

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



LABORATOIRE DE BIOSURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Option : Biochimie Appliquée

### THEME

**Etude des effets tératogènes du diabète  
expérimental chez le rat Wistar : Effet  
prophylactique des extraits enzymo-mimétiques  
(*Cistanche tinctoria*).**

Présentée par : Mme Bouzitouna Amina

Directeur de thèse : Pr. Ouali Kheireddine

Professeur, Université d' Annaba

Co-Directeur de thèse : Pr. Djeddi Samah

Professeur, Université d' Annaba

Membres de Jury:

Président : Pr. Ladjama Ali

Professeur, Université d'Annaba

Examineurs :

Pr.Grara Nedjoud

Professeur, Université de Guelma

Pr. Tadjine Aicha

Professeur, Université d'El Taref

Dr.Lakbar Chanez.

MCA, Universté d'El Taref

N° DBCH...../2018

Année universitaire : 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Sommaire

Remerciement	I
Résumés	II
Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
Abréviations	V
Introduction	01
<b>Chapitre 1 : Synthés bibliographique</b>	
I.1. Diabète	05
I.1.1. Définition	05
I.1.2. Classification	05
I.1.3. Physiopathologie	06
I.1.3.1. Diabète de type 1	06
I.1.3.2. Diabète de type 2	07
I.1.4. Diabète et grossesse	10
I.1.4.1. Physiopathologie du diabète gestationnel	10
I.1.4.2. Facteurs tératogènes	15
I.1.4.3. Malformations embryonnaires associées avec le diabète maternel	16
I.2. Stress oxydant	19
I.2.1. Radicaux libres	20
I.2.1.1. Origine et destinée des ERO	21
I.2.1.2. Différents radicaux libres oxygénés	23
I.2.1.3. Rôle physiologique des entités oxydantes	26
I.2.2. Stress oxydant et ses conséquences biologiques	28
I.2.2.1. Oxydation des protéines	28
I.2.2.2. Peroxydation lipidique	30
I.2.2.3. Oxydation des acides nucléiques	32
I.2.2.4. Sucres	33
I.2.3. Systèmes de défense antioxydante	33
I.2.3.1. Antioxydants enzymatiques	34

I.2.3. 2. Antioxydants non enzymatiques :	36
I.3. Toxicité du glucose	39
I.3.1. Auto-oxydation du glucose	40
I.3.2. Activation de la voie des polyols	41
I.3.3. Activation de la protéine kinase C (PKC)	42
I.3.4. Voie des hexosamines	43
I.3.5. Glycation des protéines	44
I.4. <i>Cistanche tinctoria</i> L.	46
I.4.1. Systématique	46
I.4.2. Description morphologique	46
I.4.3. Distribution géographique	46
I.4.4. Partir utilisée	46
I.4.5. Constituants	47
I.4.6. Action pharmacologique et toxicologique	47
I.4.7. Médecine traditionnelle	47
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	
II.1. Objectif de l'étude	48
II.2. Etudes phytochimiques	50
II.2.1. Matériel végétal	50
II.2.2. Préparation des extraits	51
II.2.2.1. Extrait aqueux	51
II.2.2.2. Extrait Méthanolique	51
II.2.3. Testes phytochimiques (études préliminaires)	53
II.2.3.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude	53
II.2.3.2. Epuisement du matériel végétal avec le méthanol	54
II.2.3.3. Autres métabolites secondaires	55
II.2.4. Dosage des polyphénols	55
II.2.5. Dosage des flavonoïdes	56
II.2.6. Dosage des tanins	56
II.2.7. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince "CCM"	57
II.3. Evaluation des Activités biologiques	58

II.3.1. Activité anti-oxydante <i>in Vitro</i>	58
II.3.1.1. Test au DPPH	58
II.3.1.2. Teste de blanchissement de beta-carotène	59
II.3.1.3. Activité antioxydante par la méthode de piégeage du peroxyde d'hydrogène	59
II.4. Evaluation de la toxicité chez les rats	60
II.5. Activité antidiabétique	60
II.5.1. Evaluation de l'activité antidiabétique chez la ratte non gestante :	60
II.5.1.1. Animaux et condition d'élevage	60
II.5.1.2. Protocole expérimental	60
II.5.2. Evaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique	76
II.5.2.1. Animaux	76
II.5.2.2. Induction de diabète	76
II.5.2.3. Accouplement	76
II.5.2.4. Traitement	76
II.5.2.5. Prélèvement sanguine	79
II.5.2.6. Prélèvement des organes maternels	79
II.5.2.7. Visualisation des malformations squelettiques fœtales	82
II.6. Traitement statistique des résultats	82
<b>Chapitre 3 : Résultats et discussion</b>	83
III.1. Résultats	83
III.1.1. Etudes phytochimiques	83
III.1.1.1. Rendements en extraits secs	83
III.1.1.2. Analyse phytochimique	83
III.1.1.3. Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins	84
III.1.1.4. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM	85
III.1.2. Activité biologique	87
III.1.2.1. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	87
III.1.2.2. Evaluation de la toxicité chez les rats	90
III.1.2.3. Evaluation de l'activité antidiabétique chez la ratte non gestante	91
III.1.2.4. Evaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique.	110

III.1.2.5. Etudes tératologiques chez les fœtus	134
III.2. Discussion	147
III.2.1 Etudes phytochimiques	147
III.2.1.1 Rendements en extraits secs	147
III.2.1.2. Analyse phytochimique	148
III.2.1.3. Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins	149
III.2.2. Activités biologiques	150
III.2.2.1. L'Activité antioxydante <i>in vitro</i>	150
III.2.2.2. L'évaluation de l'activité antidiabétique chez la ratte non gestante	152
III.2.2.3. L'évaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique.	162
Conclusion et perspectives	168
Références bibliographiques	170
Publication et communications	
Annexe	

---

# REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Laboratoire d'écobiologie des milieux marins et littéraux, département de Biologie marine, Université Badji Mokhtar Annaba, dirigé par le professeur M. Bensouilah. Je le suis tout particulièrement reconnaissante de la confiance qu'il a su me témoigner en m'intégrant dans son équipe de recherche et de l'opportunité qu'il m'a offert de me former à la recherche.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon encadreur Monsieur K. OUALI et mon co-encadreur Madame Djeddi Samah Professeurs à l'Université Badji Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci de m'avoir guidé pendant ces années. Merci pour votre disponibilité, vos investissements pour nos discussions et vos enthousiasmes au cours des réunions qui ont jalonné ce projet et pour tout le temps que vous m'avez consacré pour rédiger ce manuscrit.

Mon respect, ma reconnaissance ainsi que mes vifs remerciements vont à Monsieur A. LADJAMA, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de juger ce travail et m'honoré par sa présidence de jury.

A Madame A. TADJINE, Professeur, Université Chadli Ben Jedid, El Taref , pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de consacrer son temps pour le juger. Je vous prie de croire en mon profond respect.

A Madame N. GHERARA, Professeur, Université 08 Mai 1945, Guelma, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je suis honorée de sa présence, ses compétences reconnues dans le domaine du diabète exposé dans ce mémoire en font un juge pertinent. Qu'il soit assuré de ma sincère gratitude.

A Madame C. LAKBAR, Maitre de conférence, Université Chadli Ben Jedid, El Taref , pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de consacrer son temps pour le juger. Je vous prie de croire en mon profond respect.

A Monsieur N. BOUZERNA, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, pour son dévouement suivi et ses encouragements. Qu'il trouve ici ma gratitude et mes sincères remerciements.

Je remercie également tous les membres de laboratoire qui sont été généreux et compréhensifs durant tout le parcours.

Pour finir ; mes pensées vont à ma famille.

A mes parents tout d'abord car c'est avec eux que tout a commencé! Merci pour votre amour, votre soutien et votre confiance. Merci aussi de m'avoir donné la chance de pouvoir faire ce que je voulais dans la vie. Je suis fière d'avoir des parents comme vous...

A mes sœurs, Merci d'être toujours là pour me soutenir dans les moments difficiles.

Merci mes amis pour votre aide, votre soutien et votre amitié.

Durant l'ensemble de mon cursus, je pense que tous les gens qui m'ont entouré méritent mes remerciements, ne serait-ce que de m'avoir aidé ou tout de moins supporté...

En espérant que cette contribution scientifique sera une étape vers l'amélioration du confort de vie des patients diabétiques.

# *Résumés*



## Résumé

Le premier objectif de cette étude était d'observer l'effet antidiabétique et antioxydant des extraits aqueux et méthanoliques de *Cistanche tinctoria* dans le diabète sucré induit par la streptozitocine.

Le deuxième objectif était d'évaluer l'effet anti- tératogène du traitement par les extraits de *Cistanche tinctoria* chez les rattes gestantes diabétiques et non diabétiques.

Les extraits aqueux (EA) et méthanoliques (EM) ont été administrés quotidiennement à doses de 200 mg / kg de poids corporel chez les rats rendu diabétiques par la streptozotocine pendant une période de 21 jours. Les paramètres biochimiques et des stress oxydatif sont estimé chez les rattes non gestantes.

Des rats Wistar femelles vierges ont reçu une injection de 50 mg / kg de streptozotocine avant l'accouplement. L'administration orale des extraits aqueux et méthanoliques de *Cistanche tinctoria* a été administrée chez des rattes gestantes non diabétiques et diabétiques à la dose de 200 mg / kg entre le 0 et le 19<sup>eme</sup> jour de grossesse. Au jour 20 de la gestation, les rattes ont été sacrifiées et un échantillon de sang maternel a été prélevé pour la détermination du paramètre biochimique. L'utérus a été pesé avec son contenu et les fœtus ont été analysés.

Les extraits méthanolique et aqueux ont exercé un effet antidiabétique significatif chez les rats diabétiques non gestante. Par la détermination des paramètres biochimiques, il a révélé que l'EA a des effets bénéfiques sur le paramètre biochimique d'une manière plus efficace que l'EM. Un traitement quotidien avec 200 mg / kg de poids corporel pendant 21 jours a non seulement entraîné une diminution significative de la glycémie chez les rats diabétiques, mais a également augmenté la teneur en glycogène hépatique et amélioré le profil oxydatif.

Chez les rattes gestante, les résultats obtenus montrent que le taux de glucose sanguin était presque normalisé 2 semaines après l'administration quotidienne répétée par voie orale, le traitement par les extraits de la plante a entraîné aussi une réduction des taux de cholestérol, de triglycérides et de HDL, ainsi qu'une diminution de la résorption, du poids placentaire, de l'indice placentaire et des anomalies fœtales par rapport au groupe diabétique. Les fœtus de rats diabétiques traités avec l'extrait de *Cistanche tinctoria* présentaient une fréquence plus faible des malformations par rapport au groupe diabétique.

Le traitement par *Cistanche tinctoria* a eu un effet hypoglycémiant, contribuant à réduire l'incidence des anomalies internes chez les descendants des mères diabétiques.

**Mots clé :** *Cistanche tinctoria* ; Diabète ; Grossesse ; Résultat reproductif ; Anomalie ; Stress oxydant.

## Abstract

The first aim of this study was planned to observe the antidiabetic and antioxydant effect of *Cistanche tinctoria* aqueous and methanolic extracts in streptozotocin induced diabetes mellitus.

The second aim was to evaluate the teratologic effect of *Cistanche tinctoria* extracts treatment on maternal biochemical and oxidative stress profile, reproductive outcomes, and also fetal anomaly incidence from diabetic and non-diabetic rats.

The aqueous and methanolic extracts were administered daily in doses of 200-mg/kg body weight to streptozotocin induced diabetic rats for a period of 21 days. The biochemical and oxidative stress parameter was estimated.

Virgin female Wistar rats were injected with 50 mg/kg streptozotocin before mating. Oral administration of an aqueous and methanolic extracts of *Cistanche tinctoria* was given to non-diabetic and diabetic pregnant rats at dose of 200 mg/kg from 0 to 19<sup>th</sup> day of pregnancy. At day 20 of pregnancy the rats were killed and a maternal blood sample was collected for the determination of biochemical parameter. The gravid uterus was weighed with its contents and fetuses were analyzed.

The methanolic and aqueous extracts exerted a significant antidiabetic effect in streptozotocin diabetic rats. By determination of blood glucose, total cholesterol, total triglyceride and total lipids, it revealed that the aqueous extract has beneficial effects on the biochemical parameter in a way more effective than the methanolic extract. Daily treatment with 200mg/kg body weight of methanolic and aqueous extracts for 21 days not only brought a significant decrease on blood glucose level in STZ-induced diabetic rats, but also increased the hepatic glycogen content.

Oral administration of the aqueous and methanolic extracts (200mg/kg) produced a significant decrease on blood glucose in STZ diabetic pregnant rats the blood glucose levels were nearly normalised 2 weeks after daily repeated oral administration. No height significant changes observed in normal rats. In diabetic dams, plant treatment caused reduced cholesterol, triglycerides and HDL levels, and decreased resorption, placental weight, placental index, and fetal anomalies as compared to diabetic group. The fetuses from diabetic rats treated with *Cistanche tinctoria* extract had lower frequency of malformation as compared to diabetic group.

*Cistanche tinctoria* treatment had hypoglycemic effect, contributing to reduce incidence of internal anomalies in offspring from diabetic dams.

**Keywords :** *Cistanche tinctoria*; Diabetes; Pregnancy; Reproductive outcome; Anomaly; Oxidative stress.

## المُلخَص

الهدف الأول من هذه الدراسة هو مراقبة تأثيرات المستحضرات المستخلصة من نبتة الدانون على الجهاز التأكسدي و داء السكري التجريبي .

أما الهدف الثاني فهو تقييم تأثيرات مستخلصات الدانون على أجنة الفئران المصابة بداء السكري التجريبي.

قد تم إعطاء المستخلصات المائية و الميثانولية لنبتة الدانون للفئران المصابة بالداء بجرعة 200 مغ / كغ على مدى 21 يوم وفي نفس الوقت تم إعطاء مستخلصات الدانون للفئران الحوامل المصابة بداء السكري و الفئران الشاهدة بجرعة 200 مغ /كغ من اليوم صفر إلى اليوم التاسع عشر من الحمل . في اليوم العشرين من الحمل قمنا بذبح الفئران و أخذنا عينات من الأم لتحديد المعايير البيوكيميائية و معايير الجهاز التأكسدي كما قمنا بوزن الرحم و تحليل الأجنة .

أظهرت النتائج أن العلاج اليومي بالمستخلصات المائية و الميثانولية بجرعة 200 مغ /كغ لمدة 21 يوم لدى الفئران غير حوامل المصابة بداء السكري التجريبي لها تأثيرات إيجابية على المعايير البيوكيميائية و على زيادة محتوى الغليكوجين الكبدى و كذلك في تحسين القضاء علي الإجهاد التأكسدي .

فيما يخص الفئران الحوامل أثبتت النتائج أن العلاج بمستخلصات نبتة الدانون أدى إلى انخفاض في مستويات الغلوكوز و الكوليسترول و الدهون الثلاثية بعد أسبوعين تقريبا من تناول الدواء , كما قام بتحسين الإجهاد التأكسدي و عمل على تخفيض وزن المشيمة و التشوهات الجنينية مقارنة مع الفئران الحوامل المصابة بالداء و الغير معالجة كما لاحظنا التقليل في وتيرة تشوهات الهيكل العظمي لدى أجنة الأمهات المعالجة بمستحضرات الدانون بالمقارنة مع المجموعة الغير معالجة.

خلاصة القول العلاج بمستخلصات الدانون له فاعلية في علاج داء السكري و الإجهاد التأكسدي كما يساهم في الحد من حدوث التشوهات لدى اجنة الأمهات المصابة بداء السكري .

**الكلمات الدالة :** داء السكري , الحمل , التشوهات الجنينية , الإجهاد التأكسدي , *Cistanche tinctoria*

# *Liste des figures*



## Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule $\beta$ dans le diabète de type 1.	07
2	Physiopathologie du diabète de type 2.	09
3	Physiopathologie du diabète gestationnel.	11
4	Chaîne respiratoire de la mitochondrie.	19
5	Balance entre les prooxydant et les antioxydnt.	20
6	Schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et des cibles biologiques.	22
7	Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR.	28
8	Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.	30
9	Les trois étapes de la peroxydation lipidique.	31
10	Nature des produits terminaux formés lors de peroxydation lipidique.	31
11	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires.	33
12	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.	34
13	Régénération de la vitamine E par la vitamine C et le GSH.	38
14	Structure générale du noyau des flavonoïdes.	39
15	Voies activées par l'hyperglycémie.	40
16	Réactions à l'origine de la production d'ERO par autoxydation du glucose.	41
17	Voie des polyols.	42
18	Voie de la PKC dans le cadre de la pathologie diabétique.	43
19	Voie des hexosamines.	44
20	Formation des AGEs par la voie de Maillard.	45
21	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	49
22	Photo de <i>Cistanche tinctoria</i> .	50
23	Localisation géographique de la zone d'étude.	50
24	Protocole général d'extraction des polyphénols, dosages et méthodes utilisées pour l'étude du pouvoir antioxydant.	52
25	Protocole expérimental des testes phytochimiques.	54

<b>26</b>	Schéma montrant le changement de couleur de DPPH du violet au jaune quand il est exposé à une substance antioxydante.	58
<b>27</b>	Répartition et traitement des lots de rats.	63
<b>28</b>	Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique.	68
<b>29</b>	Formule chimique du glutathion réduit.	70
<b>30</b>	Réaction d'Ellman entre le Glutathion et le DTNB.	70
<b>31</b>	Schéma récapitulatif du protocole expérimental pour l'évaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique.	78
<b>32</b>	Photographies in situ de rat.	80
<b>33</b>	Aspect extérieur d'un fœtus de rat normal (A) et un fœtus de rat avec macrognathie (B) au 20 <sup>ème</sup> jour de gestation.	81
<b>34</b>	Photo des résultats des tests phytochimiques.	84
<b>35</b>	Chromatographie sur couches minces des extraits de <i>Cistanche tinctoria</i> .	86
<b>36</b>	Activité antiradicalaire des extraits de <i>Cistanche tinctoria</i> .	87
<b>37</b>	Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de <i>Cistanche tinctoria</i> , du BHT, $\alpha$ -tocophérol.	89
<b>38</b>	Effet d'EA et EM sur le poids corporel journalier des rats témoins, diabétiques non traité et traité.	91
<b>39</b>	Gain du poids chez les rats témoins, DNT, et traités avec l'EA et l'EM.	92
<b>40</b>	Variation de la concentration plasmatique en Albumine et en Protéines totales chez les rats témoins, DNT et diabétique traite avec l'EA et l'EM.	96
<b>41</b>	Variation de la concentration plasmatique en Urée et en créatinine pour les lots témoin, DNT et traitées par l'EA et l'EM.	97
<b>42</b>	Variation de la concentration plasmatique en ASAT en ALAT pour les lots témoin, DNT et traitées par l'EA et l'EM.	97
<b>43</b>	Effet des EA et EM sur l'activité du glutathion peroxydase.	101
<b>44</b>	Effet des EA et EM sur l'activité du superoxyde dismutase.	102
<b>45</b>	Effet des EA et EM sur l'activité de la catalase.	103
<b>46</b>	Effet des EA et EM sur l'activité de glutathion –s-transfèrease.	104
<b>47</b>	Coupes histologiques de pancréas du rat.	109
<b>48</b>	Variation du gain pondéral en pourcentage chez les rattes gestantes témoins non traité (TG) et traitées (TGEA et TGEM) et les rattes gestantes diabétiques non traités DG et diabétiques traitées avec les deux extraits.	112

<b>49</b>	Variation du poids absolu en grammes du foie, cœurs et pancréas chez les rattes gestantes témoins T, témoins traitées, diabétiques D et diabétiques traitées.	113
<b>50</b>	Variation du poids relatif en grammes par cent gramme du poids corporel du foie, cœurs et pancréas chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées.	113
<b>51</b>	Variation de concentrations plasmatiques en mg/dl des triglycérides, chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées avec les deux extrais (EA, EM).	117
<b>52</b>	Variation de concentrations plasmatiques en mg/dl du cholestérol total, chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées avec les deux extrais (EA, EM).	117
<b>53</b>	Variation de concentrations plasmatiques des lipides totaux, chez les rattes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées pendant la période de la gestation avec les deux extrais (EA, EM).	118
<b>54</b>	Variation de concentrations plasmatiques en HDL-C, chez les rattes gestantes témoins, diabétiques, témoins traitées et diabétiques traitées avec les deux extrais (EA, EM).	118
<b>55</b>	Effets des extraits aqueux et méthanolique de <i>Cistanche tinctoria</i> sur les paramètres immunologique de la ratte gestante, a) IL-1 $\beta$ ; b) IL-6 ; c) IL-2 ; d) IL10 et e) TNF- $\alpha$ .	122
<b>56</b>	Variation de la concentration de la vitamine C chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées.	124
<b>57</b>	Variation de la concentration de la vitamine E chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées.	125
<b>58</b>	Variation de la concentration de la glutathion réduit chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées.	126
<b>59</b>	Effet des extrais sur les concentrations plasmatique et tissulaire de malondialdéhyde (MDA) chez la ratte gestante témoins et diabétique.	131
<b>60</b>	Variation de la concentration de l'anion superoxide chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées.	132
<b>61</b>	Variation de la concentration de la capacité antioxydante totale (FRAP) chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées.	132

- 62** Variation du taux de fœtus avec morphologie normale et malformé chez les rattes gestantes témoins (TG, TGEA, TGEM), les rattes gestantes diabétiques DG et les rattes gestantes diabétiques traitées. 137
- 63** Photographies démontrant l'aspect morpho-anatomique de la progéniture des rattes diabétiques en J 20 qui témoigne de l'existence d'un NTD. 137
- 64** Fœtus de rat diabétique en J 20. 140
- 65** Photographies démontrant l'aspect morpho-anatomique de la progéniture des rattes incluses dans l'étude. 141
- 66** Histogramme de distribution du rapport entre la longueur maxillaire et la longueur mandibulaire chez les fœtus des rats témoins (TG, TGEA, TGEM), diabétiques non traité (DG) et traités avec les deux extraits (EA,EM). 142
- 67** Variation de la concentration de la glutathion réduit chez les fœtus des rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées. 143
- 68** Variation de la concentration en acide ascorbique chez les fœtus des rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées. 144
-

# *Liste des Tableaux*



Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.	21
2	Structure et propriétés chimique de la STZ.	61
3	Aspects, couleurs et rendement des extraits de <i>C.tinctoria</i> .	83
4	Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la plante.	83
5	Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extrais de <i>C. tinctoria</i> .	85
6	Résultats de la chromatographie sur couche mince de <i>Cistanche tinctoria</i> .	86
7	Activité antiradicalaire des extraits de <i>Cistanche tinctoria</i> .	88
8	Activité antioxydante des extraits, du BHT et de l' $\alpha$ -tocophérol dans le système $\beta$ -carotène/acide linoléique.	89
9	Pourcentages de piégeage du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> des extraits bruts de <i>Cistanche tinctoria</i> .	90
10	Variation de poids initial et final chez les rats témoin, diabétique non traitées et traités avec l'EA et l'EM.	91
11	Variation des poids absolu et relatif des organes pour les rats témoins, diabétiques non traités et traités avec le EA et le EM.	93
12	Variation de la concentration plasmatique en glucose et la teneur hépatique en glycogène chez les rats témoins, diabétiques non traités et traités par l'EA et EM.	94
13	Variations des paramètres lipidiques chez les rats témoins, diabétiques non traités et traités avec l'EA et EM.	95
14	Effets des extraits aqueux et méthanolique de <i>Cistanche tinctoria</i> sur les paramètres immunologique.	99
15	Variation des concentrations plasmatique et tissulaire (foie, pancréas et cœur) des antioxydants exogène (vitamine C et Vitamine E) et endogène (GSH) chez les groupes expérimentaux.	100
16	Effet des extraits sur les concentrations plasmatique et tissulaire (foie, pancréas et cœur) de malondialdéhyde (MDA), les concentrations plasmatique et hépatique de l'anion superoxide et la capacité antioxydante (FRAP) au niveau plasmatique et hépatique chez les groupes expérimentaux.	107

<b>17</b>	Variation du poids corporel aux jours gestationnels 0, 7, 14 et 20 chez les rats témoins (TG), témoins traités (TGEA et TGEM), les rats diabétiques (DG) et les rats diabétiques traités avec les deux extraits (DGEA et DGEM).	110
<b>18</b>	Variation de la glycémie en mg/dl aux jours gestationnels 0, 7, 14 et 20 chez les rattes témoins, témoins traités, diabétiques et diabétiques traités.	115
<b>19</b>	Variation de la concentration plasmatique en Albumine et en Protéines totales chez les rats gestante témoins, témoin traité, DG et diabétique traitée avec l'EA et l'EM.	119
<b>20</b>	Variation de la concentration plasmatique en Urée, en créatinine, en ASAT et en ALAT pour les lots témoin, DG, témoin traité et diabétique traités par l'EA et l'EM pendant la période de la gestation.	119
<b>21</b>	Effet des extraits sur l'activité enzymatique tissulaire (foie, pancréas et cœur), à savoir la SOD (en % d'inhibition/min/mg de protéine), la GSH-Px (en nM de glutathione oxydé/min/mg de protéine), la GsT (en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) et la catalase ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine), chez les rattes gestantes témoins, témoins traités, diabétiques et diabétiques traités avec les deux extraits (EA et EM).	127
<b>22</b>	résultats de la reproduction des rattes gestantes témoins et diabétiques traités non traités avec les extraits de <i>Cistanche tinctoria</i> .	134
<b>23</b>	Effet des extraits de <i>Cishtanche tinctoria</i> sur la prévention des malformations fœtales dans le diabète induit par la STZ chez la ratte.	138
<b>24</b>	Effet des extraits sur l'activité enzymatique tissulaire (foie et cœur), à savoir la SOD (en % d'inhibition/min/mg de protéine), la GSH-Px (en nM de glutathione oxydé/min/mg de protéine), la GsT (en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) et la catalase ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine), chez les fœtus de la rattes gestantes témoins, témoins traités, diabétiques et diabétiques traités avec les deux extraits (EA et EM).	145

---

# *Liste des Abréviations*



### Liste des abréviations

Abréviation	Signification
$^1\text{O}^2$	: Oxygène singulet
<b>AGE</b>	: Advanced Glycation End product
$\text{AlCl}_3$	: Trichlorure d'aluminium
<b>ASAT</b>	: Aspartate aminotransferase
<b>BBC</b>	: Bleu de coomassie
<b>BHT</b>	: Butylhydroxyanisole
<b>CAT</b>	: Catalase
<b>CCM</b>	: Chromatographie sur couche mince
<b>CDNB</b>	: 1-Chloro-2,4 di nitrobenzene
$\text{CHCl}_3$	: Chloroform
<b>CIV</b>	: Communications intraventriculaires
<b>CPA</b>	: Cellule présentatrice d'antigène
<b>DAG</b>	: Diacylglycérol
<b>DEA</b>	: Diabétiques traités par l'extrait aqueux
<b>DEM</b>	: Diabétiques traités par l'extrait méthanolique
<b>DG</b>	: Diabétique gestante non traité
<b>DGEA</b>	: Diabétique gestante traité par l'extrait aqueux
<b>DGEM</b>	: Diabétique gestante traité par l'extrait méthanolique
<b>DID</b>	: Diabète insulino-dépendant
<b>DNID</b>	: Diabète non insulino-dépendant.
<b>DNT</b>	: Diabétiques non traité
<b>DPPH</b>	: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>DTNB</b>	: Acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque
<b>EAG</b>	: Equivalant d'acide gallique
<b>EQ</b>	: Equivalant quercétine
<b>ERO</b>	: Espèce Réactifs de l'Oxygène
$\text{FeCl}_3$	: Chlorure ferrique
<b>FRAP</b>	: Réduction de fer (Ferric Reducing Ability of Plasma
<b>GAD</b>	: Acide Glutamique Decarboxylase.

<b>GAPDH</b>		Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>GLUT4</b>	:	Transporteur de glucose 4.
<b>GMPc</b>	:	Guanosine monophosphate cyclique
<b>GOT</b>	:	Oxaloacétate de glutamate transférase
<b>GR</b>	:	Glutathion réductase.
<b>GSH</b>	:	Glutathion réduit
<b>GSH-Px</b>	:	Glutathion peroxydase
<b>GSSG</b>	:	Glutathion oxydée
<b>GsT</b>	:	Glutathion S transférase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:	Peroxyde d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	:	Acide sulfurique
<b>HCl</b>	:	Acide chlorhydrique
<b>HDL</b>	:	Lipoprotéines de haute densité
<b>HGPO</b>	:	Hyperglycémie provoquée par voie orale.
<b>HO<sup>•</sup></b>	:	Radicaux hydroxyles
<b>I %</b>	:	Inhibition des radicaux libres en pourcentages
<b>IC50</b>	:	Concentration inhibitrice de 50
<b>IMC</b>	:	Indice de masse corporelle
<b>IRS1</b>	:	Insulin Receptor Substrate 1
<b>LDL</b>	:	Lipoprotéine de basse densité
<b>MDA</b>	:	Malondialdéhyde
<b>MPO</b>	:	Myéloperoxydase
<b>MT</b>	:	Métallothionéines
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	:	Carbonate de sodium
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	:	Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate
<b>NaCl</b>	:	Chlorure du sodium
<b>NAD<sup>+</sup></b>	:	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
<b>NADPH, H<sup>+</sup></b>	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>NBT</b>	:	Nitrobleu de tétrazolium
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	:	Ammoniaque
<b>NO<sub>2</sub></b>	:	Dioxyde d'azote
<b>NOD</b>	:	Non-obese diabetic.
<b>NOS</b>	:	Nitrique oxyde synthase

<b>NTD</b>	:	Anomalies du tube neural
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	:	Anion superoxide
<b>OMS</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONOOH</b>	:	Nitroperoxyde
<b>PGE2</b>	:	Prostaglandine E2
<b>PKC</b>	:	Protéine kinase C
<b>PN</b>	:	Polynucléaires neutrophiles
<b>PTG</b>	:	Produits Terminaux de Glycation
<b>RO<sup>·</sup></b>	:	Alkoxyde
<b>ROO<sup>·</sup></b>	:	Peroxyde
<b>ROS</b>	:	Reactive oxygen species
<b>SNC</b>	:	Système nerveux central
<b>SO</b>	:	Stress oxydant
<b>SOD</b>	:	Superoxide dimutase
<b>STZ</b>	:	Streptozotocine
<b>TBA</b>	:	Thiobarbituriques
<b>TCA</b>	:	Acide trichloracétique
<b>TEA</b>	:	Témoins traités par l'extrait aqueux
<b>TEM</b>	:	Témoins traités par l'extrait méthanolique
<b>TG</b>	:	Témoin gestante non traité
<b>TGEA</b>	:	Témoin gestante traité par l'extrait aqueux
<b>TGEM</b>	:	Témoin gestante traité par l'extrait méthanolique
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:	Tumor Necrosis Factor
<b>TPTZ</b>	:	2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine
<b>TS</b>	:	Contrôle sain
<b>UDP-GlcNac</b>	:	UDP-N-acetyl-glucosamine
<b>VDDI</b>	:	Ventricules droits à double issue
<b>VLDL</b>	:	Lipoprotéines de très basse densité

---

# *Introduction*



### Introduction générale

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution comme dans le cas du diabète (Favier,2003 ; Dal-Ros et *al.*,2013).

Le diabète sucré n'est pas une maladie homogène. Il s'agit en fait d'un ensemble hétérogène de désordres métaboliques caractérisé par la présence d'une hyperglycémie chronique accompagnée d'une perturbation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique, et résultant d'un défaut de sécrétion d'insuline de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (American Diabetes Association, 2011). Il est maintenant admis que des concentrations élevées en glucose dans les milieux extra et intracellulaires induisent un stress oxydant défini comme un déséquilibre de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants et qui est considéré comme le moteur mobilisant des différents facteurs pathologiques vers les complications du diabète (Boumaza, 2009).

L'hyperglycémie génère une augmentation des radicaux libres lesquels réagissent avec les substrats oxydables (glucose, protéines, acides gras) et produisent des composés carbonyles, dont les effets cellulaires sont multiples : glycation de protéines, peroxydation des lipides, modification de l'expression de gènes, et modification de l'ADN (Boumaza, 2009).

La grossesse est un état physiologique qui s'accompagne de certaines modifications de l'organisme maternel de la fécondation jusqu'à l'accouchement. Des études expérimentales et cliniques ont démontré que la glucotoxicité est notoirement beaucoup plus importante lorsqu'elle s'associe à la grossesse, il augmente le risque d'anomalies de la reproduction, de mort intra-utérine, de prématurité, de mortalité périnatale et de malformations congénitales (Eriksson et *al.*, 2003) en ce sens qu'elle favoriserait accessoirement une tératogénicité ou embryopathie diabétique (Herrera et *al.*, 2010).

Les malformations s'installent généralement durant l'organogenèse, l'une des phases les plus critiques du développement embryonnaire, et se localisent préférentiellement dans certains tissus primitifs, tels que le tube neural et le mésoderme cardiaque (Toumiet *al.*, 2009).

En dépit de l'intérêt scientifique signifiant à propos de ce domaine de recherche saisissant, les mécanismes moléculaires de la tératogénicité diabétique restent présentement très peu connus et imprécis. En fait, les malformations sont induites avant la 7<sup>ème</sup> semaine post-conceptionnelle chez les êtres humains et durant les sept à dix premiers jours chez les embryons de rats et de souris avec une incidence considérablement élevée même en présence d'un déséquilibre métabolique léger (Cederberg et *al.*, 2003 ).

La Disponibilité excessive du glucose entraine une glycation non enzymatique et une augmentation de l'activité oxydative mitochondriale, ayant pour résultat un stress oxydatif (Ouali et *al.*, 2007). Les investigations récentes rapportent le rôle crucial du stress oxydatif dans embryopathie diabétique (Reece et *al.*, 2006). L'augmentation des espèces réactifs de l'oxygène réagit avec les acides gras polyinsaturés dans les membranes embryonnaires, produisant la peroxyde lipidique et diminuant la fluidité membranaire, avec les protéines et l'ADN, entraînant la production des protéines carbonyles et endommageant les bases, ce qui déclenchant une apoptose accrue dans les cellules des progénitures(Lappas et *al.*, 2011).

L'intensité des désordres oxydatifs est corroborée par l'immaturation des systèmes antioxydants embryonnaires, ce qui contribue au déclenchement de la cascade tératogénique (Zabihi et *al.*, 2007). Les dégâts ultérieurs causés par l'abolissement des systèmes redox se traduisent par des poussées apoptotiques nocives qui falsifient le déroulement contrôlé de l'embryogenèse (Yang et *al.*, 2008). Par conséquent, le spectre des malformations diabétiques indique que l'embryon s'expose au glucose en excès qui bouleverserait le contrôle strict et la coordination stéréotypée des gènes organo-constitutifs et compromettrait la démarche adéquate des processus morphogénétiques (Gao et Gao, 2007 ; Toumi et *al.*, 2009).

Plusieurs médicaments sont utilisés pour contrôler le diabète, mais un contrôle glycémique parfait est rarement atteint (Cooppan, 2005). Le traitement pharmacologique actuel du diabète est représenté essentiellement par l'insuline et les hypoglycémiantes oraux qui visent à soigner et non à guérir la maladie (Zhang et *al.*, 2006 ;Eddouks et *al.*, 2007 ) en plus, on remarque que l'utilisation continue des drogues antidiabétiques synthétiques causes des effets secondaires néfastes et la cytotoxicité(Hwang et *al.*, 2005;Zhang et *al.*, 2006 ). Depuis l'antiquité, les plantes ont été utilisées pour le traitement du diabète sucré (Damasceno et Volpato, 2008;Volpato et *al.*, 2009 ). L'utilisation des plantes médicinales comme traitement alternatif est largement répandue dans les populations des pays sous-développés, qui ont un accès limité à l'assistance médicale.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités à la fois antidiabétiques et antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydatif et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant (Boumaza., 2009). Plusieurs études ont confirmé que la supplémentation en antioxydants naturelle pourrait être très bénéfique dans l'atténuation du stress Oxydatif associé au diabète (Eriksson et Borg, 1991 ; Sivan et *al.*, 1997 ; Cederberg et Eriksson, 2005). Les femmes diabétiques utilisent souvent des extraits aqueux de plantes pendant la grossesse sans se soucier de leurs résultats possibles. Les effets de plusieurs de ces plantes ont déjà été prouvés expérimentalement chez les animaux et les humains, tandis que d'autres nécessitent des investigations plus poussées (Prince et *al.*, 1998). Les effets anti-térogènes des antioxydants ont incité plusieurs chercheurs à utiliser des biomolécules naturelles pour atténuer le stress oxydatif et ainsi réduire l'embryopathie diabétiques.

L'Algérie possède un riche patrimoine d'agroressources médicinales et alimentaires utilisées traditionnellement pour traiter plusieurs maladies, dont le diabète, les maladies cardiovasculaires et différents pathologies (Kambouche et *al.*, 2009).

*Cistanche tinctoria*, localement appelée Danoun, est une plante parasite utilisée en Algérie pour le traitement du diabète, diarrhée, les douleurs abdominal (Hammiche et Maiza, 2006). Traditionnellement, on utilise la décoction aqueuse de cette plante par voie orale, seule ou mélangée avec d'autres plantes médicinales (Maiza et *al.*, 1993). Aucune étude scientifique concernant les propriétés pharmacologiques de *C. tinctoria* n'a été réalisée.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à entreprendre ce travail qui est subdivisé trois parties essentielles ; La première partie de ce travail s'attachera à donner quelques rappels bibliographiques sur le diabète sucré, le diabète gestationnelle on déterminer les facteurs térogènes et les malformations embryonnaires associé, le stress oxydatif, l'implication du stress oxydatif dans la pathologie du diabète et une description botanique de la plante médicinale *Cistanche tinctoria* puis l'élucidation des compositions en principes actifs et leurs activités biologiques.

Puis dans la seconde partie « partie expérimentale », nous allons nous intéresser à l'activité antidiabétique, antioxydante et l'effet prophylactique des extraits bruts de *Cistanche tinctoria* chez des rattes gestantes et non gestantes rendues diabétiques par la streptozotocine.

Enfin dans la troisième partie nous présenterons les résultats obtenus et leurs discussions.

# *Synthèse Bibliographiques*



## **I.1. Diabète :**

### **I.1.1. Définition :**

Le mot diabète vient du grec « dia-baino » signifiant « passer au travers », est un terme englobant diverses affections.

Le diabète sucré n'est pas une maladie homogène. Il s'agit en fait d'un ensemble hétérogène de désordres métaboliques caractérisé par la présence d'une hyperglycémie chronique accompagnée d'une perturbation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique. Il est lié à une carence relative ou absolue en insuline endogène ou à un défaut d'action de l'insuline ou aux deux anomalies conjuguées (Cheng et Fantus, 2005 ; Monnier, 2010 ; Buyschaert, 2012).

Selon l'OMS, un patient est diagnostiqué diabétique dès lors qu'il présente d'une glycémie supérieure à 1.26 g/l (7mmol/L), caractéristique à jeun (> 8heurs ), confirmée par deux prises de sang consécutives ou qu'une mesure de l'hémoglobine glyquée est supérieure à 6 %, ou encore qu'il obtient un résultat positif au test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO : observation des variations de glycémie trois heures durant, chez un patient à jeun au départ, à qui l'on a demandé de boire une solution contenant 75 grammes de glucose)(Buyschaert, 2012).

L'hyperglycémie chronique s'accompagne de complications apparaissant au long court et touchant de nombreux organes, particulièrement l'œil, le rein, les systèmes nerveux et cardiovasculaire.

### **I.1.2. Classification :**

L'ancienne classification des diabètes, insulino-dépendants et non insulino-dépendants, était fondée sur leur traitement plutôt que sur leur mécanisme causal (Rodier, 2001).

Depuis 1997, une nouvelle classification du diabète sucré a été proposée par Kaneko (American Diabetes Association) et adoptée chez l'homme par l'OMS (Hennen, 2001). Cette classification a été établie d'après une approche pathogénique plutôt que thérapeutique.

On distingue :

- Le type 1 (ou diabète d'origine auto-immune ou idiopathique), communément appelé diabète insulino-dépendant ;
- Le type 2 ou diabète non insulino-dépendant (dans lequel prédominent insulino-résistance et insulino-pénie);
- diabètes de causes spécifiques (ex-diabètes « secondaires », catégorie qui s'enrichit constamment de nouvelles découvertes ;

- et le diabète gestationnel (Hennen, 2001).

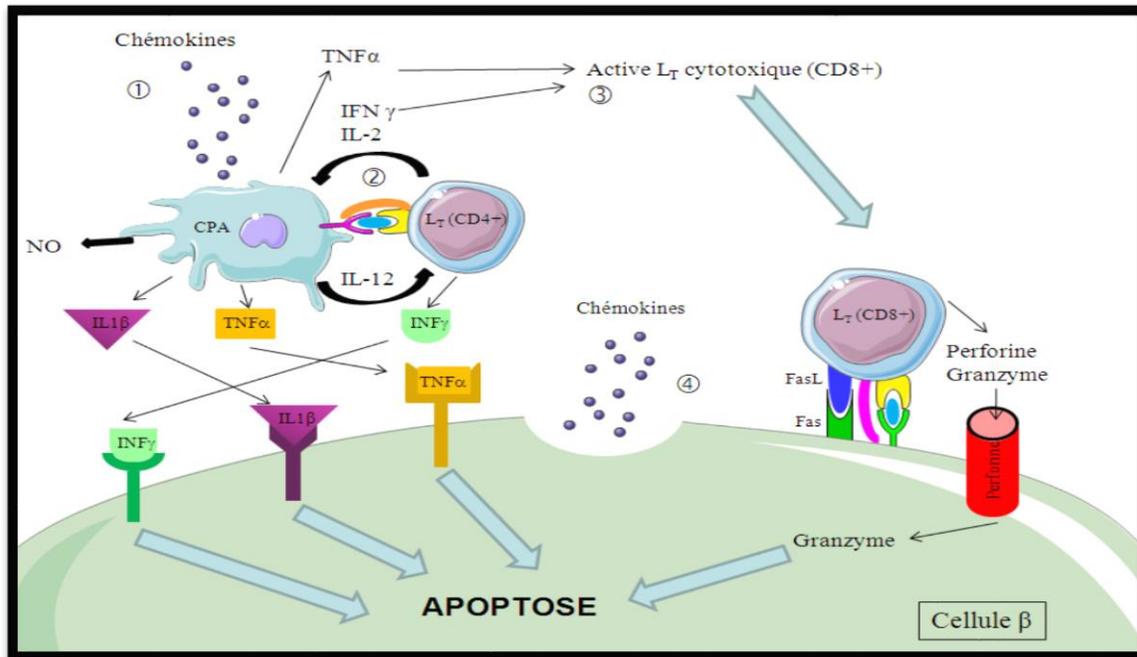
### **I.1.3. Physiopathologie :**

#### **I.1. 3.1. Diabète de type 1:**

Le diabète de type 1, autrefois appelé diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète juvénile (Auberval, 2010). Il représente environ 15 % de l'ensemble des cas de diabète. Il peut survenir à tout âge, mais est plus fréquent chez les jeunes, avec une incidence maximale entre 9 et 14 ans. Le DID peut être précipité par un facteur externe, tel qu'une infection virale. La présence d'anticorps anti-cellules  $\beta$  dans le sérum laisse prévoir le développement futur d'un diabète (Gaw et *al.*, 2004). La physiopathologie du DID est dominée par la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  langerhansiennes localisées dans l'ensemble du pancréas. Lorsque 80 % d'entre elles ont été détruites, la sécrétion d'insuline devient insuffisante pour maintenir une glycémie normale ; c'est alors qu'apparaissent les premières manifestations cliniques du DID. Ainsi, celles-ci sont la conséquence d'une maladie auto-immune qui a débuté plusieurs mois, voire plusieurs années auparavant (Perlemuter et Morin, 2003). Certaines formes de type 1 n'ont pas d'étiologie connue (absence de signes d'auto-immunité notamment) et sont donc nommées idiopathique. Ces formes assez rares sont surtout rencontrées chez les diabétiques d'origine africaine ou asiatique (Delattre et *al.*, 2003).

- **Mécanisme de destruction de la cellule  $\beta$  :**

Le processus de recrutement des lymphocytes dans l'îlot pancréatique n'est pas clairement compris, mais il implique la production de cytokines à la fois par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), les cellules de l'endothélium vasculaire et les cellules  $\beta$ . La figure 1 présente un mécanisme simplifié de la destruction des cellules  $\beta$  lors d'un diabète de type 1 (Auberval, 2010).



**Figure 1.** Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule  $\beta$  dans le diabète de type 1 (Pirot et *al.*, 2008)

La destruction des cellules  $\beta$  est essentiellement due à une infiltration des îlots par les lymphocytes T cytotoxiques CD8 mais on ne connaît pas encore l'antigène cible initiateur, bien que l'enzyme GAD (GlutamicAcidDecarboxylase) semble être à ce jour le meilleur candidat, les anticorps anti-GAD étant les premiers dépistés. De plus, la suppression par transgénèse de l'expression de la protéine GAD au niveau des cellules  $\beta$  des souris diabétiques NOD permet de prévenir le diabète, et les îlots comportant des cellules  $\beta$  n'exprimant pas GAD transplantés chez les souris NOD ne subissent pas l'attaque auto-immune contrairement aux îlots contenant les cellules  $\beta$  normales (Grimaldi, 2003).

### I.1. 3. 2. Diabète de type 2:

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) est aussi appelé « diabète mature » car il survient le plus souvent chez l'adulte, autour de la cinquantaine, sa prévalence augmente avec l'âge (Bouldjadj, 2009). Il est très répandu et représente plus de 90% des cas de diabète (Auberval, 2010).

L'hyperglycémie des diabétiques de type 2 est la conséquence de deux grands mécanismes physiopathologiques. Le premier correspond à une diminution de la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline (insulino-résistance) touchant les tissus périphériques que sont le muscle, le

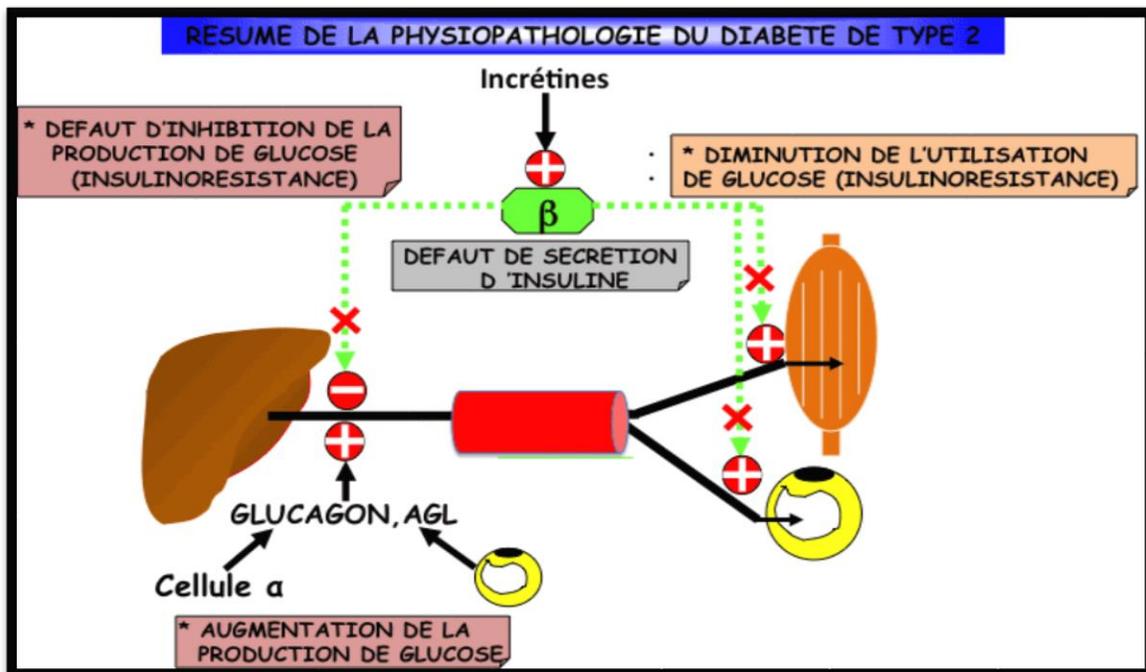
tissu adipeux et le foie (Bouldjadj, 2009). Sa mise en place fait intervenir de hautes concentrations en acides gras qui sont libérés par le tissu adipeux dans la circulation. Ces acides gras sont ensuite oxydés dans les tissus périphériques en acétyl coenzyme A, en diacylglycérol et en céramides, ce qui entraîne l'augmentation d'une isoforme d'une protéine kinase C. Cette kinase phosphoryle le récepteur IRS-1 sur les acides aminés sérines et thréonine ce qui a pour conséquence d'inhiber la phosphorylation de la tyrosine qui est requise pour libérer l'insuline. Ainsi, la translocation des vésicules renfermant le transporteur GLUT4 est inhibée, le glucose circulant ne peut donc pas entrer dans les cellules. Cela favorise l'hyperglycémie, le pancréas va donc s'adapter en produisant plus d'insuline (Auberval, 2010). Le deuxième phénomène consiste en une anomalie de l'insulino-sécrétion (Bouldjadj, 2009). Les dysfonctions de l'insulinosecrétion, qui entraînent une insulino-pénie relative au regard de l'insulinorésistance ont probablement une origine génétique, mais des facteurs aggravant interviennent en particulier l'accumulation de triglycérides dans le pancréas secondaire à l'augmentation chronique des concentrations d'acides gras libres et de triglycérides dans le plasma : il s'agit de la lipotoxicité ; de même, l'hyperglycémie chronique entraîne un phénomène de glucotoxicité sur les cellules bêta du pancréas participant à la diminution de l'insulinosecrétion ; il en est de même pour les dépôts d'amylène dans les cellules bêta du pancréas (Figure 2) (Guillaume, 2004).

## ➤ Les facteurs de risques :

Les causes initiales de ce diabète sont mal connues et certainement multiples, facteurs génétiques et environnementaux agissant de concert (Bouldjadj, 2009).

1. **L'hérédité** : La présence d'un diabétique de type 2 dans une famille augmente le risque de survenue du diabète chez les autres membres de cette famille, ce qui est en faveur d'une participation génétique dans l'apparition du diabète de type 2 (Guillaume, 2004). De plus, chez des jumeaux monozygotes, la concordance de la maladie peut atteindre 90% (Auberval, 2010).
2. **L'obésité** : L'existence d'une obésité est un facteur de risque important de développer un DNID chez un sujet génétiquement prédisposé. Cependant l'obésité n'est qu'un des facteurs prédisposant parmi d'autres : il existe des obésités majeures sans diabète et inversement, un sujet sans surcharge pondérale peut être atteint d'un DNID. Enfin, notons que c'est l'obésité androïde (rapport taille/hanche > 1) qui fait courir le plus de risque de devenir diabétique au patient (Perlemuter et Morin, 2003).

3. **L'âge** : Le risque de développer un diabète de type 2 augmente avec l'âge. En effet, la tranche d'âge la plus touchée est celle des 40-59 ans. Chez le sujet âgé, il y a une baisse de l'insulino-sécrétion et une augmentation de l'insulino-résistance (Auberval, 2010).
4. **Grossesse** : Les femmes ayant des enfants dont le poids de naissance est supérieur à 4 kg ont un risque augmenté de développer un DNID (Perlemuter et Morin, 2003). De plus, un enfant né de mère atteinte par un diabète gestationnel, a plus de risque de développer un diabète de type 2 et de souffrir d'obésité (Auberval, 2010).
5. **L'exercice physique** : L'exercice physique a un rôle protecteur sur la survenue du DNID en augmentant la sensibilité tissulaire à l'insuline (Perlemuter et Morin, 2003).



**Figure 2.** Physiopathologie du diabète de type 2

(Guillaume, 2004).

## **I.1.4. Diabète et grossesse :**

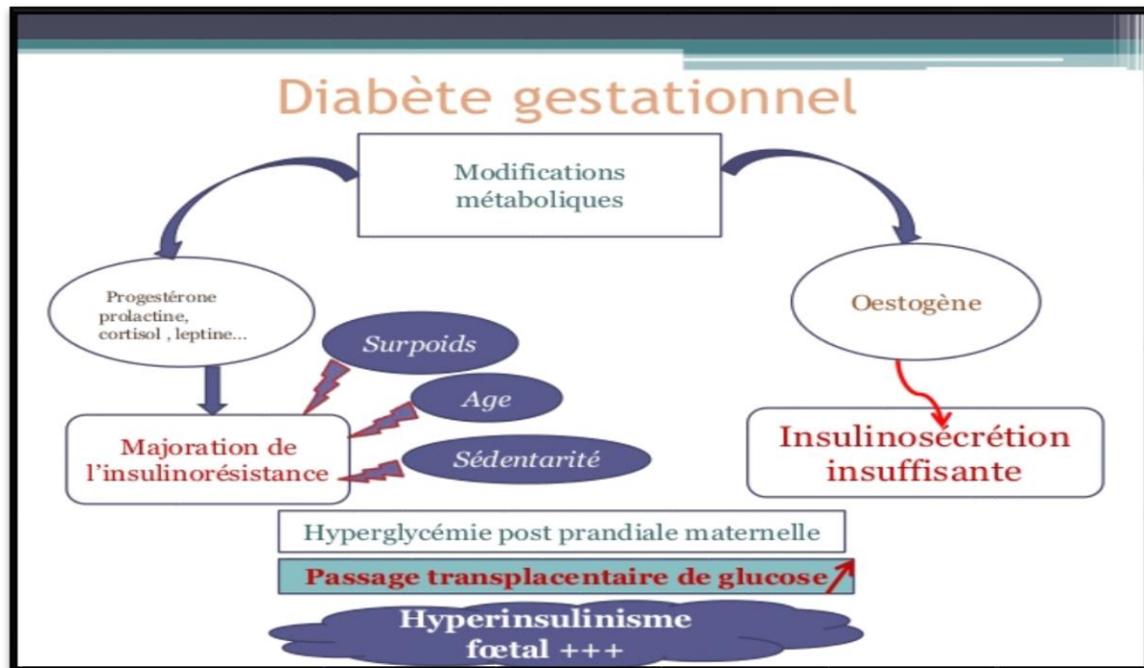
La définition actuelle du diabète gestationnel est celle proposée lors de la IV<sup>e</sup> conférence internationale du diabète gestationnel (Metzger et Coustan, 1998) et par l'OMS. Il s'agit d'un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quel que soit le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum. Cette définition regroupe ainsi essentiellement deux catégories de patientes qui sont liées à des pronostics maternels et fœtaux différents:

On distingue les femmes ayant une mauvaise tolérance glucidique apparue au cours de la grossesse, le plus souvent en seconde partie de grossesse et disparaissant, temporairement au moins, en post-partum. C'est la situation la plus fréquente. Et les patientes ayant un trouble de la glycorégulation « Un diabète patent préexistant » antérieur à la grossesse et découvert à l'occasion de celle-ci. Le plus souvent, il s'agit d'un diabète de type 2 mais parfois également d'un diabète de type 1. Ce diabète est alors révélé par les modifications métaboliques induites par la gestation. Ce diabète persistera après l'accouchement (Froger et *al.*, 2012).

### **I.1.4. 1. Physiopathologie du diabète gestationnel :**

La grossesse se présente comme une situation d'accélération métabolique avec une première phase anabolique, puis une deuxième phase catabolique, cette série d'adaptations métaboliques suite à des modifications hormonales, dont la finalité est d'assurer le flux énergétique nécessaire à la croissance du fœtus. Au cours de la grossesse normale, il existe une insulino-résistance physiologique, progressive et réversible associée à un hyperinsulinisme réactionnel. Au cours du diabète gestationnel, on a cette même situation d'insulino-résistance. Par contre, l'élément prédominant est une diminution de l'insulinosécrétion avec, comme finalité, une anomalie de la tolérance glucidique. Les mécanismes précis expliquant ces anomalies physiologiques au cours de la grossesse normale et pathologique au cours du diabète gestationnel sont vraisemblablement multifactoriels(Figure3).

A long terme, bien que la tolérance glucidique se normalise le plus souvent rapidement après l'accouchement, la femme ayant un antécédent de diabète gestationnel est à très haut risque de développer un diabète sucré, essentiellement de type 2. Or, sur le plan physiopathologique, il apparaît cependant que les mêmes mécanismes seraient impliqués à la fois dans le diabète gestationnel et dans le diabète de type 2, faisant penser qu'il pourrait s'agir de la même entité pathologique à des stades différents (Vambergue et *al.*, 2002).



**Figure 3. Physiopathologie du diabète gestationnel**

([www.https://fr.slideshare.net/AmineDafaa/grossesse-et-diabte](https://fr.slideshare.net/AmineDafaa/grossesse-et-diabte))

(Consulté le 18/05/2017).

a). **Anomalies fonctionnelles de l'insulinosécrétion(hyperinsulinisme)**

Au premier trimestre de grossesse, sous l'effet de l'imprégnation hormonale (hormones lactogènes, progestérone, oestrogènes), l'insulinosécrétion augmente. Il en résulte une légère augmentation de la réponse insulinique au glucose sans qu'il n'y ait de majoration importante de l'insulinorésistance et donc une diminution modérée de la glycémie maternelle (Catalano et *al.*, 1991).

La première anomalie fonctionnelle rencontrée est l'augmentation de l'insulinémie à jeun. En effet, l'insulinémie à jeun augmente de manière progressive au cours de la gestation. En général, les taux sont multipliés par deux entre le premier et le dernier trimestre de la grossesse (Vambergue et *al.*, 2002).

Cette hyperinsulinémie est secondaire à une augmentation de la production d'insuline et à une diminution de sa dégradation hépatique. En effet, il semble que la synthèse de pro-insuline (précurseur de l'insuline) soit augmentée au cours de la grossesse chez les femmes normales et chez les patientes diabétiques (Beardsall et *al.*, 2008).

Pour s'adapter à l'augmentation de l'insulinosécrétion à la fois au cours du diabète gestationnel, mais aussi au cours de la grossesse normale, les îlots de Langerhans subissent des modifications structurales et fonctionnelles. Ainsi ont été décrites une hypertrophie et une hyperplasie des cellules bêta.

Par ailleurs, une mutation du gène de la glucokinase, enzyme exprimée dans les cellules  $\beta$  et dans les hépatocytes, impliquée dans les mécanismes d'insulinosécrétion, est retrouvée, dans certaines études, chez les femmes présentant un diabète gestationnel. Cette association est toutefois inconstante (Vambergue et *al.*, 2002).

Enfin, Au cours du diabète gestationnel, l'insulinosécrétion en réponse à une charge en glucose est altéré, elle est moins stimulée et le pic d'insulinosécrétion est retardé et altéré.

## **b). Les modifications de la sensibilité à l'insuline (L'insulinorésistance)**

L'insulinorésistance hépatique, adipocytaire et musculaire est un phénomène physiologique au cours de la grossesse qui permet l'épargne du glucose disponible par le fœtus. Ce glucose est essentiel pour le fœtus car il assure 80% du métabolisme oxydatif de ses tissus. En fin de grossesse, l'insulinosensibilité diminue de 50 à 60% chez les femmes normotolérantes et atteintes de diabète gestationnel comparée à des femmes non enceintes. Cette diminution de l'insulinosensibilité est cependant passagère et s'améliore en post-partum.

Les mécanismes de l'insulinorésistance au cours de la grossesse sont encore à l'heure actuelle mal définis, plusieurs causes sont cependant évoquées.

- **Modifications de la liaison de l'insuline à son récepteur** : Les études concernant l'implication de la liaison de l'insuline à son récepteur dans les mécanismes d'insulinorésistance pendant la grossesse sont contradictoires. Certaines d'entre elles ont montré que cette liaison était diminuée, d'autres qu'elle était inchangée ou augmentée (Shao *et al.*, 2000 ; Vambergue et *al.*, 2002).

Cette liaison est soumise aux variations hormonales au niveau de l'adipocyte notamment : l'oestradiol accroît cette liaison, la progestérone pourrait l'augmenter ou la diminuer et la prolactine la diminue (Friedman et *al.*, 1999 ; Vambergue et *al.*, 2002).

Toutefois, les troubles de l'affinité de l'insuline pour son récepteur ne semblent pas permettre d'expliquer les mécanismes de l'insulinorésistance.

- **Anomalies de la cascade de signalisation intracellulaire** : Cette insulinorésistance semble être liée à des défauts de la cascade de signalisation insulinique intracellulaire

présents au cours de la grossesse normale et elle est augmentée en cas de diabète gestationnel. Il a été observé une diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline dans les cellules musculaires humaines de femmes enceintes obèses ou présentant un diabète gestationnel entraînant une captation musculaire de glucose diminuée dans le diabète gestationnel (Pratipanawat et *al.*, 2001),

- **Anomalies de l'action périphérique de l'insuline:** Au cours de la grossesse normale, on constate une diminution de la glycolyse par diminution de l'activité de la phosphofructokinase et de la pyruvate kinase dans le muscle squelettique. L'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase est plus élevée dans le muscle de femmes enceintes comparé à celui de femmes non enceintes, suggérant une augmentation de la synthèse locale d'acide gras inhibant la glycolyse (Vambergue et *al.*, 2002). Une possible anomalie au niveau du transport du glucose a été évoquée. Une diminution significative de la concentration du transporteur de glucose insulino-dépendant GLUT4, a été mise en évidence dans l'étude d'Okuna et *al.* (1995), dans le tissu adipeux des femmes enceintes comparativement à des femmes non-enceintes.

### c). Facteurs modulant la sécrétion insulinaire et favorisant l'insulinorésistance

- **Implications hormonales :** La production hormonale au cours de la grossesse débute dès l'implantation du trophoblaste et augmente tout au long de la grossesse. Elle modifie le métabolisme des nutriments pour assurer un apport énergétique fœtal suffisant tout en maintenant l'homéostasie glucidique de la mère. Les hormones favorisent le stockage des graisses, diminuent les dépenses énergétiques et abaissent la clairance du glucose (Shao et *al.*, 2000). Les hormones lactogènes (prolactine, hormone lactogène placentaire et hormone chorionique somatotrope) sont considérées comme des facteurs dominants dans la mise en place de l'insulinorésistance maternelle (Newbern et Freemark, 2011). Des essais cliniques ont montré que des taux sériques de prolactine élevés ou des infusions d'hormone lactogène placentaire chez l'humain conduisent à un état de résistance à l'insuline et à une hyperinsulinémie (Friedman et *al.*, 1999).

Les œstrogènes sont également augmentés chez la femme enceinte. Ils proviennent à la fois de la sécrétion placentaire et de l'aromatation des androgènes du fœtus. Ils s'élèvent à partir du 35<sup>e</sup> jour de gestation. La nature de l'implication des œstrogènes est discutée. Les effets seraient toutefois minimes.

La progestérone dont la concentration s'élève au soixante-cinquième jour de la grossesse a un effet direct sur le métabolisme glucidique. Elle est à l'origine d'une diminution de la tolérance au glucose en réduisant la capacité de l'insuline à inhiber la production hépatique de glucose et le transport du glucose (Nelson et *al.*,1994).

Le cortisol est sûrement l'hormone la plus diabétogène. Sa sécrétion est stimulée par une augmentation de la production hépatique de la globuline (CBG). En fin de grossesse, la cortisolémie est deux fois et demie plus élevée. Cette hormone est responsable d'une augmentation de la production hépatique de glucose et d'une diminution de l'insulinosensibilité (Handwerger et Freemark, 2000). Le mécanisme responsable serait une diminution de la phosphorylation sur les résidus tyrosine du récepteur de l'insuline associée à une diminution du contenu en InsulinReceptorSubstrate 1 (IRS1) de la cellule musculaire (Barbour et *al.*,2002).

- **Les cytokines :** Plus récemment, le rôle du TNF- $\alpha$  (TumorNecrosis Factor), dans l'instauration de l'insulinorésistance a été évoqué. La sécrétion de cette cytokine pro-inflammatoire pendant la grossesse provient des adipocytes et plus majoritairement du placenta. L'augmentation des niveaux circulants de TNF- $\alpha$  chez les femmes enceintes pourrait être un facteur déterminant dans la mise en place de la résistance à l'insuline notamment par son effet répresseur sur la sécrétion et l'expression de l'adiponectine. Kirwanet *al.*(2002) ont montré qu'il existait, au troisième trimestre de grossesse, une corrélation négative entre les taux circulants de TNF- $\alpha$  et la sensibilité à l'insuline. Il participerait également à l'altération de la voie de signalisation insulinique intracellulaire dans les tissus cibles périphériques par le biais d'une diminution de la phosphorylation des molécules IRS. Enfin, il exerce un rôle inhibiteur de translocation de la protéine de transport du glucose GLUT4 (Bouglé et Annane, 2009).

## I.1.4. 2. Facteurs tératogène:

Plusieurs études expérimentales ont essayé de disséquer les facteurs tératogènes dans le diabète maternel. (Styrud et Eriksson,1992 ; Buchananet *al.*,1994 ; Viana et al.1996; Eriksson et Wentzel 2015).

### a. Glucose:

L'augmentation de la concentration du glucose est la caractéristique de l'état diabétique. Il existe de nombreuses preuves cliniques que les taux accrus du glucose / HbA1c sont corrélés avec un risque élevé de malformation congénitale chez la progéniture (Hanson et *al.*,1990 ; Zhao et Reece, 2013). Des études expérimentales, montrent une corrélation entre l'augmentation des taux sériques du glucose et le risque de malformations fœtales chez les rats diabétiques (Eriksson et Wentzel 2015). De plus, l'injection du glucose à des rattes gestantes non diabétiques ont également eu des effets tératologiques. Fine et *al.*,(1999) ont montré que l'augmentation de la concentration du glucose *in vitro* dans la culture des embryons, provoque des perturbations du développement et peut provoquer des anomalies du tube neural (NTD) chez les embryons de souris.

L'augmentation du glucose produirait un flux glycolytique élevé, ainsi qu'une activité mitochondriale du cycle de l'acide citrique et une phosphorylation oxydative élevée. Plusieurs conséquences de l'augmentation de métabolisme du glucose ont été suggérées, avec une augmentation de la production mitochondriale de superoxyde peut posséder le potentiel tératogène le plus prononcé. Cependant, l'activité de l'hexose monophosphate, la formation des espaces réactives de l'oxygène (ROS), l'inhibition de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la formation élevée d'alpha-oxoaldéhyde peuvent jouer un rôle dans la dysmorphogénèse embryonnaire induite par le diabète (Eriksson et Wentzel 2015).

### b. Accumulation du sorbitol :

Plusieurs complications causées par le diabète ont été attribuées à l'accumulation de sorbitol, la notion que ce mécanisme pourrait être impliqué dans l'embryopathie diabétique a donc été étudiée (Lee et *al.*, 1995). Dans un état diabétique, une forte proportion du glucose est métabolisée par la «voie de polyol», où l'aldose réductase réduit le glucose en sorbitol. Le sorbitol peut s'accumuler dans les tissus et causer des dommages par des effets osmotiques (Siman, 1997). L'augmentation de la concentration du glucose dans le diabétique gestationnel expérimental est en effet mise en parallèle avec une augmentation de la concentration en sorbitol

embryonnaire (Akazawa, 2005). De plus, le diabète maternel a provoqué une augmentation à la fois de la teneur en sorbitol et de l'activité de l'aldose-réductase dans les fœtales. Cependant, même si l'on a montré que les inhibiteurs de l'aldose réductase réduisent l'accumulation embryonnaire de sorbitol, ils échouent *in vivo* et *in vitro* pour inhiber la tératogénicité du diabète (Siman, 1997 ; Eriksson, 2009).

**c. Carence en acide arachidonique :**

Une carence en acide arachidonique et des sons dérivés métabolique a été proposée pour induire des malformations au cours de diabète gestationnelle, la supplémentation en acide arachidonique à la fois *in vivo* et *in vitro* protège contre le diabète et les défauts de fusion du tube neural induits par la concentration élevée en glucose (Goldman et al., 1985 ; Eriksson, 2009 ; Eriksson et Wentzel, 2012). Les études de Wentzel et al., (1999) ont montré que la concentration de prostaglandine E2 (PGE2) diminuée au jour 10, mais pas au jour 11, chez les embryons des rats diabétique. La PGE2 est formée à partir de l'acide arachidonique à travers la voie cyclooxygénase. On a signalé que les inhibiteurs de la cyclooxygénase étaient à la fois tératogènes (Wentzel et Eriksson, 1998 ; Eriksson et al., 2003 ; Higa et al., 2007) et protégés contre les anomalies du tube neural induites par l'hyperglycémie (Kubow et al., 1993).

**I.1.4. 3. Malformations embryonnaires associées avec le diabète maternel :**

Elles sont dues aux effets tératogènes des désordres métaboliques et de l'hyperglycémie maternels, et se développent dans les sept premières semaines de grossesse, atteignant le système cardio-vasculaire, uro-génital, le squelette, le système nerveux central (SNC). On constate un risque 7 à 10 fois plus élevé chez les enfants de mères diabétiques avant la grossesse. Elles sont souvent à l'origine de fausses couches. Mais en ce qui concerne les patientes souffrant de diabète gestationnel, il s'agit le plus souvent d'une hyperglycémie développée au 2<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse. L'organogenèse étant déjà effectuée, il existe donc un risque de malformation fœtale sensiblement égal à celui de la population générale (il ne faut pas oublier les patientes dont le diabète, antérieur à la grossesse mais méconnu, a été diagnostiqué pendant la grossesse) (Zhao et Reece, 2013).

**a). Système nerveux central « Tube neural » :** Les malformations du SNC les plus fréquemment associées au diabète sont celles qui intéressent les premières étapes de la neurulation, avant la fin de la 4<sup>e</sup> semaine du développement : le déterminisme de la « bilatéralisation » de l'encéphale (et de la face) dont la perturbation conduit à

l'holoprosencéphalie, et la fermeture du tube neural. Les modèles expérimentaux animaux confirment d'ailleurs que le diabète maternel ou l'hyperglycémie modifie l'expression de gènes particulièrement impliqués dans ces phénomènes (Fine et *al.*, 1999 ; Liao et *al.*, 2004). L'holoprosencéphalie et les anomalies faciales qui s'y associent sont observées dans 1 à 3 % des grossesses de femmes diabétiques (à comparer à une fréquence globale estimée à 1/250). Les neurodysraphies les plus évocatrices du diabète sont les lésions étendues, rachischisis voire craniorachischisis, particulièrement si elles sont associées à des dysostoses rachidiennes, et les encéphalocèles.

**b). Système cardiovasculaire « défaut congénital au niveau du cœur :**

Les cardiopathies (hors cardiomyopathies), dont la fréquence est globalement multipliée par 5 dans un contexte diabétique, sont aussi des malformations à déterminisme « précoce » puisque la morphogénèse cardiaque est achevée à 50 jours de développement. Les communications intraventriculaires (CIV) sont les plus fréquemment observées, mais, paradoxalement, relativement moins souvent que dans la population générale. Plus caractéristiques du diabète sont les ventricules droits à double issue (VDDI) (Wren et *al.*, 2003), les transpositions des gros vaisseaux et les troncs artériels communs, ainsi que les atrésies tricuspides, les hétérotaxies, ou les syndromes d'hypoplasie du cœur gauche (Wren et *al.*, 2003 ; Frias et *al.*, 2007). La relative fréquence des cardiopathies conotruncales chez les enfants de mères diabétiques a suggéré l'implication des crêtes neurales céphaliques qui peuplent le pôle artériel du tube cardiaque primitif et participent à la formation des gros vaisseaux et d'une partie du septum interventriculaire : hypothèse confirmée par l'étude de modèles animaux, *in vivo* ou *in vitro*, montrant un défaut de migration, de différenciation et de prolifération des cellules neurocrestales cardiaques, dans un contexte de diabète maternel ou d'hyperglycémie (Kumar et *al.*, 2007). Via des modèles analogues, l'hypoglycémie peut aussi s'avérer responsable d'anomalies de la morphologie et de la fonction cardiaques fœtales (Smoak et *al.*, 2002).

**c). Système musculosquelettique :** Les atteintes squelettiques les plus fréquentes dans le diabète sont les anomalies rachidiennes, à type de dysostoses, traduisant une anomalie de la mise en place des somites (autour de la 4<sup>e</sup> semaine du développement) (Frias et *al.*, 2007). Elles sont isolées ou bien associées à des dysraphies ou dysgénésies du pôle caudal. Au niveau des membres, dont l'architecture se met en place, on observe essentiellement des anomalies réductionnelles : Les plus caractéristiques sont les atteintes radiales ou fémorales, généralement

unilatérales, hypoplasie ou bifidité et les polydactylies ou duplications, en particulier des hallux (Åberg et al, 2001 ; Frias et al, 2007).

**d). Effet de diabète sur la pré-implantation et sur le placenta :** Dès que barrière placentaire se met en place, lors de la formation des premières villosités (à J21 après la conception), le transfert de glucose de la mère à l'embryon puis au fœtus s'organise. Il s'effectue au travers de la barrière, par un système de transfert facilité par le transporteur GLUT1, qui assure, en permanence, un parallélisme entre la glycémie maternelle et la glycémie fœtale : l'hyperglycémie, comme l'hypoglycémie maternelle sont transmises directement au fœtus. Celui-ci est capable, dès le second trimestre, de réagir aux variations de sa glycémie par ses mécanismes régulateurs pancréatiques et développe une hyperplasie de ses îlots de Langerhans en réponse à l'hyperglycémie de sa mère diabétique.

L'examen du placenta est d'un apport majeur au diagnostic de diabète maternel, même en dehors de toute morbidité fœtale (Benirschke et al, 1999 ; Evers et al, 2003). Classiquement, le placenta est volumineux pour l'âge gestationnel, surtout pour les enfants non macrosomes (Evers et al, 2003); il semblerait l'être moins qu'attendu pour le poids fœtal (rapport P/F plus faible que la normale) (Roche et al, 2004). Il est épais, à la coupe, d'aspect macroscopique hydropique, avec un cordon ombilical « gras », de diamètre élevé, qui présente une artère unique plus souvent que dans la population normale.

Il faut remarquer que l'examen du placenta à lui seul est capable d'orienter vers un état de dysrégulation maternelle glycémique, probablement de l'ordre d'une augmentation de la résistance à l'insuline, en deçà des seuils détectables par les examens biologiques de dépistage du diabète, constatent que leur groupe de placentas « contrôles » d'enfants de poids anormalement élevé issus de mères non diabétiques a un aspect plus proche de ceux des enfants de mères diabétiques que de ceux des enfants contrôles de poids normal. Ils relèvent que ces enfants ont des mères dont l'indice de masse corporelle (IMC) est élevé et donc soulignent une possible résistance à l'insuline infraclinique. Ces observations rejoignent celles des fœtopathologistes confrontés au quotidien au problème des décès inopinés in utero de fœtus en fin de grossesse, en dehors de toute pathologie connue (Delezoide et al., 2008).

### I.2. Stress oxydant :

Dans une cellule eucaryote normale, l'énergie nécessaire à son fonctionnement se fait de façon aérobie en utilisant des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydants ou accepteurs d'électrons et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Elles ont lieu dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui fournit 90% de l'énergie nécessaire. Dans cet organe intracellulaire, l'oxygène est l'accepteur final d'électron après une cascade de réactions d'oxydo-réduction, faisant intervenir quatre complexes protéiques. Lorsque l'oxygène est transformé en molécule d'eau, cela permet de générer de l'ATP (adénosine triphosphate), molécule à haut potentiel énergétique (Figure4).

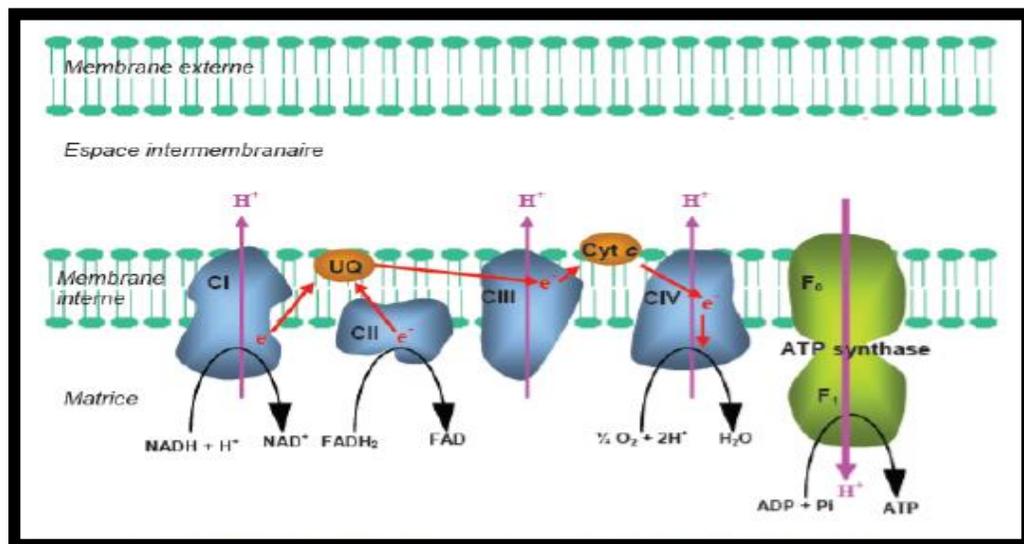


Figure 4. Chaîne respiratoire de la mitochondrie (Auberval, 2010).

Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau ; il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivées de l'oxygène très réactives. Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants. Quand un déséquilibre apparaît entre molécules pro-oxydantes et antioxydantes, en faveur des entités oxydantes, on parle alors de stress oxydant (Auberval, 2010)(Figure 5).

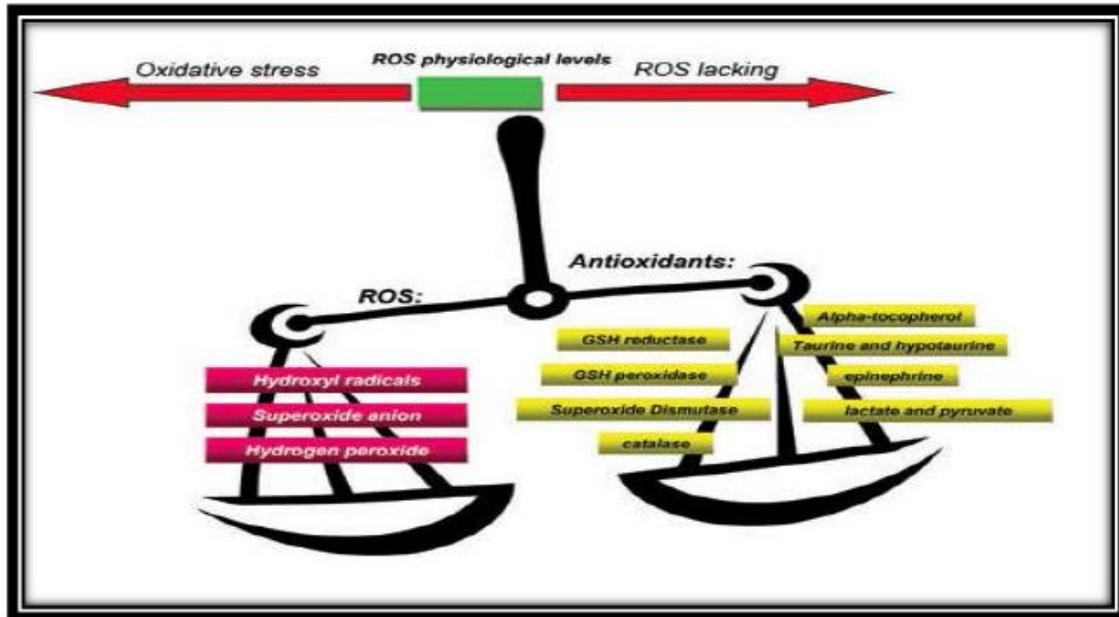


Figure 5. Balance entre les prooxydant et les antioxydnt (Fontaine,2007).

### I.2.1. Radicaux libres :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (Halliwell et Gutteridge, 2007). Il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple :  $\cdot\text{OH}$ ) (Mac Laren 2007, Goto et *al.*, 2008). Leur durée de vie est très courte allant de quelques millisecondes à quelques nanosecondes. Ils peuvent entraîner des lésions tissulaires en captant des électrons d'une molécule stable pour essayer d'apparier leurs propres électrons, laissant ainsi la molécule originale dans un état instable (Filaire et Toumi, 2012). Les Espèce Réactifs de l'Oxygène (ERO) constituent la plus importante classe des espèces à radical libre qui soit formé dans les systèmes vivants (Finaud et *al.*, 2006). On peut distinguer les radicaux primaires, qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...) (Favier, 2003 ; Gardès-Albert et *al.*, 2003). Actuellement, on emploie le terme d'ERO pour désigner un ensemble plus large de molécules :

- Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , les radicaux hydroxyles  $\text{HO}^{\cdot}$ , peroxyde  $\text{ROO}^{\cdot}$ , alkoxyde  $\text{RO}^{\cdot}$ ) (Favier, 2003).

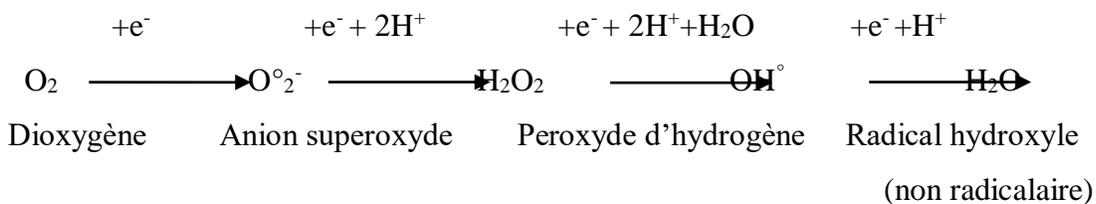
- Des dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'oxygène singulet  $^1O^2$  et le nitroperoxyde (ONOOH) mais qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux libres (Bartosz, 2003. Halliwell et Whiteman 2004) (Tableau 1)

**Tableau 1.** Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003)

Nom	Symbole
<b>Espèces radicalaires</b>	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$
<b>Espèces non radicalaires</b>	
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^-$

### I.2.1.1 Origine et destinée des ERO :

Une vision simple de la formation des principales espèces activées de l'oxygène peut être apportée par la « chaîne de réduction monovalente » de l'oxygène. Elle consiste en l'addition successive sur la molécule d'oxygène, un par un, de quatre électrons conduisant à la formation de la molécule d'eau, selon le schéma suivant (Delattre et *al.*, 2005) :

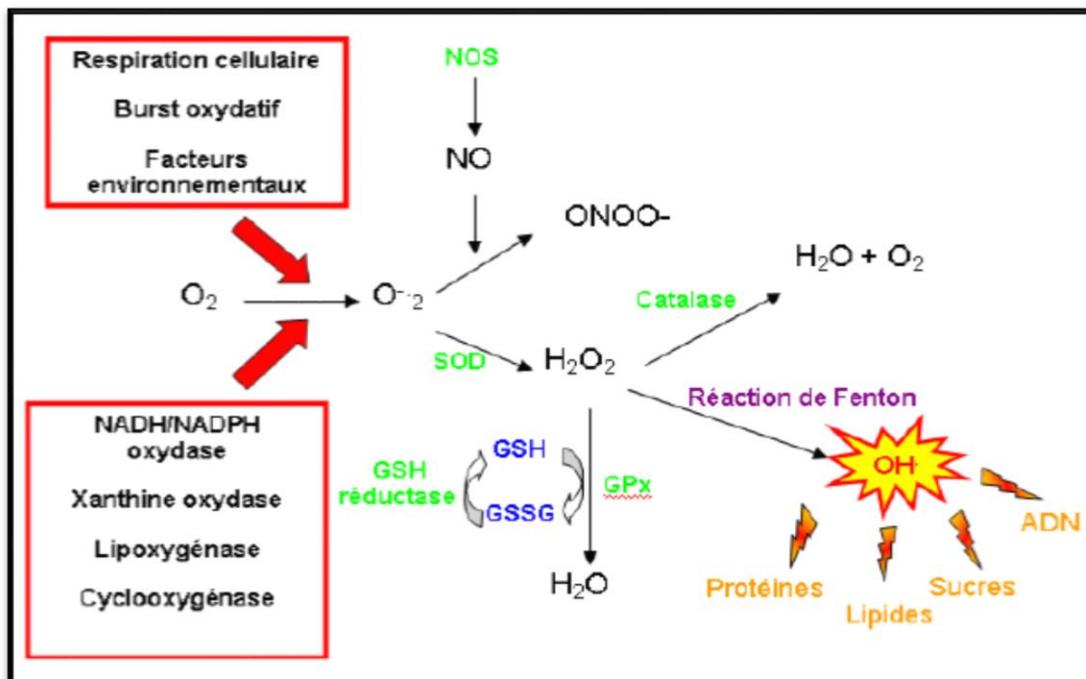


La molécule de dioxygène est en réalité bi-radicalaire. Elle possède, en effet, deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes,

il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  qui est un radical modérément réactif. Il est formé après réduction de l'oxygène  $O_2$  par un électron et en présence d'un cofacteur NADPH. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique. Les superoxydes dismutase (SOD) vont ensuite dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  qui est relativement stable et peut diffuser au travers des membranes. Cette molécule donne ensuite *via* la réaction de Fenton (non enzymatique) une entité très réactive, le radical hydroxyle,  $OH^\circ$ . Ce dernier va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (Figure 6).

Les ERO peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques. C'est ainsi que la chaîne respiratoire provoque une libération importante d'ERO, mais dont l'intensité demeure controversée.

D'autres activités enzymatiques fournissent aussi des ERO, notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'ERO.

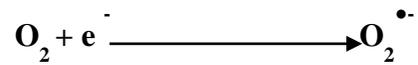


**Figure 6.** Schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et des cibles biologiques (Auberval, 2010).

### I.2.1.2. Différents radicaux libres oxygénés :

#### a). Anion superoxyde :

Par sa configuration électronique l'oxygène moléculaire est un radical, il possède en effet deux électrons non appariés, heureusement un blocage cinétique limite sa réactivité ; les spins de ses deux électrons parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande. Cependant, dans l'organisme, une partie de cet oxygène moléculaire peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ); chef de fil des EOR (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

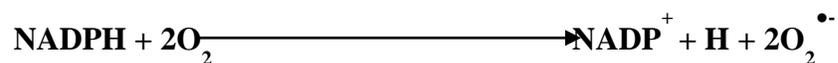


La source principale de ce radical est la chaîne de transport d'électrons mitochondrial (Bartosz, 2003) au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase) et du complexe III (ubiquinol /cytochrome c oxydoréduction) (Chiarugi et Fiaschi, 2007). Environ 0 à 5 % de l'oxygène moléculaire utilisé par les mitochondries est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire (Bartosz, 2003).

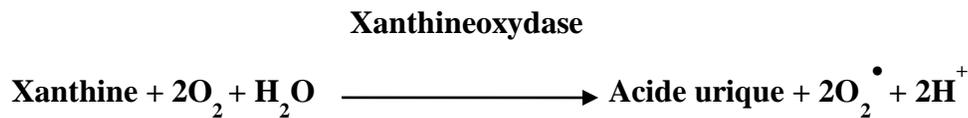
D'autres chaînes de transport d'électrons (péroxyosomes et microsomes) contribuent pareillement à la production du  $O_2^{\bullet-}$  dans les cellules en aérobiose. Les cytochromes  $P_{450}$  et  $b_5$  de la chaîne de transport d'électrons des microsomes peuvent produire des EOR quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l' $O_2$  (Sevanian *et al.*, 1990).

La poussée respiratoire (respiratoryburst) des polynucléaires neutrophiles constitue une source cellulaire importante de l'anion superoxyde qui est produit au niveau de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique formé de plusieurs sous unités. Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée pour produire l' $O_2^{\bullet-}$ . Cette production est à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'hypochlorite ( $ClO^{\bullet-}$ ) indispensables à la digestion du matériel phagocyté (Babior *et al.*, 2002).

#### NADPH oxydase



Le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante :

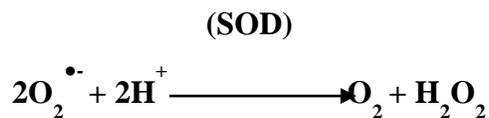


De nombreuses molécules peuvent être substrats de réactions d'auto-oxydations (non enzymatique), comme le glucose, les monoamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) l'hémoglobine, conduisant également à la formation du superoxyde (Bartosz, 2003).

Ce radical est peu réactif mais représente le précurseur d'espèces plus agressives. Avec l'apport d'un autre électron il devient un ion peroxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  qui à son tour avec l'ajout de deux ions hydrogène ( $2\text{H}^+$ ) produit l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### b). Peroxyde d'hydrogène:

Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) n'est pas un radical libre, puisqu'il ne possède pas d'électron libre. Cependant, il fait partie des dérivés actifs de l'oxygène (Lacolley et al., 2007). Il est produit par la dismutation de l'anion superoxyde. La dismutation enzymatique est catalysée principalement par la SOD.



À côté de la SOD, il existe d'autres enzymes produisant  $\text{H}_2\text{O}_2$ , comme les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes (Kohen et Nyska, 2002). Cependant, certaines de ces oxydases comme la glycoxylate oxydase, la D-aminoacide oxydase peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde (Del Rio et al., 1996), le foie est l'organe central de cette production. Les microsomes sont responsables dans 80% de la concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$  généré *in vivo* dans les sites hyperoxiques (Valko et al., 2006).

Bien qu'il soit utilisé par l'organisme pour lutter contre les pathogènes et qu'il joue un rôle dans de nombreuses voies de signalisation, comme l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, il est aussi toxique pour les cellules du fait de sa capacité à générer d'autres ERO. Il a aussi la capacité à diffuser à travers les membranes cellulaires, ce qui lui permet d'étendre ses effets dans d'autres

compartiments cellulaires (Marinho et *al.*, 2014). En présence de métaux, il est capable de générer le radical hydroxyle. Le peroxyde d'hydrogène peut oxyder directement les composés biologiques notamment les protéines, en particulier les résidus cystéines et ainsi former des ponts disulfures (Bretón-Romero et Lamas, 2014). Cela va entraîner une modification de la structure de la protéine et altérer sa fonction. Le peroxyde d'hydrogène peut être dismuté en eau et dioxygène, réaction catalysée par la catalase.

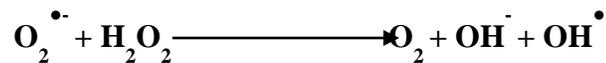
### c). Radical hydroxyle:

Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) est formé principalement par la dégradation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi  $\text{H}_2\text{O}_2$  associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton.



$\text{H}_2\text{O}_2$  peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du  $\text{OH}^\bullet$ , ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorg, 2004).

### Fe(III)/Cu(II)



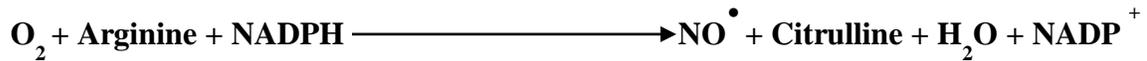
D'autres voies de formation du  $\text{OH}^\bullet$  sont : la décomposition de l'acide peroxonitrique et la réaction de l'acide hypochloreux avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Bartosz, 2003).

Avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus toxique et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène, il réagit avec de nombreuses espèces moléculaires. Il peut oxyder tous les acides aminés mais il est plus réactif avec les acides aminés soufrés et aromatiques (Lacolley et *al.*, 2007 ; Davies, 2005). Il est en outre capable d'inhiber certaines enzymes. Le radical hydroxyle réagit aussi avec l'ADN, ce qui va altérer sa structure et entraîner des mutations, et participe aux réactions de peroxydation lipidique (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

### d). Monoxyde d'azote :

Le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS) (Sorg, 2004) selon la réaction suivante :

## Nitrique oxyde synthase

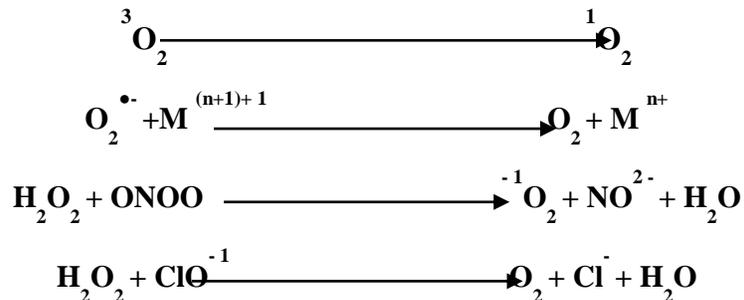


NO<sub>2</sub> Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, régulation immunitaire (Valko et *al.*, 2007). Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pour former un puissant oxydant le peroxy-nitrite (ONOO<sup>•</sup>) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le et le OH<sup>•</sup> (Densiov et Afanas'ev, 2005).

### e). Oxygène singulier :

Pour l'oxygène moléculaire l'état triplet (biradical) est plus stable que l'état singulier, ainsi l'oxygène singulier fait partie des EOR. Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers EOR ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur comme la porphyrine, tel est le cas de la porphyrie erythropoétique- congénitale (Sorg, 2004)

#### Lumière + photosensibilisateur



### I.2.1.3. Rôle physiologique des entités oxydantes:

De façon physiologique, les espèces réactives radicalaires (OH<sup>•</sup>) ou non (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables (Halliwell and Gutteridge, 1989 ; Sies, 1993). Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles sont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir

dans la défense immunitaire, agir en tant que second messager cellulaire, intervenir dans les voies de transduction du signal et ainsi réguler les fonctions cellulaires (Dikalov *et al.*, 2007).

## **a). Messagers intra et extracellulaire :**

Les radicaux libres ou les espèces réactives constituent par eux-mêmes un système de transmission de signaux, qui serait apparu très tôt dans la vie (Favier, 2003). Ils peuvent être considérés comme des messagers intra et extracellulaire car ils permettent d'induire des réponses cellulaires face à de nombreux stress. Ces stress peuvent être d'origine thermique ou induits par des radiations comme les ultraviolets ou par des xénobiotiques (pesticides, médicaments), ce qui conduit à l'expression de gènes de défenses (SOD à manganèse, catalase...).

Ils participent aux cascades de signalisation intracellulaire dans de nombreuses cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et le tissu thyroïdien (Dröge, 2002).

## **b). Régulation du tonus vasculaire et autre fonction du NO :**

Le monoxyde d'azote (NO) extracellulaire ou produit par les NOS, a la capacité de se fixer et d'activer la guanylatecyclase, produisant un second messager important à l'origine de nombreuses réponses physiologiques, le GMPc. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de la protéine kinase GMPc dépendante permet la phosphorylation et l'activation de canaux potassiques calcium dépendants responsables de la relaxation des vaisseaux. Le NO joue également un rôle dans l'inhibition de l'adhésion plaquettaire (Auberval, 2010).

## **c). Défense immunitaire et « Burst Oxydatif » :**

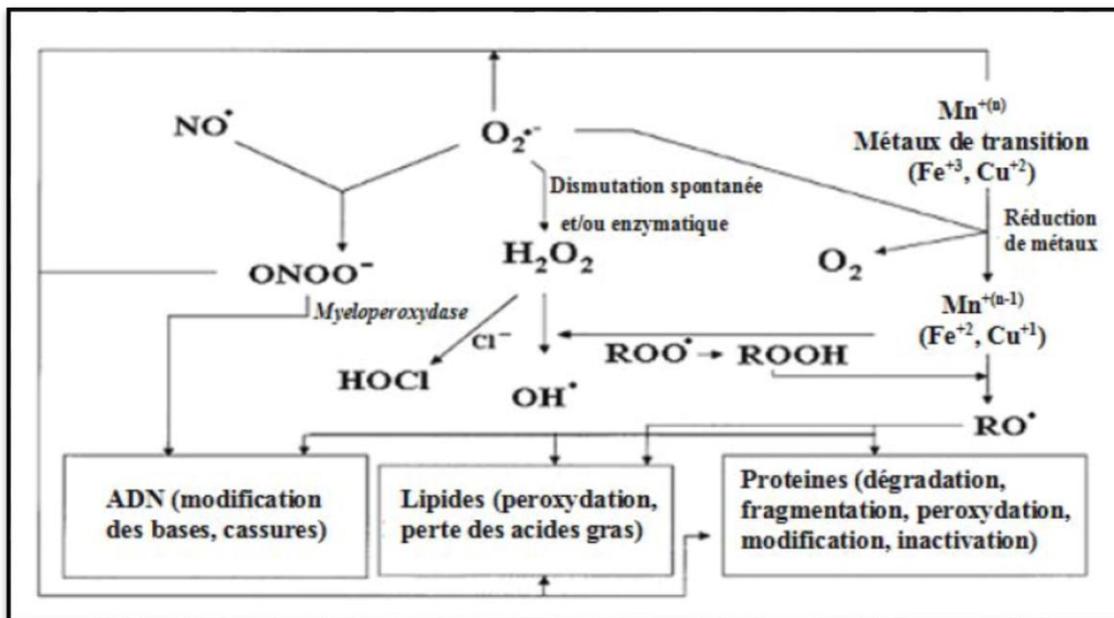
Dans les leucocytes et notamment les polynucléaires neutrophiles (PN), les entités oxydantes participent très activement à la défense de l'organisme par leur action toxique notamment sur les bactéries par le phénomène de « burst oxydatif ». Dans un environnement inflammatoire, les PN sont attirés par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse. Ils phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiales pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation des neutrophiles permet la libération de protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, et implique l'isoforme phagocytaire de la NADPH oxydase, la myéloperoxydase ou MPO et la NOS. La NADPH oxydase relargue une grande quantité d'anions superoxydes qui sont ensuite dismutés en peroxyde d'hydrogène dans la fente du phagosome qui contient du chlorure à forte concentration. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène et

le chlorure vont être utilisés par la MPO pour former de l'acide hypochlorique (HOCl), qui peut réagir avec l'anion superoxyde pour former le radical hydroxyle, qui va exercer son attaque oxydante (Serteyn, 2003).

Le but est d'éliminer les micro-organismes en produisant des espèces oxydantes capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (Babor, 1999 ; Babor, 2000). Le burst oxydatif est la première ligne de défense dans un environnement pathogène (Dröge, 2002).

## I.2.2. Stress oxydant et ses conséquences biologiques:

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, des sucres, de l'ADN et des lipides (Figure 7).



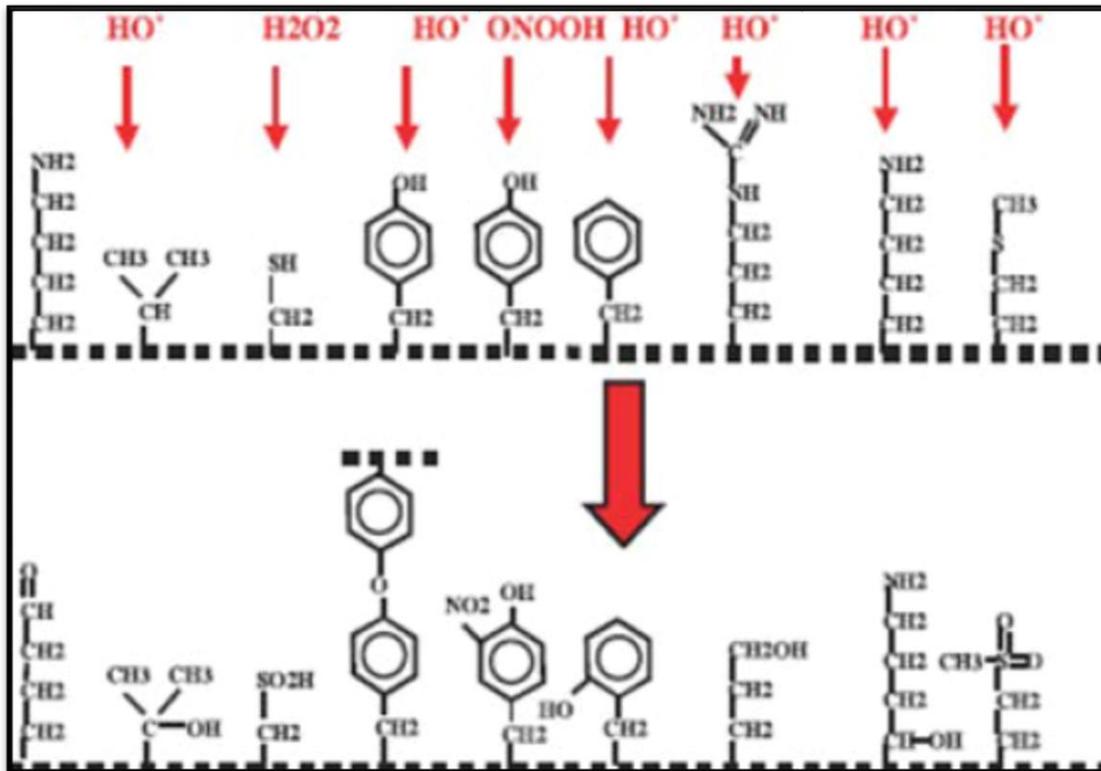
**Figure 7.** Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (Kohen et Nyska, 2002).

### I.2.2.1. Oxydation des protéines :

Protéines subissent des modifications au cours du stress oxydant, soit sous l'action des radicaux libres oxygénés, soit en présence de métaux de transition. Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines. Ces modifications peuvent conduire à la perte de la fonction ou de l'activité de la protéine et il en résulte que les protéines modifiées deviennent.

Presque tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ERO et former des groupements carbonylés, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) étant les plus sensibles à l'oxydation. Par exemple, l'oxydation des groupements thiols (-SH) peut donner lieu à la formation de pont disulfure entre deux résidus (Davies, 2000). Ces dommages peuvent entraîner des altérations structurales et fonctionnelles importantes : perte d'activité enzymatique, non reconnaissance de la protéine par son récepteur. Normalement, ces protéines non fonctionnelles sont prises en charge par des systèmes protéolytiques tel que le protéasome et dégradées. Cependant, lorsque ces systèmes protéolytiques sont défaillants, les protéines oxydées peuvent former des agrégats, dû au fait qu'elles deviennent hydrophobes et s'accumuler dans les cellules (Figure 8) (Favier, 2003).

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines (Levine, 2002). Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés. L'histidine, la proline, l'arginine et la lysine sont particulièrement prédisposées à cette attaque. La formation de nitrotyrosines est due au peroxy-nitrite hautement toxique, produit par la réaction du monoxyde d'azote et du superoxyde. Les carbonyles protéinés et les nitrotyrosines sont tous deux très stables et ne sont généralement pas retrouvés chez les patients, faisant d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables (Favier, 2003).



**Figure 8.** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

#### I.2.2.2. Peroxydation lipidique :

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique (Figure 9) forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Favier., 2003). Les radicaux diènes conjugués, sous l'action de l'oxygène, se transforment en hydroperoxydes qui peuvent, soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase, soit continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et alcanes volatiles (Hamadi., 2010).

La peroxydation de lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) (Figure 10) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

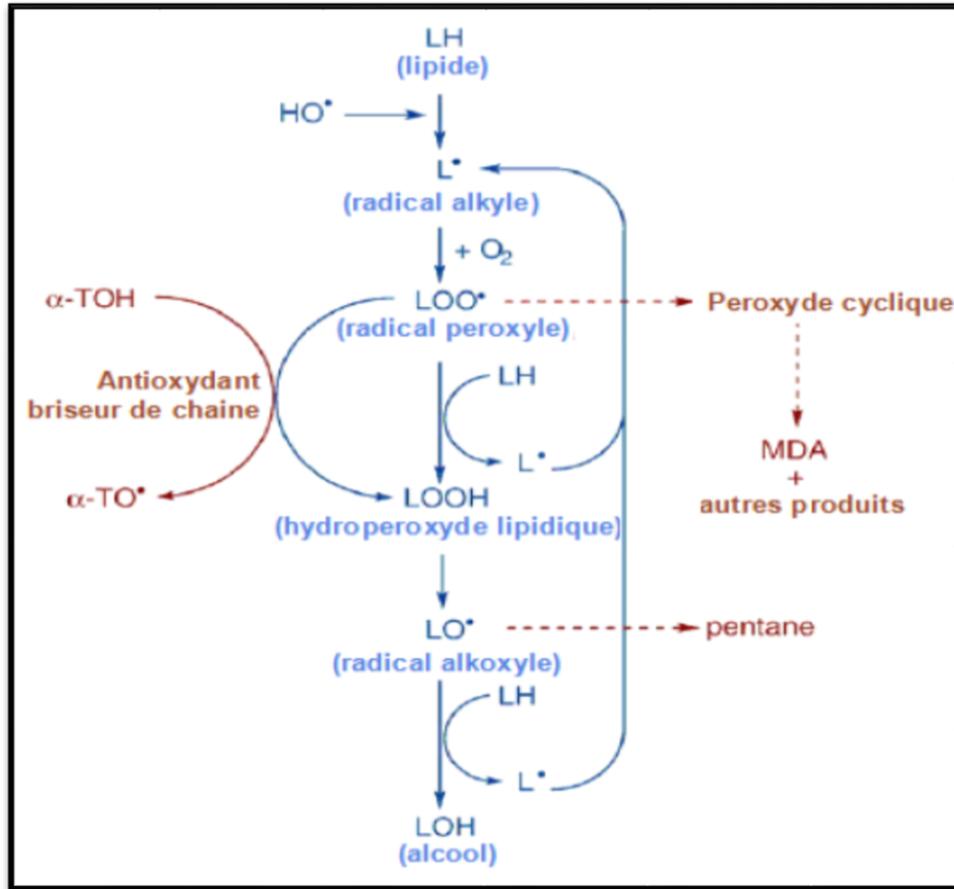


Figure 9. Les trois étapes de la peroxydation lipidique (Sachdev et Davies, 2008).

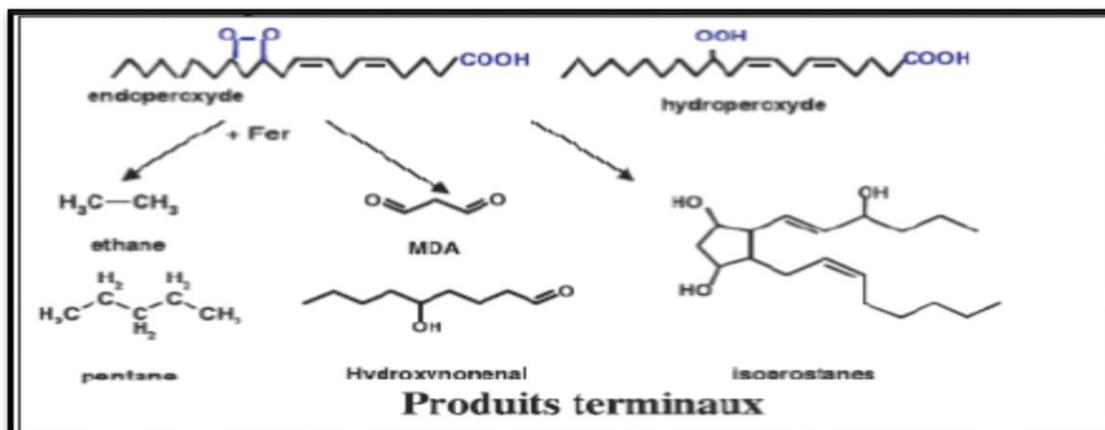


Figure 10. La nature des produits terminaux formés lors de peroxydation lipidique. (Sachdev et Davies, 2008).

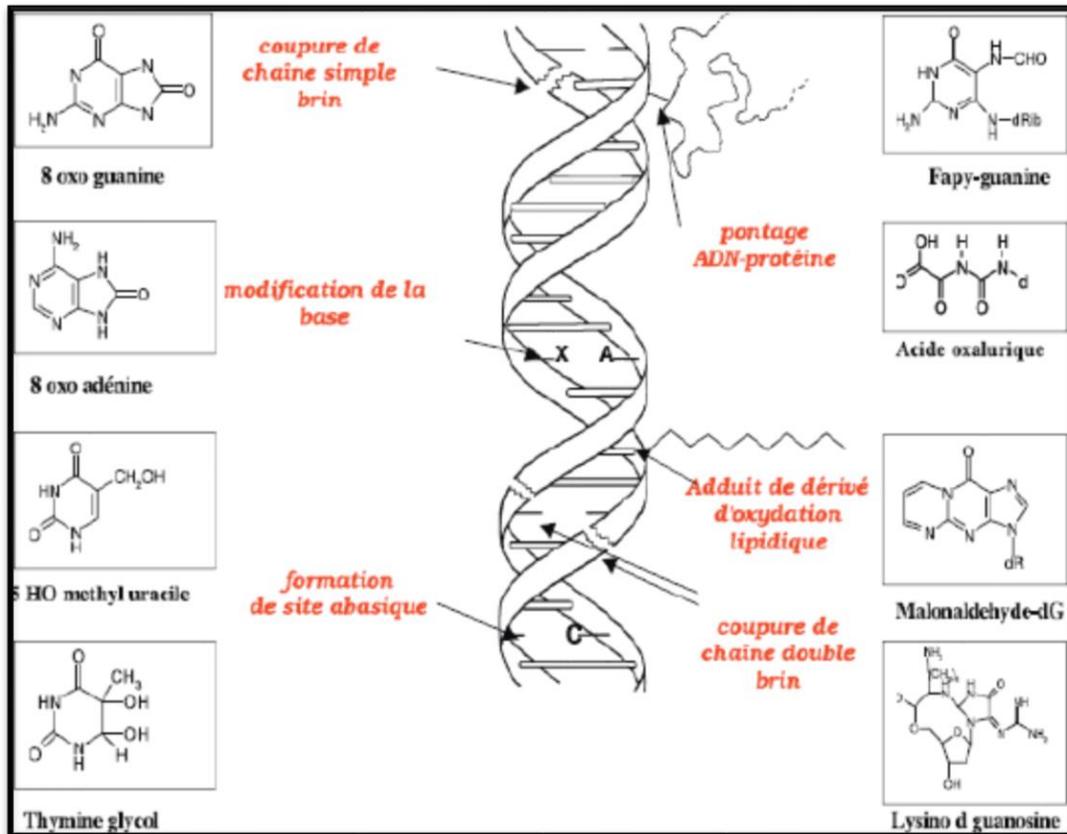
### I.2.2.3. L'oxydation des acides nucléique :

L'oxydation de l'ADN constitue une caractéristique majeure retrouvée dans des conditions de stress oxydant accru. La base guanine est principalement touchée par les phénomènes d'oxydation de l'ADN. La guanine va réagir avec le radical hydroxyle pour former du 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG). Le 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine va alors s'apparier avec l'adénine au lieu de la cytosine ce qui va induire des mutations au sein de l'ADN (Haleng et al., 2015). Le radical hydroxyle peut aussi réagir avec les groupements aromatiques des bases d'ADN (Nikitaki et al., 2015).

Ces altérations de l'ADN peuvent entraîner des coupures de l'ADN simple brin et double brin.

Il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Certaines enzymes permettent la réparation directe de l'ADN. La réparation de l'ADN peut se faire également par excision des bases endommagées, celles-ci sont remplacées en utilisant le brin intact comme matrice. Cependant, l'efficacité de ces systèmes dépend de plusieurs facteurs comme l'âge de la cellule ou le type de cellule. De plus, si les dommages sont trop importants, la cellule va entrer en apoptose ou dans un cycle de division cellulaire non contrôlé aboutissant à la formation de tumeurs cancéreuses.

Les dommages médiés par le stress oxydant au niveau de l'ADN sont de cinq types: l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques, d'adduits intra-caténaires, des cassures des brins et des pontages ADN-protéines (Cadet et al., 2002)(Figure 11).



**Figure 11.** Types de lésions de l'ADN provoquées par les attaques radicalaires (Favier, 2003).

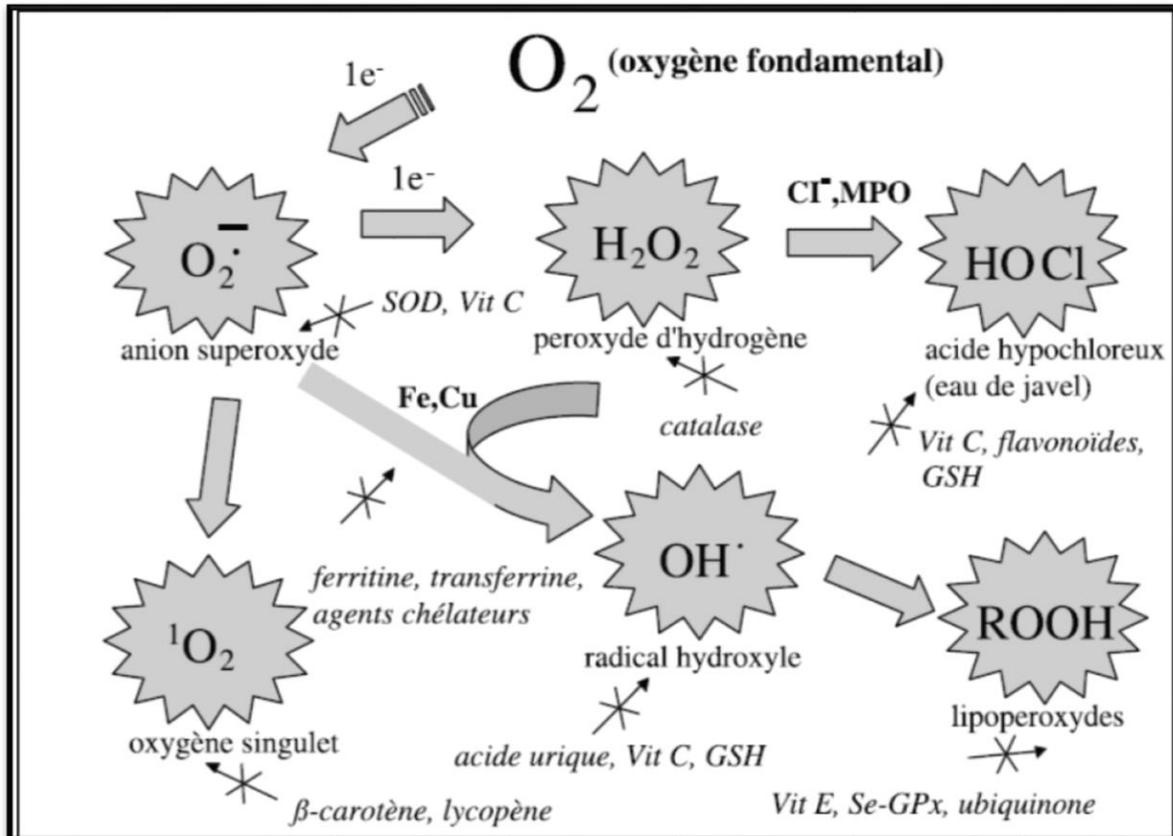
#### I.2.2.4. Sucres :

En présence de métaux, l'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et des anions superoxydes ( $OH^\bullet$ ), et entraîner la coupure de protéines et leur glycation par attachement du céto-aldéhyde formant un dérivé de produit de glycation avancé (AGE, Advanced Glycation End product) (Auberval., 2010).

#### I.2.3. Systèmes de défense antioxydante :

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 12). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types

cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Kebieche., 2009).



**Figure 12.** Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail et al., 2002).

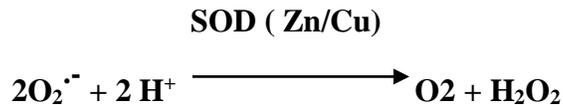
### I.2.3. 1. Antioxydants enzymatiques :

Les enzymes antioxydantes sont les premières lignes de défenses contre les entités oxydantes. Leur rôle est de diminuer la quantité de ROS présente dans la cellule. Parfois ces enzymes nécessitent des oligo-éléments (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique (Auberval., 2010).

Il s'agit principalement de trois enzymes ; (i) la superoxyde dismutase (SOD), (ii) la catalase (CAT) et (iii) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du  $O_2^{\bullet-}$  et du  $H_2O_2$ , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel et al., 2001).

## a). Superoxydismutase :

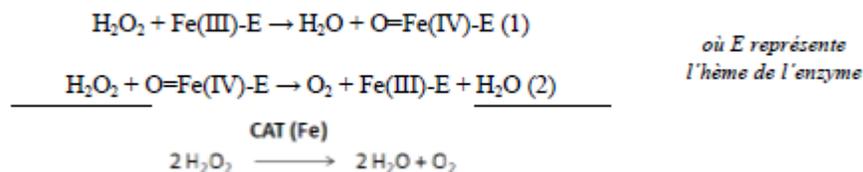
Les SOD sont les premières enzymes à intervenir dans la cascade des ERO. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène, selon la réaction suivante :



Il en existe trois isoformes décrites chez les mammifères: la SOD à Manganèse (Mn) dans les mitochondries, à cuivre (Cu) ou à zinc (Zn) dans le cytoplasme et les mitochondries, et des formes Cu/Zn SOD extracellulaires. Les deux dernières sont retrouvées dans les vaisseaux sanguins. Il existe des molécules chimiques de synthèse qui possèdent cette activité enzymatique et sont perméables aux membranes cellulaires. Elles sont appelées SOD mimétiques(Fridovich, 1995).

## b). Catalase :

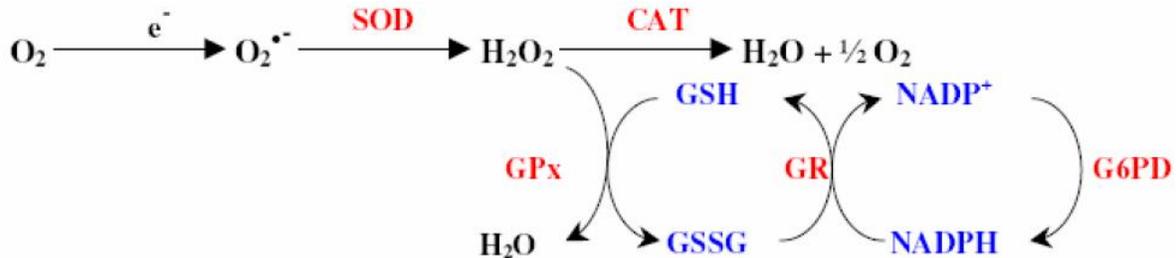
La catalase (CAT) est une protéine ubiquitaire fortement concentrée dans le foie et les érythrocytes. Dans toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, elle est localisée presque exclusivement dans les peroxysomes (riches en oxydases) ce qui limite son action par rapport à des peroxydases cytoplasmiques. Cette enzyme est formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constitue les sites actifs de la CAT. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un groupement intermédiaire Fe(IV)=O très oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène(Delattre et *al.*, 2005). Cette réaction est illustrée par les deux demi-équations suivantes :



## c).Glutathion peroxydase:

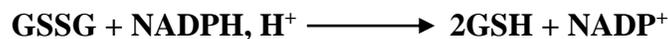
Il existe cinq isoformes de la glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les mammifères, localisées dans la mitochondrie, le noyau ou le cytoplasme. La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine(Boyer, 2016). La GSH-Px est présente dans les liquides extracellulaires (sang) et dans les cellules au niveau du cytoplasme et des membranes. Elle assure

la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH) et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires, grâce à la présence de glutathion réduit (GSH) (Banerjee et Vats, 2013), selon le mécanisme suivant :



Les molécules toxiques sont ainsi transformées en molécules assimilables comme l'eau et l'alcool. Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée GSSG est obtenue. Pour que cette réaction perdure, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR). Elle catalyse la réduction du GSSG en GSH (ci-dessous), à l'aide du cofacteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H<sup>+</sup>). Le NADPH, H<sup>+</sup> provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphates (Sayre et al. 2005).

#### GRase



### I.2.3. 2. Antioxydants non enzymatiques :

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (Pincemilet *al.*, 2002 ; Koechlin–ramonatxo, 2006). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les phytates, huiles essentielles (Bruneton, 1999). Flavonoïdes (Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001) apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (Koechlin–Ramonatxo, 2006).

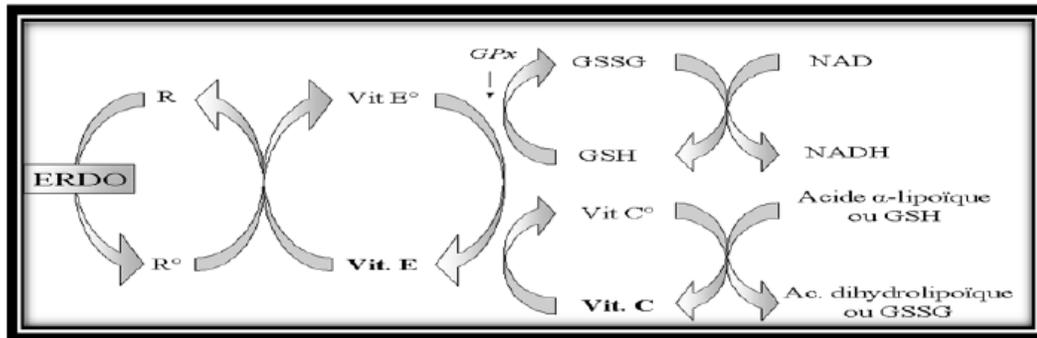
**a). La glutathion réduit :** Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine :  $\gamma$ -L-Glutamylcystéinyl glycine. C'est le thiol intracellulaire le plus abondant. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH). De plus, il piège le peroxyde d'hydrogène et réagit avec l'oxygène singulet et le radical hydroxyle (Benaraba., 2007) et agit également comme cosubstrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transféras(Ravi et *al.*, 2004). Les formes GSH (réduite) et GSSG (oxydée) forment un couple d'oxydoréduction très important dans la cellule car il permet les échanges d'électrons à l'intérieur de celle-ci(Auberval., 2010). La glutathion fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vit C, la vit E et les superoxydesdismutases(Gerard-Monnier et Chaudiere., 1996). Des études ont montré son importance dans de nombreuses pathologies comme le cancer où une protéine exercerait son effet anti-carcinogène en augmentant les concentrations de GSH (Bounous, 2000). De plus, il protégerait des complications afférentes au diabète (Thornalley et *al.*, 1996).

**b). Métallothionéines:** Les métallothionéines(MT) sont des dérivées métalliques d'une protéine riche en soufre : la thionéine. Ces protéines régulent les concentrations intracellulaires en métaux (cuivre, zinc, cadmium, mercure) en les séquestrant, prévenant ainsi leur circulation sous leur forme libre pro-oxydante. Induites lors d'intoxications aux métaux notamment, les MT préviennent donc la mise en place de processus oxydatifs (Petersen et *al.*,2008).

**c). Thioredoxines:**Les thioredoxinessont de petites protéines douées d'une activité intrinsèque d'oxydoréduction. Elles sont capables de réduire les ERO et de restituer leur conformation aux protéines oxydées. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques, du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyle en acide ascorbique(Haton., 2005).

**d). Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) :**La vitamine E est un terme générique pour tous les tocophérols et les tocotriénols, desquels existent 8 dérivatifs et dont l' $\alpha$ -tocophérol est le plus abondant (Shils et *al.*, 2006). La vitamine E agit directement sur une grande variété d'ERO pour former un radical peu réactif. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie principalement par la vitamine C (Figure 13), mais également par d'autres composés comme le GSH, la vitamine A et l'ubiquinol. La vitamine E est liposoluble et a été démontrée comme le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Shils et al., 2006 ;

Traber et Atkinson, 2007). Elle pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Lyn Patrick, 2006).



**Figure 13.** Régénération de la vitamine E par la vitamine C et le GSH

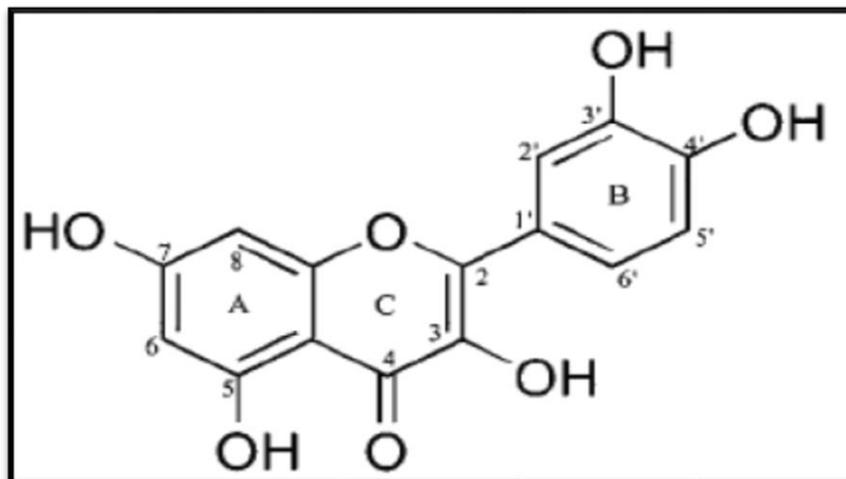
(Malardé, 2012).

**e). La vitamine C (acide L-ascorbique) :** C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra et extracellulaires. Il protège efficacement les protéines sans protéger les lipides (Haton., 2005).

L'acide ascorbique est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène singlet. Il sert également à régénérer la vitamine E oxydée (Borg et Reeber., 2008).

**f). La vitamine A (caroténoïde) :** La vitamine A agit de manière synergique avec la vitamine E au niveau de la membrane pour piéger les radicaux libres. Elle serait aussi capable de régénérer la vitamine E oxydée. Les caroténoïdes, dont font partie le  $\beta$ -carotène et le lycopène, piègent l'oxygène singlet, grâce à leur structure très riche en doubles liaisons (Haton., 2005).

**g). Les flavonoïdes :** Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005). De nos jours, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en  $C_6$  (A et B), reliés par un hétérocycle en  $C_3$  (Figure 14) (Bruneton, 1999; Pietta, 2000).



**Figure 14.** Structure générale du noyau des flavonoïdes

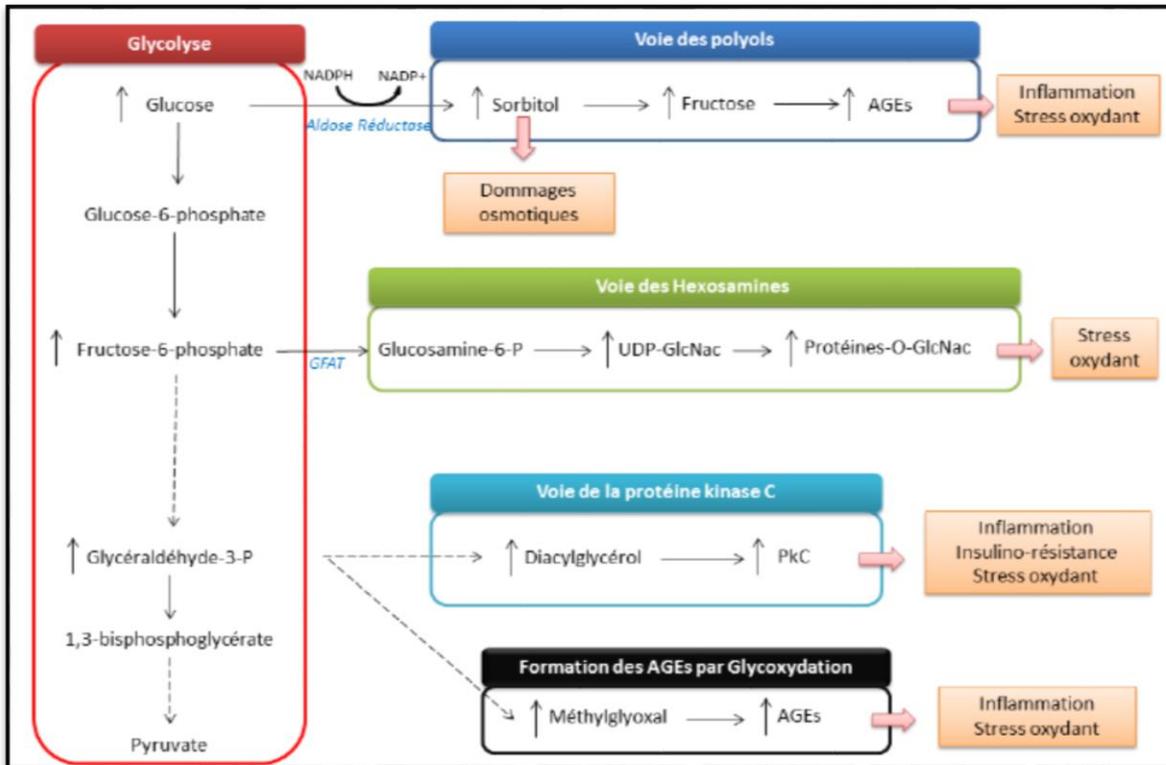
( Heim *et al.*, 2002)

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich., 2006)

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à ; (i) leur capacité de piéger directement les RL, (ii) de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss, (iii) d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, (iv) d'activer les enzymes antioxydantes et (v) de réduire les radicaux  $\alpha$ -tocophéryl (Cotelle 2001 ; Heim *et al.*, 2002; Lin et Weng.,2006).

### I.3. Toxicité du glucose :

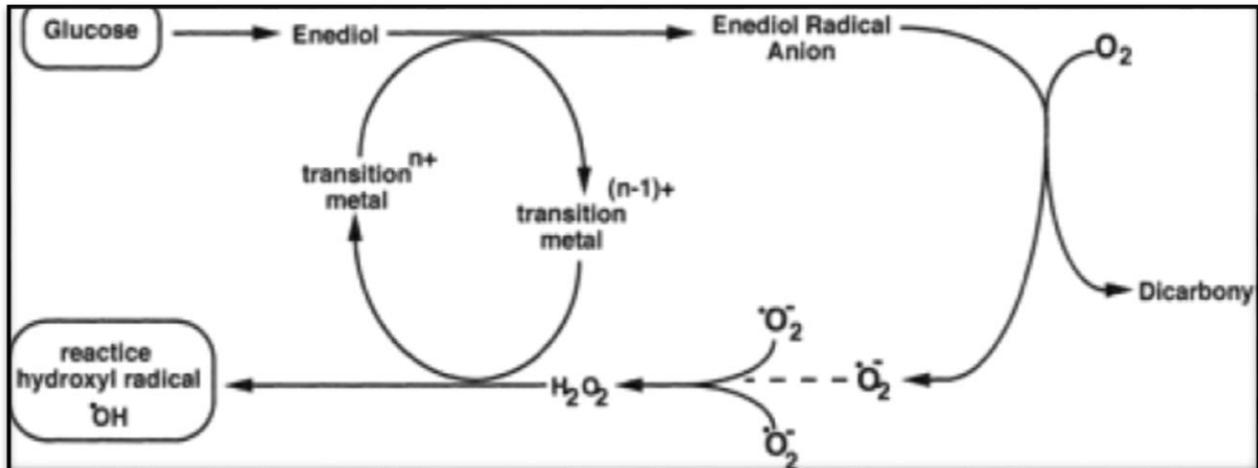
La toxicité liée à l'hyperglycémie chronique est maintenant bien connue. Différentes voies sont activées en condition d'hyperglycémie et jouent un rôle dans le mécanisme de toxicité du glucose. Parmi ces voies activées par l'hyperglycémie, on peut citer : la voie des polyols, des hexosamines, de la protéine kinase C (PKC) et les voies de formation des produits avancés de glycation (AGE) (Figure 15).



**Figure 15.** Voies activées par l'hyperglycémie. Quatre voies sont activées par l'hyperglycémie : la voie des polyols, des hexosamines, de la protéine kinase C (PKC) et les voies de formation des produits avancés de glycation (AGE). (Boyer,2016).

### 1.3.1. Auto-oxydation du glucose :

L'auto oxydation du glucose a été décrite par Wolff et Dean (1987). Le glucose, dans sa forme linéaire, possède une fonction aldéhyde et une fonction hydroxyle adjacente, en équilibre avec la forme ène-diol. Le glucose peut, sous la forme ène-diol et en présence de métaux de transition, donner naissance à un radical anionique ène-diol. C'est sous cette dernière forme que le glucose est capable de façon isolée de s'oxyder en présence de métaux de transition, aboutissant à la formation d'un radical anionique ène-diol. Ce radical peut ensuite réagir avec l'oxygène pour libérer des anions superoxydes. Au cours de cette réaction, il y a formation d' $\alpha$ -cétoaldéhyde, qui peut réagir avec des métaux de transition *via* la réaction Fenton pour former des radicaux hydroxyles très réactifs (Hunt *et al.*, 1988 ; Hunt and Wolff., 1991; Wolff *et al.*, 1991), capables d'altérer les protéines avant même la fixation du glucose sur celles-ci (Figure 16) (Benaraba., 2007).



**Figure 16.** Réactions à l'origine de la production d'ERO par autoxydation du glucose (Ahmed., 2005).

Les produits de l'autoxydation du glucose sont à leur tour, précurseurs d'un autre mécanisme impliqué dans l'élévation du SO en cas d'hyperglycémie : la glycation des protéines et la formation des Produits Terminaux de Glycation (PTG), plus communément appelés AGE (Advanced Glycated End-Product) (Malardé, 2012).

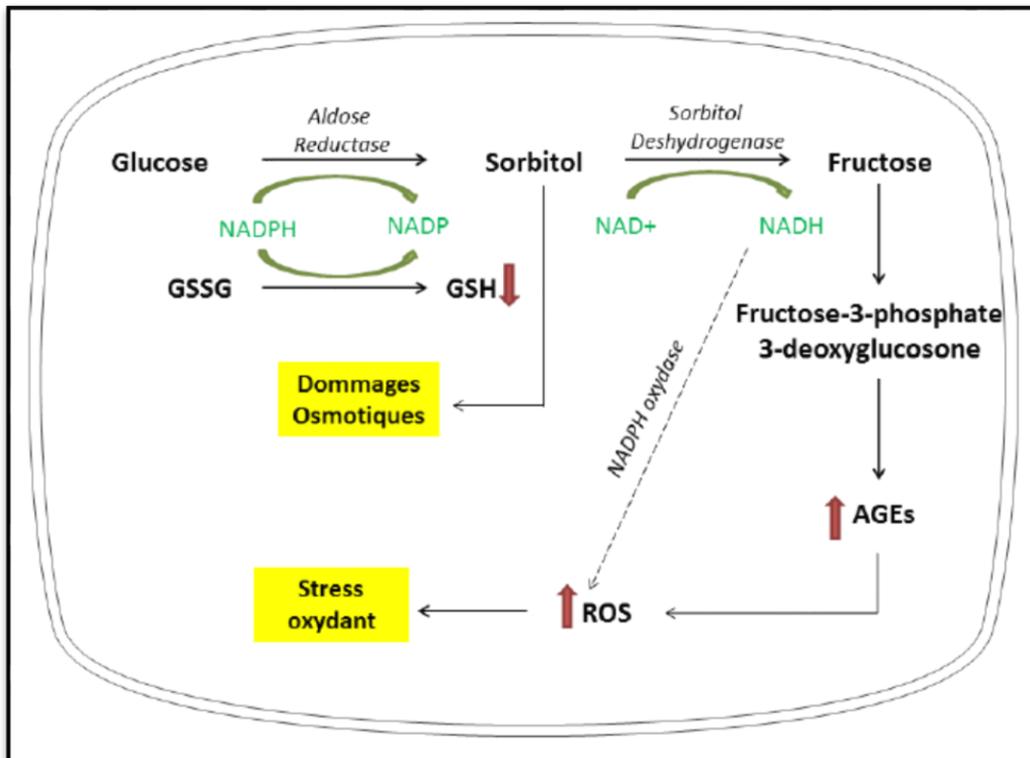
### I.3.2. Activation de la voie des polyols :

A l'état de normoglycémie, le glucose est transformé par l'hexokinase en glucose-6-phosphate pour rejoindre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Cependant, dans le cas d'une hyperglycémie, l'hexokinase est saturée. Le glucose, de ce fait, s'accumule dans les tissus périphériques et active une voie accessoire, la voie des polyols (Auberval., 2010). Cette voie fait intervenir deux enzymes ; L'aldose réductase et le sorbitol déshydrogénase.

L'aldose réductase, qui n'est active qu'à de fortes concentrations du glucose du fait de sa faible affinité pour celui-ci, réduit le glucose en sorbitol en utilisant comme cofacteur le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH, H<sup>+</sup>) provenant de la voie des pentose-phosphates et qui sera oxydée en NADP<sup>+</sup> (Figure 17). L'expression de cette enzyme semble augmentée dans le diabète. Puis le sorbitol déshydrogénase oxyde une partie du sorbitol formé en fructose en utilisant comme cofacteur le nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD<sup>+</sup>) (Bouldjadj., 2009).

L'activation de la voie des polyols conduit à : L'accumulation du sorbitol (agent du stress osmotique très actif) ; L'accumulation du fructose (caractérisé par son grand pouvoir réducteur

par rapport au glucose) qui stimule la glycosylation non enzymatique des protéines ; et La diminution du rapport  $\text{NADPH}$ ,  $\text{H}^+/\text{NADP}^+$  et  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  (altération du potentiel redox) ce qui affecte la régénération du GSH en aboutissant à un stress oxydant et limite également certaines réactions enzymatiques, comme la formation du NO par la NO synthase. Ces conséquences sont directement impliquées dans la production des ROS et l'inhibition de certains antioxydants (Boumaza, 2009).



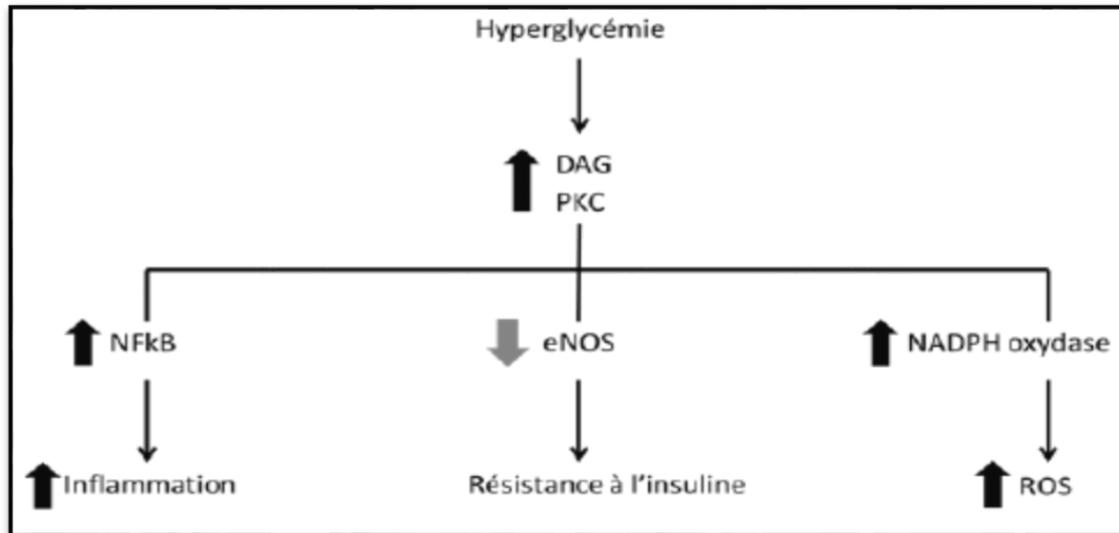
**Figure 17.** Voie des polyols. L'activation de la voie des polyols va entraîner une augmentation du stress oxydant mais aussi provoquer des dommages osmotiques dus à l'augmentation du sorbitol.

(Boyer,2016).

### I.3.3.Activation de la protéine kinase C :

Le mécanisme responsable de l'activation de la PKC semble être principalement lié à une production accrue du diacylglycérol (DAG) à partir des intermédiaires de la glycolyse par l'activation de la Phospholipase C et l'inhibition de la DAG Kinase (Xia et *al.*, 1994 ; Keogh et *al.*, 1997).L'augmentation de l'activité de l'enzyme induit une augmentation de l'expression des gènes néfastes pour la cellule et au contraire, diminue celle des gènes bénéfiques. En effet, elle augmente l'expression de facteurs vasoconstricteurs (endothéline-1) en diminuant ceux vasodilatateurs (NO). Elle induit également l'expression de gènes pro-inflammatoires et

augmente la production de ROS par la NADPH oxydase (Brownlee., 2005). L'activation de la PKC va contribuer à l'installation de l'insulino-résistance via la diminution de l'expression de eNOS(Figure 18) (Naruse et al, 2006).



**Figure 18.** Voie de la PKC dans le cadre de la pathologie diabétique (Boyer,2016).

#### I.3.4. Voie des hexosamines :

L'activation de la voie des hexosamines va aboutir à la formation de protéines O-Glycosylées (O-GlcNac). La O-GlcNac glycosylation est une modification post-traductionnelle qui implique l'addition d'un N-acétylglucosamine sur un résidu serine ou thréonine des protéines. En condition physiologique, 2 à 3% du glucose est converti en UDP-GlcNac qui est le produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines. L'élément limitant de cette voie est la glutamine-fructose 6-Phosphate aminotransférase (GFAT) (Willis et al, 2010).

En condition d'hyperglycémie, l'expression de la glutamine-fructose 6-Phosphate amidotransférase (GFAT) est augmentée (Divald et Powell, 2006). La glucosamine-6-phosphate ainsi formée est transformée en UDP-N-acetyl-glucosamine (UDP-GlcNac). L'UDP-GlcNac est le substrat de l'enzyme O-GlcNac transférase (OGT) qui va catalyser la formation de protéines O-GlcNac (Figure 19).

L'activation de cette voie va entraîner une augmentation de la génération des ROS et contribuer à l'installation d'un stress oxydant. De plus, l'accumulation des protéines modifiées par l'O-

GlcNac glycosylation joue un rôle dans les complications et l'apparition de maladies associées au diabète (Kopelman.,2000 ; Youn et *al.*, 2014).

Le phénomène de glycosylation des protéines va contribuer au phénomène de glucotoxicité du glucose dans la pathologie diabétique.

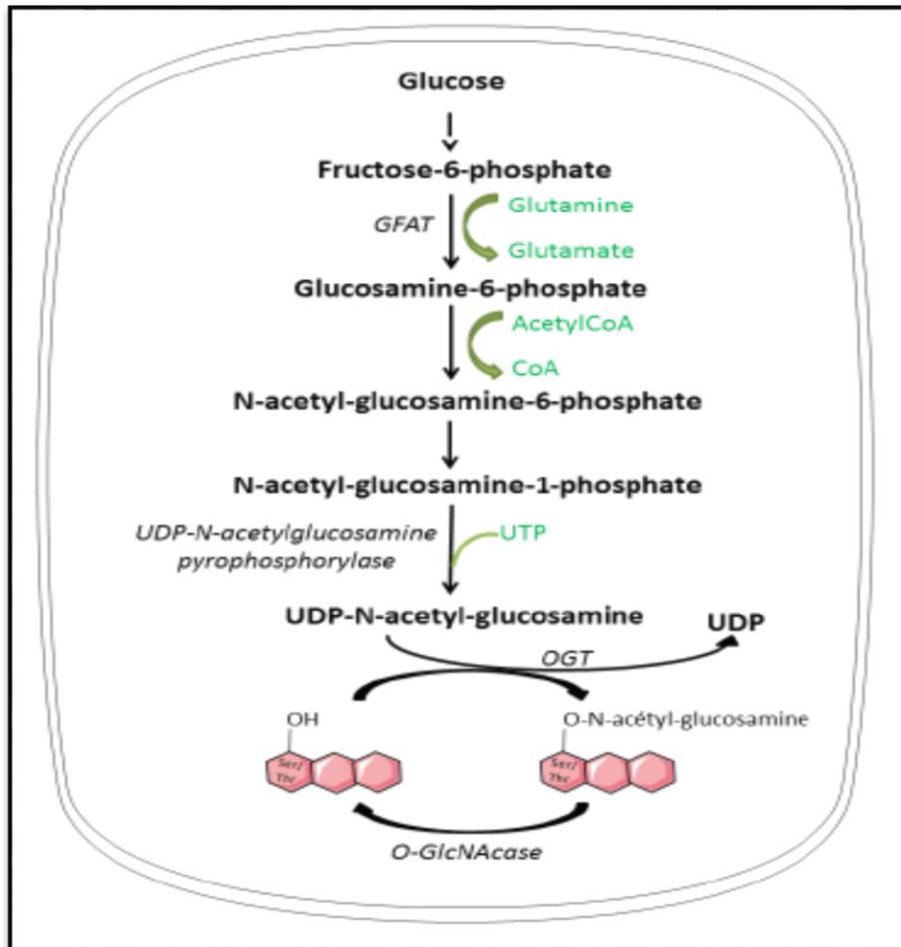


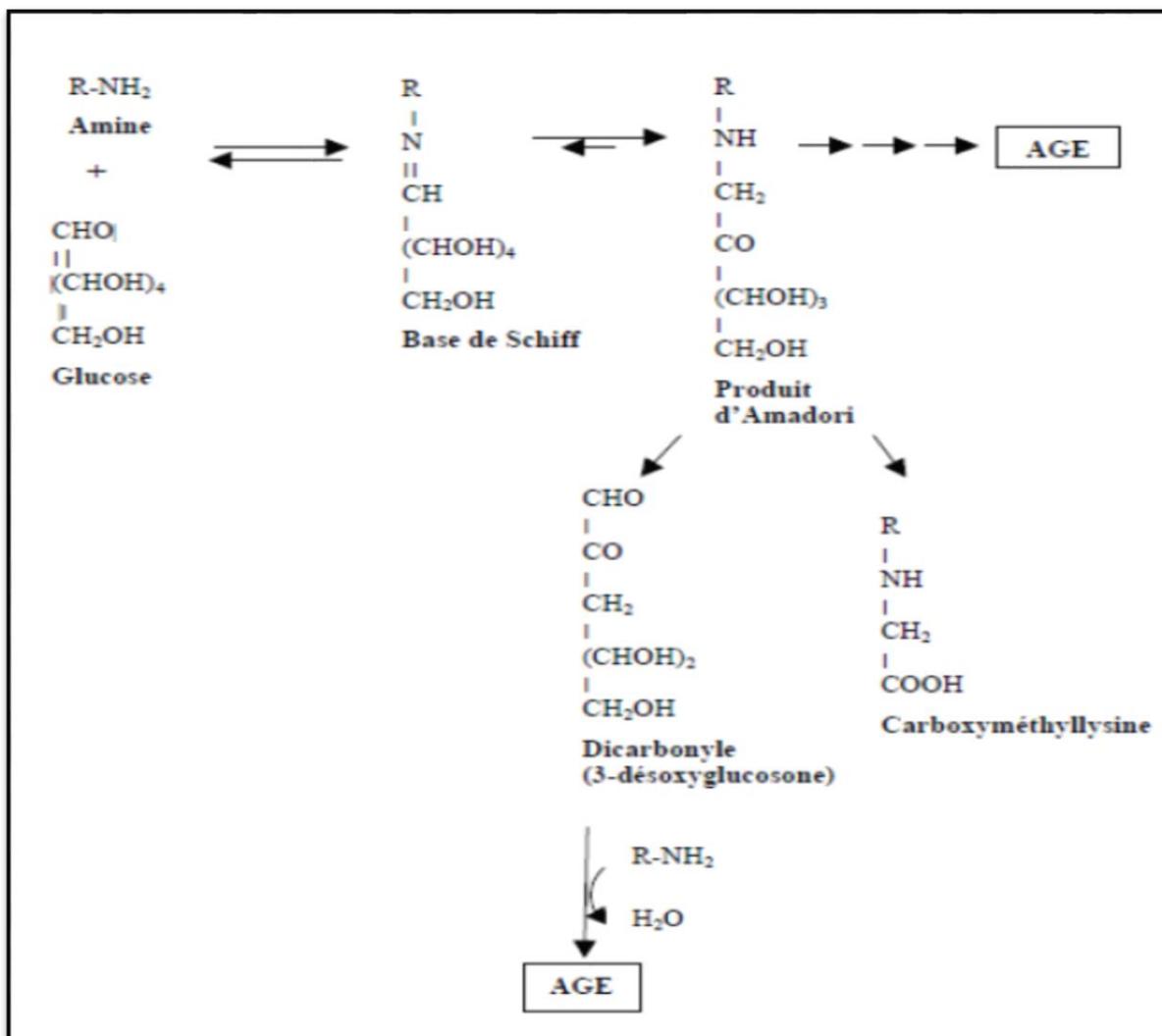
Figure 19. Voie des hexosamines(Boyer,2016).

### I.3.5 Glycation des protéines :

L'hyperglycémie est une cause essentielle de la glycosylation non enzymatique ou la glycation des protéines. La glycation des protéines est une réaction covalente qui attache sans l'intervention d'enzyme des résidus glucose aux  $\text{NH}_2$  libres des protéines (Racciah, 2004). Le glucose (ou autre sucre réducteur) réagit avec la fonction amine N-terminal des protéines ou d'un acide aminé, le plus souvent une lysine, ce qui permet la formation d'une base de Schiff qui se réarrange en produit d'Amadori(Guillet, 2010)qui présente la particularité de posséder un groupement céto.

Cette fonction céto peut, en présence de métaux de transition, céder un électron à l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation d'anions superoxydes  $O_2^\circ$  (Bouldjadj., 2009). Ces produits d'Amadori vont subir une série de réactions (déshydratation et réarrangement) avant d'être convertis en adduits covalents stables ou AGEs (Figure 20) (Brownlee., 2001). La formation d'AGEs est dépendante des ROS ; elle est augmentée par la production de MDA et par la diminution de GSH réduit (Jain et Palmer., 1997).

La glycation touche des protéines comme l'albumine, les immunoglobulines, le fibrinogène, le collagène et les LDL. La protéine glyquée la plus connue est l'hémoglobine glyquée, HbA1c dont le taux est utilisé en clinique comme indice du contrôle métabolique de la glycémie (Boyer, 2016).



**Figure 20.** Formation des AGEs par la voie de Maillard (Januel, 2003)

## I.4. *Cistanche tinctoria* L.

*Cistanche* est un genre de plantes parasites, appartenant aux angiospermes eudicotylédones de la famille des Orobanchaceae. Ce genre comprend 27 espèces holoparasites, sans chlorophylle, *Cistanche tinctoria* L., comme tous les membres de la famille, c'est une plante parasite. Elle est dépourvue de chlorophylle et donc incapable d'effectuer la photosynthèse (Baba Aissa, 1999).

### I.4.1. Systématique :

Classe : Magnoliopsida

Famille : Orobanchaceae

Genre : *Cistanche*

Espèce : *tinctoria* L.

### I.4.2. Description morphologique :

*Cistanche tinctoria* L (Nom vernaculaire : Danoun en arabe) c'est une plante érigée et non ramifiée, de 0,2 à 1 m. d'hauteur. Sa tige est comprise entre 3 et 5 cm d'épais. Les feuilles sont lancéolées, réduites à l'échelle brunâtre. Les racines sont absentes: la plante s'attache à son hôte via de petits tubercules. Les principales plantes hôtes sont *Tamarix gallica*, *Calligonum comosum* et *Pulicariasp.*

Ses nombreuses fleurs forment une pointe dense, avec des pétales jaunes, en forme de tube de 3-4 cm. Ouverture au sommet. Comme la plante apparaît après la pluie, la floraison se produit peu de temps après; Cela peut arriver à n'importe quel moment de l'année dans les hautes montagnes du Sahara central. La floraison dans les zones les plus septentrionales du Sahara algérien est habituellement au début du printemps (Ozenda, 1991).

### I.4.3. Distribution géographique :

Local: commun sur les hauts plateaux et le nord du Sahara algérien; Plus rare dans le Sahara occidental et central.

Régional: Afrique du Nord.

Global: Afrique du Nord (Benchelah et al., 2000).

### I.4.4. Partir utilisée :

La partie inférieure épaisse de la tige est recueillie juste après la pluie. Il est utilisé comme poudre séchée, prise par voie orale. Il est également utilisé pour traiter les abcès. La partie inférieure de jeune plante est coupée en tranche et séchée pour fabriquer les cataplasmes (Bellakhda, 1997).

## **I.4.5. Constituants :**

Amidons et composés aromatique

## **I.4.6. Action pharmacologique et toxicologique :**

Aucune information n'a été trouvée sur l'action pharmacologique de cette plante, alors qu'une recherche sur sa toxicité semble négative (Benhouhou, 2009).

## **I.4.7. Médecine traditionnel :**

Il est utilisé pour traiter la diarrhée, le diabète, les troubles intestinaux, les infections (abcès) et comme diurétique. Les nomades dans le sud du Maroc et l'Algérie mangent la partie inférieure soit bouillis dans de l'eau, soit cuits et mélangés avec des céréales pour faire une sorte de porridge ou un pain plat. Il est également connu pour ses propriétés aphrodisiaques.

La plante est également utilisée pour le bronzage et la teinture des peaux. Dans la région de Tissint (Maroc). La poudre est appliquée aux plaies comme homéostat.

Une préparation préparée à partir de la partie inférieure séchée, du miel et des feuilles de l'olivier est utilisée comme crème pour les hémoroides.

En Egypte, la plante en poudre séchée mélangée au lait de chameau est utilisée pour contourner les cataplasmes (Bellakhda, 1997 ; Hammiche et Maiza, 2006 ; Benhouhou, 2009).

# *Matériels & Méthodes*



### II.1. Objectif de l'étude :

La présente étude a été menée sur la mise en évidence de constituants chimiques et sur l'évaluation des activités, antioxydantes, antidiabétique et l'effet anti-térogène de *Cistanche tinctoria*. Pour cela, nous avons fixés les objectifs suivants :

- identifier les différents constituants chimiques présents dans la partie aérienne de *C. tinctoria* par des réactions colorées et la chromatographie sur couche mince (CCM);
- l'évaluation de l'activité antioxydante in vivo et in vitro des nos extrais;
- évaluer la toxicité des extraits en subaigüe ;
- évaluer l'activité antidiabétique des extraits aqueux et méthanolique de *Cistanche tinctoria* sur un modèle animale insulino-prive dont l'hyperglycémie a été provoquée par l'injection de la streptozitocine.
- évaluer l'effet prophylactique des nos extraits sur la térogénicité du diabète expérimental chez le rat Wistar.

Pour cela, nous avons adopté le protocole générale montré dans la Figures 21

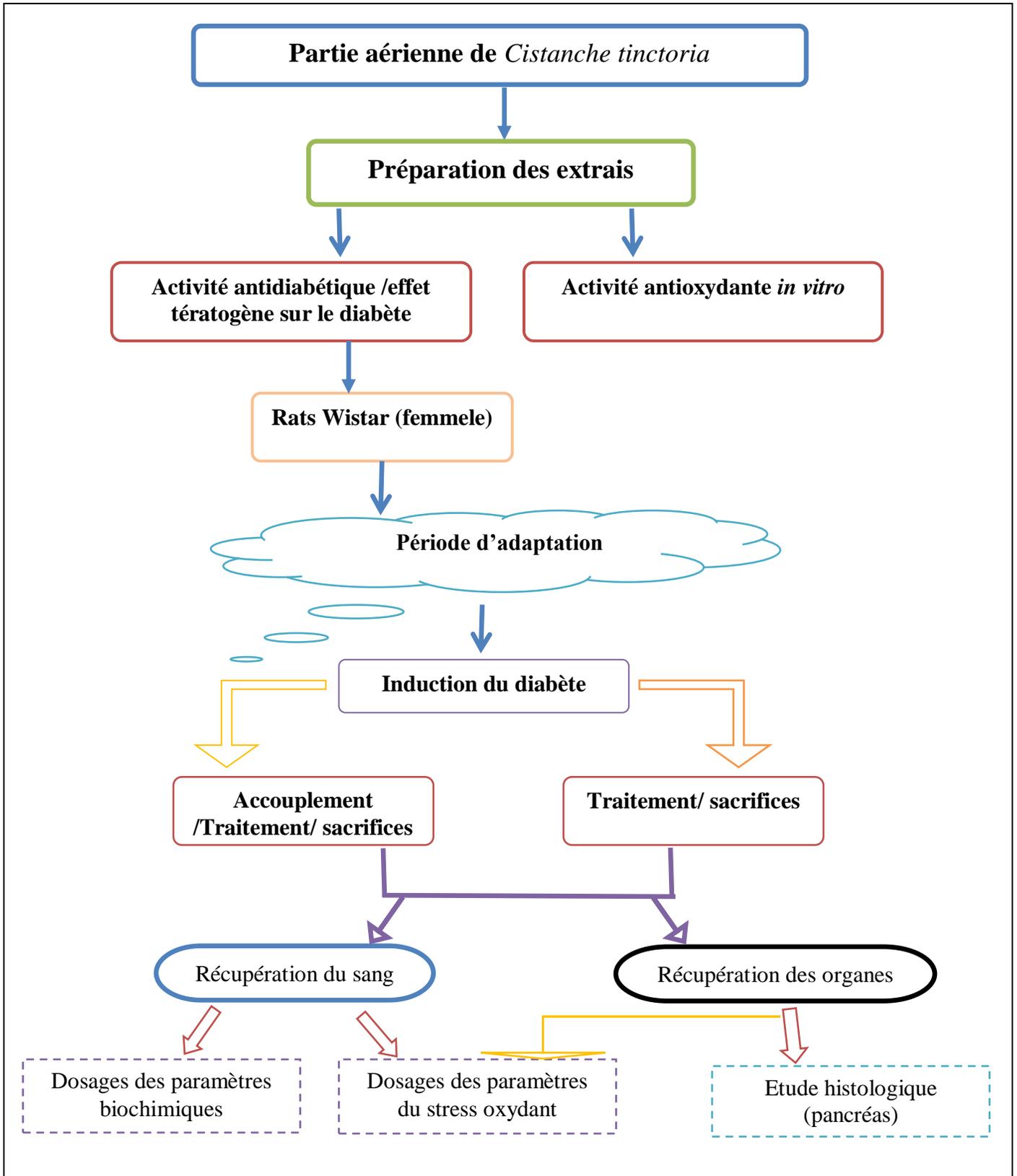


Figure 21. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

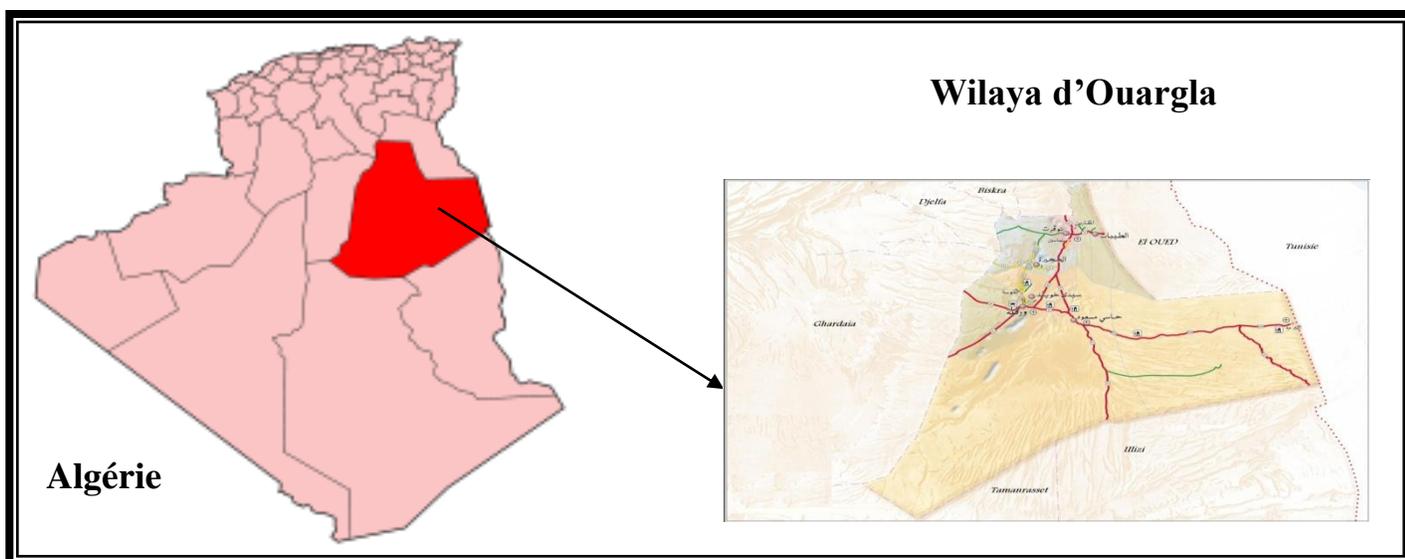
## II.2. Etudes phytochimiques :

### II.2.1 Matériel végétal :

La partie aérienne de *Cistanche tinctoria*(Figure 22)est récoltée de la wilaya d’Ouargla (sud d’Algérie) (Figure 23) le mois de Mars 2012. Les échantillons ont été lavés à l’eau courante, puis séchés à l’ombre et à l’abri de la lumière, à température ambiante. Après séchage, la partie aérienne a été broyée pour obtenir une poudre fine, qui a servi pour la préparation des extraits.



**Figure 22.**Photo de *Cistanche tinctoria*(source personnelle)



**Figure23.** Localisation géographique de la zone d’étude  
(<http://www.mtp.gov.dz/fr/permalink/3281.html> consulté le : 13/10/1015)

### II.2.2. Préparation des extraits :

**II.2.2.1. Extrait aqueux :** L'extrait aqueux a été préparé conformément à la tradition algérienne, à partir de la partie aérienne. 50 g de la poudre a été mis dans 100 ml d'eau distillée bouillante. Ensuite on le laisse sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Le mélange a été filtré, centrifugé et concentré au Rotavapor (Büchi R II).

**II.2.2.2. Extrait Méthanolique :** Le matériel végétal 50g de la plante séchées et broyées a été laissées au contact d'une quantité (en ml) d'éther de pétrole dans un baril en verre de telle façon que le solvant ouvre totalement le matériel végétal pendant 24 heures. L'éther de pétrole extrait, en plus de certains produits apolaires après filtration, le filtrat est évaporé sous pression réduite grâce à un rotavapeur, cette opération est répétée trois fois avec renouvellement de solvant chaque 24h. La deuxième macération a été effectuée avec une solution hydro-alcoolique (méthanol/eau 8/2 v/v) pendant 24 heures ; l'opération a été répétée 3 fois. La solution a été filtrée et concentrés sous vide à 45 °C au Rotavapor.

Les deux extraits obtenus (aqueux et méthanoliques) sont lyophilisés et aliquotes à -20°C pour la détermination de l'activité antioxydante in vitro et les deux activités : antidiabétiques et antioxydante in vivo (Figure24).

#### ➤ Calcul des rendements en extraits secs :

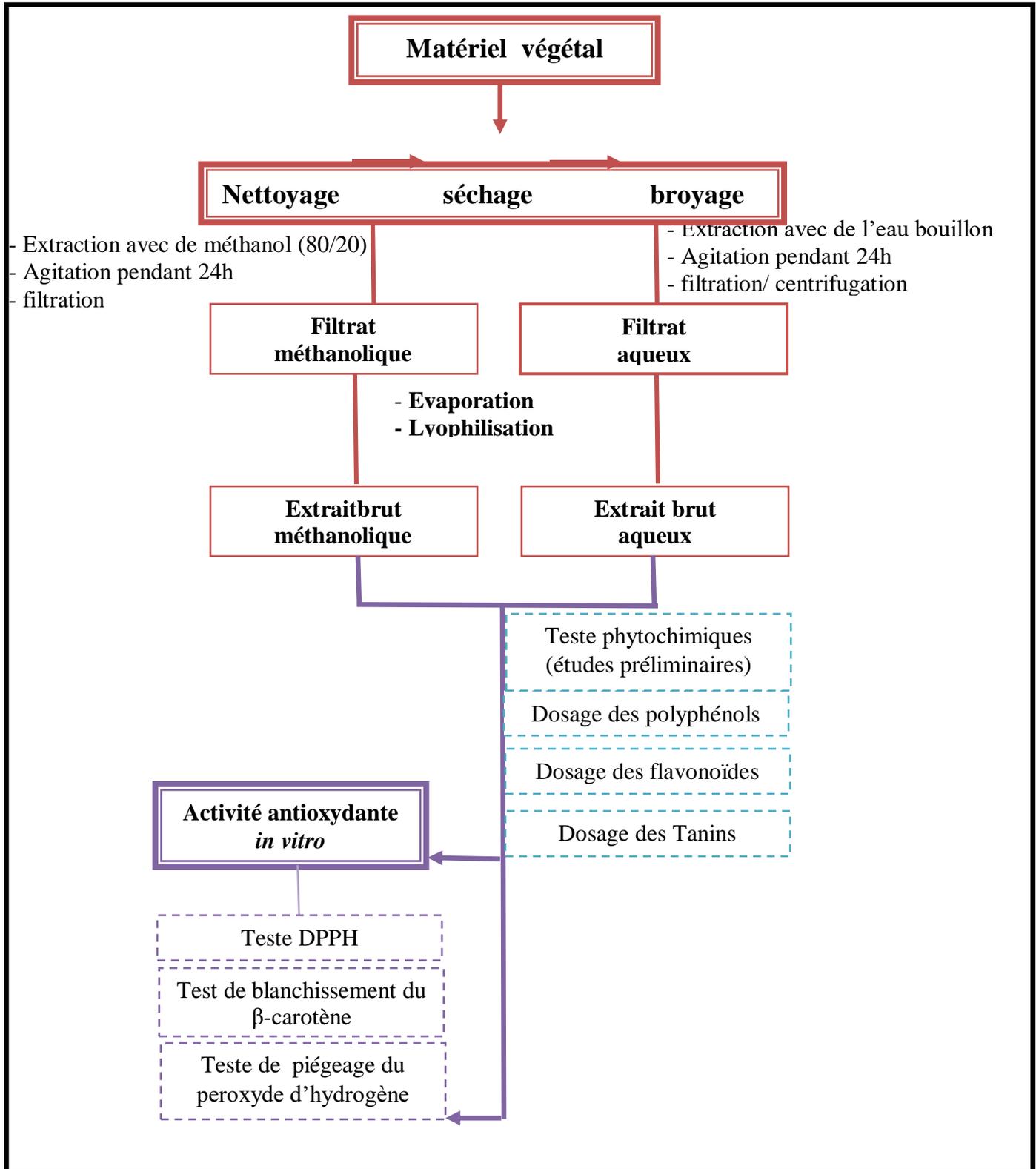
Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant :

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

**P1 :** poids de récipient après lyophilisation ;

**P2 :** poids de récipient avant lyophilisation ;

**P3 :** poids de la matière végétale de départ.



**Figure 24.** Protocole général d'extraction des polyphénols, dosages et méthodes utilisées pour l'étude du pouvoir antioxydant.

### II.2.3. Testes phytochimiques (études préliminaires) :

Les principaux constituants chimiques présents dans la poudre, la fraction aqueuse et méthanolique ont été identifiés par des réactions colorées (Harborne.,1998), les réactifs de caractérisation classiques ont permis de mettre en évidence les groupes chimiques suivants : les flavonoïdes (réaction de la cyanidine), les alcaloïdes (réactifs de Dragendorff et de Mayer), les composés réducteurs (réactif de Fehling), les saponosides (indice de mousse), les tanins (chlorure ferrique), les stérols et triterpènes (Réaction de Liebermann Buchard).

#### II.2.3.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude :

Dans un Erlenmeyer, 10 g de matière végétal est mis en présence de 100 ml d'eau bouillant. Après infusion pendant 15 mn, nous avons filtré et complété le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée. L'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :

➤ **Mise en évidence des tanins:**

Dans un tube à essais, nous avons introduit 5 ml d'infusé, puis nous avons ajouté 1 ml de solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 1 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noir (Edeoga1 et *al.*, 2005).

➤ **Mise en évidence des flavonoïdes :**

Traiter 5 ml d'extrait avec quelques gouttes d'HCl concentré. Ajouter une quantité de tournures de magnésium (Laisser agir). La présence des flavone aglycone est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange (Karumi *etal.*, 2004).

➤ **Mise en évidence des saponosides :**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée :

- ✓ Pas de mousse = test négatif
- ✓ Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- ✓ Mousse de 1-2 cm = test positif
- ✓ Mousse plus de 2 cm = test très positif (Karumi et *al.*, 2004).

➤ **Mise en évidence des Mucilages :**

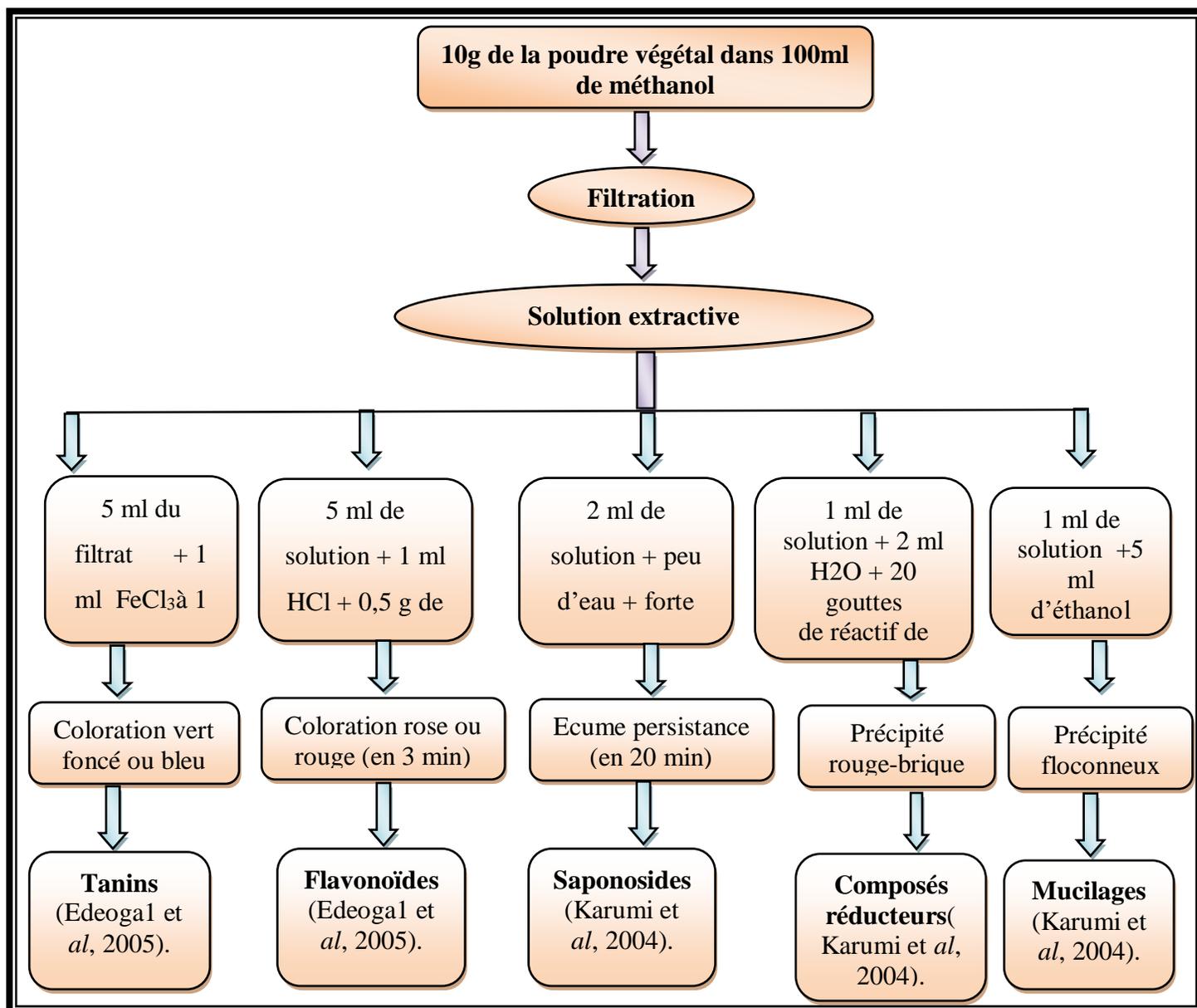
Nous avons introduit 1 ml du décocté à 10 % dans un tube à essai et ajouté 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages (Karumi et *al.*, 2004).

➤ **Mise en évidence des composés réducteurs :**

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait (décocté à 10%) avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (Karumi et *al.*, 2004).

**II.2.3.2. Epuisement du matériel végétal avec le méthanol :**

Dans un ballon, 10 g de matière végétal est mis en présence de 100 ml de méthanol absolue. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait méthanoliques est soumis aux tests mentionné dans la Figure 25 :



**Figure 25.** Protocol expérimental des testes phytochimiques

### II.2.3.3. Autres métabolites secondaires :

#### ➤ Mise en évidence des flavonoïdes :

Macérer 1g de la poudre sèche dans 10 ml d'acétate d'éthyle pendant 3 min, filtrer et procéder au test suivant : prendre 1 ml du filtrat, le rendre basique par l'ajout du  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai (Edeoga1 et *al.*, 2005).

#### ➤ Mise en évidence des alcaloïdes :

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilué à 10 % à température ambiante. Après filtration sur un papier lavé à l'eau distillée et de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat, 1 ml du macéré est introduit dans deux tubes à essai puis 5 gouttes de réactif de Mayer ont été ajoutés dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Dregendorff ont été ajoutés dans le deuxième. La présence d'une turbidité ou d'un précipité blanc jaunâtre, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (Edeoga1 et *al.*, 2005).

#### ➤ Mise en évidence des Stérols et terpènes :

Prendre 1g de chaque extrait, la dissoudre dans 10 ml d'éther de pétrole, filtrer puis évaporer ; le résidu obtenu est dissout dans 0,5 ml d'acide acétique et ensuite dans 0,5 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Les deux solutions sont transférées dans un tube essai, puis on ajoute 1 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. La formation d'un cercle marron ou violet indique la présence des stérols terpéniques (Karumi et *al.*, 2004).

### II.2.4. Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode citée par (Wong et *al.*, 2006).

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela, 2005).

Brièvement 200µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5%) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200 µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg) (Annexe 1).

### II.2.5. Dosage des flavonoïdes :

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) cité par (Djeridane et *al.*,2006)est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg)(Annexe 1).

### II.2.6. Dosage des tanins:

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide.

Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal : HCl à 8 % (v/v), le méthanol à 37 % (v/v) et 4 % de vanilline dans du méthanol(m/v). Le mélange a été maintenu à 30 °C avant le dosage.200 µl de chaque extrait à analyser ont été ajoutés à1000 µl de réactif de vanilline ; le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité à 30 °C pendant 20 min. L'absorbanceest mesurée à 500 nm par un spectrophotomètre UV contre un blanc constitué d'un mélange de méthanol (37 %) et de HCl (8%) à volume égal. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la catéchine (Annexe 1) (Mahmoudi et *al.*, 2013).

### II.2.7. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince "CCM" :

- **Principe** : La chromatographie sur couche mince est essentiellement une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée immobilisée sur un support planaire.
- **Méthode** : Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de Silica gel G60 ; 0.25mm, sur support rigide en verre ; 20/20cm.

Deux microlitres (2µl) de chaque extrait ainsi que des étalons sont déposés à des points repères à 1,5cm du bord inférieur de la plaque. On a employé comme éluant un mélange de (chloroforme : acétate d'éthyle : acide formique (50 : 40 :10 V/V/V) (Riov et Gottlieb, 1980).

Après développement, les plaques sont séchées, puis visualisées séparément par deux systèmes de révélation :

- i) révélation physique sous lampe UV à 254 nm et 366nm.
- ii) révélation chimique par une solution aqueuse de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ , 2%)

pour la détection des composés phénoliques.

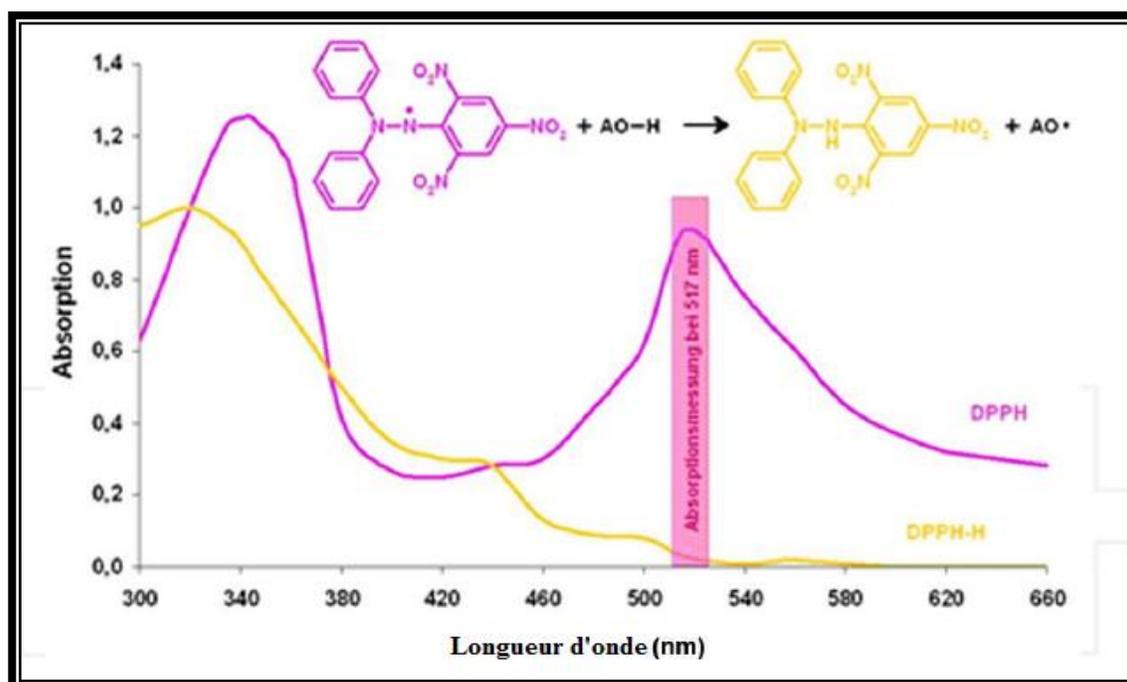
Les rapports frontaux des spots issus de la séparation sont calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits

### II.3. Evaluation des Activités biologiques :

#### II.3.1. Activité anti-oxydante *in Vitro* :

**II.3.1.1. Test au DPPH :** L'Activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole utilisé par Yik-Ling Chew et *al.*,(2009).

Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteur de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (Figure 26) (Guenzet, 2012).



**Figure 26.** Schéma montrant le changement de couleur de DPPH du violet au jaune quand il est exposé à une substance antioxydante (Mendoza Pérez et Fregoso Aguilar, 2013)

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,15 mM. Dans des tubes on introduit 100 µl de chaque extrait (0,1mg/ml dans le méthanol) et on ajoute 2ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm. Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% = [1 - (\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Control négatif})] \times 100.$$

✓ **Calcul des IC50 :**

IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH•. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

**II.3.1.2. Teste de blanchissement de beta-carotène :**

Dans ce test la capacité antioxydant des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Ismaïlet al, (2010). L'émulsion de  $\beta$ -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 5 mg de  $\beta$  carotène dans 50 ml du chloroforme, 40mg de l'acide linoléique et 400 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. 20  $\mu$ L de solution d'extraits ou d'antioxydants de référence (butylhydroxyanisole (BHT),  $\alpha$ -tocophérol) solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 1,5 ml de l'émulsion précédente. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température de 50°C pendant deux heures. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 470 nm.

L'activité antioxydant relative des extraits est calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100[(A_{A(120)} - A_{C(120)}) / (A_{C(0)} - A_{C(120)})] \times 100$$

Où :

$A_{C(0)}$  = Absorbance de contrôle négatif, au  $t_0$

$A_{A(120)}$  = Absorbance de l'échantillon après 120min d'incubation

$A_{C(120)}$  = L'absorbance de contrôle négatif après 120 min d'incubation

**II.3.1.3. Activité antioxydante par la méthode de piégeage du peroxyde d'hydrogène :**

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est fondée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration du  $H_2O_2$  est diminuée par les composés piègeurs, la valeur de l'absorbance de ce dernier à 230 nm est également diminuée (El-Haci *et al.*, 2012). L'étude de l'activité du piégeage du  $H_2O_2$  a été réalisée par la méthode décrite par Ruch *et al.*, (1989). 3,4 ml des extraits brut (méthanolique et aqueux) à une seule concentration (0,1  $\mu$ g/ml) préparés dans une solution

tampon phosphate à 0,1 M (pH 7,4) sont mélangés avec 600 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 43 mM (préparée dans le même tampon phosphate). La réaction des échantillons avec le peroxyde d'hydrogène est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à 230 nm pendant 40 minutes, à 10 minutes d'intervalle. Dans les mêmes conditions opératoires, le BHT, à la même concentration choisie, est utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ du piégeage du H}_2\text{O}_2 = [(A_C - A_A) / A_C] \times 100$$

**II.4. Evaluation de la toxicité chez les rats :** l'étude de la toxicité a été réalisée sur dix groupes des rats par gavage des extraits de *Cistanche tinctoria* aux doses de 100, 250, 500, 1000, 1500 et 2000 mg/kg. Les animaux ont été observés après 30 minutes, 24, 48, 72 heures et deux semaines après l'administration des extraits (Bouanania et al., 2010).

#### **II.5. L'activité antidiabétique :**

##### **II.5.1. L'évaluation de l'activité antidiabétique chez la ratte non gestante :**

###### **II.5.1.1. Animaux et condition d'élevage :**

Notre étude a été réalisée sur 40 rats (femelles) *Ratus ratus* de la souche Wistar, adultes âgés de 8 semaines pesant ( $200 \pm 20$  g) provenant de l'institut Pasteur d'Alger.

Les rats sont élevés dans des cages en plastique grillagées. Ces cages sont tapissées d'une litière composée de copeaux de bois. Le nettoyage des cages et le changement de la litière sont réalisés quotidiennement. Les rats acclimatés aux conditions de notre animalerie (l'animalerie du département de biologie (université Badji Mohtar Annaba), pendant un mois à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , une hygrométrie de ( $55 \pm 5\%$ ) et une photopériode de (12h / 12h). L'eau de boisson est servie dans des biberons *ad libitum*.

###### **II.5.1.2. Protocole expérimental :**

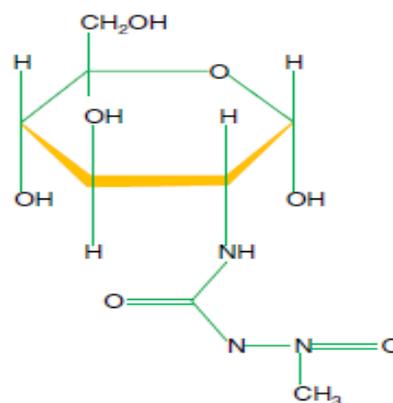
###### **a). Indication du diabète :**

La Streptozotocine (STZ) (Tableau 2) est un antibiotique, extrait de *Streptomyces acromogenes*, sélectivement toxique pour les cellules  $\beta$  du pancréas (Hwang et al., 2005). Cette propriété a été décrite en 1963 par Rakietyen (McLetchie, 2002) et est depuis largement utilisée pour induire le diabète insulino-dépendant et non insuline dépendant chez les modèles animaux (Duhault et Koenig-Berard, 1997). Comme tous agents alkylants, la STZ inhibe l'initiation de la

synthèse de l'ADN et est faiblement active sur les synthèses de protéines et de l'ARN. Le mécanisme de l'action diabétoène est encore méconnu. La STZ à forte dose, détruit les cellules  $\beta$ , à faible dose et répétée, elle induit une insulite suivie de la destruction des cellules  $\beta$  par un mécanisme immunitaire dépendant des cellules T (Szkudelski,2001).

**Tableau 2 : Structure et propriétés chimique de la STZ** (Hwang et *al.*, 2005 ; Eleazu et *al.*, 2013 ; <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> " consulté le : 26/02/2016").

La structure chimique



<b>Nom chimique</b>	2-Deoxy-2-(3-(methyl-3- nitrosoureido)- $\beta$ -D-glucopyranose
<b>Formule moléculaire (brute)</b>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>
<b>Masse moléculaire</b>	265.221g/mol
<b>La demi de vie</b>	35-40 min

Le diabète est introduit chez les rats à jeun (12h) par injection intra-péritonéal de la STZ à dose de 50mg/kg de poids corporel (Ouali et *al.*, 2007), la STZ est dissoute dans Tampon citrate 0.1mmol/l(pH 4.7). Les rats du lot témoin ont reçue à la place de la SZT de tampon citrate 0.1mmol (2ml/kg). Quarante-huit heures après l'injection la glycémie est mesurée chez les rats après un à jeun de 12h, et les rats avec une glycémie supérieure à 250 mg/dl sont considérés diabétiques et utilisée dans notre expérimentation.

#### b). Composition des lots et traitement des rats :

Les rats sont divisés en quatre groupes de dix rats. L'extrait est administré par gavage (*per os*) pendant 21 jours a 9h de matin est à dose de 200mg/kg (le choix de la dose est effecteur selon des études préliminaire réalisé ultérieurement) (Figure27):

**Lot(1)** : rats sein (non diabétiques) reçoit l'eau distillée (2ml/kg) ;

**Lot(2)** : rats diabétique non traité reçoit de l'eau distillée (2ml/kg) ;

**Lot(3)** : rats diabétique traité par l'extrait aqueux à dose de 200mg/kg dissous dans l'eau distillée juste avant l'administration ;

**Lot(4)** : rats diabétique traité par l'extrait méthanolique à dose de 200mg/kg dissous dans l'eau distillée juste avant l'administration

L'évaluation de l'activité antidiabétique des nos extraits a été déterminé par la mesure de la glycémie à jeun dans le 1<sup>er</sup> et 21<sup>ème</sup> jours de traitement et la variation dans le pourcentage est calculé :

$$\% \text{ de changement} = \frac{J_i - J_0}{J_0} \times 100$$

### c). Sacrifice, prélèvement des organes :

#### ➤ Prélèvement sanguin :

Au 21<sup>ème</sup> jour, et après 12h à jeun les rats sont sacrifiés par décapitation le sang est récupérés dans des tubes héparine, centrifugé à 3000 tours / min pendant 10 min, le plasma obtenu est aliquoté et conservé à (-20°C) pour le dosage des paramètres biochimiques et inflammatoire.

#### ➤ Prélèvement des organes :

Après dissection des rats le pancréas, le foie et le muscle cardiaque sont soigneusement prélevés sous glace rincés dans une solution de chlorure du sodium (NaCl) à 0.9%, puis pesées. Le pancréas est fixé dans du formol à 10% pour l'analyse histologique. Le pancréas, le muscle cardiaque et une partie de foie est homogénéisée dans du tampon phosphate 0.1mole/l (pH 7.4) ensuite centrifugée à 9000tr/min pendant 30 minutes le surnageant récupérer est conservé à -40°C, pour l'analyse des protéines et du statut antioxydant (GSH, GSH-Px, GsT, Cat, Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), SOD, l'anion superoxide(O<sub>2</sub>-), la vitamine E et l'acide ascorbique), une 2<sup>ème</sup> partie de chaque organe est homogénéisée dans du tampon KCl 1.15% pour le dosage de MDA, et une 3<sup>ème</sup> partie de foie est utilisée pour le dosage de glycogène hépatique.

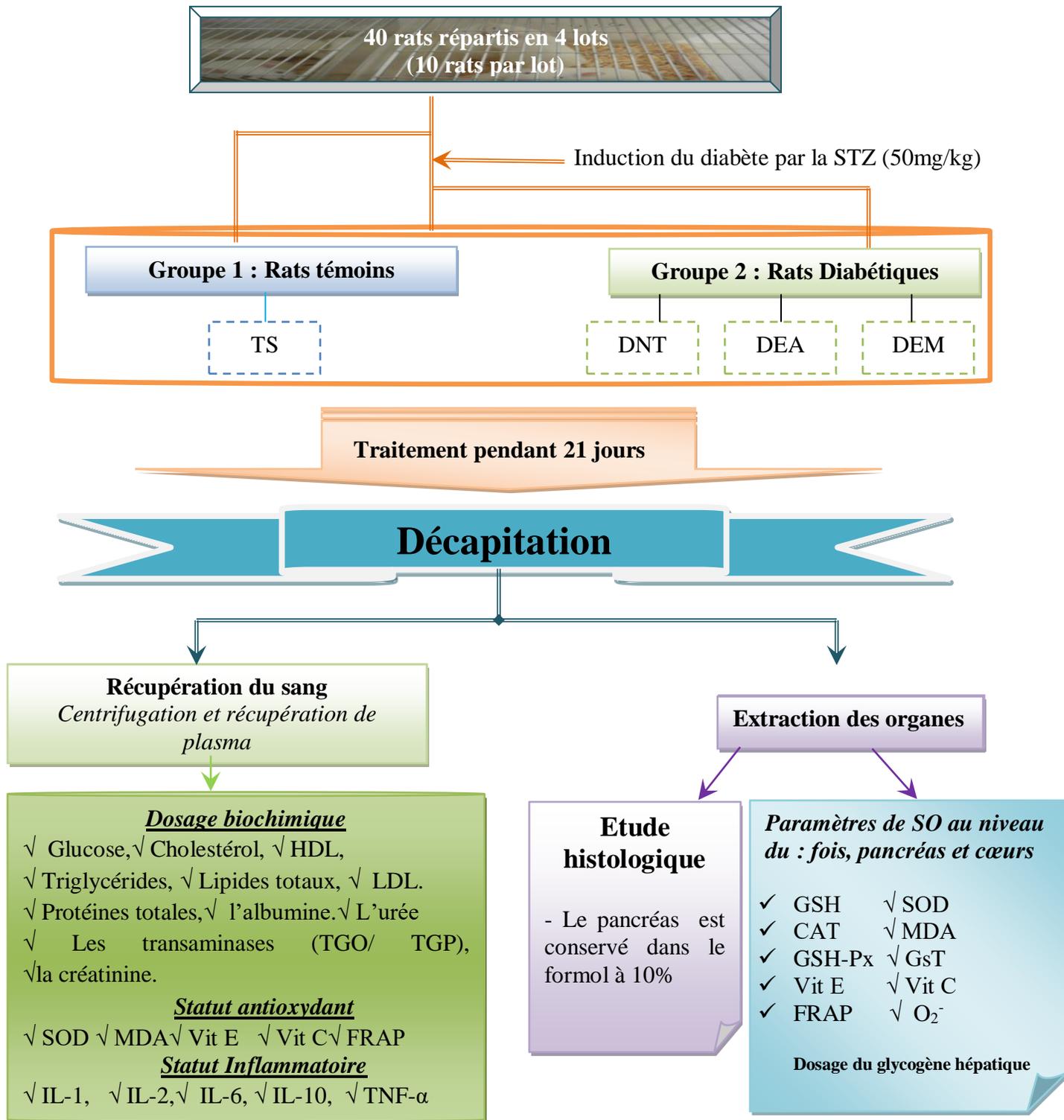


Figure 27. Répartition et traitement des lots de rats

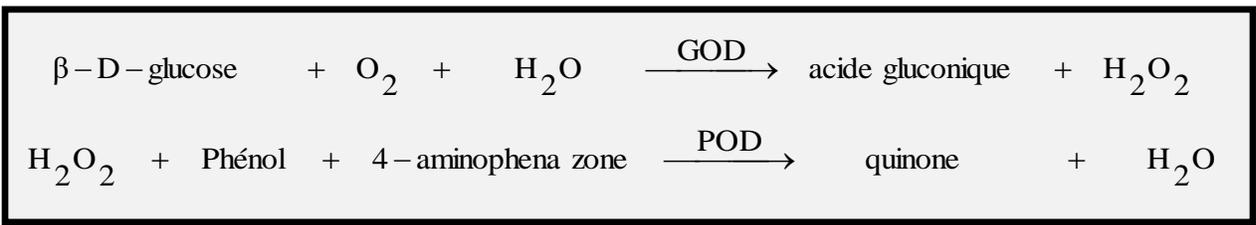
TS : contrôle sain ; DNT : Diabétiques non traités ; DEA : Diabétiques traités l'extraits par aqueux a dose de 200 mg/kg p.c ; DEM: Diabétiques traités par l'extraits méthanolique a dose de 200 mg/kg p.c.

### d).Analyse biochimique relative à l'état diabétique :

Le dosage du glucose plasmatique, le profil lipidique (triglycéride, cholestérol, lipides totaux et l' HDL), l'albumine, les protéines totales, l'urée, la créatinine, l'aspartate amino transférase et l'alanine amino transférase sont estimées à l'aide des kits commercial SPINREACT.

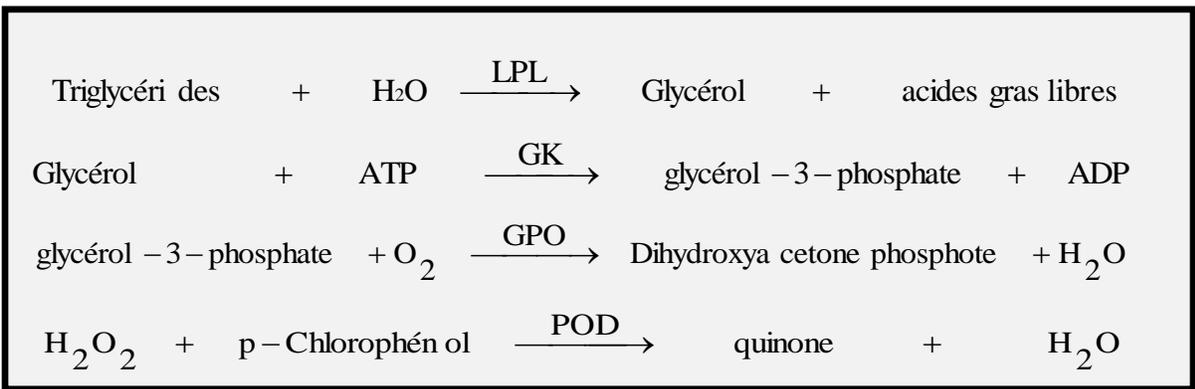
#### ➤ Dosage du glucose :

Le dosage du glucose plasmatique a été effectué par la méthode de glucose oxydase selon Trinder (1969). Le glucose oxydase catalyse l'oxydation de glucose en acide gluconique. Par la présence d'une peroxydase, le peroxyde d'hydrogène ainsi formé réagit avec le phénol et les quatres aminophenazones pour former un composé rose de quinoneimine, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.



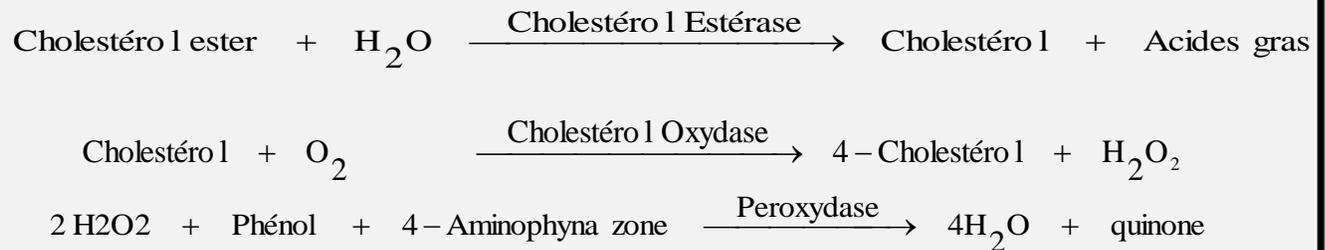
#### ➤ Dosage de triglycéride :

Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acide gras libres par la lipoprotéine lipase. Les triglycérides incubés avec le lipoproteinlipase (LPL), libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycerol-3-phosphate (G3P) et adenosine-5-diphosphate (ADP) par le glycérol kinase et l'adénosine triphosphate. Le G3P est alors converti par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacetone phosphate (DAP) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans la dernière réaction, le peroH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagit avec quatre aminophenazone (4-Ap) et p-chlorophénol dans la présence de la peroxydase (POD) .le protocole comprend donc (Buccolo, 1973) :



➤ **Dosage de cholestérol :**

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. Le cholestérol estérase hydrolyse les esters et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action du cholestérol oxydase. Ce dernier réagit avec le phénol pour produire le quinonéimine, selon les réactions ci-dessous (Meiattini, 1978) :



➤ **Dosage des HDL/LDL :**

Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), et de basse densité (LDL) présentent dans le sérum ou le plasma sont précipitées par le phosphotungstate en présence des ions magnésium. Après centrifugation le surnageant contient les lipoprotéines de haute densité (HDL). Après centrifugation le surnageant qui contient les l'HDL est utilisée pour la détermination de HDL-cholesterol (Grove, 1979 ; Naito et Kaplan, 1984 ).

Le calcul de LDL-Cholestérol est effectué par la formule de Friedewald (Friedewald et *al.*, 1972).

➤ **Dosage des lipides totaux :**

Dans la première étape les lipides insaturés réagissent avec de l'acide sulfurique pour former les ions carbonium. Dans la deuxième étape il n'y a que les ions de carbonium qui réagissent avec le phosphovanilline pour donner une couleur rose, l'intensité de la couleur est proportionnelle à toute la concentration en lipides dans l'échantillon (Cottet, 1965).

➤ **Dosage des protéines totales :**

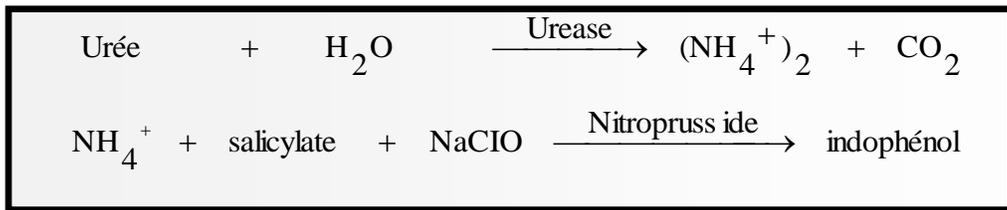
Les ions cuivriques, dans un milieu alcalin, interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe bleu-violet. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéine totale dans l'échantillon (Koller, 1984<sub>a</sub>).

➤ **Dosage de l'Albumine :**

L'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG), pour former un complexe coloré. Le pH du milieu est maintenu à 4.2 par un tampon. Après une agitation d'environ 30 secondes, l'absorption du mélange est mesurée au spectrophotomètre (Koller, 1984<sub>b</sub>).

➤ **Dosage de l'urée :**

L'urée est hydrolysée à l'aide d'enzymes dans l'ammoniaque (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Les ions ammoniacs ainsi formés réagissent avec du salicylate et l'hypochlorite (NaClO), en présence d'un catalyseur nitroprusside, pour former un indophénol vert (Kaplan, 1984<sub>b</sub>):

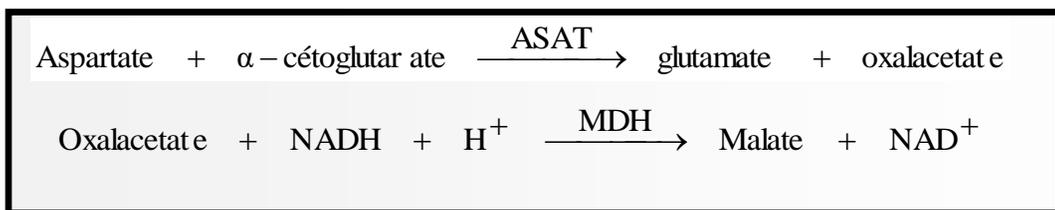


➤ **Dosage de la créatinine :**

L'analyse est basée sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium comme décrit par Jaffé. La créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps est choisi pour les mesures de telle sorte qu'il évite des interférences avec d'autres constituants de sérum. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984<sub>a</sub>).

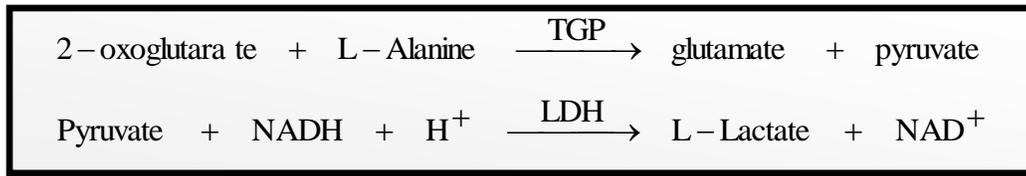
➤ **Dosage de l'Aspartate amino transférase :**

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transférase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'aspartate au α-cétoglutarate formant le glutamate et l'oxalacetate. L'oxalacetate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Murray, 1984<sub>b</sub>) :



➤ **Dosage de l'Alanine amino transférase :**

Le principe est présenté par le schéma réactionnel suivant (Murray, 1984b) :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase dans l'échantillon.

**e). Activité antioxydante *in vivo* :**

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé d'Ellman(1959).Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance à 412 nm de l'acide 2-nitro-5- mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5' –dithio-bis-2- nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. L'activité de glutathion peroxydase est mesuré selon Rotruck et al,(1973). L'activité de la catalase est mesurée selon Aebi (1983), en se basant sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 240 nm. L'activité du super oxyde dimutase (SOD) est mesurée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971) modifiée par Oberley et Spitz (1985), évalue la SOD par sa capacité à inhiber un flux d'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> généré par le système xanthine-xanthine oxydase. Les radicaux superoxydes produits par ce système réduisent le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en bleu de formasan (Trea et al, 2013).

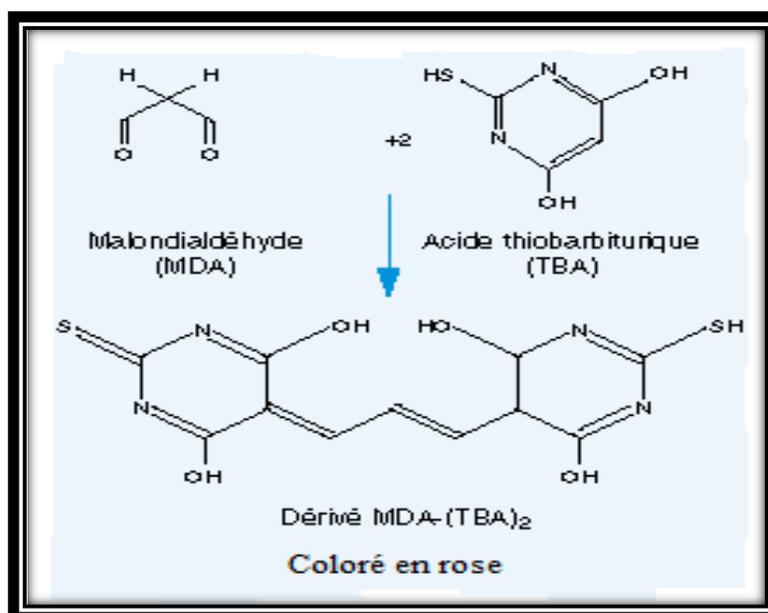
La capacité antioxydante de plasma et des tissus sont mesuré par la méthode de Réduction de fer: FRAP, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe<sub>3</sub><sup>+</sup>) en fer ferreux (Fe<sub>2</sub><sup>+</sup>). En effet le Fe<sub>3</sub><sup>+</sup> participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le Fe<sub>2</sub><sup>+</sup> à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm (BenzieetStrain, 1996).

Le dosage de la vitamine C est mesuré selonJagota et Dani, 1982, l'estimation de la peroxydation lipidique au niveau de plasma est réalisée selon Satoh (1978)et au niveau des organes selon Ohkawa et al, (1979).

➤ **Dosage du malondialdéhyde :**

**Principe :** Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiés par les radicaux libres libérés au cours de stress.

Dans notre études, les taux du MDA des tissus étudiées (foie, pancréas et muscle cardiaque) sont été évalués selon la méthode d'Ohkawa et *al.*, (1979). Le dosage repose sur la condensation en milieu acide et chaud (pH 2 à 3, 100°C) entre une molécule de MDA et deux molécules de thiobarbituriques (TBA) pour former un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. Le principe de cette méthode est résumé dans la Figure 28 :



**Figure 28.** Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique (Lefèvre et *al.*, 1998)

A 0.5ml de la fraction cytosolique 10% (KCl 1,15M) nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67%. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 20 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de *n*-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/min, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm. La concentration de MDA est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec 1, 1, 3,3 tétraétoxypropane qui donne le MDA après son hydrolyse en solution (Annexe 1). Les résultats du dosage sont exprimés en nmol/gramme de tissu.

### ➤ La détermination de la production d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) :

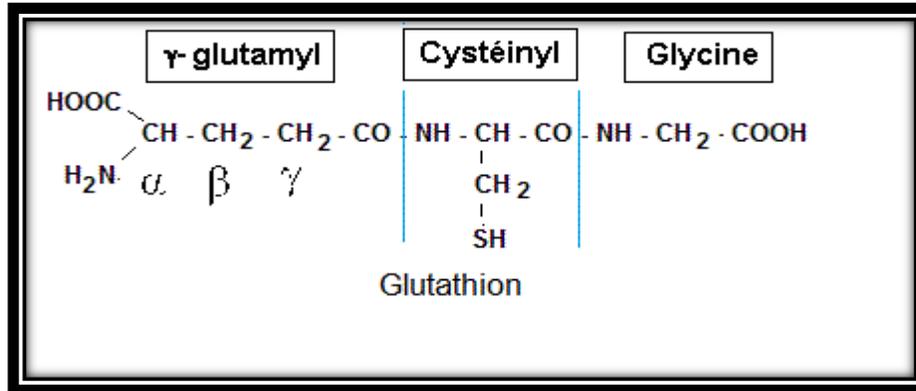
La production d'anion superoxyde est mesurée par la méthode de Hassoun et Ray (2003), qui baser sur la réduction de cytochrome C. Le mélange réactionnelle contenir 0.5ml supernatant, 0.5ml tampon phosphate (50mM, pH7.4) et 1ml cytochrome C (0.1mM) dans le même tampon, après incubation pendant 15minutes à 37°C, la réaction est terminer par placement des tubes qui contient le mélange réactionnel dans la glace. l'absorbation est déterminé à 550 nm et convertir en mmol de cytochrome C réduit/min utilisée le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon = 2.1.10^4 M^{-1}.cm^{-1}$ ).

### ➤ La détermination de la capacité antioxydante (FRAP) :

La capacité antioxydante de plasma et les tissus sont mesuré par la méthode de la réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), le teste de FRAP est estimé selon la méthode décrire par BenzieetStrain, (1996), en bref 3 ml de mélange réactionnel de FRAP ( 25 ml tampon acétate 0.3M, pH 3.6 ; 2.5 ml TPTZ 0.01M dans HCl 0.04M ; 2.5ml  $FeCl_3, 6H_2O, 0.02M$ , préchauffer à 37°C) est mélangé avec 100  $\mu$ l de plasma ou de surnageant et l'absorbance à 530 nm est enregistré après 5 min d'incubation à 37°C. Des solutions de  $FeSO_4, 7H_2O$  (0.2-1mM) sont utilisé pour la calibration, les résultats de FRAP dans le plasma et les tissus est exprime en  $\mu$ moles/L et  $\mu$ moles/milligram de protéines, respectivement.

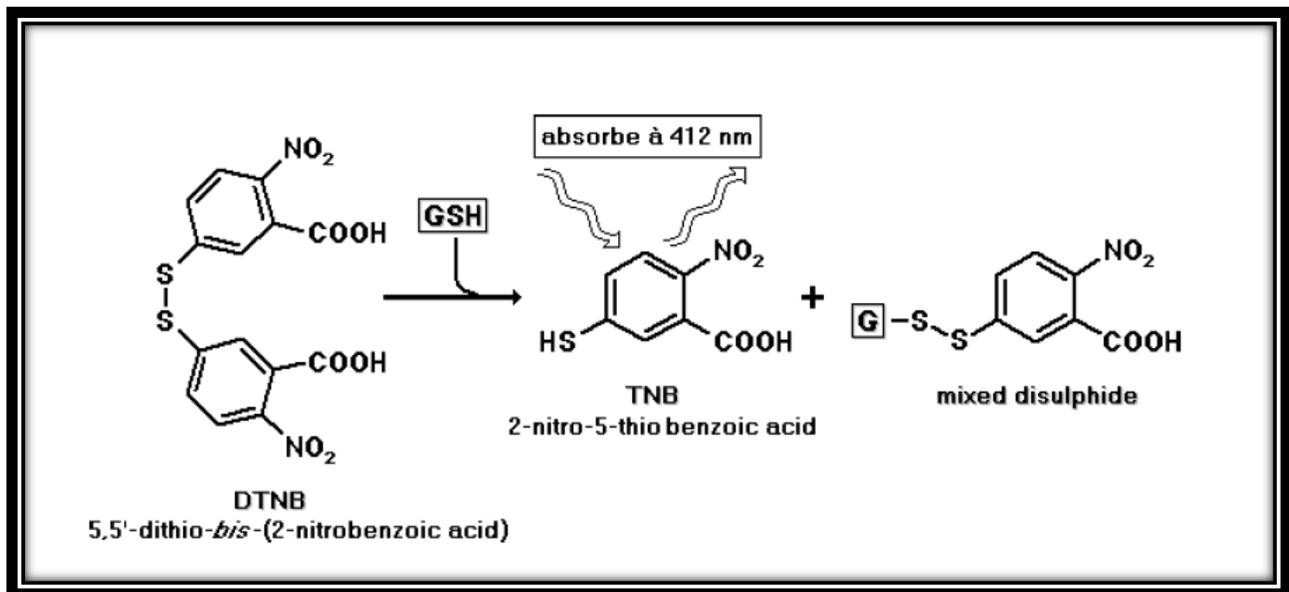
### ➤ Dosage de la glutathion :

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 0.5 à 10 mM et de l'ordre du  $\mu$ M dans le plasma. Le glutathion se compose de trois aminoacides (Figure 29) : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. De ces trois éléments, la cystéine est l'acide aminé essentiel à la synthèse du glutathion et la plus rare (Lahouel,2005). Le glutathion se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99% de la quantité total.



**Figure 29.** Formule chimique du glutathion réduit  
(www.takween.com, Consulté le : 02/03/2016)

- ✓ **Principe :** Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée (Ellman, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5'-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante (Figure 30) :



**Figure 30.** Réaction d'Ellman entre le Glutathion et le DTNB.  
(www.google.fr consulté le : 27/02/2016)

A 0.5ml de la fraction cytosolique nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 10% sur de la glace puis centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Ensuite, à 1.7 ml du tampon phosphate (0.1 M, pH 8) nous avons additionné 0.2 ml de surnageant et 0.1 ml du réactif d'Ellman 0.1M. La lecture de la densité optique est effectuée après 5 minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 10%. Les concentrations du GSH dans l'échantillon sont exprimées en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du GSH dans les mêmes conditions (Annexe 1).

### ➤ Dosage de l'acide ascorbique :

La quantification de l'acide ascorbique a été réalisée selon Jagota et Dani (1982). En bref 200 microlitres d'homogénat de tissu ou une préparation standard d'acide ascorbique a été précipité sur de la glace avec 800  $\mu\text{l}$  d'acide trichloroacétique à 10% pendant 5 min. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3000 tr / min pendant cinq minutes. Par la suite, 500 microlitres du surnageant est ensuite dilué avec 2 ml de l'eau bidistillée et on les mélange avec 200 microlitres de réactif de Folin-Ciocalteu, dilué dans de l'eau bidistillée (1: 10), l'ascorbate réduit la solution de Folin-Ciocalteu cédant une couleur bleue. Après 10 min l'absorbance des échantillons a été mesurée à 760 nm. La concentration de l'acide ascorbique est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec l'acide ascorbique (5-70  $\mu\text{g}$ ) (Annexe1). Les résultats du dosage sont exprimés en mg/gramme de tissu.

### ➤ Dosage de la vitamine E:

La détermination de la concentration de  $\alpha$ -tocophérol a été réalisée selon Martinek((1964).Caraway.,(1963) a rapporté uneméthodepour l'estimation dufer sériqueet de la capacitéde fixation du ferpar l'utilisation d'un réactiftrès sensible, le 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ). En raison des avantagesévidents de ceréactif de réagie et coloréle fer,Martinek (1964) a décidé d'adapter avec la réaction oxydométrique, dans laquelle fer ferreux, produit par la réduction du ferferriquepar la vitamineE (tocophérols), est utilisécomme un indice dela concentration en vitamine dansle sérum.

➤ **Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) :**

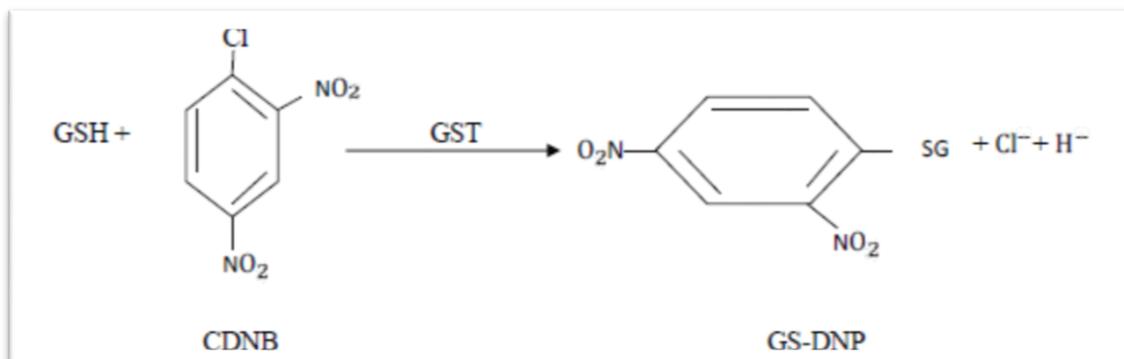
L'activité enzymatique du GSH-Px a été mesurée par la méthode de Rotruck et al (1973). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en présence de glutathion réduit, ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante :



Le mélange réactionnel contenait 0,3 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4), 0,1 ml d'azide de sodium (10 mM), 0,2 ml de glutathion (2 mM), 0,1 ml de  $H_2O_2$  (1 mM) et 0,3 ml d'enzyme (homogénat). Le contenu a été mis à incuber à 37 ° C pendant 10 minutes, suivi par l'arrêt de la réaction par addition de 0,5 ml de TCA 5%, centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été recueilli. 0,2 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) et 0,7 ml de DTNB (10 mM) ont été ajoutés à 0,1 ml de surnageant. Après le mélange, l'absorbance du produit a été lue à 420 nm, le coefficient d'extinction molaire ( $6.22 \times 10^3 M^{-1}.cm^{-1}$ ) est utilisé pour la détermination de l'activité enzymatique et les résultats sont exprimés en nmol / min/mg de protéine.

➤ **Dosage de l'activité de Glutathion S-Transférase :**

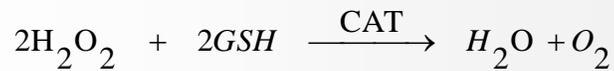
L'activité enzymatique de la GST est déterminée par l'utilisation de la méthode de Habig et al (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro-2,4 di nitrobenzene) en présence d'un cofacteur le GSH, la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Dinitrobenzene permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



Le GST contenue dans l'homogénat réagit avec le mélange (GST+CDNB) à une température de 37°C et à pH de 6.5. Le dosage consiste à faire réagir 840 µl tampon phosphate (0.1M, p H 6.5) avec 50 µl du CDNB (20mM), 100 µl du GSH (20mM) et 10 µl du surnageant. La variation de la densité optique due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée, la lecture est une cinétique toutes les 30 secondes pendant Cinque minute et à une longueur d'onde de 340 nm.

➤ **Dosage de l'activité enzymatique de la catalase :**

L'activité enzymatique de CAT est déterminée par la méthode d'Aebi,(1985). Le principe est basé sur la disparition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de la source enzymatique à 25 C° selon la réaction suivante :



Dans une cuvette en quartz, 50µl de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 19mmol/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M).

Le changement de l'absorbance est suivi pendant une minute à un intervalle de 15 secondes, à une longueur d'onde de 240 nm. L'activité enzymatique est déterminer par l'utilisation de coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon = 0.043 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) et les résultats sont exprimés en µmole d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposer/min/ mg de protéine.

➤ **Evaluation de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase:**

L'évaluation de la SOD est réalisée sur le cytosol par la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). L'activité est mesurée Par l'inhibition de la formation de formazan selon la méthode (xanthine/xanthine oxydase), Un mélange est constitué de : 2.25ml de solution tampon tris/HCl (0.05M, pH 8.3), compris 0.15 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.2 ml NBT (3mg/10ml de tampon), 0.1ml xanthine oxydase et 0.1 ml de xanthine (23mg xanthine, 0.3ml NaOH 1N), après incubation pendant deux minute à 25°C, l'activité est suivie pendant 5 minute à 560 nm. Une unité de SOD est définir comme la quantité d'enzyme qui inhibe 50 la formation de formazan/ min/ mg de protéine.

➤ **Dosage des protéines hépatiques :**

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Les protéines réagissent avec un réactif coloré contenant de l'acide orthophosphorique, de l'éthanol ainsi que le bleu de coomassie (BBC). Ce réactif réagit avec le groupement (-NH<sub>2</sub>) des protéines. L'intensité

de la couleur reflète la concentration des protéines.

50 µl de l'homogénat sont ajoutés à 2.5 ml de réactif de Bradford. Agitation, incubation 5 minutes à température ambiante puis lecture de l'absorbance à  $\lambda = 595$  nm contre un blanc réactif. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0 → 1 mg/ml de sérum albumine de bovin) (Annexe 1).

### **g). Dosage du glycogène hépatique :**

Le dosage du glycogène hépatique se fait par la méthode colorimétrique de l'antrone-acide sulfurique décrite par Hassid et Abraham, (1957).

100mg de foie de chaque rat sont homogénéisés dans 2 ml de solution de potasse (KOH à 30%). Le mélange est mis dans des glaçons et broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine. La suspension résultante est mise dans un bain-marie à 100°C pendant 20min. Après refroidissement, elle est filtrée, puis on ajoute à chaque tube 5ml d'éthanol à 95% ensuite le mélange est gardé à 4°C pendant une nuit. Le précipité est récupéré par centrifugation à 1000 tours/min pendant 15 minutes puis lavé avec de l'éthanol à 80%. Le glycogène ainsi obtenu est séché puis dissous dans 2.5 ml d'eau distillée. 2 ml de l'homogénat est additionné à 5 ml de réactif (antrone-acide sulfurique), On mélange à l'aide d'un agitateur et on incube pendant 10 minutes à 100°C dans un bain-marie puis on laisse refroidir. On lit la densité optique DO à 620 nm contre un témoin approprié. Chaque essai est répété deux fois, la valeur moyenne de l'absorbance est calculée puis convertie en équivalent de concentration glycogène à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie, avec du glucose, dans les mêmes conditions expérimentales (Annexe 1).

### **f). statut inflammatoire :**

Le dosage de l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) sont estimés à l'aide des kits commerciaux (Cayman Chemical Company). Concernant l'interleukine-2 (IL-2) et l'interleukine-10 (IL-10) sont évalués à l'aide des kits commerciaux (Boster Immunoleader, Boster Biological Technology)

### g). Etude histologique :

Les coupes histologiques du pancréas ont été réalisées suivant la technique classique du Houlot, (1984) qui comporte les étapes suivantes :

- La fixation des échantillons (fragment de chaque organe) dans le formol, puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.
- Déshydratation des échantillons à l'aide d'un appareil automatique qui permet le passage automatique et progressif des échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 95% et 100%).
- Inclusion et réalisation des blocs : Les pièces sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5  $\mu\text{m}$  en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés « Microtomes ». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.
- La coloration: Pour la coloration, la technique utilisée est celle à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). la coloration suit les étapes suivantes :

**Déparaffinage** et **hydratation** des lames à l'eau du robinet puis rinçage à l'eau distillée. Puis sont mises dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux). Les lames sont plongées dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); ensuite dans un bain d'eau du robinet avec vérification de la différenciation au microscope.

Mises dans un bain d'eau ammoniacale, puis dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet. Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

### II.5.2. Evaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique :

#### II.5.2.1. Animaux :

Après 30 jour d'adaptation sous les conditions standard ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12h de cycle lumière/obscurité), les rats males et femelles de la souche *Wistar*(Institut Pasteur, Alger), adulte pesant  $220 \pm 20$  g sont utilisée dans notre étude expérimentale, avec un accès d'aliment (régime standard sous forme de bouchons, ONAB, Alger) et l'eau est servie dans des biberons *ad libitum*. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité scientifique de notre faculté qui est en accord avec les principes de santé animale (NIH publication No. 85-23, revised 1985).

#### II.5.2.2. Induction de diabète :

Le diabète est induit chez les rats femelles par la streptozotocine (Sigma, St. Louis, MO). La STZ est administré par voie intra péritonéal à une dose de 40 mg/kg dissoudre dans le tampon citrate (0.1mM, pH4.5), les rats témoins ont reçue le tampon citrate. La concentration du glucose est mesurée après une semaine d'induction du diabète. L'état diabétique est confirmée quand la concentration de glucose sanguine est dépassée le 200mg/dl.

#### II.5.2.3. Accouplement :

Les rats femelles (témoin et diabétiques) sont mis en contact pendant une nuit avec des rats males non diabétique. Le matin et après la réalisation des frottis vaginaux, la présence de sperme (bouchon muqueux) dans le frottis est désignée le premier jour de la gestation. Le protocole d'accouplement est suivi pendant 15 jours consécutifs, par exemple. Pendant trois cycles œstrien approximatifs, la femelle est échouée de devenir gestante pendant cette période est considérée stérile et exclue du notre étude (Dallaqua et al., 2012).

#### II.5.2.4. Traitement :

Les rattes gestantes (30 témoins et 40 diabétiques) sont divisées en 6 groupes :

**Groupe (1)** : non diabétiques; **Groupe (2)**: non diabétiques traité par l'extrait aqueux; **Groupe (3)** : non diabétique traité par l'extrait méthanolique; **Groupe (4)** : diabétique non traité ; **Groupe (5)** : diabétique traité par l'extrait aqueux et **Groupe (6)** : diabétique traité par l'extrait méthanolique (Figure 31).

Les deux extraits sont administrés quotidiennement à 9 h de matin par voie oral à l'aide d'une sonde à raison de 200mg/kg/jour, dissout dans de l'eau distillée.

La concentration du glucose sanguine est mesurée à partir de la veine de la queue par des bandelettes réactives (ACCU-CHEK active, Roche Diagnostics). La glycémie est mesurée à jeun

dans le 0, 7,14, 20 jours de gestation approximativement à 8h30 de matin. Les résultats ont été exprimés en termes de milligramme par décilitre de sang. Le pourcentage de diminution de la glycémie est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de diminution de la glycémie} = [(glycémie \text{ finale} - glycémie \text{ initiale}) / glycémie \text{ initiale}] \times 100.$$

Les rats sont pesés quotidiennement le matin (8h30).

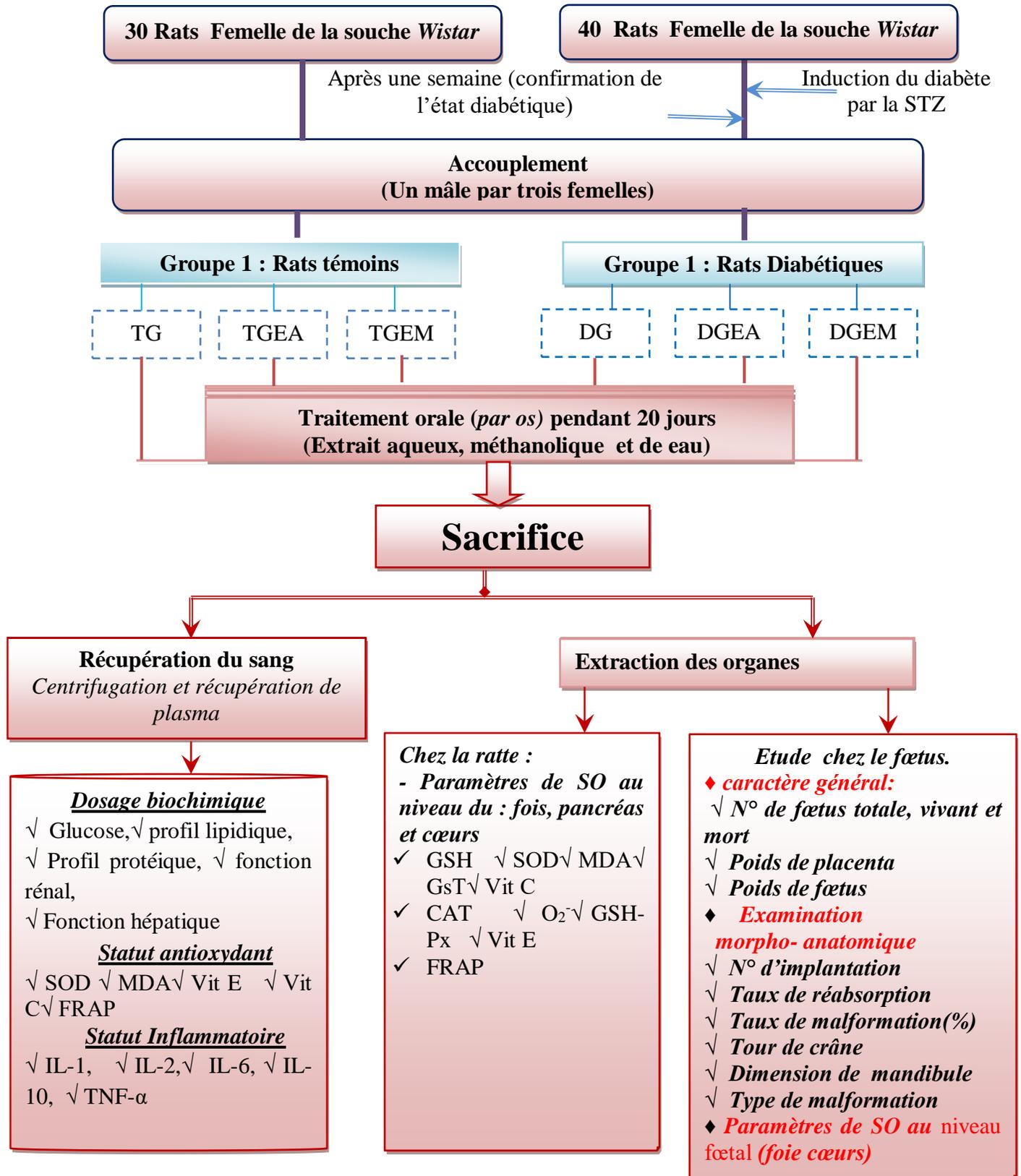


Figure 31. Schéma récapitulatif du protocole expérimental pour l'évaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique

### II.5.2.5. Prélèvement sanguine :

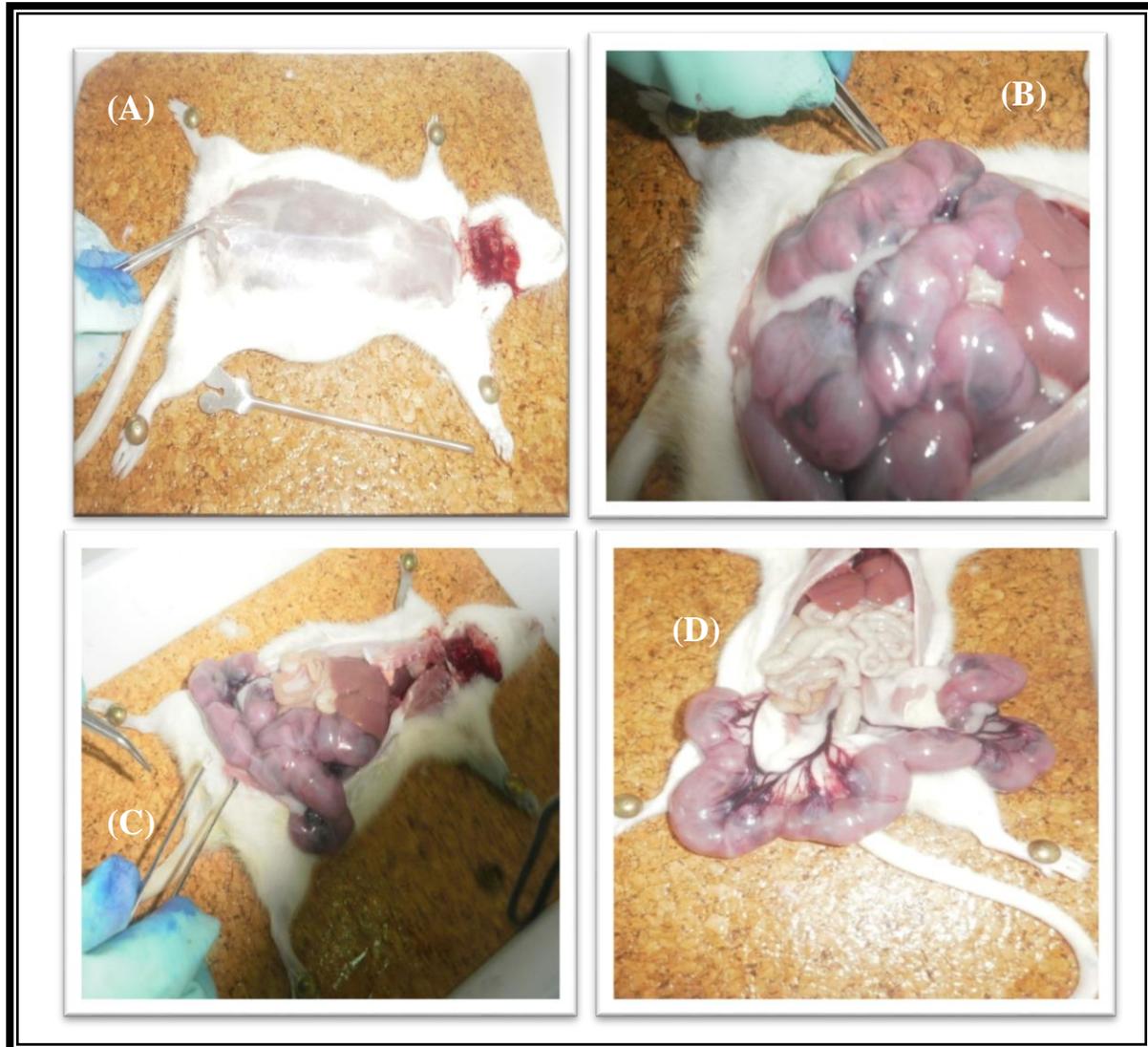
Le 20<sup>ème</sup> jour de la gestation, les rats sont sacrifiés le matin par décapitation, Le sang a été recueilli dans des tubes héparines, puis directement centrifugé à 4000 tours/min pendant 15 minutes. Le plasma obtenu a été séparé en plusieurs fractions dans des tubes Eppendorf et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour le dosage des paramètres suivants :

- ✓ les paramètres biochimiques : glucose plasmatique, le profil lipidique (triglycéride, cholestérol, lipides totaux et l' HDL), l'albumine, les protéines totales, l'urée, la créatinine, l'aspartate amino transférase et l'alanine amino transférase à l'aide des kits commercial SPINREACT.
- ✓ Le statut inflammatoire : Le dosage de l'IL-1), l'IL-6) et le TNF- $\alpha$  sont estimées à l'aide des kits commercial (cayman chemical company). l'IL-2 et l'IL-10 sont évaluées à l'aide des kits commercial ( Boster Immunoleader, Boster Biological Technology).
- ✓ Le statut antioxydant : l'acides ascorbique, la vitamine E, la SOD, FRAP et l'MDA par les méthodes décrit par Jagota et Dani(1982), Martinek(1964),Beauchamp et Fridovich (1971) ,Benzieet Strain (1996) et Satoh (1982) respectivement.

### II.5.2.6. Prélèvement des organes maternels :

Après sacrifice, l'animal a été fixé en *décubitus dorsal*, une incision a été pratiquée depuis l'orifice urogénital jusqu'au manubrium sternal (Figure 32<sub>a</sub>). Le foie, le pancréas, le cœur et l'utérus ont été rapidement prélevés sous glace à l'aide de pinces fines, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de NaCl et pesés au moyen d'une balance de précision. Le pancréas, le muscle cardiaque et une partie de foie est homogénéisée dans du tampon phosphate 0.1mole/l (pH 7.4) ensuite centrifugée à 9000tr/min pendant 30 minutes le surnageant récupéré est conservé à  $-40^{\circ}\text{C}$  pour l'analyse des protéines et du statut antioxydant (GSH, GSH-Px, GsT), cat, FRAP, SOD, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), la vita E et l'acide ascorbique), et une 2<sup>ème</sup> partie de chaque organe est homogénéisée dans du tampon KCl 1.15% pour le dosage de MDA.

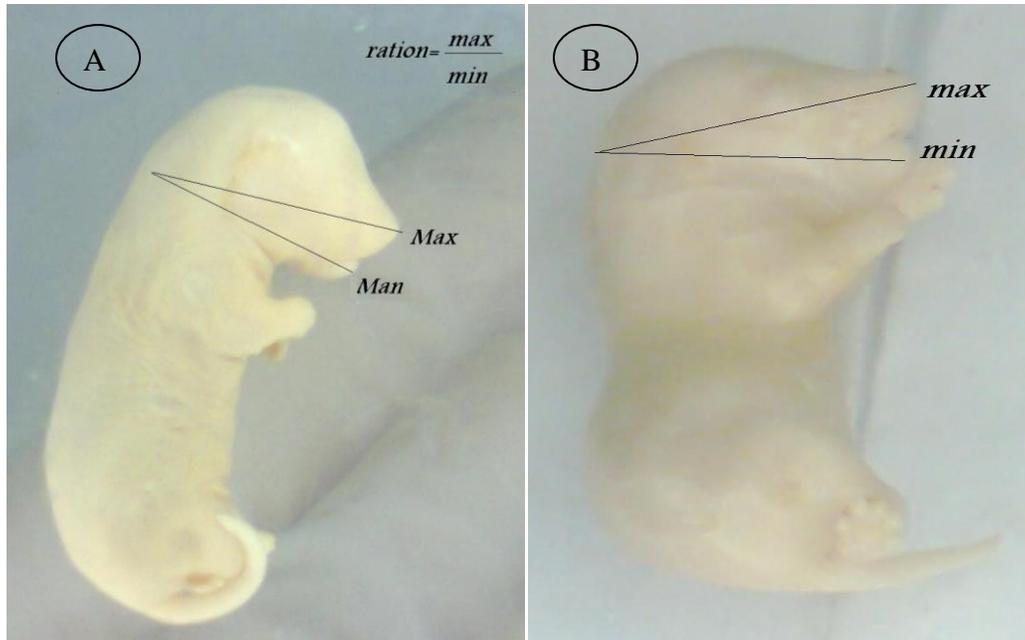
L'utérus des rattes témoins et diabétiques est rapidement excisé et pesé (Figure32<sub>b,c,d</sub>), l'ovaire et le contenu de l'utérus sont examinés pour déterminer le nombre de corps jaunes, de site d'implantation, des fœtus vivants et morts et le taux de résorption. Le nombre de site d'implantation a été déterminée par la méthode de Salewski, (1964).



**Figure 32.** Photographies *in situ*. A) :de ratte gestante. B) : de l'utérus de ratte témoin, C)ratte diabétique traité avec l'EA , D) ratte diabétique traité avec l'EM

Le pourcentage de perte fœtale pré-implantation a été calculé comme suit:  $\text{nombre de corps jaune} - \text{nombre d'implantations} \times 100 / \text{nombre de corps jaunes}$ , et utilisé comme une mesure d'effet antiimplantationale et le pourcentage de perte fœtale après l'implantation a été calculé comme suit:  $\text{nombre d'implantations} - \text{nombre de fœtus vivant} \times 100 / \text{nombre d'implantations}$  et utilisées comme mesure de l'effet abortif (Damasceno et *al.*, 2002). Les fœtus et les placentas sont prélevés et pesés pour calculer l'indice placentaire que égale : le poids placentaire / le poids fœtal. Les fœtus sont examinés sous binoculaire, les paramètres suivants en l'occurrence, le tour de crâne, la taille et la taille de mandibule, cette

dernière a été évaluée en mesurant la longueur des deux lignes (Siman et Eriksson, 1997). La première ligne de la pointe de la mâchoire inférieure à travers la partie inférieure de l'oreille externe au cou (désigné "min", Figure. 33) et la deuxième ligne a été faite de cou au bout du nez (notée "max," Figure. 33). Le rapport entre les longueurs des deux lignes (max / min) a été utilisé comme indice de la taille mandibulaires (Siman et *al.*, 2000).



**Figure 33.** Aspect extérieur d'un fœtus de rat normal (A) et un fœtus de rat avec macrognathie (B) au 20<sup>ème</sup> jour de gestation. Les lignes indiquent la mesure de longueur maxillaires (max) et mandibulaire (min).

Les malformations ont été évaluées en utilisant la liste détaillée par Wentzel et Eriksson. (1996) : Défauts de tube neural (lésions de la plaque neural, ouverture du tube neural, le exencéphalie, hydrocéphalie, anomalies cérébrales) une malrotation axiale ou un corps disproportionné (une macrosomie, des micrognathies et des agnathies supérieures et inférieures, Exophtalmie). Les fœtus présentant ces anomalies sont considérés comme malformés.

Après avoir identifié le nombre de fœtus malformés dans chaque portée, nous avons calculé le taux de malformations (exprimé en %) dans chaque lot par la formule suivante :

Taux de malformations (%) = [nombre de fœtus malformés × 100] / nombre total de fœtus

Une fois examinés, Certains organes considérés comme essentiels pour la survie des fœtus (le foie et le cœur) sont soigneusement prélevés, rincés, pesés, puis homogénéisée dans du tampon phosphate 0.1mole/l (pH 7.4) ensuite centrifugée à 9000tr/min pendant 30 minutes le surnageant récupérer est conservé à  $-40^{\circ}\text{C}$  pour l'analyse des protéines et du statut antioxydant (GSH, GSH-Px, GsT, CAT, SOD, et l'acide ascorbique). Quelques-uns ont été conservés dans de l'éthanol absolu afin de les colorer au rouge Alizarine pour déterminer toute anomalie squelettique axiale et/ou appendiculaire.

### II.6. Traitement statistique des résultats :

Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version13, 31). Les résultats sont représentés sous la forme : moyenne  $\pm$  écart type moyenne, Les données ont été analysées par l'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA) et a l'aide du test de Tukay, nous avons comparé les moyennes . Les différences sont considérées comme :

- Significatives lorsque ( $p < 0.05$ ).
- Hautement significative lorsque ( $p < 0.01$ ).
- Très hautement significative lorsque ( $p < 0.001$ ).

Avec p : Seuil de signification.

# *Résultats & Discussion*



### III.1. Résultats

#### III.1.1 Etudes phytochimiques :

##### III.1.1.1 Rendements en extraits secs :

Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement par rapport à la poudre sèche de notre plante. Ces éléments sont présentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3 :** Aspects, couleurs et rendement des extraits de *C.tinctoria*.

Extraits	Couleurs/ Aspects	Rendements(%)
Aqueux	Marron(poudre)	21,6 ±2,8
Méthanoïque	Marron(liquide)	16,9 ± 2,7

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SE.

En matière de rendement en extraits secs, nous avons constaté que *Cistanche tinctoria* a présenté un rendement assez élevé de l'ordre de 21.6 % pour l'extrait aqueux de la plante. Pour l'extrait méthanolique, nous avons remarqué un rendement de l'ordre de 16,9 %.

##### III.1.1.2. Analyse phytochimique :

Les résultats des études phytochimiques effectuées sur la partie aérienne de *Cistanche tinctoria* sont reportés dans le Tableau 4 et la Figure 34. Les résultats révèlent la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des composés réducteurs, les polyuronides (mucilages) et des tanins (réaction  $FeCl_3$ ) dans les deux extraits, alors que les saponosides et stérols et triterpènes n'étaient présents que dans l'extrait aqueux, ainsi l'absence totale des oses et osides dans nos extraits.

**Tableau 4 :** Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la plante

Groupes chimiques	Extrait aqueux	Extrait méthanolique
Saponosides : mousse	+	-
Tanins : réaction $FeCl_3$	+	+
Composés réducteurs	+	+
Oses et holosides	-	-
Polyuronides( mucilages)	+	+
Stérols et triterpènes : Liebermann	+	-
Alcaloïdes : réaction de Mayer	+	+
Alcaloïdes : réaction de Dragendorff	+	+
Flavonoïdes : HCL	+	+
Flavonoïdes : réaction de la cyanidine	+	+

+ = réaction positif, - = réaction négatif



**Figure 34.** Photo des résultats des tests phytochimiques.

### III.1.1.3. Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins :

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins sont rapportés dans le Tableau 5. Les valeurs sont les moyennes de trois répétitions plus ou moins l'écart-type.

Les analyses quantitatives des phénols totaux des flavonoïdes et des tanins sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique ( $y=0.047x+0.058$ ,  $R^2=0.997$ ), en  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine ( $y=0.313x+0.0171$ ,  $R^2=0.998$ ) et en  $\mu\text{g}$  équivalent de catéchine ( $y=0.1771x+0.0168$ ,  $R^2=0.9938$ ) par mg de la matière sèche. Nos résultats montrent que l'extrait aqueux a une teneur plus élevée en polyphénols totaux ( $120.60 \pm 0.95 \mu\text{g EAG/mg}$ ) par rapport à l'extrait méthanolique ( $80.57 \pm 5.35 \mu\text{g EAG/mg}$ ).

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèlent que l'extrait méthanolique est le plus riche en flavonoïde avec une teneur de ( $180.01 \pm 2.37 \mu\text{g EQ/mgd'extrait}$ ) et que l'extrait aqueux a la teneur la plus faible avec  $46.98 \pm 5.09 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ .

Concernant le dosage des tanins, nos résultats révèlent des concentrations élevés de l'ordre de  $75.36 \pm 0.63$  pour l'extrait aqueux et de  $62.56 \pm 0.96$  pour l'extrait méthanoliques.

**Tableau 5 :** Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits de *C. tinctoria*

	Extrait	Polyphénols <sup>a</sup>	Flavonoïdes <sup>b</sup>	Tanins <sup>c</sup>
<i>C.tinctoria</i>	Aqueux	120.60 ±0.95	46.95 ±5.09	75.36± 0.63
	Méthanolique	80.57±5.35*	180.01±2.37*	62.56 ± 0.96

(a) µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

(b) µg d'équivalent de la quercétine par milligramme d'extrait.

(c) µg d'équivalent de la catechine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SE.

\*P ≤ 0.01 EA Vs EM.

#### III.1.1.4. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM :

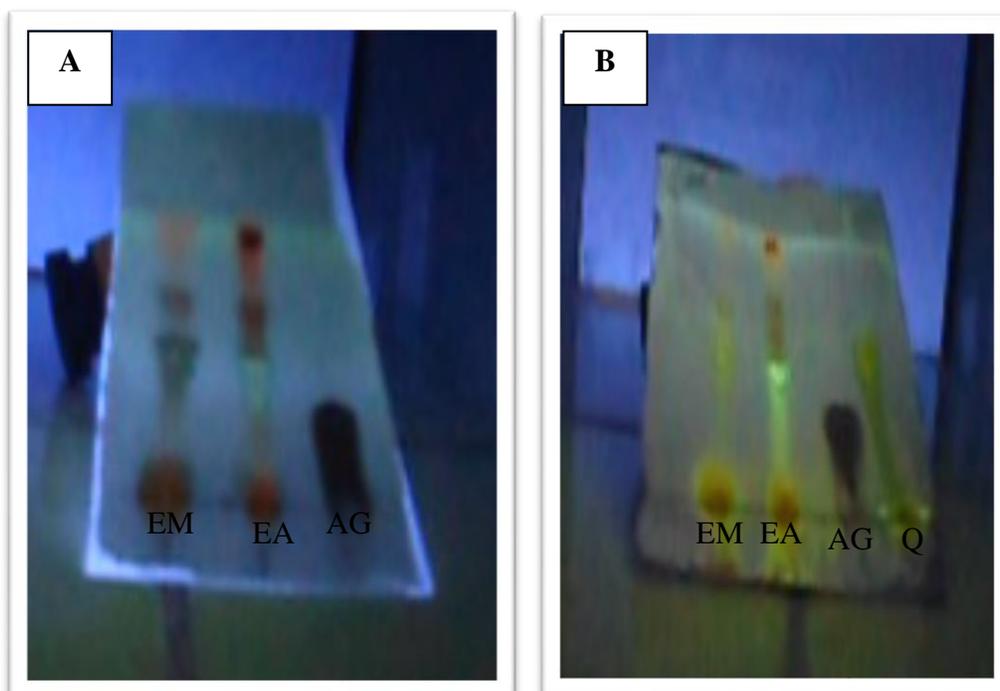
Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimiques de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés.

De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser les différents constituants des extraits. Le système de migration constitué de chloroforme, acétate d'éthyle et acide formique, (50: 40:10, V/V/V), a permis d'avoir une bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. La révélation est réalisée par deux méthodes différentes;

**A)** Observation sous lumière ultraviolette (à 365 nm)

**B)** révélation chimique par une solution aqueuse du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub> à 2%)

Les chromatogrammes résultants comportent une série de spots (Figure 35), l'identification des composés était basée sur la comparaison des RF et les couleurs sont observées sous lampe UV des taches sont apparues sur CCM avec ceux des étalons notés dans les mêmes conditions expérimentales.



**Figure 35.** Chromatographie sur couches minces des extraits de *Cistanche tinctoria*.

A) observation sous UV (365 nm), B) révélation par  $\text{AlCl}_3$  2%.

EA : Extrait aqueux ; EM : Extrait méthanolique ; AG : Acide gallique ; Q : quercétine

Le Tableau 06 comporte les RF des différents spots apparus avec le système de solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV.

Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence trois composés pour l'extrait aqueux et quatre composés pour l'extrait méthanolique.

**Tableau 06 :** Résultats de la chromatographie sur couche mince de *Cistanche tinctoria*

Extrait aqueux			Extrait Méthanolique		
Rf	Couleurs des spots (UV à 365nm)	Suggestion des classes de flavonoides (Markham,1982)	Rf	Couleurs des spots (UV à 365 nm)	Suggestion des classes de flavonoides (Markham,1982)
0.08	Jaune	Flavonols		Orange	Anthocyanidine 3
0.63	Gris				Glycosides
0.68	Orange	anthocyanidine 3-glycosides		Vert	Flavanons, Flavonols
				Bleu	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
				Mauve	

Suite à l'observation sous lampe UV (365 nm), la comparaison des Rf<sub>s</sub> des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés nous a permis d'avoir une idée sur les composés présents dans notre plante.

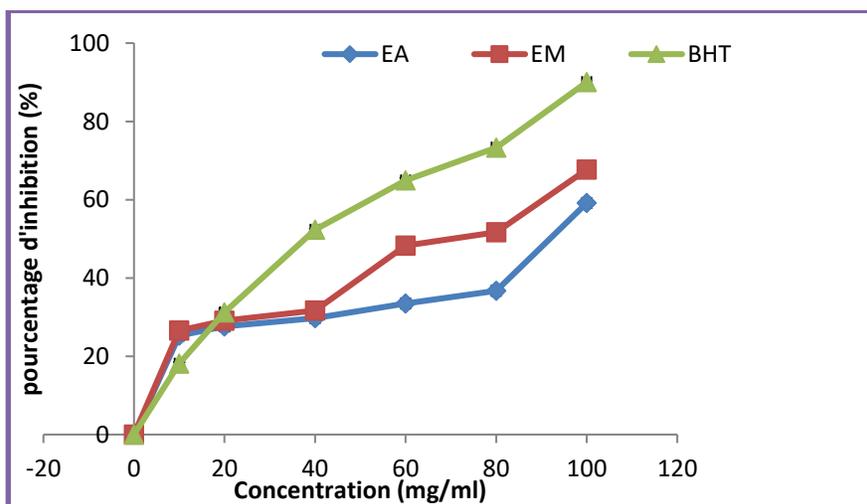
### III.1.2. Activités biologiques :

#### III.1.2.1. Activité antioxydante *in vitro* :

Dans ce travail, trois tests sont utilisés : la méthode de balayage du radical libre DPPH, le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la méthode de piégeage du peroxyde d'hydrogène pour déterminer la capacité anti-oxydante des extraits de *Cistanche tinctoria*

##### a). Méthode de balayage du radical libre DPPH :

Nous avons étudié l'activité de balayage du radical DPPH des extraits bruts aqueux et méthanolique de *Cistanche tinctoria* suivant la méthode décrite par Yik-Ling Chew *et al.*, (2009). Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits de *C. tinctoria* possèdent une activité antiradicalaire à dose dépendante, avec une IC<sub>50</sub> de 86.30  $\mu$ g/ml pour l'extrait méthanolique et de l'ordre de 159.76  $\mu$ g/ml pour l'extrait aqueux. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure. 36, la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'antioxydant de référence BHT est de 57.04 $\pm$ 0.52.



**Figure 36.** Activité antiradicalaire des extraits de *Cistanche tinctoria*. Le BHT est utilisé comme antioxydant de référence, EA., extrait aqueux ; EM., extrait méthanolique. Les valeurs sont la moyenne de trois mesures  $\pm$  SD

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits (Tableau 07) :

- **Calcul de l'EC<sub>50</sub>** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%,  $EC_{50} = (IC_{50}/\text{mg de DPPH/ml})$ ]
- **Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR)** qui est inversement proportionnel à l'EC<sub>50</sub> ( $APR = 1/EC_{50}$ ) (Prakash et al., 2007).

**Tableau 07** : Activité antiradicalaire des extraits de *Cistanche tinctoria*,

	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	EC <sub>50</sub> (µg /µg DPPH)	APR
<b>Extrait aqueux</b>	159.70 ± 2.3	6.65 ±0.36	0.15±0.36
<b>Extraits Méthanolique</b>	53,18 ±1.5	2.21 ±1.01	0.45±0.58
<b>BHT</b>	57.04±0.52	2.85± 0.69	0.35±0.38

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SE

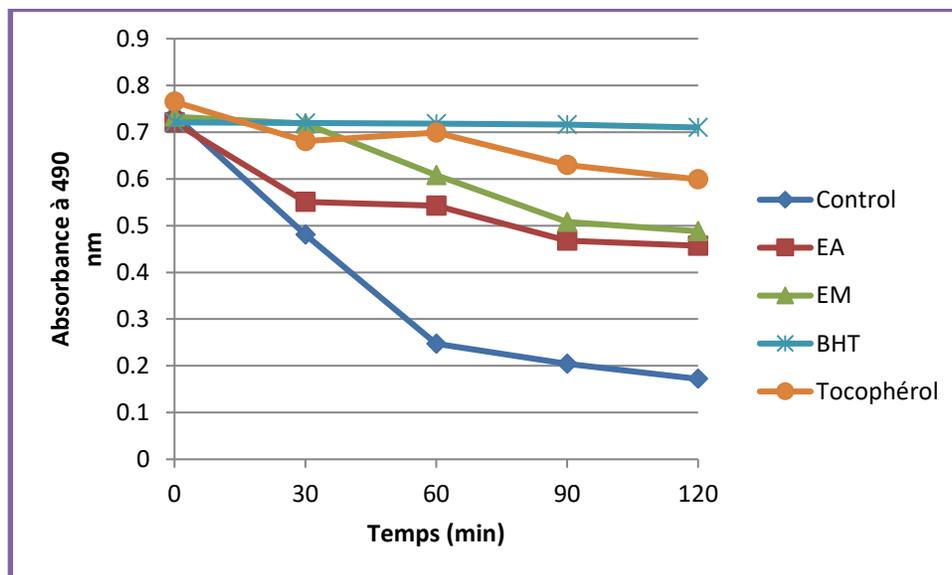
Parmi les deux extraits de *Cistanche tinctoria*, l'EM représente l'extrait le plus actif avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 86.30 µg/mg et un APR de 0.27. Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'EA (IC<sub>50</sub> = 159.76 µg/ml et APR de 0.15) avec une différence significative entre ces deux extraits ( p<0.001).

✓ **Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et polyphénols et l'efficacité antiradicalaire**

Nous avons établi une corrélation entre l'efficacité antiradicalaire (AE) et les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes. Le résultat obtenu nous montre la présence d'une corrélation linéaire entre le paramètre AE et la teneur en flavonoïdes à raison de 0.987. Pour les phénols totaux, la corrélation de ces composés à piéger le radical DPPH est négatif où le coefficient de corrélation est égal à -0.953.

**b). Test de blanchissement du β-carotène**

La cinétique de blanchissement du β-carotène en absence et en présence des extraits de *Cistanche tinctoria* et d'antioxydant standards ainsi que les pourcentages d'inhibition est représenté dans la Figure 37 et Tableau 08 respectivement.



**Figure 37.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de *Cistanche tinctoria*, du BHT,  $\alpha$ -tocophérol (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

**Tableau 08 :** Activité antioxydante des extraits, du BHT et de l'  $\alpha$ -tocophérol dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique

	Extrait aqueux	Extrait Méthanolique	$\alpha$ -tocophérol	BHT
<b>Pourcentage d'inhibition (%)</b>	62,43±0.6 *	64,23±1.69*	70.23±1.2*	90.02±0.89

\*p<0.01 vs BHT

D'après ces résultats, il est évident que tous le standard et les extraits testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$  carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

Les deux extraits montrent une activité inhibitrice élevée. Etant donné qu'il n'existe pas une différence significative entre les extraits, la valeur moyenne d'activité antioxydante relative est de 62,62%, mais cette activité reste significativement inférieure ( $p \leq 0.01$ ) à celle du BHT (90.02%) utilisée comme contrôles positifs.

✓ **Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et polyphénols et l'activité antioxydante dans le système  $\beta$ -carotène/ acide linoléique :**

Nous constatons qu'il y a une corrélation positive avec les phénols totaux ( $R^2 = 0.619$ ), donc les polyphénols interviennent de façon importante à piéger les radicaux libres. En ce qui concerne les flavonoïdes, le coefficient de corrélation est de l'ordre de 0.262.

**c). Activité antioxydante par la méthode de piégeage du peroxyde d'hydrogène :**

Nous avons étudié l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits bruts : aqueux et méthanoliques de *Cistanche tinctoria*, suivant la méthode décrite par Ruch et al. ? (1989). Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau 09. À la concentration utilisée (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ), nous avons remarqué que le BHT exerce un effet puissant de l'ordre de 91,42 %. En ce qui concerne les deux extraits testés, l'extrait méthanolique a montré une activité sur le piégeage du peroxyde d'hydrogène de l'ordre de 53,27 %, alors que l'extrait aqueux a exercé une activité de l'ordre de 32,08 %.

**Tableau 09 :** Pourcentages de piégeage du  $\text{H}_2\text{O}_2$  des extraits bruts de *Cistanche tinctoria*.

Échantillons	Temps (minutes)				
	0	10	20	30	40
BHT	91,42	73.86	59.89	55.02	43.27
Extrait aqueux	53,27	41.75	38.95	30.08	21.23
Extrait Méthanolique	32.08	30.26	23.89	15.08	10.15

**III.1.2.2. Evaluation de la toxicité chez les rats :**

Aucun décès ou signe de toxicité n'ont été enregistrés durant la période de traitement ou d'observation dans les groupes traités (100, 250, 500, 1 000, 1 500 et 2 000 mg/kg). On note également qu'aucune variation de poids n'a été obtenue par rapport au témoin.

III.1.2.3. Evaluation de l'activité antidiabétique chez la ratte non gestante :

a). Variation du poids corporel pendant la période de traitement :

L'injection de la STZ par voie intraperitoniale à dose de 50mg/Kg de poids corporel chez les rats entraîne une diminution non significative des poids corporels des rats diabétiques non traités par rapport aux témoins. Toutefois, chez les rats traités on constate qu'il y a une augmentation, mais toujours non significative par rapport au lot diabétique non traité, mais moins modérée que celle des témoins, (Figure 38).

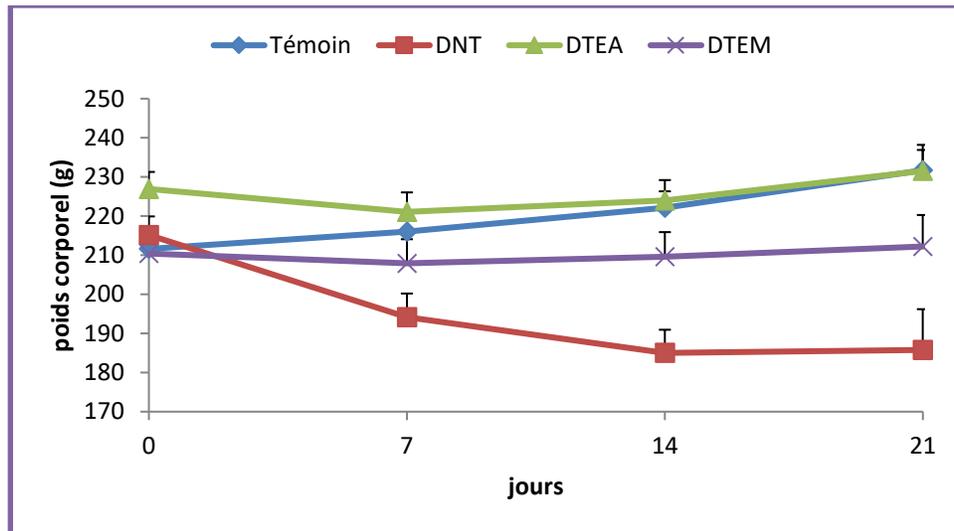


Figure 38. Effet d'EA et EM sur le poids corporel journalier des rats témoins, diabétiques non traité et traité. Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM).

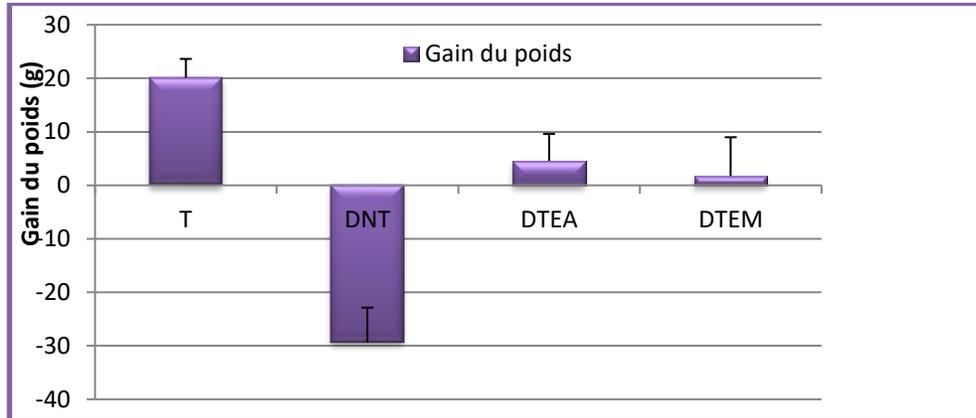
✓ Comparaison entre le poids initial et le poids final

La comparaison entre le poids initial et le poids final chez les rats témoins, diabétiques non traités et traités avec l'EA et l'EM, est représentée dans le Tableau.10 et la Figure 39.

Tableau 10 : Variation de poids initial et final chez les rats témoins, diabétiques non traités et traités avec l'EA et l'EM.

Groupe <sup>1</sup>	Poids corporel en gramme		Gain du poids (g)
	Poids initial	Poids final	
T	211.61±4.05	231.71±5.19 <sup>a</sup>	20.1± 3.52
DNT	215.15 ± 4.76	185.8 ± 10.4	-29.35± 6.5
DTEA	226.94 ± 4.34	231.53 ± 6.67 <sup>a</sup>	4.59± 5.02
DTEM	210.45 ± 5.34	212.22 ± 8.05	1.77±7.21

Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), <sup>a</sup>P ≤ 0.01, initial Vs Final.



**Figure 39.** Gain du poids chez les rats témoins, DNT, et traités avec l'EA et l'EM. Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM).

Pour les rats témoins, il y a une augmentation de poids corporel qui est de l'ordre de ( $211.58 \pm 4,056$  à  $231,71 \pm 5,19$ ), cette différence de poids est significative entre le poids initial et le poids final. En revanche il y a une diminution mais non significative entre le poids initial et le poids final des rats diabétiques non traités qui est de l'ordre de ( $215,15 \pm 4,76$  à  $185,8 \pm 10,04$ ) avec une perte de poids de l'ordre de ( $-29.35 \pm 6.5$ ). En ce qui concerne les deux groupes traités (avec l'EA et l'EM) on remarque que le groupe traité avec le EA a gagné du poids de l'ordre de ( $+ 4.59, 2.02\%$ ) plus que le groupe traité avec le EM qui est de l'ordre de ( $+ 1.77, 0.84\%$ ), mais entre les deux groupes traités la différence n'est pas significative.

#### **b). Variation du poids absolu et relatif des organes :**

La variation des poids absolu et relatifs des organes (foie, cœurs et pancréas) pour les quatre lots expérimentaux est énumérée dans le Tableau 11.

**Tableau 11 :** Variation des poids absolu et relatif des organes pour les rats témoins, diabétiques non traités et traités avec le EA et le EM.

Groupe <sup>1</sup>	poids absolu (g)			poids relatif (g/100g de poids corporel)		
	Foie	Cœur	Pancréas	Foie	Cœur	Pancréas
<b>T</b>	6,59 ± 0,90	0,6 ± 0,05	0,81 ± 0,02	3,31 ± 0,19	0,30 ± 0,008	0,40 ± 0,01
<b>DNT</b>	9,30±1,67**	0,72 ± 0,1*	0,70±0,10	5,57±0,24**	0,36 ± 0,01**	0,36±0,06
<b>DTEA</b>	11,50±0,54***	0,75 ± 0,06	0,98 ± 0,18	5,26±0,4**	0,34 ± 0,08	0,48 ± 0,07
<b>DTEM</b>	8,63 ± 0,61 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,08	0,75 ± 0,06	4,44 ± 0,5 <sup>#</sup>	0,36 ± 0,01**	0,38 ± 0,03

Les résultats sont exprimés en: (M ± SEM), # P < 0.05 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05; \*\* P < 0. 01; \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; <sup>a</sup> P < 0.01 EA VS EM.

Après l'induction du diabète par la streptozotocine, on a constaté une augmentation significative du poids absolu et relatif du foie des rats diabétiques en comparaison aux rats témoins (PA : DNT: 9,30 ± 1,67, DTEA: 11,50 ± 0,54, DTEM : 8,63 ± 0,61 vs T: 6,59 ± 0,90, P < 0.05, et P < 0.001 ; PR : DNT: 5,57 ± 0,24, DTEA: 5,26 ± 0,44, DTEM : 4,44 ± 0,5 vs T: 3.31 ± 0,19). De même Pour le muscle cardiaque, les résultats révèlent une augmentation du poids absolu et du poids relatif chez les rats diabétiques par rapport aux rats témoins (PA : DNT : 0,72 ± 0,01, DTEA : 0,75 ± 0,06, DTEM : 0,71± 0,08 vs T : 0,60 ± 0,05 P < 0.05 ; PR : D: 0.36 ± 0.01, DTEA: 0.34 ± 0.08, DTEM : 0.36 ± 0.01 Vs T: 0,30 ± 0.008). Concernant le pancréas, les résultats révèlent une diminution du poids absolu et du poids relatif chez les rats diabétiques par rapport aux rats témoins (PA : D: 0,70±0,10, DTEA: 0,98 ± 0,18, DTEM : 0,75 ± 0,06 vs T: 0,81 ± 0,02; PR : D: 0,36±0,06, DTEA: 0,48 ± 0,07, DTEM : 0,38 ± 0,03 vs T: 0,40 ± 0,01). Cependant l'adjuvant utilisé en l'occurrence les extraits de notre plante a eu un effet réparateur statistiquement non significatif concernant les variations pondérales. Par conséquent, il n'existe pas de différence significative entre les deux lots traités (Tableau 11).

c). Effet des extraits de *Cistanche tinctoria* sur les paramètres biochimiques :

c).1. Glycémie et glycogène :

L'injection par voie intra péritonéal de la STZ provoque une augmentation très hautement significative des niveaux du glucose plasmatique comparativement aux rats témoins. En revanche, le traitement des rats diabétiques par l'EM a atténué significativement l'hyperglycémie, si elle est comparée avec le groupe DNT, la glycémie est réduite à 58.39%. D'autre part le traitement des rats par EA provoque une diminution très hautement significative de la concentration plasmatique du glucose, qui est réduite à 54.58 % par rapport au lot DNT et elle est aussi très hautement significative par rapport à la concentration initiale qui passe de  $389,5 \pm 32,48$  à  $176,9 \pm 33,6$  (Tableau 12). Les résultats montrent que l'EM est plus efficace dans la réduction du niveau plasmatique du glucose que l'EA, mais il n'existe pas une différence significative entre les deux traitements.

Concernant le teneur hépatique en glycogène, Nos résultats montrent qu'il y a une diminution très hautement significative de la teneur hépatique en glycogène chez le lot diabétique par rapport au lot témoin. Le traitement des rats diabétiques par l'EM et l'EA induit une augmentation significative dans la teneur hépatique en glycogène par rapport au lot diabétique non traité et on a constaté que l'EA a des effets bénéfiques par rapport à celui de l'EM avec une différence significative entre les deux traitements (Tableau 12).

**Tableau 12:** Variation de la concentration plasmatique en glucose et la teneur hépatique en glycogène chez les rats témoins, diabétiques non traités et traités par l'EA et l'EM.

Groupe <sup>1</sup>	Dose (mg/kg)	Variation de glycémie (mg/dl)			Glycogène (mg/g de foie)
		Avant traitement	Après traitement	Efficacité (%)	
<b>T</b>	-	103,75 ± 3,49	101,32 ± 4,04	-	136,62 ± 0,54
<b>DNT</b>	-	407,8 ± 3,5	442,0 ± 1,8 ***	-	49,82 ± 1,62***
<b>DTEA</b>	200	389,5 ± 32,48	176,9 ± 33,6 <sup>a, ###</sup>	54.58	80,82 ± 2,82*. <sup>###</sup>
<b>DTEM</b>	200	408,7 ± 23,9	170,06 ± 22,0 <sup>a, ###</sup>	58.39	71,37 ± 2,54*. <sup>##</sup>

Les résultats sont exprimés en: (M ± SEM), <sup>##</sup> P < 0.01 ; <sup>###</sup> P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; <sup>a</sup>P ≤ 0.01 après traitement Vs avant traitement.

## c).2. Profil lipidiques :

Les résultats de l'influence des extraits aqueux de *Cistanche tinctoria* sur le profil lipidique chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par STZ sont représentés dans le Tableau 13

**Tableau 13:** Variations des paramètres lipidiques chez les rats témoins, diabétiques non traités et traités avec l'EA et l'EM.

Lots expérimental -aux	Paramètres lipidiques				
	Cholestérol (mg/dl)	Triglycéride (mg/dl)	HDL (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	Lipides totaux (mg/dl)
Témoin	49,75 ± 3,72	56,76 ± 5,02	46.27 ± 1.05	11.35 ± 1.02	334,37 ± 7,35
DNT	104,16± 6,6***	118,54 ± 8,1***	28.71± 2.29*	23.71 ± 1.61***	629,60±23,8*
DTEA	72,54 ± 4,78***.#	90,14±5,71***	40.13 ± 2.33###	22.03±1.14***	446,7±11,6 #
DTEM	86,72 ± 9,08 ***	62,6 ± 13,4###.a	48.88± 2.03###	12.53± 2.69#.a	554,6 ± 17,5.

Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), # P < 0.05 ; # # # P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité;\*P < 0.05;\*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ;

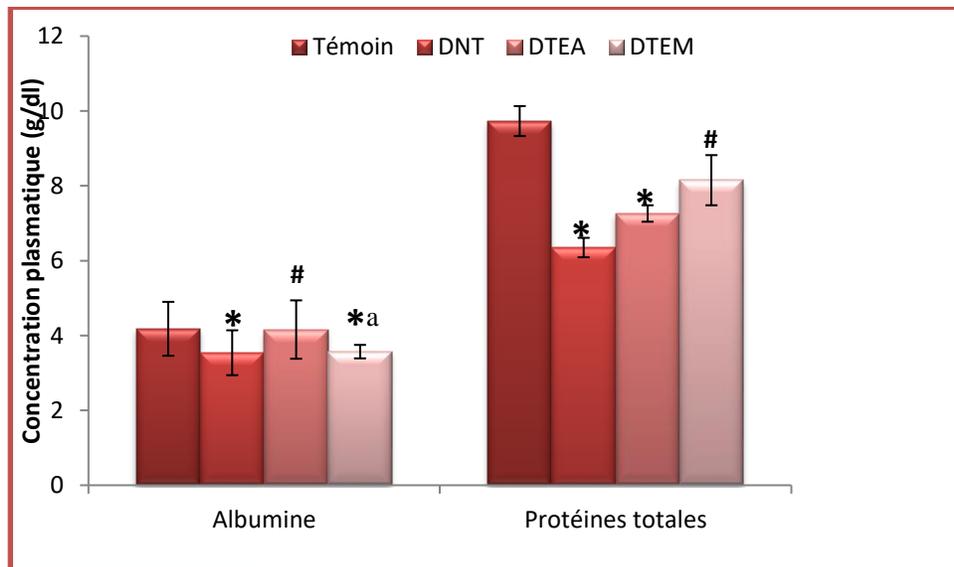
<sup>a</sup>. EM Vs EA (P ≤ 0.01).

Nous avons constaté que l'injection de la STZ a provoqué une augmentation significative de la concentration plasmatique du cholestérol total ( D: 104,16 ± 6,6 vs T: 49,75 ± 3,72 et p < 0.001), des triglycérides ( D: 118,54 ± 8,1 vs T: 56,76 ± 5,02 et p < 0.001), des lipides totaux ( D: 629,60±23,8 vs T: 334,37 ± 7,35et p < 0.001) et des VLDL-cholestérol ( D: 23.71 ± 1.61 vs T: 11.35 ± 1.02 et p < 0.001), et une diminution très hautement significative de HDL-cholestérol (D: 28.71± 2.29 vs T: 46.27 ± 1.05 p < 0.001) chez les lots diabétiques par rapport au groupe sain. Le traitement des rats diabétiques par l'EA et l'EM a baissé la concentration plasmatique de cholestérol total (-30.35% et -16.74% respectivement), des triglycérides (-23.95% et -47.69% respectivement), des lipides totaux (-29.05% et 11.91% respectivement) et des VLDL-cholestérol. En revanche en note une augmentation très hautement significative (p< 0.001) dans la concentration plasmatique de HDL-cholestérol chez les deux lots traités par rapport au lot diabétique non traité.

## c).3. Bilan protéique :

La Figure 40 illustre une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) de la concentration plasmatique d'albumine chez les diabétiques par rapport au lot témoin. En revanche, le traitement des rats diabétiques par l'EA a atténué significativement ( $p \leq 0.05$ ) l'hypoalbuminémie. D'autre part, le traitement des rats par l'EM a provoqué une légère augmentation non significative par rapport aux diabétiques non traités, cependant il existe une différence significative entre les deux traitements.

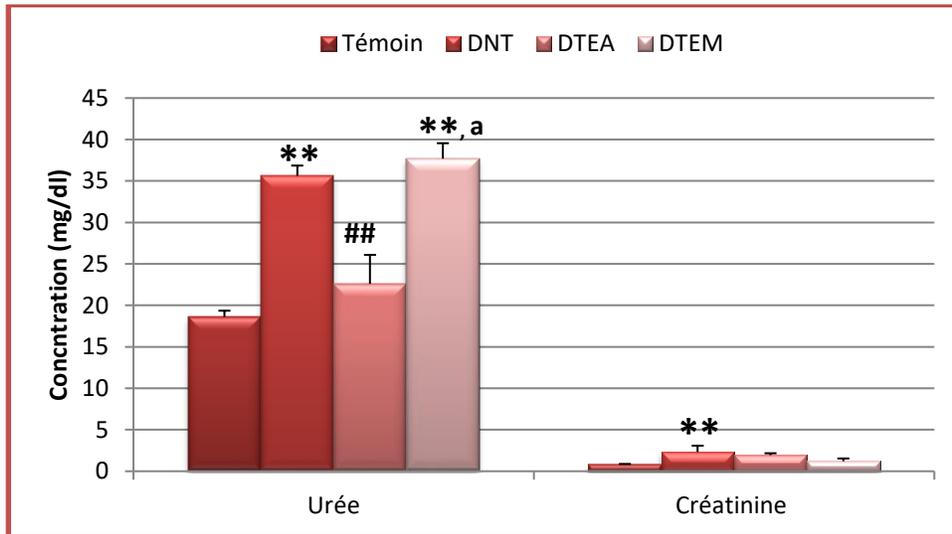
Concernant les protéines totales les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative ( $p \leq 0.05$ ) dans leurs concentrations chez le lot diabétique non traité par rapport au lot témoin, Par ailleurs, nos résultats indiquent que le traitement des rats diabétiques par les deux extraits (aqueux et méthanoïque) a atténué l'hypoprotéinémie significativement ( $p \leq 0.05$ ) pour l'extrait méthanoïque et non significative pour l'extrait aqueux, par conséquent il n'existe pas une différence significative entre les deux traitements (Figure 40).



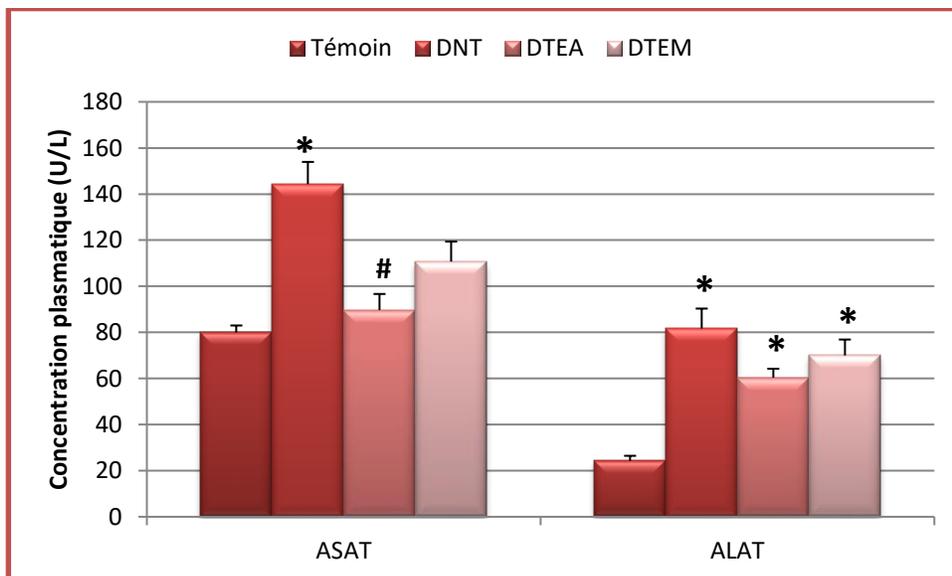
**Figure 40.** Variation de la concentration plasmatique en Albumine et en Protéines totales chez les rats témoins, DNT et diabétique traite avec l'EA et l'EM. Les résultats sont exprimés en: ( $M \pm SEM$ ), #  $P < 0.05$  comparaison avec le groupe diabétique non traité; \* $P < 0.05$ ; comparaison avec le groupe témoin sain, <sup>a</sup>. EM Vs EA ( $P \leq 0.05$ )

c).4. Bilan rénal et hépatique :

La variation des paramètres biochimiques concerne l'effet de la STZ et les deux extraits (EA et EM) sur les reins et le foie pour les quatre lots expérimentaux qui sont énumérés dans les Figures 41 et 42.



**Figure 41.** Variation de la concentration plasmatique en Urée et en créatinine pour les lots témoin, DNT et traitées par l'EA et l'EM. Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), \*\*P ≤ 0.01, Vs Témoins ;##P ≤ 0.01, Vs Diabétiques non traités. ;<sup>a</sup>. EM Vs EA (P ≤ 0.01).



**Figure 42.** Variation de la concentration plasmatique en ASAT en ALAT pour les lots témoin, DNT et traitées par l'EA et l'EM. Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), #P < 0.05 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05; comparaison avec le groupe témoin sain.

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative dans la concentration plasmatique de l'urée chez le lot diabétique par rapport au lot témoin. Le traitement des rats diabétiques par les deux extraits engendre une diminution significative dans la concentration d'urée chez les rats diabétiques traités par l'EA. D'autre part, pour le traitement des rats par l'EM il n'y a aucun effet sur la concentration plasmatique de l'urée avec une différence significative avec le groupe témoin sain et non significative par rapport aux diabétiques non traités, cependant il existe une différence significative entre les deux traitements. Concernant la créatinine, nos résultats montrent une élévation significative dans la concentration de créatinine chez les lots diabétiques non traités par comparaison au lot témoin. Le traitement des rats diabétiques par l'EM et l'EA induit une diminution non significative dans la concentration de la créatinine par rapport au lot DNT. Et, ainsi il n'existe pas de différence significative entre les deux traitements.

En ce qui concerne la fonction hépatique, nous avons remarqué une augmentation statistiquement significative de l'activité des transaminases (TGO et TGP) dans le plasma des rats diabétiques non traités par rapport à celle du contrôle. Par ailleurs le traitement des rats diabétiques à dose de 200mg/kg de poids corporel d'EA et EM a rétabli cette activité qui reste plus active que celle des témoins, et il n'existe pas une différence entre les deux traitements.

#### **d). Profil inflammatoire :**

La concentration plasmatique en cytokine est représentée dans le Tableau 14 : les paramètres pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 et TNF- $\alpha$ ) et le facteur de croissance de cellules T (IL-2) ont été évalués chez les rats. On note une augmentation significative pour l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et l'IL-10 et hautement significative pour TNF- $\alpha$ , chez les rats diabétiques en comparaison avec les témoins. En revanche le traitement des rats diabétiques avec les extraits (aqueux et méthanolique) à dose de 200mg/kg pendant 21 jours, a entraîné une amélioration dans le profil pro inflammatoire avec une diminution significative pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, et non significative pour IL-10 et TNF- $\alpha$ . Concernant le niveau plasmatique d'IL-2 (facteur de croissance des cellules T nécessaire pour la survie et la prolifération des cellules T), a été significativement réduit chez les rats diabétiques par rapport à celles des contrôles. Le niveau plasmatique de l'IL-2 était significativement restauré chez les rats diabétiques traités avec les deux extraits (EA, EM) de *Cistanche tinctoria*.

**Tableau 14** : Effets des extraits aqueux et méthanolique de *Cistanche tinctoria* sur les paramètres immunologique.

Lots expérimentaux	Paramètres Immunologiques				
	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
<b>Témoin</b>	98.98 $\pm$ 5.26	198.1 $\pm$ 10.6	80.07 $\pm$ 5.20	63.4 $\pm$ 3.80	23.66 $\pm$ 0.6
<b>DNT</b>	176.09 $\pm$ 9.73*	121.28 $\pm$ 1.66***	195.7 $\pm$ 11.6*	92.17 $\pm$ 5.03*	37.08 $\pm$ 2.27**
<b>DTEA</b>	115.04 $\pm$ 0.92 <sup>#</sup>	164.75 $\pm$ 8.10 <sup>##</sup>	109.5 $\pm$ 1.54 <sup>#</sup>	80.9 $\pm$ 10*	22.21 $\pm$ 2.05 <sup>##</sup>
<b>DTEM</b>	120.34 $\pm$ 7.70 <sup>#</sup>	157.7 $\pm$ 11.6* <sup>#</sup>	126.1 $\pm$ 10.6* <sup>#</sup>	88.14 $\pm$ 3.36*	31.07 $\pm$ 3.22 <sup>a</sup>

Les résultats sont exprimés en: (M  $\pm$  SEM), <sup>#</sup> P < 0.05, <sup>##</sup> P < 0.01 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain. ; <sup>a</sup> : P  $\leq$  0.01 EA Vs EM.

#### e). Statut antioxydant :

Il est admis que le règne végétal constitue une source importante des antioxydants naturels, raison pour laquelle une recherche d'éventuel effet antioxydant des plantes médicinales constitue un facteur cruciale pour l'évaluation de leurs effets phytosanitaires et pour la compréhension de leurs mécanismes d'action. *Cistanche tinctoria* a été évaluée pour son effet sur les paramètres du stress oxydant associé au diabète sucré et principalement au niveau de certains organes constituant des sites de développement des complications diabétiques.

##### e).1. Antioxydants non enzymatique (exogène et endogène) :

La concentration plasmatique et tissulaire des vitamines (C et E) et du glutathion est représentée dans le Tableau 15. Le résultat obtenu montre une diminution statistiquement significative dans la concentration de la vitamine C dans le plasma et dans les organes étudiés (foie, pancréas et cœurs) chez le groupe diabétique non traité par rapport au groupe témoin. Le traitement des rats diabétiques par les deux extraits aqueux et méthanolique a rétabli cette diminution significativement dans le plasma, le tissu hépatique et le muscle cardiaque, en revanche on a noté une légère amélioration dans le tissu pancréatique.

Concernant la variation de la vitamine E, nous avons remarqué une diminution hautement significative dans la concentration plasmatique (DNT : 6,35  $\pm$  0,26 vs T : 9,73  $\pm$  0,407) et très hautement significative dans l'homogénat de foie (DNT : 144, 8 $\pm$  0,59 vs T : 190,90  $\pm$  0,96) en vitamine E chez le lot diabétique non traité par rapport au groupe témoin. Le traitement des rats

diabétiques par les deux extraits a amélioré cette perturbation avec une augmentation dans la concentration plasmatique et hépatique de cette vitamine, chez les deux lots traités par rapport au groupe non traité. Mais elle reste remarquablement faible par rapport au groupe témoin sain.

L'induction du diabète chez les rats entraîne une diminution hautement significative de la teneur hépatique, pancréatique et cardiaque en glutathion réduit (-63.25%, -54.63 % et - 47.82% respectivement) par rapport aux rats témoins. Par contre, chez les deux groupes traités (DTEA) et (DTEM) on enregistre une augmentation significative de la teneur hépatique, ( $p < 0.01$ ), de la teneur pancréatique et ( $p < 0.01$ ), de la teneur cardiaque du glutathion réduit en comparaison avec le groupe non traité (DNT).

**Tableau 15 :** Variation des concentrations plasmatique et tissulaire (foie, pancréas et cœur) des antioxydants exogènes (vitamine C et Vitamine E) et endogène (GSH) chez les groupes expérimentaux.

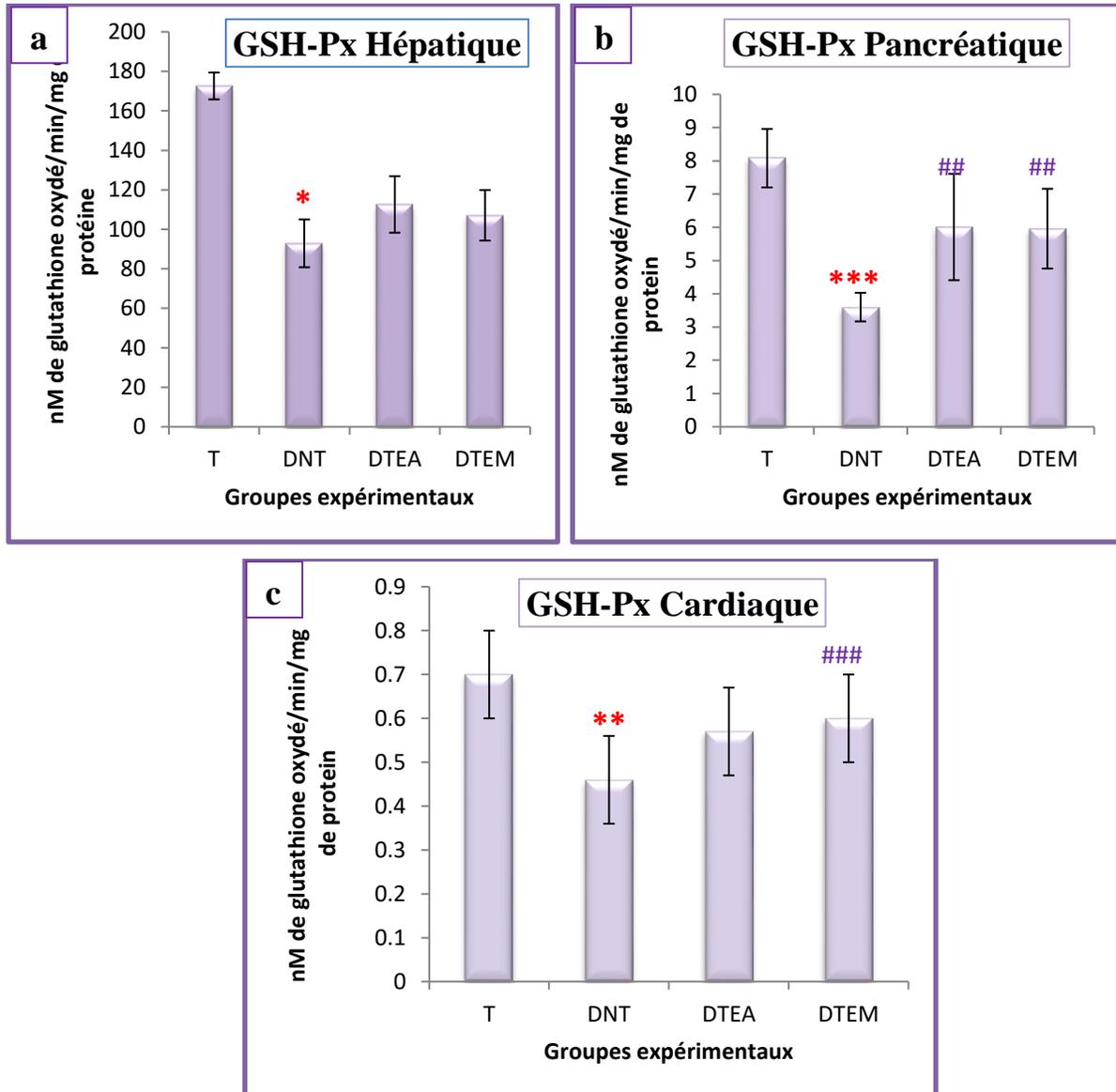
Lots expérimentaux <sup>1</sup>	Témoin	DNT	DTEA	DTEM
<b>Vit C plasmatique (µg/ml)</b>	19,90 ± 0,96	10,28 ± 0,59*	22,25 ± 0,81 <sup>###</sup>	19,32 ± 1,47 <sup>###</sup>
<b>Vit C hépatique (µg/g de tissu)</b>	94,87 ± 2,19	79,73 ± 2,77*	105,88 ± 2,38 <sup>##</sup>	99,32 ± 5,82 <sup>##</sup>
<b>Vit C pancréatique (µg/g de tissu)</b>	51.59 ± 2.95	28.06 ± 4.10 <sup>***</sup>	37.11 ± 2.70 <sup>**</sup>	31.25 ± 2.3 <sup>**</sup>
<b>Vit C cardiaque (µg/g de tissu)</b>	30.64 ± 0.64	20.14 ± 1.11*	30.37 ± 0.81	30.93 ± 0.77 <sup>#</sup>
<b>Vit E plasmatique (µg/ml)</b>	9,73 ± 0,407	6,35 ± 0,26 <sup>**</sup>	7,26 ± 0,22*	8,15 ± 0,67 <sup>#</sup>
<b>Vit E hépatique (µg/g de tissu)</b>	190,90 ± 0,96	144,8 ± 0,59 <sup>***</sup>	166,25 ± 0,81 <sup>#</sup>	156,42 ± 1,07 <sup>#</sup>
<b>Antioxydant endogène</b>				
	<b>GSH hépatique</b>	<b>GSH cardiaque</b>	<b>GSH pancréatique</b>	
	<b>(µmol/mg de protéine)</b>			
<b>Témoin</b>	60.20 ± 0.27	1.38 ± 0.01	8.20 ± 0.86	
<b>DNT</b>	22.12 ± 0.27 <sup>***</sup>	0.72 ± 0.08 <sup>**</sup>	3.72 ± 0.42 <sup>***</sup>	
<b>DTEA</b>	43.50 ± 0.142 <sup>*,##</sup>	1.20 ± 0.07 <sup>##</sup>	7.31 ± 1.42 <sup>##</sup>	
<b>DTEM</b>	63.55 ± 0.36 <sup>###,a</sup>	0.9 ± 0.04 <sup>*</sup>	6.89 ± 0.9 <sup>##</sup>	

Les résultats sont exprimés en: (M ± SEM), <sup>##</sup> P < 0.01, <sup>###</sup> P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05; \*\* P ≤ 0.01, \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin

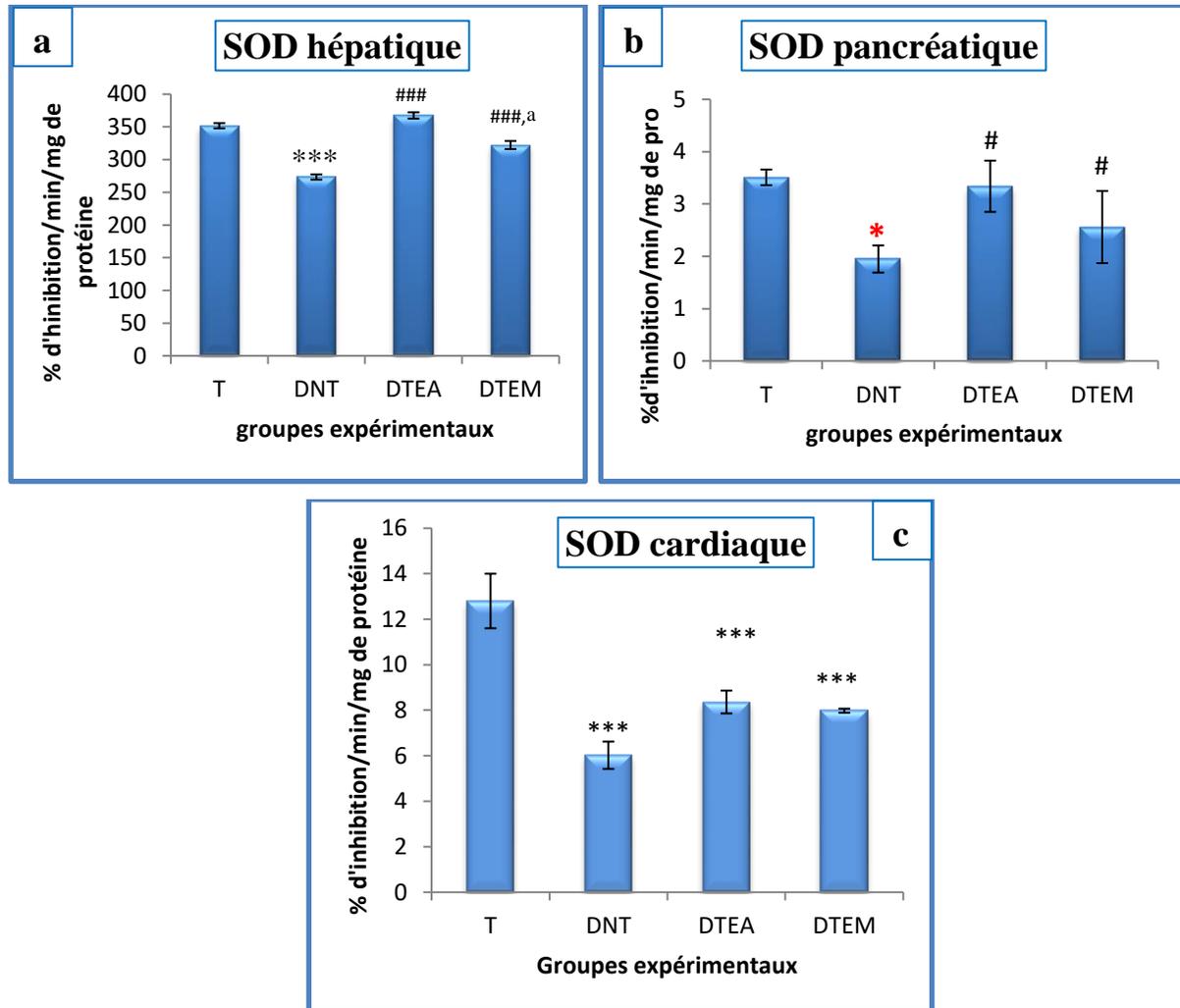
sain ; <sup>a</sup> : P ≤ 0.01 EA Vs EM.

## e).2. Les antioxydants enzymatiques :

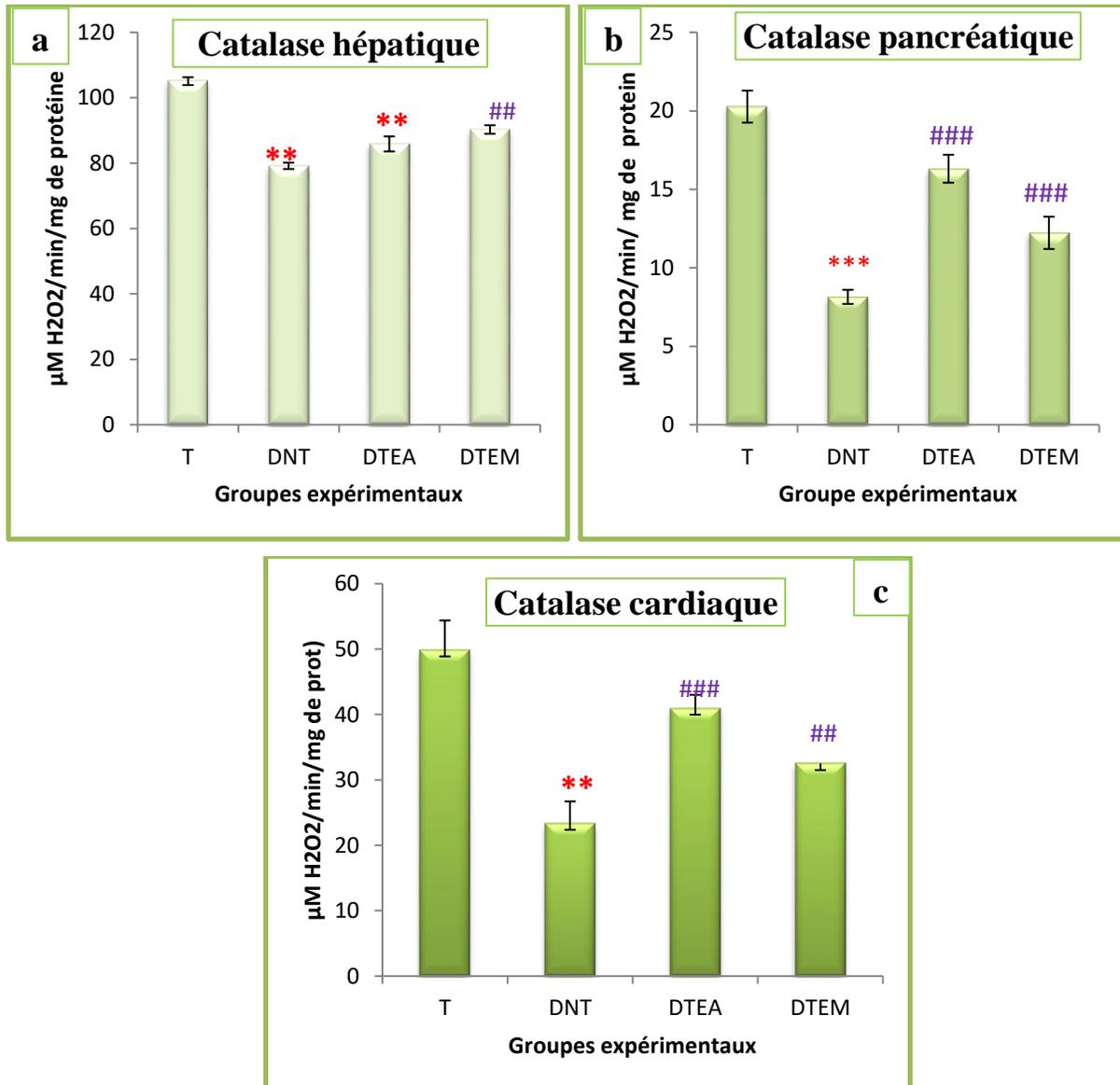
Les résultats de l'effet des extraits sur les enzymes antioxydantes : l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px), du superoxyde dismutase (SOD), du catalase (CAT), et du glutathion-S-transférase (GST) hépatiques, pancréatique et cardiaque chez les rats témoins, diabétiques non traités (DNT) et traité avec les deux extraits aqueux et méthanolique (DTEA et DTEM) après 21 jours de traitement sont représentés respectivement dans les Figures 43,44,45 et 46.



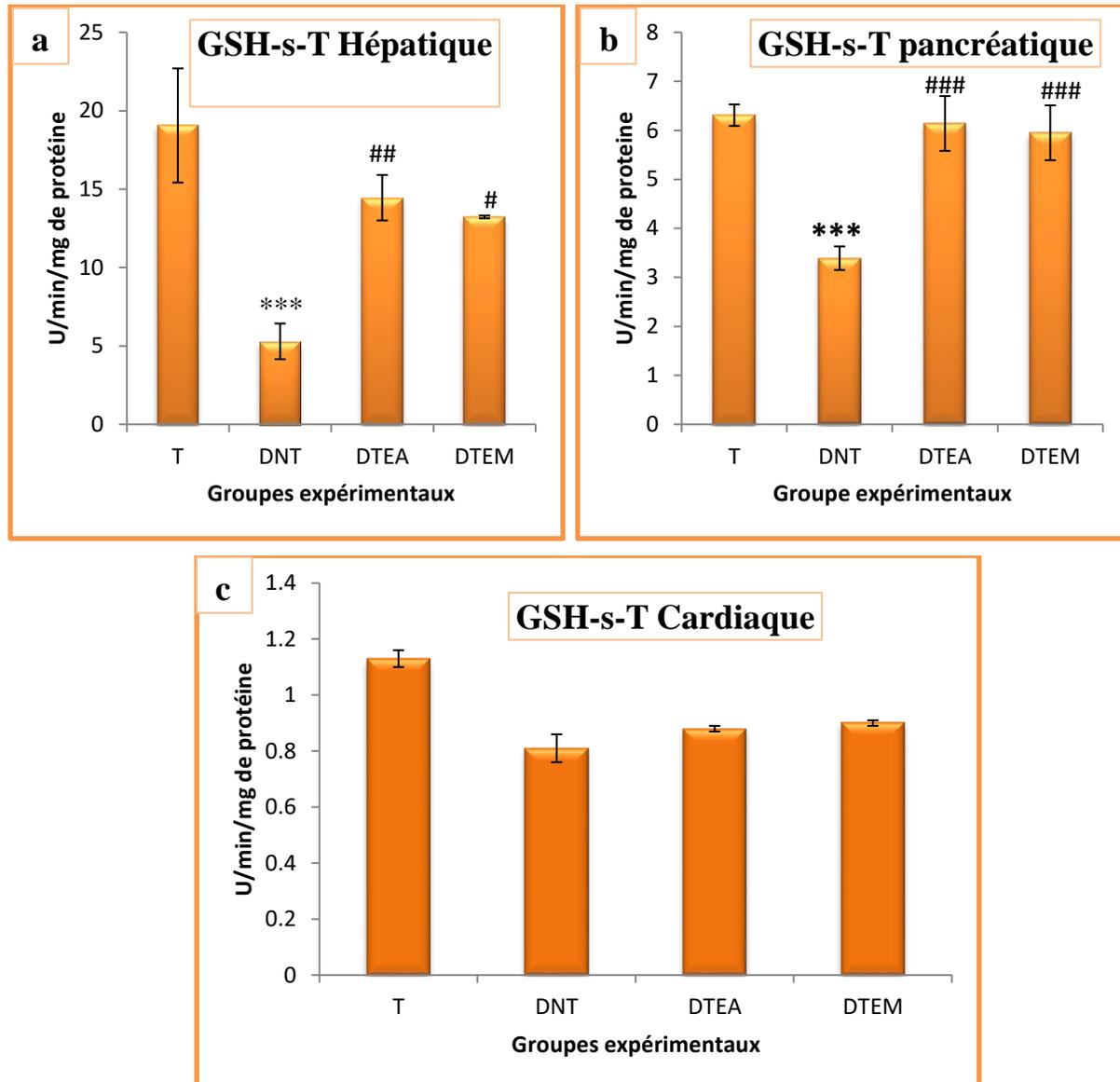
**Figure 43.** Effet des EA et EM sur l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px), a). hépatique ; b).pancréatiques et c).cardiaques . Les résultats sont exprimés en: (M  $\pm$ SEM) ## P < 0.01. ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité;\*P < 0.05;\*\*P < 0.01 ;\*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.



**Figure 44.** Effet des EA et EM sur l'activité du superoxyde dismutase, a). hépatique ; b) pancréatiques et c).cardiaques . Les résultats sont exprimés en: ( $M \pm SEM$ ), #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$  comparaison avec le groupe diabétique non traité; \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  comparaison avec le groupe témoin sain ; <sup>a</sup>  $P < 0.01$  EA VS EM.



**Figure 45.** Effet des EA et EM sur l'activité de la catalase (CAT), a). Hépatique ; b). pancréatiques et c). cardiaques. Les résultats sont exprimés en: (M ± SEM)<sup>###</sup> P < 0.01, <sup>###</sup> P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.



**Figure 46.** Effet des EA et EM sur l'activité de glutathion –s-transférase (G-s-t), a). hépatique ; b).pancréatiques et c).cardiaques . Les résultats sont exprimés en: (M  $\pm$ SEM) #P < 0.05 ; ##P < 0.01 ; )###P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité;\*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.

L'analyse du statut antioxydant enzymatique du foie, pancréas et le muscle cardiaque est déterminée par l'évaluation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase, de la catalase, de la glutathion peroxydase et de la glutathion-s-transférase. Les résultats illustrés par les Figures 43,44,45 et 46 respectivement, révèlent une diminution significative, très hautement significative et hautement significative de l'activité du GSH Px hépatique, pancréatique et cardiaque chez le lot des rats diabétiques non traités en comparaison à ceux normo-glycémiques. Cette réduction est à l'ordre de 46, 17% dans le foie (DNT :  $92,9 \pm 12,1$  vs T :  $172,6 \pm 6,79$  ;  $< 0,05$ ) ; de l'ordre de 55, 44% dans le pancréas (DNT :  $3,60 \pm 0,43$  vs T :  $8,08 \pm 0,88$  ;  $< 0,05$ ) et de l'ordre de 34, 28 % dans le cœurs (DNT :  $0,46 \pm 0,01$  vs T :  $0,7 \pm 0,08$  ;  $< 0,05$ ). Par contre le traitement de trois semaines par les deux extraits (EA et EM) des rats diabétiques semble rétablir la concentration du GSH-Px , on note une augmentation de 21,20% et 15,28% au niveau hépatique (DTEA :  $112,6 \pm 14,3$  et DTEM :  $107,1 \pm 12,8$  vs DNT :  $92,9 \pm 12,1$ ), 66,94% et 65 ,55% au niveau pancréatique (DTEA :  $6,01 \pm 1,6$  et DTEM :  $5,92 \pm 1,2$  vs DNT :  $3,6 \pm 0,43$  :  $P < 0,01$ ) et 23,91% et 30,34% au niveau cardiaque (DTEA :  $0,57 \pm 0,056$  et DTEM :  $0,6 \pm 0,089$  vs DNT :  $0,46 \pm 0,015$  ;  $P < 0,001$  DTEM). De même pour l'activité du couple superoxyde dismutase / catalase enzymes responsables respectivement de la réduction des anions superoxyde  $O_2^-$  et de la dismutation du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , on a noté une réduction de leur activité chez les lots diabétiques par rapport au lot témoin ( SOD hép : DNT  $273,39 \pm 4,04$  vs T  $351,78 \pm 3,98$   $P < 0,001$  ; SOD car : DNT  $6,02 \pm 0,6$  vs T  $12,80 \pm 1,2$   $P < 0,001$  ) ; (CAT hép : DNT  $79,2 \pm 0,98$  vs T  $105,08 \pm 1,2$   $P < 0,01$  ; CAT pan : DNT  $8,15 \pm 0,45$  vs T  $20,27 \pm 1,02$   $P < 0,001$  ; CAT car : DNT  $23,36 \pm 3,35$  vs T  $49,87 \pm 4,51$   $P < 0,01$  ). Le traitement des rats diabétiques par les deux extraits (EA et EM) a rétabli l'activité des deux enzymes au niveau de trois organes étudiés (foie, cœur et pancréas), (SOD hép : DTEA  $367,49 \pm 4,8$  vs DNT  $273,39 \pm 4,04$   $P < 0,001$  et DTEM  $322,28 \pm 6,23$  vs DNT  $273,39 \pm 4,04$   $P < 0,001$  et avec différence significatif entre les deux traitements (SOD car : DTEA  $8,36 \pm 0,5$  vs DNT  $6,02 \pm 0,6$   $P > 0,05$  et DTEM  $7,98 \pm 0,09$  vs DNT  $6,02 \pm 0,6$   $P > 0,05$ ) et (CAT hép : DTEA  $85,9 \pm 2,3$  vs DNT  $79,2 \pm 0,98$   $P > 0,05$  et DTEM  $90,3 \pm 1,3$  vs DNT  $79,2 \pm 0,98$   $P < 0,01$  ; CAT pan : DTEA  $16,31 \pm 0,89$  vs DNT  $8,15 \pm 0,45$   $P < 0,001$  et DTEM  $12,23 \pm 1,03$  vs DNT  $8,15 \pm 0,45$   $P < 0,001$  ; CAT car : DTEA  $40,97 \pm 2,04$  vs DNT  $23,36 \pm 3,35$   $P < 0,001$  et DTEM  $32,5 \pm 1,03$  vs DNT  $23,36 \pm 3,35$   $P < 0,01$ ).

Concernant l'activité enzymatique de la glutathion- s- transférase, nos résultats ont montré une réduction très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de son activité hépatique (-72,24%) chez les rats diabétiques par rapport aux rats du groupe normal contrôlé. Cette diminution apparaît qu'elle soit contractée par la supplémentation en EA (+173,15 %) et en EM (+170,09 %) par rapport au lot diabétique ( $p < 0.01$ ) et ( $p < 0.05$ ) respectivement. Au niveau pancréatique, on note une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique du GsT chez les rats DNT (-46,28 %) par rapport aux rats du lot témoin. Le traitement des rats diabétiques a significativement ( $p < 0.001$ ) restauré l'activité enzymatique de GST (+81,12%) pour l'EA contre (+75,51 %) pour l'EM. Au niveau du cœur, une légère diminution non significative ( $p > 0.05$ ) de l'activité du GST a été notée chez les rats diabétiques (-28,31 %) en comparant au groupe normal contrôlé. Le traitement des rats diabétiques par les deux extraits (EA et EM) était sans effet significatif ( $p > 0.05$ ).

### e).3. Biomarqueur de stress oxydant et la capacité antioxydante (FRAP) :

Les résultats de l'effet des extraits (EA et EM) de *Cistanche tinctoria* sur les biomarqueur de stress oxydant (MDA et  $O_2^-$ ) et sur la capacité antioxydante total (FRAP) sont reportés dans le Tableau 16.

**Tableau 16 :** Effet des extraits sur les concentrations plasmatique et tissulaire (foie, pancréas et cœur) de malondialdéhyde (MDA), les concentrations plasmatique et hépatique de l'anion superoxide et la capacité antioxydante (FRAP) au niveau plasmatique et hépatique chez les groupes expérimentaux.

Groupe	Témoin	DNT	DTEA	DTEM
<b>Expérimentaux</b>				
<b>MDA (plasma)</b> (nmol/ml)	4,33±0,399	8,61 ±0,618*	5,87 ± 0,655 #	5,64 ±0,577#
<b>MDA (hépatique)</b> (nmol/mg de protéine)	55,0± 1,03	113,01±1,12*	56,12±0,94#	112±1,23*.a
<b>MDA (pancréatique)</b> (nmol/g du tissu)	33,37±3,68	75,88±1,89***	55,9±1,97***.#	63,4±2,01***
<b>MDA (cardiaque)</b> (nmol/mg de protéine)	21,46±5,92	30,40±3,45	25,00±2,75	22,11±3,9
<b>l'anion superoxide</b>				
<b>(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (plasma)</b> nmol/min/ml	82,96±2,09	110,19±1,56**	85,23±1,23##	89,13±0,98##
<b>l'anion superoxide</b>				
<b>(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (foie)</b> nmol/min/mg de protéine	10,72±2,39	29,07±1,54**	11,84±2,08#	19,47±1,04
<b>FRAP (plasma)</b> µmole				
	350,27±2,09	189,89±3,12***	289.32±2,75###	259.18±1,56###
<b>FRAP (foie)</b> µmole/mg de protéine				
	11,86±0,69	5,77±0,44***	9,51±0,86#	9.11±1,48#

Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.

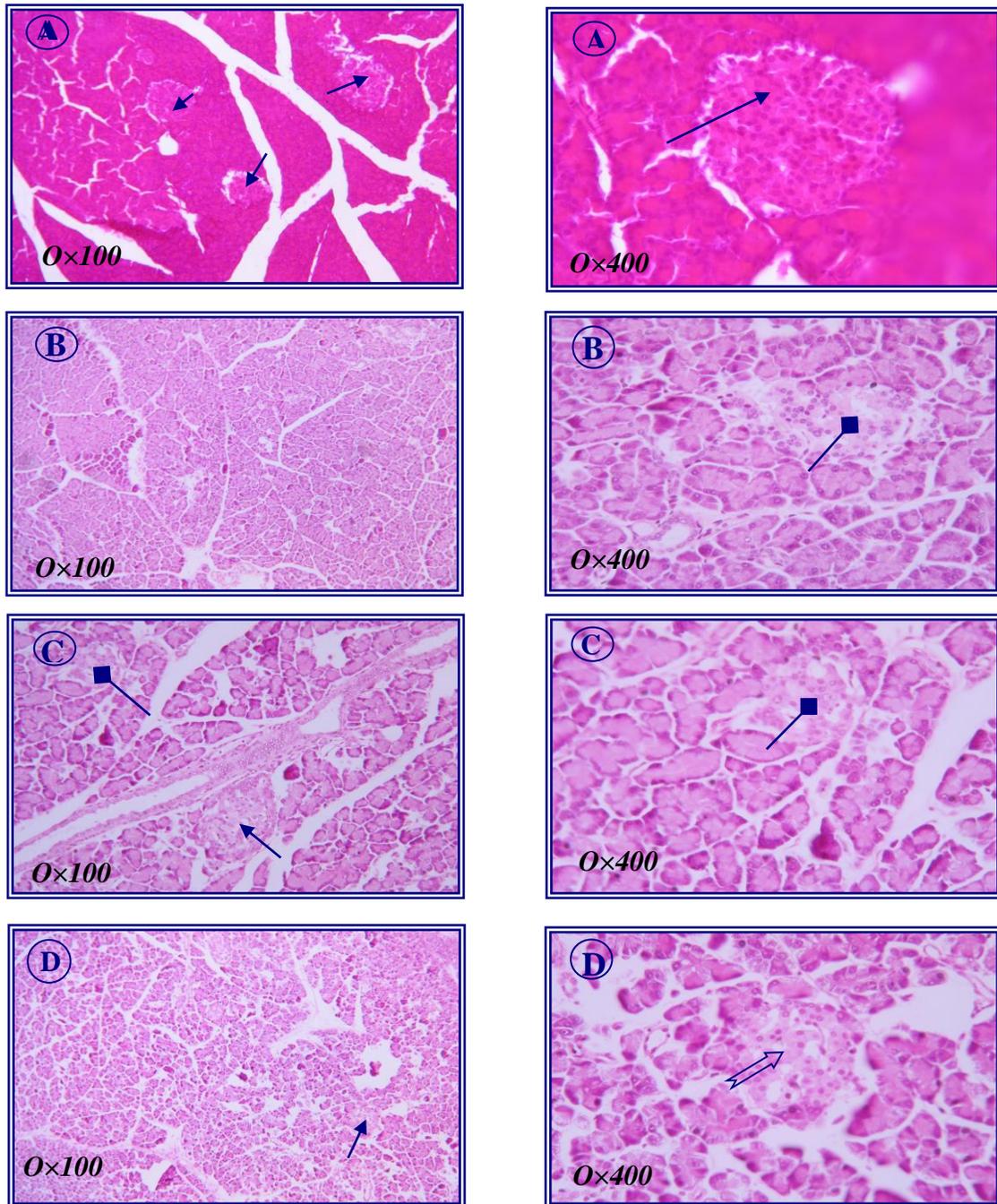
Nous avons constaté une élévation remarquable de la peroxydation lipidique était évidente dans le plasma (+98,84%), le foie (+105,47 %), le pancréas (+127,83%) et le cœur (+41.65%) chez les rats diabétiques par rapport au groupe témoin normal . Le traitement des rats diabétiques avec

l'EA et l'EM à raison de 200mg /kg a significativement baissé le taux de l'MDA plasmatique (31,82 % et 34,49%) ( $p < 0,05$ ), au niveau hépatique le traitement des rats diabétiques par l'EA a réduit significativement l'MDA (-50,37%) ( $p < 0,05$ ), tendance que le traitement des rats diabétiques avec l'EM n'a pas d'effet significatif contre la peroxydation lipidique hépatique ( $p > 0,05$ ). Au niveau pancréatique on note une diminution significative chez le lot traité par l'EA (-26,33%,  $p < 0,05$ ) et une légère diminution non significative chez le lot traité par l'EM (16,44%,  $p > 0,05$ ) en comparaison au groupe diabétique non traité. Le traitement des rats diabétiques avec les deux extraits et sans effets au niveau cardiaque (Tableau 16).

Concernant l'anion superoxide ( $O_2^-$ ) nos résultats indiquent une augmentation hautement significative ( $p < 0.01$ ) de sa production au niveau plasmatique et hépatique chez les rats recevant la STZ et non traités (plasm  $110,19 \pm 1,56$  nmol/min ; hépa  $29,07 \pm 1,54$  nmol/min/mg de P) par rapport au groupe témoin normal (plasm  $82,96 \pm 2.09$  nmol/min ; hépa  $10,72 \pm 2,39$  nmol/min/mg de P). Par ailleurs, le traitement des rats diabétiques avec les deux extraits a réduit significativement cette production (leurs valeurs respectives  $85,23 \pm 1,23$  nmol/min et  $85,23 \pm 1,23$  nmol/min au niveau plsmatique ;  $11,84 \pm 2,08$  nmol/min/mg de protéines et  $19,47 \pm 1,04$  nmol/min/mg de P au niveau hépatique) n'ont aucune différence significative avec celle obtenue avec le témoin normal). Ce résultat explique probablement la protection des animaux par les flavonoïdes contre le stress oxydatif.

Les résultats de la capacité antioxydante totale montrent une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) dans leur concentration plasmatique (-45,78 %) et hépatique (-51,43%) chez le lot diabétique non traité en comparaison avec le lot témoin. Le traitement des rats diabétiques avec les deux extraits à rétabli significativement la capacité antioxydante totale dans les deux comportements étudiés (Tableau 16).

**f). Etude histologique :** L'observation microscopique du pancréas montre une diminution du nombre des ilots de langerhans par champ microscopique chez le rat DNT par rapport au témoin. Le traitement avec les deux extraits (EA, EM) à une dose de 200mg/kg pendant 21 jours a protégé les ilots de langerhans contre les radicaux libres gébérés par la STZ chez les deux groupes traités (Figure 47).



**Figure.47.** Coupes histologiques de pancréas du rat témoin (A) ; diabétique non traité (B); diabétique traité avec l'EM (C) ; diabétique traité avec l'EA (D).

➔ : îlots de Langerhans      ■ : îlots de Langerhans difformé (Zone de nécrose)  
⇔ : Protection partielle des îlots de Langerhans

### III.1.2.4. Evaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique :

#### a). Étude pondérale :

Les variations pondérales des rattes gestantes chez les lots témoins (TG), témoins traités (TGEA et TGEM), diabétiques (DG) et diabétiques traités avec les extraits aqueux et méthanolique (DGEA, DGEM) sont rassemblées dans le Tableau 17 et les Figures 48,49 et 50.

#### a).1. Évolution du poids corporel chez les rattes gestantes :

Au cours de l'expérimentation, le poids corporel des rattes (exprimé en grammes) des nos lots (TG, TGEA, TGEM, DG, DGEA et DGEM) a été pris quotidiennement et présenté au jour 0, au jour 7, au jour 14 et au jour 20 de la gestation. Le gain pondéral a été calculé au jour gestationnel 20 (Tableau 17, Figure 48).

**Tableau 17 :** Variation du poids corporel aux jours gestationnels 0, 7, 14 et 20 chez les rattes témoins (TG), témoins traitées (TGEA et TGEM), les rattes diabétiques (DG) et les rattes diabétiques traitées avec les deux extraits (DGEA et DGEM).

Groups	0	7	14	20	Gaine de poids corporel entre j0 et j20 (g)
TG	210.30 ± 3.74	219.28 ± 4.04	243.04 ± 4.13	272.88 ± 4.87	62.58±4.45
TGEA	216.20 ± 5.86	232.30 ± 6.29	253.40 ± 6.35	303.78 ± 9.05	87.58±9.83
TGEM	209.40 ± 2.19	219.26 ± 2.14	232.20 ± 5.27	249.31 ± 4.06	39.91±4.13
DG	215.97 ± 2.96	209.91 ± 4.73	211.17 ± 7.45	231.72 ± 9.13**	15.73±7.12**
DGEA	214.75 ± 4.28	212.30 ± 4.45	228.73 ± 6.15	240.46 ± 9.31	25.79±7.21
DGEM	210.93 ± 5.05	209.14 ± .25	219.23 ± 7.60	233.19 ± 9.80**	21.3±10.8**

Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), \*\*P < 0.01 comparaison avec le groupe témoin sain.

Au 1<sup>er</sup> jour de la gestation, la prise du poids n'a montré aucune différence significative chez les rattes diabétiques (D), les rattes diabétiques traitées et les rattes non diabétiques traitées par les deux extraits (EA et EM) par rapport aux rats témoins (TG) (DG : 215.97 ± 2.96 et DGEA : 214.75 ± 4.28, DGEM : 210.93 ± 5.05; TGEA : 216.20 ± 5.86 et TGEM : 209.40 ± 2.19 vs T : 206,4 ± 6,24).

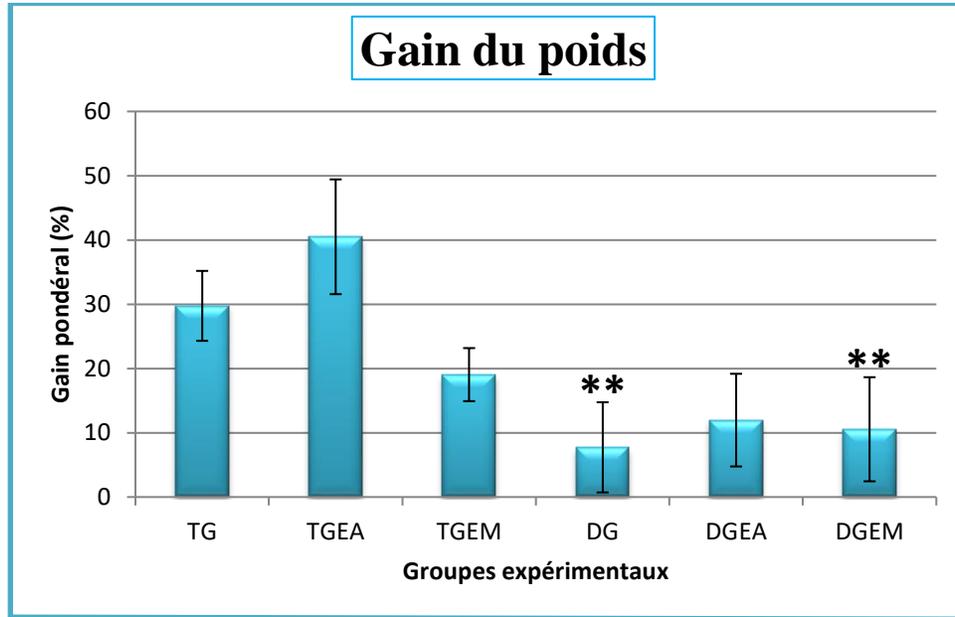
Au 7<sup>ème</sup> jour, les résultats ont montré une augmentation pondérale n'étant pas statistiquement significative chez les lots : Témoin et les témoins traités par EA et EM, par rapport au lot D (TG : 219.28 ± 4.04 ; TGEA : 232.30 ± 6.29 et TGEM : 219.26 ± 2.14 vs DG: 209.91 ± 4.73) et avec un gain de poids de l'ordre de 8.98±2.28, 16.10±4.62 et 9.85±1.06 pour les rattes témoins et témoins traitées par l'extrait aqueux et méthanolique respectivement et on note une diminution non significative chez les lots diabétiques. Le traitement oral des rattes diabétiques par les deux extraits

n'a pas augmenté la moyenne pondérale par rapport aux contrôles, chez les diabétiques traitées par l'extrait aqueux a augmenté davantage au-delà du seuil des rattes diabétiques non traitées en étant non significatif.

Au 14<sup>ème</sup> jour, la prise du poids a montré une augmentation non significative chez le lot T par rapport au lot D (TG :  $243.04 \pm 4.13$  vs DG :  $211.17 \pm 7.45$ ). En revanche, la progression du traitement jusqu'à ce stade avancé a rétabli sensiblement le poids dans le lot DGEA par rapport au lot DG sans que cette augmentation ne soit significative (DGEA :  $228.73 \pm 6.15$  vs DG :  $211.17 \pm 7.45$ ). Cette augmentation pondérale non significative chez les rattes diabétiques traitées par l'extrait aqueux s'est avérée si considérable qu'elle installe la moyenne au dessous du seuil pondéral caractérisant le lot TG (Tableau 17).

Au 20<sup>ème</sup> jour, la prise du poids a montré une augmentation hautement significative chez le lot TG par rapport aux lots DG et DGEM et non significatif chez le lot diabétique traité par l'EA (DG :  $243.04 \pm 4.13$ , DGEA :  $240.46 \pm 9.31$  et DGEM :  $233.19 \pm 9.80$  vs TG :  $272.88 \pm 4.87$ ). En revanche, la progression du traitement jusqu'à ce stade avancé a rétabli sensiblement le poids dans le lot DGEA par rapport au lot DG sans que cette augmentation ne soit significative (Tableau 17).

À la fin de l'expérimentation, le calcul du gain pondéral (exprimé en %) a montré que la moyenne de gain de poids corporel chez les rattes gestantes diabétiques est significativement plus faible (7.74%) par rapport aux lots témoins (29.75%) et témoins traités (EA : 40.50% et EM : 19.05%). Cependant, le gain de poids a été rétabli de manière non significative (11.97%) chez les rattes gestante diabétiques traitées avec une dose quotidienne de 200mg/kg d'extrait aqueux ( $P > 0,05$ ), bien que le gain de poids était encore nettement inférieur à celui des témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 48).

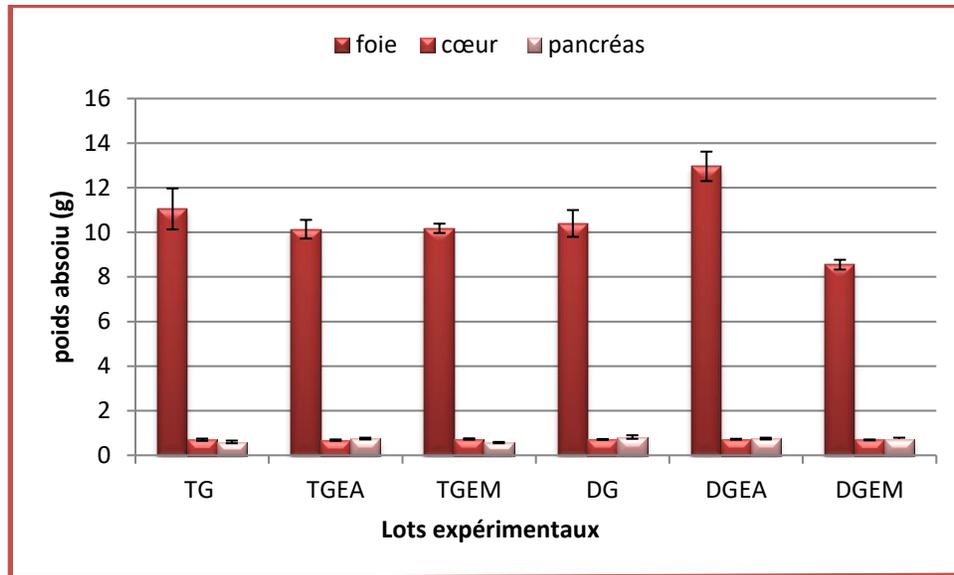


**Figure 48.** Variation du gain pondéral en pourcentage chez les rattes gestantes témoins non traitées (TG) et traitées (TGEA et TGEM) et les rattes gestantes diabétiques non traitées DG et diabétiques traitées avec les deux extraits. Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), \*\*P < 0.01 comparaison avec le groupe témoin sain.

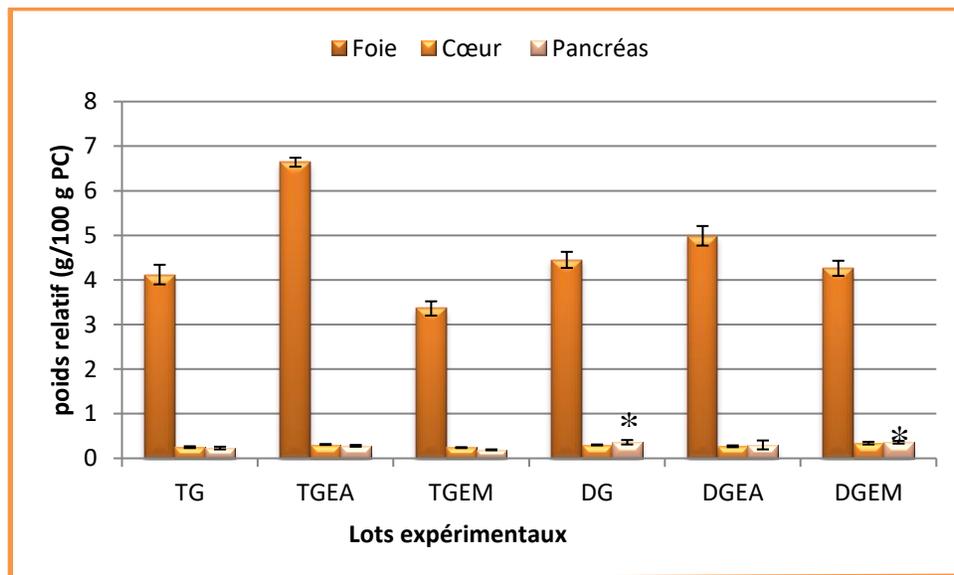
#### a).2. Variation du poids absolu et relatif des organes maternels :

Après dissection, la prise du poids absolu (exprimé en grammes) et relatif (exprimé en gramme d'organe par cent gramme de poids corporel) du foie et cœurs a indiqué qu'il n'existe pas une différence entre les lots expérimentaux (Figures 49 et 50).

Concernant le poids du pancréas (exprimé en grammes), nos résultats ont indiqué une augmentation non significative chez les lots DG, DGEA et DGEM par rapport au lot TG (DG :  $0.82 \pm 0.08$ , DGEA :  $0.78 \pm 0.04$  et DGEM :  $0.74 \pm 0.05$  vs T :  $0,60 \pm 0,06$ ). Cependant, l'effet du traitement, bien qu'il ne soit pas significatif, a atténué remarquablement le poids pancréatique absolu (DGEA :  $0.78 \pm 0.04$  et DGEM :  $0.74 \pm 0.05$  vs DG :  $0.82 \pm 0.08$ ). Parallèlement, le poids relatif du pancréas (exprimé en g/100gPC) était élevé significativement chez le lot DG en comparaison avec le lot TG (DG :  $0.36 \pm 0.05$  vs TG :  $0.23 \pm 0.03$ ). En revanche, l'administration par voie orale de l'extrait aqueux de *Cistanche tinctoria* a rétabli légèrement cette augmentation (DGEA :  $0,30 \pm 0,1$  vs T :  $0.23 \pm 0.03$ ). (Figures 49 et 50).



**Figure 49.** Variation du poids absolu en grammes du foie, cœur et pancréas chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées. Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM).



**Figure 50.** Variation du poids relatif en grammes par cent gramme du poids corporel du foie, cœur et pancréas chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées. Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM) \*P < 0.05 comparaison avec le groupe témoin sain.

**b). Etudes biochimiques:**

Les variations des paramètres biochimiques des rattes gestantes chez les lots témoin (T), témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées sont rassemblées dans les Tableaux 18, 19, et les Figures 51, 52, 53 et 54.

**b).1. Évolution glycémique chez les rattes gestantes**

Au cours de la phase gestationnelle, la glycémie maternelle (exprimée en mg/dl) a été mesurée en quatre temps évolutifs et précis en accord avec la chronologie développementale de leur progéniture, à savoir au 0<sup>er</sup> jour correspondant au développement péri-implantatoire, au 7<sup>ème</sup> jour correspondant au développement embryonnaire, au 14<sup>ème</sup> jour correspondant au développement organogénique et au 20<sup>ème</sup> jour correspondant au développement fœtal avancé (1 jours avant la mise en bas).

Le prélèvement au 0<sup>er</sup> jour a montré une augmentation très hautement significative de la concentration du glucose chez les rattes diabétiques (+227.14%) et les rattes diabétiques traitées avec l'extrait aqueux et méthanolique (292.08% et 352.78% respectivement) par rapport aux rattes témoins (DG : 323.1 ±42.3 ; DGEA : 335.9 ±24.9 et DGEM : 387.9 ±14.8 vs T : 85.67 ±1.86 ). La mise en route du traitement par les deux extraits au même jour n'a pas fait l'objet d'une atténuation significative de l'hyperglycémie (Tableau 18).

Par ailleurs, le prélèvement au 7<sup>ème</sup> jour a montré une augmentation glycémique très hautement significative chez le lot diabétique et hautement significative chez les lots diabétiques traités par rapport au lot témoin (D : 310.6±34.4 ; DGEA : 262.9±53.3 et DGEM : 272.0±30.9 vs T : 1,10 ± 0,05). Concernant les lots témoins traités par les deux extraits on note une légère augmentation statistiquement non significative par rapport au lot témoin non traité (TGEA : 114.00±4.38 et TGEM : 113.00±6.15 vs TG : 97.17±5.08). Cependant, la progression mi-gestationnelle du traitement a atténué l'hyperglycémie à (-7.71%) pour l'extrait aqueux et (-28.87%) pour l'extrait méthanolique par rapport au jour 0, mais qui persistait quand même comparativement au taux glucidique caractérisant les rattes du contrôle (Tableau 18).

En outre, le prélèvement au 14<sup>ème</sup> jour a montré une hyperglycémie très hautement significative chez le lot diabétique par rapport au lot témoin (DG : 360.7±31.0 vs TG : 87.33±5). En l'occurrence, le traitement des rattes diabétiques avec les deux extraits aqueux et méthanolique de *Cistanche tinctoria* à dose de 200 mg/kg a rétabli d'une manière très hautement significativement la glycémie (DGEA : 105.57±9.14, DGEM : 175.5±36.0 vs DG : 360.7±31.0).

Au 20<sup>ème</sup> jour, nos résultats ont montré une hyperglycémie significative chez le lot diabétique non traité par rapport au lot témoin. En revanche, le traitement des rats diabétiques par l'EA a normalisé significativement la glycémie, si elle est comparée avec le groupe DG, la glycémie est réduite à - 67.37 par rapport au jour 0. D'autre part le traitement des rattes par l'EM provoque une diminution hautement significative de la concentration du glucose, qui est réduite à - 59.07% par rapport au lot DG et elle est aussi hautement significative par rapport à la concentration initiale qui passe de 387.9 ±14.8 à 148.2±23.4 (-61.79%). Mais elle reste remarquablement élevée que celle du contrôle quoiqu'elle soit plus tendancieuse d'une normalisation tardive (Tableau 18).

**Tableau 18 :** Variation de la glycémie en mg/dl aux jours gestationnels 0, 7,14 et 20 chez les rattes témoins, témoins traitées , diabétiques et diabétiques traitées.

Groupes <sup>1</sup>	0j	7 <sup>ème</sup> j	14 <sup>ème</sup> j	20 <sup>ème</sup> j
TG	85.67 ±1.86	97.17±5.08	87.33±5	89.67±8.01
TGEA	96.00 ±7.29	114.00±4.38	84.00±2.79	96±10.1
TGEM	94.50 ±5.56	113.00±6.15	85.25±2.66	95.5±5.52
DG	323.1 ±42.3***	310.6±34.4***	360.7±31.0***	361.7±28.8***
DGEA	335.9 ±24.9***	262.9±53.3*	105.57±9.14### a,]	109.6±11.1###a
DGEM	387.9 ±14.8***	272.0±30.9* <sup>a</sup>	175.5±36.0####a	148.2±23.4## <sup>a</sup>

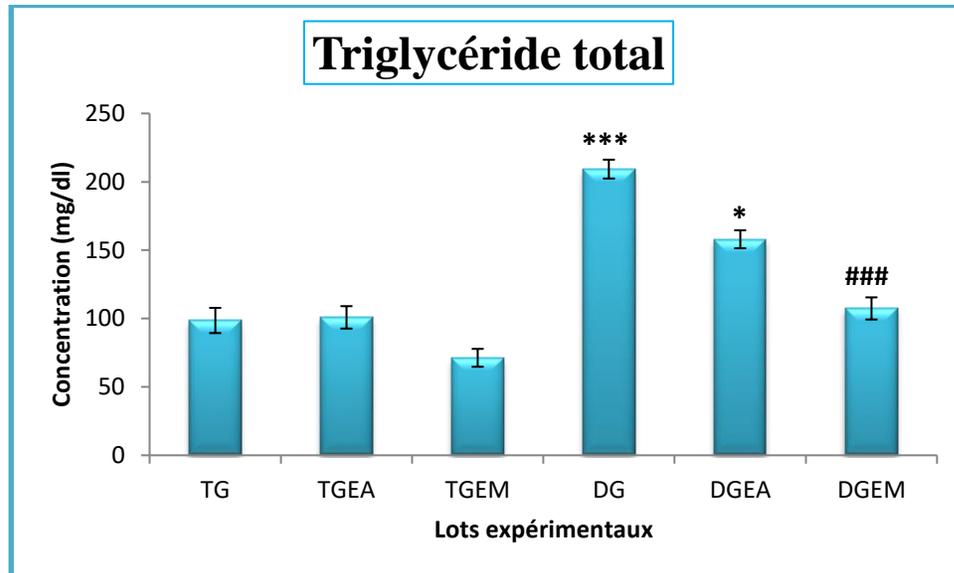
Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), ## P < 0.01, ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité;\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain : <sup>a</sup> p ≤ 0,01 vs j0.

**b).2. Profile lipidique chez la ratte gestante (lipides totaux, triglycérides, cholestérol et HDL-C) :**

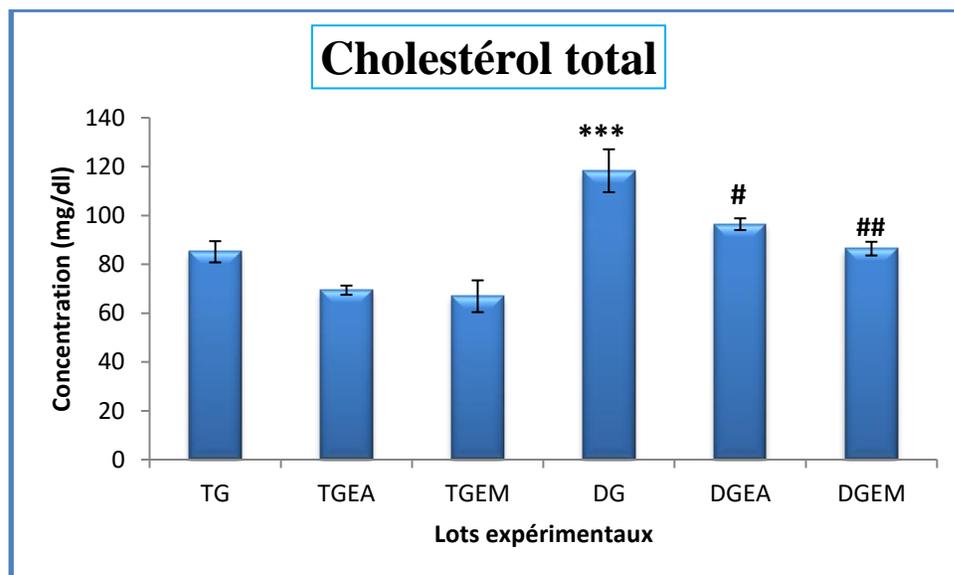
Nos résultats montrent un accroissement très hautement significatif de la concentration plasmatique en triglycérides chez les animaux diabétiques non traités et hautement significatif chez les rattes gestantes traitées avec l'extrait aqueux de *Cistanche tinctoria* comparativement aux animaux du contrôle (DG : 209.3±16.9; DGEA : 158±16.6 vs TG : 98.61±9.22), on note aussi une diminution non significative chez le lot témoin traité avec l'extrait méthanoïque par rapport au lot témoin sain (Figure 51). Le traitement des rattes gestantes diabétiques par les deux extraits entraîne une diminution non significatif pour l'extrait aqueux (-24.51%) et très hautement significative et presque comparable au témoin non traité pour l'extrait méthanoïque (-48.86%) (Figure 51).

La teneur plasmatique en cholestérol augmente très significativement chez les rattes diabétiques par rapport aux rattes témoins (DG : 118.3±8.78vs TG : 85.11±4.35). En effet, le traitement des rattes diabétiques par les deux extraits rétablis significativement cette augmentation par rapport aux diabétiques. Concernant les deux lots non diabétiques traités avec l'EA et l'EM on note une diminution statistiquement non significative dans la concentration plasmatique de cholestérol par rapport au lot témoin non traité (Figure 52).

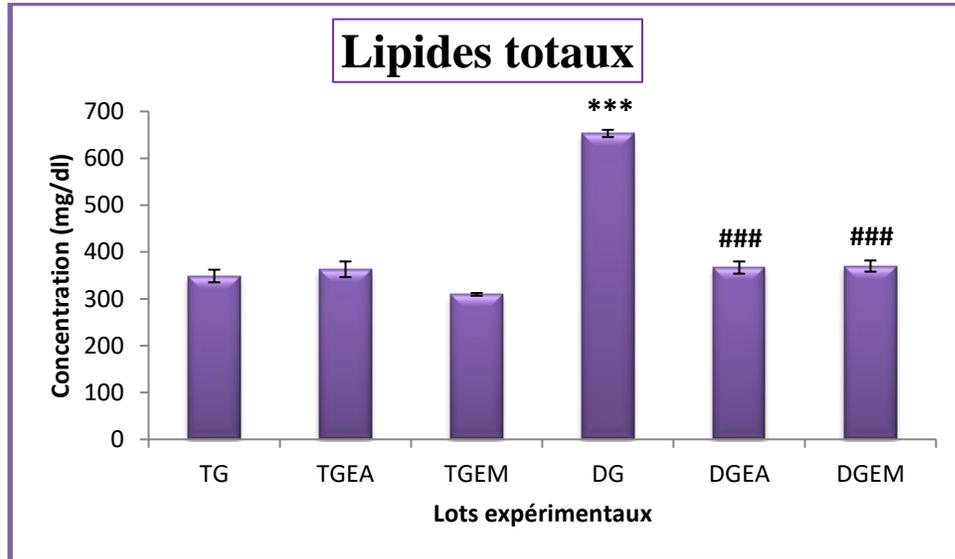
L'interprétation des résultats démontre une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) dans la concentration plasmatiques des lipides totaux (+87.26 %) et une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de la concentration plasmatiques de HDL-C (- 43.89%) chez le groupe diabétique non traité (DG) comparant au groupe témoin sain (TG). Le traitement des rattes diabétiques par les deux extraits a abaissé significativement la concentration des lipides totaux (-43.82 % pour l'EA et -43.33% pour l'EM) par rapport au lot diabétique non traité. Par contre on note une augmentation significative chez les lots diabétiques traités en HDL-C par rapports aux lots diabétiques non traités (Figure 53 et 54).



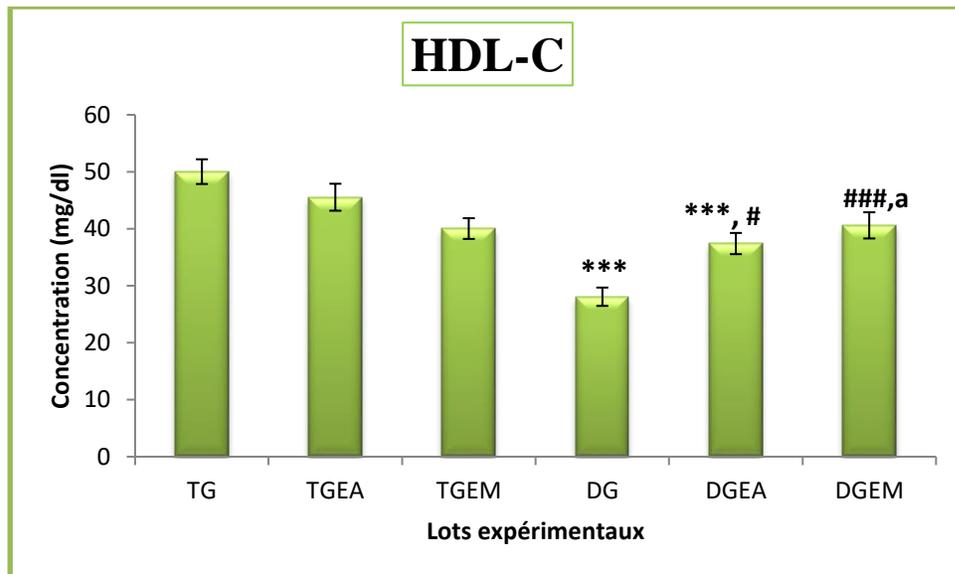
**Figure 51.** Variation de concentrations plasmatiques en mg/dl des triglycérides, chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées avec les deux extrais (EA, EM). Les résultats sont exprimés en: (M  $\pm$ SEM), ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.



**Figure 52.** Variation de concentrations plasmatiques en mg/dl du cholestérol total, chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées avec les deux extrais (EA, EM) Les résultats sont exprimés en: (M  $\pm$ SEM), # P < 0.05, ## P < 0.01 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.



**Figure 53.** Variation de concentrations plasmatiques des lipides totaux, chez les rattes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées pendant la période de la gestation avec les deux extrais (EA, EM). Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.



**Figure 54 :** Variation de concentrations plasmatiques en HDL-C, chez les rattes gestantes témoins, diabétiques, témoins traitées et diabétiques traitées avec les deux extrais (EA, EM) Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), # P < 0.05, ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain. <sup>a</sup>p ≤ 0,05 EA vs EM ).

**b).3. Profil protéique chez la ratte gestante (protéines totales et albumine) :**

Le Tableau 19 montre une très légère diminution non significative ( $p \geq 0.05$ ) dans les concentrations plasmatiques d'albumine et des protéines totales chez les rattes diabétiques par rapport aux lots témoins (sain et traité avec les deux extraits aqueux et méthanolique). En revanche, le traitement des rattes diabétiques par les deux extraits (l'EA et l'EM) a provoqué une légère augmentation non significative par rapport au diabétiques non traitées, par conséquent il n'existe pas une différence significative entre les deux traitements.

**Tableau 19 :** Variation de la concentration plasmatique en Albumine et en Protéines totales chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, DG et diabétiques traitées avec l'EA et l'EM.

Groupes	Albumine	Protéines totales
	(mg/dl)	(mg/dl)
<b>TG</b>	3,58±0,17	7,96±0,88
<b>TGEA</b>	3,50±0,26	7,68±0,23
<b>TGEM</b>	3,56±0,30	7,46±0,12
<b>DG</b>	3,27±0,12	7,54±0,51
<b>DGEA</b>	3,57±0,27	7,86±0,38
<b>DGEM</b>	3,58±0,10	8,15±0,18

Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM).

**b). 4. Bilan rénal et hépatique chez la ratte gestante**

La variation des paramètres biochimiques concerne l'effet de la STZ et les deux extraits (EA et EM) sur les reins et le foie pour les lots expérimentaux sont énumérés dans le Tableau 20

**Tableau 20 :** Variation de la concentration plasmatique en Urée, en créatinine, en ASAT et en ALAT pour les lots témoin, DG, témoin traité et diabétique traitées par l'EA et l'EM pendant la période de la gestation

Groupes	Rénal		Hépatique	
	Urée (mg/dl)	Créatinine (mg/dl)	ASAT (U/l)	ALAT (U/l)
<b>TG</b>	23.07±1.30	0.83±0.15	102,50±2,47	35,73±2,63
<b>TGEA</b>	19.88±1.35	0.78±0.15	110,25±4,46	30,84±3,70
<b>TGEM</b>	30.08±1.05	0.96±0.67	92,50± 5,20	27,13±1,25
<b>DG</b>	66.38±6.39***	3.50±0.34***	398,3±13,6***	90,13±4,37***
<b>DGEA</b>	29.62±2.06###	1.60±0.49##	108,85±4,51###	54,25±5,95###
<b>DGEM</b>	47.71±1.86	1.18±0.2###	109,50±6,25###	70,00±7,83***

Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM), ## P < 0.01, ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative du taux plasmatique en urée et créatinine chez les rattes gestantes diabétiques non traitées par rapport au groupe témoin. En revanche l'administration de l'extrait aqueux chez les rattes gestantes diabétiques (DGEA) a provoqué une diminution très hautement significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration plasmatique d'urée (-55,37%) et hautement significatif ( $p < 0,01$ ) de la concentration plasmatique de créatinine par rapport aux rattes diabétiques (DG), Tandis qu'on enregistre chez les rattes gestantes diabétiques traitées par l'extrait méthanolique une diminution non significative de la concentration plasmatique d'urée (-28.12%) et très hautement significatif de créatinine (-66.28%) par rapport aux rattes gestantes diabétiques (DG) (tableau 20). Chez le groupe des rattes saines traitées, on a également constaté que l'administration journalière de la même dose de l'extrait méthanolique de *Cistanche tinctoria* provoquait une augmentation non significative de la concentration plasmatique de l'urée et de la créatinine.

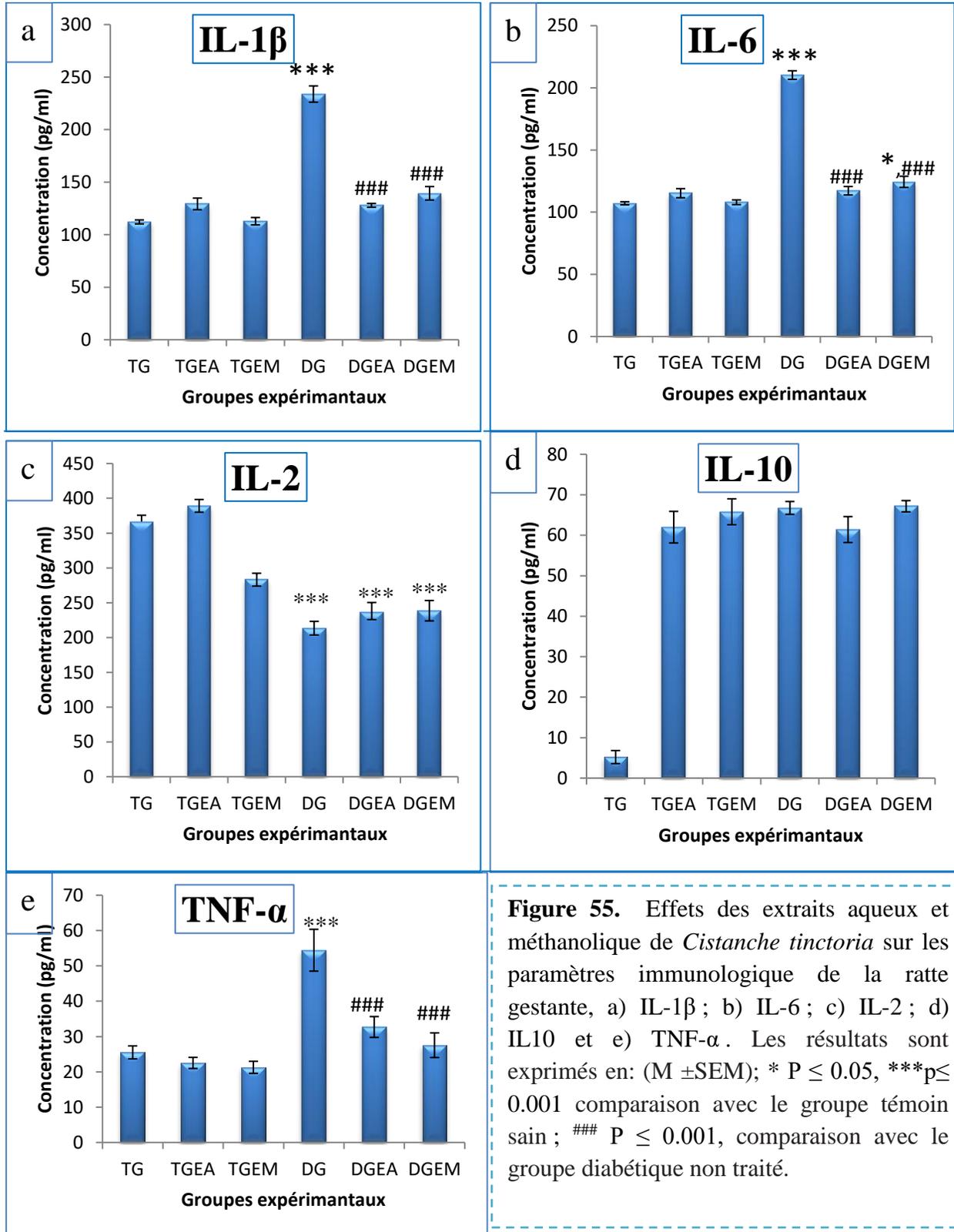
Concernant les biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique, nos résultats révèlent une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique des transaminases, l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) chez les rattes gestantes diabétiques par rapport aux rattes témoins. Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution très hautement significative de l'activité de l'ASAT et l'ALAT chez les rattes gestantes traitées par l'extrait aqueux par rapport aux rattes gestantes diabétiques non traitées. Chez les rattes diabétiques gestantes traitées par l'extrait méthanolique, on note une différence très hautement significative de l'activité de l'ASAT et non significative de l'activité de l'ALAT par rapport aux rattes diabétiques non traitées (Tableau 20).

#### **b).5. Profile inflammatoire :**

La concentration plasmatique en cytokine est représentée dans la Figure 55(a, b, c, d et e) : les paramètres pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 et TNF- $\alpha$ ) et le facteur de croissance de cellules T (IL-2) ont été évalués chez les rattes gestantes témoins (TG, TGEA et TGEM) et diabétiques (DG, DGEA et DGEM). Nos résultats montrent un accroissement très hautement significatif de la concentration plasmatique d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , chez les rattes gestantes diabétiques en comparaison avec les témoins (IL-1 $\beta$  : DG 233,89 $\pm$ 7.72 vs TG : 112,16 $\pm$ 1.91)(IL-6 : DG :210,25  $\pm$ 3,45 vs TG : 107,16  $\pm$ 1,23)(TNF- $\alpha$  : DG : 54,43 $\pm$  5,92 vs TG. 25,50 $\pm$ 1,84). En revanche le traitement des rattes gestantes diabétiques avec les extraits (aqueux et méthanolique) à dose de 200mg/kg pendant 20 jours, entraine une amélioration dans le profil pro inflammatoire

avec une diminution très hautement significative pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, et le TNF- $\alpha$ . Les résultats de la concentration plasmatique d'IL-10 ne montrent aucune différence entre les groupes expérimentaux.

À propos du niveau plasmatique d'IL-2 on note une réduction très hautement significativement chez les rattes gestantes diabétiques non traitées et traitées avec les deux extraits par rapport à celles des contrôles ( DG : 212.8 $\pm$ 10.4, DGEA : 236.2 $\pm$ 14.1 ; DGEM : 238.0 $\pm$ 15.2 vs TG : 366.66 $\pm$ 9.01).



**Figure 55.** Effets des extraits aqueux et méthanolique de *Cistanche tinctoria* sur les paramètres immunologique de la ratte gestante, a) IL-1 $\beta$  ; b) IL-6 ; c) IL-2 ; d) IL10 et e) TNF- $\alpha$ . Les résultats sont exprimés en: (M  $\pm$ SEM); \* P  $\leq$  0.05, \*\*\*p $\leq$  0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; ### P  $\leq$  0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité.

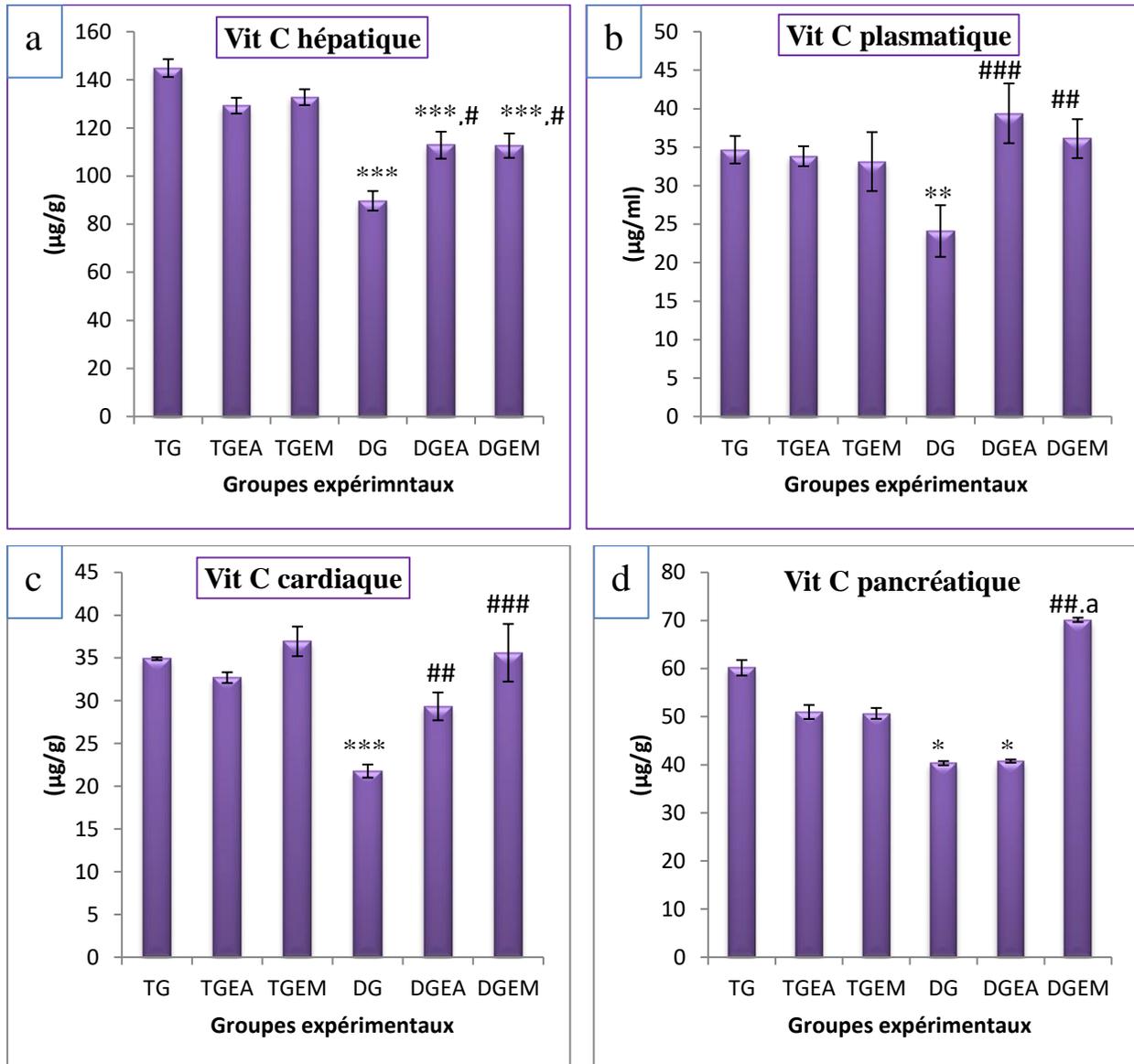
**c). le statu antioxydant maternelle :****c)1. Antioxydants non enzymatique maternelle :**

Les antioxydants non enzymatiques sont déterminés par le dosage de trois paramètres : deux antioxydants exogènes (Vit C et la Vit E) et un antioxydant endogène (GSH). Les résultats obtenus sont illustrés respectivement dans les Figures 56,57 et 58.

D'après nos résultats, la concentration hépatique de la vitamine C chez les rattes gestantes diabétiques a significativement diminuée par rapport aux témoins (DG :  $89,67 \pm 4,06$  vs TG :  $144,89 \pm 3,77$ ). De même, le traitement avec les deux extraits chez les rattes gestantes diabétiques a fait améliorer significativement cette atténuation. Toutefois, son effet ne la réduit pas au seuil des témoins (DGEA :  $112,84 \pm 5,67$ , DGEM/  $112,64 \pm 5,07$  vs T :  $144,89 \pm 3,77$ ) (Figure 56a).

Concernant la concentration plasmatique de la vitamine C, le résultat obtenu montre une diminution hautement significative chez le lot diabétique non traité par rapport au lot témoin (DG :  $24,11 \pm 3,36$  vs TG :  $34,67 \pm 1,79$ ). En effet le traitement des rattes gestantes diabétiques avec les deux extraits (EA et EM) a amélioré cette perturbation avec une augmentation très hautement significative et des valeurs similaire au témoin (DGEA :  $39,44 \pm 3,88$  ; DGEM :  $36,11 \pm 2,53$ ) (Figure 56b).

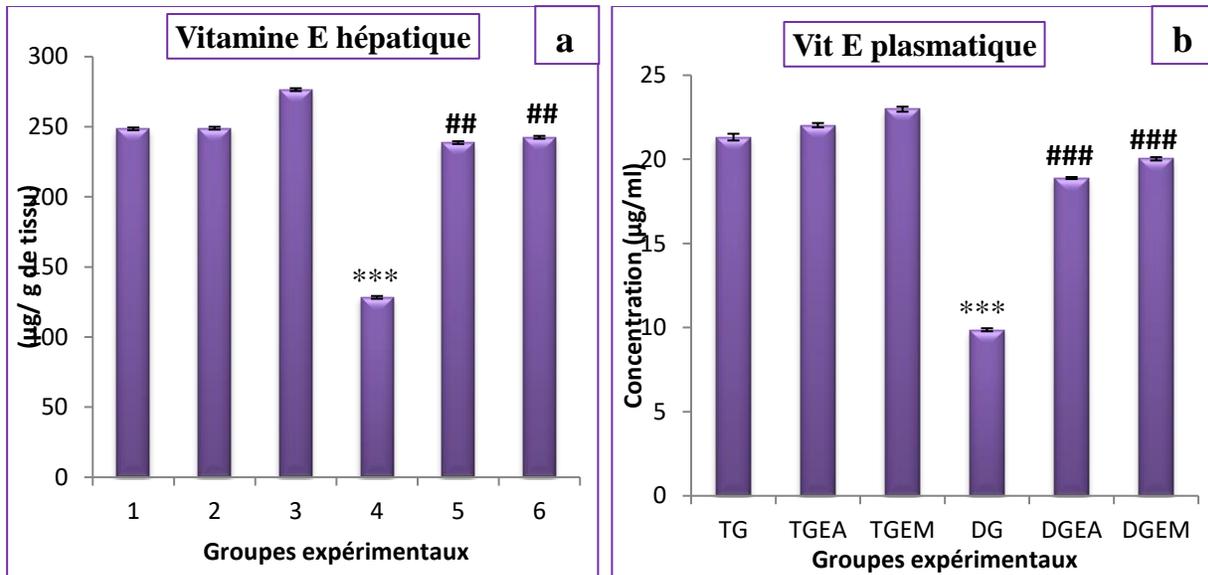
Les résultats de la concentration de la vitamine C cardiaque et pancréatique (Figure 56 c et d respectivement) révèlent une diminution très hautement significative et significative chez la ratte gestante diabétique par rapport au groupe témoin (Vit C car : DG :  $34,90 \pm 0,17$  vs TG :  $21,76 \pm 3,36$ ) ; (Vit C panc : DG :  $40,33 \pm 0,43$  vs TG :  $60,15 \pm 1,61$ ). Le traitement de la ratte gestante diabétique avec les deux extraits aqueux et méthanolique augmente significativement la concentration cardiaque de la vitamine C chez les deux lots traités par rapports au lot diabétique non traité (DGEA :  $29,33 \pm 1,63$  DGEM :  $35,60 \pm 3,37$  vs DG:  $21,76 \pm 0,77$ ). Concernant le teneur pancréatique on note une augmentation très hautement significative uniquement dans le lot traité avec l'extrait méthanolique avec une valeur supérieure à la valeur de groupe témoin (DGEM :  $70,13 \pm 0,46$  vs TG :  $60,15 \pm 1,61$ ). Il existe une différence hautement significative entre les deux traitements utilisés.



**Figure 56.** Variation de la concentration de la vitamine C chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées ; a) hépatique ; b) plasmatique ; c) cardiaque et d) pancréatique. (Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM); \* P ≤ 0.05, \*\*p≤ 0.01, \*\*\*p≤ 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; # P ≤ 0.05, ## P ≤ 0.01, ### P ≤ 0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité ; <sup>a</sup> P ≤ 0.01 EA vs EM).

D'après la figure 57 on observe une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) dans la concentration plasmatique et la teneur hépatiques en vitamine E chez le groupe diabétique non traité (DG) comparé aux groupes témoins (TG, TGEA, TGEM). En revanche, les résultats montrent que l'administration des deux extraits (EA, EM) chez les rattes gestantes diabétiques a causé une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) dans le teneur hépatique en vitamine E

(Figure 57a) et très hautement significative dans la concentration plasmatique de la vitamine E (Figure 57b) par rapport à ceux non traités (DG).

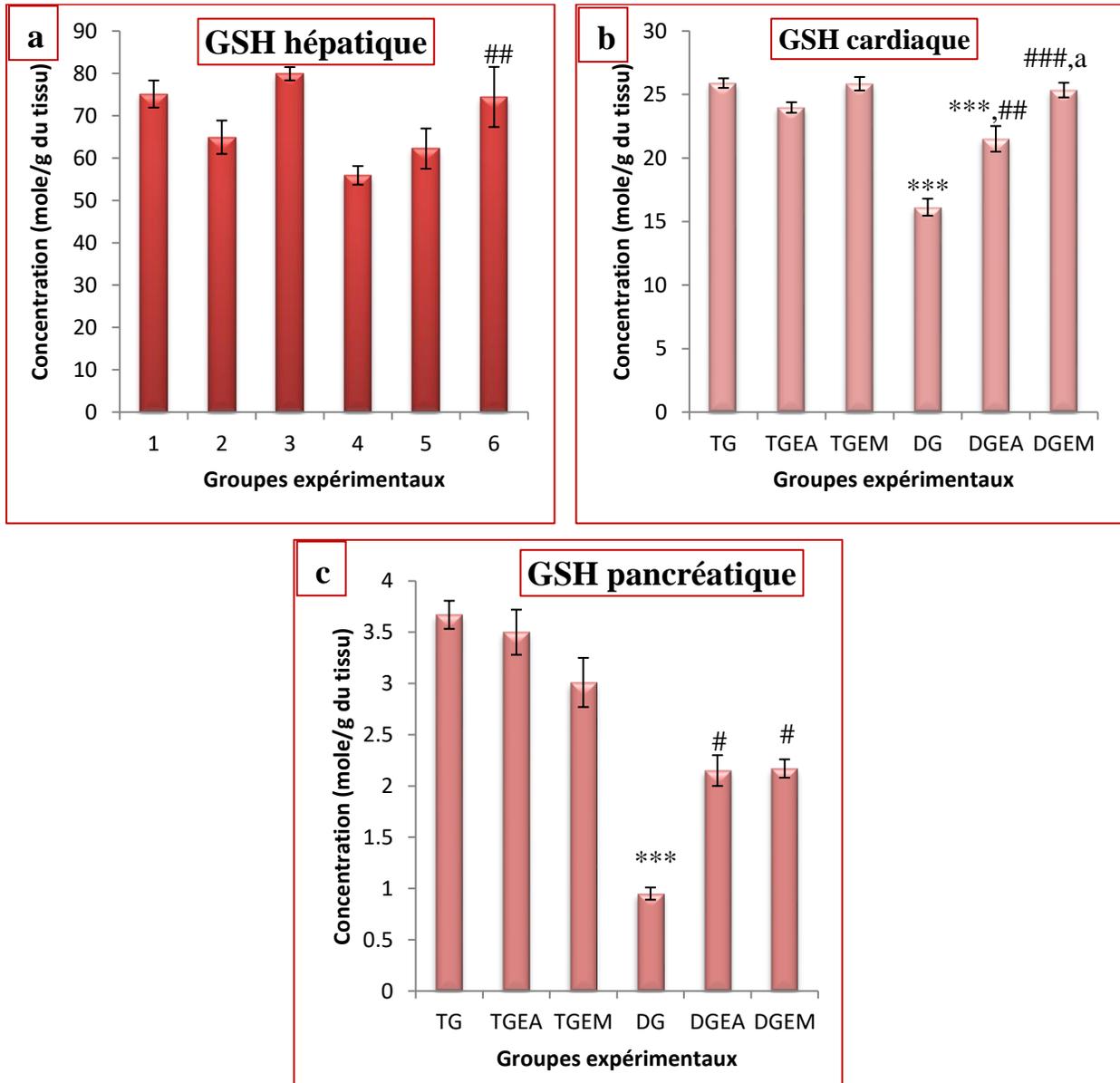


**Figure 57.** Variation de la concentration de la vitamine E chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées ; a).hépatique ; b) plasmatique. (Les résultats sont exprimés en: (M ±SEM); \*\*\*p≤ 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; ## P ≤ 0.01, ### P ≤ 0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité.).

Les résultats de l'étude de l'influence de traitement par les deux extraits aqueux et méthanolique de *Cistanche tinctoria* pendant la période de gestation sur le taux tissulaire du GSH sont rassemblés dans la figure 58.

Chez les rattes gestantes diabétiques témoins nous avons constaté une diminution très hautement significative du taux du GSH cardiaque ( $16.13 \pm 0.67$  contre  $25.90 \pm 0.38$ ) et pancréatique ( $0.95 \pm 0.06$  contre  $3.67 \pm 0.13$ ) et une diminution non significative dans la teneur hépatique en GSH ( $55.92 \pm 2.20$  contre  $75.12 \pm 3.21$ ) par rapport à celui enregistré chez les gestantes saines. Par contre chez les rattes diabétiques traitées par l'EA pendant la période de la gestation à dose de 200 mg/kg nous avons constaté une augmentation significative du taux pancréatique et cardiaque et non significative dans le taux hépatique, cette augmentation et de l'ordre de 11,26% dans le foie, de 33,35% dans le cœur et de 126,31% dans le pancréas. En effet, le taux hépatique en GSH reste inférieur à celui de rattes saines témoins ( $62,22 \pm 4,75$  contre  $75,12 \pm 3,21$ ).

D'autre part, chez les rattes gestantes traitées par l'EM nous avons constaté également qu'un traitement de 20 jours provoquait une augmentation significative de la concentration hépatique ( $p \leq 0.01$ ), cardiaque ( $p \leq 0.001$ ) et pancréatique ( $p \leq 0,05$ ) en GSH par rapport au groupe diabétique non traité (figure 58).



**Figure 58.** Variation de la concentration de la glutathion réduit chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées ; a).hépatique ; b)cardiaque et c) pancréatique. (Les résultats sont exprimés en:(M  $\pm$  SEM);\*\*\* $p \leq 0.001$  comparaison avec le groupe témoin sain ; #  $P \leq 0.05$ , ##  $P \leq 0.01$ , ###  $P \leq 0.001$ , comparaison avec le groupe diabétique non traité ; <sup>a</sup>  $P \leq 0.01$  EA vs EM).

## c).2. Les antioxydants enzymatiques maternels :

Les résultats de l'effet des extraits de *Cistanche tinctoria* sur les paramètres enzymatiques chez la ratte gestante, à savoir l'activité enzymatique de la SOD, de la GSH-Px, de la GsT et de la CAT sont rapportés dans le Tableau 21.

**Tableau 21** : Effet des extraits sur l'activité enzymatique tissulaire (foie, pancréas et cœur), à savoir la SOD (en % d'inhibition/min/mg de protéine), la GSH-Px (en nM de glutathione oxydé/min/mg de protéine), la GsT (en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) et la catalase ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéine), chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées avec les deux extraits (EA et EM).

Groupes	TG	TGEA	TGEM	DG	DGEA	DGEM
<b>SOD hépatique</b> (% d'inhibition/min/mg de protéine)	430,8 ± 5,6	444,3 ± 4,54	415,21 ± 5,7	189,83 ± 8,81***	392.66 ± 6.30###	310.3 ± 21###.a
<b>SOD Cardiaque</b> (% d'inhibition/min/mg de protéine)	10.23 ± 1.3	10.09 ± 0.9	9.97 ± 0.5	4.89 ± 1.03***	9.63 ± 0.6##	8.52 ± 0.23##
<b>SOD pancréatique</b> (% d'inhibition/min/mg de protéine)	1.80 ± 0.4	1.72 ± 0.05	1.76 ± 0.01	1.69 ± 0.02	1.90 ± 0.1	1.55 ± 0.4
<b>GSH-Px hépatique</b> (nM de glutathione oxydé/min/mg de protéine)	84.5 ± 18.2	82.7 ± 27	92.98 ± 7.97	29.72 ± 7.4***	75.2 ± 23.2###	88.7 ± 10.2###
<b>GSH-Px Cardiaque</b> (nM de glutathione oxydé/min/mg de protéine)	6,72 ± 0,85	5,95 ± 0,50	5,70 ± 0,34	3,49 ± 0,49*	5,05 ± 0,39	6,94 ± 0,88###
<b>GSH-Px Pancréatique</b> (nM de glutathione oxydé/min/mg de protéine)	7,30 ± 0,48	6,52 ± 0,98	6,50 ± 0,12	2,76 ± 0,28***	5,03 ± 0,59	3,58 ± 0,51**

<b>GsT hépatique</b> (U/min/mg de protéine)	17.16±1.29	16.38±1.17	17.48±1.07	6.94±0.77**	16.02±2.14 <sup>##</sup>	12.88±0.35
<b>GsT Cardiaque</b> (U/min/mg de protéine)	4.62±0.05	4.02±0.09	4.21±0.1	3.9±0.12	3.96±0.08	4.11±0.12
<b>GsT Pancréatique</b> (U/min/mg de protéine)	1.13±0.64	0.8±0.21	0.87±0.46	0.40±0.08***	0.62±0.085***	0.50±0.01***
<b>Catalase hépatique</b> ( $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg de protéine)	17.16±1.29	16.38±1.17	17.48±1.07	6.94±0.77**	16.02±2.14 <sup>##</sup>	12.88±0.35
<b>Catalase Cardiaque</b> ( $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg de protéine)	4.62±0.05	4.02±0.09	4.21±0.1	3.9±0.12	3.96±0.08	4.11±0.12
<b>Catalase Pancréatique</b> ( $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg de protéine)	1.13±0.64	0.8±0.21	0.87±0.46	0.40±0.08***	0.62±0.085***	0.50±0.01***

Les résultats sont exprimés en: (M  $\pm$  SEM), # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain.

Nos résultats indiquent une diminution très hautement significative de l'activité hépatique et cardiaque en SOD chez les rattes gestantes diabétiques par rapport aux rattes gestantes témoins (SOD hép : DG 189,813  $\pm$  8,81 vs TG : 430,8  $\pm$  6,6) (SOD car : DG 4,89  $\pm$  1,03 vs TG : 10,23  $\pm$  1,3). Cette hypoactivité a augmenté significativement ( $p \leq 0.001$ ) au niveau hépatique chez les rattes gestantes diabétiques traitées aux extraits à 200mg/kg (DTEA : 392,66  $\pm$  6,30 ; DGEM : 310,3  $\pm$  21 vs DG : 189,83  $\pm$  8,81), mais demeure prononcée chez les rattes gestantes traitées avec l'EM par rapport à l'activité enregistrée chez les rattes témoins (DGEM : 310,3  $\pm$  21 vs TG : 430,8  $\pm$  5,6) avec une différence significative entre les deux traitements. Concernant l'activité de la SOD cardiaque on note une augmentation hautement significative chez les rattes gestantes traitées avec les deux extraits aqueux et méthanolique par rapport aux rattes diabétiques non traitées (DGEA : 9,63  $\pm$  0,6, DGEM : 8,52  $\pm$  0,23 vs DG : 4,89  $\pm$  1,03). Les résultats de l'activité de la SOD

pancréatique montrent qu'il n'existe pas une différence significative entre les groupes expérimentaux étudiés.

Les résultats de l'activité enzymatique de la GSH-Px au niveau de trois tissus étudiés montrent une diminution considérable chez les ratteS diabétiques gestantes comparativement aux témoins (GSH-Px hép : DG  $29,72 \pm 7,4$  vs TG :  $84,5 \pm 18,2$ ,  $p \leq 0,001$ ) (GSH-Px car : DG  $3,49 \pm 0,49$  vs TG :  $6725 \pm 0,85$  ;  $p \leq 0,05$ ) (GSH-Px pan : DG  $2,76 \pm 0,28$  vs TG :  $7,30 \pm 0,48$ ,  $p \leq 0,0011$ ). Cependant, en dépit de cette chute, le traitement des ratteS diabétiques avec les deux extraits a augmenté significativement ( $p \leq 0,001$ ) l'activité du GSH-Px hépatique par rapport aux diabétiques non traitées (DGEA :  $75,1 \pm 23,2$  DGEM :  $88,7 \pm 10,2$  vs DG :  $29,98 \pm 7,97$ ). A propos de l'activité cardiaque de GSH-Px, on note une augmentation très hautement significative chez les ratteS gestantes diabétiques traitées à l'EM (DGEM :  $6,94 \pm 0,88$  vs DG :  $3,49 \pm 0,49$ ) et non significative chez les ratteS diabétiques traitées avec l'EA pendant la période de la gestation, Toutefois, son effet ne la réduit pas au seuil des témoins (DGEA :  $5,05 \pm 3,96$  vs TG :  $6,72 \pm 0,85$ ). En ce qui concerne l'activité de GSH-Px pancréatique les résultats indiquent une augmentation non significative de son activité chez les ratteS gestantes diabétiques traitées avec les deux traitements par rapport aux ratteS diabétiques non traitées, mais cette chute considérable s'est améliorée insuffisamment après l'administration des extraits (DGEA :  $5,03 \pm 0,59$  ; DGEM :  $3,58 \pm 0,51$ ) vu la persistance d'une différence significative comparativement aux témoins (TG :  $7,30 \pm 0,48$ ).

Concernant l'activité enzymatique du GsT, nos résultats montrent une diminution hautement significative ( $p < 0,01$ ) de son activité hépatique chez les ratteS diabétiques gestantes par rapport aux ratteS du groupe normal contrôlé. Cette diminution apparaît qu'elle soit contractée par l'administration d'EA et d'EM par rapport au lot diabétique non traité ( $p < 0,01$ ) et ( $p < 0,05$ ) respectivement. Au niveau pancréatique, on note une diminution très hautement significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité enzymatique du GsT chez les ratteS diabétiques non traitées et traitées avec les deux extraits par rapport aux ratteS du lot témoin. Au niveau du cœur, une légère diminution non significative ( $p > 0,05$ ) de l'activité du GST a été notée chez les ratteS diabétiques gestantes en comparant au groupe normal contrôlé. Le traitement des ratteS diabétiques par les deux extraits (EA et EM) pendant la gestation était sans effet significatif ( $p > 0,05$ ).

Dans notre étude nous avons constaté une réduction significative de l'activité de la CAT au niveau du foie ( $p \leq 0,01$ ) et pancréas ( $p \leq 0,001$ ) et non significative au niveau du cœur chez les ratteS gestantes diabétiques non traitées par rapport à celles des ratteS gestantes saines. Cette

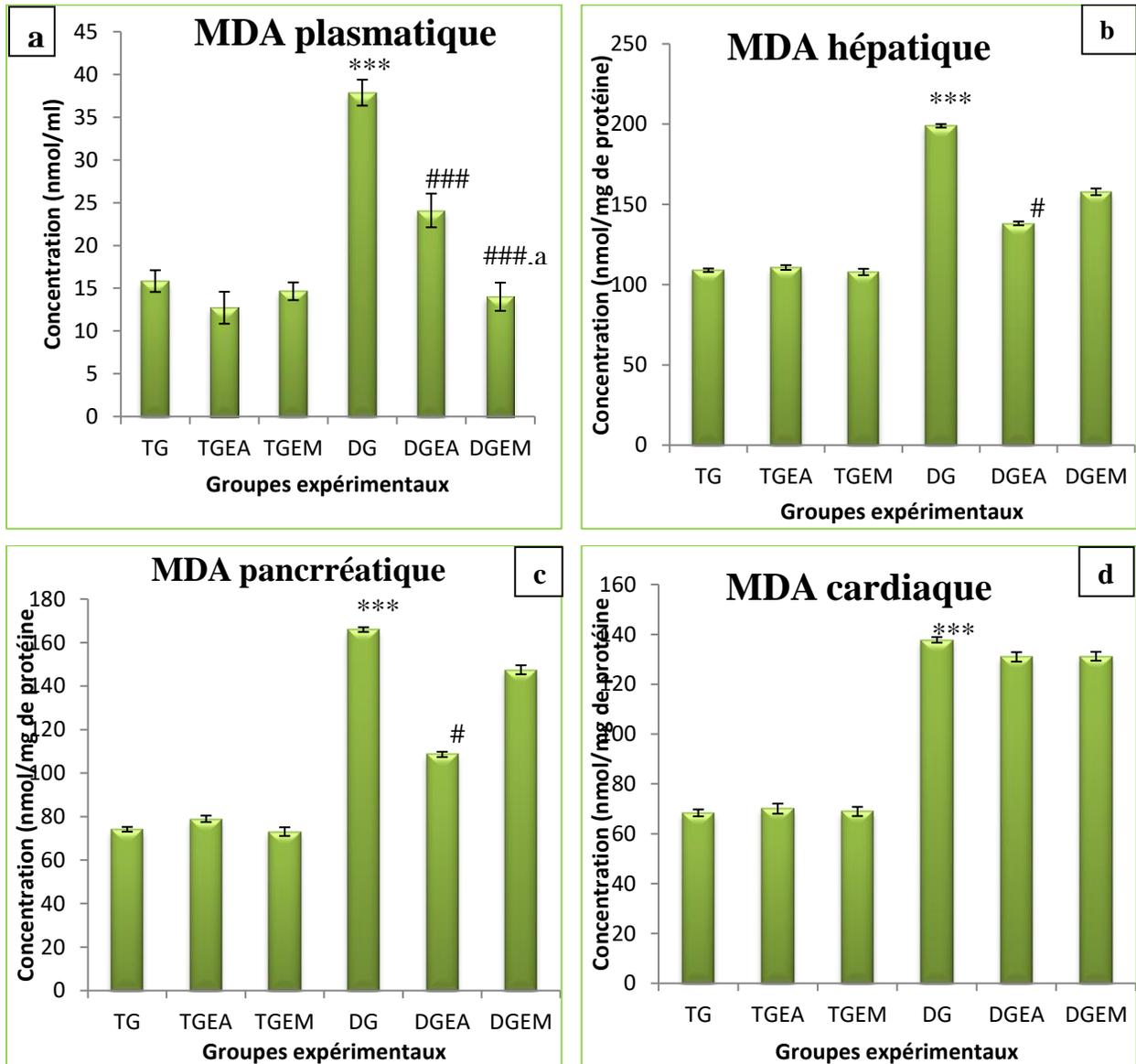
réduction est de l'ordre de (-59,55% ) dans le foie (  $6,94 \pm 0,77$  contre  $17,16 \pm 1,29$ ), de (-14,28%) dans le cœur ( $3,9 \pm 0,08$  contre  $4,62 \pm 0,05$ ) et de (-64,60%) dans le pancréas ( $0,40 \pm 0,08$  contre  $1,13 \pm 0,64$ ). Le traitement pendant la période de la gestation par les deux extraits a provoqué une augmentation hautement significative de l'activité de la CAT au niveau hépatique pour l'EA ( $16,02 \pm 2,14$  vs  $17,16 \pm 1,29$ ) et non significative pour l'EM ( $12,88 \pm 0,35$  vs  $17,16 \pm 1,29$ ) chez les rattes gestantes diabétiques par rapport à celle enregistré chez les diabétiques non traitées.

Au niveau cardiaque et pancréatique en note une légère augmentation non significative dans l'activité de la CAT chez les diabétiques traitées par rapport au non traitées, mais reste inférieure à celle enregistrée chez les témoins non traitées.

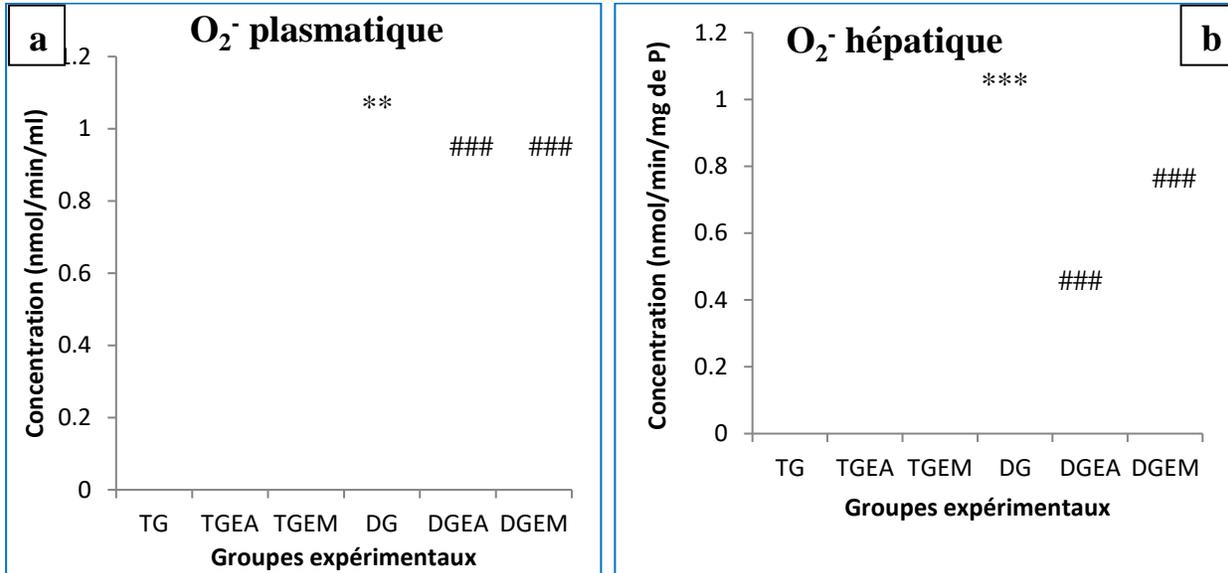
Nous avons également constaté que chez les rattes gestantes non diabétiques traitées par les deux extraits l'activité enzymatique des enzymes antioxydants étudiée : (SOD, GSH-Px, GST et catalase) n'a pas changé de façon significative dans les organes étudiés par rapport à celles enregistrée chez les rattes gestantes témoins saines.

### c).3. Biomarqueur de stress oxydant et la capacité antioxydante (FRAP) maternel :

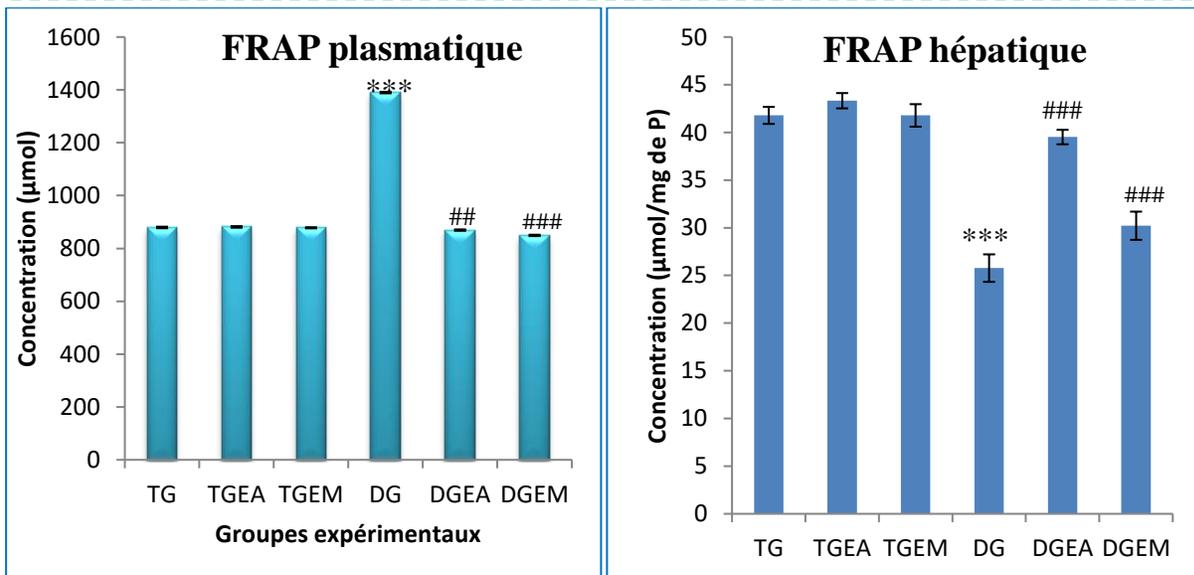
Les résultats de l'effet des extraits (EA et EM) de *Cistanche tinctoria* sur les biomarqueur de stress oxydant (MDA et  $O_2^-$ ) et sur la capacité antioxydante totale (FRAP) de la ratte gestante non diabétique et diabétique sont illustrés respectivement dans les Figures 59,60 et 61.



**Figure 59.** Effet des extraits sur les concentrations plasmatique et tissulaire de malondialdéhyde (MDA) chez la ratte gestante témoin et diabétique, a).plasmatique , b)..hépatique ; c) pancréatique et d) cardiaque. (Les résultats sont exprimés en:(M ±SEM);\*\*\*p≤ 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; # P ≤ 0.05, ## P ≤ 0.01, ### P ≤ 0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité).



**Figure 60.** Variation de la concentration de l’anion superoxyde chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées ; a).plasmatique ; b) hépatique. (Les résultats sont exprimés en:(M ±SEM);\*\*\*p≤ 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; # P ≤ 0.05, ## P ≤ 0.01, ### P ≤ 0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité ).



**Figure 61.** Variation de la concentration de la capacité antioxydante total (FRAP) chez les rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées ; a).plasmatique ; b) hépatique. (Les résultats sont exprimés en:(M ±SEM);\*\*\*p≤ 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; ## P ≤ 0.01, ### P ≤ 0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité).

Nous avons constaté qu'une élévation remarquable de la peroxydation lipidique était évidente dans le plasma (+98,84%), le foie (+105,47 %), le pancréas (+127,83%) et le cœur (+41.65%) chez les rattes gestantes diabétiques par rapport au groupe témoin normal. Le traitement des rattes diabétiques avec l'EA et l'EM à raison de 200mg /kg a significativement baissé le taux de l'MDA plasmatique (31,82 % et 34,49%) ( $p < 0,05$ ), au niveau hépatique le traitement des rattes diabétiques par l'EA a réduit significativement MDA (-50,37%) ( $p < 0,05$ ), et que le traitement des rattes diabétiques avec l'EM n'a pas d'effet significatif contre la peroxydation lipidique hépatique ( $p > 0,05$ ). Au niveau pancréatique on note une diminution significative chez le lot traité par l'EA (-26,33%,  $p < 0,05$ ) et une légère diminution non significative chez le lot traité par l'EM (16,44%,  $p > 0,05$ ) en comparaison au groupe diabétique non traité. Le traitement des rates diabétiques avec les deux extraits et sans effets au niveau cardiaque (Figure 59).

Concernant l'anion superoxide ( $O_2^-$ ) nos résultats indiquent une augmentation hautement significative ( $p < 0.01$ ) de son production au niveau plasmatique et hépatique chez les rattes recevant la STZ et non traitées (plasm  $110,19 \pm 1,56$  nmol/min ; hépa  $29,07 \pm 1,54$  nmol/min/mg de P) par rapport au groupe témoin normal (plasm  $82,96 \pm 2.09$  nmol/min ; hépa  $10,72 \pm 2,39$  nmol/min/mg de P). Par ailleurs, le traitement des rattes diabétiques avec les deux extraits a réduits significativement cette production (leurs valeurs respectives  $85,23 \pm 1,23$  nmol/min et  $85,23 \pm 1,23$  nmol/min au niveau plasmatique ;  $11,84 \pm 2,08$  nmol/min/mg de protéines et  $19,47 \pm 1,04$  nmol/min/mg de P au niveau hépatique) n'ont aucune différence significative avec celle obtenue avec le témoin normal) (Figure 60).

Les résultats de la capacité antioxydante totale montrent une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) dans leur concentration plasmatique (-45,78 %) et hépatique (-51,43%) chez le lot diabétique non traité (DG) en comparaison avec le lot témoin (TG). Le traitement des rattes diabétiques avec les deux extraits a rétablie significativement la capacité antioxydante totale dans les deux comportements étudiés (Figure 61).

## III.1.2.5. Étude tératologique chez les fœtus

Les variations des paramètres tératologiques chez les rattes gestantes des lots témoins non traités TG, Témoins traités (TGEA, TGEM) diabétiques DG et diabétique traitées avec les deux extraits (DGEA, DGEM) sont rassemblées dans le Tableau 22.

**Tableau 22** : résultats de la reproduction des rattes gestantes témoins et diabétiques traitées et non traitées avec les extraits de *Cistanche tinctoria*.

Groupes	TG	TGEA	TGEM	DG	DGEA	DGEM
<b>Femelle gestante (N)</b>	10	10	10	14	10	10
<b>Grossesse à terme (N)</b>	10	10	9	06	08	06
	100%	100%	90%	42,85%	80%	60%
<b>Avec résorption totale</b>	0	0	1	08	03	04
<b>Implantation<sup>a</sup></b>						
<b>Totale</b>	108	136*	116	58***	98 <sup>##</sup>	66***
<b>M ± SEM</b>	10,8±0,38	13,6±0,49	12,88±0,45	11,50±0,61	12,25±0,62	11±1,59
<b>Fœtus vivants<sup>a</sup></b>						
<b>Totale</b>	96	130	99	44***	86 <sup>##</sup>	42***
<b>M ± SEM</b>	9,6 ±0,45	13±0,47	11±0,00	7,33±1,71	10,75±0,72	7,0±2,03
<b>Fœtus Morts<sup>a</sup></b>						
<b>Totale</b>	0	0	2	05***	0 <sup>###</sup>	10***
<b>M ± SEM</b>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,22±0,14	0,83±0,54	0,0±0,0	1,66±0,55
<b>Résorption</b>						
<b>Totale<sup>a</sup></b>	12	08	15	20	12	14
<b>M±SEM</b>	1,20±0,38	0,80±0,24	1,66±0,52	3,33±0,95	1,50±0,18	2,33±0,55
<b>Taux de résorption<sup>b</sup></b>						
<b>(%)</b>	11,11%	6,15%	12,93%	34,48%**	12,24%	21,21%
<b>Post-implantation (%)</b>	11,11	4,41	14,65	24,13	12,24	36,36
<b>Poids de l'utérus<sup>a</sup></b>	48,97±5,54	58,53±2,43	46,14±6,42	38,53±3,05	47,45±4,99	33,66±4,11
<b>Poids fœtal (g)<sup>a</sup></b>	3,27±0,14	3,23±0,08	3,38±0,04	2,44±0,11**	2,95±0,03**	3,06±0,14
<b>SPA fetuses (%)<sup>b</sup></b>	02,76	8,09	1,09	69,02***	20,48*	08,01
<b>APA fetuses (%)<sup>b</sup></b>	88,08	90,90	97,00	10,23***	52,33* <sup>##</sup>	60,23* <sup>##</sup>
<b>LPA fetuses (%)<sup>b</sup></b>	09,14	1,0	1,91	20,75**	27,19**	31,76**
<b>Poids de placenta (g)<sup>a</sup></b>	0,42±0,01	0,41±0,01	0,38±0,02	0,59±0,01*	0,43±0,01	0,49±0,01
<b>Index placentaire</b>	0,140±0,000	0,149±0,005	0,144±0,000	0,206±0,008	0,166±0,006	0,128±0,000
<b>Taille (cm)<sup>a</sup></b>	4,54±0,093	4,42±0,06	4,45±0,05	4,21±0,08	4,07±0,05	4,12±0,08
<b>Tour de crane (cm)<sup>a</sup></b>	3,46±0,07	3,37±0,05	3,40±0,05	3,10±0,12	3,14±0,08	3,48±0,07

(Les résultats sont exprimés en:(M ±SEM);\*\*\*p≤ 0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; # P ≤ 0.05, ## P ≤ 0.01, ### P ≤ 0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité ; a) teste de Kruskal–Wallis; b) teste de Fisher).

Les résultats obtenus montrent que 100% des rattes dans le groupe TG, ont terminé la période de gestation normalement, contre 42,85 % dans le groupe diabétique non traité, le traitement des rattes diabétiques avec les deux extraits a diminué le risque d'avortement chez les rattes diabétiques, avec une différence significative par rapport au groupe diabétique non traité (80% avec grossesse à terme dans le groupe diabétique traité avec l'EA et 60% dans le groupe diabétique traité avec l'EM). Nous avons obtenu 8 rattes avec réabsorption totale dans le groupe diabétique non traité contre 3 et 4 respectivement chez les groupes diabétiques traités avec les deux extraits EA et EM (Tableau 22).

Les résultats sur l'incidence des implantations totales, fœtus vivantes, mortes et résorption sont représentés dans le Tableau 22. Le résultat obtenu indique qu'il n'existe pas une différence significative dans la moyenne d'implantation totale chez les groupes expérimentaux. Par contre on note une augmentation significative dans la moyenne de létalité dans les groupes diabétiques non traités ( $0,83 \pm 0,54$ ) et traités avec l'EM ( $1,66 \pm 0,55$ ) par rapport au groupe témoin non traité ( $0,0 \pm 0,0$ ), le traitement des rattes diabétiques avec l'EA a protégé les fœtus contre la mort ( $0,0 \pm 0,0$ ) et réduits le taux de résorption (12,24% contre 34,48 chez le groupe diabétique non traité).

Concernant le poids fœtal les résultats obtenus montrent une diminution dans la moyenne de poids corporel des fœtus des rattes diabétiques non traitées (DG) par rapport au groupe témoin (TG), la moyenne était d'environ 25,38% inférieure à celui du témoin non traité ( $2,44 \pm 0,11$  g contre  $3,27 \pm 0,14$  g,  $p < 0,05$ ). La supplémentation maternelle avec les extraits de *Cistanche tinctoria* réduit l'indice de RCIU. Les six groupes expérimentaux possèdent des fœtus avec poids normal (APA), petit (SPA) et grand (LPA) par rapport à l'âge gestationnel mais avec des pourcentages différents on trouve que dans le groupe TG 88,08 % sont APA et uniquement 2,76% sont SPA par contre chez le DG on trouve uniquement que 10,23% sont APA et 69,02% sont SPA, le traitement des rattes a réduit le pourcentage des SPA, et on trouve que 8,01% des fœtus sont petits par rapport à l'âge gestationnel dans le groupe DGEM, et 20,48 dans DGEA contre 69,02 dans le groupe DG (Tableau 22).

Concernant le poids placentaire les résultats obtenus montrent une augmentation hautement significative chez le groupe diabétique non traité ( $0,59 \pm 0,01$ ) avec un index placentaire de ( $0,206 \pm 0,008$ ) par rapport au TG ( $0,42 \pm 0,01$ ), avec un index placentaire de  $0,140 \pm 0,006$ , le traitement des rattes diabétiques avec les deux extraits a diminué significativement le poids de placenta ( DGEA,  $0,43 \pm 0,01$  avec un index placentaire de  $0,166 \pm 0,006$ ) ( DGEM :  $0,49 \pm 0,01$

avec un index placentaire de  $0,128 \pm 0,007$ ).

La mesure de la taille et du tour de crane chez les fœtus des groupes expérimentaux montre une différence significative chez les fœtus des rattes gestantes non traitées par rapport au fœtus de rattes témoins dans les deux paramètres (Taille : DG :  $4,01 \pm 0,08$  vs TG :  $4,54 \pm 0,093$  ; TC, DG :  $3,10 \pm 0,12$  vs TG :  $3,46 \pm 0,07$ ) le traitement des rattes diabétiques avec les deux extraits a faiblement amélioré cette perturbation de croissance, mais on note une légère augmentation non significative ( taille : DGEA :  $4,07 \pm 0,05$ , DGEM :  $4,12 \pm 0,08$  Vs DG :  $4,01 \pm 0,08$ ) ( TC : DGEA  $3,14 \pm 0,08$ : DGEM :  $3,18 \pm 0,07$ ) par rapport au groupe DG.

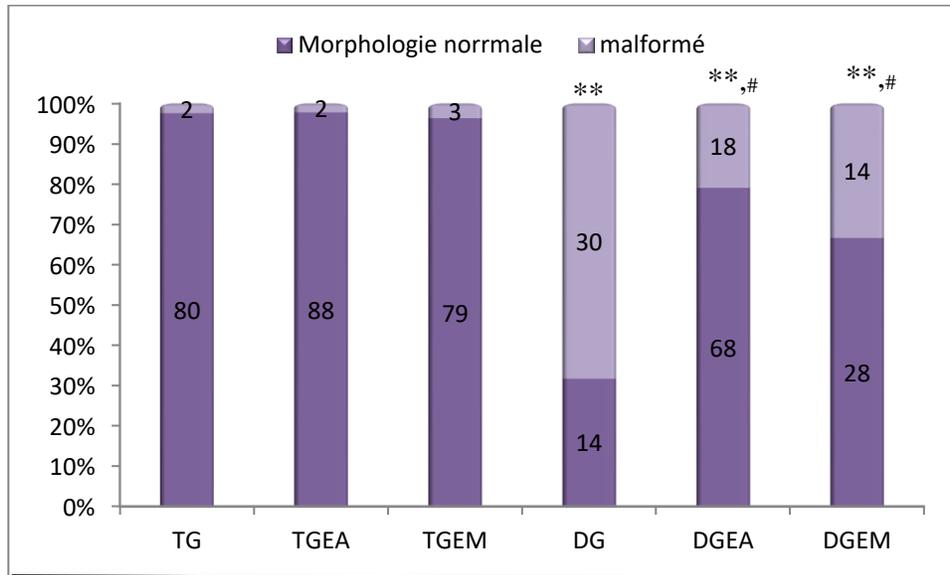
#### a). Les malformations :

Durant l'observation morpho-anatomique des fœtus collectés, nous avons procédé au calcul du nombre total des fœtus dans chaque portée pour en déduire le taux de malformations.

Les résultats morphologiques des fœtus des rattes témoins (non traitées et traitées) et des rattes diabétiques (non traitées et traitées avec les extraits de *Cistanche tinctoria* ) au jour 20 de la gestation , montrent deux catégories de fœtus : étaient soit avec morphologie normale ou avec un défaut de développement "malformés".

Le diabète maternel augmente les malformations chez les fœtus de 2,43 % à 68,18 %. Or, le traitement des rattes diabétiques avec l'EA de *Cistanche tinctoria* pendant la période de la gestation tend sensiblement à réduire significativement ( $p \leq 0,01$ ) l'incidence dysmorphogénique chez leur progéniture (de 68,18% à 20,45%). De même, le traitement à l'EM a amélioré les résultats morphologiques (de 68,18% à 33,33%) sauf que le traitement avec les deux extraits échoue à rétablir complètement ce taux (DGEA : 20,45% , DGEM : 33,33 vs TG : 2,43%) (Figure 62).

Concernant les deux groupes témoins traités (TGEA, TGEM), les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas une différence significative dans le taux de malformation avec le groupe TG (TGEA : 2,22 ; TGEM : 3,65 vs TG : 2,43%).



**Figure 62.** Variation du taux de fœtus avec morphologie normale et malformé chez les rattes gestantes témoins (TG, TGEA, TGEM), les rattes gestantes diabétiques DG et les rattes gestantes diabétiques traitées. Le nombre de fœtus dans chaque catégorie sont indiqués dans les barres. (Les résultats sont exprimés en pourcentage; \*\* $p \leq 0.01$  comparaison avec le groupe témoin sain ; #  $P \leq 0.05$ , comparaison avec le groupe diabétique non traité).

Le tableau 23 représente les différents types des malformations externes trouvé durant l’observation morpho-anatomique des fœtus collectés.

**Tableau.23.** Effet des extraits de *Cishtanche tinctoria* sur la prévention des malformations fœtales dans le diabète induit par la STZ chez la ratte.

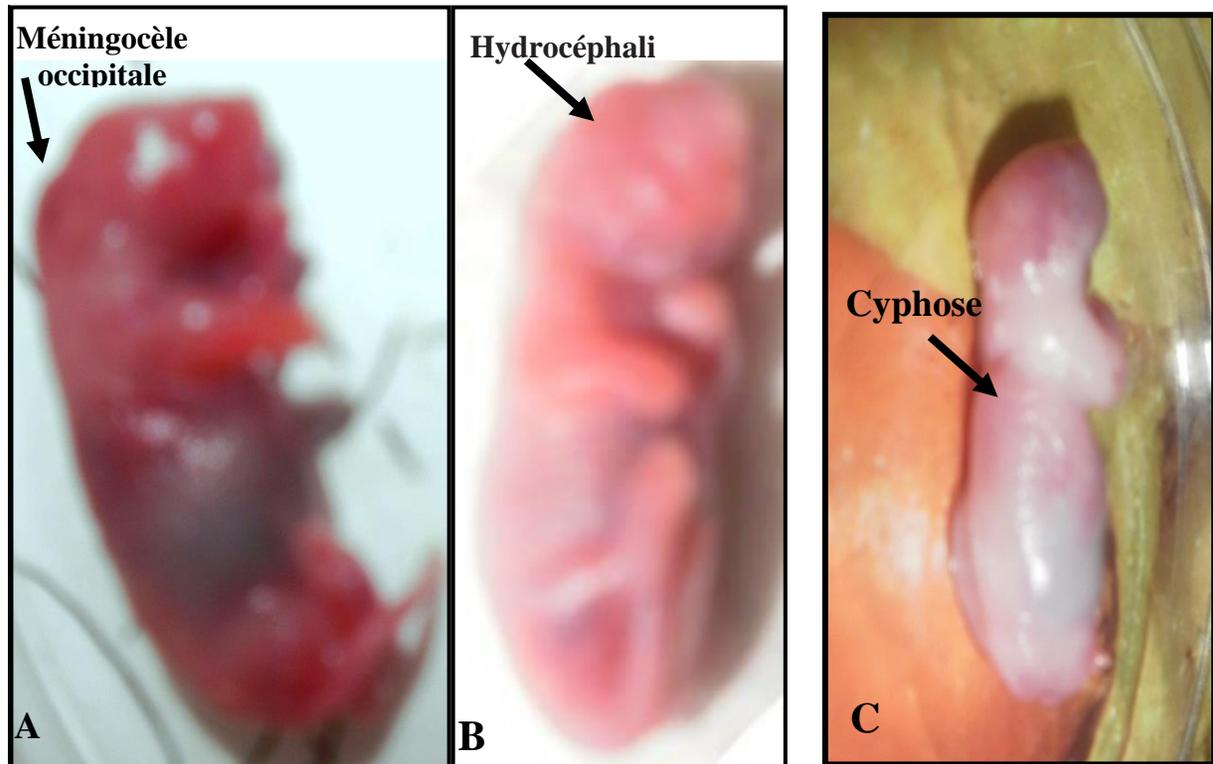
Type de malformation	TG (n=82)	TGEA (n=90)	TGEM (n=82)	DG (n= 44)	DGEA (n=86)	DGEM (n=42)
<b>Ouverture du tube neurale :</b>						
- Hydrocéphalie	0	0	0	2	1	3
- Exencéphalie	0	0	0	3	2	3
- Méningocèle occipitale	0	0	0	2	3	2
- cyphose	0	0	0	5	2	2
Ectopie cardiaque	0	1	0	1	0	0
Exophtalmie	1	0	2	5	4	2
Régression caudale	0	0	0	1	0	0
Hypertrophie des membres	0	1	1	3	3	2
Microtie	0	0	0	1	0	0
Gastroschisis	0	0	0	2	2	2
Hypoplasie maxillaire	0	0	0	1	0	0
Micrognathie mandibulaire	0	0	0	4	2	0
Agnathie mandibulaire	0	0	0	1	0	0
Œdème	1	0	0	3	1	0
Absence des membres inférieure	0	0	0	1	0	0

Les fœtus dans les groupes témoins non traités et traités avec les deux extraits ont eu une faible fréquence de malformations (Tableau 23). On trouve dans le groupe TG que parmi les 82 fœtus examinés il y a uniquement un fœtus avec exophtalmie et un fœtus avec œdème, de même dans le groupe de TGEA il n'y a aussi que 2 fœtus malformés, un avec ectopie cardiaque et le deuxième avec hypertrophie de l'un des membres supérieurs, chez le groupe TGEM il y a deux types des malformations : exophtalmie (2) et hypertrophie des membres (1). Il n'existe pas une différence significative entre les groupes témoins traités et témoins non traités.

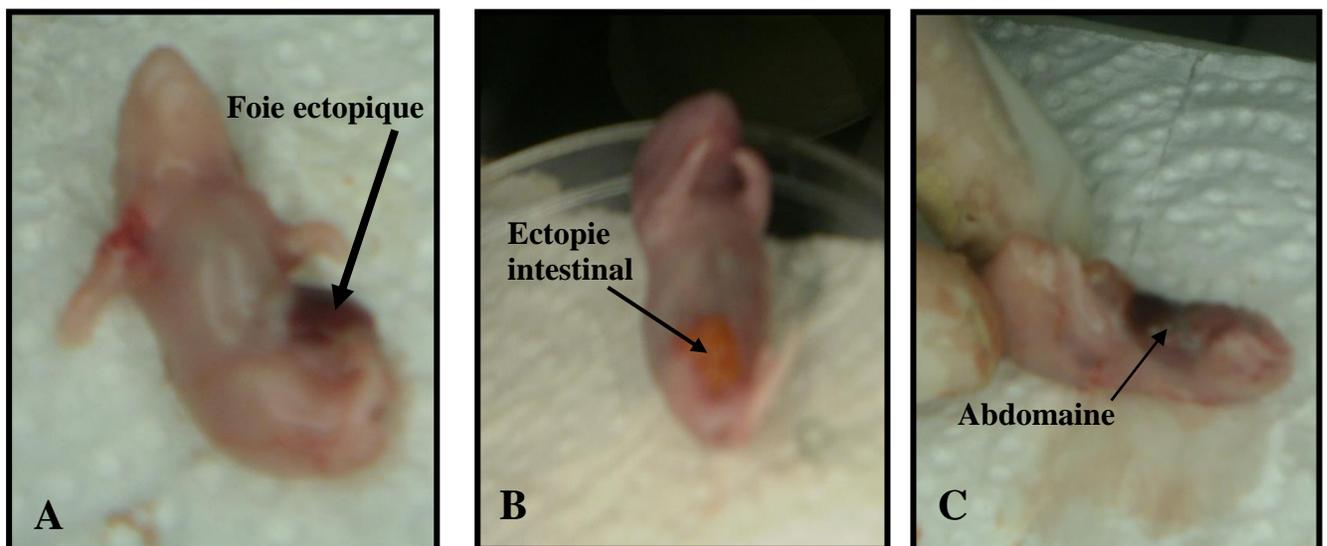
Dans le groupe DG Il y avait une forte incidence de malformations. Plusieurs types des malformations sont enregistrés. On trouve quelques fœtus avec des anomalies au niveau du tube neural (Figure 63) telles que l'exencéphalie (3), l'hydrocéphalie (2), la méningocèle (2) et cyphose (5). Chez tous les fœtus atteints de méningocèle, la lésion était située dans la région occipitale. Il y avait une seule cavité de fente faciale oblique avec une microtie à faible jeu

(figure 63A), six cas de gastroschisis (figures 64) sont enregistrés dans les groupes diabétiques (2) cas dans le groupe DG, (2) cas dans le groupe DGEA et (2) dans le groupe (DGEM). La gastroschisis était caractérisée par un grand défaut de la paroi abdominale impliquant les parties ombilicales et infraombilicales de la paroi abdominale ventrale avec le foie et les boucles de l'intestin grêle faisant saillie à l'extérieur (Figure 64C). Un RCIU (figure 65B), syndrome de la régression caudale (figure 65 C) une hypoplasie maxillaire et mandibulaire (figure 65 D), œdème (figure 65 E), hypertrophie des membres (figure 65F), une microtie et il y avait plusieurs cas d'exophtalmie (figure 65G) (cinq cas dans le groupe DG, quatre dans le groupe DGEA et deux dans le groupe DGEM).

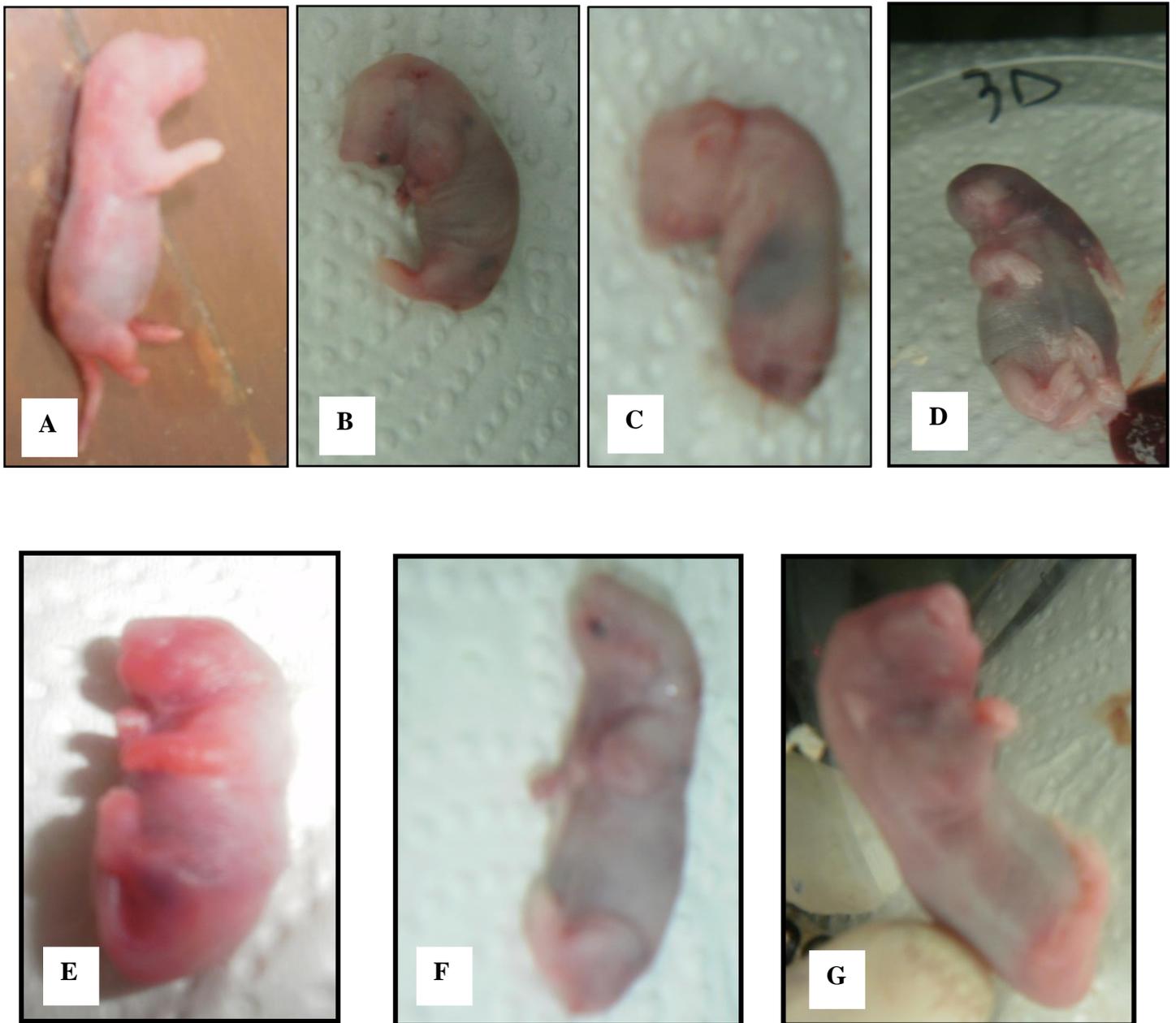
La taille relative des mandibules des fœtus au jour 20 de la gestation a été calculée comme le rapport entre le maxillaire estimé et la longueur mandibulaire ( $\text{max} / \text{man}$ , Figure. 33). Chez les fœtus des groupes témoins, les résultats indiquent une distribution normale étroite de la taille mandibulaire (figure 66). Dans le groupe DG, cependant, nous avons trouvé deux populations distinctes de taille mandibulaire. La population avec un aspect normal avait une distribution plus large que celle des témoins, et un cas de maxillaire sous-développé a été noté ( $\text{max}/\text{min} < 1$ ). Un rapport  $\text{max} / \text{min}$  supérieure à 1,25 indique un fœtus avec micrognathie (Simán et Eriksson, '97b). La taille de la mandibule dans le groupe micrognathique était très variable, d'une absence raccourcie à une absence complète de la mâchoire inférieure. Le traitement par les extraits de *Cistanche tinctoria* a réduit le nombre de fœtus micrognathiques (figure 66).



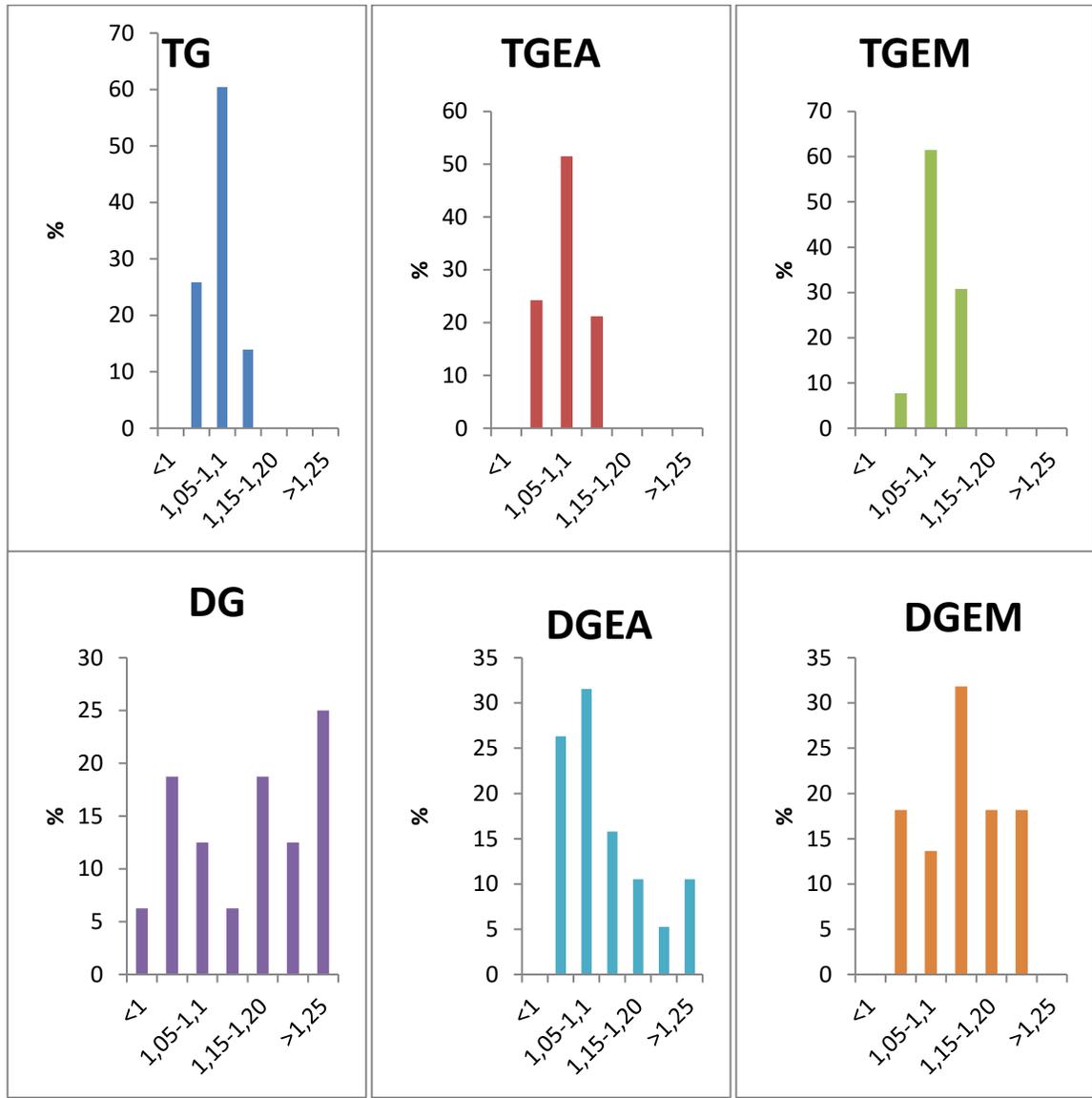
**Figure 63.** Photographies démontrant l'aspect morpho-anatomique de la progéniture des rattes diabétiques en J 20 qui témoigne de l'existence d'un NTD. (A). Méningocèle occipitale, (B). Hydrocephalie, (C). cyphose.



**Figure 64.** Fœtus de rat diabétique en J 20. Présente la gastroschisis (A). Foie éctopique, (B) ectopie intestinal, (C).Gasroschisis avec le foie et l'intestin faisant saillie à travers le grand défaut de la paroi abdominale.



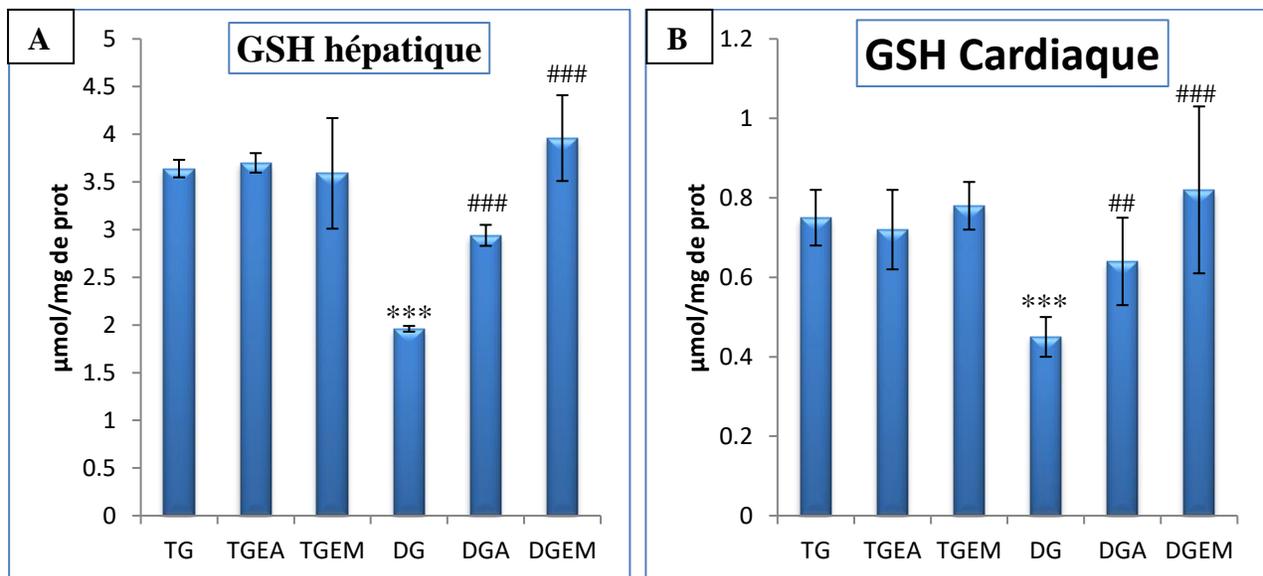
**Figure 65.** Photographies démontrant l'aspect morpho-anatomique de la progéniture des ratte incluses dans l'étude. **A).** le fœtus d'une ratte témoin ; **B).** RCIU (queue courte) ; **C).** Syndrome de régression caudale ; **D).** micrognathie **E).**œdème **F).** hypertrophie des membres ; **G).** Exophthalmie .



**Figure 66.** Histogramme de distribution du rapport entre la longueur maxillaire et la longueur mandibulaire chez les fœtus des rats témoins (TG, TGEA, TGEM), diabétiques non traité (DG) et traités avec les deux extraits ( EA,EM).

### III.1.2.6. le statut antioxydant fœtaux

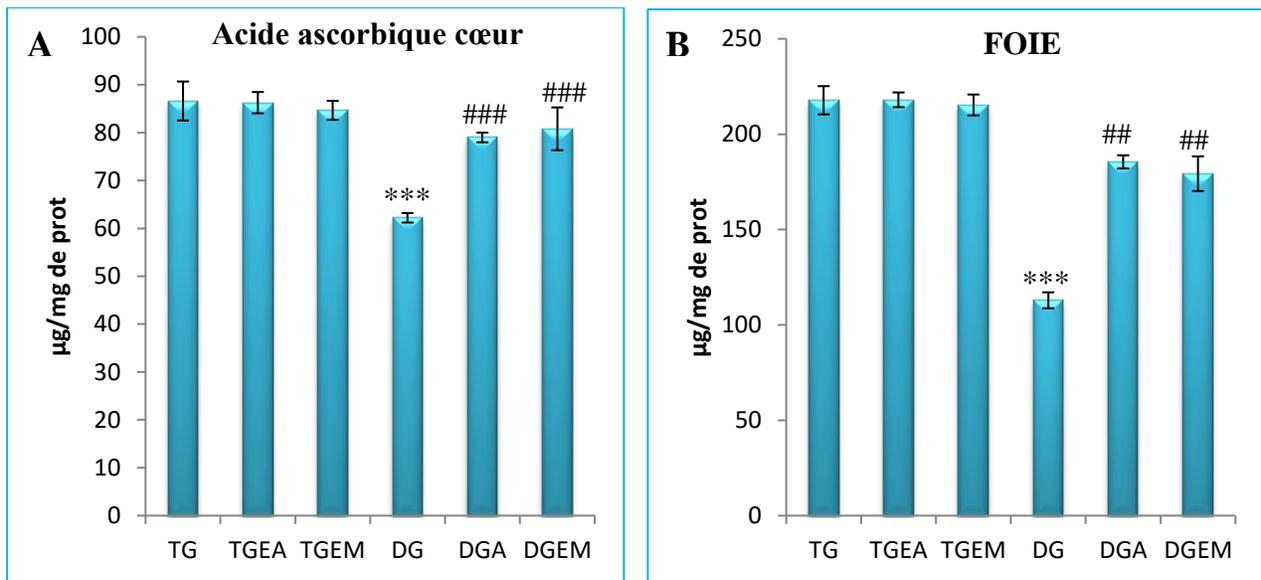
Les concentrations en GSH hépatique et cardiaque ont diminué significativement chez la progéniture des rattes gestantes diabétiques par rapport aux témoins (GSH hép : DG :  $1,96 \pm 0,03$  vs TG :  $3,64 \pm 0,09$ ) (GSH car : DG :  $0,45 \pm 0,05$  vs TG :  $0,75 \pm 0,07$ ). L'administration de l'EA aux rattes gestantes diabétiques a augmenté significativement la concentration du glutathion fœtale dans le deux organes (foie et cœur) comparativement aux rattes gestantes diabétiques non traitées (DGEA :  $2,94 \pm 0,11$  vs DG :  $1,96 \pm 0,03$ ) (DGEA :  $0,64 \pm 0,11$  vs DG :  $0,45 \pm 0,05$ ). En effet, EM a supprimé complètement l'effet du diabète gestationnel sur le taux du GSH fœtal en le rétablissant significativement bien au-delà du seuil des témoins (foie : DGEM :  $3,96 \pm 0,41$ ) (cœur : DGEM :  $0,82 \pm 0,21$ ). Concernant les deux groupes témoins traités il n'existe pas une différence significative par rapport au groupe témoin non traité (Figure 67).



**Figure 67.** Variation de la concentration de la glutathion réduit chez les fœtus des rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées ; a).hépatique ; b)cardiaque (Les résultats sont exprimés en:(M  $\pm$ SEM);\*\*\*p $\leq$  0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ;## P  $\leq$  0.01, ### P  $\leq$  0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité.

Concernant la concentration hépatique et cardiaque en acide ascorbique chez les fœtus, Nos résultats montrent que la concentration en Vit C cardiaque diminue considérablement chez les fœtus des rattes diabétiques gestantes comparativement aux témoins (DG :  $62,20 \pm 0,99$  vs TG :  $86,60 \pm 4,07$ ). Cependant, en dépit de cette chute, le traitement des rattes diabétiques avec les deux extraits a

augmenté significativement la concentration en Vit C cardiaque par rapport aux témoins (DGEA :  $78,98 \pm 1,01$  ; DGEM :  $80,79 \pm 4,47$  vs T :  $86,60 \pm 4,07$ ) (Figure 68 A). De même, pour la concentration hépatique, on note une réduction significative chez les fœtus des DG par rapport aux fœtus de groupe TG (DG :  $112,89 \pm 4,19$  vs TG :  $215,78 \pm 7,41$ ), le traitement de la ratte pendant la période de la gestation avec les deux extraits de notre plante a augmenté significativement la concentration hépatique en Vit C comparativement aux groupe DG (DGEA :  $185,47 \pm 3,45$  ; DGEM :  $179,28 \pm 9,08$  vs DG :  $112,89 \pm 4,19$ ) (Figure 68 B).



**Figure 68.** Variation de la concentration en acide ascorbique chez les fœtus des rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétique et diabétiques traitées ; a). Cardiaque ; b). Hépatique (Les résultats sont exprimés en:(M  $\pm$ SEM);\*\*\*p $\leq$  0.001 comparaison avec le groupe témoin sain ; ## P  $\leq$  0.01, ### P  $\leq$  0.001, comparaison avec le groupe diabétique non traité).

les résultats des antioxydants enzymatique des fœtus de la ratte gestante, témoin non traitée et traitée , diabétique non traitée et traitée avec les extraits de *Cistanche tinctoria* sont reportés dans le tableau 24.

**Tableau 24** : Effet des extraits sur l'activité enzymatique tissulaire (foie et cœur), à savoir la SOD (en % d'inhibition/min/mg de protéine), la GSH-Px (en nM de glutathione oxydé/min/mg de protéine), la GsT (en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) et la catalase ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéine), chez les fœtus de la rattes gestantes témoins, témoins traitées, diabétiques et diabétiques traitées avec les deux extraits (EA et EM).

Groupes	TG	TGEA	TGEM	DG	DGEA	DGEM
<b>SOD hépatique</b>	130,8 ± 5,6	144,3 ± 4,54	115,21 ± 5,7	89,83 ± 8,81***	112,66 ± 6,30###	110,3 ± 21###
<b>SOD Cardiaque</b>	10,23 ± 1,3	10,09 ± 0,9	9,97 ± 0,5	4,89 ± 1,03***	9,63 ± 0,6##	8,52 ± 0,23##
<b>GSH-Px hépatique</b>	84,5 ± 18,2	82,7 ± 27	92,98 ± 7,97	29,72 ± 7,4***	75,2 ± 23,2###	78,7 ± 10,2###
<b>GSH-Px Cardiaque</b>	6,72 ± 0,85	5,95 ± 0,50	5,70 ± 0,34	3,49 ± 0,49*	5,05 ± 0,39##	5,94 ± 0,88###
<b>GsT hépatique</b>	47,61 ± 2,19	46,88 ± 1,7	47,48 ± 1,07	41,02 ± 3,67	42,94 ± 4,09	43,08 ± 3,5
<b>GsT Cardiaque</b>	9,26 ± 1,15	8,96 ± 1,19	9,12 ± 1,1	8,49 ± 0,32	8,75 ± 0,8	8,90 ± 0,42
<b>Catalase hépatique</b>	17,16 ± 1,29	16,38 ± 1,17	17,48 ± 1,07	6,94 ± 0,77***	16,02 ± 2,14##	12,88 ± 0,35###
<b>Catalase Cardiaque</b>	4,62 ± 0,05	4,02 ± 0,09	4,21 ± 0,1	3,9 ± 0,12	3,96 ± 0,08	4,11 ± 0,12

Les résultats sont exprimés en: (M ± SEM), ## P < 0,01, ### P < 0,001 comparaison avec le groupe diabétique non traité; \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001 comparaison avec le groupe témoin sain.

D'après nos résultats, on note une diminution significative dans l'activité enzymatique du SOD chez les fœtus des rattes gestantes diabétiques dans les organes étudiés par rapport aux témoins (SOD hép, DG : 89,83 ± 8,81 vs TG : 130,8 ± 5,6,  $p \leq 0,001$ ), (SOD card, DG : 4,89 ± 1,03 vs TG : 10,23 ± 1,3,  $p \leq 0,001$ ). De même, le traitement des rattes gestantes diabétiques avec les extraits de *Cistanche tinctoria* a augmenté significativement l'activité enzymatique de la SOD hépatique et cardiaque chez les fœtus ((SOD hép) EA : 112,66 ± 6,30 vs DG: 89,83 ± 8,81,  $p \leq 0,001$ ) (SOD hép) EM : 110,3 ± 21 vs DG: 89,83 ± 8,81,  $p \leq 0,001$ ) (SOD card, EA : 9,63 ± 0,6 vs DG: 89,83 ± 8,81,  $p \leq 0,01$ ) (SOD card, EM : 8,52 ± 0,23 vs DG: 89,83 ± 8,81,  $p \leq 0,01$ ) (Tableau 24).

On constate que le diabète maternelle provoque une diminution très hautement significative voir tableau 24 ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) hépatique et une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) au niveau du cœur fœtale (GSH-Px hép : DG :  $29,72 \pm 7,4$  vs TG :  $84,5 \pm 18,2$ ), (GSH-Px card: DG :  $3,49 \pm 0,49$  vs TG,  $6,72 \pm 0,85$ ). En revanche, on n'enregistre aucune différence significative dans l'activité de la glutathion peroxydase chez les fœtus des rattes témoins traitées avec l'EA et l'EM par rapport aux fœtus de groupe témoins non traités. Le traitement de la ratte diabétique avec l'EA et l'EM a fait preuve d'une augmentation très hautement significative de cette hypoactivités enzymatique dans le foie et le cœur fœtale comparativement aux fœtus de rattes diabétiques non traitées. Dans le foie Cette augmentation est de l'ordre de (EA :153,03%)(EM :164,80%) et elle est de l'ordre de (EA :44,69%)(EM :70,20) au niveau du muscle cardiaque.

Concernant l'activité enzymatique de la catalase, nous avons remarqué une diminution très hautement significative au niveau hépatique (DG :  $6,94 \pm 0,77$  vs TG :  $17,16 \pm 1,29$ ) et non significative dans l'homogénat de cœur (DG :  $3,90 \pm 0,12$  vs TG :  $4,62 \pm 0,05$ ) chez les fœtus du lot diabétique non traité par rapport aux fœtus du groupe témoin. Le traitement des rattes diabétiques par les deux extraits a amélioré cette perturbation au niveau foetal avec une augmentation dans l'activité hépatique et cardiaque de cette enzyme, chez les fœtus des deux lots traités par rapport au groupe diabétique non traité. Mais il reste remarquablement faible par rapport au groupe témoin sain (Tableau 24).

L'induction du diabète chez les rattes entraine d'après les résultats obtenus, une légère diminution non significative de l'activité hépatique et cardiaque en GsT chez les fœtus par rapport aux fœtus des rattes témoins. De même, chez les deux groupes diabétiques traités (DGEA) et (DGEM) on a enregistré une légère augmentation non significative dans l'activité hépatique, (EA :  $41,94 \pm 4,09$  ; EM :  $43,08 \pm 3,5$  Vs DG :  $41,02 \pm 3,67$ ), et l'activité cardiaque (EA :  $8,75 \pm 0,8$  ; EM :  $8,90 \pm 0,42$  Vs DG :  $8,49 \pm 0,32$ ) de la glutathion-s-transférase en comparaison avec les fœtus de groupe non traité (DG) (Tableau 24).

## III.2. Discussion

### III.2.1 Etudes phytochimiques :

Les dernières décennies ont été marquées par l'intérêt particulier porté à la mise en valeur des plantes à caractères médicinales comme sources de substances bioactives naturelles. De ce fait, de nombreuses études s'intéressent de plus en plus aux effets thérapeutiques des antioxydants d'origine naturelle. Cependant, cette source semble inépuisable, puisque seule une petite partie des 250 000 espèces végétales connues a été investiguée sur les plans phytochimiques et pharmacologiques et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (El-Haci et *al.*, 2012). Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie, en dermopharmacie et dans l'industrie agroalimentaire. Parmi ces composés, les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés dans le domaine thérapeutique. Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) constituent une famille de composés qui sont omniprésents dans le règne végétal. Les nombreuses propriétés de ces composés relatives à la santé, largement décrites dans des études épidémiologiques, sont principalement fondées sur leurs activités antioxydantes : ils peuvent piéger les radicaux libres, inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres et sont même des chélateurs de certains ions métalliques.

#### III.2.1.1 Rendements en extraits secs

Les méthodes d'extraction des composés phénoliques dépendent aussi bien du matériel végétal que du type de polyphénol à extraire.

Les rendements varient en fonction des plantes utilisées et en fonction des organes pour une même espèce, *Cistanche tinctoria* a présenté un rendement en extraits brutes assez élevé de l'ordre de 21.6 % pour l'extrait aqueux et de l'ordre de 16,9 % pour l'extrait méthanolique, par rapport au 50g de la plante broyat. Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est pas relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

Le protocole d'extraction utilisé dans cette étude respecte les paramètres qui régissent les extractions solide-liquide concernant l'extraction des polyphénols qui sont : l'augmentation de temps de contact du matériel végétal avec le solvant d'extraction, ainsi que la diminution de la taille des particules afin d'augmenter le coefficient de diffusion du solvant. Bruneton (1999) rapporte que l'extraction des hétérosides peut être effectuée le plus souvent à chaud par l'acétone

ou par les alcools (tels que le méthanol ou l'éthanol) additionnés à l'eau, il est possible ensuite de procéder à une évaporation sous vide. D'autres auteurs ont montré que le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les antioxydants d'une plante. Le méthanol aqueux est deux fois plus efficace que le méthanol pur, pour l'extraction des composés phénoliques (Vuorela, 2005).

### III.2.1.2. Analyse phytochimique

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé et sur l'extrait méthanolique préparé à partir de la partie aérienne de *Cistanche tinctoria* mentionnés dans le tableau 3, ont permis de constater la présence de cinq grands groupes chimiques des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes. On note aussi que la présence des stérols, de terpènes et les saponosides n'est que dans l'extrait aqueux et avec des intensités variables.

La mise en évidence des flavonoïdes dans les différents extraits de la plante est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec la tournure de magnésium.

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans nos extraits (aqueux et méthanolique). Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleu verdâtre dans les différents extraits, il s'agit donc des tanins catéchiques. Ces composés polyphénoliques sont des substances reconnues pour leurs propriétés antioxydantes. Les tanins sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines, leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus.

Les tests phytochimiques réalisés ont montré la présence des stérols et triterpènes mais uniquement dans l'extrait aqueux. L'apparition d'un anneau rouge brun et une couche surnageant de couleur verte par l'addition de l'acide sulfurique concentré a confirmé leur présence.

On a remarqué aussi la présence des composés réducteurs, des mucilages, des alcaloïdes ainsi l'absence totale des oses et osides dans nos extraits et des saponosides dans l'extrait méthanolique.

### III.2.1.3. Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins :

A fin de caractériser les extraits préparés à partir de *Cistanche tinctoria*, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007), est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (Abdel-Hameed, 2009).

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes ; (i) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, (ii) la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, (iii) la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, (iv) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (Huang *et al.*, 2005). Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec les acides aminés: tyrosine et tryptophane des protéines. De telles interférences peuvent être négligées car ces acides aminés aromatiques sont en proportions très faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que la plante étudiée a présenté des teneurs en composés phénoliques estimées élevées dans les deux extraits.

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation significative négative entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques, et une corrélation significativement positive entre la teneur des extraits en tanins et en polyphénole.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques arides (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008).

En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh *et al.*, 2008 ; Podsedek, 2007).

### III.2.2. Activités biologiques:

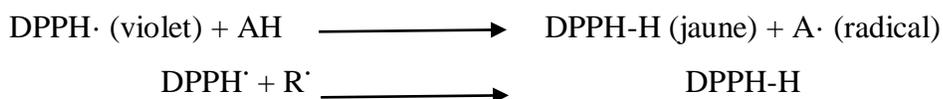
#### III.2.2.1. L'Activité antioxydante *in vitro* :

Selon l'étude bibliographique exhaustive que nous avons réalisée à ce jour, nous n'avons pas trouvé de travaux réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes de la plante utilisée au courant de nos expérimentations. Ce qui représente de cette étude quelle soit la première exploration des propriétés antioxydantes de *Cistanche tinctoria*.

Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (Prior *et al.*, 2005). Pour cette raison, nous avons utilisé trois techniques complémentaires.

##### a). Méthode de balayage du radical libre DPPH :

Le radical DPPH· est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008). L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH· à 517nm, qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présents dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes (Maisuthisakul *et al.*, 2007).



Selon Turkmen *et al.*, 2007 les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. Turkmen *et al.*, 2007 ont constaté que les extraits du thé noir ayant une activité anti-oxydante très élevée, ont également un contenu plus élevé en polyphénols.

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre devrait être pris en considération dans l'activité biologique.

D'un autre côté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants.

**b). Test de blanchissement du  $\beta$ -carotène**

La méthode d'évaluation de l'activité antioxydante par la décoloration du  $\beta$ -carotène est une méthode spectrophotométrique qui permet de suivre, à 490 nm, la décoloration du  $\beta$ -carotène au cours du temps de la réaction. D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué clairement l'effet de l'antioxydant de référence (BHT) exercé en inhibant la décoloration du  $\beta$ -carotène observé par la faible décroissance de l'absorbance à 490 nm au cours des 60 minutes de la cinétique. Les deux extraits aqueux et méthanolique de *Cistanche tinctoria* ont présenté un effet efficace concernant l'inhibition de la décoloration du  $\beta$ -carotène remarqué par une minime décroissance de l'absorbance. Ozsoy et al (2008) ont trouvé pour le BHT un pourcentage égal à 93 %, ce qui est en accord avec la valeur que nous avons trouvée. Dans ce modèle de mesure de l'activité antioxydante, le  $\beta$ -carotène subit une décoloration rapide en l'absence d'un antioxydant qui aboutit à une réduction de l'absorbance de la solution d'essai avec le temps de réaction (Khadri et al., 2008), cela est dû à l'acide linoléique qui produit des hydroperoxydes pendant son incubation à 50 °C (Kubola et Siriamornpun., 2008), ces derniers attaquent les insaturations du  $\beta$ -carotène, et en conséquence, la couleur caractéristique de ce dernier disparaît (Khadri et al., 2008). De ce fait, la présence d'un antioxydant dans l'extrait permettra de réduire au minimum l'oxydation du  $\beta$ -carotène par les hydroperoxydes. Deba et al. (2008) suggèrent que l'activité antioxydante des polyphénols extraits des plantes réside dans le fait que ces derniers ont la capacité de donner des atomes d'hydrogène aux radicaux libres (hydroperoxydes du milieu réactionnel) issus de l'oxydation de l'acide linoléique et, par conséquent, stoppent l'attaque de ces radicaux sur le  $\beta$ -carotène. Dans le même contexte, Mayachiew et Devahastin, dans leur publication (Mayachiew et Devahastin., 2008), attribuent aux polyphénols leur pouvoir antioxydant, dans ce type de méthode, à leurs propriétés redox qui incluent le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de l'oxygène singulet et leur pouvoir de céder leurs atomes d'hydrogène. Dans cette méthode, nous avons remarqué que les extraits de la plante étudiée a présenté une activité élevée, ce qui indique que cette plante possède des composés phénoliques à activité antioxydante non négligeable, car comparée à celle de l'antioxydant de référence BHT, la valeur trouvée pour *Cistanche tinctoria* n'est pas trop éloignée.

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et al., 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du

$\beta$ -carotène, parait très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

**c). Activité antioxydante par la méthode de piégeage du peroxyde d'hydrogène :**

Le peroxyde d'hydrogène en lui-même n'est pas très réactif, mais il est parfois toxique pour la cellule parce qu'il est à l'origine des radicaux hydroxyles présents dans les cellules. Par conséquent, le retrait de  $H_2O_2$  est très important pour la défense antioxydante dans la cellule (Halliwell., 1991). Il a été démontré que les polyphénols ont une action protectrice chez les mammifères et les cellules bactériennes contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène, avec notamment des composés phénoliques de type flavonoïde, tels que la quercétine, la catéchine et d'autres polyphénols comme les esters d'acide gallique et d'acide caféique (Kumaran et Karuna Karan., 2007). D'après nos résultats, nous avons remarqué que *Cistanche tinctoria* présente une activité moyenne sur le piégeage du peroxyde d'hydrogène comparée à celle de l'antioxydant de référence, le BHT, et ce malgré la teneur en composés antioxydants que renferme cette plante, cela peut être expliqué par des phénomènes intrinsèques d'auto-inhibition et par les teneurs en composés qui ont le pouvoir de piéger ce type de radicaux et qui ont la capacité de donner des électrons pour favoriser la conversion du  $H_2O_2$  en  $H_2O$ .

**III.2.2.2. L'évaluation de l'activité antidiabétique chez la ratte non gestante :**

Le diabète est une maladie complexe tant par ses mécanismes physiopathologiques que par son déterminisme génétique ainsi que la genèse de ses complications. Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon très alarmante. Le traitement pharmacologique actuel du diabète est représenté essentiellement par l'insuline et les hypoglycémiant oraux, représentés par les insulinosécréteurs, les sensibilisants de l'insuline et les inhibiteurs de la glucosidase. En outre, les médicaments anti-diabétiques ont généralement des effets secondaires, une diminution de l'efficacité au fil du temps, une inefficacité contre les complications diabétiques à long terme et un faible rapport coût-efficacité (Grover *et al.*, 2002). En conséquence, la découverte et le développement de nouveaux médicaments antidiabétiques est encore plus qu'indispensable.

La médecine populaire pratiquée par l'homme à travers le monde est basée essentiellement sur l'utilisation des plantes médicinales, qui sont largement utilisées, en raison de leur efficacité, des effets secondaires limités, et des coûts relativement bas (Hwang *et al.*, 2005). Il est aujourd'hui

largement reconnu que le monde végétal constitue la source majeure de médicament grâce à la richesse des produits dit du métabolisme secondaire (Eddouks et *al.*, 2007).

*Cistanche tinctoria*, une plante saharienne du sud algérien, localement appelée Danoun, selon nos meilleurs connaissances, n'a jamais été étudiée, l'une des trésors de notre patrimoine végétale utilisée traditionnellement dans le sud algérien pour traiter l'infection, les troubles intestinaux, et le diabète. L'étude bibliographique préalable réalisée a montré que l'on disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique concernant d'autres espèces du même genre, alors qu'il n'existe aucune étude propre à l'espèce *Cistanche tinctoria*.

Le but de cette partie d'étude est de mettre en évidence l'impact des extraits (EA, EM) d'une plante médicinale (*Cistanche tinctoria*) sur la glycémie et les teneurs de certains paramètres biochimie et immunologique d'une part, et d'autre part sur le statut antioxydant au niveau du foie, pancréas et du muscle cardiaque, chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la STZ.

Le diabète sucré peut être modélisé chez l'animal par différentes techniques, entre autres chimiques, la streptozotocine est un dérivé nitrosurique isolé de *Streptomyces griseus* qui représente l'une parmi plusieurs substances utilisées pour induire un diabète insulino-dépendant ou non insulino-dépendant chez les rats (Szkudelski., 2001).

Dans notre étude on a constaté que l'injection de la STZ à une dose de 50 mg/kg peut induire chez des rats le développement de diabète de type 1 (Lenzen, 2008). La STZ engendre une nécrose des cellules  $\beta$  pancréatiques et une carence sévère en insuline avec une hyperglycémie diabétique établie dans les deux jours suivants (Szkudelski., 2001). Les effets toxiques de la substance semble être associés à une formation accrue des radicaux libres (Bedoya et *al.*, 1996), à une altération de la membrane plasmique des cellules  $\beta$  ainsi d'une fragmentation d'ADN conduisant à l'activation de poly (ADP-ribose) synthétase et une déplétion de taux de  $\text{NAD}^+$  cellulaire (Wilson., 1988).

Dans le cas général, le poids corporel des rats rendus diabétiques par la STZ diminue, mais il est récupéré une fois que les rats sont soumis à un traitement hypoglycémique (Ramesh et *al.*, 2010). Dans la présente étude, le diabète induit par la STZ était caractérisé par une perte sévère de poids corporel, qui a également été rapportée par d'autres chercheurs (Avila et *al.*, 2013). La diminution du poids corporel par rapport aux rats normaux pourrait être due à un mauvais contrôle glycémique. Le catabolisme excessif des protéines pour fournir des acides aminés pour la gluconéogenèse pendant la déficience en insuline entraîne une atrophie musculaire et une perte

de poids chez les rats diabétiques non traités (Ramesh et *al.*, 2010). L'administration par voie orale des extraits à partir de différentes plantes médicinales a entraîné comme conséquence l'augmentation de poids corporel des rats diabétiques (Akpan et *al.*, 2007 ; Sefi et *al.*, 2011 ).

Dans nos résultats, l'administration de l'EA et l'EM a induit une augmentation non significative dans le poids pondéral des rats diabétiques. Cette amélioration du poids corporel pourrait être due à une amélioration de la sécrétion d'insuline et du contrôle glycémique (Eliza et *al.*, 2009). De même, l'extrait aqueux de *C.tinctria* diminue la polyphagie et la polydipsie chez les rats diabétiques traités par rapport au groupe DNT.

Les désaccords dans les poids d'organes chez les rats expérimentaux sont également surveillés pour le diagnostic indirect de diabète. Kim (1997) a montré que les poids du foie et de pancréas ont augmenté chez les rats diabétiques. Basé sur ces résultats, nous avons constaté que l'administration de l'EA et l'EM a mené l'effet diabetogénique de la STZ et a réduit le degré de diabète. Ces résultats nous encouragent à croire que l'administration par voie orale d'EA et d'EM peut avoir un avantage potentiel sur le diabète, en empêchant le dommage pancréatique induit par les produits chimiques, environnementaux et d'autres facteurs causant le diabète.

Comme il a été décrit précédemment, le traitement par la STZ inhibe la sécrétion d'insuline par le pancréas suite à une destruction des cellules bêta des îlots pancréatiques ce qui induit une augmentation significative dans la concentration du glucose chez les rats (Zhang et *al.*, 2000). Deux mécanismes fondamentaux qui causeraient une hyperglycémie lors d'un diabète, d'une part par un mécanisme de surproduction (excès de la néoglucogenèse et la glycogénolyse), d'autre part par la diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques (Arulselvan et Subramanian., 2007). Les extraits des plantes peuvent jouer le rôle critique en réparant les dommages de la cellule bêta pancréatique et en favorisant la synthèse d'insuline, de ce fait, ils abaissent brièvement le niveau plasmatique du glucose. Les résultats indiquent que le traitement des rats diabétiques est accompagné d'une diminution du taux du glucose. Il est de l'ordre de 30% pour l'EA, et de 47% avec l'EM, Nous avons également suggéré que l'effet hypoglycémique des extraits (EA et l'EM) peut être expliqué par le fait qu'il pourrait augmenter l'utilisation de glucose chez les rats diabétiques en favorisant la sécrétion d'insuline dans le pancréas, ou pourrait inverser les caractéristiques cataboliques de la carence en insuline (i) stimulant l'utilisation périphérique du glucose, (ii) augmentant l'élimination du glucose du sang ou (iii) la

réduire l'absorption du glucose au niveau du tractus gastro-intestinal, cependant le mécanisme d'action exacte reste encore mal élucidé.

Le profil lipidique est devenu d'une importance cruciale via son utilisation dans le traitement de plusieurs maladies (Akuyam., 2007). Le diabète sucré est aussi associé avec une hyperlipidémie et provoque de profondes anomalies dans la concentration et la composition des lipides. Ces anomalies représentent un important facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont rapporté que les complications cardiovasculaires associées au diabète sont dues aux perturbations du métabolisme lipidique (Shamaony et *al.*, 1994 ; Akuyam et *al.*, 2007 ; Qi et *al.*, 2008).

Les résultats de notre étude ont montré une augmentation significative du cholestérol, des triglycérides, des lipides totaux et des VLDL-C, associée à une diminution remarquable des HDL-C. Nos résultats sont en accord avec ceux montrés par (Sharma et *al.*, 2008 ; Ong et *al.*, 2010). L'hyperlipidémie observée peut être expliquée par la carence en insuline qui inhibe la 3-hydroxy-3-méthyl glutamyl coenzyme A réductase (HMG-coA réductase) une enzyme clé pour la biosynthèse du cholestérol (Betteridge et *al.*, 2002), D'autre part, La concentration élevée des lipides totaux, cholestérol et triglycéride observées chez les rats diabétiques peuvent être le résultat de la fonction anormale du foie provoquée par les dommages résultant de la STZ, ce qui agit directement ou indirectement en augmentant le niveau de glucose de plasma et en perturbant le métabolisme glucidique (Sefi et *al.*, 2011). Ce qui montre que la STZ agit donc surtout au niveau du glucose et, cette augmentation au lieu qu'elle prend sa voie normale dans l'élaboration de l'énergie nécessaire aux fonctions vitales de l'organisme, une grande partie du glucose est transformée en acides gras et glycérol et enfin la synthèse des triglycérides et cholestérol.

La recherche de nouvelles drogues capable de réduire et/ou de réguler la concentration sérique du cholestérol total et des triglycérides a gagné d'élan ces dernières années. Les extraits de plantes constituent un potentiel candidat, elles contiennent souvent une mixture très complexe de différentes molécules, de polarité distincte, capable de réduire la concentration sérique des lipides par différents mécanismes (Eddouks et *al.*, 2004).

Le traitement des rats diabétiques avec les deux extraits aqueux et méthanolique induit une diminution significative des lipides totaux, de cholestérol, des triglycérides et des VLDL-C de l'ordre de 17.07%, 18.77% et 43.01% respectivement chez les rats traités avec l'EA et de 18.93%, 20.27% et 50.61% pour ceux traités avec l'EM. D'autre part on note une l'augmentation

du taux des HDL-C connus sous le nom du bon cholestérol à cause de leur rôle bénéfique contre les complications cardiovasculaires principalement l'athérosclérose, on constate que l'EM a des effets bénéfiques sur le métabolisme lipidique meilleur que l'EA. De nombreux travaux indiquent que les extraits des plantes diminuent la concentration des lipides totaux, cholestérol et triglycérides plasmatiques. On peut expliquer cette diminution des lipides par l'effet des extraits sur l'absorption intestinale du cholestérol et du triglycéride. La diminution des acides gras, particulièrement les acides gras saturés, réduiraient la concentration sérique du cholestérol, l'effet hypotriglyceridémie pourrait être dû à une absorption retardée des triglycérides dans le petit intestin induite par la viscosité élevée du contenu intestinal (Sefi et *al.*, 2011), la diminution de la synthèse des acides gras (Bopanna et al., 1997), l'augmentation du catabolisme des LDL, l'activation des lipases tissulaire (Khanna et al., 2002) et/ou inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase (Mc Carty, 2001) et par la production des précurseurs de triglycérides tels que acétyl-CoA et de glycérol phosphate.

Dans les tissus adipeux l'insuline a une action antilipolytique en inhibant la lipase. Nos résultats montrent une diminution de la concentration plasmatique des protéines totales et d'albumine mais une augmentation de l'urée et de la créatinine chez les rats diabétiques. Ce qui explique la dégradation des protéines en acides aminés puis en urée et créatinine, ce qui induira une diminution des composés protéiques du corps. Cependant les résultats montrent que chez les rats traités avec l'EM on note une augmentation de la concentration des protéines et d'albumine de 4.39% à 10.45% avec une diminution de l'urée, de la créatinine de 33.87%, à 52.21%. En revanche chez les rats traités avec l'EA on note une augmentation non significative (de l'ordre de 1.97%) dans la concentration d'albumine avec une diminution dans la concentration d'urée (42.33%), et de la créatinine (51.32 %) et on note qu'il n'y a aucun effet sur la concentration des protéines totales. Ceci est en accord avec les résultats précédents qui ont montré que les extraits des plantes jouent un rôle positif dans l'amélioration de la concentration du glucose. Alors, dans ce cas la dégradation des protéines diminue, et leur synthèse augmente. La concentration de l'urée et de la créatinine diminue. Il est important d'envisager une étude qui permettrait d'élucider ce mécanisme.

Les transaminases sont des enzymes importants dans les processus biologiques de l'organisme, ces enzymes sont impliqués dans la dégradation des acides aminés en acide  $\alpha$ -cétonique qui complète son métabolisme à travers le cycle de Krebs et la chaîne de transport d'électron.

Dans notre étude expérimentale, nous avons noté une augmentation significative dans l'activité des transaminases chez les rats diabétiques. Cette augmentation est synonyme d'un dysfonctionnement de la fonction des hépatocytes en réponse aux effets nocifs de la STZ. L'hyperglycémie provoque la dégradation des protéines du corps en acides aminés, ceci augmente l'intensité de la néoglucogenèse. Ainsi ces acides aminés peuvent se transformer sous l'action des transaminases plasmatique en composés carboxyliques tel que l'acide  $\alpha$  - céto glutarique et l'acide pyruvique puis en glucose. Ce qui implique alors une forte activité enzymatique d'ASAT et d'ALAT.

Comme il est indiqué dans le Tableau 17, l'activité des transaminases (ASAT et ALAT) a diminué après le traitement par les extraits. L'activité de l'alanine aminotransférase montre un changement chez les groupes expérimentaux, une réduction marquée (26.06%) chez le groupe diabétique traité avec l'EA et de (23.40 %) chez le groupe diabétique traité avec l'EM. Pour l'aspartate aminotransférase on observe une réduction plus importante chez le groupe traité avec l'EM (43.87%) que celui traité avec l'EA (32.92%). Ce qui signifie que les deux extraits peuvent jouer un rôle atténuateur vis-à-vis la fonction du foie en réduisant la concentration sanguine en glucose ou par quelques autres mécanismes, capable de réduire la dégradation des protéines et l'accumulation des acides aminés dans le sang et par conséquent il y a diminution de l'activité enzymatique des transaminases.

Le glycogène est la forme de stockage intracellulaire primaire de glucose et ses niveaux dans divers tissus sont une réflexion directe d'activité d'insuline car cette hormone favorise le dépôt intracellulaire de glycogène en stimulant le glycogène synthétase et en inhibant le glycogène phosphorylase (Valdiguie, 2000).

Nos résultats montrent une diminution significative dans la teneur hépatique en glycogène chez les rats diabétiques, cette diminution est due à la destruction sélective des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans par la STZ, ayant pour résultat une diminution dans la concentration plasmatique d'insuline. D'autre pensent que cette diminution pourrait être due à la perte de système d'activation de glycogène synthétase et/ou plus grande activité de glycogène phosphorylase (Zhong *et al.*, 2004).

Le traitement des rats diabétiques par les deux extraits a augmenté d'une manière significative la teneur hépatique en glycogène. Boby (2010) a démontré que l'administration des extraits des plantes a une influence profonde sur le métabolisme des hydrates de carbone chez les animaux. Il

active la glycogénèse et par conséquent augmente le taux de glycogène hépatique.

Le diabète est considéré comme une maladie auto-immune causée par une attaque pancréatique par des lymphocytes T autoréactifs. Diverses cellules inflammatoires produisant différentes cytokines pro-inflammatoires pourraient également être impliquées, et la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques accompagne la réponse inflammatoire (insulite). L'insulite destructrice est associée à des taux élevés en cytokines Th1 (IL-2, IL-12 et IFN- $\gamma$ ) et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\beta$  et IFN- $\alpha$ ) dans des modèles animaux (Alnek *et al.*, 2015). Dans cette étude, nous avons mesuré les taux plasmatique en cytokines (IL-1 IL6, IL10 et TNF- $\alpha$ ) pour établir un lien avec le diabète. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative dans la concentration plasmatique d'IL-1 $\beta$ , IL-6, d'IL-10 et TNF- $\alpha$ , chez les rats diabétiques en comparaison avec les témoins. Des études récentes suggèrent que l'expression de cytokine aberrante joue un rôle important dans la pathogenèse de diabète en déclenchant l'apoptose des cellules bêta. Cependant, on ne dispose que de données limitées sur la corrélation entre les taux circulants de cytokines et le diabète (Yazar *et al.* 2011).

Plusieurs études, a été rapportée la diminution de la production d'IL-2 dans le diabète de type 1, mais sa cause n'a pas été élucidée, Zier (1984) suggérant que la réduction de la synthèse IL-2 est spécifique au diabète de type 1 non explicable uniquement par un mauvais contrôle métabolique et pourrait donc être impliqué dans la pathogenèse de la maladie. En outre, les faibles taux d'IL-2 peuvent être expliqués par une consommation anormale ou par un facteur sérique qui interfère avec la production d'IL-2 (Yazar *et al.* 2011). Nos résultats indiquent une diminution significative dans le taux d'IL2 dans le groupe diabétique. Ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle la cytokine IL-2 joue un rôle dans la pathogenèse du diabète de type 1.

Plusieurs études expérimentales indiquent que les métabolites secondaires présents dans les extraits des plantes jouent un rôle important dans la modification de profil de cytokines (Weiss *et al.*, 2011). Dans notre étude, ainsi que dans des travaux antérieurs (Weiss *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2013), la préparation à base de plantes entraîné une amélioration dans le profil pro inflammatoire avec une diminution significative pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, et non significative pour IL-10 et TNF- $\alpha$ .

Le stress oxydant soit un phénomène non spécifique d'altération cellulaire, il est évoqué dans le cadre des complications liées au diabète. En effet, diverses études ont mis en évidence une élévation des marqueurs du stress oxydant en mesurant notamment les marqueurs de la

peroxydation lipidiques et une diminution du système de défense antioxydant enzymatique et non enzymatique chez les diabétiques de type 1, de type 2 et dans le diabète expérimental.

Au cours du diabète le stress oxydant peut être partiellement réduit par les antioxydants. Une supplémentation par des antioxydants, tel que la vitamine C et E, a été proposée comme un traitement complémentaire (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2000). Ainsi, plusieurs métabolites secondaires isolés de la plante ont montré une activité antioxydante et une capacité de prévenir les effets toxiques du stress oxydant au cours du diabète.

De nombreuses études expérimentales ont montré les effets bénéfiques de l'administration des extraits de plusieurs plantes, utilisés en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète, sur la balance oxydant/antioxydant ainsi que leurs capacités de prévenir le développement des complications liées au diabète. Donc on a consacré cette partie de l'étude pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits aqueux et méthanolique lyophilisé de *Cistanche tinctoria* et de sa capacité de protéger les tissus hépatiques, pancréatique et le muscle cardiaque contre les dommages tissulaires qui peuvent être causés par la production excessive des espèces réactives de l'oxygène et des produits de peroxydation lipidiques lors du diabète.

La présente étude a révélé une augmentation significative de MDA, et  $O_2\cdot$  et une réduction importante de la capacité antioxydante totale (FRAP), de l'activité des enzymes antioxydants (SOD, CAT, GSHPx, Gst) et des teneur en antioxydants non enzymatique (GSH, Vit C et Vit E) hépatique et pancréatique chez les rats diabétiques.

Le stress oxydatif dans le diabète coexiste avec une réduction du pouvoir antioxydant (Nakhaee et al., 2009). Cakatay et al (2002) ont également indiqué que les niveaux de capacité antioxydante totale (FRAP) dans le plasma des animaux diabétiques étaient significativement réduits par rapport à aux animaux témoins.

Le présent travail a indiqué les mêmes résultats obtenue par des autre auteurs (Cakatay et al., 2002 ; Nakhaee et al., 2009) et montré une réduction significative de la FRAP d'homogénat plasmatique et hépatique de rats diabétiques par rapport aux animaux témoins. Le traitement avec les extraits de *Cistanche tinctoria* a amélioré significativement le pouvoir antioxydant chez les rats diabétiques traités comparativement au groupe diabétique non traité.

Dans la présente étude, les résultats indiquent que la production d' $O_2\cdot$  au niveau plasmatique et hépatique chez les rats diabétiques est significativement augmenté par apport au rats non diabétiques. Cette augmentation induit une diminution significative dans l'activité enzymatique

de la SOD. L'augmentation de la production du d'une part a l'activité cytotoxique du STZ sur les cellules bêta, et la formation de radicaux super oxydes d'autre part, la concentration élevée en glucose qui provoque une auto-oxydation qui par la suite aboutissant à la formation des anions superoxydes. L'administration des extraits de *Cistanche tinctoria* pendant 21 jours conduit à une diminution significative de la production d'ion superoxyde par rapport aux rats diabétiques. Ce qui signifie que les deux extraits peuvent jouer un rôle atténuateur vis-à-vis l'action cytotoxique du STZ et du glucose ou par quelques autres mécanismes, capable de réduire la production d'O<sub>2</sub>.

Une telle hyperperoxydation de MDA pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox cellulaire dans le pancréas et le foie en faveur des prooxydants, car la STZ s'est avéré générateur de radicaux libres qui, par leur pouvoir oxydant, sont à l'origine de l'oxydation de l'ADN, de lipides et de carbohydrates aboutissant ainsi à la mort des cellules β et l'installation du diabète. La diminution de l'activité enzymatique du catalase peut être due à son inhibition par les réactions de la glycation non enzymatique, alors que la déplétion en GSH réduit peut signifie son oxydation par les radicaux libres en GSSG oxydé. Ces données supposent l'idée que l'hyperglycémie induit le stress oxydant chez les modèles animaux comme il était montré précédemment (Saxena, 1993). Le traitement des rats diabétiques par l'EA et l'EM de *Cistanche tinctoria* a non seulement diminué la formation de MDA au niveau du foie et de pancréas mais aussi il a modifié positivement le statut en GSH et de même l'activité enzymatique du CAT, SOD, GSH-Px. Ces résultats suggèrent l'effet modulateur de *C. tinctoria* sur le stress oxydant et l'action cytotoxique induite par la STZ, donc il a pu améliorer l'état pathologique du diabète par inhibition de la peroxydation lipidique. En outre, la réduction de la peroxydation lipidique chez les rats diabétiques traités par la plante peut être due à l'augmentation du statut antioxydant, car les deux extraits de la plante ont présentés une haute activité antioxydante (une augmentation de l'activité de la SOD, de la CAT, de la GSH-Px, de la concentration du GSH, et de la concentration en vitamine (E et C) par rapport aux groupes témoins). Initialement, nous avons démontré l'effet scavenger, l'activité antioxydante et anti-peroxydation lipidique des extraits in vitro. L'étude phytochimique de la plante nous a permis de détecter la présence de certains types de composés qui semblent avoir, en plus l'activité antihyperglycémiant, une activité antioxydante comme les polyphénols, les saponines, les tanins et les flavonoïdes. Il est admis que ces composés notamment les flavonoïdes présentent une activité antioxydante importante. Ces résultats suggèrent donc que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *Cistanche tinctoria*

a pu exercer une activité antioxydante et protéger les tissus hépatiques et pancréatiques des attaques radicalaires.

La cardiomyopathie diabétique implique un ensemble de changements des mécanismes cellulaires et moléculaires, tel que la régulation du système en rénine-angiotensine, l'apoptose des cardiomyocytes et la nécrose cellulaire (An et Rodrigues., 2006). Des études cliniques et expérimentales récentes ont démontré que des concentrations élevées de glucose plasmatique accroissent d'une manière significative la fréquence de l'apoptose des cardiomyocytes et la nécrose cellulaire, conduisant à une perte supérieure à 30% de l'ensemble des myocytes (Trea et al., 2013).

Des études expérimental chez l'animal ont mis en évidence une corrélation entre l'hyperglycémie et la surproduction des ROS et la fréquence de l'apoptose des myocytes (Trea et al., 2013).

Plus encore, l'activation du système angiotensine-rénine chez des animaux diabétiques engendre un état de stress oxydatif via la stimulation NADH/NADPH oxydase. L'inhibition de ce système par un prétraitement en antioxydant réduisait l'apoptose et l'intensité du stress oxydant chez les rats diabétiques.

La présente étude montre clairement que le diabète expérimentalement induit par la STZ provoque une augmentation du poids absolu et relatif du cœur en comparaison aux rats normoglycémiques. Chez les rats diabétiques, l'activité des piègeurs des radicaux libres au niveau cardiaque, la SOD, la CAT, la GSH-Px, GST, la teneur en GSH et en vitamine C cardiaque se trouve significativement diminuée. Ces changements biochimiques pourraient contribuer à l'activation du processus apoptotique des cardiomyocytes. Il a été démontré que dans des conditions oxydantes, le NF-kB un facteur de transcription impliqué dans une grande variété de réponse cellulaires (inflammatoire, croissance et apoptose) se trouve activé.

Le traitement pendant 3 semaines par les extraits de *Cistanche tinctoria* a amélioré d'une part l'activité de système antioxydant à savoir, la CAT, la SOD, la GSH-Px, GST et la teneur en GSH en en vitamine C chez les rats diabétiques. Le diabète est associé à un niveau élevé d'acides gras libres, ces derniers sont connus pour leur effet inducteur de l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques et des cellules de l'endothélium vasculaire humain. Dans ce sens nous avons signalé au niveau des résultats une augmentation des MDA index de la peroxydation des lipides chez les rats diabétiques qui est due à une production accrue de radicaux libres. L'hyperglycémie

chronique augmente l'intensité du stress oxydant via l'autooxydation des monosaccharides, conduisant à la production de superoxydes, et d'hydroxyles. Ces radicaux peuvent engendrer des dommages au niveau du cœur en se combinant aux acides gras poly insaturés membranaires afin d'augmenter MDA. Nos résultats montrent une atténuation des niveaux des MDA et une amélioration du statut antioxydant (GSH, Vit C, CAT, GSH-Px, GST et SOD) après administration orale des extraits chez les rats diabétiques. Ceci conforte l'hypothèse que c'est par son potentiel antioxydant que les extraits de notre plante pourraient préserver le muscle cardiaque contre les attaques radicalaires dans un environnement diabétique entraînant une diminution des risques d'apparition de cardiomyopathies diabétiques.

### **III.2.2.3. L'évaluation de l'effet prophylactique sur la tératogénicité chez la ratte diabétique.**

Notre étude expérimentale a mis l'accent sur les potentialités anti-tératogéniques de deux extraits de *Cistanche tinctoria*, principalement sur l'effet des molécules polyphénoliques phytochimiquement actives qu'ils renferment, chez des rattes gestantes diabétiques.

Etant donné que le diabète de type I est caractérisé par une hyperglycémie, une hypertriglycéridémie, une hypercholestérolémie, et une hypo protéinémie qui sont dues à des défauts de sécrétion de l'insuline, notre exploration des effets métabotropes des extraits chez les rattes diabétiques gestantes a englobé les paramètres plasmatiques servant d'indicateurs de base en diabétologie, à savoir le glucose, le bilan lipidique (triglycérides, le cholestérol, lipides totaux et l'HDL-C) et le bilan protéique (les protéine totales et l'albumine).

L'adjonction orale des extraits après l'administration de la streptozotocine s'est répercutée tardivement sur l'évolution glycémique gestationnelle. En effet, au premier jour, l'hyperglycémie témoignant de l'installation du diabète de type I n'a pas été influencée par la mise en route du traitement. Ce statut hyperglycémique ne semble pas avoir des retombées offensives sur la physiologie des pré-embryons durant la phase péri-implantatoire. En fait, chez les mammifères, le produit de conception est amené à confronter un gradient décroissant en O<sub>2</sub> pendant sa descente dans l'oviducte, et les conditions hypoxiques et même anoxiques utérines sont contrebalancées par un gradient croissant en glucose d'origine plasmatique, favorisant ainsi fortement l'activité glycolytique anaérobie qui est requise à ce stade du développement (Toumiet *al.*, 2009).

Par ailleurs, l'évolution gestationnelle s'accordait avec une chute significative de la concentration

plasmatique du glucose au jour 14 chez les rattes diabétiques traitées avec persistance de ce statut glycémique au 20<sup>ème</sup> jour de la gestation. Cet effet hypoglycémiant lent, qui tendait à établir une normalisation pré-partum possible, a été auparavant constaté dans plusieurs contextes diabétologiques (Volpato et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les deux extraits peut jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme glucidique, en protégeant les cellules  $\beta$  contre l'effet cytotoxique de la streptozotocine.

Dans ce contexte, plusieurs études sont en faveur de l'action hypoglycémiante efficace des extraits de maintes plantes médicinales dans le diabète maternel, telles *Bauhinia forficata* (Damasceno et al., 2004 ; Volpato et al., 2008), *Ginkgo biloba* (Rudge et al., 2007), *Morus nigra* (Volpato et al., 2011), (Shivananjappa, Muralidhara, 2012) et *Hibiscus rosa-sinensis* (Afiune et al., 2017). Cette constatation primaire de l'effet anti-diabétogène de notre plante illustrerait la capacité potentielle du principe actif quelle contienne à prévenir l'agressivité d'une glucotoxicité maternelle chronique qui est à la base des changements physiopathologiques initiées par le stress oxydatif dit glucodépendant. Or, le rétablissement glycémique pendant la phase organogénétique précoce démasque l'effet anti-tératogène indirect de nos extraits vu l'incrimination franche de l'excès glucidique dans les processus apoptotiques déformateurs (Shivananjappa, Muralidhara, 2012).

L'insulinodéficiencia causera inévitablement une lipolyse progressive résorbant les stocks graisseux maternels tout en minimisant l'effet satiétogène de la leptine, ce qui intensifie le comportement polyphagique insulinodépendant. Effectivement, les rattes diabétiques gestantes montraient une hypertriglycéridémie légère témoignant de l'élévation du taux des lipoprotéines à très faible densité (*VLDL, very low density lipoproteins*) déchargés par le foie en réponse à sa saturation en acides gras libres. Ces déviations biochimiques ont été considérablement corrigées par l'administration des deux extraits qui tendaient à restaurer le niveau plasmatique des *VLDL*, précurseurs indirects des lipoprotéines à faible densité (*LDL, low density lipoproteins*). Cet effet modérément hypotriglycéridémiant valorise l'avantage de traitement par les extraits des plantes antérieurement rapportée (Zhao-Hua Tian et al., 2015). L'efficacité de nos extraits semble être multipolaire du fait de la diversité de ses modes d'actions.

En fait, les études précédentes ont montré que les extraits des plantes, inhibe la synthèse des acides gras et la phosphatidate phosphohydrolase, deux enzymes clés impliquées dans la lipogénèse, augmente l'expression des récepteurs périphériques aux LDL et accélère le rejet de l'excès lipidique

à travers la bile (Damasceno *et al.*, 2004). Cet effet hypolipidémiant efficace va de pair avec l'effet hypocholestérolémiant notable qui a été prouvé dans la présente expérimentation. Ainsi, l'adjonction de l'EA et l'EM pourrait corriger sensiblement les dyslipidémies maternelles et jouerait de ce fait un rôle extrêmement important dans la prévention des désordres cardio-angiopathiques directs et embryopathiques indirects.

La résolution, que cette prophylaxie se résume dans le fait que les complications athérosclérotiques pourraient être implicitement amorcées par l'oxydation des LDL en excès et par l'agrégation des macrophages chargés en cholestérol au niveau des micro-vaisseaux coronaires et placentaires. Cet amorçage subtile altère grossièrement la physiologie de l'adaptation des femelles gestantes à la grossesse du fait qu'il existe un trouble de la redistribution nutritionnelle endogène avec une perturbation de l'approvisionnement trophique placentaire primaire, et fœtal secondaire, en concordance avec l'aggravation progressive du dysfonctionnement cardiaque maternel, aboutissant ainsi à une mauvaise formation du labyrinthe placentaire dont la finalité est une restriction de croissance intra-utérine (*IUGR, intra-uterine growth restriction*) (Toumi *et al.*, 2009).

Les résultats relatifs aux lipidémies étaient en accord avec ceux concernant l'évolution pondérale chez les rattes diabétiques gestantes. Cette évolution ne montrait un écartement remarquable entre les trois lots diabétiques (DG, DGEA et DGEM) qu'au début de la phase post-organogénique. En fait, la baisse pondérale observée au jour 14 chez les rattes diabétiques gestantes qui ont été soumises au traitement suggère que les extraits de *Cistanche tinctoria* pourraient réduire les dépôts lipidiques viscéraux, probablement via le blocage de la lipolyse sous-cutanée et la mobilisation de la machinerie enzymatique hépatique régissant la lipogénèse et la glycolyse.

Nos données ont démontré une augmentation significative des taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  chez les rattes diabétiques. Le TNF- $\alpha$  est un médiateur clé des réponses immunitaires et inflammatoires, et il contrôle l'expression du réseau de gènes inflammatoires. La surproduction de TNF- $\alpha$  contribue de manière significative aux complications pathologiques observées dans de nombreuses maladies inflammatoires (Badr *et al.*, 2011). Les différentes complications observées au cours de diabète étaient probablement dues aux taux élevés en cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, nos données ont démontré que les extraits provoquaient une restauration significative des taux plasmatiques de ces cytokines, en particulier le TNF- $\alpha$ . Ainsi, la supplémentation en extraits a des effets anti-inflammatoires et atténue l'inflammation allergique chez les rats diabétiques. Auparavant, les extraits des plantes inhibaient

la production de cytokines pro-inflammatoires induites par le diabète (Cheh *et al.*, 2009).

La diminution de la production d'IL-2 et la réponse proliférative des lymphocytes, fournit une preuve importante de l'altération des fonctions immunitaires (Han *et al.*, 2003). Nos résultats révèlent une diminution significative de taux plasmatique du facteur de croissance des lymphocytes T (IL-2). Plusieurs études ont révélé qu'une diminution du taux plasmatique d'IL-2 (qui favorise la survie et la prolifération des lymphocytes T) est un phénomène évident dans plusieurs maladies et indique un défaut de fonctions de la cellule T (Badr *et al.*, 2011). L'administration des extraits de *Cistanche tinctoria* a amélioré et maintenue une réponse immunitaire efficace des cellules T chez la ratte gestante.

La relation entre les complications diabétologiques et le statut pro/antioxydants maternel constituait ces dernières années un parcours de recherche très étendu (Valko *et al.*, 2007).

Nos résultats ont montré une diminution significative du glutathion réduit (GSH) hépatique, pancréatique et cardiaque chez les rattes diabétiques gestantes. Ce tripeptide ubiquitaire est la pierre angulaire du réseau antioxydant cellulaire qui englobe un ensemble de systèmes enzymatiques éboueurs, tel celui des glutathion S-transférases (GST) (Volpato *et al.*, 2008).

La supplémentation des extraits rétablit partiellement les niveaux hépatique, pancréatique et cardiaque du GSH alors qu'elle atténue simultanément l'hypoactivité de catalase, GSH-Px, SOD et le GST dans ces organes, ce qui nous pousse à considérer nos résultats comme positifs car l'administration des extraits de flavonoïdes était largement liée à une diminution des phénomènes oxydatives via des mécanismes mettant en jeu l'interférence de ces polyphénols avec les systèmes enzymatiques GSH-dépendants (Dastmalchi *et al.*, 2008).

Le diabète maternel augmente le risque de malformations et provoque un retard du développement fœtal dont les mécanismes physiopathologiques sont très peu connus. Cependant, il a été démontré que les catalyseurs enzymatiques des radicaux libres suppriment l'effet tératogène de l'hyperglycémie chronique et d'autres intermédiaires métaboliques. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme commun conduisant à la production des radicaux libres, ces derniers sont considérés comme les principaux médiateurs des complications diabétiques au cours de la grossesse (Ouali *et al.*, 2007).

Nos résultats montrent que le diabète maternel engendre une altération de développement normal des fœtus. Cette altération est caractérisée par une diminution du tour du crane, de la taille et par une augmentation du taux de résorption et de malformations.

Le placenta représente la première ligne de défense envers tout agent embryopathogène. Ce rôle crucial est assuré par la forte sélectivité des microvaisseaux villositaires qui sont pourvus d'une gamme de transporteurs spécifiques et de systèmes enzymatiques particuliers (Jones *et al.*, 2007). Dans ce contexte diabéto-tératologique, étant donné que l'altération initiale de la fonction placentaire a été fortement signalée et que les mécanismes placentaires de l'approvisionnement trophique conditionnent la programmation développementale au cours de la vie intra-utérine, les changements structuraux et fonctionnels de cette barrière causeraient inévitablement des dysrégulations embryogéniques déformatrices (Fernandez-Twinn et Ozanne, 2006 ; Smith et Ozanne, 2006).

Nos résultats ont fait preuve d'une diminution du poids fœtal moyen chez les rattes diabétiques gestantes non traitées. Ces constats s'accordaient avec l'augmentation franche des taux de malformations et de résorptions avec décroissement décelable du nombre total des fœtus. En revanche, le traitement avec EA et EM allégeait considérablement ces tendances embryopathiques morbides.

Nos résultats ont aussi indiqué une augmentation modérée du nombre moyen d'implantations aux dépens d'un décroissement ultérieur dans le nombre total des fœtus recensés chez les rattes diabétiques gestantes non traitées. Cette issue, qui semble être paradoxale, se traduirait par le fait que l'hyperglycémie chronique endommagerait agressivement l'embryon post-implantatoire après l'établissement des connexions sanguines trophoblastiques par déclenchement direct des processus apoptotiques, menant ainsi à une résorption embryonnaire (Sun *et al.*, 2005). D'ailleurs, le traitement par l'EA préservait le nombre total des fœtus après avoir élevé le nombre d'implantations par portée au dépens d'un effet hypoglycémiant maternel bien déterminé, ce qui revalorise d'autant plus son pouvoir anti-tératogène encore mystérieux. Cependant, la positivité de ces données se réfère vraisemblablement à l'activité antioxydante des extraits de *Cistanche tinctoria*. Cette activité permettrait d'établir un environnement local approprié supportant le développement post-implantatoire.

Nos résultats montrent un état de stress oxydatif au niveau des organes fœtaux (foie et cœurs). Cette altération est caractérisée par la diminution des antioxydants enzymatique (GSH-Px, SOD, CAT et GST) et non enzymatique (GSH et Vit C). Le traitement les extraits de *Cistanche tinctoria* semble avoir un effet protecteur via l'activation du système antioxydant et notamment de la catalase. La diminution de l'activité de cette dernière pourrait être à l'origine de l'affaiblissement de la défense des fœtus qui deviennent vulnérables aux attaques des anions

super oxyde  $O_2^{\cdot -}$ : Cederberg et *al.*(2000) suggérant que la décomposition du  $H_2O_2$  par la catalase, peut être un facteur essentiel impliqué dans la protection de l'embryon contre les attaques radicalaire dans l'environnement maternel diabétique. De plus nous avons signalé une augmentation de la teneur en GSH intracellulaire chez les fœtus de rattes diabétiques traitées par l'EA en comparaison à ceux des rattes non traitées. Ce résultat indique que l'EA de peut avoir un rôle important dans le métabolisme et la biosynthèse du glutathion.

Au terme de notre commentaire, on peut conclure que l'administration per os des deux extraits à dose de 200mg/kg aux rattes diabétiques gestantes exerçait des effets hypoglycémians et hypolipidémians prononcés au détriment d'une insulinodéficience expérimentale, contribuait au rétablissement d'une bonne répartition énergétique maternelle adaptative et réduisait fortement le stress oxydatif cardio-hépatique. Fait intéressant, l'amélioration des paramètres métaboliques et oxydatifs maternels a été suivie d'une amélioration importante des paramètres morfo-anatomiques et oxydatifs fœtaux. Toutes ces suggestions scientifiques ne peuvent plus être confirmées à présent, à cause de l'absence actuelle de recherches abordant ce sujet pharmaco-diabéto-tératologique.

L'issue de notre expérimentation modeste pose réellement une série de questions à l'égard de l'effet anti-tératogène de *Cistanche tinctoria*. Nos données font preuve d'un effet prophylactique potentiel de cette plante envers les complications gestationnelles tératogéniques au cours d'un diabète expérimental de type I.

*CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES*



### Conclusion et perspectives

L'usage des plantes médicinales constitue un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la médecine est très accentuée dans ces dernières années grâce à leurs effets thérapeutiques qu'elles exercent et ceci est certainement lié à la présence des molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

Notre étude a été consacrée à les effets antioxydant, antidiabétique et anti-térogéniques attribués à la *Cistanche tinctoria* dans ses deux extraits ; méthanolique et aqueux.

Les résultats obtenus montrent que le dosage des composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de *Cistanche tinctoria* a révélé des teneurs considérables en polyphénols et en tanins avec des quantités appréciables en flavonoïdes et après évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage de radical libre DPPH dans les deux extraits, nous avons observé un pouvoir antioxydant puissant par rapport à celui de BHT, ce qui confirme les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à piéger les radicaux libres. Le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène a montré également que l'extrait hydroalcoolique est plus actif comme inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène.

Cette problématique cruciale, à laquelle nous nous sommes intéressés, se résume dans le fait que l'induction d'un diabète sucré expérimental par l'administration intrapéritonéale de la STZ à dose de 50 mg/Kg de poids corporel chez des ratte rats femelles adultes (non gestante et pré-gestante) a induit des perturbations métaboliques : glucidique, lipidique et protéinique, des dommages dans la fonction de certains organes : foie, cœur et plus particulièrement l'atteinte pancréatique, au niveau de système immunitaire, et entraîne un état de stress oxydatif qui se révèle, par une augmentation significative de MDA, de la production d' $O_2^{\cdot -}$ , avec une consommation cellulaire forte du glutathion réduit (GSH) dans les tissus étudiés (foie, cœur et pancréas), et une diminution du système de défense antioxydant enzymatique et non enzymatique chez la ratte non gestante et gestante.

La perturbation dans l'organisme maternelle provoque un épuisement délétère dans le contenu du GSH, et de l'activité des enzymes antioxydants de leurs fœtus. Cet épuisement dans le statut antioxydant chez les fœtus s'est traduit par une diminution remarquable du nombre fœtal total, vivre et du poids fœtal, avec accroissement simultané des taux de résorptions et de malformations.

En effet, l'accroissement du taux du glutathion réduit (GSH), de la vitamine C, de la vitamine E, de la capacité antioxydante total (FRAP) et de l'activité des enzymes à savoir de la CAT, de la SOD, de la GSH-Px, et de GST chez les rats diabétiques non gestante traités par les deux extraits montrent clairement les propriétés anti-oxydantes de *Cistanche tinctoria*.

La supplémentation par voie oral de l'EA et l'EM à dose de 200mg/kg dans l'eau semble prévenir les complications tératologiques du diabète gestationnel via un effet antioxydant efficace mais inconnu. Cet effet s'est révélé par un rétablissement considérable des paramètres tératologiques dont la finalité est de contrebalancer les désordres oxydatifs au sein de l'unité fœto-maternelle.

Vu l'importance de ces résultats, il serait intéressant de poursuivre la recherche dans le cadre des théorèmes suivants :

- Compléter et d'approfondir ce travail par une étude phytochimique avancée. Dans un premier temps de faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables du pouvoir antioxydant en utilisant des techniques d'identification plus performantes. Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes. Ainsi, on peut aborder l'étude des relation structure –propriété.
- Effectuer des essais pour établir la relation dose - activité ou encore l'élucidation du mécanisme des activités hypoglycémiques et le potentiel antioxydant de extraits chez les animaux.
- Etablir une vue d'ensemble à propos des mécanismes physiologiques régissant le phénomène de l'adaptation gestationnelle et les sollicitations neuro-immuno-endocriniennes qui lui sont associées.

# *Références Bibliographiques*



# Références Bibliographiques

### A

1. Abdel-Hameed E.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. Food Chem. 114: 1271-1277.
2. Åberg A., Westbom L., Källen B. (2001). Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. Early Hum Dev. 61 : 85-95.
3. Aebi H. (1983). Catalase, In: Methods in Enzymatic Analysis (Ed. Bergmer HU), Vol. 3 Academic press, New York.,p. 276–286.
4. Afiune L.A.F., Leal-Silva T., Sinzato Y.K., Moraes-Souza R.Q., Soares T.S., Campos K.E. (2017). Beneficial effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower aqueous extract in pregnant rats with diabetes. PLoS ONE 12(6): e0179785.
5. Ahmed N. (2005). Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res. Clin. Pract. 67(1): 3-21.
6. Akazawa S. (2005). Diabetic embryopathy: Studies using a rat embryo culture system and animal model. Congenital Anomalies. 45 : 73–79
7. Akpan H B, Adefule A K, Fakoya F A, Caxton-Martins EA. (2007). Evaluation of LDH and G6-PDH activities in auditory relay centers of streptozotocin-induced diabetic wistar rats, Journal of Analytical Sciences. 1: 21–25.
8. American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 34, S62–S69.
9. An D., Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy, *Am. J. Physiol-Heart Circ. Physiol*, 291, 2006, 1489-506.
10. Arulselvan P., Subramanian S. P. (2007). Beneficial effects of *Murraya koenigii* leaves on antioxidant defense system and ultra structural changes of pancreatic  $\beta$ -cells in experimental diabetes in rats, Chemico-Biological Interactions. 165: 155–164.

11. Auberval N. (2010). Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle, thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.
12. Avila D. L., Araujo G. R, Silva A. (2013). Amorim-Miranda P H, Diniz M F, Pedrosa M L, Silva M E, Geraldo DE Lima W, Caldeira Costa D, Vildagliptin ameliorates oxidative stress and pancreatic beta cell destruction in type 1 diabetic rats, Archives of Medical Research., 44: 194-202.

### **B**

13. Baba Aissa F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition Edas. 368 p.
14. Babior B.M. (1999). NADPH Oxidase: An update. Blood. 93 :1464-1476.
15. Babior B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. Am. J. Med. 109:33-44.
16. Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. (2002). The neutrophil NADPH Oxidase. Archive of Biochemistry and Biophysics. 397: 342-344.
17. Badr G., Alwasel S., Ebaid H., Mohany M., Alhazza I. (2011). Perinatal Supplementation With Thymoquinone Improves Diabetic Complications and T Cell Immune Responses in Rat Offspring. Cell Immunol. 267(2):133-40.
18. Banerjee M., Vats P. (2013). Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. Redox Biol. 11;2:170-7.
19. Barbour L.A., Shao J., Qiao L., Pulawa K., Jensen D.R., Bartke A., Garrity M., Draznin B et Friedman J.E. (2002). Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 186(3) : 512-517.
20. Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology. 9: 5-21.
21. Beardsall K., Diderholm B.M., Dunger D.B., (2008). Insulin and carbohydrate metabolism. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 22(1): 41-55.
22. Beauchamps C., Fridovich L (1971). Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44: 276-287.
23. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M (1996). N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. Experientia, 52 : 344 - 347.

24. Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. IBIS Press. 764 p.
25. Benaraba R. (2007). Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique : Etude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants nutritionnels (polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III), Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, France.
26. Benchelah A.C., Bouziane H., Maka M. et Ouahes C. (2000). Fleurs du Sahara. Voyage et ethnobotanique avec les touaregs du Tassili. Ed.Ibis Press, Paris. 255 p.
27. Benhouhou, S. (2009). *Cistanche phelypaea* (L.) Coutinho. A Guide to Medicinal Plants in North Africa. 85-86.
28. Benirschke K et Kauffmann P. (1999). Pathology of the human placenta. Fourth edition. New York : Springer Verlag.
29. Benzie Iris F. F et Strain J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry 239, 70–76.
30. Berger M.M. (2006). Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence. Nutrition Clinique et Métabolisme. 20(1):48-53.
31. Beterridge J (2002). Lipide disorder in diabetes mellitus In: pickup J .and Williams. (edds). Textbook of diabetes Blackwell science. London 551-553.
32. Boizot N., Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration, génétique et physiologie forestières, laboratoire d'analyses biochimiques. Le Cahier des Techniques de l'Inra, pp. 79–82.
33. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. (2000). Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance, Diab. & Metab, 26: 163-176.
34. Borg J.M., Reeber A.(2008). Biochimie métabolique, Ellipses, P 420, France.
35. Bouanania S., Henchiric C., Migianu-Griffonib E., Aoufa N., Lecouveyb, M. (2010). Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. Journal of Ethnopharmacology. 129: 38–45.
36. Bouglé A et Annane D. (2009). Les effets de l'insuline : de la cellule à l'organisme entier. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. 28(5) : e193-e199.

37. Bouldjadj R. (2009). Etude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba* Asso chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par streptozotocine, Mémoire de magistère, Université Mentouri Constantine, Algérie.
38. Boumaza A. (2009). Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation, Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine, Algérie.
39. Bounous G. (2000). Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 20(6C):4785-92.
40. Bourin M et Jolliet P. (1999). Pharmacologie générale et pratique. Ed ellipse, Paris. P142
41. Boyer F. (2016). Stress oxydant et pathologie diabétique Impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses. thèse de doctorat, Université de La Réunion, France.
42. Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem* 111: 925–929
43. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive methode for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
44. Bretón-Romero R et Lamas S. (2014). Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol.* 1(2): 529–34. .
45. Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414(6865): 813-20.
46. Brownlee M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diab.* 54(6): 1615-25.
47. Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème
48. Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.
49. Bruneton J. (1999). Flavonoïdes. In : Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, Technique et Documentation (Paris), pp: 310-353.
50. Buccolo. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes ., *Clin Chem* 19(5) : 476-482.

51. Buchanan T.A., Denno K.M., Sipos G.F., Sadler T.W. (1994). Diabetic teratogenesis. In vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose per se. *Diabetes*. 43: 656-660.
52. Buyschaert M. (2012). *Diabétologie clinique*. Bruxelles. De Boeck. p 199.

### C

53. Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S.(2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem*. 383(6):933-43.
54. Caraway, W. T (1963). Macro and micro methods for the determination of serum iron and iron-binding capacity. *Clin. Chem*. 9: 188-99
55. Catalano P.M., Tyzbir E.D., Roman N.M., Amini S.B., Sims E.A. (1991). Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 165(6 Pt 1):1667-72.
56. Cederberg J., Eriksson U.J. (2005). Antioxidative treatment of pregnant diabetic rats diminishes embryonic dysmorphogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 73(7):498-505.
57. Cederberg J., Picard J.J., Eriksson U.J. (2003). Maternal diabetes in the rat impairs the formation of neural-crest derived cranial nerve ganglia in the offspring. *Diabetologia*. 46:1245–1251.
58. Cheh N., Chipitsyna G., Gong Q., Yeo C.J., Arafat H.A. (2009). Anti inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford)*. 11 (5): 373-381.
59. Cheng A. Y.Y et Fantus, I. G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association journal* 172 (2): 213-226.
60. Chiarugi P et Fiaschi T. (2007). Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cellular Signalling*. 19: 672-682.
61. Cooppan R. (2005). General approach to the treatment of Diabetes mellitus. In: Kahn, C.R., Weir, G.C., King, G.L., Jacobson, A.M., Moses, A.C., Smith, R.T. (Eds.), *Joslin's Diabetes mellitus*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 587–596.

62. Cotellet N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. 1: 569-590.
63. Cottet M.J. (1965). Dosage des lipides sériques par la méthode sulfo-phosphovanillique (1) de E Chabrol et R Charonnat. *Académie National de Médecine* 149 : 331-338.

### D

64. Dallaqua B., Saito F.H., Rodrigues T., Calderon I.M.P., Rudge M.V.C., Herrera E., De' bora Damasceno D.C. (2012). Treatment with *Azadirachta indica* in diabetic pregnant rats: Negative effects on maternal outcome. *Journal of Ethnopharmacology*. 143 : 805–811.
65. Dal-ros S., Jeandidier N., Seyfritz E., Bietiger W., Pinget M et Sigrist S. (2013). Apport de l'insulinothérapie par voie intrapéritonéale: impacts sur le stress oxydant impacts et le diabète. *INFUSYSTEMES France*. 30 (2) :13-16.
66. Damasceno D. C., Volpato G.T., Mattos Paranhos Calderon I., Aguiar R., Cunha Rudge M. V.(2004). Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Phytomedicine* 11: 196–201
67. Damasceno D.C., Volpato G.T., Calderon I.M.P., Rudge M.V.C. (2002). Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Animal Reproduction Science* 72, 235–244.
68. Damasceno, D.C., Volpato, G.T. (2008). Antidiabetic botanical extracts. In: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), *Botanical Medicine in Clinical Practice*. CAB International, London, pp. 547–551.
69. Davies K.J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 50(4-5):279–89.
70. Davies MJ. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 1703(2): 93–109.
71. Deba F., Xuan T.D., Yasuda M., Tawat S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oil from *Bidens pilosa* L. Var. *Radiata*. *Food Chem* 19: 356–2 10.
72. Del Rio L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Corpas F.J., Pastori G.M., Bueno P., Lopez-Huertas E. (1996). Peroxisoms as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions*. 24: 434-438.

73. Delattre J., Beaudoux JL., Bonnefont-Rousselot. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, 1-405, Paris.
74. Delattre J., Durand G., Jardillier J.C. (2003). Biochimie Pathologique, Aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-Sciences Flammarion, P 317, France.
75. Delezoide A.L., Khung-Savatovsky S., Guimiot F. (2008). Retentissement foetoplacentaire du diabète et de l'obésité maternels. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie*. 10 (3) : 175-84.
76. Densiov E.T., Afanas'ev I.B. (2005). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), Pp: 703-861.
77. Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 49(4):717-27.
78. Divald A., Powell S.R. (2006). Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic Biol Med*. 40(1):156-64.
79. Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*. 97: 654-660.
80. Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*. 82(1):47-95.
81. Duhault J., Koenig-Berard E. (1997). Diabetes mellitus and its animal models. *Thérapie* 52: 375-84.

### E

83. Eddouks M, Lemhadri A, Michel, JB (2004). Caraway and caper: a potential antihyperglycaemic plants in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 94 : 143 - 148.
84. Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 5 : 194-203.
85. Edeoga1 H.O., Okwu D. E et Mbaebie B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4 (7) : 685-68.
86. Eleazu C.O., Iroaganachi M., Eleazu K. C. (2013). Ameliorative Potentials of Cocoyam (*Colocasia esculenta* L.) and Unripe Plantain (*Musa paradisiaca* L.) on

- the Relative Tissue Weights of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*, 8 pages.
87. El-Haci I.A., Atik-Bekkara F., Didi A., Gherib M., Didi M.A. (2012). Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie* 10: 280–285.
88. El-Haci I.A., Atik-Bekkara F., Didi A., Gherib M., Didi M.A. (2012). Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*. 10:280–285.
89. Eliza J., Daisy P., Ignacimuthu S., Durairandiyar V. (2009). Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.)Sm., in STZ-induced diabetic rats, *Chemico-Biological Interactions*. 182: 67–72.
90. Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70–77.
91. Eriksson U. J., Cederberg J et Wentzel P. (2003). Congenital Malformations in Offspring of Diabetic Mothers—Animal and Human Studies. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 4: 79–93.
92. Eriksson U. J. et Wentzel P. (2012). Diabetic Embryopathy. *Developmental Toxicology*. 425-436.
93. Eriksson U.J et Wentzel P. (2015). The status of diabetic embryopathy. *Upsala Journal Of Medical Sciences*. 121(2): 96–112.
94. Eriksson U.J. (2009). Congenital anomalies in diabetic pregnancy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 14 (2009) 85–93.
95. Eriksson U.J., Borg L.A. (1991). Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia*. 34(5): 325-31.
96. Evers I.M., Nikkels P.G.J., Sikkema J.M., Visser G.H.A. (2003). Placental pathology in women with type 1 diabetes and in a control group with normal and large-for-gestational-age infants. *Placenta*. 24 : 819-25.

### F

97. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynaracardunculus L.* organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 33: 1372-379.

98. Favier. (2003). Le stress oxydant. intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.108-115.
99. Ferreria A., Proenca C., Serralheiro M.L.M., Araujo M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*. 108: 31-37.
100. Filaire E., Toumi H. (2012). Rôle des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'exercice physique sur le métabolisme osseux: amis ou ennemis ?. *rhumatisme* 79 : 387-392.
101. Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*. 36 : 327-358.
102. Fine E.L., Horal M., Chang T.I., Fortin G., Loeken M.R. (1999). Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* : 48:2454-62.
103. Fiordaliso, F, Li, B, Latini, R, Sonnenblick, E H, Anversa, P, Leri, A, Kajstura, J. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II dependent, *Lab. Invest*, 80, 2000, 513-527.
104. Fontaine É. (2007). Radicaux libres - Stress oxydatif. *Cah. Nutr. Diét.* 42 : 2.
105. Frias J.L., Frias J.P., Frias P.A., Martinez-Frias M.L. (2007). Infrequently studied congenital anomalies as clues to the diagnosis of maternal diabetes mellitus. *Am J Med Genet Part A*. 143 : 2904-9.
106. Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.
107. Friedewald W.T., Levei R.I., Fridrickson D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 18(6): 499-502.
108. Friedman J.E., Ishizuka T., Shao J. (1999). Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with previous gestational diabetes. *Diabetes*. 48: 1807-14.
109. Froger J., Prieur C., Rimbart D., Thibault N. (2012). Comprendre le diabète gestationnel. *Actualités pharmaceutiques* 51 (6) : 10-14.

110. Gao Q et Gao Y.M. (2007). Hyperglycemic condition disturbs the proliferation and cell death of neural progenitors in mouse embryonic spinal cord. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25: 349-357.
111. Gardès-Albert M., Bonne font-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité chimique.* 91-95.
112. Gaw A., Michael J. M., Robert A.C., Denis St. J. O., Michael J. S., James S. (2004). *Biochimie Clinique*, Coordination scientifique de l'édition française : Michel Vaubourdolle, PharmD. P 169, France.
113. Gerard-MonnierD., Chaudier J. (1996).Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol Biol.* 44: 77-85.
114. Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.* 4: 162-169.
115. Goldman A.S., Baker L., Piddington R., Marx B., Herold R., Egler J. (1985). Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 8227–8231.
116. Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazaw K. (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine.* 45: 1318-1325.
117. Grimaldi A. (2003). *Guide pratique du diabète.* 2<sup>ème</sup> édition, P 372, France.
118. Grove T.H. (1979). Effect of reagent pH on determination of HDL Cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem.* 25: 560.
119. Guenzet A. (2012). Effets des extraits aqueux lyophilisés de *Portulaca oleracea* et *Zygophyllum gaetulum* sur le profil lipidiques et le statut redox, chez les rats rendus diabétiques par injection de streptozitocine. Thèse de magister, Université d'Oran, Algérie
120. Guillet C. (2010). Implication des produits terminaux de glycation dans les complications liées au diabète. *Nutrition clinique et métabolisme* 24 : 109-114.
- H**
121. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.(1974). Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130–7139.

122. Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2015). Le stress oxydant. *Rev Médicale Liège*.62 (10) : 628-638.
123. Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 91: 14–22 13.
124. Halliwell B., Gutteridge J. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn. New York: Oxford Univ. Press Inc. p: 187.
125. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Second edition, Clarendon Press, Oxford.
126. Halliwell B., Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. 142: 31-2.
127. Hamadi Nacereddine. (2010). Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine, thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine, Algérie.
128. Hammiche V., Maiza K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology* .105 : 358–367
129. Han S.N., Leka L.S., Lichtenstein A.H., Ausman L.M., Meydani S.N. (2003). Effect of a therapeutic lifestyle change diet on immune functions of moderately hypercholesterolemic humans. *J Lipid Res*. 44(12):2304-10.
130. Handwerger S., Freemark M. (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 13(4) : 343-56.
131. Hanson U., Persson B., Thunell S. (1990). Relationship between haemoglobin A1c in early type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnancy and the occurrence of spontaneous abortion and fetal malformation in Sweden. *Diabetologia*. 33:100–104.
132. Harborne J.B. (1998). *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall, London, pp 60.
133. Hassid C.H., Abraham S. (1957). Chemical procedures for analysis of polysaccharides. *Methods Enzymol*. 3 : 34.
134. Hassoun E. A., Ray S.(2003). The induction of oxidative stress and cellular death by the drinking water disinfection by-products, dichloroacetate and trichloroacetate in J774.A1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part

- C 135 : 119–128.
135. Haton C. (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale, Thèse de doctorat, Université Paris VI, Pierre et Marie Curie, France.
136. Heim E.K., Tagliaferro A.R., BobilyaD.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572-584.
137. Hendrich A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica*. 27: 27-40.
138. Hennen G. (2001). *Endocrinologie*. édition Boeck université. 1<sup>ère</sup> édition , paris, pp.127-162.
139. Herrera E., Ortega-Senovilla H. (2010). Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy dare these the cause of the problem? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 24:515–25.
140. Higa R., Gonzalez E., Pustovrh M.C. (2007). PPARdelta and its activator PGI2 are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPARdelta activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2007;13:103–10.
141. Houlot R. (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*, Ed Maloine, p360.
142. Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 53:1841-1856.
143. Hunt J.V., Dean., R.T. and Wolff., S.P. (1988). Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autooxydation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing, *Biochem. J*. 256: 205-12.
144. Hunt J.V., Wolff S.P. (1991). Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radic. Res. C*, 12(Pt1) : 115-23.
145. Hwang H.J., Kim S.W., Lim J.M., Joo J.H., Kim H.O., Kim H.M., Yun J.W. (2005). Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life*

Sciences. 76 : 3069–3080.

### I

146. Ismail H.I, Wei Chan K., Mariod A.A, Ismail M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry* 119: 643–647.

### J

148. Jagota S. K., Dani H. M. (1982). A New Calorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent. *Analytical Biochemistry*. 127: 178- 182
149. Jain S.K., Palmer M. (1997). The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 22(4): 593-6.
150. Januel C. ( 2003). Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabete etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4, thèse de doctorat, Université de Lyon I, France.

### K

151. Kambouche N., Merah B., Derdour A., Bellahouel S., Benziane M.M., Younos C., Firkioui M., Bedouhene S.,Soulimani R. (2009). Etude de l'effet antidiabétique des saponines extraites d'*Anabasis articulata* (Forssk) Moq, plante utilisée traditionnellement en Algérie. *Phytotherapie*. 7: 197–201.
152. Kaplan A. (1984a). Lipids. *Clin Chem The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton*; 918-919.
153. Kaplan, A. (1984b) :Urea. Kaplan, A et al., *Clin Chem ., The C.V.mOSBY Co. St Louis., Toronto.Princeton* :1257-1260 et 437 et 418.
154. Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O. (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci.* 4(3):179-182.
155. Kebieche Mohamed. (2009). Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L.* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicinen, thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine, Algérie.
156. Keogh R.J., Dunlop M.E., Larkins R.G. (1997). Effect of inhibition of aldose

- reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation, *Metabolism*. 46: 41-47.
157. Khadri A., Serrlheiro M.L.M., Nogueira J.M.F. (2008). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oil from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Food Chem* 109: 630–7 14.
158. Kirwan J.P., Hauguel De Mouzon S., Lepercq J., Challier J.C., Huston Presley L., Friedman, J.E., Kalhan S.C. et Catalano P.M. (2002). TNF alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*. 51 (7) : 2207-2213.
159. Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20 (4) :165-177.
160. Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxydants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30: 620-650.
161. Koller A. (1984<sub>a</sub>): Total serum protein. Kaplan, A et *al.*, *Clin Chem.*, The C.V.mOSBY Co. St Louis., Toronto.Princeton : 1316-1324 et 418.
162. Koller A. (1984<sub>b</sub>): albumin, Kaplan, A , *Clin Chem.*, The C.V.mOSBY Co. St Louis., Toronto.Princeton : 315-324.
163. Kopelman P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*. 404(6778): 635–643.
164. Kubola J., Siriamornpun S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chem* 110: 881–90 15.
165. Kubow S, Yaylayan V, Mandeville S. (1993). Protection by acetylsalicylic acid against hyperglycemia-induced glycation and neural tube defects in cultured early somite mouse embryos. *Diabetes Res*. 22:145-158.
166. Kumar SD, Dheen ST, Tay SSW. (2007). Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovasc Diabetol*. 6 : 34.
167. Kumaran A., Karuna Karan R.J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40: 344–352.

### L

168. Lacolley P., Barbuty D., Boulanger C.M. (2007). Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. 2 ed. Paris : John Libbey Eurotext.
169. Lahouel M. (2005). Interaction flavonoïdes mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
170. Lappas M., Hiden U., Desoye G., Froehlich J., Hauguel-deMouzon S., Jawerbaum A. (2011). The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 15(12): 3061-100.
171. Lee A.Y., Chung S.K., Chung S.S. (1995). Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2780-2784.
172. Lefèvre G., Beljean Leymarie M., Beyerle F. (1998). Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann Biol Clin* ; 56 : 305.
173. Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: 1076-1081.
174. Lenzen S (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.
175. Levine Garland R.L., Oliver D., Amici C.N., Climent A., Lenz I., Ahn A.G., Shaltiel S., Mc Cord J.M. (2002). The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am. J. Med*, 108: 652-659.
176. Liao D.M., Ng Y.K., Tay S.S.W., Dheen S.T. (2004). Altered gene expression with abnormal patterning of the telencephalon in embryos of diabetic Albino Swiss mice. *Diabetologia*. 47 : 523 -531.
177. Lin J.K., Weng M.S. (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. In : *The science of flavonoids*. Grotewold, E. Eds, Springer, Pp: 217.
178. Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F. (2006). Antioxydant proprieties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 477-485.

179. Lushchak. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 224C:164–75.
180. Lyn Patrick, N.D. (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern. Med.* 11 (2): 114-127.

### M

181. Mac Laren D. (2007). Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier. Nikitaki Z., Hellweg C.E., Georgakilas A.G., Ravanat J.L. (2015). Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem.*3.
182. Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*), *Nat. & Tech*, 09, 35 40.
183. Maisuthisakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P. (2007). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis.* 21: 229-240.
184. Maiza K., Brac De La Perre R.A., Hammiche V. (1993). Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. Actes du 2e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11<sup>e</sup> Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars.
185. Malardé L. (2012). Activité physique et produits dérivés du soja : intérêts dans la prise en charge du stress oxydant associé au diabète de type 1. Thèse de doctorat, Sciences Humaines et Sociales. L'Université européenne de Bretagne.
186. Marinho H.S., Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* 23(2): 535–562.
187. Martinek R. G. (1964). Method for the Determination of Vitamin E (Total Tocopherols) in Serum. *Clinical Chemistry Vol. 10, No. 12:* 1078-1086.
188. Mayachiew P., Devahastin S. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT* 41: 1153–9 20.
189. McLetchie N.G.B. (2002). Alloxan diabetes: A discovery, albeit a minor one . *J R Coll Physicians Edinb* 32:134–142.

190. Meattini, F., Kim, Y., Peroni, O. and Fryer, L. (1978). The 4-Hydroxybenzoate 14 Amino Phenazone Chromagenic System. *Clinical Chemistry*, 24, 2161-2165
191. Mendoza Pérez O.A et Fregoso Aguila T.A (2013). Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico: in oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants
192. Metzger B.E., Coustan D.R. (1998). Proceedings of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 21 (Suppl. 2):1-167.
193. Monnier L. (2010). *Diabétologie.*, Issy-les-Moulineaux ; Elsevier Masson. p 408
194. Murray, R.L (1984 b). Aspartate aminotransferase., Kaplan, A et al., *Clin Chem .*, The C.V.mOSBY Co. St Louis., Toronto.Princeton : 1112-116.
195. Murray, R.L. (1984a): Creatinine ., Kaplan, A et al., *Clin Chem .*, The C.V.mOSBY Co. St Louis., Toronto.Princeton :1261-1266 et 418.
196. Naito H.K., Kaplan A. (1984). Cholesterol. *Clin Chem the C.V Mosby CO. St Louis.*

### N

197. Nakhaee A., Bokaeian M., Saravani M., Farhangi A., Akbarzadeh A. (2009). attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by *Eucalyptus globulus*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 24 (4) 419-425
198. Naruse K., Rask-Madsen C., Takahara N., Ha S., Suzuma K., Way K.J. (2006). Activation of vascular protein kinase C- $\beta$  inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*. 55(3):691-698.
199. Nelson T., Shulman G., Grainger D., Diamond M.P. (1994). Progesterone administration induced impairment of insulin suppression of hepatic glucose production. *Fertility and Sterility*. 62 : 491-496.
200. Newbern D., Freemark M. (2011). Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 18(6):409-16.

### O

201. Oberley L.W., Spitz D.R (1985). Nitroblue tetrazolium. In 'Handbook of methods for oxygen radical research Greenwald R.A. Ed° CRC Press Boca Raton. 217-220.
202. Ohkawa H., Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem. 95: 351–358
203. Okuna S., Akazawa S., Yasuhi I., Kawasaki E., Matsumoto K., Yamasaki H. (1995). Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy. Horm Metab Res. 27(5): 231-4.
204. Ouali K., Trea F., Toumi L., Bairi A., Maurel D., Guellati M.-A. (2007). L'héspéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. Phytothérapie 5: 204–209
205. Ozenda P. (1991). Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris. 662 p.
206. Ozsoy N., Can A., Yanardag R., Akev A. (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. Food Chem 110: 571–83.

### P

207. Perlemuter G., Morin N.H. (2003). Endocrinologie Diabétologie Nutrition, 4<sup>ème</sup> édition, P409, France.
208. Petersen Shay K., Moreau R.F., Smith E.J., Hagen T.M. (2008). Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. IUBMB Life. 60: 362–367.
209. Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products. 63: 1035-1042.
210. Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defenses. Nutrition Clinique et Métabolisme. 16: 233-239.
211. Pirot P., Cardozo A.K., Eizirik D.L. (2008). Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 52(2):156-65.

212. Podsedek A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. LWT. 40 : 1-11.
213. Pratipanawatr W., Pratipanawatr T., Cusi K., Berria R., Adams J.M., Jenkinson C.P., Maezono K., DeFronzo R.A., Mandarino L.J. (2001). Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes*, 50(11): p. 2572-8.
214. Prince, P.S., Menon, V.P., Pari, L. (1998). Hypoglycaemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 1–7.
215. Prior R. L., Wu X., Schaich K.(2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 4290–4302.

### Q

216. Qi x-y., Chen w-j., Zhang l-q and Xie B.J. (2008). Magrocides extract from *Siratia*

### R

217. Raccach D. (2004). Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie* 1: 29-42.
218. Ramesh Babu K., Maddirala Dilip R., Vinay Kumar K., Shaik Sameena F., Tiruvenkata Kumar E.G., Swapna S., Ramesh B., Rao C.A. (2010). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of methanol:water (4:1) fraction isolated from aqueous extract of *Syzygium alternifolium* seeds in streptozotocin induced diabetic rats, *Food Chem. Toxicol.* 48: 1078–1084.
219. Ravi K., Ramachandran B., Subramanian S. (2004). Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats, *Life Scie.* 75: 2717-2731.
220. Reece E.A., Ji I., Wu Y.K. (2006). Characterization of differential gene expression profiles in diabetic embryopathy using DNA microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 195:1075–1080.
221. Reece E.A., Leguizamón G., Wiznitzer A.(2009). Gestational diabetes: the

- need for a common ground. *Lancet*. 373:1789–1797.
222. Riov J, Gottlieb HE. (1980). Metabolism of auxin in pine tissues: indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum* 50, 347–352.
223. Roche B, Mechler C. (2004). Rapport du poids du placenta sur le poids foetal. Quelles significations ? Quelles utilisations ? Mémoire pour le Diplôme interuniversitaire de pathologie foetale et placentaire. Université Paris 7
224. Rodier M. (2001). Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire Imagerie fonctionnelle et métabolique*, Vol.25 - n°2 : 91-93.
225. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman D.G., and Hoekstra W.G. (1973). Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179 :588-590.
226. Ruch R.J., Cheng S.J., Klaunig J.E (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10(6): 1003–8.
227. Rudge M.V.C., Damasceno D.C., Volpato G.T., Almeida F.C.G., Calderon I.M.P., Lemonica I.P. (2007). Effect of *Ginkgo biloba* on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2007) 40: 1095-1099.

### S

228. Sabu M.C., Smitha K., Ramadasan K. (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 83: 109-116
229. Sachdev S., Davies K.J.A. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*. 44: 215–223.
230. Salewski, E. (1964) . Farbmethode zum makroskopischen nachweis von implantatconstellen an uterus der ratter naunyn schmuderbergs. *Archieve of Pharmacology* 247, 367.
231. Sarkhail P., Rahmanipour S., Fadyevatan S., Mohammadirad A., Dehghan G., Amin G., Shafiee A., Abdollahi M. (2007). Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacol. Res.* 56 : 261-266.

232. Satoh. K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 90 : 37-43.
233. Sayre L.M., Moreira P.I., Smith M.A., Perry G. (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann. Ist. Super. Sanità*. 41 (2):143-164.
234. Sefi M., Fetoui H., Lachkar N., Tahraoui A., Lyoussi B., Boudawara T., Zeghal N. (2011). Centaurea erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas, *Journal of Ethnopharmacology*. 135: 243–250.
235. Serteyn D., Grulke S., Franck T., Mouithys-mickalad A., Deby-dupont G.(2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét.* 147:79–93.
236. Sevanian A., Nordenbrand K., Kim, E., Ernester L., Hochstein P. (1990). Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free radical biology & medicine*. 8: 145-152.
237. Shao J., Catalano P.M., Yamashita H., Ruyter I., Smith S., Youngren J., Friedman J.E.(2000). Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM. *Diabetes*. 49(4): 603-610.
238. Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J. (2006). *Modern Nutrition in Health and Disease*. Tenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. p: 582.
239. Shivananjappa M.M., Muralidhara. (2012). Abrogation of maternal and fetal oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic rat by dietary supplements of *Tinospora cordifolia*. *Nutrition* 28 : 581–587 .
240. Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*. 215(2):213-9.
241. Simán C M., Gittenberger-De Groot A C., Wisse B et Eriksson U.J. (2000). Malformations in Offspring of Diabetic Rats: Morphometric Analysis of Neural Crest- Derived Organs and Effects of Maternal Vitamin E Treatment. *Teratology* 61:355–367

## Références Bibliographiques

242. Simán C.M., Eriksson U.J. (1997). Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes*. 46:1054– 1061.
243. Simán M. (1997). Congenital Malformations in Experimental Diabetic Pregnancy: Aetiology and Antioxidative Treatment . *Upsala J Med Sci* 102: 61-98.
244. Sivan E, Lee YC, Wu YK, Reece EA. (1997). Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology*. 56:343-349.
245. Smoak IW. (2002). Hypoglycemia and embryonic heart development. *Front iFree Radical Biology Medicine* 43: 4-15.

### T

246. Trea F., Ouali K., Baba-Ahmed F., Kadi Y. (2013). La Glisodin®, un extrait de melon, atténue l'apoptose des cardiomyocytes via la suppression du stress oxydant cardiaque au cours du diabète chronique expérimental. *Phytothérapie* 11:339-347
247. Trinder P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*. 22(2): 158-61.
248. Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F., Polat G. (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea,. *Molecules*. 12: 484-496.

### V

249. Valdiguié P. (2000). *Biochimie clinique*. Edition Médicales internationales (2e édition). Paris. 340p.
250. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. (2007) . Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 359: 44-84.
251. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160: 1-40
252. Vambergue A., Valat A. S., Dufour P., Cazaubiel M., Fontaine P., Puech F. (2002). Le diabète gestationnel : Physiopathologie du diabète gestationnel. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 31 (6) : 4S3-4S10.
253. Volpato G.T., Damasceno D.C., Rudge M.V.C., Padovani C.R., Calderon

- I.M.P.(2008). Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 116 : 131–137
254. Volpato G.T., Damasceno D.C., Kempinas W.G., Rudge M.V.C., Calderon, I.M.P. (2009). Effect of exercise on the reproductive outcome and fetal development of diabetic rats. *Reproductive Biomedicine Online* 19, 852–858.
255. Volpato G.T., Calderon I.M.P., Sinzato S., Campos, K.E., Rudge M.V.C., Damasceno D.C. (2011). Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats *Journal of Ethnopharmacology*. 138: 691– 696.
256. Vuorela S. (2005). Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal*. 5(2): p. 181-94.
- 
257. Weckbecker G, Cory JG (1988) Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukaemia LI210 cells in vitro. *Cancer Let*. 40: 257-264.
258. Wentzel P, Eriksson UJ.(1998). Antioxidants diminish developmental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos in vitro. *Diabete*.47:677–84.
259. Wentzel P., Welsh N., Eriksson U.J. (1999). Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered PGE2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes*. 48:813–20.
260. Willis M.S., Townley-Tilson W.H.D., Kang E.Y., Homeister .JW., Patterson C.(2010). Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res*. 106(3):463–78.
261. Wolff S.P. (1991). Is hyperglycemia risky enough to justify the increased risk of hypoglycemia linked with tight diabetes control, *Biochem. Med. Metab. Biol*, 46(2): 129-39.
262. Wolff S.P., Dean R.T. (1987). Glucose autooxidation and protein modification, *Biochem. J*, 245 : 243-50.

263. Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W., Chen F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97: 705-711.
264. Wren C., Birrell G., Hawthorne G. (2003). Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers. *Heart.* 89 : 1217-20.

### X

265. Xia P., Inoguchi T., Kern T.S., Engerman R.L., Oates P.J., King G.L. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia, *Diabetes*, 43: 1122-1129.

### Y

266. Yang N., Zhao M., Zhu B., Yang B., Chen C., Cui C et Jiang Y. (2008). Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9: 570–574.
267. Yik-Ling Chew, Joo-Kheng Goh, Yau-Yan Lim. (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry* 116 : 13–18
268. Youn J-Y., Siu K.L., Lob H.E., Itani H., Harrison D.G., Cai H. (2014). Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome. *Diabetes.* 63(7):2344–55.

### Z

269. Zabihi S., Eriksson U.J., Wentzel P. (2007). Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats. *Reprod Toxicol.* 23(4):486–498.
270. Zhang J., Huang Y., Hou T et Wang Y. (2006). Hypoglycaemic effect of *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *Swiss Med Wkly* 136 : 529-532.
271. Zhao Z et Reece E.A. (2013). New Concepts in Diabetic Embryopathy. *Clin*

Lab Med. 33(2): 207–233.

272. Zhao-Hua T., Miao F.T, Zhang X., Wang Q.H., Lei N., Guo L.C.(2015).Therapeutic effect of okra extract on gestational diabetes mellitus rats induced by streptozotocin. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 8(12): 1038–1042.

### **WEBGRAPHIE**

- [www.https://fr.slideshare.net/AmineDafaa/grossesse-et-diabte](https://fr.slideshare.net/AmineDafaa/grossesse-et-diabte): Consulté le 18/05/2017
- [www. takween.com](http://www.takween.com), Consulté le : 02/03/2016
- <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> " consulté le : 26/02/2016
- <http://www.mtp.gov.dz/fr/permalink/3281.html> *consulté le : 13/10/1015*
- [www.google.fr](http://www.google.fr) consulté le : 27/02/2016)
- [www. https://fr.slideshare.net/AmineDafaa/grossesse-et-diabte](https://fr.slideshare.net/AmineDafaa/grossesse-et-diabte). Consulté le 18/05/2017

# *Publication & Communications*



### 1. Publications

- Amina Bouzitouna, Khierddine Ouali, Samah Djeddi, 2015, Protective Effects of *Cistanche tinctoria* Aqueous Extract on Blood Glucose and Antioxidant Defense System of Pancreatic  $\beta$ -cells in Experimental Diabetes in Rats, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 32(2) : 243-249.

- Amina Bouzitouna, Kheireddine Ouali, Sandra Amri, Houria Rahmoun, Mourad Bensouilah, 2014, Effect of *Cistanche tinctoria* Methanolic Extract on the Maternal-Fetal Outcome and Oxidative Stress Biomarkers of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Conference Paper in International Journal of Nutrition and Food Engineering Vol:8, No:11: 146.

### 2. Communication internationale

- 5<sup>ème</sup> symposium international des plantes aromatiques et médicinales, Marrakech, Maroc 14-16 Novembre 2013. A. Bouzitouna , K. Ouali, H. Rahmoun, M. Bensouilah : Effect of Cistanche tinctoria Aqueous Extract on the Maternal–Fetal Outcome, Oxidative Stress Status And Lipid Profile In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

-5<sup>ème</sup> symposium international des plantes aromatiques et médicinales, Marrakech, Maroc 14-16 novembre 2013. A. Bouzitouna , K. Ouali, H. Rahmoun ; M. Bensouilah: Antioxydant and antidiabétique effect of aqueous and méthanoliques extraits de *cistanche tinctoria* in streptozotocin diabétiques rats.

- 18<sup>th</sup> World Congress of the International Federation for the Surgery of Obesity & Metabolic Disorders (IFSO), Istanbul, Turkey 28-31 August 2013. Amina Bouzitouna, Kheireddine Ouali, Sandra Amri, Houria Rahmoun, Mourad Bensouilah, 2013, Effect of Cistanche Tinctoria Aqueous Extract on the Maternal-Fetal Outcome, Oxidative Stress Status and Lipid Profile in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.

- 18<sup>th</sup> Word Congress of the International Federation for the Sugery of Obesity and metabolic Disorders (IFSO), Istanbul, Turkey 28-31 August 2013. Amina Bouzitouna, Kheireddine Ouali, Sandra Amri, Houria Rahmoun, Mourad Bensouilah, 2013, Antioxydant and Antidiabétique Effect of Aqueouse and Méthanoliques Extraits of Cistanche Tinctoria in Streptozotocin Diabetic Rats. Conference Paper in Obesity Surgery, 23, 1118.

- II<sup>ème</sup> congrès international de biotechnologie et valorisation des bio-ressources(BVBR) 18 au 20 Mars 2014, Tabarka, Tunisie. Bouzitouna Amina<sup>1</sup>, Ouali Kheireddine<sup>1</sup>, Rahmoun Houria<sup>1</sup>, Bensouilah Mourad<sup>1</sup>: l'activité antidiabétique d'extrait aqueux de *cistanche tinctoria* sur le diabète expérimental chez les rats wistar.

- 25<sup>ème</sup> Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) , Hammamet- Tunisie du 24 au 27 Mars 2014. Bouzitouna Amina<sup>1\*</sup>, Ouali Kheireddine<sup>1</sup>, Rahmoun Houria<sup>1</sup>, Bensouilah Mourad<sup>1</sup> : Étude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux de *Cistanche tinctoria* chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine.

- Bio Engineering Conference (BIO ENG'14), 27-29 Novembre 2014. Bouzitouna Amina, Ouali Kheireddine, Rahmoun Houria, Bensouilah Mourad : Protective effects of *Cistanche tinctoria* extracts on antioxidant defense system and morphological changes of pancreatic  $\beta$ -cells in experimental diabetes in rats.

## Research Article



## Protective Effects of *Cistanche tinctoria* Aqueous Extract on Blood Glucose and Antioxidant Defense System of Pancreatic $\beta$ -cells in Experimental Diabetes in Rats

Amina Bouzitouna<sup>1\*</sup>, Khierddine Ouali<sup>2</sup>, Samah Djeddi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science University Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar Annaba, Algeria.

\*Corresponding author's E-mail: [bouzitouna\\_bio@yahoo.fr](mailto:bouzitouna_bio@yahoo.fr)

Accepted on: 29-04-2015; Finalized on: 31-05-2015.

### ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate the possible protective effects of '*Cistanche tinctoria*' extract on the antioxidant defense systems of pancreas in streptozotocin (STZ) induced diabetes in rats. The levels of blood glucose and TBARS in pancreas were estimated in control and experimental groups of rats. The aqueous extract (ACE) was administered daily in doses of 200mg/kg body weight to streptozotocin induced diabetic rats for a period of 21 days. Evaluate the changes in the cellular antioxidant defense system such as the level of reduced glutathione and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-s-transferase were assayed in pancreatic tissue homogenate. The aqueous extract exerted a significant ( $P < 0.000$ ) antidiabetic effect in streptozotocin diabetic rats. Daily treatment with 200mg/kg body weight of ACE for 21 days not only brought a significant decrease on blood glucose level in STZ-induced diabetic rats, but also increased the antioxidant enzymes' activities. From this study it can be concluded that the aqueous extract of *C. tinctoria* causes antidiabetic and antioxidant activity in Streptozotocin induced in diabetic rats.

**Keywords:** *Cistanche tinctoria*, Antidiabetic effect, diabetes, oxidative stress, streptozocin.

### INTRODUCTION

Free radicals are continually produced in the body as a result of normal metabolic processes and interaction with environmental stimuli complications.<sup>1</sup> These unstable molecules are capable of causing cellular damage, which leads to cell death and tissue injury. The ROS can bind with most normal cellular components; they react with unsaturated bonds of membrane lipids, denature proteins, and attack nucleic acids.<sup>2</sup> The concentrations of ROS are modulated by antioxidant enzymes and non-enzymatic scavengers, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px).<sup>3</sup> A disturbance of the balance between formation of active oxygen metabolites and the rate at which they are scavenged by enzymic and nonenzymic antioxidants is referred to as oxidative stress.<sup>4</sup>

It has been established that oxidative stress lies at the root of a number of pathological processes and diseases such as cancers, atherosclerosis, rheumatic arthritis, haematological and neurodegenerative disorders are not exempt, with more making the list among which is diabetes mellitus.

Diabetes mellitus is a heterogeneous metabolic disorder characterized by high levels of blood glucose with disturbances of carbohydrate; lipid and protein metabolism resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both.<sup>5</sup>

This serious, metabolic disorder affects approximately 4% of the population worldwide and is expected to increase by 5.4% in 2025.<sup>6</sup>

Ihara<sup>7</sup>, examined oxidative stress markers in experimental diabetic rats and found increased reactive oxygen species (ROS) in pancreatic islets. The pancreatic beta-cells, have required intricate mechanisms to defend against ROS toxicity. However, the reduced antioxidant capacity potentially makes pancreatic  $\beta$ -cells sensitive to ROS-mediated signal transduction and cellular response.

Thus, maintenance of  $\beta$ -cell oxidant status and their protection against oxidative damage might delay the onset of diabetes as well as the evolution of its complications.<sup>8</sup>

*Cistanche tinctoria* is a parasitic plant (Orobanchaceae) that is attached underground to the roots of the main host plants (*Tamarix gallica*, *Calligonum comosum* and *Pulicaria* sp) and grows by absorbing nutrients from the host plant. The parasite is widely distributed in North Africa, Arabia, and Asian countries.

As a rare traditional medicinal plant, the dried whole plant is used for the treatment of abdominal pains, diarrhoea, Muscle contractions, bruises, gynaecological diseases; stimulant of lactation and Diabetes. No information was found on the pharmacological of this plant, while a search on its toxicity appears negative.

The present study is conducted to systematically evaluate the antihyperglucemic effect of *C. tinctoria* aqueous extract in STZ-induced diabetic rats.

In addition, this work determines whether the pancreas was subjected to oxidative damage during experimental diabetes as well as to examine the associated changes in antioxidant status.



## MATERIALS AND METHODS

### Collection of Plant Material

Aerial part of *C. tinctoria* (Desf.) Beck. (Orobanchaceae) were used in this study. Lower parts of the stem were collected in Mars, 2012, in the region of Ouregla, Algeria. The plant was identified<sup>9-10</sup> by the botanists in the Department of Biology (Annaba, Algeria).

### Chemical Reagents

All chemicals were purchased from Sigma (USA), Aldrich (Milwaukee, USA), Fluka (Buchs, Switzerland), Tokyo Chemical Industry (TCI) and Merck (Germany).

### Preparation of Extract

*C. tinctoria* aqueous extract (ACE) was prepared by boiling 50 g of the powder of the aerial part of the plant in a flask containing 1 L of water for 5 min. The extract was agitated and covered until it reached room temperature. The residue was removed by filtration and the extract was then suitably concentrated in a rotary evaporator (final concentration: 50 mg/mL). A sample was separated in order to determine the solid concentration, and then the extract was divided into aliquots stored at -20° C until further use. (Yield of aqueous extract was about 13.5%).

### Animals and Experimental Design

#### Animal

Wistar rats (body weight 220 ± 20 g) used for experiments were obtained from Pasteur Institute (Algiers, Algeria). The rats were acclimatized for three week before starting the experiment. Before and during the experiment the rats were housed under controlled environmental conditions of temperature (22 ± 2°C) in a 12 h light and dark cycle, and were maintained on (unless otherwise stated) standard food pellets and tap water *ad libitum*.

#### Induction of Diabetes in Animals

Diabetes was induced by a single intraperitoneally (i.p.) injection of streptozotocin (STZ) in fasted rats at dose of 60 mg/kg body weight.<sup>11</sup> STZ was freshly dissolved in 0.1M cold sodium citrate buffer, pH 4.5. Three days after STZ injection, the glucose level of blood from the tail vein was determined, and hyperglycemic rats (blood glucose level > 200 mg/dl) were used as the diabetic rats for further experiments. Treatment with plant extract was started on the third day after STZ injection and continued for 21 days.

#### Experimental Design

The STZ-induced diabetic rats (mentioned above) were randomly divided into two groups (8 rats per group), and normal rats were used as the control group. Group I (n = 8): normal control (NC), normal rats were received 1ml distilled water Group II (n = 8): diabetic control (DC), the diabetic rats were received 1ml distilled water; Group III (n = 8): diabetic rats were treated with 200mg/kg/d of ACE for 21days. Weekly body weights were also recorded.

On the last day of experimentation, the animals were deprived of food overnight and sacrificed by cervical decapitation.

#### Tissue preparation

The Pancreatic tissue was excised, rinsed in ice-cold physiological saline and homogenized in 0.1mM phosphate buffer (pH 7.4). The homogenate was then centrifuged at 9000 ×g for 30 min at 4°C, and aliquots of supernatant were kept at -20°C until used for assays.

#### Assay of Non-enzymatic Antioxidants

##### Measurement of Reduced Glutathione (GSH)

Pancreas GSH content was determined by eliman method of Ellman<sup>12</sup> modified by Jollow<sup>13</sup>, based on the development of yellow colour when DTNB (5, 5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) is added to compounds containing sulfhydryl groups.

In brief, 0.8 ml of homogenate supernatant was added to 0.2 ml of 10% trichloroacetic acid, and then tubes were centrifuged at 3000 ×g for 5 min. Supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025ml of 0.01 M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4). The absorbance at 412 nm was recorded. Finally, total GSH content was expressed as U GSH/g protein.

##### Measurement of Ascorbic Acid

Quantification of ascorbic acid was performed according to Jagota and Dani<sup>14</sup>. In brief two hundred microlitres of tissue homogenate or standard preparation of ascorbic acid was precipitated on ice with 800 µl trichloroacetic acid for 5 min. The samples were then centrifuged at 3000 rpm/min for five minutes.

Thereafter, five hundred microliters of the supernatant was subsequently diluted with double distilled water to 2 mL and mixed with two hundred microliters of Folin-Ciocalteus reagent, diluted in double distilled water (1:10), the ascorbate reduced the Folin-Ciocalteu solution yielding a blue colour. After 10 min the absorbance of the samples was measured at 760 nm in a spectrophotometer.

##### Estimation of Lipid Peroxidation (malondialdehyde)

Lipid peroxidation in the pancreatic tissue was estimated colorimetrically by thiobarbituric acid reactive substances TBARS method of Ohkawa<sup>15</sup>. A principle component of TBARS being malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. In brief, 2.5 ml of 20% trichloroacetic acid and 1.0 ml of 0.67% TBA are added to 0.5 ml of tissue homogenate (KCl 1.15%), then the mixture is heated in a boiling water bath for 30 min. The resulting chromogen is extracted with 4.0 ml of n-butyl alcohol and the absorbance of the organic phase is determined at the wavelength of 530 nm. The MDA contents were calculated using 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane as standard and the results are expressed as nmol of malondialdehyde/g of tissue.



## Assay of Pancreas Enzymatic Antioxidants

### Assay of Catalase (CAT) Activity

Catalase (E.C.1.11.1.6) activity was measured according to Aebi<sup>16</sup> method. The 0.1ml of the tissue homogenate was pipette into cuvette containing 1.9 mL of 50mM phosphate buffer, pH7.0. Reaction was started by the addition of 1.0mL of freshly prepared 30%(v/v) hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The rate of decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured spectrophotometrically from changes in absorbance at 240nm for 2min. The enzyme activity was calculated by using an extinction coefficient of 0.043 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Activity of enzyme was expressed as units mg<sup>-1</sup> protein.

### Assay of Glutathion Peroxidase (GSH-Px) Activity

Glutathion peroxidase (E.C.1.11.1.9) activity was measured by the method described by Floche and Gunzler.<sup>17</sup> The reaction mixture contained 0.3ml of 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 0.1mL of 10mM sodium azide, 0.3ml of enzyme, 0.2ml 2mM glutathione and 0.1 ml of 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The contents were incubated at 37°C for 10min, followed by the termination of the reaction by the addition of 0.5 ml TCA 5%, centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was collected. 0.2 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.7 ml DTNB (10 mM) were added to 0.1 ml supernatant. After mixing, the absorbance of the product was read at 420 nm and expressed as nmol mg<sup>-1</sup> protein.

### Assay of Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Pancreatic SOD (E.C.1.15.1.1) activity was measured by inhibition of the formazan formation according to the method (xanthine/xanthine oxidase test) of Beauchamp and Fridovich.<sup>18</sup> The reaction mixture contained the following solutions: 2.25 ml of 0.05 M Tris/HCl buffer, pH 8.3, including 0.15 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.2 ml nitroblue tetrazolium chloride (3 mg per 10 ml buffer), 0.1 ml xanthine oxidase solution, and 0.1 ml xanthine solution (23 mg xanthine, 0.3 ml 1 N NaOH). The reaction was started by adding an aliquote of the xanthine oxidase solution. After incubation for 1-2 min at 25° C the activity was followed for 5 min at 560 nm. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme which inhibits the formazan formation to 50 %.

### Assay of Glutathione-S-transferase (GST) Activity

Glutathione-S-transferase (GST) (EC2.5.1.18) catalyzes the conjugation reaction with glutathione in the first step of mercapturic acid synthesis. The activity of GST was measured according to the method of Habig<sup>19</sup>.

The reaction mixture contained 0.05 ml of 1-chloro-2,4-dinitro benzene (20 mM), 0.84ml phosphate buffer (0.1M, pH 6.5), 0.01 pancreas supernatant and 0.1 ml of GSH (0.3 mg GSH/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) change in color was monitored by recording absorbance (340 nm) at 30 s intervals for 5 min. The enzyme activity was expressed in μmole conjugate/min/mg protein.

## Statistical analysis

The data were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. All the results were expressed as mean± S.E.M. for eight rats in each group. A difference in the mean values of p<0.05 was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Effect of ACE on changes of body weight, pancreas weight, and blood glucose levels in diabetic rats.

Table 1 presents the effect of aqueous extract of *C. tinctoria* on changes on body weight, pancreas weight and blood glucose levels in diabetic rats. There was no significant intra-group variation in the basal body weight of the rats. However, the body weight of the animals in the NC group increased significantly from 211±4.058 g to 231±5.19 g, while the weight of the diabetic rats decreased remarkably from 215±4.34 g to 185±10.04 g. Oral administration of ACE at that dose of 200mg/kg bw significantly increased the body weight, compared to untreated diabetic rats, though there is no statistical significance. There were no significant changes in the pancreas weight of the test group compared to the diabetic control.

As illustrated in Table 1, the changes in fasting blood glucose levels of different experimental groups during the experimental period. There was a significant elevation in blood glucose level in STZ-diabetic rats compared to normal rats. The administration of ACE extract produced marked antihyperglycemic effect in diabetic rats. The fasting blood glucose decreased by 59.97% after treatment. The difference between the experimental and diabetic control rats in lowering the fasting blood glucose levels was statistically significant.

**Table 1:** Effect of oral administration of ACE on body weight, Pancreas weight and blood glucose in streptozotocine-induced diabetic rats on 21st day.

Parameters studied	NC	DC	DC + ACE (200mg/kg bw)
Initial body weight (g/day)	211.61 ± 4.05	215.15 ± 4.76	226.94 ± 4.34
Final body weight (g/day)	231.71 ± 5.19*	185.8 ± 10.4	231.53 ± 6.67*
Pancreas weight (g/100g bw)	0.40 ± 0.01	0.36 ± 0.06	0.48 ± 0.07
Blood glucose levels (mg/dl)	101.32 ± 4.04	442.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	176.9 ± 33.6 <sup>b</sup>

Each value is mean ± SEM of eight rats in each group.

\*P < 0.01. Initial vs. Final body weight

<sup>a</sup>P < 0.01. by comparison with normal rats.

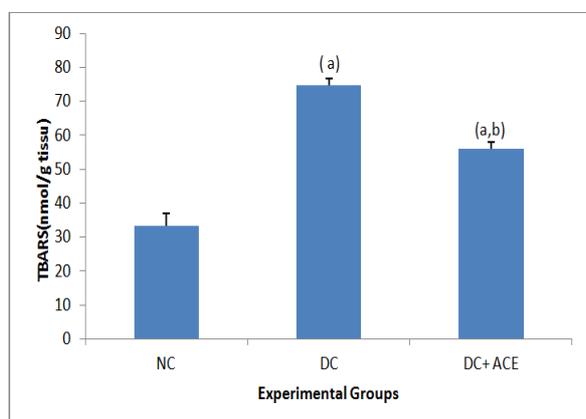
<sup>b</sup>P < 0.01. by comparison with streptozotocin diabetic rats.

### Evaluation of Redox Status in Pancreatic Tissue

To measure oxidative stress markers in pancreatic tissue, we evaluated oxidative damage to lipids, specifically, TBARS. A significant increase in the concentration of



TBARS was observed in the pancreas of diabetic animals compared to controls (Figure 1). Diabetic animals treated with 200 mg/kg of ACE showed a reduction in the concentration of TBARS compared to untreated diabetic animals.



**Figure 1:** Effect of ACE on the level of TBARS in pancreas of experimental groups of rats. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). N C, control (untreated); DC, diabetic; DC+ACE, diabetic treated with 200mg/kg body mass. Statistically significant differences ( $p \leq 0.01$ ) are between the following groups: (a) NC and DC; (b) DC and DC+EAC.

#### Effect of EAC on the Levels of Non enzymatic Antioxidants

The change in the levels of nonenzymatic antioxidants such as vitamin C and GSH in pancreatic tissue of experimental and control groups of rats are represented in Table 2. Diabetic rats showed a significant ( $P < 0.01$ ) decrease in the levels of vitamin C and GSH compared to control rats. Treatment with *C. tinctoria* aqueous extract reversed the level of GSH to near control levels when compared to diabetic rats. However a marked a small unsignification increase in the concentration of vitamin C is observed.

**Table 2:** Effect of ACE on non enzymatic antioxidants (GSH, Vit C) in experimental groups of rats.

Parameters studied	NC	DC	DC+ ACE (200mg/kg bw)
GSH (U /g protein)	8.20 $\pm$ 0.86	3.72 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	7.31 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>
Ascorbic acid (mg/g wet tissue)	51.59 $\pm$ 2.95	28.06 $\pm$ 4.10 <sup>a</sup>	37.11 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>

Each value is Mean  $\pm$  SEM of eight rats in each group.

<sup>a</sup> $P < 0.01$ .by comparison with normal rats.

<sup>b</sup> $P < 0.05$ .by comparison with streptozotocin diabetic rats.

#### Effects of *Cistanche tinctoria* extract on STZ-induced changes in the antioxidant enzyme activities

Table 3 shows the changes in the activities of enzymatic antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and glutathione-s-transferase (GST) in pancreatic tissues of control and experimental groups of rats. Significantly

decreased activities of these enzymes were observed in STZ-induced diabetic rats. The oral administration of ACE to diabetic rats showed a significant increase in the activities of SOD, CAT, GsT and GSH-Px and restored these activities to near control levels.

**Table3:** Antioxidant enzymes activities (SOD, CAT, GSH-Px and GsT) in the pancreas tissue of adult rats (controls and experimental groups).

Parameters studied	NC	DC	DC+ ACE (200mg/kg bw)
SOD	3.51 $\pm$ 0.15	1.95 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	3.345 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>
CAT	20,24 $\pm$ 1.02	8,15 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	16,31 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>
GSH-Px	8.08 $\pm$ 0.88	3.60 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	6.01 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>
GST	6.31 $\pm$ 0.22	3.39 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	6.14 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>

Activity is expressed as: 50 % of inhibition of formazan formation /min/mg of protein for SOD;  $\mu$ M of hydrogen peroxide decomposed/min/ mg of protein for catalase; nM of glutathione oxidized/min/mg of protein for GSH-Px, U/min/mg of protein for GST. Values are given as mean  $\pm$  SEM for groups of eight rats in each. Values are statistically significant at  $P < 0.01$ . Statistical significance was compared within the groups as follows: a) comparison with normal rats. b) comparison with streptozotocin diabetic rats.

#### DISCUSSION

Diabetes is a metabolic defect characterized with developed hyperglycemia after the insufficiency of insulin release from the pancreas, increased oxidative stress, non-enzymatic glycolization, lipid peroxidation and changed antioxidative defence system after being exposed to free radicals.<sup>20</sup> The use of phytochemicals compounds on tissues which regulates glucose metabolism, is an interesting area to explore.

In the current study, STZ-induced diabetes was characterized by a severe loss in body weight, which has also been reported by other investigators.<sup>21</sup> The decrease in body weights compared to normal rats could be due to poor glycemic control. The excessive catabolism of protein to provide amino acids for gluconeogenesis during insulin deficiency results in muscle wasting and weight loss in diabetic untreated rats.<sup>22</sup> Oral administration of ACE partially improved the body weight in diabetic rats. An increase in the body weight of diabetic rats might be due to an improvement in insulin secretion and glycemic control.<sup>23</sup> Likewise, *C. tinctoria* aqueous extract decreased polyphagia and polydipsia in treated-diabetic rats compared with diabetic group.

Hyperglycemia, as the most predominant characteristics of diabetes, is very dangerous for diabetic patients and animals.<sup>24</sup> In this study, it is observed a significant increase in the concentration of blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. Oral administration of ACE might reverse the blood glucose in diabetic rats. Anti-hyperglycemic effect of medicinal plant extracts is

generally dependent upon the degree of  $\beta$ -cell destruction.<sup>25</sup> We suggested also that ACE extract might reverse the catabolic features of insulin deficiency by (i) stimulating peripheral glucose utilization, (ii) increasing glucose removal from blood or (iii) reducing glucose absorption from the gastrointestinal tract.

Oxidative stress in diabetes coexisted with a reduction in the antioxidant capacity, which could increase the deleterious effects of free radicals. The accumulation of free radical observed in diabetic rats is attributed to chronic hyperglycemia that alters antioxidant defense system as demonstrated by previous studies.<sup>7-3</sup> Lipid peroxidation of unsaturated fatty acids is frequently used as an indicator of increased oxidative stress and subsequent oxidative damage.<sup>21</sup> Lipid peroxidation impairs cell membrane function by decreasing membrane fluidity and causes free radical induced membrane lipid peroxidation including increased membrane rigidity, decreased cellular deformability and alters activity of membrane-bound enzymes and receptors, leading to disease.<sup>26</sup> The high level of the lipid peroxidation marker TBARS in diabetic rats is a reflection of insufficient antioxidant defenses in combating ROS-mediated damage. The results show that the pancreas of diabetic animals has increased oxidative damage, exemplified by the increased concentration of TBARS. Several studies also showed an increase in the concentration of TBARS in the pancreatic tissue of diabetic rats.<sup>27-21</sup> In the present study, the increased formation of lipid peroxidation in pancreas tissue of diabetic rats supported these findings. Oral administration of *C. tinctoria* aqueous extract to STZ diabetic rats abrogated the increased MDA levels suggesting that ACE might have a high antioxidant capacity to scavenge free radicals generated by reactive oxygen species and prevent radical damage.

Glutathione (GSH) is an important intracellular peptide with multiple functions ranging from antioxidant defense to modulation of cell proliferation.<sup>28</sup> It is well known that GSH is involved in the protection of normal cell structure and function by maintaining the redox homeostasis, quenching of free radicals and participating in detoxification reactions. It is a direct scavenger of free radicals as well as a co-substrate for peroxide detoxification by glutathione peroxidase.<sup>29</sup> Decreased levels of reduced glutathione are reported in the pancreas of the STZ-induced diabetic rats.<sup>30</sup> This reduction could be explained, according to previous studies,<sup>31</sup> by a decrease of GSH synthesis or an increase of its degradation induced by STZ oxidative stress.<sup>30</sup> In the present study, the elevation of GSH levels in pancreas was observed in the ACE treated diabetic rats. This indicates that the ACE can either increase the biosynthesis of GSH or reduce the oxidative stress leading to less degradation of GSH, or could have both effects.

Vitamin C or ascorbic acid is an excellent hydrophilic antioxidant in plasma and disappears faster than other antioxidants on exposure to reactive oxygen species.<sup>32</sup>

Hypoinsulinemia and/or hyperglycemia inhibit ascorbic acid and cellular transport. As the chemical structure of ascorbic acid is similar to that of glucose, it shares the membrane transport system with glucose and hence competes with it for its transport.<sup>30</sup> The decreased level of ascorbic acid in diabetic rats may be due to either increased utilization as an antioxidant defense against increased reactive oxygen species or to a decrease in glutathione level, since glutathione is required for the recycling of ascorbic acid.<sup>25</sup>

The diabetogenic action of streptozotocin is associated with the generation of reactive oxygen species, which causes oxidative damage. This damage might play an important role in the progression and development of diabetes and its complications.<sup>33-34</sup> This can be prevented by the scavenging activity of enzymatic antioxidants such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. Moreover, the deleterious reactive oxygen electrophiles are neutralized by the action of nonenzymatic antioxidant, reduced glutathione, which is formed by the activities of glutathione reductase and glutathione-S-transferase, respectively.<sup>35</sup>

Superoxide dismutase, an important intracellular antioxidative enzyme, plays a pivotal role in oxygen defense metabolism by intercepting and reducing superoxide to hydrogen peroxide.<sup>20-26</sup> Several studies have reported a reduced activity of SOD in experimental diabetes.<sup>3-35-38</sup> This diminished activity of SOD is the result of the over accumulation of superoxide anion in the cellular organelles,<sup>39</sup> inactivation by hydrogen peroxide<sup>40</sup> or by glycation of the enzyme.<sup>41</sup> Oral treatment of ACE caused a significant increase in SOD activities of the diabetic rats. This means that the ACE extract can reduce reactive oxygen free radicals and improve the activities of the tissue antioxidant enzymes.

Catalase, Another important free radical scavenger enzyme that breaks down hydrogen peroxide, which was produced by SOD, into water and reactive oxygen species.<sup>20</sup> The decrease in Catalase activity in diabetes could result from uncontrolled production of hydrogen peroxide due to the auto-oxidation of glucose, protein glycation and lipid oxidation.<sup>35</sup> The deficiency of this enzyme in beta cells causes increased oxidative stress and damaged beta cells.<sup>42</sup> In the present study, the reduction in CAT level in diabetic condition was observed. Our result is in agreement with the other results,<sup>3-35-37-38</sup> who reported a decrease in CAT level in diabetes mellitus. In our study, it was observed that the oral administration of ACE caused a significant increase in the activity of CAT of the diabetic rats and it may be due to the antioxidant activity of extract.

In experimental diabetes, it is observed reduced activities of the GSH-metabolizing enzymes, GSH-Px and GST. Glutathione peroxidase was a selenium-containing tetrameric glycoprotein involved in the detoxification of hydrogen peroxide into water and molecular oxygen,<sup>3</sup> in the presence of reduced glutathione (GSH) forming



oxidized glutathione (GSSG), and thus, it protects cell proteins and cell membranes against oxidative stress.<sup>37</sup> Glutathione peroxidases represent the major enzymatic defense against oxidative stress caused by hydroperoxides. They reduce hydrogen peroxide and organic hydroperoxides, such as fatty acid hydroperoxides, to the corresponding alcohols.<sup>43</sup> GST shows broad substrate specificity and detoxify a variety of electrophiles by conjugation to reduced GSH. GST also plays an important although indirect role in antioxidant defense, by eliminating toxic substances and preventing their subsequent deleterious effect.<sup>44</sup> The decrease of GSH-Px and GST may also be due to the decreased availability of its substrate, GSH, which has been shown to be depleted during diabetes.<sup>37</sup> In the present study, treatment of diabetic rats with aqueous extract of *C. tinctoria* induced an increase in GSH-Px and GST activity in pancreatic tissues to levels higher than those in control animals by 66.9% and 81% respectively. Moreover, the results of the present investigation are consistent with the results of sefi<sup>3</sup>, Sivakumar and Subramanian,<sup>35</sup> and El-Missiry and El Gindy,<sup>45</sup> reporting the correlation between the increased lipid peroxides and decreased enzymatic antioxidants in experimental diabetes.

The enhanced activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-s-transferase, can be very effective in scavenging the various types of oxygen free radicals and their products. Pancreatic  $\beta$ -cells may be protected from oxidative damage (induced by STZ) according to this reciprocal mechanism. Suggesting that the ACE has a direct or indirect preventive and protective effect in diabetes by decreasing oxidative stress and by preserving the integrity of pancreatic  $\beta$ -cell. These mechanisms may help explain why ACE has a protective effect in STZ-induced diabetic rats.

## CONCLUSION

In conclusion, the present investigation shows that aqueous extract of *C. tinctoria* possess significant antidiabetic action in streptozotocin-induced diabetic rats. The present, investigation shows the favorable effect of ACE on pancreas antioxidant defense system in, addition to its antidiabetic effect.

Further detailed studies are in progress to elucidate the exact way by which they elicit their modulatory effects.

## REFERENCES

- Halliwell B, Gutteridge J MC, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, UK: Clarendon Press; 1989.
- Jia J, Zhang X, Hua Y.S, WU Y., Wang Q Z, Li N N, Guo Q C, Dong X C, Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats, Food Chemistry, 115, 2009, 32–36.
- Sefi M, Fetoui H, Lachkar N, Tahraoui A, Lyoussi B, Boudawara T, Zeghal N, Centaurium erythrea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas, Journal of Ethnopharmacology, 135, 2011, 243–250.
- Papas A M, Determinants of antioxidant status in humans, Lipids, 31, Suppl, 1996, 77-82.
- Akpan H B, Adefule A K, Fakoya F A, Caxton-Martins EA, Evaluation of LDH and G6-PDH activities in auditory relay centers of streptozotocin-induced diabetic wistar rats, Journal of Analytical Sciences, 1, 2007, 21–25.
- Kim S H, Hyun S H, Choung S Y, Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice, Journal of Ethnopharmacology, 104, 2006, 119–123.
- Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats a model of type 2 diabetes, Diabetes, 48, 1999, 927–932.
- Gopalan S P, Chinnakrishnan S S, Sorimuthu P S, Fisetin averts oxidative stress in pancreatic tissues of streptozotocin-induced diabetic rats, Endocrine, 44, 2013, 359–368.
- OZENDA P. Flore du Sahara, 3e édition, complétée. CNRS, Paris, 1991.
- QUEZEL P, SANTA S, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris (FR)., 1962-1963., I : 1-565, II : 571-1170.
- Ouali K, Trea F, Toumi L, Bairi A, Maurel D, Guellati M.A, L'héspéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental, Phytothérapie, 5, 2007, 204–209.
- Ellman G L, Tissue sulfhydryl groups, Arch. Biochem. Biophys, 82, 1959, 70–77.
- Jollow D, Mitchell L, Zampaglione N, Gillete J, Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzenoxide as the hepatotoxic intermediate, Pharmacology, 11, 1974, 151-169.
- Jagota S K, Dani H M, A New Calorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent, Analytical Biochemistry, 127, 1982, 178-182.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem, 95, 1979, 351–358.
- Aebi H, Catalase, In: Methods in Enzymatic Analysis (Ed. Bergmer HU), Academic press, New York. 3, 1983, 276–286.
- Floche L., Gunzler W.A, Glutathione peroxidase. In: Packer L. (ed.): Methods in Enzymology. Academic Press, New York. 105, 1984, 115–121.
- Beauchamps C, Fridovich L, Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels, Anal Biochem, 44, 1971, 276-287.
- Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B, Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation, J. Biol. Chem, 249, 1974, 7130–7139.
- Karatug A, Bolkent S, The potential role of combined antioxidant treatment on pancreas of STZ-diabetic mice,



- Experimental and Toxicologic Pathology, 65, 2013, 255–262.
21. Avila D. L., Araujo G R, Silva A, Amorim-Miranda P H, Diniz M F, Pedrosa M L, Silva M E, Geraldo DE Lima W, Caldeira Costa D, Vildagliptin ameliorates oxidative stress and pancreatic beta cell destruction in type 1 diabetic rats, Archives of Medical Research, 44, 2013, 194-202.
  22. Ramesh Babu K, Maddirala Dilip R, Vinay Kumar K, Shaik Sameena F, Tiruvenkata Kumar E G, Swapna S, Ramesh B, Rao C A, Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of methanol:water (4:1) fraction isolated from aqueous extract of *Syzygium alternifolium* seeds in streptozotocin induced diabetic rats, Food Chem. Toxicol, 48, 2010, 1078–1084.
  23. Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S, Duraipandiyan V, Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.) Sm., in STZ-induced diabetic rats, Chemico-Biological Interactions, 182, 2009, 67–72.
  24. Zhu K, Nie S, Li C, Huang J, Hu X, Li W, Gong D, Xie M, Antidiabetic and Pancreas-Protective Effects of Zinc Threoninate Chelate in Diabetic Rats may be Associated with its Antioxidative Stress Ability, Biol Trace Elem Res, 15, 2013, 291–298.
  25. Arulselvan P, Subramanian S P, Beneficial effects of *Murraya koenigii* leaves on antioxidant defense system and ultra structural changes of pancreatic  $\beta$ -cells in experimental diabetes in rats, Chemico-Biological Interactions, 165, 2007, 155–164.
  26. Saravanan G, Ponmurugan P, Beneficial Effect of S-allylcysteine (SAC) on Blood Glucose and Pancreatic Antioxidant System in Streptozotocin Diabetic Rats, Plant Foods Hum Nutr, 65, 2010, 374–378.
  27. Bhandari U, Jain N, Pillai KK, Further studies on antioxidant potential and protection of pancreatic beta-cells by *Embelia ribes* in experimental diabetes, Exp Diabetes Res, 2007, 15803.
  28. Lu S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and Controversies, Faseb J, 13, 1999, 1169–1183.
  29. Winterbourn C C, Concerted antioxidant activity of glutathione and superoxide dismutase. IN: packer, I., fuchs, j. (eds.), biothiols in health and disease. marcel dekker inc., New York., 1995, 117–134.
  30. Sathishsekar D, Subramanian S, beneficial effects of *Momordica charantia* seeds in the treatment of STZ-induced diabetes in experimental rats, Biol. Pharm. Bull, 28, 2005, 978–983.
  31. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees T T, Stegink LD, Diekus M, Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin induced diabetes, Diabetes, 35, 1986, 503–507.
  32. Punithais R, Rajendran K, Shirwaikar A, Shirwaikar A, Alcoholic Stem Extract of *Coscinium fenestratum* Regulates Carbohydrate Metabolism and Improves Antioxidant Status in Streptozotocin–Nicotinamide Induced Diabetic Rats. ECAM, 2, 3, 2005, 375–381.
  33. Matsunami T, Sato Y, Hasegawa Y, Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure, International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 4, 3, 2011, 255–266.
  34. Maritim A C, Sanders R A, Watkins J B, Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. J. Biochem. Mol. Toxicol, 17, 2003, 24-38.
  35. Sivakumar S, Subramanian S P, Pancreatic tissue protective nature of D-Pinitol studied in streptozotocin-mediated oxidative stress in experimental diabetic rats, European Journal of Pharmacology, 622, 2009, 65–70.
  36. Zhang L, Yang J, Chena X Q, Zana K, Wenc X D, Chena H, Wang Q, Mao-xiang L, Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin, Journal of Ethnopharmacology, 132, 2010, 518–524.
  37. Jin L, Xue H Y, Jin L J, Li, SY, Xu YP, Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes, Eur. J. Pharmacol. 582, 2008, 162–167.
  38. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S, Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. Pharmacological Research, 51, 2005, 117-123.
  39. Raha S, Robinson B H, Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends in Biochemical Sciences, 25, 2000, 502-508.
  40. Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S, Protective effect of *Eugenia jambolaa* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 27, 2004, 1212-1217.
  41. Meghana K, Sanjeev G, Ramesh B, Curcumin prevents streptozotocin induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. European Journal of Pharmacology, 577, 2007, 183-191.
  42. Heales SJ, Catalase deficiency, diabetes, and mitochondrial function, The Lancet, 357(9252), 2001, 314.
  43. Herbette S, Roeckel-Drevet P and Drevet JR, Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. FEBS Journal, 274, 2007, 2163-2180.
  44. Aposhian HV and Aposhian MM, Arsenic toxicology: Five questions. Chemical Research in Toxicology, 19, 2006, 1-15.
  45. El-Missiry MA, El Gindy AM, Amelioration of alloxan induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds, Ann. Nutr.Metab, 44, 2000, 97–100.

**Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.**

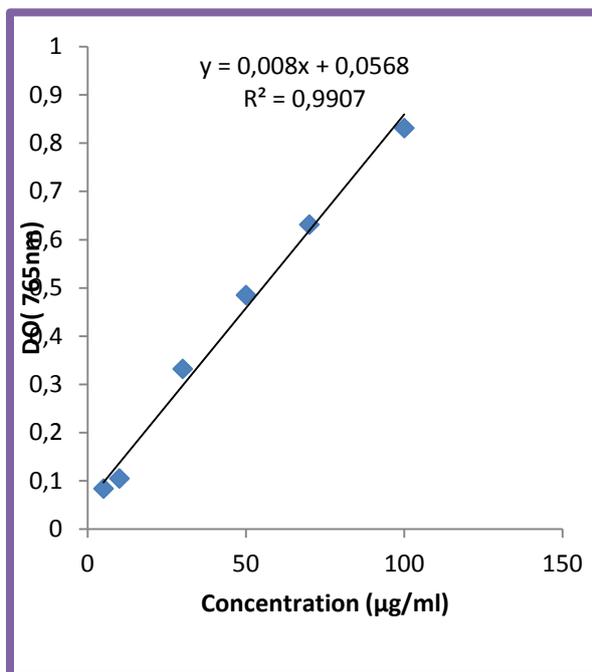


# ANNEX

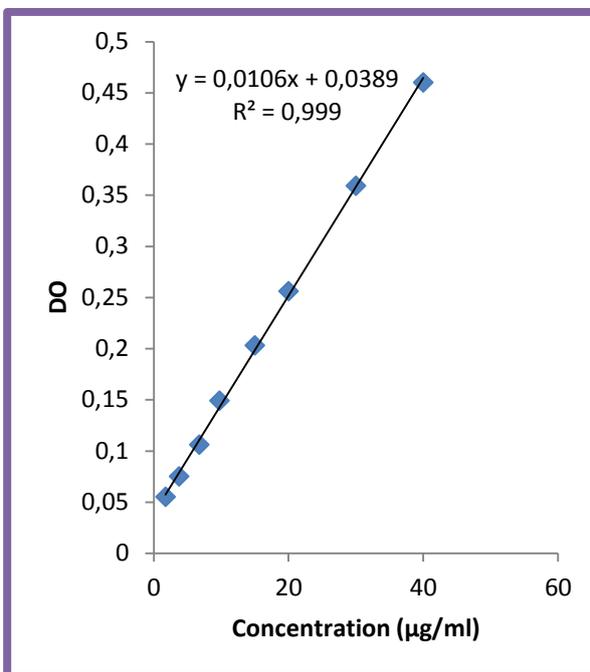


## Annexe 1 : Courbes d'étalonnage

### 1. Courbe d'étalonnage d'acide gallique : 2. Courbe d'étalonnage de la quercétine :

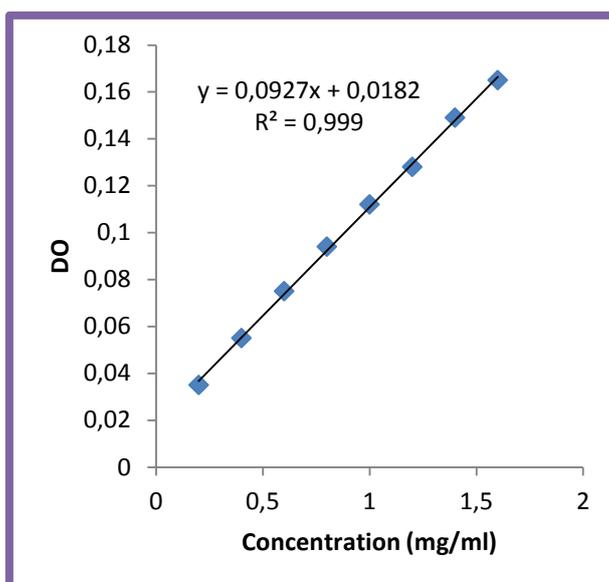


**Figure I.** Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux



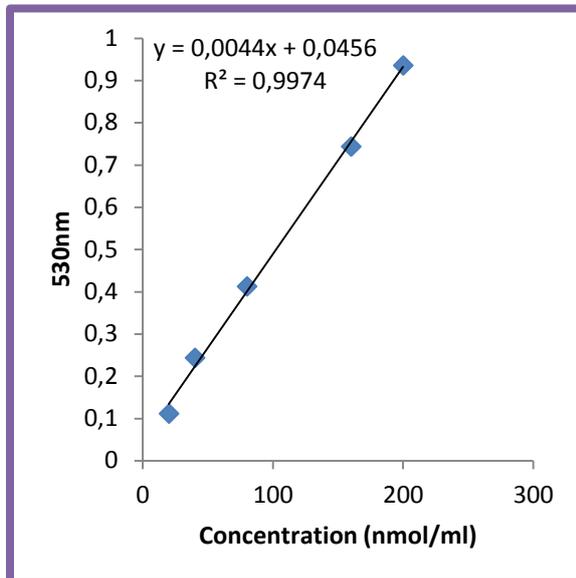
**Figure II.** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux

### 3. Courbe d'étalonnage de la catéchine



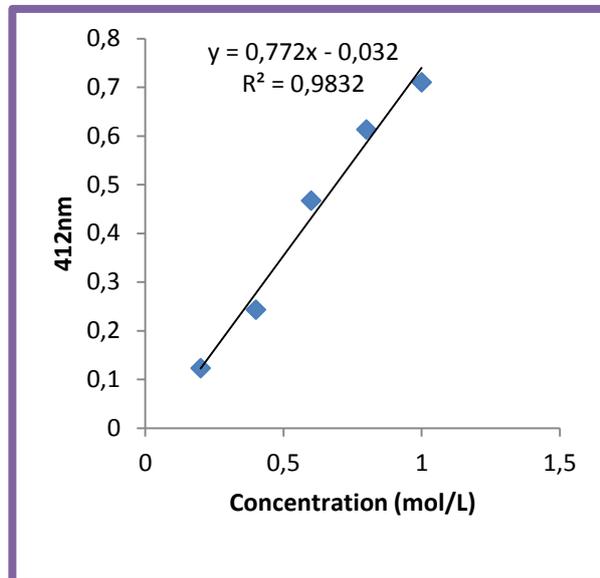
**Figure III.** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.

#### 4. Courbe d'étalonnage de 1, 1,3,3 tétraétoxypropane



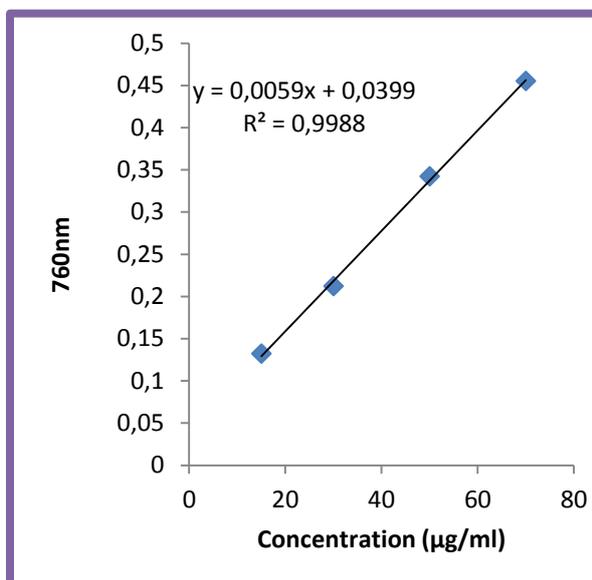
**Figure IV.** Droite d'étalonnage de 1, 1,3,3 tétraétoxypropane pour le dosage de MDA

#### 5. Courbe d'étalonnage du GSH



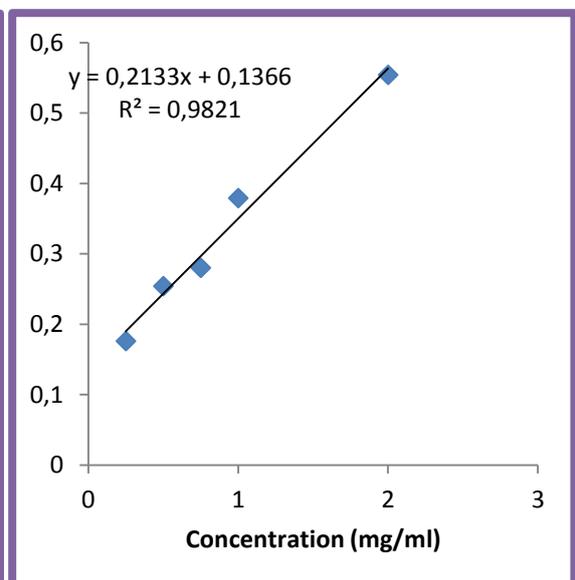
**Figure V.** Droite d'étalonnage du GSH pour le dosage de GSH réduit

#### 6. Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique



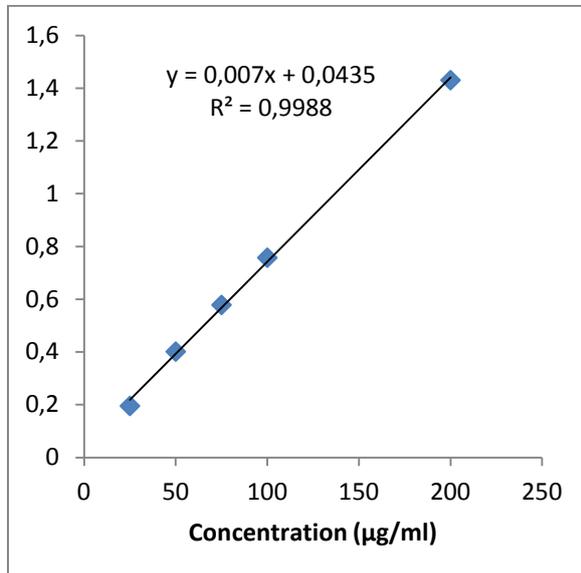
**Figure VI.** Courbe d'étalonnage pour le dosage de la vitamine C

#### 7. Courbe d'étalonnage d'alpha tocophérol



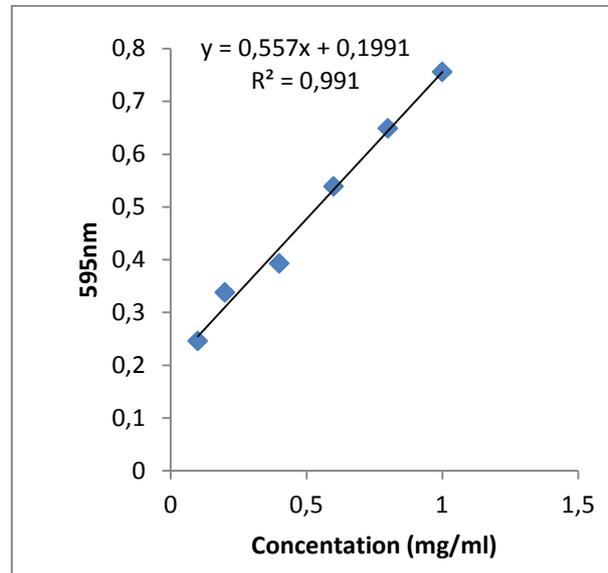
**Figure VII.** Courbe d'étalonnage d'alpha tocophérol pour le dosage de la vitamine E

### 8. Courbe d'étalonnage du glucide



**Figure VIII.** Courbe d'étalonnage du glucose pour le dosage du glycogène

### 9. Courbe d'étalonnage de protéine



**Figure IX.** Courbe d'étalonnage d SAB pour le dosage des protéines