivées. L'échange de matériel végétal entre différentes régions est très fréquent et les synonymies et homonymies doivent être très nombreuses. Il a été identifié une quinzaine de variétés. Les principales variétés commerciales sont: Zehri, Gabsi, Garsi... Les périodes de maturation vont de septembre à décembre et la qualité des fruits est, pour la plupart, satisfaisante (35-38). Des récentes investigations ont identifié plus de 60 écotypes nommés principalement en fonction de leurs origines géographiques ainsi que la couleur des fruits (39).

### **5.3.3. Phytochimie de *P. granatum***

Toutes les parties du fruit du grenadier semblent avoir des propriétés thérapeutiques et certaines études rapportent que l'écorce, les racines, les feuilles et le tronc ont aussi des effets médicaux bénéfiques. Des recherches actuelles semblent indiquer que les principaux constituants thérapeutiques du grenadier sont les ellagitannins (incluant les punicalagins), l'acide punique, les flavonoïdes, les anthocyanidines, les anthocyanines, les flavonols estrogéniques et les flavones. Le tableau 2 liste les principaux constituants du grenadier (34).

**Tableau 2** : Principaux constituants des différentes parties du grenadier (34)

| <b>Parties du grenadier</b>          | <b>Constituants</b>   |
|--------------------------------------|---|
| Jus de fruit                         | Anthocyanines, glucose, acide ascorbique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, catéchines, EGCG, quercetine, rutine, nombreux minéraux, acides aminés |
| Huile de graine                      | 95 % acide punique, acide ellagique et autres acides gras, stérols  |
| Péricarpe (écorce et zeste) de fruit | Punicalagins phénoliques, acide gallique et autres acides gras, catéchine, EGCG, quercetine, rutine, et autres flavonoles, flavones, flavonones, anthocyanidines  |
| Feuilles                             | Tannins (punicalin et punicafolin) et flavones glycosides (lutéoléine et apigénine)   |
| Fleurs                               | Acide gallique, acide ursolique, triterpenoïdes   |
| Racines et écorce                    | Ellagitannins (punicalins et punicalagins), nombreux alcaloïdes pipéridines   |

L'acide gallique ou acide 3, 4,5-trihydroxybenzoïque est présent dans le péricarpe des fruits et les fleurs du grenadier sous sa forme libre, comme les glycosides, comme son dimère l'acide ellagique et comme un composant des ellagitannins. Son effet hypoglycémiant *in vivo* découle en partie de sa capacité à activer et induire l'expression du PPAR- $\gamma$ , cible des médicaments insulino-sensibilisateurs comme les thiazolidinediones (40).

L'acide ursolique et l'acide oléanique sont des dérivés triterpénoïdes, souvent ensemble, présents dans différentes parties du grenadier (fleur et graine). L'acide oléanique inhibe l'absorption intestinale de glucose chez les rats comme la phlorizine (41). L'acide ursolique retarde l'absorption sanguine du glucose chez les rats diabétiques de type 2 et exerce un effet protecteur encore mal connu sur les îlots de Langerhans (42).

#### **5.3.4. Activités thérapeutiques de *P. granatum***

Le grenadier a été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. En médecine Ayurvedique, le grenadier est considéré comme « une pharmacie en soi » et il a été utilisé comme agent antiparasitaire, un « tonique sanguin » et pour traiter les aphtes, les

diarrhées et les ulcères. Le grenadier a servi aussi de remède pour le diabète dans le système Unani de la médecine pratiquée au Moyen Orient et en Inde (34). Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées et incluent traitement et prévention du cancer, les maladies cardiovasculaires, diabète, dysfonctionnement érectile et protection contre les radiations ultraviolettes. Ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydante, anticarcinogénique, anti-inflammatoire et antidiabétique du grenadier.

#### **5.3.4.1. Activité antioxydante de *P. granatum***

Des études *in vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux (43). Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit. Les punicalagins sont les ellagitannins majeurs dans le fruit entier et peuvent être hydrolysés en acide ellagique et d'autres plus petits polyphénols *in vivo* (44).

#### **5.3.4.2. Activité anti-inflammatoire de *P. granatum***

Des études *in vivo* ont démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénase, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l'inflammation), a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. La lipo-oxygénase, qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait (45).

Des rats obèses Zucker Fatty ayant reçu une supplémentation de jus de grenade ou d'extraits de fruits de grenadier durant 5 semaines montrent une diminution significative de l'expression des marqueurs de l'inflammation vasculaire, la trombospondine et la cytokine

TGF- $\beta$ 1 et une augmentation significative de l'expression de la synthétase endothéliale de l'acide nitrique (eNOS) en comparaison avec les rats contrôles (46). Cependant, les propriétés anti-inflammatoires du grenadier dans la protection de l'endothélium et dans la diminution de l'athérosclérose n'ont pas été encore validées par des essais cliniques chez l'homme (43).

#### **5.3.4.3. Activité anticarcinogénique de *P. granatum***

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur (47). Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose (48).

Une étude clinique en phase II portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate récurrent a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate specific antigen) durant le traitement avec du jus de grenade. La même étude a indiqué que le grenadier pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, apoptotique, antioxydante et anti-inflammatoire (49).

#### **5.3.4.4. Activité antidiabétique de *P. granatum***

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL cholestérol en améliorant les ratios total/HDL et LDL/HDL cholestérol. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques (50) sans affecter les paramètres diabétiques (51).

Plusieurs études ont montré, en utilisant différents modèles animaux et mêmes des patients diabétiques, des effets bénéfiques du traitement avec les extraits de grenadier.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette activité hypoglycémiante. Le tableau 3 illustre les différentes études montrant l'effet antidiabétique du grenadier et les mécanismes d'actions proposés.

**Tableau 3** : Différentes études montrant l'effet antidiabétique du *P.granatum* et les différents mécanismes d'action proposés

| <b>Effet</b>  | <b>Partie de la plante</b> | <b>Modèle biologique</b>              | <b>Références</b> |
|---|----------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| ↓glycémie   | Fleurs                     | Rats diabétiques induits par alloxane | (52)              |
|   | Écorce de fruits           | Rats diabétiques induits par alloxane | (53)              |
|   | Graines                    | Rats streptozotocine                  | (54)              |
| Inhibition $\alpha$ -glucosidase                            | Fleurs                     | Rats Zucker diabetic fatty            | (55)              |
| ↑ Sensibilité à l'insuline par activation du PPAR- $\gamma$ | Fleurs                     | Rats Zucker diabetic fatty            | (56)              |
| Restauration des mRNA GLUT-4 cardiaques                     | Fleurs                     | Rats Zucker diabetic fatty            | (56)              |
| Modulation des enzymes du métabolisme glucidique            | Fleurs                     | Rats streptozotocine                  | (57)              |

Grâce aux travaux présentés dans ce mémoire, nous avons découvert un nouveau mécanisme d'action expliquant l'effet hypoglycémiant du grenadier permettant ainsi une contribution significative dans la compréhension de l'effet bénéfique de cette plante dans le traitement du diabète.

# Matériels et Méthodes

---

## 1. Extraction et préparation des plantes

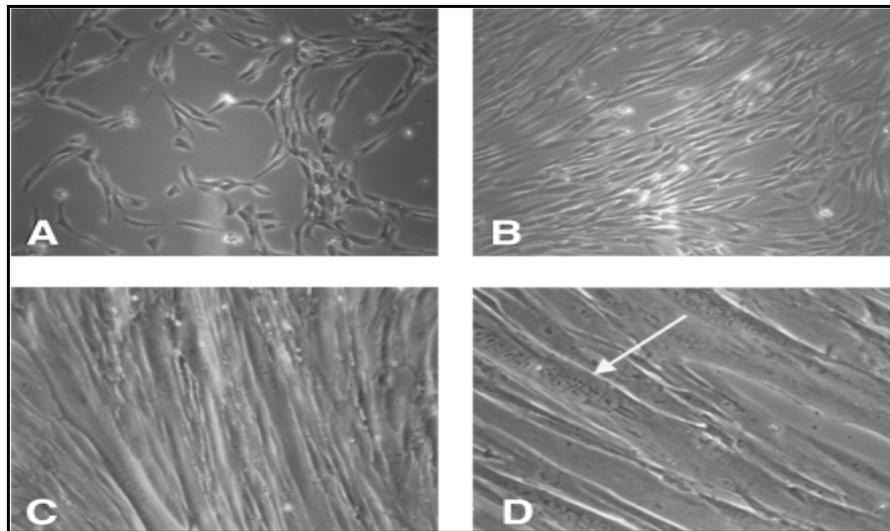
Deux variétés tunisiennes du grenadier, *Punica granatum*, ont été choisies, la variété Gabsi (GB) et Espagnoule (EP). Deux parties de la plante ont été étudiées, les fleurs et les fruits à 3 stades de maturation soit 2, 4 et 6 mois. Les différentes parties du grenadier ont été récoltées dans différentes régions de la Tunisie selon la localisation géographique des variétés. Les échantillons ont été identifiés par l'équipe tunisienne du Laboratoire de Biotechnologies végétales Appliquées à l'Amélioration des cultures à Gabès sous la direction du Dr Mars et du Dre Bekir Jalila. Les fleurs ont été récoltées au mois de Mai 2009 (Stade0) et les fruits aux mois de Juin (Stade1), Août (Stade2) et Octobre (Stade3) 2009 selon leurs stades de maturation. Les différents échantillons ont été séchés à l'air ambiant puis réduits sous forme de poudre. Les extraits de grenadier ont subi une extraction à 80% avec l'éthanol à chaud. Après centrifugation, le surnageant a été filtré et séché puis conservé dans des eppendorfs à 4°C. Les extraits testés ont été remis en suspension dans du Dimethyl Sulfoxide (DMSO) jusqu'à une concentration finale de 100mg/ml. Après solubilisation dans le bain-marie, le mélange a été centrifugé à 3000 RPM pour 15 minutes à température ambiante. Le surnageant a été ensuite séparé et conservé à -20°C. Les extraits ainsi congelés ont été décongelés à 37°C et dilués à la concentration requise dans le milieu de culture avant chaque expérience de manière à obtenir une concentration finale de 0.1 à 0.2% DMSO.

## 2. Culture cellulaire

Les myoblastes (Fig 4-A) d'origine murine C2C12 (American Type Culture Collection; ATCC) ont été cultivés dans un milieu de prolifération composé de Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) avec 10% de Fetal Bovine Serum (FBS), 10% de Horse Serum (HS) et 0.5% d'antibiotiques pénicilline- streptomycine (PS). Lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence, les cellules ont été repiquées dans des plaques de 12 puits ( $7.5 \times 10^4$  cellules/ml) ou 6 puits ( $5 \times 10^4$  cellules/ml) et cultivées pendant 2 jours (80% de

confluence; jour 0). La différenciation a été induite en remplaçant le milieu de prolifération par celui de différenciation composé du DMEM avec 2% de HS et 0.5% de PS. Le milieu de différenciation a été changé à tous les 2 jours jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour où les cellules musculaires C2C12 ainsi différenciées (les myotubes, Fig 4-D) ont été incubées avec les différents extraits du grenadier, 0.1% DMSO (contrôle véhicule) et metformine (400µM; contrôle positif) pendant 18 heures et insuline (100 nM) pour 30 minutes.

Lors de l'étude de l'effet des inhibiteurs sur le transport de glucose et les voies de signalisation, les cellules ont été prétraitées 1 heure avec 50µM de LY294002 ou 20µM de Compound C avant d'ajouter les extraits et les contrôles.



**Figure 4** : Vue microscopique du processus de différenciation des myoblastes en myotubes. (A et B) : Myoblastes en phase de prolifération. (C) : Myotubes au 4<sup>ème</sup> jour de différenciation. (D) : Myotubes au 6<sup>ème</sup> jour de différenciation

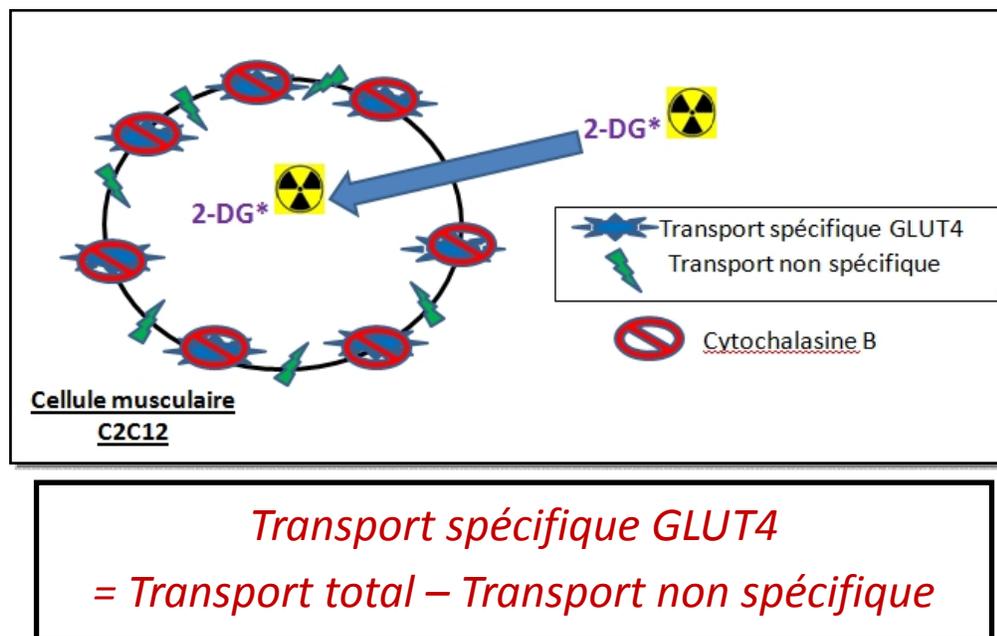
### 3. Essai de cytotoxicité à la LDH

C'est un essai colorimétrique utilisant le kit de LDH (Roche, Mannheim, Germany) qui permet de mesurer l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) relâchée dans le milieu de culture lorsque les cellules sont endommagées. Suite au traitement des cellules avec les différents extraits à différentes concentrations, les milieux de culture pour chaque condition ont été récoltés à part et utilisés pour mesurer la LDH relâchée dans le

surnageant. Pour mesurer les niveaux de LDH intracellulaires, les cellules ont été lysées avec 1% de triton dans le milieu de culture 10 minutes à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les lysats ont été récoltés dans des tubes eppendorfs puis centrifugés à 250g, à 4°C pendant 30 minutes. Les résultats ont été exprimés en termes de ratio LDH relâchée/LDH totale (LDH totale = LDH relâchée + LDH lysats) et comparés avec les résultats des cellules traitées avec le contrôle DMSO. La concentration optimale non toxique choisie pour chaque extrait est de 50 µg/ml.

#### 4. Essai du transport de glucose

C'est un essai radioactif qui consiste à mesurer le transport dans les cellules musculaires différenciées C2C12 d'un sucre non métabolisable et marqué au tritium, le 2-Desoxy-D-[1-<sup>3</sup>H]-glucose, dont l'entrée dans la cellule s'effectue par un transport non spécifique et un transport spécifique via les transporteurs GLUT-4 (inhibé par la cytochalasine B). La quantité de glucose radioactif incorporé dans la cellule est mesurée dans les lysats cellulaires en présence de liquide à scintillation.



**Figure 5** : Principe schématique de la mesure du transport spécifique de glucose dans les cellules musculaires C2C12

À la fin des différents traitements (i.e. 7<sup>ème</sup> jour de différenciation), les cellules musculaires C2C12 différenciées ont été rincées 2 fois avec du tampon Krebs chauffé à 37°C (136mM NaCl, 20mM HEPES, 4.7mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 4.05mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.95mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4) contenant du glucose (5mM). Les puits destinés à être un contrôle positif ont été incubés avec du tampon Krebs supplémenté de 5mM de glucose et 100nM d'insuline. Pour les autres conditions, les cellules ont été incubées dans du Krebs tampon et 5mM du glucose. Après 30 minutes à 37°C, les cellules ont été rincées trois fois avec du tampon Krebs sans glucose (37°C; pH 7.4) et le transport de glucose a été initié par l'addition de 500µl/puits du tampon Krebs sans glucose (37°C; pH 7.4) contenant 10µM 2-Desoxy-D-[1-<sup>3</sup>H]-glucose (1µCi/ml). Certains puits ont été traités avec 10µM de cytochalasin B (inhibiteur des transporteurs spécifiques de glucose) afin de pouvoir quantifier le transport non spécifique. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, les cellules ont été rincées trois fois avec du tampon Krebs froid (4°C) contenant du glucose (5mM) et lysées avec 500µl de NaOH (0.1M) pour 30 minutes à température pièce. Les lysats de chaque puits ont été complétés avec 4 ml de liquide de scintillation (Ready-gel, Beckman Coulte, Mississauga, Ontario, Canada) et la quantité de radioactivité du 2-Desoxy-D-[1-<sup>3</sup>H]-glucose incorporée dans les cellules a été mesurée avec un compteur à scintillation. Le transport spécifique de glucose via les transporteurs GLUT-4 a été obtenu par soustraction du transport non spécifique (avec cytochalasin B) du transport total (sans cytochalasin B).

## **5. Immunobuvardage (Western Blot)**

À la fin des différents traitements, les lysats cellulaires ont été préparés avec le tampon de lyse RIPA (Radio Immun Precipitation Assay) (0.1M HEPES, 0.3M NaCl, 10mM EGTA, 4mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10 % glycérol, 2% Triton X-100, 0.2% SDS, 2mM PMSF, 10mM NaF, 100µM Na-orthovanadate, 1mM Na-pyrophosphate, cocktail d'inhibiteurs de protéase Roche; pH 7.4). Pour le western blot mesurant la quantité des transporteurs GLUT-4, un tampon sucrose (20mM Tris, 225mM sucrose, 2mM PMSF, cocktail d'inhibiteurs de protéase Roche; pH 7.4) a été utilisé à la place du tampon de lyse RIPA.

Les protéines ont été quantifiées en utilisant le kit du dosage de protéines au BSA. Les protéines de chaque échantillon (40µg ou 15µg pour l'essai avec le tampon sucrose) ont été séparées dans 10% SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Les membranes ont été bloquées avec 5% de lait dans du TBST (200mM Tris base, 1.37M NaCl et 0.1% Tween-20; pH 7.6) pendant 2 heures puis incubées avec l'anticorps primaire (Phospho-Akt (Ser473), Cell signaling, #9271, 1/1000; Phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172), Cell signaling, #2535, 1/500; Glut4 (1F8) Mouse mAb, cell signaling, #2213, 1/1000) durant la nuit à 4°C. Après lavage avec du TBST (pH 7.6), les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante (anti-rabbit, Jackson, 5% BSA, 1/20000 ou anti-mouse IgG, cell signaling, #7076, 5% BSA, 1/4000). Les bandes ont été détectées par l'ECL Plus Western blot detection system (Perkin Elmer, Woodbridge, Canada). Les membranes ont été reprises avec des anticorps dirigés contre l'Akt (Cell signaling, #9272, 1/1000); AMPK $\alpha$  (Cell signaling, #2532, 1/1000) et  $\beta$ -actin (Cell signaling, #4967, 1/1000) après stripping durant 10 minutes à température ambiante avec un tampon de stripping (glycine, SDS, Tween-20; pH 2.2). Toutes les expériences ont été effectuées sur 3 préparations cellulaires différentes. Image J 1.42q software (NIH, USA) a été utilisée pour la quantification des bandes de western blot.

## **6. Analyse statistique**

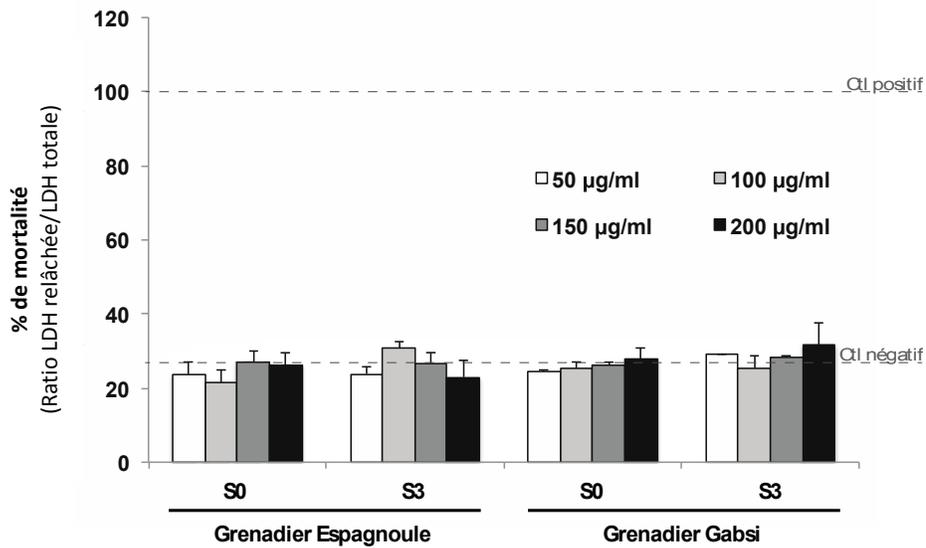
Toutes les expériences ont été effectuées sur au moins trois préparations cellulaires indépendantes avec mesures duplicata ou triplicata selon le bioessai. Les données ont été analysées par one-way et two-way ANOVA et les tests post hoc appropriés (logiciel Sigmatstat, version 3.4). Un niveau de signification de 5% a été adopté pour toutes les comparaisons ( $p < 0.05$ ). Les résultats sont exprimés par rapport à leur contrôle DMSO et présentés comme moyenne  $\pm$  SEM.

# Résultats

---

## **Les extraits de grenadier ne sont pas toxiques pour les cellules musculaires C2C12**

Au départ, les différents extraits du grenadier tunisien (variétés Espagnoule et Gabsi aux stades fleur et fruit mûr) ont été testés à des concentrations croissantes (50, 100, 150 et 200µg/ml) afin de déterminer la concentration optimale non toxique. Après 18 heures de traitement, aucune toxicité n'a été observée dans les cellules traitées avec les différentes concentrations d'extraits du grenadier (indépendamment de la variété et du stade de maturation) avec un niveau de LDH relâchée dans le milieu extracellulaire semblable à celui relâché dans les cellules non traitées ou traitées avec le véhicule DMSO (NS, Fig 1). Les cellules traitées avec le contrôle positif (le détergeant Triton) sont toutes mortes puisque le ratio de  $LDH_{relâchée}/LDH_{totale}$  a atteint presque 100% et ceci a été confirmé morphologiquement (toutes les cellules ont été détachées).



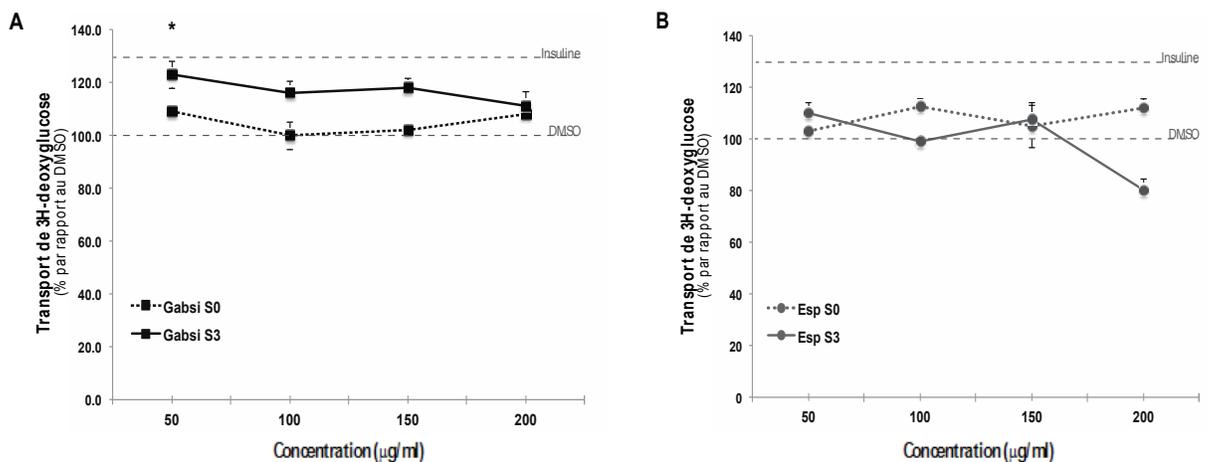
**Résultat Figure 1 : Test de cytotoxicité à la LDH des extraits des grenadiers Gabsi et Espagnole dans les cellules musculaire C2C12.** Les myotubes C2C12 ont été incubés pendant 18 heures avec DMSO (0.1% et 0.2%) comme contrôles véhicules et Triton 1% comme contrôle positif ainsi que des concentrations croissantes (50, 100, 150 et 200µg/ml) des extraits du grenadier Espagnole et Gabsi aux stades fleur (S0) et fruit mûr (S3). La cytotoxicité a été mesurée tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Ctl négatif : cellules non-traitées, cellules traitées avec 0.1% DMSO ou cellules traitées avec 0.2% DMSO. Ctl positif : cellules traitées avec 1% Triton X-100. Les résultats sont exprimés en ratio [LDH relâchée/LDH totale] par rapport à leur contrôle DMSO et présentés comme moyenne  $\pm$  SEM. (\* $p < 0.05$  VS DMSO en one-way ANOVA,  $n=3$ ).

### **Le grenadier Gabsi stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12**

On a ensuite mesuré l'effet des extraits de grenadier sur le transport de glucose dans les cellules musculaires différenciées C2C12 traitées avec les différentes concentrations non toxiques précédemment testées. Les myotubes C2C12 ont été incubés pendant 18 heures avec les extraits des grenadiers Espagnole et Gabsi aux stades fleur (S0) et fruit mûr (S3) à des concentrations croissantes (50, 100, 150 et 200µg/ml), DMSO (0.1% et 0.2%) comme contrôles véhicules et 100nM d'insuline comme contrôle positif durant 30

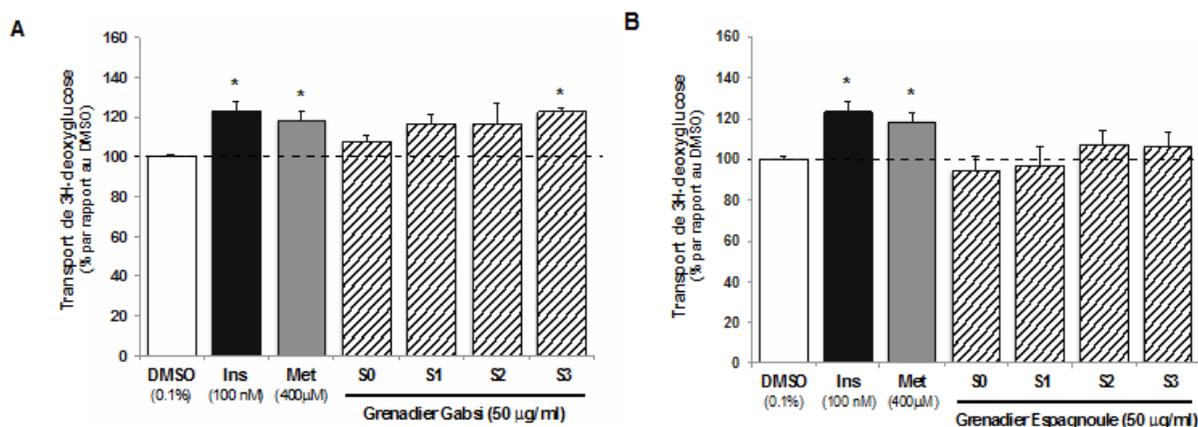
minutes. Le transport de glucose a été mesuré par un essai radioactif tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes.

L'insuline (100nM) a stimulé le transport de glucose de  $129.3\% \pm 4.4$  ( $p < 0.05$  vs DMSO; Fig 2A & 2B). Les fleurs des deux variétés du grenadier tunisien n'ont pas stimulé le transport de glucose dans les cellules C2C12 aux concentrations testées par rapport au contrôle DMSO (Fig 2A & 2B). Par contre, le fruit mûr (S3) du grenadier Gabsi a augmenté le transport de glucose dans les myotubes de façon significative par rapport au DMSO, alors que celui de la variété Espagnoule n'a pas eu d'effet. De plus, le fruit mûr du grenadier Gabsi a significativement stimulé le transport de glucose par rapport à sa fleur ( $123.0\% \pm 8.8$  vs  $108.9\% \pm 2.3$  respectivement;  $p < 0.05$ ; Fig 2A). Il est intéressant à noter que l'effet maximal du transport de glucose des fruits mûrs du grenadier Gabsi est produit avec la concentration de  $50\mu\text{g/ml}$  ( $123.0\% \pm 8.8$ ;  $p < 0.05$  vs DMSO; Fig 2A) et cet effet diminue avec l'augmentation de la dose ( $111.0\% \pm 6.6$  à  $200\mu\text{g/ml}$ ; NS vs DMSO; Fig 2A).



**Résultat Figure 2 : Courbe dose-réponse du transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 stimulées par les extraits des grenadiers Gabsi et Espagnoule.** Les myotubes C2C12 ont été incubés 18 heures avec les extraits du grenadier Gabsi (**panneau A**) et Espagnoule (**panneau B**) aux stades fleur (S0) et fruit mûr (S3) à des concentrations croissantes (50, 100, 150 et  $200\mu\text{g/ml}$ ), DMSO (0.1% et 0.2%) comme contrôles véhicules et 100nM d'insuline comme contrôle positif. Le transport de glucose a été mesuré par un essai radioactif tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du transport de  $^3\text{H}$ -deoxyglucose par rapport à leur contrôle DMSO et présentés comme moyenne  $\pm$  SEM. ( $*p < 0.05$  VS DMSO en one-way ANOVA,  $n=3$ ).

Enfin, un criblage des extraits des grenadiers Espagnoule et Gabsi aux différents stades de maturation (S0, S1, S2 et S3) à la concentration optimale non toxique choisie de 50 µg/ml a été réalisé (Fig 3). Nos résultats ont montré que le grenadier Espagnoule n'a pas significativement stimulé le transport de glucose dans les C2C12 à aucun stade de maturation, similaire aux résultats obtenus dans la courbe dose-réponse (Fig 2B). Par contre, on a observé que le grenadier Gabsi, au stade 3 (fruit mûr) a significativement stimulé le transport de glucose par rapport au contrôle DMSO ( $123.0\% \pm 1.6$  vs  $100.0\% \pm 2.3$ ;  $p < 0.05$ ; Fig 3A) et à des niveaux comparables à ceux de l'insuline ( $123\% \pm 4.9$ ;  $p < 0.05$ ; Fig 3A). Cependant, il n'y a pas d'effet marqué du stade de maturation puisque une analyse statistique (two-way ANOVA) des 2 variétés de grenadier aux différents stades (sans prise en compte des contrôles) a révélé que la variété Gabsi est la variété la plus active ( $p < 0.05$ ) dans la stimulation du transport de glucose dans le muscle sans avoir d'effet significatif du stade de maturation (NS). Ainsi, on a choisi la variété Gabsi aux stades fleur (S0) et fruit mûr (S3) à la concentration de 50 µg/ml pour élucider les mécanismes d'action impliqués dans la stimulation du transport de glucose du grenadier tunisien dans le muscle squelettique.



**Résultat Figure 3: Effet de la variété et du stade de maturation des extraits des grenadiers Gabsi et Espagnoule sur le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12.** Les myotubes C2C12 ont été incubés 18 heures avec les différents extraits du grenadier Gabsi (**panneau A**) et Espagnoule (**panneau B**) à la concentration de 50 μg/ml, DMSO (0.1%) comme contrôle véhicule et 400 μM de metformine (Met) et 100 nM d'insuline (Ins) durant 30 minutes comme contrôles positifs. Le transport de glucose a été mesuré par un essai radioactif tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du transport de <sup>3</sup>H-deoxyglucose par rapport à leur contrôle DMSO et présentés comme moyenne ± SEM. (\*p<0.05 VS DMSO en one-way ANOVA, n=3).

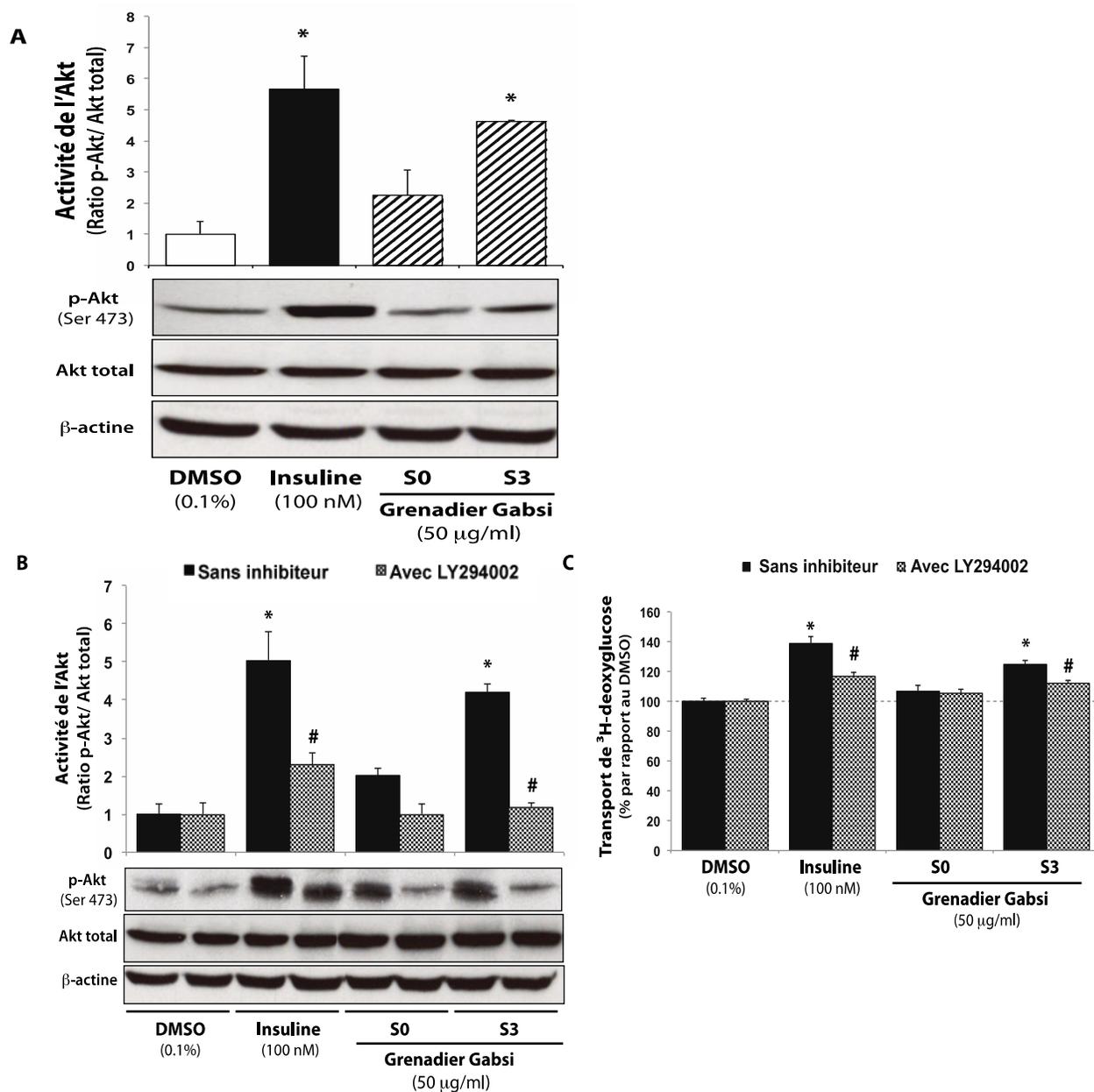
### Voies de signalisation impliquées dans le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 stimulées par le grenadier Gabsi

Comme décrit auparavant, deux voies principales régulent le transport de glucose dans le muscle squelettique : à savoir la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. Alors, les niveaux d'activation de l'Akt et de l'AMPK ont été mesurés après traitement des cellules C2C12 avec l'extrait du grenadier Gabsi aux stades fleur (S0) et fruit mûr (S3). Ceci a été réalisé par l'évaluation des niveaux de phosphorylation de l'Akt et de l'AMPK par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la phospho-Akt (Ser 473) et la phospho-AMPK (Thr172) puis en les comparant à leurs taux totaux respectifs (Akt<sub>tot</sub> et AMPK<sub>tot</sub>).

- **Seul le fruit mûr du grenadier Gabsi active la voie de l'Akt pour stimuler partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12**

Tel qu'anticipé, l'insuline a activé la voie de l'Akt de 6 fois par rapport au contrôle DMSO ( $5.7 \pm 1.1$  unité arbitraire [U.A.] vs  $1.0 \pm 1.5$  U.A. respectivement;  $p < 0.05$ ; Fig 4A). Quant au grenadier, seul le fruit mûr (S3) a significativement phosphorylé l'Akt par rapport au DMSO ( $4.6 \pm 0.2$  U.A. vs  $1.0 \pm 1.5$  U.A. respectivement;  $p < 0.05$ ; Fig 4A), alors que la fleur n'a pas eu d'effet. Pour vérifier l'implication de cette voie dans l'effet du grenadier Gabsi sur le transport de glucose, on a utilisé LY294002, un inhibiteur sélectif puissant de la PI-3 kinase qui se trouve en amont de l'Akt. Tout d'abord, le traitement des cellules C2C12 avec l'insuline en présence de LY294002 ( $50 \mu\text{M}$ ) a réduit significativement la phosphorylation de l'Akt ( $2.29 \pm 0.30$  U.A.; Fig 4B) et le transport de glucose ( $116.5\% \pm 3.0$ ; Fig 4C) de 60% par rapport à l'insuline toute seule (p-Akt :  $5.03 \pm 0.77$  U.A. et transport :  $138.6\% \pm 4.8$ ;  $p < 0.05$ ; Fig 4B & 4C respectivement). En revanche, LY294002 a inhibé la captation de glucose induite par le traitement avec le fruit mûr du grenadier de 56% seulement (*Gabsi S3* :  $124.9\% \pm 2.4$  vs *Gabsi S3+LY* :  $111.8\% \pm 2.0$ ;  $p < 0.05$ ; Fig 4C), malgré une inhibition de l'activation de l'Akt de 100% (Fig 4B).

Ceci suggère que le fruit mûr du grenadier Gabsi emprunte la voie de l'Akt pour stimuler partiellement la captation musculaire de glucose et d'autres voies sont probablement impliquées. Il est à noter que la fleur n'a pas significativement activé l'Akt, ainsi le transport de glucose n'a pas été affecté par LY294002.



**Résultat Figure 4 : L'extrait de fruits mûrs du grenadier Gabsi active la voie de l'Akt pour stimuler partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12.** Les myotubes C2C12 ont été incubés 18 heures avec 50µg/ml d'extraits de fleur (S0) et de fruit mûr (S3) du grenadier Gabsi, DMSO (0.1%) comme contrôle véhicule, 100nM d'insuline comme contrôle positif durant 30 minutes (A). Pour vérifier la contribution de la voie de l'Akt dans l'effet du grenadier Gabsi dans la captation musculaire de glucose, les myotubes C2C12 ont été prétraités avec 50µM de LY294002, puissant inhibiteur sélectif de la PI-3 kinase, durant 1heure (B & C).

Panneaux **A & B** : 40µg de protéine par échantillon ont été analysées par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la p-Akt (Ser 473) et l'Akt total. Les résultats sont exprimés en ratio [p-Akt/Akt] par rapport à leur contrôle DMSO en absence ou en présence de LY294002 et présentés comme moyenne ± SEM. (\*p<0.05 par rapport au DMSO; # p<0.05 par rapport à la même condition sans inhibiteur; ANOVA, n=3). Panneau **C**, le transport de glucose a été mesuré par un essai radioactif tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du transport de <sup>3</sup>H-deoxyglucose par rapport à leur contrôle DMSO en absence ou en présence de LY294002 et présentés comme moyenne ± SEM (\*p<0.05 par rapport au DMSO; # p<0.05 par rapport à la même condition sans inhibiteur; ANOVA, n=3). **NB** : LY294002 a inhibé l'activité de l'Akt dans les cellules musculaires C2C12 incubées avec le véhicule DMSO en comparaison à celles non traitées avec l'inhibiteur. Pour faciliter l'interprétation des résultats, on a rapporté la condition DMSO avec LY294002 à 100% d'activité et exprimé les autres conditions (insuline, GBS0 et GBS3) traitées avec l'inhibiteur par rapport à ce contrôle.

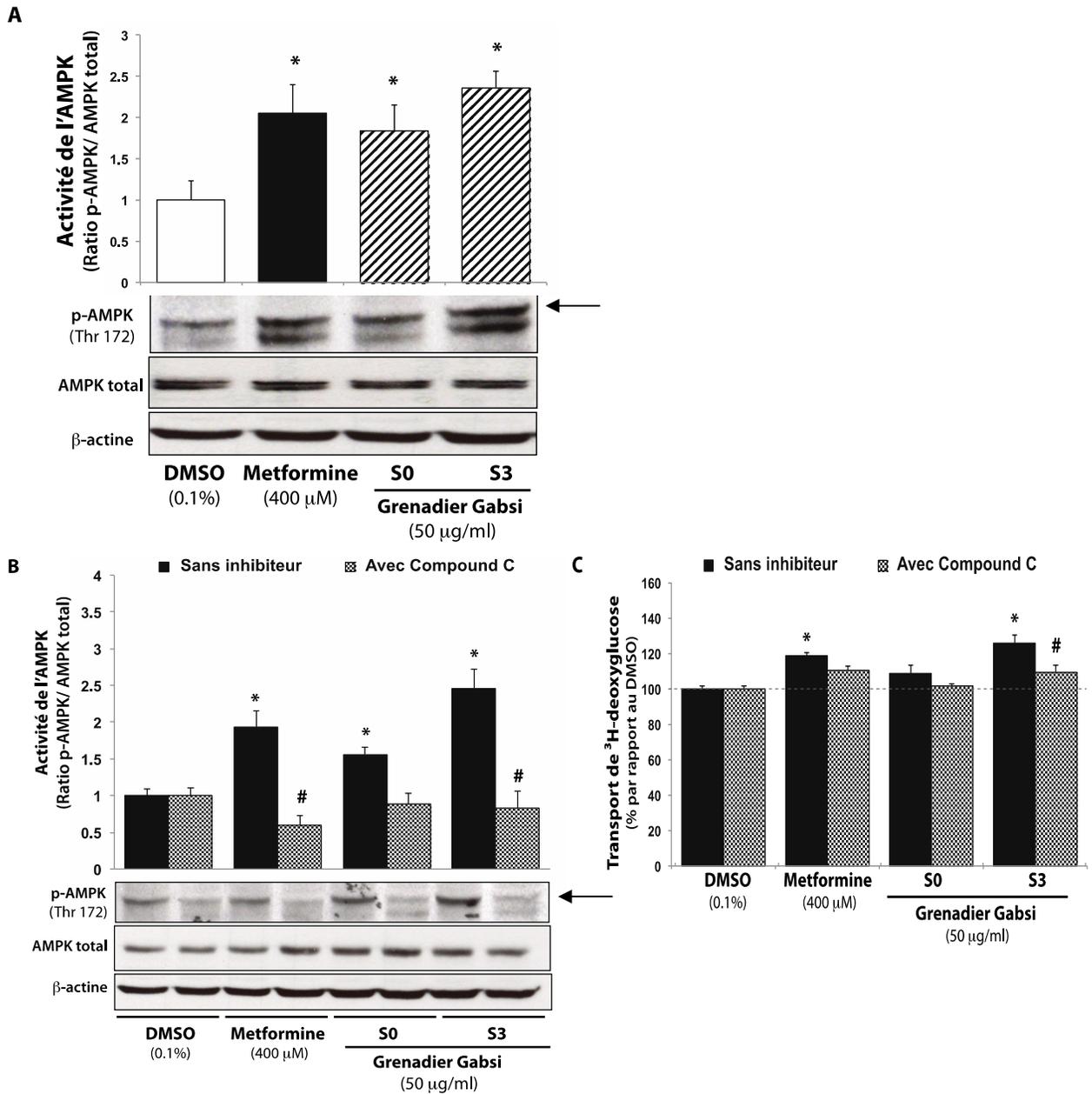
- **La fleur et le fruit mûr du grenadier Gabsi activent la voie de l'AMPK pour médier partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12**

Vu que le transport de glucose induit par le fruit de grenadier n'a pas été totalement inhibé par le LY294002, on a testé l'activation de la voie insulino-indépendante en mesurant la phosphorylation de l'AMPK par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la phospho-AMPK (Thr 172) et l'AMPK total.

La metformine a doublé les niveaux de phosphorylation de l'AMPK par rapport au contrôle DMSO ( $2.1 \pm 0.1$  U.A. vs  $1.0 \pm 0.98$  U.A. ; p<0.05; Fig 5A). Quant au grenadier, la fleur ( $1.8 \pm 0.1$  U.A) et le fruit mûr ( $2.4 \pm 1.4$  U.A) ont stimulé significativement la phosphorylation de l'AMPK essentiellement au même niveau que la metformine (p<0.05, Fig 5A).

Pour vérifier la contribution de cette voie dans l'effet du grenadier Gabsi, on a utilisé le Compound C (CC), un inhibiteur puissant mais non-sélectif de l'AMPK. Le prétraitement des cellules C2C12 avec le CC (20µM) a inhibé la phosphorylation de l'AMPK (p<0.05; Fig 5B) ainsi que la captation de glucose (Fig 5C) stimulées par la metformine. Lorsque les cellules ont été incubées avec les extraits de grenadier en présence

de CC, les niveaux de phosphorylation de l'AMPK ont été ramenés au niveau basal (*DMSO*+*CC*; Fig 5B). De plus, le CC a significativement réduit le transport de glucose induit par le fruit mûr (S3) de 65% (*Gabsi S3* :  $125.9\% \pm 4.5$  vs *Gabsi S3+CC* :  $109.5\% \pm 3.9$  ;  $p < 0.05$ ; Fig 5C). Il est intéressant à noter que la légère induction du transport de glucose par la fleur a été inhibée par le CC (*Gabsi S0* :  $108.8\% \pm 4.7$  vs *Gabsi S0* :  $101.7\% \pm 1.1$ ; NS; Fig 5C).



**Résultat Figure 5 : L'extrait de fleurs et de fruits mûrs du grenadier Gabsi active la voie de l'AMPK pour médier partiellement le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12.** Les myotubes C2C12 ont été incubés 18 heures avec 50µg/ml d'extraits de fleur (S0) et de fruit mûr (S3) du grenadier Gabsi, DMSO (0.1%) comme contrôle véhicule, 400 µM de metformine comme contrôle positif (A). Pour vérifier la contribution de la voie de l'AMPK dans

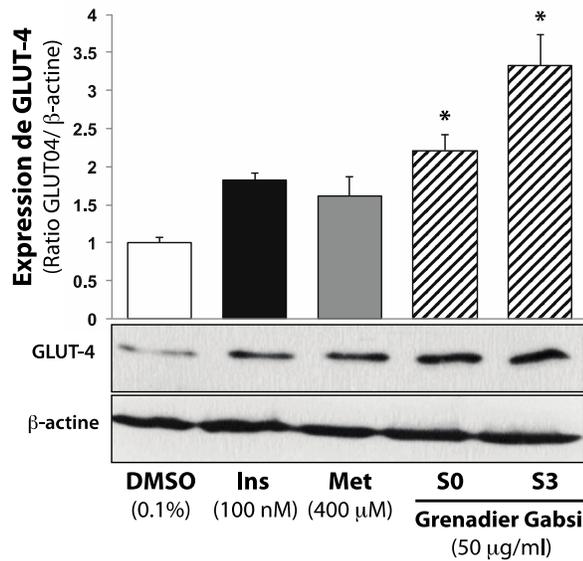
l'effet du grenadier Gabsi dans la captation musculaire du glucose, les myotubes C2C12 ont été prétraités avec 20 $\mu$ M de Compound C, puissant inhibiteur de l'AMPK, durant 1 heure (**B & C**). Panneaux **A & B** : 40 $\mu$ g de protéine par échantillon ont été analysées par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la p-AMPK (Thr 172) et l'AMPK total. Les résultats sont exprimés en ratio [p-AMPK/AMPK] par rapport à leur contrôle DMSO en absence ou en présence de Compound C et présentés comme moyenne  $\pm$  SEM. (\* $p < 0.05$  par rapport au DMSO; #  $p < 0.05$  par rapport à la même condition sans inhibiteur;  $n=3$ ; ANOVA,  $n=3$ ). Panneau **C**, le transport de glucose a été mesuré par un essai radioactif tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du transport de  $^3\text{H}$ -deoxyglucose par rapport à leur contrôle DMSO en absence ou en présence de Compound C et présentés comme moyenne  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$  par rapport au DMSO; #  $p < 0.05$  par rapport à la même condition sans inhibiteur; ANOVA,  $n=3$ ). **NB** : Compound C a inhibé l'activité de l'AMPK dans les cellules musculaires C2C12 incubées avec le véhicule DMSO en comparaison à celles non traitées avec l'inhibiteur. Pour faciliter l'interprétation des résultats, on a rapporté la condition DMSO avec Compound C à 100% d'activité et exprimé les autres conditions (metformine, GBS0 et GBS3) traitées avec l'inhibiteur par rapport à ce contrôle.

### **Le grenadier Gabsi augmente l'expression des transporteurs GLUT-4 dans les cellules musculaires C2C12**

Puisque GLUT-4 constitue le principal transporteur de glucose responsable de l'augmentation de la captation de glucose induite par l'insuline ou la contraction musculaire (via l'activation de l'AMPK), on a voulu élucider l'effet des deux stades de maturation du grenadier Gabsi sur l'expression de ce transporteur dans les myotubes C2C12.

L'expression de GLUT-4 a été stimulée par le traitement des myotubes avec l'insuline ( $1.8 \pm 0.1$  U.A.) et la metformine ( $1.6 \pm 0.3$  U.A.) par rapport au DMSO sans être significatif ( $1.2 \pm 1.3$  U.A.; NS; Fig 6). Par contre, le grenadier Gabsi a fortement stimulé le niveau d'expression de ce transporteur dans les myotubes C2C12. En effet, par rapport au DMSO, l'expression de GLUT-4 a doublé suite au traitement avec la fleur, alors qu'elle a triplé avec le fruit mûr ( $2.2 \pm 0.2$  U.A. et  $3.3 \pm 0.5$  U.A. respectivement;  $p < 0.05$ ;

Fig 6). On a noté notamment une différence significative entre les deux stades ( $p < 0.05$ ; Fig 6). Cet effet vient s'ajouter aux mécanismes d'action impliqués dans le transport de glucose dans le muscle stimulé par le grenadier Gabsi.



**Résultat Figure 6 : Effet de l'extrait du grenadier Gabsi sur le niveau d'expression du transporteur GLUT-4 dans les cellules musculaires C2C12.** Les myotubes C2C12 ont été incubés 18 heures avec 50μg/ml d'extraits de fleur (S0) et de fruit mûr (S3) du grenadier Gabsi, DMSO (0.1%) comme contrôle véhicule, 400μM de metformine et 100nM d'insuline durant 30 minutes. 15μg de protéine par échantillon ont été analysées par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre le transporteur GLUT-4. Les résultats sont exprimés en ratio GLUT-4/β-Actine par rapport à leur contrôle DMSO et présentés comme moyenne ± SEM. (\* $p < 0.05$  VS DMSO en one-way ANOVA,  $n=3$ ).

## Discussion et perspectives

---

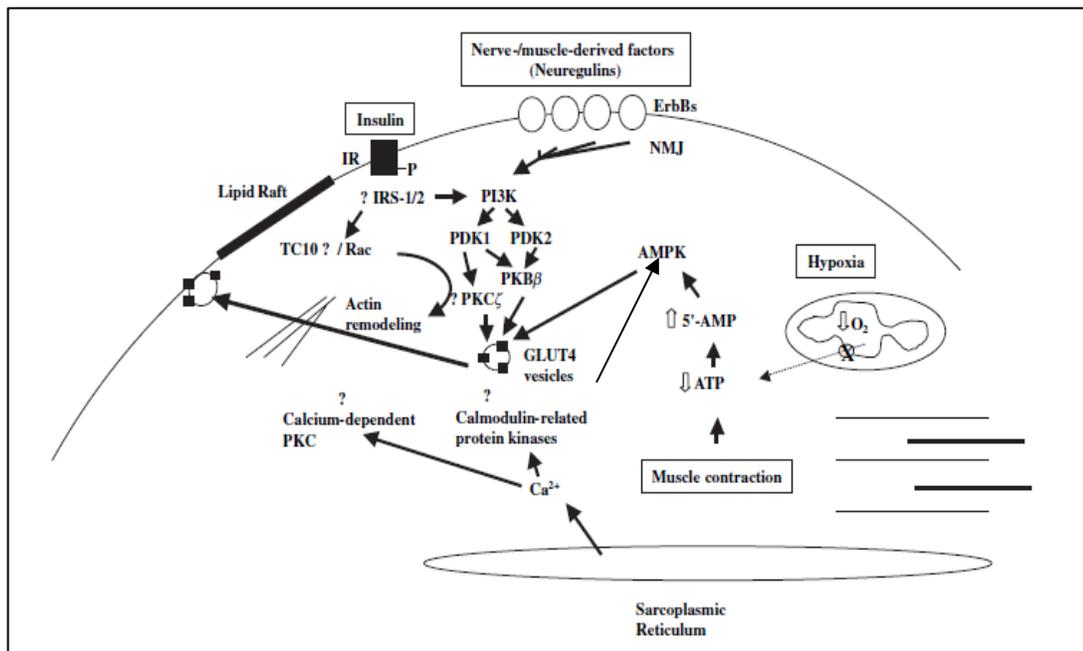
Le grenadier, *Punica granatum*, est connu pour son large éventail d'activités biologiques incluant ses propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, anti-carcinogénique, et antidiabétique (34). Plusieurs études se sont intéressées à l'élucidation des mécanismes d'action impliqués dans l'activité antidiabétique du grenadier. Une étude a montré que les fleurs de grenadier augmentent la sensibilité à l'insuline en activant le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (56), alors qu'une autre a révélé une activité inhibitrice des enzymes  $\alpha$ -glucosidase (impliqués dans l'absorption intestinale de glucose) (55). Cependant, il n'y a pas d'études examinant le potentiel antidiabétique des fruits de grenadier ni une comparaison entre ses activités et celles des fleurs. La stimulation du transport de glucose dans les tissus périphériques contribue à la diminution de la glycémie. En fait, le muscle squelettique est responsable d'environ 80% de la captation postprandiale de glucose (58). Ainsi, le but de cette présente étude est d'évaluer l'activité antidiabétique des fleurs et des fruits (à différents stade de maturation) de grenadier tunisien, particulièrement au niveau des mécanismes de captation de glucose dans le muscle.

Tout d'abord, on a vérifié la toxicité des différentes variétés et stades de grenadier. Nos résultats ont montré que ces extraits ne sont pas toxiques jusqu'à une concentration de 200 $\mu$ g/ml, puisque les niveaux de LDH relâchée dans le milieu de culture n'ont pas été supérieurs à ceux relâchés par les cellules non traitées ou celles traitées avec 0.1% et 0.2% DMSO. Le taux un peu élevé du ratio LDH<sub>relâchée</sub>/LDH<sub>totale</sub> (autour de 25%) n'est pas surprenant avec des cellules C2C12 en différenciation. En effet, le processus de différenciation se fait dans un milieu faible en sérum, en d'autres termes, une condition propice pour la mort cellulaire par apoptose (59). Cependant, lorsqu'on a effectué une courbe dose-réponse avec les deux variétés aux stades fleur (S0) et fruit mûr (S3), on a observé une diminution de la captation de glucose avec l'augmentation de la dose surtout pour le fruit mûr. Ceci laisse supposer l'existence de composés inhibiteurs du transport de glucose dont l'effet se manifeste à forte dose. Des expériences complémentaires peuvent être menées pour une identification de ces composés. Ainsi, la concentration de 50 $\mu$ g/ml a été jugée comme la concentration non toxique avec activité optimale.

Le criblage des différents extraits de grenadier a montré que seulement la variété Gabsi stimule le transport de glucose au niveau du muscle squelettique, plus particulièrement le fruit mûr, à des niveaux presque aussi puissants que ceux de l'insuline. Même si la fleur de cette variété exhibe un faible pouvoir stimulateur de captation de glucose, il n'est pas significatif. Ainsi, le transport de glucose au niveau du muscle vient s'ajouter aux mécanismes antidiabétiques de grenadier. De plus, il semble que ce pouvoir est dépendant de la variété. Ceci peut être dû à la présence de principes actifs responsables de la captation de glucose dans le grenadier Gabsi et qui sont absents dans la variété Espagnoule.

Tel que mentionné auparavant, le transport de glucose dans le muscle squelettique est sous le contrôle de deux principales voies. D'une part, l'insuline par l'intermédiaire de la PI3-kinase et de l'Akt, stimule la translocation des GLUT-4 à la membrane plasmique et ainsi promeut la captation du glucose (60). D'autre part, des stimuli, comme l'exercice physique, l'hypoxie et l'hyperosmolarité, activent la voie de l'AMPK pour induire la translocation et l'activation des GLUT-4 (61). Il est intéressant de noter que l'extrait de fleurs de grenadier stimule la voie d'AMPK seulement, alors que celui de fruits mûrs active la voie de l'Akt et la voie de l'AMPK. L'utilisation d'inhibiteurs de ces voies (Compound C et LY294002) démontre qu'autant la voie de l'AMPK que celle de l'Akt sont responsables de la captation de glucose dans les myotubes C2C12, puisque l'inhibition de chaque voie séparément réduit significativement le transport de glucose sans l'abolir.

Cependant, ces résultats ne nient pas la possibilité de l'implication de la voie alternative dépendante de  $Ca^{+2}$ . En effet, diverses études suggèrent que le calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique initie ou facilite l'activation des molécules de signalisation impliquées dans la stimulation du transport de glucose par la contraction musculaire (62). Ainsi, la phosphorylation de la CaMKK (Calcium/Calmodulin-dépendant protein kinase kinase), une kinase en amont de l'AMPK (63) peut être analysée pour voir si le grenadier emprunterait cette voie supplémentaire de la CaMKK/AMPK pour activer la captation de glucose dans le muscle. D'autres expériences peuvent être conduites pour une investigation profonde des voies de signalisation impliquées dans le transport de glucose dans le muscle.



**Figure 6** : Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la translocation des transporteurs de glucose GLUT-4 à la surface cellulaire dans le muscle squelettique. IR : Récepteurs à l'insuline, NMJ : Jonction neuromusculaire (13, 63)

Il est bien démontré que ces voies, une fois activées, ciblent les transporteurs de glucose GLUT-4 à plusieurs niveaux, soit leur translocation à la membrane plasmique à partir des vésicules intracellulaires, soit leur phosphorylation et ainsi leur activation (13),

soit leur niveau d'expression. Ainsi, l'insuline et l'exercice induisent la translocation des GLUT-4 préexistants du compartiment endosomal à la surface membranaire (13). La contraction musculaire, par l'intermédiaire de la voie de l'AMPK (64) et la coopération avec l'AMPc (13), augmente la transcription des gènes de GLUT-4 dans les fibres musculaires. Cependant, l'insuline et par conséquent la résistance à l'insuline associée à l'obésité ou le diabète de type 2, ne semble pas être liée à un changement au niveau de l'expression des transporteurs GLUT-4 dans le muscle squelettique (13). Puisque les fleurs et les fruits mûrs du grenadier Gabsi ont stimulé la voie d'AMPK, il n'est pas surprenant, ainsi, d'observer une augmentation des niveaux d'expression des transporteurs GLUT-4 dans les myotubes C2C12. Par contre, il semble que la voie de l'Akt joue un rôle primordial dans la transmission du signal de translocation des GLUT-4 et ainsi de la captation de glucose par le grenadier puisque seulement le fruit mûr en était capable contrairement aux fleurs.

Le grenadier est une riche source de flavonoïdes, lipides, acide ascorbique et de tanins. Plusieurs de ces composés sont connus pour avoir diverses propriétés médicinales. Le tableau 2 présente la composition phytochimique des différentes parties de grenadier. Le jus de fruit de grenadier contient, entre autres, des anthocyanines, acide gallique, acide ellagique, catéchine, quercétine et rutin (dérivé de la quercétine). Plusieurs études ont montré que la quercétine (65), l'acide caféique (66), l'acide ellagique (67) et les anthocyanines (68, 69) stimulent la translocation de GLUT-4 et ainsi le transport de glucose dans les myotubes C2C12 par l'intermédiaire de la voie de l'AMPK. L'epigallocatechine stimule la voie de l'Akt et le transport de glucose dans les cellules musculaires L6 (70), alors que l'acide gallique le fait par l'intermédiaire de la PKC (71). Ainsi, ces constituants du jus de fruit de grenadier peuvent être les médiateurs de l'effet de l'extrait de fruit mûr du grenadier Gabsi dans la captation de glucose observée dans notre étude. Il sera intéressant de voir si la composition de fruit mûr du grenadier Espagnole comprendrait les mêmes composantes phytochimiques et aux mêmes concentrations. Des expériences de fractionnement guidé par les bioessais seront nécessaires pour approfondir notre compréhension de l'effet des différentes variétés de grenadier sur le transport de glucose.

Par ailleurs, les fleurs de grenadier contiennent de l'acide gallique (71), de l'acide ursolique (42) et des triterpenoides (72, 73) qui peuvent contribuer à la stimulation du transport de glucose. Cependant, la concentration de ces composantes dans l'extrait de fleurs du grenadier Gabsi peut être sous optimale pour l'induction de la captation de glucose puisque son effet n'était pas significatif.

En résumé, il y a un intérêt croissant dans la promotion des produits de santé naturels et le recours à la médecine alternative. Cette étude est la première à prouver que le grenadier peut moduler positivement la captation de glucose dans le muscle squelettique via l'activation de la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK et via une augmentation de l'expression des transporteurs spécifiques GLUT-4.

Des études ultérieures pourraient être menées pour élucider d'autres mécanismes d'action impliqués dans cet effet stimulateur du transport de glucose dans le muscle.

- Etude de l'effet du grenadier sur la translocation des transporteurs GLUT-4 dans les cellules musculaires L6 par un essai d'immunocytochimie ou de biotinylation. Les myotubes C2C12 ayant une expression endogène de GLUT-4 plus faible que les myotubes L6 (9).
- Étude de l'effet du grenadier sur la phosphorylation des différentes protéines en amont et en aval et de l'Akt et de l'AMPK. On peut citer comme exemple, la phosphorylation des IRS, CaMKK ou de l'AS160. L'AS160 est phosphorylé par l'insuline via la voie de la PI-3 kinase et par l'AMPK et probablement par d'autres kinases dans le muscle squelettique. Une fois phosphorylée, cette protéine inactive l'activité de la Rab-GAP (ou GTPase) permettant une mobilisation accrue des transporteurs GLUT-4 à la membrane (74).
- Des études récentes ont indiqué que le contenu en glycogène musculaire pouvait réguler le transport de glucose et l'activité de l'AMPK en réponse à la contraction musculaire mais les mécanismes régulant ces effets demeurent toutefois obscurs (75). Ainsi, on pourrait étudier l'effet du grenadier sur

l'accumulation du glycogène dans le muscle et son impact sur le transport de glucose et l'expression des GLUT-4 utilisant un essai calorimétrique (76).

Finalement, malgré que les composés actifs et leurs mécanismes d'action précis restent à clarifier, ces résultats *in vitro* prometteurs indiquent la nécessité de tester *in vivo* l'effet du grenadier Gabsi sur des modèles d'animaux diabétiques. En plus, l'identification du (des) composé(s) actif(s) dans le fruit dans le fruit mûr du grenadier Gabsi pourrait aboutir à la découverte de nouvelles molécules antidiabétiques intéressantes.

# Bibliographie

---

1. IDF Diabetes Atlas 2011.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> DWFsNAa.
3. <http://www.phac-aspc.gc.ca> rdS.
4. <http://www.pharmatec-tunisie.com/article/article.php?id=76>.
5. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*. 1998;15(7):539-53.
6. *Bulletin of the World Health Organization* 2011;89:172-183.
7. Diagnosis TECot, Mellitus CoD. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997 July 1, 1997;20(7):1183-97.
8. Grimaldi A. *Traité de diabétologie Flammarion* ed. édition e, editor2009.
9. Lauritzen HP, Schertzer JD. Measuring GLUT4 translocation in mature muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Aug;299(2):E169-79.
10. Capeau J. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)*. 2003 Aug-Sep;19(8-9):834-9.
11. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005 Apr 9-15;365(9467):1333-46.
12. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Sep;283(3):E413-22.
13. Zorzano A, Palacin M, Guma A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2005 Jan;183(1):43-58.
14. Ishiki M, Klip A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology*. 2005 Dec;146(12):5071-8.
15. Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem J*. 2008 Jul 15;413(2):201-15.
16. Suzuki K, Kono T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 May;77(5):2542-5.
17. *Medicine ESSR-ACoS*.
18. Miyake K, Ogawa W, Matsumoto M, Nakamura T, Sakaue H, Kasuga M. Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(10):1483-91.
19. Bhavsar SK, Foller M, Gu S, Vir S, Shah MB, Bhutani KK, et al. Involvement of the PI3K/AKT pathway in the hypoglycemic effects of saponins from *Helicteres isora*. *J Ethnopharmacol*. 2009 Dec 10;126(3):386-96.
20. Hardie DG. Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism. *Proc Nutr Soc*. 2011 Feb;70(1):92-9.
21. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005 Jan;1(1):15-25.

22. Jessen N, Pold R, Buhl ES, Jensen LS, Schmitz O, Lund S. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. *J Appl Physiol*. 2003 Apr;94(4):1373-9.
23. Grisouard J, Timper K, Radimerski TM, Frey DM, Peterli R, Kola B, et al. Mechanisms of metformin action on glucose transport and metabolism in human adipocytes. *Biochem Pharmacol*. 2010 Dec 1;80(11):1736-45.
24. Hardie DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr*. 2011 Feb 16.
25. Monnier L, Slama G, Vialettes B, Ziegler O. [Nutrition and diabetes. Recommendations of ALFEDIAM (French Language Association for the Study of Diabetes and Metabolic Diseases)]. *Diabete Metab*. 1995 Jun;21(3):207-16.
26. Ducobu J. [Oral antidiabetic drugs in 2003]. *Rev Med Brux*. 2003 Sep;24(4):A361-8.
27. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 2002 Jul 2;137(1):25-33.
28. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2131-57.
29. Chia CW, Egan JM. Incretin-based therapies in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):3703-16.
30. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*. 2001 Mar;109 Suppl 1:69-75.
31. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*. 1989 Sep;12(8):553-64.
32. Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 1995;2(2):137-89.
33. Goetz. Phytothérapie du diabète *Phytothérapie*. 2007;5:212-7.
34. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Altern Med Rev*. 2008 Jun;13(2):128-44.
35. Mars M. La culture du grenadier (*Punica granatum L.*) et du figuier (*Ficus carica L.*) en Tunisie.
36. Mars M, Carraut, A., Marrakchi, M., Gouiaa, M. et Gaaliche, F. Ressources génétiques fruitières en Tunisie (poirier, oranger, figuier, grenadier). *Plant genetic Resources Newslette*. 1994;100:1-4.
37. Mars MeG, F. Les variétés de grenadier en Tunisie. Ed GOVPF /Alpha SA (32 pages). 1993.
38. Mars MeS, S. Etude comparative de la qualité des fruits de cinq variétés de grenadier (*Punica granatum L.*). *Revue des Régions Arides*. 1992;92:45-57.
39. Jbir R, Hasnaoui N, Mars M, Marrakchi M, Trifi M. Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. *Scientia Horticulturae*. 2008;115(3):231-7.
40. Katz SR, Newman RA, Lansky EP. *Punica granatum*: heuristic treatment for diabetes mellitus. *J Med Food*. 2007 Jun;10(2):213-7.

41. Yoshikawa M, Matsuda H. Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs. *BioFactors*. 2000;13(1-4):231-7.
42. Jayaprakasam B, Olson LK, Schutzki RE, Tai MH, Nair MG. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *J Agric Food Chem*. 2006 Jan 11;54(1):243-8.
43. Basu A, Penugonda K. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev*. 2009 Jan;67(1):49-56.
44. Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta*. 2004 Oct;348(1-2):63-8.
45. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*. 1999 Jul;66(1):11-7.
46. de Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, et al. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide*. 2007 Aug;17(1):50-4.
47. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food*. 2004 Fall;7(3):274-83.
48. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14813-8.
49. Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, et al. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 1;12(13):4018-26.
50. Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J Vitam Nutr Res*. 2006 May;76(3):147-51.
51. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. 2006 Aug;187(2):363-71.
52. Jafri MA, Aslam M, Javed K, Singh S. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2000 Jun;70(3):309-14.
53. Parmar HS, Kar A. Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *BioFactors*. 2007;31(1):17-24.
54. Ashish K.Das SCM, Sanjay K. Baberjee, Sanghamitra Sinha, B.P.Saha and M.Pal. Studies on the hypoglycemic activities of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*. 2001;15(7):628-9.
55. Li Y, Wen S, Kota BP, Peng G, Li GQ, Yamahara J, et al. *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J Ethnopharmacol*. 2005 Jun 3;99(2):239-44.

56. Huang TH, Peng G, Kota BP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, et al. Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Sep 1;207(2):160-9.
57. Manoharan S. Effects of Punica granatum Flowers on Carbohydrate Metabolizing Enzymes, Lipid Peroxidation and Antioxidants Status in Streptozotocin Induced Diabetic Rats *The Open Nutraceuticals Journal.* 2009;2:113-7.
58. Pessin JE, Bell GI. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol.* 1992;54:911-30.
59. Wang J, Guo K, Wills KN, Walsh K. Rb functions to inhibit apoptosis during myocyte differentiation. *Cancer Res.* 1997 Feb 1;57(3):351-4.
60. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, et al. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol.* 1999 Jun;19(6):4008-18.
61. Ralston E, Ploug T. GLUT4 in cultured skeletal myotubes is segregated from the transferrin receptor and stored in vesicles associated with TGN. *J Cell Sci.* 1996 Dec;109 ( Pt 13):2967-78.
62. Lee HC, Aarhus R, Graeff RM. Sensitization of calcium-induced calcium release by cyclic ADP-ribose and calmodulin. *J Biol Chem.* 1995 Apr 21;270(16):9060-6.
63. Abbott MJ, Edelman AM, Turcotte LP. CaMKK is an upstream signal of AMP-activated protein kinase in regulation of substrate metabolism in contracting skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Dec;297(6):R1724-32.
64. Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol.* 2001 Sep;91(3):1073-83.
65. Eid HM, Martineau LC, Saleem A, Muhammad A, Vallerand D, Benhaddou-Andaloussi A, et al. Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Jul;54(7):991-1003.
66. Jensen J, Jebens E, Brennesvik EO, Ruzzin J, Soos MA, Engebretsen EM, et al. Muscle glycogen inharmoniously regulates glycogen synthase activity, glucose uptake, and proximal insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jan;290(1):E154-E62.
67. Poulou N. Ellagic Acid Stimulates Glucose Transport in Adipocytes and Muscles through AMPK Mediated Pathway. *J Diabetes Metab.* 2011:2-7.
68. Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, D'Archivio M, Santangelo C, Giovannini C, et al. Cyanidin-3-O-beta-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPARgamma activity in human omental adipocytes. *Diabetes.* 2011 Sep;60(9):2234-44.
69. Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr.* 2010 Mar;140(3):527-33.

70. Jung KH, Choi HS, Kim DH, Han MY, Chang UJ, Yim SV, et al. Epigallocatechin gallate stimulates glucose uptake through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway in L6 rat skeletal muscle cells. *J Med Food*. 2008 Sep;11(3):429-34.
71. Prasad CN, Anjana T, Banerji A, Gopalakrishnapillai A. Gallic acid induces GLUT4 translocation and glucose uptake activity in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett*. 2010 Feb 5;584(3):531-6.
72. Shi L, Zhang W, Zhou YY, Zhang YN, Li JY, Hu LH, et al. Corosolic acid stimulates glucose uptake via enhancing insulin receptor phosphorylation. *Eur J Pharmacol*. 2008 Apr 14;584(1):21-9.
73. Lin Z, Zhang Y, Shen H, Hu L, Jiang H, Shen X. Oleanolic acid derivative NPLC441 potently stimulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a multi-target mechanism. *Biochem Pharmacol*. 2008 Nov 15;76(10):1251-62.
74. Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Jul;295(1):E29-37.
75. Steensberg A, van Hall G, Keller C, Osada T, Schjerling P, Pedersen BK, et al. Muscle glycogen content and glucose uptake during exercise in humans: influence of prior exercise and dietary manipulation. *J Physiol*. 2002 May 15;541(Pt 1):273-81.
76. Lust WD, Passonneau JV, Crites SK. The measurement of glycogen in tissues by amylo-alpha-1,4-alpha-1,6-glucosidase after the destruction of preexisting glucose. *Anal Biochem*. 1975 Sep;68(1):328-31.

