

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des frères MENTOURI Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



N° d'ordre: 39/D3C/2017

N° de série: 03/Bioch/2017

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat de 3^{ème} cycle

en Biochimie appliquée

Présentée par :

REBAI Redouane

Thème

Corrélations entre le comportement dépressif, le profil lipidique et les paramètres du stress oxydatif au cours du diabète expérimental: Effet protecteur de la mélatonine et de la fluoxétine

Soutenue le 25/05/2017

Devant le jury:

Président:

Mr. CHIKHI Abdelouahab

Prof. U. des frères Mentouri-Constantine

Examineurs:

1. Mr. JASMIN Luc

Prof. U. de Californie, San Francisco. U.S.A

2. Mr. FRIH Hacène

Prof. U. Badji-Mokhtar-Annaba

3. Mr. SANHADJI Kamel

Prof. CRBt Constantine

4. Mr. ROUABAH Abdelkader

Prof. U. des frères Mentouri-Constantine

Directeur de thèse:

Mr. BOUDAH Abdennacer

Prof. ENSB Constantine

Année universitaire: 2016/2017

Mes remerciements vont d'abord à Dieu le tout puissant pour m'avoir donné la force et le courage nécessaire afin de mener ce travail au bout.

A travers ces lignes, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à monsieur le professeur BOUDAH Abdennacer, malgré ses nombreuses occupations, a accepté de prendre la direction de cette thèse en cours de route, et qui s'est honnêtement acquitté de son noble devoir de conseiller discret et de pourvoyeur d'idées à l'origine de ma réussite tout en me donnant toutefois la possibilité de trouver par moi-même mon cheminement personnel. Je lui dois tout.

A monsieur le président du jury Professeur CHIKHI Abdelouahab qui ma fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Je remercie également monsieur le Professeur JASMIN Luc, tout d'abord pour le grand honneur qu'il me fait de participer au jury de cette thèse et aussi pour ses conseils prodigués, son analyse soignée, ses commentaires judicieux, ses aides consenties et son inépuisable bonté. Lesquels m'ont permis de raffiner davantage certains points, hiérarchiser mes interrogations et orienter ainsi ma réflexion et mon engagement dans de futurs travaux de recherche.

A Monsieur le Professeur FRIH Hacène pour son support et son aide sans défaillance ainsi que sa perspicacité scientifique. Ses conseils et sa disponibilité qui m'ont permis de progresser tout en améliorant ma démarche scientifique.

A Monsieur le Professeur SANHADJI Kamel que j'ai admiré toujours l'ampleur de ses connaissances, sa modestie et ses qualités humaines. Veuillez trouver ici, le témoignage de mon admiration et de mon grand respect.

A Monsieur le Professeur ROUABAH Abdelkader d'avoir accepté d'examiner ce travail malgré ses grandes occupations.

A Monsieur le Professeur HAMIDECHI M. A pour son aide, ses corrections et ses directives qui m'ont été d'un grand soutien.

A toute l'équipe des ingénieurs de ENSB-Constantine, particulièrement Mme SAKHERI et Mlle RANDA. Je voudrais les remercier pour leur disponibilité.

A Monsieur GUIDOUME Kadour pour son aide et sa patience.

À ma famille

À mes amis

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et des acronymes

Introduction	1
Revue bibliographique	
1. Diabète sucré.....	3
1.1. Diabète de type 1.....	3
1.2. Diabète de type 2.....	3
1.3. Diabète gestationnel.....	4
1.4. Diabètes secondaires.....	4
1.5. Complications du diabète.....	4
1.5.1. Complications métaboliques aiguës.....	4
1.5.2. Complications chroniques.....	5
1.6. Modèles animaux du diabète sucré.....	5
1.6.1. Modèles animaux du diabète spontané.....	5
1.6.1.1. Modèles animaux du diabète de type 1.....	6
1.6.1.2. Modèles animaux du diabète de type 2.....	6
1.6.2. Modèles animaux du diabète induit par pancréatectomie chirurgicale.....	6
1.6.3. Modèles animaux du diabète induit par voie chimique.....	7
1.6.3.1. Diabète induit par l'alloxane.....	7
1.6.3.2. Diabète induit par la streptozotocine.....	7
2. Stress oxydatif.....	9
2.1. Radicaux libres.....	9
2.2. Implication des radicaux libres dans les fonctions physiologiques.....	12
2.3. Effets délétères des radicaux libres à l'échelle moléculaire.....	12
2.3.1. Altération de l'acide désoxyribonucléique.....	12
2.3.2. Oxydation des protéines.....	13
2.3.3. Lipoperoxydation.....	13
2.4. Défenses antioxydantes.....	15
2.4.1. Antioxydants enzymatiques.....	16
2.4.1.1. Glutathion peroxydase.....	16
2.4.1.2. Catalase.....	

2.4.1.3. Glutathion S-transférase.....	17
2.4.1.4. Superoxyde dismutase.....	17
2.4.2. Antioxydants non enzymatiques.....	17
2.4.2.1. Glutathion réduit.....	18
2.4.2.2. Vitamine E.....	18
2.4.2.3. Vitamine C.....	18
2.4.2.4. Acide urique.....	19
2.4.2.5. Oligoéléments.....	19
2.5. Diabète et stress oxydatif.....	19
2.5.1. Auto-oxydation du glucose.....	20
2.5.2. Voie des polyols.....	21
2.5.3. Glycation des protéines.....	21
2.5.4. Voie de la protéine kinase C.....	21
2.6. Stress oxydatif et la physiopathologie de dépression au cours du diabète.....	22
3. Mélatonine.....	23
3.1. Métabolisme de la mélatonine.....	25
3.2. Récepteurs mélatoninergiques.....	26
3.3. Effets physiologiques de la mélatonine.....	27
3.4. Potentiel antioxydant de la mélatonine.....	28
3.5. Activité antidépressive de la mélatonine.....	29
4. Fluoxétine.....	30
4.1. Mécanisme d'action de la fluoxétine.....	31
4.2. Activité antioxydante de la fluoxétine.....	32
Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique et conditions d'élevage.....	33
2. Induction du diabète et traitements.....	35
3. Pesée.....	35
4. Etude comportementale.....	36
4.1. Test du labyrinthe en croix surélevée.....	36
4.2. Test du champ ouvert.....	36
4.3. Test de la nage forcée.....	37
5. Prélèvement des échantillons et décapitation.....	37

5.1. Prélèvement du sang.....	38
5.2. Récupération du cerveau et préparation de l'homogénat.....	38
5.2.1. Homogénat cérébral.....	38
5.2.2. Homogénat érythrocytaire.....	39
6. Dosage des paramètres biochimiques.....	39
6.1. Paramètres sanguins.....	41
6.1.1. Dosage de l'insuline.....	41
6.1.2. Dosage de l'hémoglobine glyquée.....	41
6.1.3. Détermination de la glycémie.....	41
6.1.4. Dosage du cholestérol total.....	41
6.1.5. Dosage des triglycérides.....	42
6.1.6. Dosage du cholestérol-LDL.....	42
6.1.7. Dosage du cholestérol-HDL	43
6.1.8. Dosage de l'acide urique.....	44
6.1.9. Détermination de l'activité de l'aspartate aminotransférase.....	44
6.1.10. Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase.....	44
6.1.11. Détermination de l'activité de Phosphatase alcaline.....	45
6.1.12. Dosage de la créatinine.....	45
6.2. Dosage des paramètres du stress oxydatif au niveau tissulaire.....	45
6.2.1. Détermination du glutathion réduit.....	45
6.2.2. Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase.....	45
6.2.3. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase.....	46
6.2.4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase.....	46
6.2.5. Dosage du malondialdéhyde.....	46
6.2.6. Dosage des protéines totales.....	46
7. Analyse statistique.....	47

Résultats et discussion

1. Effets des traitements sur le poids corporel et les paramètres métaboliques.....	48
1.2. Effets des traitements sur le poids corporel.....	48
1.3. Effets sur les paramètres métaboliques.....	48
1.3.1. Effets des traitements sur la consommation d'aliments.....	48
1.3.2. Effets des traitements sur la consommation d'eau.....	48
1.3.3. Effets des traitements sur le volume urinaire.....	48

2. Effets des traitements sur les paramètres comportementaux.....	49
2.1. Effets des traitements sur les paramètres du labyrinthe en croix surélevée.....	51
2.2. Effets des traitements sur les paramètres du champ ouvert.....	51
2.3. Effets des traitements sur les paramètres de la nage forcée.....	52
3. Effets des traitements sur les paramètres sanguins.....	53
3.1. Effets des traitements sur la glycémie.....	57
3.2. Effets des traitements sur l'insulinémie.....	57
3.3. Effets des traitements sur le taux de l'hémoglobine glyquée.....	58
3.4. Effets des traitements sur les paramètres du profil lipidique.....	58
3.5. Effets sur l'activité des transaminases et phosphatase alcaline.....	58
3.6. Effet sur l'acide urique et la créatinine.....	59
4. Effets des traitements sur les paramètres du stress oxydatif.....	60
4.1. Effets des traitements sur les paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes.....	64
4.2. Effet des traitements sur les paramètres du stress oxydatif au niveau cérébral.....	64
Conclusion générale et perspectives.....	66
Références bibliographiques.....	73
Annexe.....	76

Liste des tableaux

<u>Tableau 1:</u>	Principales espèces réactives de l'oxygène.....	10
<u>Tableau 2:</u>	Classification des récepteurs mélatoninergiques et leurs localisations....	28
<u>Tableau 3:</u>	Composition du régime alimentaire pour un 1 kg d'aliment (ONAB).....	35
<u>Tableau 4:</u>	Variation de poids corporel (g) chez les rats témoins et traités après 4 semaines du traitement.....	48
<u>Tableau 5:</u>	Variation des paramètres métaboliques chez les différents groupes expérimentaux durant 28 jours de traitement.....	49
<u>Tableau 6:</u>	Paramètres du test du labyrinthe en croix surélevé chez les groupes expérimentaux.....	51
<u>Tableau 7:</u>	Paramètres de test du champ ouvert chez les groupes expérimentaux.....	53
<u>Tableau 8:</u>	Paramètres du test de la nage forcée chez les groupes expérimentaux....	54
<u>Tableau 9:</u>	Variations des paramètres sanguins chez les groupes expérimentaux.....	57
<u>Tableau 10:</u>	Paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes chez les groupes expérimentaux.....	65
<u>Tableau 11:</u>	Paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les groupes expérimentaux.....	66

Liste des figures

<u>Figure 1:</u>	Structure chimique de la streptozotocine.....	08
<u>Figure 2:</u>	Effets délétères de la STZ sur la cellule β pancréatique de rat.....	09
<u>Figure 3:</u>	Endommagement de l'ADN par les attaques radicalaire.....	13
<u>Figure 4:</u>	Processus de peroxydation lipidique et la formation des produits terminaux.....	15
<u>Figure 5:</u>	Régulation de la production des ERO par les différents antioxydants.....	16
<u>Figure 6:</u>	Régénération du glutathion, de la vitamine E et C.....	20
<u>Figure 7:</u>	Mécanismes métaboliques impliqués dans la genèse du stress oxydant au cours du diabète.....	20
<u>Figure 8:</u>	Etapes de glycation non enzymatique des protéines.....	22
<u>Figure 9:</u>	Circuit reliant les régions cérébrales impliquées dans les troubles dépressifs	25
<u>Figure 10:</u>	Voie de biosynthèse de la mélatonine.....	26
<u>Figure 11:</u>	Principales voies de dégradation de la mélatonine.....	27
<u>Figure 12:</u>	Effets antioxydants de la mélatonine et son action sur les différents radicaux libres oxygénés et azotés.....	30
<u>Figure 13:</u>	Métabolisme de la fluoxétine au niveau hépatique.....	32
<u>Figure 14:</u>	Dispositif du labyrinthe en croix surélevé (EPM).....	36
<u>Figure 15:</u>	Dispositif du champ ouvert (OFT).....	37
<u>Figure 16:</u>	Test de la nage forcée (FST).....	38
<u>Figure 17:</u>	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	40
<u>Figure 18:</u>	Variation des paramètres de labyrinthe en croix surélevé au 25 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	52
<u>Figure 19:</u>	Variation des paramètres de champ ouvert au 26 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	53
<u>Figure 20:</u>	Variation des paramètres de nage forcée au 28 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	54
<u>Figure 21:</u>	Variations des paramètres sanguins (le taux de l'insuline, du glucose et de l'hémoglobine), après le 28 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	58

<u>Figure 22:</u>	Variations des paramètres de profil lipidique (Cholestérol-total, C-HDL, C-LDL et les triglycérides), après le 28 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	59
<u>Figure 23:</u>	Variation de l'activité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline, après 28 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	60
<u>Figure 24:</u>	Variation du taux de l'acide urique et de la créatinine au niveau sanguin après 28 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	60
<u>Figure 25:</u>	Variations des paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes après le 28 ^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux.....	66
<u>Figure 26:</u>	Variation des paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les groupes expérimentaux (MDA et GSH).....	68
<u>Figure 27:</u>	Variation des paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les groupes expérimentaux (CAT, GSH-Px, GST).....	69

Liste des abréviations et des acronymes

4-HNE	4-hydroxynonéal
AGE	Produits terminaux de glycation
AGPI	Acide gras polyinsaturé
ALAT	Alanine-Amino transférase
ASAT	Aspartate-Amino transférase
CAT	Catalase
EPM	Elevated plus maze (labyrinthe en croix surélevée)
ERO	Espèces Réactives De l'oxygène
ERN	Espèces Réactives De l'azote
FST	Forced swimming test (test de la nage forcée)
Fe	Fer
GSH-Px :	Glutathion Peroxydase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
GST :	Glutathion S-transférase
HOCl:	L'acide hypochloreux
H₂O :	Eau
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
MDA :	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide-adénosine dinucléotide phosphate
NO :	Oxyde nitrique
OFT	Open field test (test du champ ouvert)
O₂ :	Oxygène
O₂' :	Radical superoxyde
•OH:	Radical hydroxyle
R•	Radical lipidique
RH :	Acide gras
ROO• :	Radical peroxyde
ROOH :	Hydroperoxyde
SOD:	Superoxyde dismutase

Unités

°C :	Degré Celsius
dl :	Décilitre
g :	Gramme
g/l:	Gramme/ litre
mg :	Milligramme
mg/kg	Milligramme/kilogramme
mg/dl :	Milligramme/décilitre
min :	Minute
mm :	Millimètre
mol :	Mole
mmol/l :	Millimolaire/litre
U/l :	Unité internationale/litre
µl:	Microlitre

Résumé

L'hyperglycémie chronique s'accompagne d'une production excessive des radicaux libres par divers mécanismes. Ceci est un signe indicateur du stress oxydatif qui se trouve impliqué dans l'aggravation des complications chroniques liées au diabète sucré. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets bénéfiques de la mélatonine et la fluoxétine sur les désordres métaboliques induits par le diabète, ainsi que sur les paramètres du stress oxydatif qui pourrait jouer un rôle causal dans l'apparition du comportement dépressif chez les rats rendus diabétiques suite à une injection intrapéritonéale de streptozotocine (60 mg/kg). Après 72 heures, les rats rendus diabétiques ont été traités par la mélatonine et la fluoxétine pendant 4 semaines. Des tests comportementaux tels que le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM), le champ ouvert (OFT) et la nage forcée (FST), ont été réalisés au cours de la dernière semaine de traitement pour vérifier les effets antidépresseurs et anxiolytiques de ces deux drogues.

À la fin de cette expérimentation, des prélèvements sanguins ont été effectués pour le dosage de quelques paramètres sanguins, ainsi que la détermination des marqueurs du stress oxydatif érythrocytaire et au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe.

Nos résultats ont montré que le traitement à la mélatonine et la fluoxétine a amélioré significativement le comportement anxieux chez les rats diabétiques durant l'EPM et l'OFT, le même traitement a pu renverser le comportement dépressif dans le FST.

Il a été noté par ailleurs que les deux traitements exercent un effet régulateur sur la glycémie et les paramètres du profil lipidique, ainsi ces deux drogues diminuent la lipoperoxydation érythrocytaire et améliorent le statut antioxydant au niveau des structures cérébrales impliquées dans la physiopathologie dépressive.

Toutefois, l'ensemble de ces résultats montre clairement que la mélatonine est dotée d'une activité antioxydante plus puissante que celle de la fluoxétine, ainsi elle exercerait un effet antidépresseur.

Mots clés: Diabète sucré, Dépression, Mélatonine, Fluoxétine, Désordres métaboliques, Stress oxydatif.

Abstract

The chronic hyperglycemia is accompanied by excessive production of free radicals by various mechanisms. This is an indicator of the oxidative stress that is involved in the worsening of chronic complications related to diabetes mellitus. The objective of this study is to evaluate the beneficial effects of melatonin and fluoxetine on metabolic disorders induced by diabetes, as well as on the parameters of oxidative stress that could play a causal role in the appearance of depressive behavior in rats rendered diabetic following an intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg / kg). After 72 hours, the diabetic rats were treated with melatonin and fluoxetine for 4 weeks. Behavioral tests such as the elevated plus maze (EPM), the open field (OFT) and forced swimming (FST) were performed during the last week of treatment to verify the antidepressant and anxiolytic effects of these two drugs.

At the end of this experiment, blood samples were taken for the determination of some biochemical parameters, as well as the determination of oxidative stress markers in erythrocytes, prefrontal cortex and hippocampus.

Our results showed that treatment with melatonin and fluoxetine significantly improved anxiety behavior in diabetic rats during EPM and OFT, the same treatment was able to reverse depressive behavior in the FST.

It was also noted that both treatments exert a regulating effect on blood glucose and lipid profile parameters, thus these two drugs decrease erythrocyte lipoperoxidation and improve the antioxidant status in the cerebral structures involved in the pathophysiology of depression

However, all these results clearly show that melatonin is endowed with a more potent antioxidant activity than that of fluoxetine, and thus it would have an antidepressant effect.

Key words: Diabetes mellitus, Depression, Melatonin, Fluoxetine, Metabolic disorders, Oxidative stress

ملخص

يرتبط ارتفاع السكر في الدم المزمن بإنتاج مفرط في الجذور الحرة من خلال اليات مختلفة. وهو علامة منبهة للإجهاد التأكسدي الذي يشارك في تفاقم المضاعفات المزمنة لمرض السكري. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثيرات المفيدة لميلاتونين والفلوكستين في الاضطرابات الأيضية الناتجة عن مرض السكري، إضافة الى قياس الاجهاد التأكسدي الذي يمكن ان يكون السبب في ظهور سلوك اكتئابي لدى الجرذان المصابة بداء السكري بعد الحقن بالستربتوزوتوسين (60 ملغ / كلغ). بعد 72 ساعة، تم علاج الفران المصابة بداء السكري بالميلاتونين والفلوكستين لمدة 4 أسابيع. إضافة الى قيام باختبارات سلوكية مثل اختبار ارتفاع عبر متاهة (EPM)، المجال المفتوح (OFT) و السباحة المجبورة (FST) قدمت خلال الأسبوع الأخير من العلاج للتأكد من الآثار المضادة للاكتئاب ومزيلة لقلق لهاذان العقارين. في نهاية التجربة، تم أخذ عينات دم لتحديد بعض القياسات البيوكيميائية، وكذا تحديد علامات الاجهاد التأكسدي في كريات الدم الحمراء القشرة الامامية الجبهية و الالبوكامب.

أظهرت نتائجنا أن العلاج باستعمال الميلاتونين والفلوكستين تحسن بشكل ملحوظ في سلوك القلق لدى الجرذان المصابة بداء السكري خلال EPM و OFT، نفس العلاج استطاع قلب السلوك الاكتئابي في FST.

كما لوحظ أن كلامن العلاجان يمارسا تأثير تنظيمي على مستوى السكر في الدم والمقاييس الدهنية، كما ان هاذان العقارين يخفضان نسبة الاكسدة الدهنية للكريات الدموية الحمراء ويحسنان وضع مضادات الأكسدة في بنيتا المعنيتان في الفيزيولوجيا المرضية للاكتئاب. لذلك، فكل هذه النتائج تدل بشكل واضح على أن الميلاتونين له نشاط مضاد للأكسدة أكثر قوة من الفلوكستين وبالتالي فهو يمارس تأثير مضاد للاكتئاب.

الكلمات المفتاحية: داء السكري، الميلاتونين، الفلوكستين، مستوى الدهون، الإجهاد التأكسدي.

Introduction

Introduction

Bien que les désordres métaboliques engendrés par l'état diabétique soient une réelle préoccupation, ce sont surtout les complications à long terme qui font du diabète la priorité numéro 1 en santé publique. L'hyperglycémie chronique caractéristique des sujets diabétiques génèrent souvent un stress oxydatif permanent susceptible d'être impliqué dans de nombreuses complications invalidantes du diabète.

En effet, il est désormais admis que de nombreux systèmes et organes sont affectés négativement par l'augmentation du stress oxydatif, y compris le cerveau, qui subit des changements pouvant accroître le risque du déclin cognitif et comportemental.

À ce titre, plusieurs travaux de recherche ont démontré que la production excessive des radicaux libres, issue de l'altération des défenses antioxydantes contribue directement à l'apparition de certaines pathologies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Tabner *et al.*, 2002; Phaniendra *et al.*, 2015), ainsi qu'à des perturbations neurocomportementales se manifestant par une symptomatologie anxio-dépressive (Da Silva Haeser *et al.*, 2007; Korczak *et al.*, 2011).

D'un autre côté, de nombreux travaux ont signalé que les troubles des fonctions cognitives et comportementales observés au cours du diabète, sont associés à des anomalies morphologiques et des changements structurels et neurochimiques au niveau des structures cérébrales impliquées dans les phénomènes d'apprentissage, de gestion du stress et des émotions tels que le cortex et l'hippocampe (Reagan *et al.*, 1999; Sima *et al.*, 2004; Castillo-Gómez *et al.*, 2015). Ces modifications pathologiques sont attribuées à la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui ciblent préférentiellement à la fois les membranes neuronales en raison de leurs teneurs élevées en acides gras polyinsaturés et la défense antioxydante enzymatique du cerveau qui est relativement faible par rapport aux autres tissus.

D'autres études (Chawla *et al.*, 2014) ont apporté la preuve que le diabète sucré s'accompagne d'altérations des différentes voies du métabolisme glucidique, lipidique et protéique facilitant ainsi la mise en place de différents processus d'aggravation des complications vasculaires. Dans ce contexte, il a été démontré que l'accumulation de produits terminaux de glycation (AGE) induite par l'élévation de glycation non enzymatique des protéines et l'auto-oxydation rapide du glucose, conduisent à une augmentation du stress oxydatif qui semblent impliqués dans le développement des complications du diabète (Rahimi *et al.*, 2005; Guillet, 2010).

Au sein de l'organisme, la mélatonine une indolamine chargée de contrôler les cycles biologiques circadiens, qui intervient également à d'autres niveaux pour agir comme un antioxydant impliqué dans les systèmes de protection cellulaire des organismes, en raison de sa capacité à neutraliser de nombreux radicaux libres et améliorer l'activité des enzymes antioxydantes (Tan *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004), il a été prouvé que cette neurohormone exerce une activité antidépressive et anxiolytique chez les rongeurs lorsque ils sont soumis à différents tests comportementaux (Papp *et al.*, 2006; Detanico *et al.*, 2009).

La fluoxétine, inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine qui est largement utilisé dans la pratique clinique pour le traitement les troubles dépressifs et de l'anxiété. De nombreuses études lui confèrent un rôle dominant dans la restauration des dommages oxydatifs en améliorant le statut antioxydant cellulaire suite à un déclin provoqué par le stress oxydatif (Behr *et al.*, 2012; Erman *et al.*, 2015). Outre ces effets, cette drogue pourrait influencer l'homéostasie glucidique et lipidique au cours du diabète sucré (Lustman *et al.*, 2000; Gülseren *et al.*, 2005; Biagetti et Corcoy, 2013).

Ce travail de thèse vise à évaluer chez des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine :

1. les effets de la mélatonine et de la fluoxétine sur les perturbations du métabolisme lipidique et glucidique induites suite à l'installation du diabète et
2. le comportement dépressif qui pourrait en résulter par le stress oxydatif au niveau de deux structures nerveuses de l'animal en l'occurrence le cortex préfrontal et l'hippocampe.

Revue
bibliographique

1. Diabète sucré

Le diabète sucré est une affection métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique due à un défaut de sécrétion de l'insuline, de son action ou les deux associées. Il est caractérisé par le taux élevé de glucose dans le sang au dessus du seuil de son élimination rénale, qui est à l'origine des complications dégénératives chroniques dont les lésions micro- et macro-vasculaires touchant de nombreux organes et systèmes tels que les yeux, les reins, les nerfs et vaisseaux sanguins (Frère *et al.*, 2001; Goldenberg et Punthakee, 2013).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe le diabète sucré en deux formes principales, le diabète de type 1, qu'on appelait auparavant diabète insulino-dépendant représentant 15% des diabètes sucrés, et le diabète de type 2, dit non insulino-dépendant ou diabète gras qui est le plus fréquent et représente environ 85% des cas. Outre ces deux formes de diabète sucré, on rencontre d'autres types de diabètes, tels que le diabète gestationnel, qui se manifeste chez les femmes pendant la grossesse, ainsi que les diabètes secondaires, apparaissant au cours de différentes maladies sous-jacentes ou de traitements médicamenteux.

1.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DID) est une maladie chronique apparait le plus souvent chez les personnes jeunes, d'où son appellation ancienne de diabète juvénile. Il est dû à un déficit majeur de la sécrétion de l'insuline, conséquence d'une destruction auto-immune des cellules bêta du pancréas (Hill *et al.*, 2013). L'apparition de ce type de diabète est le plus souvent rapide, il se révèle par une polyurie (une émission abondante d'urines), un amaigrissement brutal malgré une polyphagie (un appétit augmenté) et une polydipsie (un soif intense).

1.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DNID) est une autre forme chronique du diabète sucré qui nécessite un traitement quotidien à vie. Ce type est le plus fréquent chez les diabétiques, il se manifeste généralement à l'âge adulte, chez des individus de 40 ans et plus et peut toucher davantage les personnes obèses ou ayant un surplus de poids.

Cette maladie hétérogène est la résultante d'une insulino-résistance des tissus périphériques qui pourrait être d'origine génétique, acquise, ou les deux à la fois. L'état de l'insulino-résistance est associé à un déficit qualitatif et quantitatif de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Lange, 2004).

1.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est un diabète qui apparaît durant la grossesse, habituellement pendant la 24^{ème} et la 28^{ème} semaine de grossesse. Il s'agit d'un trouble de la tolérance au glucose qui conduit à une hyperglycémie, de sévérité variable et survenant pour la première fois pendant la grossesse. Cette forme du diabète disparaît après l'accouchement (Michel, 2001).

1.4. Diabètes secondaires

Il existe d'autres types de diabète moins fréquents qui peuvent se déclarer chez les personnes subissant des traitements médicamenteux (corticothérapie et contraceptifs oraux) ou ayant un défaut génétique au niveau de facteurs transcriptionnels. C'est le cas du diabète MODY (Maturity Onset Diabetes Of the Young) et le diabète mitochondrial qui est causé par une mutation typique de transmission maternelle, touchant l'ADN mitochondrial. Outre ces formes génétiques, on trouve d'autres types du diabète secondaire suite à une endocrinopathie (phéochromocytome, Cushing et acromégalie) (Molven *et al.*, 2008; Resmini *et al.*, 2009).

1.5. Complications du diabète

En plus des complications à long terme du diabète, les malades diabétiques sont sujets à d'autres complications directement liées au métabolisme du glucose.

1.5.1. Complications métaboliques aiguës

- **L'acidocétose diabétique:** lorsque l'hyperglycémie n'est pas bien contrôlée et que l'organisme manque d'insuline, il remplace le glucose par un autre carburant, en l'occurrence les acides gras. Cela peut conduire à une accumulation de corps cétoniques dans le sang, ce qui augmente son acidité. L'acidocétose diabétique est définie par trois phases successives comprenant une cétose et une baisse du pH au-dessous de 7,3 ou un taux de bicarbonate < 15 mmol/l, suivie par un coma acidocétosique (Tenoutasse *et al.*, 2010).

- **L'état hyperosmolaire:** il s'agit d'une véritable urgence médicale qui est fatale dans plus de 50 % des cas de diabète de type 2, se caractérise cliniquement par une hyperglycémie qui peut aller au-delà de 5 g/l, une hyperosmolarité plasmatique au-delà de 350 mmol/L. Cet état hyperosmolaire provoque généralement chez les diabétiques une déshydratation et une perte de connaissance (Lokrou *et al.*, 2010).

1.5.2. Complications chroniques

L'hyperglycémie chronique est susceptible de provoquer à long terme des complications dégénératives chroniques de deux types:

- la microangiopathie est liée à l'atteinte des artérioles et des capillaires avec une lésion fondamentale de l'épaississement de la membrane basale, elle se manifeste au niveau de la rétine (rétinopathie, jusqu'à la cécité), du glomérule rénal (néphropathie, une insuffisance rénale nécessitant la dialyse) et des nerfs (neuropathies) (Guérin-Dubourg, 2014).

- la macroangiopathie diabétique correspond à une atteinte des artères de gros calibre, elle est due à la sclérose des vaisseaux, secondaire à un dépôt lipidique à l'intérieur des vaisseaux, que l'on appelle "plaque d'athérome". Ainsi elle peut être liée également aux facteurs de risque cardio-vasculaire possible au niveau des artères coronaires (Infarctus du myocarde), des artères cérébrales (accident vasculaire cérébral) et des artères des membres inférieurs (Chanson *et al.*, 2000; Fowler, 2008).

1.6. Modèles animaux du diabète sucré

L'utilisation des modèles animaux dans le contexte du diabète expérimental devient primordiale pour mieux comprendre l'étiologie et la physiopathologie de cette maladie, en raison de sa gravité et de ses nombreuses répercussions métaboliques et dégénératives chez l'homme.

Cependant, le choix adéquat d'un modèle animal diabétique simulant fidèlement l'état métabolique constaté au cours du diabète sucré, va dépendre de la méthode utilisée. En effet en fonction de la pathologie étudiée de nombreux rongeurs ont été utilisés comme modèles diabétiques, quant à l'installation du diabète chez l'animal elle peut être effectuée de façon spontanée ou par induction chirurgicale, immunologique et chimique.

1.6.1. Modèles animaux du diabète spontané

Ce type d'animaux développent une forme génétique (loci de susceptibilité sont situés dans la région codant pour la molécule CMH de classe II 1-A g7 (ou I-A)), proche de la pathologie humaine. Plusieurs modèles animaux du diabète spontané sont capables de développer un type bien déterminé du diabète sucré (diabète de type 1 ou 2), d'où l'importance du choix du modèle diabétique servant de référence pour l'étude expérimentale.

1.6.1.1. Modèles animaux du diabète de type 1

Ces modèles animaux présentent la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine du diabète de type 1. Ils existent deux principaux rongeurs de laboratoire qui sont les plus utilisés pour étudier ce type de diabète, il s'agit:

- **La souris NOD (Non obese diabetic):** le diabète est induit par un processus auto-immun après 4 semaines d'âge, il est caractérisé par une infiltration leucocytaire au sein des îlots de Langerhans et la présence d'auto-anticorps contre l'insuline et/ou contre les protéines GAD (anticorps anti-décarboxylase de l'acide glutamique) ou IA2 (anticorps anti-insuline), ce qui conduit à une destruction de cellules bêta des îlots productrices de l'insuline (Delovitch et Singh, 1997).

- **Le rat BB (Bio-breeding):** il est la souche consanguine du rat de laboratoire (rat Wistar), ce modèle animal a grandement contribué à la recherche de pathogénèse du DT1. Le diabète est installé avec un processus très similaire à celui observé chez la souris NOD, mais l'insulite apparaît à un stade plus précoce que l'apparition des signes cliniques de la maladie (Saï et Gouin, 1997).

1.6.1.2. Modèles animaux du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est la forme hétérogène et la plus fréquente de diabète, ainsi les modèles animaux utilisés se caractérisent généralement par leur spontanéité à développer une résistance à l'insuline et une obésité, reflétant les conditions humaines de la maladie (King, 2012).

1.6.2. Modèles animaux du diabète induit par pancréatectomie chirurgicale

Cette technique est réalisée chez différentes espèces animales comme les rats, les cochons, les chiens et les primates. Le diabète induit par ablation complète du pancréas n'est plus utilisé actuellement, en raison d'une part des risques d'infection et des difficultés de manipulation qui nécessitent un environnement adéquat et des conditions d'hygiène strictes, mais aussi des complications dues aux troubles digestifs causés par l'absence du suc pancréatique (le pancréas exocrine) indispensable à la digestion. Outre ces risques, la perte des cellules alpha provoque une dérégulation hormonale due à l'absence de sécrétion du glucagon. La pancréatectomie partielle permet d'obtenir une hyperglycémie légère au bout de 6 à 7 semaines (Masiello, 2006; Etuk, 2010).

1.6.3. Modèles animaux du diabète induit par voie chimique

Parmi les nombreuses études récentes entreprises dans la recherche des effets antidiabétiques de composés d'origine végétale ou synthétique, deux substances toxiques détruisent de façon sélective les cellules β pancréatiques, il s'agit de l'alloxane et la streptozotocine qui sont les plus fréquemment utilisés pour induire un diabète expérimental (Radenković *et al.*, 2016). Ces deux analogues cytotoxiques du glucose exercent leur action diabétogène quand ils sont administrés par voie parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée), ainsi le type du diabète sucré induit par ces deux substances dépend le plus souvent de la dose utilisée et de l'espèce animale.

1.6.3.1. Diabète induit par l'alloxane

L'alloxane est un dérivé pyrimidique hétérocyclique de formule brute ($C_4H_2N_2O_4$). Ce puissant agent oxydant est synthétisé par oxydation de l'acide urique par l'acide nitrique (Lenzen et Panten, 1988). Son analogie structurale au glucose lui confère la possibilité de pénétrer à l'intérieur des cellules β des îlots de Langerhans à travers les transporteurs de glucose GLUT2 où il exerce son action cytotoxique sélective sur les cellules pancréatiques productrices d'insuline. Suite à son entrée dans les cellules β , l'alloxane est réduit en acide dialurique, puis réoxydé en alloxane, créant ainsi un cycle d'oxydoréduction générant des radicaux superoxydes (Lenzen, 2008). Ces derniers subissent une dismutation pour former du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles impliqués directement dans la fragmentation de l'ADN des cellules β . En outre, l'alloxane est capable d'inactiver les glucokinases par oxydation des deux groupements thiols (SH-) de l'enzyme, induisant ainsi une diminution de l'activité enzymatique des glucokinases dès lors observée au niveau hépatique après administration de l'alloxane. Cela joue un rôle important dans le processus d'induction du diabète de type 1 (Szkudelski *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2009).

1.6.3.2. Diabète induit par la streptozotocine

La streptozotocine (zanosar™) est un antibiotique synthétisé par une souche microbienne du sol *Streptomyces achromogenes*. Cette drogue a été utilisée initialement en chimiothérapie comme un agent alkylant pour traiter le cancer du pancréas. Actuellement la STZ est largement utilisée dans la recherche médicale pour produire un modèle animal de diabète de type 1 ou 2.

La structure de streptozotocine est suffisamment semblable à celle du glucose pour être transportée dans la cellule par les transporteurs GLUT2, mais pas reconnue par les autres

types de transporteurs de glucose. Cela explique la toxicité par rapport aux cellules β , étant donné que ces cellules expriment à un niveau relativement élevé ce type de transporteurs (Elsner *et al.*, 2000).

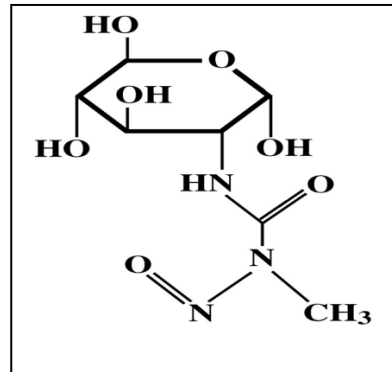


Figure 1: Structure chimique de la streptozotocine.

Le mécanisme pathogène de la STZ qui conduit à la mort cellulaire est l'alkylation de l'ADN. Ce dernier est méthylé par le groupement méthylnitrosouré de la STZ en position 6 de la guanine (Bennett et Pegg, 1981). Le transfert d'un groupement méthyle à l'ADN de la cellule β , entraîne des réactions en chaîne conduisant à la fragmentation de l'ADN. Le dommage de l'ADN cellulaire initie un mécanisme préjudiciable de la STZ, il s'agit de l'activation de la poly-(ADP-ribose)-polymérase, enzyme de réparation activée par les lésions radicalaires de l'ADN. Ce mécanisme provoque une déplétion du NAD^+ et de l'ATP, ce qui induit à la nécrose des cellules β et l'inhibition de la biosynthèse de l'insuline (Lenzen, 2008).

En outre, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées par la STZ, tels le H_2O_2 et OH^\cdot jouent un rôle crucial dans le mécanisme de la cytotoxicité et les changements délétères de l'ADN (fig. 2). De plus, la production élevée de NO^\cdot contribue aussi à l'altération de l'ADN, ce radical peut s'associer avec l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) pour former le peroxyneutre (ONOO^\cdot), un radical très toxique pour la cellule β (Szkudelski, 2001).

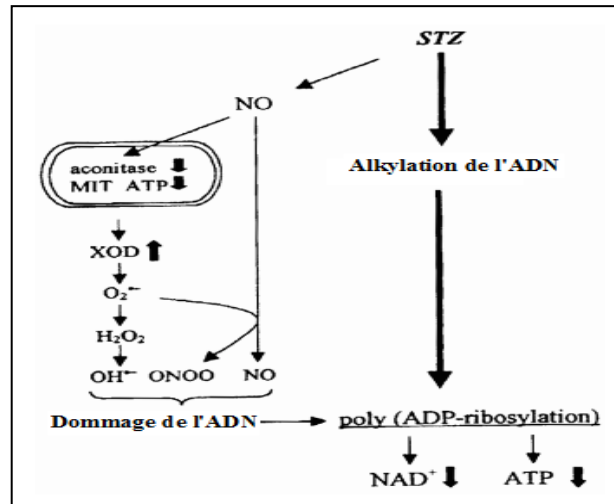


Figure 2: Effets délétères de la STZ sur la cellule β pancréatique de rat (Szkudelski, 2001).

2. Stress oxydatif

Notre organisme produit de l'énergie à partir des aliments et de l'oxygène, molécule indispensable à la vie. Cette dernière devient pathologique pour l'organisme lorsque elle génère des composés très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques, dénommés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Leurs fonctions sont très complexes car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou dans certaines conditions, être nuisibles en fonction de leur concentration. Pour cela, l'organisme a développé un système de défense très sophistiqué et composé de substances dites antioxydantes qui régulent la production des ERO. Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre en faveur d'un excès de molécules pro-oxydantes avec des effets délétères sur l'organisme par rapport à l'activité des systèmes de défense antioxydante (Defraigne et Pincemail, 2008).

2.1. Radicaux libres

Les radicaux libres sont synthétisés en permanence dans la cellule lors de réactions avec l'oxygène. En effet, ce sont des espèces chimiques instables possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs orbitales externes, la durée de vie des radicaux libres est très courte (10^{-4} s) et aussi instable. Ils sont très réactifs car ils cherchent un électron afin de réappairier leur électron célibataire, cette instabilité chimique fait que ces molécules ont la possibilité de réagir avec des structures de la cellule entraînant des dégâts cellulaires irréversibles (Krötz *et al.*, 2004; Bayr, 2005).

On distingue principalement deux types de radicaux libres dans l'organisme vivant:

- **Les espèces réactives azotées (ERA):** sont majoritairement les dérivées de l'oxyde nitrique (NO) qui est formé dans les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes terminaux d'azote du groupe guanido de la L-arginine sous l'action de l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Sennequier et Vadon-le Goff, 1998). Selon l'environnement, le NO peut être converti en diverses autres espèces azotées réactives (ERA) telles que le cation nitrosonium (NO^+), l'anion nitroxylique ($\text{NO}\bullet$) ou le peroxy-nitrite ($\text{ONOO}\bullet$).

- **Les espèces réactives oxygénées (ERO):** constituent la plus importante classe des ERO qui soient formés dans les systèmes vivants et peuvent être définies comme des molécules qui comportent de l'oxygène mais qui sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air. Elles englobent l'ensemble des dérivés radicalaires centrés sur l'oxygène (tabl.1) ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$, $\text{ROO}\bullet$), mais également les composés non radicalaires (ROOH , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$) (Apel, 2004).

Tableau 1: Principales espèces réactives de l'oxygène

Radical libre oxygéné	Origine et réactions de formation	Propriétés
Le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	<p>L'oxygène moléculaire subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron).</p> <ul style="list-style-type: none"> -Au niveau la membrane mitochondriale interne sous l'action de l'ubiquinone et de NADH déshydrogénase (Cadenas et Davies, 2000). -Au niveau des cellules vasculaires endothéliales tout comme la NADPH oxydase (Nauseef, 2014). - Au niveau du réticulum endoplasmique par le système des cytochromes P450 (lors détoxification des xénobiotiques) (Puntarulo et Cederbaum, 1998). - Au niveau du cytosol par action des xanthine oxydases (Lamprecht <i>et al.</i> 2004) 	<p>Ce radical présente une réactivité restreinte mais c'est un précurseur des autres ERO plus toxiques</p>

	$O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^- \cdot$	
Le radical hydroxyle ($\cdot OH$)	<p>Produit à partir de la transformation de l'H_2O_2 par une succession de réactions en chaîne, initiée par la réaction de Fenton (en présence de métaux de transition) et suivie par la réaction de Habber-Weiss:</p> $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + ^-OH$ <p>(réaction de Fenton).</p> $H_2O_2 + O_2^- \cdot \rightarrow \cdot OH + ^-OH + O_2$ <p>(réaction de Habber-Weiss).</p> <p>- La source principale de ce radical: Cellules du système immunitaire (Granulocytes et Macrophages) (Rossi <i>et al.</i>, 1985).</p>	le plus réactif des ERO et le plus dangereux pour les composants cellulaires
Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	<p>Formé à partir de l'anion superoxyde sous l'action catalytique du superoxyde dismutase (SOD)</p> $O_2^- \cdot + O_2^- \cdot \xrightarrow{SOD, 2 H^+} H_2O_2 + O_2$ <p>- Les principale sources de cette molécule:</p> <ul style="list-style-type: none"> - les peroxysomes et les microsomes - la désamination oxydative des amines par les monoamine oxydases existantes dans la membrane mitochondriale externe (Halliwell <i>et al.</i>, 2000; Jenner, 2003). 	Ce n'est pas un radical libre, mais sa diffusion facile à travers les membranes cellulaires, lui rend une molécule toxique (précurseur du $\cdot OH$) par réaction de Fenton/Haber-Weiss.
Le radical pyroxyyle ($ROO\cdot$)	<p>Formé suite à l'oxydation d'acides gras polyinsaturés par l'oxygène singulet ou le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (Niki, 2014), cette réaction se déroule en deux étapes:</p> $RH + \cdot OH \rightarrow R\cdot + H_2O$ <p>(réaction 1).</p>	Il est doté d'un pouvoir oxydant important mais inférieur à celui de ($\cdot OH$), ainsi il peut se

	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ (réaction 2).	décomposer pour donner le radical ($O_2\cdot$).
L'acide hypochloreux (HOCl)	Produit à partir du peroxyde d'hydrogène sous l'influence des myéloperoxydases: $H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{myéloperoxydase}} HClO + HO^-$ - les cellules immunitaires (granulocytes) sont la principale source de l'acide hypochloreux (Hawkins, 2001).	Toxique pour les constituants cellulaires en raison de sa diffusion facile à travers les membranes cellulaires

2.2. Implication des radicaux libres dans les fonctions physiologiques

Malgré les effets extrêmement dangereux pour les cellules de l'organisme et la susceptibilité d'engendrer un nombre considérable de maladies, les radicaux libres remplissent de nombreuses fonctions indispensables pour la survie cellulaire. Ils contribuent aux fonctions immunitaires pour la destruction des microorganismes comme nous l'avons vu précédemment où les cellules immunitaires produisent différents ERO dont le but d'éliminer les agents microbiens (Knight, 2000). Ces espèces jouent également un rôle important dans l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire (NFκB, Nrf-2 et P53) impliquées dans la mort cellulaire programmée, indispensables dans le développement et l'homéostasie des organismes multicellulaires (Finkel, 2003; Barouki, 2006).

2.3. Effets délétères des radicaux libres à l'échelle moléculaire

La production excessive de radicaux libres provoque des dommages directs de macromolécules cellulaires (acides nucléiques, protéines et lipides) (Bonfont-Rousselot, 2001).

2.3.1 Altération de l'acide désoxyribonucléique

L'acide désoxyribonucléique est l'une des cibles privilégiées des radicaux libres. L'altération de l'ADN se produit lorsque les radicaux libres changent la structure chimique des bases azotées en causant ou en créant des mutations nouvelles (fig. 3). Le radical ($\cdot OH$), par exemple, peut réagir avec la guanine pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) qui s'associe avec l'adénine à la place de la cytosine, ainsi les produits terminaux de la peroxydation des acides gras polyinsaturés tel que le MDA, peuvent avoir une action

mutagène sur l'ADN par formation d'adduits. Ces altérations entraînent des mutations qui peuvent être l'une des causes du vieillissement cellulaire et parmi les principaux instigateurs du cancer (Morel et Barouki, 1998; Halen *et al.*, 2007).

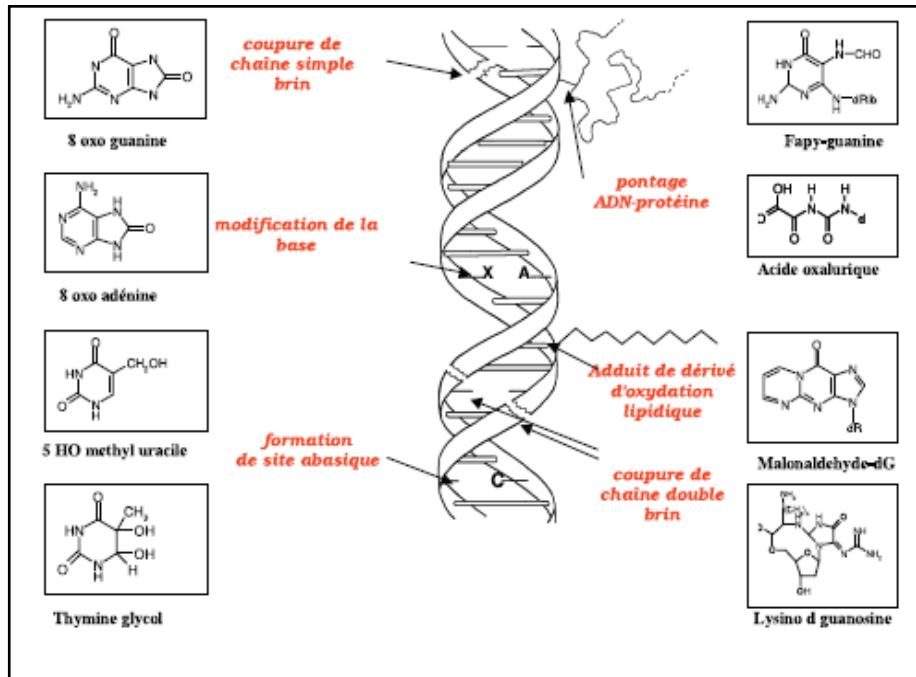


Figure 3: Endommagement de l'ADN par les attaques radicalaires (Favier, 2003).

2.3.2. Oxydation des protéines

Presque tous les acides aminés composant les protéines peuvent être oxydés par les ERO, cette oxydation a lieu entre les radicaux libres et les groupes latéraux des acides aminés particulièrement la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine (Favier, 1997), pour donner naissance à des protéines carbonylées et des liens croisés par le clivage de la chaîne peptidique. Contrairement aux autres, l'oxydation de ces résidus d'acides aminés sulfurés est réversible, cela peut constituer un mécanisme important pour la régulation de certaines fonctions enzymatiques.

L'oxydation peut conduire également à l'hydroxylation de groupes aromatiques et de chaînes latérales d'acides aminés aliphatiques, comme elle induit aussi la formation d'agrégats protéiques réticulés. De plus, certains résidus des protéines réagissent avec des produits issus de l'oxydation d'acides gras polyinsaturés tels le malondialdéhyde, le 4-hydroxynonéal et avec des dérivés de glucides (la glycation) (Stadtman et Levine, 2003). Ces modifications conduisent généralement à une altération de la fonction de protéines qui perdent leur activité catalytique lorsqu'il s'agit des enzymes et leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand.

2.3.3. Lipoperoxydation

La peroxydation lipidique résulte de l'attaque de radicaux libres au niveau d'une double liaison des acides gras polyinsaturés (acide linoléique, linoléique, et arachidonique), en présence de l'oxygène moléculaire. Cette réaction se produit au niveau des membranes des cellules qui sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides et les sphingolipides. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire ou à une altération de leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, perte d'activité d'enzymes ou de récepteurs par exemple) (Cillard et Cillard, 2006; Michel *et al.*, 2008).

Les attaques radicalaires peuvent également cibler les lipoprotéines circulantes telles que les LDL en raison de leurs richesses en cholestérol et en phospholipides aboutissant à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. Ces derniers se transforment petit à petit en cellules spumeuses incriminées dans l'athérogenèse (Haleng *et al.*, 2007).

Les réactions de la peroxydation lipidique se décomposent en trois étapes successives: l'initiation, la propagation et la terminaison (fig. 4).

La phase d'initiation débute lorsque un initiateur radicalaire tel que le $\bullet\text{OH}$, arrache un hydrogène de l'acide gras polyinsaturé (RH) situé sur un carbone placé entre deux doubles liaisons pour former un radical lipidique ($\text{R}\bullet$) qui ensuite se transforme en diène conjugué par réarrangement intramoléculaire. Ce dernier en présence d'une molécule d'oxygène, donne un autre radical, le peroxy ($\text{ROO}\bullet$) (la phase d'initiation) suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un acide gras voisin, une telle combinaison conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (ROOH), tandis que le deuxième acide gras qui vient de donner son hydrogène est transformé en nouveau radical diène conjugué qui sera oxydé par l'oxygène pour former le 2^{ème} radical peroxy, créant ainsi une réaction en chaîne (c'est la phase de propagation) (Michel, *et al.*, 2008). Lorsqu'un radical initie la peroxydation, environ 25 molécules d'acides gras sont oxydées dans la phase de propagation (Barclay et Ingold, 1980; Cillard et Cillard, 2006).

Enfin, les peroxydes générés seront neutralisés partiellement par le glutathion peroxydase et le reste va se fragmenter facilement en différents produits terminaux (le malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal et l'isoprostane).

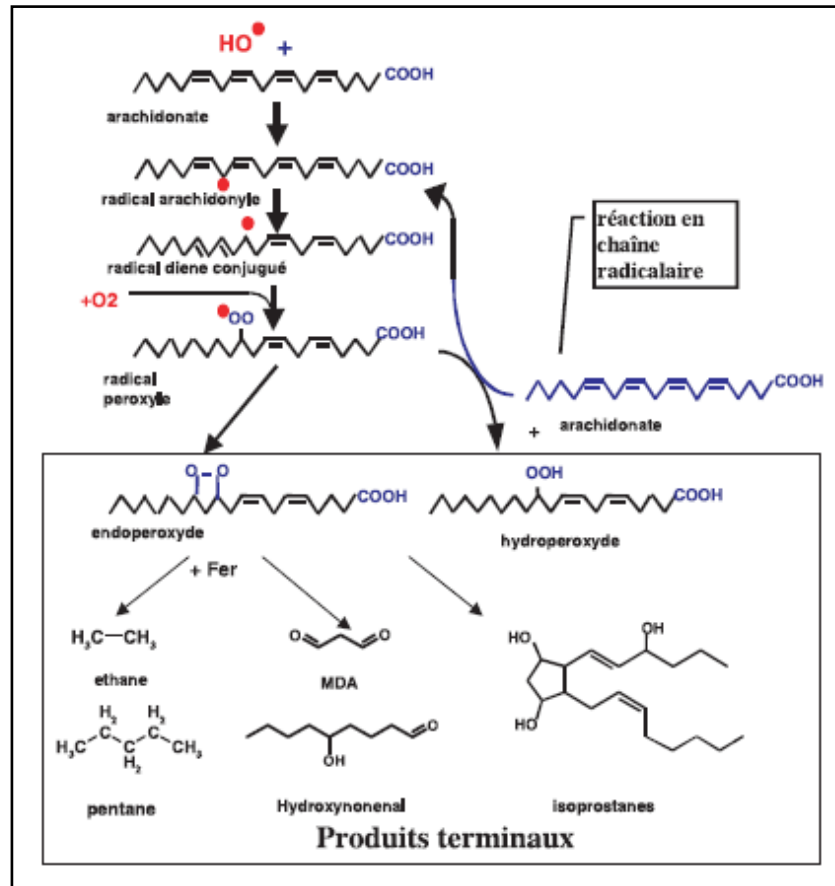


Figure 4: Processus de peroxydation lipidique et la formation des produits terminaux (Favier, 2003).

2.4. Défenses antioxydantes

Le système de défense antioxydant correspond à l'ensemble des moyens mis en œuvre pour contrôler la surproduction d'ERO et leurs effets délétères sur les composants cellulaires. Pour cela l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes pouvant neutraliser les ERO qui s'accumulent dans la cellule (fig. 5). Ce système de défense est divisés en deux sources: la première est endogène, composée d'enzymes (superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GSH-Px), glutathion-S-transférase (GST).....) et de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine). A cela s'ajoutent quelques molécules antioxydantes (glutathion et acide urique....) quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc (cofacteurs d'enzymes antioxydantes); la deuxième peut être représenté par des molécules apportées par l'alimentation (vitamines C, E, caroténoïdes, flavonoïdes, glutathion....) (fig. 5).

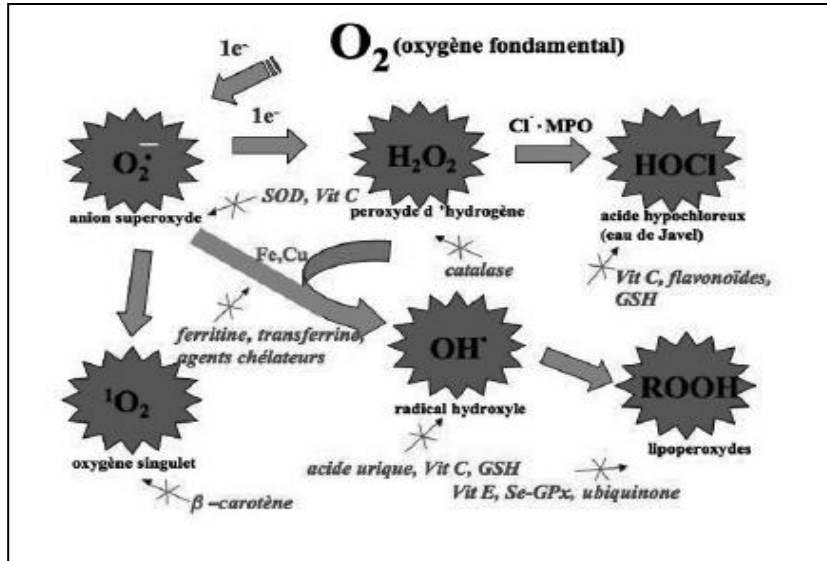
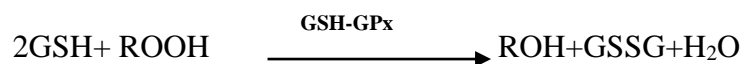
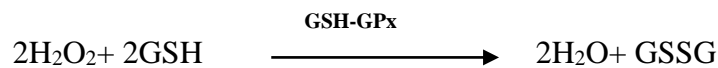


Figure 5: Régulation de la production des ERO par les différents antioxydants (Haleng *et al.*, 2007).

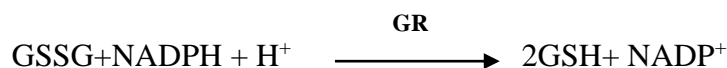
2.4.1. Antioxydants enzymatiques

2.4.1.1. Glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9)

La glutathion peroxydase (GSH-GPx) est une sélénoprotéine ayant fonction d'enzyme (cinq isoformes) et présente presque dans tous les tissus des mammifères, sa structure comporte quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Elle catalyse la réaction de réduction de peroxyde d'hydrogène en eau aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH), mais aussi assure l'élimination des hydroperoxydes lipidiques de type ROOH en ROH.



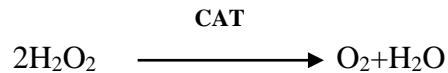
L'action de cette enzyme dépend de l'activité d'une autre enzyme, la glutathion réductase (GR) qui permet de réduire le glutathion oxydé (GSSG) aux dépens du NADPH qui lui-même est régénéré grâce à la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH) alimentée par la voie des pentoses phosphates (Richard *et al.*, 1997).



Sa distribution étant extracellulaire et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries.

2.4.1.2. Catalase (EC 1.11.1.6)

La catalase (CAT) est une enzyme héminique, permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et dioxygène (Goudable et Favier, 1997).



Ces enzymes sont ubiquitaires chez tous les organismes aérobies, retrouvées dans les peroxysomes des eucaryotes, elles sont formées de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés, comportant chacune un groupe hème (contient des atomes de fer à l'état Fe^{+3} et une molécule de NADPH.) qui constituent les sites actifs de la protéine.

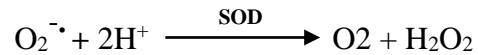
La réaction catalysée par cette enzyme commence lorsque la liaison (O-O) du peroxyde d'hydrogène subi une coupure par l'atome de fer, en créant une molécule H_2O et un groupement Fe(IV)=O fer-oxygène très oxydant. Celui-ci peut ensuite oxyder une nouvelle molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène.

2.4.1.3. Glutathion S-transférase (E.C 2.5.1.18)

La glutathion S-transférases (GST) est une protéine dimérique de poids moléculaire d'environ 25 kDa, catalyse la conjugaison du glutathion à des substrats électrophiles (endogènes et exogènes), nocifs pour la cellule. Par conséquent, cette classe d'enzyme constitue une importante ligne de défense protégeant les composants cellulaires (ADN, lipides et protéines). Les isoenzymes du GST ont été classifiés en 8 isoformes cytologiques: mu (GSTM), alpha (GSTA), pi (GSTP), tête (GSTT), zêta (GSTZ), sigma (GSTS), kappa (GSTK) et oméga (GSTO), sachant que les trois premiers isoformes étant les plus fréquents (Habdous *et al.*, 2004; Poisson, 2013).

2.4.1.4. Superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)

Cette métalloenzyme est ubiquitaire et présente dans la majorité des organismes vivants, elle catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire (Goudable et Favier, 1997).



On recense chez l'être humain 3 isoenzymes qui diffèrent par leur contenu métallique (Manganèse, Cuivre ou Zinc), leur structure et leur localisation cellulaire. La Cu/Zn-SOD1 est une protéine dimérique se trouvant dans le cytosol de toutes les cellules avec une activité plus importante au niveau du foie et des érythrocytes, la Mn-SOD2 est une SOD à manganèse présente dans la matrice mitochondriale mais également sur la paroi interne des mitochondries (Macmillan-Crow et Cruthirds, 2001). La Cu/Zn-SOD3 est la forme extracellulaire ayant une structure tétramérique et sécrétée par les cellules musculaires lisses. Cette SOD protège les parois artérielles du stress oxydant exogène (Haleng *et al.*, 2007).

2.4.2. Antioxydants non enzymatiques

2.4.2.1. Glutathion réduit

Le glutathion réduit (GSH) est l'antioxydant à fonction thiol le plus abondant au niveau cellulaire et qui joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. Il est formé par la condensation de trois acides aminés: l'acide glutamique, la cystéine et la glycine (γ -L-glutamyl-cystéinyl-glycine), sa fabrication dépend de la disponibilité de la cystéine, laquelle est relativement peu abondante dans les produits alimentaires. La molécule de cystéine procure une activité biochimique importante à la molécule du glutathion afin d'effectuer les fonctions de détoxification des ERO, ainsi ce tripeptide existe sous deux formes oxydée (GSSG) et réduite (GSH) qui est la forme majoritaire, le rapport GSH/GSSG est un excellent marqueur pour apprécier l'état du stress oxydatif au sein de l'organisme (Poisson, 2013). Le GSH réduit le peroxyde d'hydrogène en eau selon une réaction catalysée par la glutathion peroxydase (Goudable et Favier, 1997). Il est aussi considéré comme un puissant chélateur des métaux de transition et joue un rôle clé dans la régénération de la vitamine E et C sous leur forme active (Haleng *et al.*, 2007).

2.4.2.2. Vitamine E

La vitamine E est une vitamine liposoluble fait partie des phénols et comporte une chaîne latérale carbonée lui conférant un caractère hydrophobe qui permet son insertion au sein des lipoprotéines et des membranes cellulaires riches en acides gras polyinsaturés. Cette vitamine recouvrant un ensemble des tocophérols (α -tocophérol, β -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol), cependant les deux tocophérols α , γ sont intéressants d'un point de vue biologique. Ces derniers agissent parallèlement à la vitamine C et au glutathion,

essentiellement comme antioxydants contre les dérivés des ERO produits notamment par la lipoperoxydation (Goudable et Favier, 1997), ce qui explique l'effet bénéfique de cette vitamine dans la lutte contre le vieillissement, dans la prévention de certains cancers et des maladies cardiovasculaires grâce à la diminution de l'oxydation des LDL qui initie le processus de lésions artérielles (athérosclérose) (Ross, 1999).

2.4.2.3. Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique), compte parmi les vitamines hydrosolubles présentes dans les compartiments intra et extracellulaires. Elle contribue aux nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme telles la réponse immunitaire, la métabolisation du fer, la biosynthèse du collagène....

Le rôle important de l'acide ascorbique dans la neutralisation des radicaux libres les plus nocifs pour les composants cellulaires, le superoxyde et le peroxyde a été démontré (Vertuani *et al.*, 2004). De plus, elle exerce son action antioxydante en synergie avec le bêta-carotène, le sélénium et le zinc pour piéger l'excédent de radicaux libres présents dans l'organisme, ainsi elle permet de régénérer la vitamine E pour limiter la peroxydation lipidique (fig. 6) (Haleng *et al.*, 2007).

2.4.2.4. Acide urique

L'acide urique est une substance issue de la dégradation des purines chez l'homme, il est l'un des antioxydants les plus importants dans le plasma. À pH physiologique, l'acide urique est retrouvé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux hydroxyles et peroxyde, ainsi il permet de maintenir l'activité de la SOD3, enzyme indispensable à la fonction endothéliale et vasculaire.

Les réactions de neutralisation des radicaux libres par l'acide urique, aboutissent à un radical urate qui pourrait être rapidement réduit en présence de la vitamine C (Hink *et al.*, 2002; Haleng *et al.*, 2007).

2.4.2.5. Oligoéléments

À concentration physiologique, les oligoéléments comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le sélénium (Se), jouent un rôle important en tant que cofacteurs enzymatiques, indispensables au bon fonctionnement des enzymes exerçant un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydatif. À titre d'exemple, on a ainsi décrit que le cuivre, le zinc et le manganèse sont des cofacteurs de la SOD (Cu/ Zn-SOD, Mn-SOD), le sélénium présent dans le site actif de l'enzyme GSH-GPx jouerait également un rôle primordial dans la

lutte contre les radicaux libres, (Cartes *et al.*, 2005), comme il intervient aussi dans l'activité de différentes sélénoprotéines (Steinbrenner et Sies, 2009).

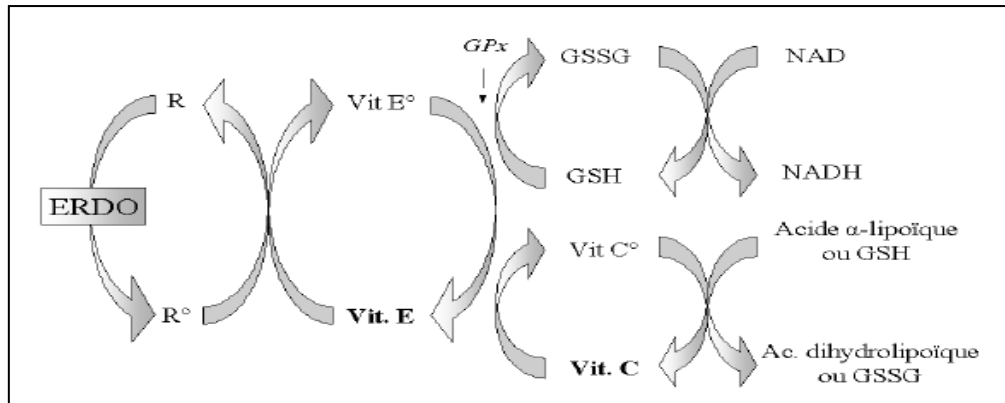


Figure 6: Régénération du glutathion, de la vitamine E et de la vitamine C (Malardé, 2012).

2.5. Diabète et stress oxydatif

Lors de l'hyperglycémie chronique, le glucose exerce son effet toxique en mettant en jeu plusieurs mécanismes pathogéniques conduisant à une augmentation du stress oxydatif par production accrue des ERO qui semblent impliqués dans l'apparition des complications dégénératives du diabète (Delattre *et al.*, 1999). Parmi ces mécanismes, nous citons l'auto-oxydation du glucose, l'activation de la voie des polyols, la production de produits terminaux de la glycation et l'activation des protéines kinases C (fig.7).

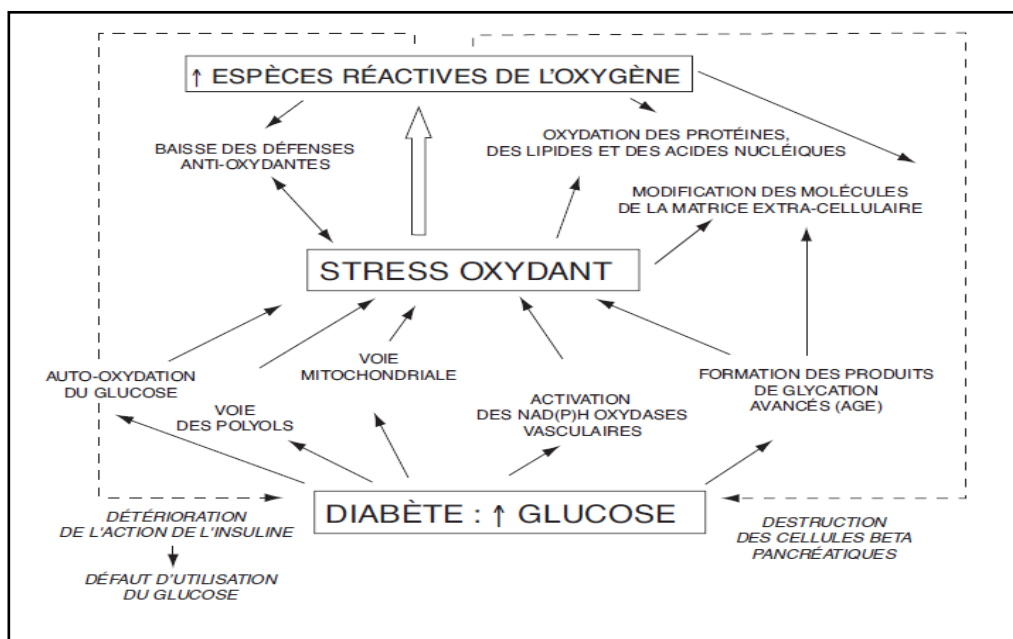


Figure 7: Mécanismes métaboliques impliqués dans la genèse du stress oxydatif au cours du diabète (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2004).

2.5.1. Auto-oxydation du glucose

Lorsque le glucose est en forme instable ène-diol (l'une de ses formes linaires transitoire) il peut s'oxyder en présence de métaux de transition tel le fer, aboutissant à la formation d'un radical anionique ène-diol qui interagit avec l'oxygène moléculaire pour libérer des anions superoxydes ou donner naissance à des aldéhydes comme le glyoxal. Ce dernier se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît la formation de certains produits de glycation avancés (AGE) comme la carboxyméthyllysine qui provoque le déclenchement de réactions de Fenton avec production d'ERO (Delattre *et al.*, 1999; Haleng *et al.*, 2007).

2.5.2. Voie des polyols

En présence de concentrations intracellulaires élevées de glucose, une fraction non oxydée de ce substrat est dirigée vers la voie des polyols pour une production accrue du sorbitol sous l'action de l'aldose réductase. Cette réaction conduit à la déplétion intracellulaire de NADPH qui est indispensable à l'activité de l'aldose réductase et en conséquence, la diminution du taux intracellulaire de glutathion réduit (GSH), un facteur important de protection vis-à-vis des dommages créés par les radicaux libres oxygénés (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2004; Zghal-Mokni *et al.*, 2005). De plus, le sorbitol produit est ensuite oxydé en fructose par la sorbitol-déshydrogénase, une telle réaction conduit à l'accumulation du sorbitol et le fructose qui sont peu métabolisés et peu diffusibles à travers la membrane cellulaire induisant ainsi différentes complications du diabète au niveau de la rétine, le rein et les vaisseaux (Racah, 2004).

2.5.3. Glycation des protéines

La glycation est une réaction non enzymatique du glucose et des protéines, il en résulte la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose et les groupements amines libres des protéines. Cette réaction, très dépendante du temps d'exposition au sucre et de la concentration sanguine en glucose, se déroule en plusieurs étapes, dans ses phases précoces, la formation d'une liaison instable entre le groupement aldéhyde du glucose et le résidu aminé d'une protéine (base de Schiff) (fig.8), capable de subir un réarrangement moléculaire dit réarrangement d'Amadori conduit à des composés dicarbonylés. Ces produits peuvent ensuite se condenser et réagir entre eux aboutissant aux produits terminaux de glycation AGE (ou produits de Maillard) qui s'accumulent notamment au niveau du collagène et autres protéines de la matrice extracellulaire où ils participent au développement des complications micro-vasculaires ((Bonfont-Rousselot *et al.*, 2004; Racah, 2004).

Au niveau plasmatique, les AGE se lient avec des récepteurs (RAGE) présents sur les macrophages et les cellules endothéliales, glomérulaires, ce qui conduit à la formation des ERO et à l'activation du facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor kappa-B) qui joue un rôle central dans les réactions inflammatoires (Hudson *et al.*, 2005).

Les principales protéines ciblées par le mécanisme de glycation sont: l'albumine, le collagène, le fibrinogène, les immunoglobulines, les LDL et l'hémoglobine. Cette dernière (la variante HbA1c) est utilisée le plus souvent pour la surveillance de l'équilibre glycémique.

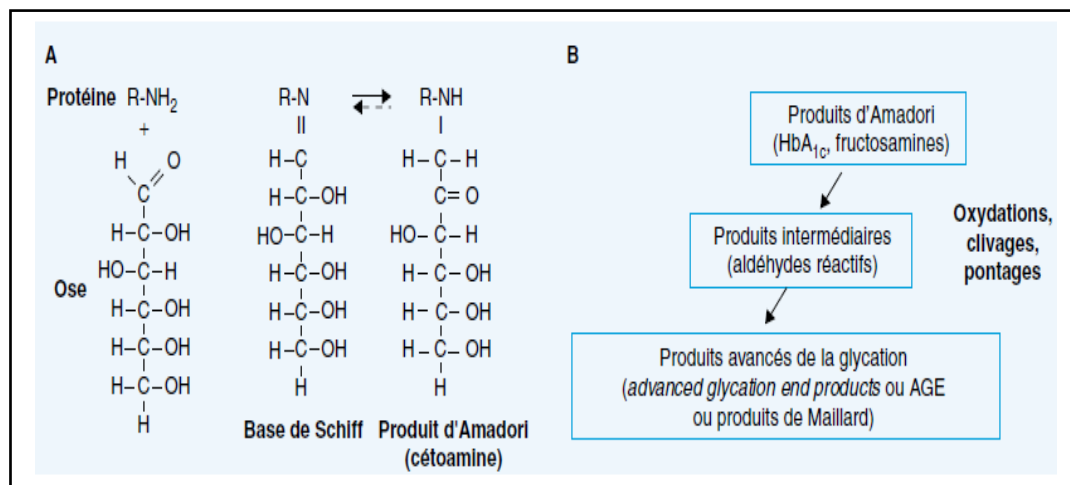


Figure 8: Etapes de glycation non enzymatique des protéines (Gillery, 2006).

2.5.4. Voie de la protéine kinase C

Les concentration élevée du glucose qui caractérise l'état diabétique, induit la synthèse de diacylglycérol (DAG), un messenger secondaire dérivé des phospholipides membranaires, impliqué dans l'activation de la protéine kinase C (PKC) qui semble contribuer à la production des ERO via l'activation des NADPH oxydases au niveau des cellules endothéliales (Jones, 2000), mais aussi à l'augmentation de l'expression des facteurs vasoconstricteurs telle l'endothéline-1 et la réduction de la production de NO (vasodilatateur), entraînant des anomalies de flux sanguins locaux (Defraigne, 2005).

A coté des ces 4 voies, il existe d'autres mécanismes favorisant le stress oxydatif au cours du diabète comme l'activation de la voie des hexosamines qui provoque de multiples changements dans l'expression génique et dans la fonction des protéines (Defraigne, 2005).

2.6. Stress oxydatif et la physiopathologie de dépression au cours du diabète

Plusieurs hypothèses ont été émises pour élucider les mécanismes qui sous-tendent la physiopathologie de la dépression au cours du diabète. Parmi ces hypothèses, nous soulignons l'hyperglycémie comme principale cause métabolique du développement des troubles dépressifs, l'implication de la neurotransmission monoaminergique, l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) et l'altération de la neurogénèse. En outre, il a été démontré que l'effet néfaste du stress oxydatif se répercute en particulier au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal, zones cérébrales importantes pour la médiation et la modulation du comportement émotionnel.

En effet, la dépression ne peut être attribuée à une seule zone anatomique, elle implique différentes structures cérébrales dont le cortex préfrontal (PFC) et les régions limbiques du cerveau, avec leurs circuits interconnectés (fig.9). Ces régions cérébrales sont le siège de différentes fonctions cognitives dites supérieures comme la mémoire, les émotions, la régulation de l'humeur et les fonctions exécutives (Maletic *et al.*, 2007).

- **le déficit de la neurotransmission monoaminergique:** la neurobiologie de la dépression postule que la dépression correspond à un déficit des neurotransmissions noradrénergiques (NA) et sérotoninergiques (5-HT) (Meyer *et al.*, 2006), mais également la participation d'autres neurotransmetteurs, tels que l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et/ou le glutamate (Luscher *et al.*, 2011; Catena-Dell'Osso *et al.*, 2013). De ce fait, certains agents pharmacologiques tels les antidépresseurs favorisant l'augmentation des concentrations synaptiques de monoamines comme la sérotonine et la noradrénaline montrent une efficacité dans l'amélioration des symptômes dépressifs, soutenant ainsi le concept de déséquilibre chimique ou de faible activité des neurotransmetteurs au niveau des régions spécifiques du cerveau. De plus, cette dérégulation a été aussi observée dans l'état diabétique, particulièrement une diminution des niveaux de la sérotonine (Haider *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014).

- **la dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien:** Les cellules neuro-sécrétoires du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus sécrètent le facteur de libération de CRH (corticotrophin-releasing hormone) dans le système circulatoire de la glande pituitaire antérieure où se fixe à ses récepteurs, stimulant la production de l'ACTH qui est envoyée dans la circulation sanguine pour inciter la libération de glucocorticoïdes (le principal chez l'humain étant le cortisol et la corticostérone chez les rongeurs) (Spiga *et al.*, 2011; Schloesser *et al.*, 2012).

les diabétiques ayant un diabète mal contrôlé présentent une hypersécrétion de glucocorticoïdes et une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), associées à une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'hormone de libération de la corticotrophine hypothalamique et de l'ARNm du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans l'hippocampe, conduisant à une altération de la neurogénèse et la plasticité synaptique qui sont impliquées dans la pathophysiologie de nombreuses maladies, y compris la dépression et les déficits cognitifs observés au cours du diabète (Chan *et al.*, 2003; Stranahan *et al.*, 2008; Detka *et al.*, 2013).

- **La diminution de la neurogénèse et l'altération de la plasticité neuronale:** la neurogénèse hippocampique est un processus qui se déroule principalement dans le gyrus dentelé grâce à la présence des cellules souches. Ce phénomène s'avère indispensable à l'action de la plupart des antidépresseurs (Mendez-David *et al.*, 2013) et pourrait être perturbé par une baisse de concentration du BDNF, un des facteurs neurotrophiques (Brain-derived neurotrophic factor) impliqués dans la neurogénèse adulte et essentiel pour la différenciation et la survie du réseau neuronal en modulant la plasticité synaptique (Ninan, 2014). A ce titre, plusieurs études ont mis en évidence une diminution des concentrations plasmatiques de BDNF chez les diabétiques (Passaro *et al.*, 2014), ainsi ce sont les perturbations de la plasticité neuronale et la diminution de la neurogénèse hippocampique qui peuvent être associées à la comorbidité entre la dépression et le diabète (Beauquis *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2013).

- **Le stress oxydatif:** le diabète sucré engendre outre les conséquences somatiques, de lourdes répercussions neuropsychologiques à long terme chez les sujets diabétiques, il se traduit alors par des troubles de l'humeur et une altération des fonctions cognitives (Barat *et al.*, 2011). Dans les conditions physiologiques basales, la cellule utilise l'oxygène moléculaire afin de produire de l'énergie, indispensable aux fonctions vitales de l'organisme. Ce mécanisme génère à la fois des ERO qui peuvent être contrebalancés par le système antioxydant endogène. Sauf qu'au cours de l'hyperglycémie chronique, la synthèse accrue de ces espèces chimiques provoque un déséquilibre dans les mécanismes de leur contrôle et de leur élimination mettant l'organisme dans un état de stress oxydatif. Ce dernier pourrait être à l'origine de différentes lésions des macromolécules cellulaires (protéines, lipides et ADN), impliquant différents processus métaboliques liés au développement du vieillissement ou de pathologies associées (les maladies cardio-vasculaires, le cancer, les maladies

neurodégénératives et neuropsychiatriques). En ce qui concerne les maladies neuropsychiatriques, les tissus cérébraux étant la cible privilégiée des ERO vu leur grande consommation d'oxygène, leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés et leur défense antioxydante relativement faible par rapport aux autres tissus (Da Silva Haeser *et al.*, 2007). Des études précliniques ont démontré que l'apparition des symptômes dépressifs au cours du diabète est associée à un déséquilibre dans le système antioxydant où il a été souligné une diminution du taux de GSH et de l'activité de SOD et de CAT au niveau du cortex préfrontal et des structures (HIP) (Tuzcu et Baydas, 2006; Samarghandian *et al.*, 2014; Thakur *et al.*, 2016).

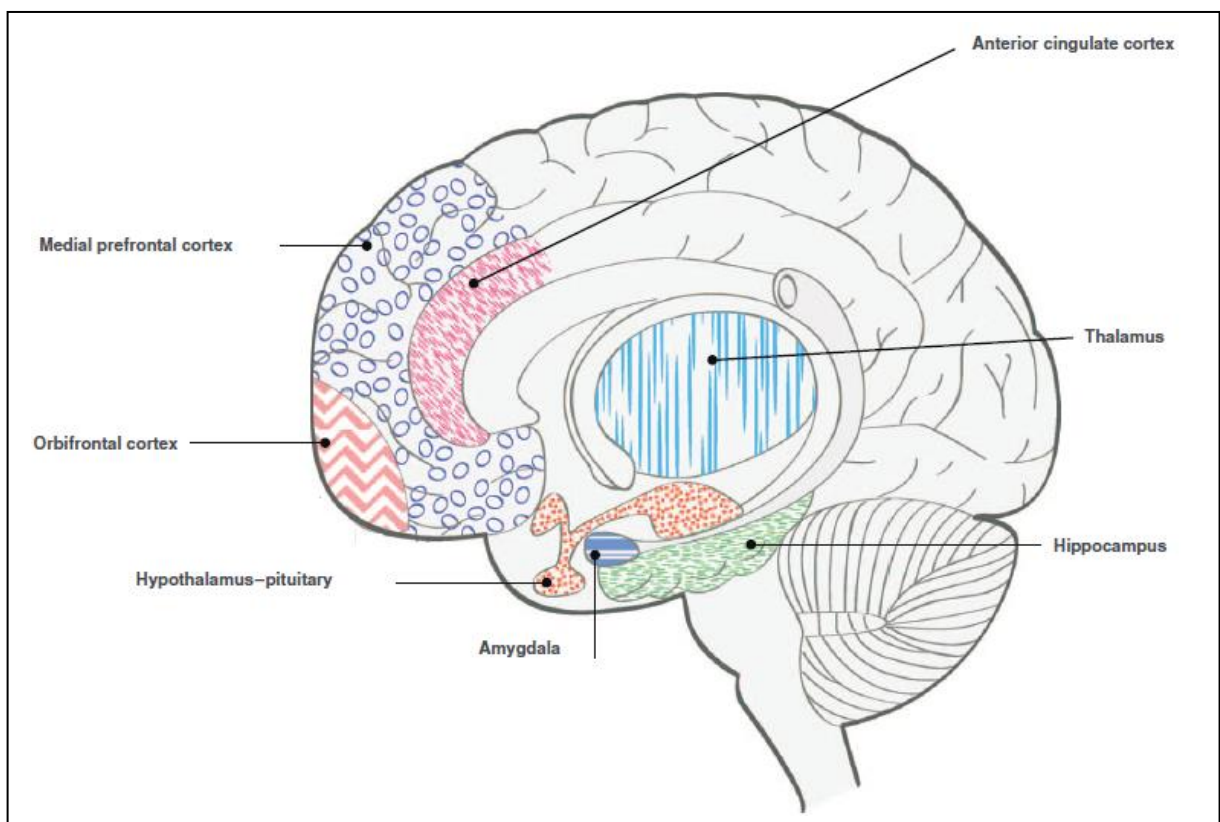


Figure 9: Circuit reliant les régions cérébrales impliquées dans les troubles dépressifs: le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe et l'axe Hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (Schloesser *et al.*, 2012).

3. Mélatonine

La mélatonine ou N-acétyl-5-méthoxytryptamine, fut isolée la première fois en 1958 par le médecin Lerner. B de l'université de Yale, cette indolamine est sécrétée et synthétisée principalement par la glande pinéale en réponse à l'absence de lumière, à partir d'un acide aminé précurseur, le L-tryptophane qui est d'abord hydroxylé sous l'action de la tryptophane

hydroxylase (TPH) et ensuite décarboxylé pour donner la sérotonine (5-hydroxytryptophane). Au sein des pinéaloctes, la sérotonine est convertie en mélatonine par un processus en deux étapes impliquant les activités séquentielles de deux enzymes, la sérotonine-N-acétyltransférase (NAT), l'enzyme limitante de cette voie de biosynthèse et l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) (fig.10).

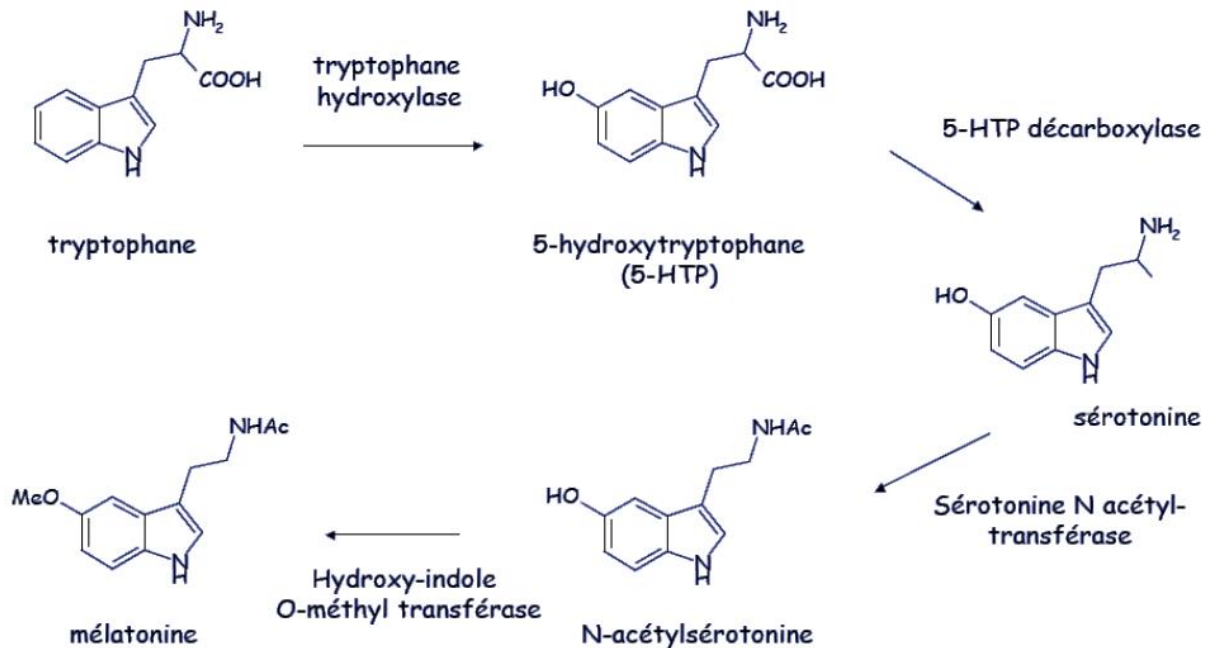


Figure 10: Voie de biosynthèse de la mélatonine (Ménard, 2011).

3.1. Métabolisme de la mélatonine

La mélatonine est métabolisée par différentes voies métaboliques, ainsi le foie est considéré comme le site principal du métabolisme par lequel plus de 90% de la mélatonine circulante est éliminée (Young *et al.*, 1985), le reste est dégradé dans le cerveau par un processus très différent de celui observé au niveau hépatique où elle est catabolisée de façon rapide (une demi-vie très courte, de l'ordre de 30 min). La mélatonine est d'abord hydroxylée en 6-hydroxymélatonine (6 OH-mélatonine) par l'isoforme du cytochrome P450, le CYP1A2 (Facciola *et al.*, 2001). Ensuite par réactions sulfo et glucuroconjugaison, la 6-hydroxymélatonine est excrétée dans les urines sous forme d'un sulfate ou d'un glucuronide (fig. 11).

Au niveau du cerveau, la mélatonine est oxydée en N1-acétyl-N2-formyl-5 méthoxy-kynurénamine (AFMK) par clivage du groupement pyrrole de la mélatonine, puis la réaction de déformylation conduit à l'apparition du N-acétyl-5-méthoxy-kynurénamine (AMK).

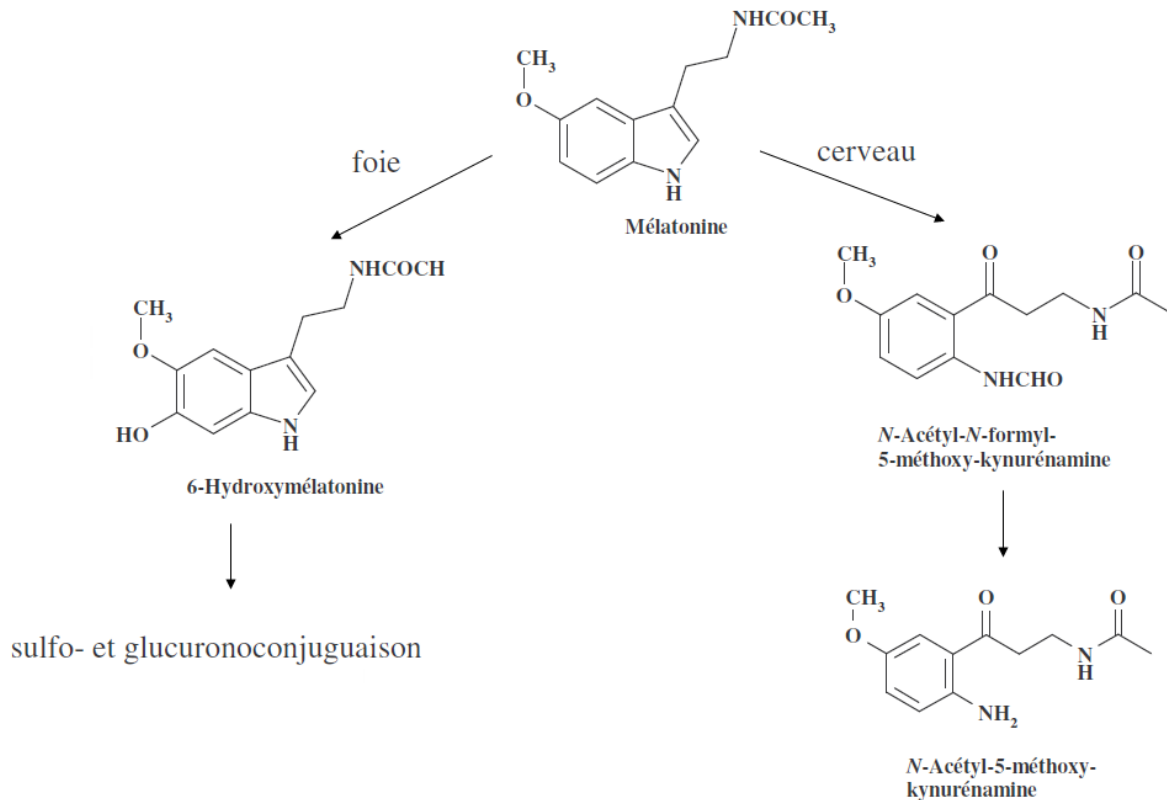


Figure 11: Principales voies de dégradation de la mélatonine.

3.2. Récepteurs mélatoninergiques

Les récepteurs mélatoninergiques appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, constitués de sept domaines transmembranaires. La première identification des récepteurs à la mélatonine a eu lieu en 1984 grâce à la synthèse d'un radioligand, la 2-[¹²⁵I]-iodo-mélatonine. Ce dernier a permis de localiser deux types de récepteurs appelés ML1 et ML2 qui présentaient respectivement une haute (pM) et une faible (nM) affinité pour la 2-iodo-mélatonine (Vakkuri *et al.*, 1984; Reppart, *et al.*, 1994; Molinari *et al.*, 1996). En 1998, le comité de nomenclature de l'Union internationale de pharmacologie (IUPHAR) a proposé une nouvelle nomenclature pour les récepteurs mélatoninergiques et leurs sous-types (tabl. 2).

En outre, l'utilisation de la 2-iodo-mélatonine a permis aussi de bien étudier la distribution de ces récepteurs au niveau des tissus cérébrales et périphériques, cette localisation ubiquitaire explique le rôle joué par la mélatonine sur les différents systèmes et fonctions au sein de l'organisme (Guardiola-Lemaitre, 2005).

Tableau 2: Classification des récepteurs mélatoninergiques et leurs localisations

Récepteurs mélatoninergiques	Sous-types	Localisation
Récepteurs ML1 (membranaires)	MT1 et MT2	les noyaux suprachiasmatiques (NSC), hypophyse, cortex cérébelleux, hippocampe, cortex cérébral, la rétine, pancréas, plaquettes sanguines, glandes surrénales, cellules immunitaires.....
Récepteurs ML2 (non membranaires)	MT3	Hippocampe, hypothalamus, thalamus, cortex frontal, rein, foie, intestin et poumon
Récepteurs nucléaires (RZR/ROR) orphelins	RZR/ROR α	Ubiquitaire
	RZR/ROR β	Glande pinéale, thalamus, hypothalamus,
	RZR/ROR γ	Thymus, muscles squelettiques, pancréas, foie, prostate

(RZR/ROR: retinoid Z receptor/ retinoid-acid receptor-related orphan receptor).

3.3. Effets physiologiques de la mélatonine

La mélatonine exerce des activités multiples partout dans l'organisme, son rôle principal est la synchronisation du rythme circadien et saisonnier liée à l'environnement, ainsi la production de cette molécule au sein de notre organisme suit un cycle veille/sommeil qui est sous contrôle d'une horloge circadienne située dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) au niveau de l'hypothalamus (Castanho, 2013). La mélatonine grâce à son passage facile à travers les membranes cellulaires pour agir dans chaque compartiment subcellulaire en raison de ses propriétés hautement lipophile et hydrophile, mais aussi la très large distribution de ses récepteurs, influence l'homéostasie de l'organisme et de nombreuses fonctions endocrines et immunologiques.

Dans notre étude seules les actions de cette neurohormone sur le statut oxydant/antioxydant et sur le comportement dépressif seront prises en considération.

3.4. Potentiel antioxydant de la mélatonine

La mélatonine s'est montrée très efficace pour réduire les dommages oxydatifs, par son action antioxydante impliquée dans les systèmes de protection cellulaire. Cet effet est dérivée de sa capacité à traverser facilement les parois cellulaires ou la barrière hémato-encéphalique. Elle peut agir directement en piégeant de nombreux radicaux libres tels que le radical hydroxyle (-OH), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le monoxyde d'azote (NO), l'anion peroxynitrite (ONOO⁻), ou indirectement en améliorant l'activité d'enzymes antioxydantes (Reiter *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2004) et en stimulant la synthèse et le recyclage d'un autre antioxydant endogène, le glutathion (Winiarska *et al.*, 2006).

Les propriétés antioxydantes de la mélatonine contribuent à certains processus de détoxification de l'organisme par le piégeage direct du radical (-OH) qui est largement considéré comme la molécule la plus destructrice formée par voie endogène dans les organismes aérobies (fig.12), aussi la mélatonine peut éliminer ce radical en interagissant avec son précurseur le H₂O₂ (Zang *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 2007).

Il est également signalé que la mélatonine joue un rôle central dans la régulation de l'activité des mitochondries par la réduction des fuites des électrons à partir de leurs chaînes de transport. De même, cette molécule peut diminuer les endommagements de ces organites et limiter leur destruction induite par les radicaux libres qu'elles engendrent. Cette action peut avoir lieu par l'interaction synergétique avec les autres molécules antioxydantes (la vitamine E ou la vitamine C), par exemple la stimulation directe de l'activité de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase mitochondriales (Martin *et al.*, 2000; Leon *et al.*, 2005).

En outre, le contrôle des enzymes pro- et anti-oxydantes représente une contribution importante à l'efficacité antioxydante de la mélatonine, ce qui améliore sa capacité de protection des macromolécules contre le stress oxydatif. En effet, il a été rapporté l'existence d'une influence de la mélatonine sur l'activité des enzymes antioxydantes par la régulation de l'expression de plusieurs gènes liés à l'activité de la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase (Rodriguez *et al.*, 2004). Certains métabolites de la mélatonine (l'AFMK et l'AMK) régularisent l'activité de la cyclo-oxgénase-2 qui peut être stimulée sous l'action de certains mécanismes pro-inflammatoires (Mayo *et al.*, 2005), ainsi les effets anti-inflammatoires de cette neurohormone reviennent à son pouvoir inhibiteur des autres enzymes impliquées dans la formation excessive de radicaux libres tels les isoformes inductibles et neuronaux de l'oxyde nitrique synthase (NOS), cependant, cet effet inhibiteur

n'empêche pas la production basale du NO à des concentrations physiologiques de la mélatonine (Hardeland, 2011).

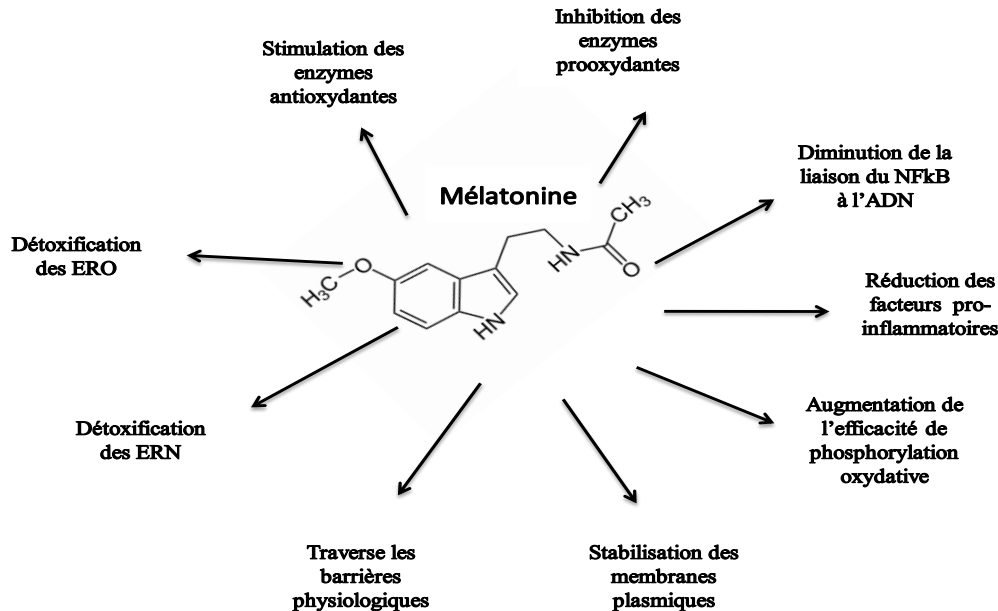


Figure 12: Effets antioxydants de la mélatonine et son action sur les différents radicaux libres oxygénés et azotés (Reiter *et al.*, 2005).

3.5. Activité antidépressive de la mélatonine

la mélatonine est considérée comme une molécule multifonctionnelle dotée de nombreux effets bénéfiques sur plusieurs états pathologiques liés aux dysfonctionnements du SNC, y compris les troubles comportementaux. En effet, il existe une forte corrélation entre l'apparition du comportement dépressif et la diminution du profil sécrétoire de la mélatonine chez les déprimés. En plus, les études préclinique portant sur les modèles animaux de la dépression ont démontré l'effet antidépresseur de la mélatonine qui met en jeu différentes voies de neurotransmission monoaminergique (Mantovani *et al.*, 2003; Micale *et al.*, 2006; Binfaré *et al.*, 2010). D'autres études suggèrent que l'action de cette neurohormone se manifeste au travers de l'activation de récepteurs MT1 et MT2 qui cohabitent avec certains sous-types de récepteurs sérotoninergiques (5HT2c) au niveau de l'hypothalamus, du cortex et de l'hippocampe. De plus, le traitement prolongé par certains antidépresseurs (fluoxétine, desipramine et clomipramine) provoque une modification du niveau des ARNm transcrits codants pour les récepteurs MT1 et MT2, conduisant à une amélioration des effets

antidépresseurs de la mélatonine (Imbesi *et al.*, 2006; Hirsch-Rodriguez *et al.*, 2007; Detanico *et al.*, 2009).

4. Fluoxétine

La fluoxétine est un médicament appartenant à la classe des médicaments appelés inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS). Cette substance est apparue initialement dans la littérature scientifique sous le nom de *Lilly 110140* (sous forme de chlorhydrate). Depuis son approbation par la FDA (Food and Drug Administration) des États-Unis le 29 décembre 1987, la fluoxétine (Prozac™ comme nom commercial) est devenu l'antidépresseur le plus prescrit pour traiter les troubles dépressifs, l'anxiété et les troubles obsessionnels compulsifs du fait des effets secondaires moindres et une toxicité réduite en cas d'un surdosage (Wong *et al.*, 1995).

Les ISRS diffèrent considérablement en pharmacocinétique, la fluoxétine est presque complètement absorbée après administration orale, mais sa disponibilité systémique est réduite en raison du premier passage hépatique et sa concentration plasmatique maximale est généralement atteinte 6 à 8 heures après l'administration.

Le foie siège exclusif du métabolisme de la fluoxétine où elle est convertie par déméthylation en métabolite actif appelé norfluoxétine (déméthylfluoxétine), produit inhibant la recapture du 5-HT.

La fluoxétine (N-méthyl-3-phenyl-3-[4-(trifluorométhyl) phenoxy]propan-1-amine) est sous forme d'un mélange racémique de deux énantiomères, la R-fluoxétine et la S-fluoxétine. Ce dernier est la forme pharmacologique la plus active, ainsi la biotransformation de fluoxétine nécessite l'implication des cytochromes P450 (CYP450) (fig.13), particulièrement les isoformes CYP2D6 et CYP2C19 (et au moins une partie CYP2C9, CYP3A4 et CYP3A5) (Sager *et al.*, 2014). En outre, la fluoxétine a été démontré pour son potentiel inhibiteur vis-à-vis de CYP2D6, CYP2C19 et de façon modérée CYP3A4 (Lutz *et al.*, 2013), cette inhibition devient plus importante lorsque le traitement est chronique où la contribution de CYP2D6 est diminuée à cause de son inhibition par la fluoxétine et son métabolite actif, la norfluoxétine.

L'élimination de la fluoxétine est de 4 à 6 jours et celle de la norfluoxétine est de 4 à 16 jours et se fait principalement (environ 60 %) par voie rénale, sous forme d'un glucuronide conjugué ou des métabolites inactifs.

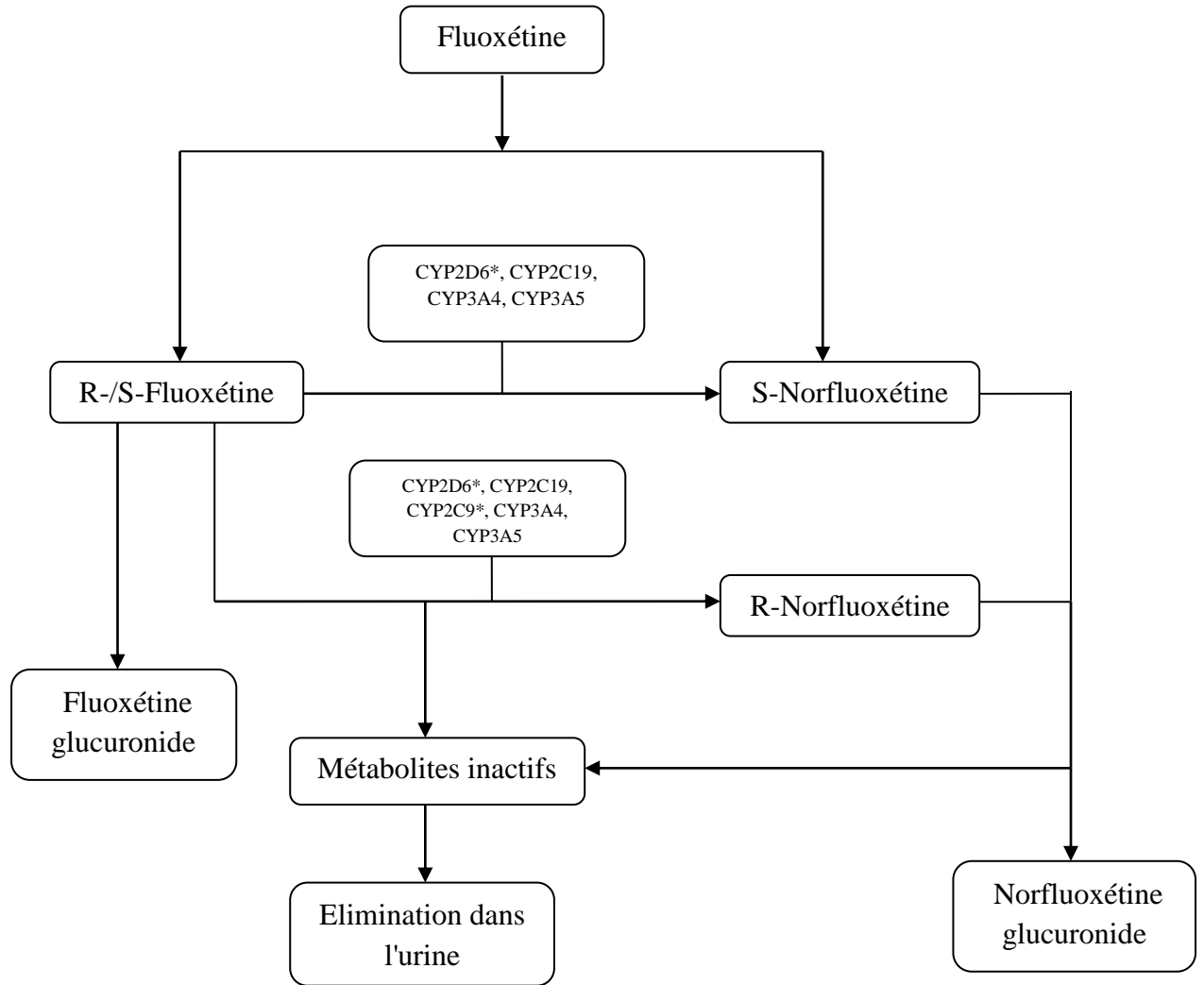


Figure 13: Métabolisme de la fluoxétine au niveau hépatique.

4.1. Mécanisme d'action de la fluoxétine

Comme tous les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine, la fluoxétine a pour effet d'augmenter le taux de sérotonine en bloquant sa recapture par le transporteur de la sérotonine (SERT) au niveau des synapses. Cependant, cette action sélective ne signifie pas qu'elle n'a aucun effet sur la recapture d'autres neurotransmetteurs mais l'effet est moindre à titre d'exemple l'action de la fluoxétine est 10 à 192 fois plus puissante sur la sérotonine par rapport à la noradrénaline.

De nombreux travaux de recherches, ont montré que le mécanisme d'action de la fluoxétine serait bien plus complexe. L'un de ces mécanismes est la stimulation de la neurogénèse

hippocampique qui représente une bonne partie de la réponse bénéfique au traitement à la fluoxétine, car elle pourrait servir comme un indice de réparation des dommages neuronaux induits par la dépression (Sapolsky, 2001; Santarelli *et al.*, 2003). En plus, l'augmentation des concentrations en neurotransmetteurs dans la fente synaptique, stimule la production d'un facteur neurotrophique, le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ce qui représente un autre mode d'action des ISRS, induisant des effets neurogéniques telle que la survie et la maturation neuronale (David, 2012).

Récemment, il a été démontré que la fluoxétine influence l'expression des SERT par l'augmentation du niveau de microRNA-16 (miR-16) qui peuvent inhiber la traduction d'un ARN messenger, menant à une diminution de la quantité de SERT dans les noyaux du raphé sérotoninergique. A ce niveau, la fluoxétine également provoque la libération du facteur SIOO β qui agit sur les cellules noradrénergiques en diminuant la quantité des miR-16 dans ces neurones, ce qui a pour conséquence d'activer la fonction des cellules sérotoninergiques (Baudry *et al.*, 2010).

4.2. Activité antioxydante de la fluoxétine

La fluoxétine est parmi les antidépresseurs qui sont largement utilisés dans la prise en charge et le traitement d'un large spectre de troubles de l'humeur. En plus de son activité antidépressive et anxiolytique, de récentes études ont prouvé que cette drogue était dotée de propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires, issues de son pouvoir antioxydant qui contribue à son action thérapeutique par amélioration du statut antioxydant au cours du stress oxydatif où la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes et l'augmentation de la lipoperoxydation au niveau du cerveau peuvent être considérées un marqueur de l'état de dépression (Bilici *et al.*, 2001; Zafir et Banu, 2007). D'autres études ont indiqué que le traitement chronique par la fluoxétine est associé à l'augmentation de l'activité de CAT et de GSH. En effet des souris femelles soumises à un traitement chronique à la fluoxétine ont enregistré une augmentation de leur taux de GSH à la fois dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Lobato *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2012).

Par ailleurs, les travaux de Aksu *et al.*(2014) suggèrent que la fluoxétine restaure la capacité antioxydante au niveau d'organes périphériques tel le rein en diminuant le taux du MDA ou en améliorant l'activité de la SOD au cours de l'ischémie-reperfusion induite chez les rats. La même étude a indiqué que la fluoxétine inhibe la réponse inflammatoire dans le tissu rénal par

diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires, restaurant ainsi les paramètres de l'inflammation qui conduisent à la nécrose et l'apoptose (Caiaffo *et al.*, 2016).

Enfin, l'effet protecteur de la fluoxétine a été constaté vis-à-vis des dommages oxydatifs induits par le mélanome de la rate chez les souris (Schmidt *et al.*, 2008).

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et conditions d'élevage

Des rats males de variété Wistar adultes de sexe mâle ont été utilisés dans cette étude, âgés de dix semaines et provenant de l'institut de Pasteur (El Kouba, Alger, Algérie), de poids (220-260g). Ils sont élevés dans des cages en polyéthylène, tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois, ainsi ils sont acclimatés pendant 3 semaines aux conditions de l'animalerie (température ambiante 24 °C) et un cycle de lumière/obscurité, 12/12h).

Les animaux ont été nourris par un régime équilibré se composant de croquettes, fournies par l'Office National des Animaux du Bétail (ONAB) (tableau 1) et recevaient de l'eau *ad libitum*.

Tableau 3: Composition du régime alimentaire pour un 1 kg d'aliment (ONAB)

Matière primaire	Quantité en (g/kg)	Pourcentage (%)
Maïs	560	56%
Complément vitaminique	20	2%
Soja	240	24%
Cellulose	100	10%
Matière minérale	80	8%

2. Induction du diabète et traitements

Le diabète a été induit par une seule injection intra péritonéale de STZ de 60 mg/kg dissoute dans un tampon citrate (0.1 M, pH 4.5). Les rats ont été répartis initialement en deux groupes, un groupe contrôle (non diabétique, n=7) qui a reçu une injection (ip) de l'eau physiologique, les rats de l'autre groupe ont reçu une dose unique de STZ. Trois jours après l'injection de STZ, la confirmation de l'installation du diabète a été effectuée à partir d'un échantillon sanguin prélevé au niveau de la queue en utilisant un glucomètre. Seulement les rats avec une glycémie > (250 mg/dl) sont considérés comme diabétiques (n=19) et retenus pour cette expérimentation. Les rats diabétiques ont été divisés aléatoirement en trois groupes:

- le premier groupe contrôle diabétique (Diabétique, n=6) qui a reçu des injections d'eau physiologique durant 28 jours.
- le deuxième groupe (Diabétique+mélatonine, n=6), traité quotidiennement à la mélatonine pendant 28 jours.

- le troisième groupe (Diabétique+fluoxétine, n=7) qui a reçu la fluoxétine(15 mg/kg, ip) dissoute dans l'eau physiologique durant 28 jours.

La mélatonine (10 mg/kg, ip) a été dissoute dans l'éthanol 1% selon la méthode de (Vural *et al.*, 2001; Aksoy *et al.*, 2003).

3. Pesée

La pesée des rats a été effectuée chaque jour à l'aide d'une balance de précision avant et après installation du diabète jusqu'à la fin du traitement.

4. Etude comportementale

4.1. Test du labyrinthe en croix surélevée (EPM)

C'est un test qui permet de mesurer un comportement de type anxieux chez les rongeurs. Le dispositif est un labyrinthe en croix surélevée à 50 cm du sol, elle est composée des deux bras de 50 cm de longueur et 10 cm de largeur et dépourvus de parois latérales (bras ouverts) et s'opposant perpendiculairement à deux bras fermés de mêmes dimensions. Le test dure 5 minutes durant lesquelles le rat est placé en face d'un bras ouvert et peut explorer librement l'ensemble de ce dispositif. Etant donné que le rat ayant peur des espaces vides, il va se réfugier naturellement dans les bras fermés et rester confiner (El Hage, 2012). Ainsi l'exploration des bras ouverts par l'animal désigne un comportement moins anxieux alors que l'exploration des bras fermés par l'animal indique un état plus anxieux (Guedri, 2014). Les variables mesurées à l'issue de ce test sont: le nombre d'entrées dans les bras ouverts, le nombre d'entrées dans les bras fermés, le temps passé dans les bras ouverts, le temps passé dans les bras fermés.



Figure 14: Dispositif du labyrinthe en croix surélevée (EPM).

4.2. Test du champ ouvert (OFT)

Ce test est largement utilisé en neurosciences, il est conçu pour évaluer les différences de réactivité émotionnelle chez les rongeurs, mais aussi utilisé pour prédire une activité de type anxiolytique d'une molécule. Le dispositif est une enceinte carrée fabriquée en plexiglas de 70 cm de coté avec des parois latérales de 40 cm de haut. Le plancher de ce dispositif est divisé en deux parties de même superficie, une partie périphérique et une autre centrale, ainsi chaque partie est sous forme de carrés de 10 cm de large chacun, ceci permet de quantifier les distances parcourues par le rat. En général, un rat anxieux présente un haut degré d'évitement de l'aire centrale par rapport à la périphérie, donc un comportement moins anxieux sera d'autant plus prononcé lorsque le rat explore la zone centrale. Le test débute par le placement de l'animal dans l'aire centrale afin de lui permettre d'explorer le dispositif pendant 5 minutes durant lesquelles le nombre d'entrées dans la partie centrale, le temps d'immobilité et la distance totale parcourue sont enregistrés (Retem *et al.*, 2013).

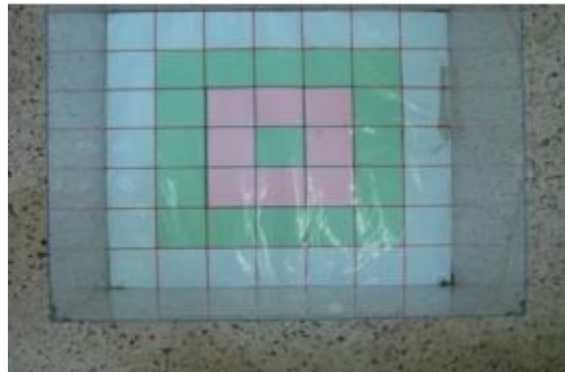


Figure 15: Dispositif du champ ouvert (OFT)

4.3. Test de la nage forcée (FST)

Le test de la nage forcée a été décrit initialement par Porsolt en (1977), il est très utilisé en pharmacologie pour mettre en évidence les propriétés antidépressives de nouvelles molécules. Ce test se déroule en deux sessions espacées par un intervalle du temps de vingt-quatre heures, la première session (pré-test) est une phase dépressinogène, elle consiste à introduire le rat durant 15 minutes dans un aquarium en plexiglas de 35 cm de large et 50 cm de profondeur rempli d'eau (26 °C) jusqu'à 40 cm de hauteur. Ces conditions permettent de contraindre le rat à nager sans poser ses pattes arrière pour se maintenir à la surface. Après quelques minutes de nage d'échappement, le rat se fige et n'effectue que des mouvements de faible amplitude pour maintenir sa tête hors de l'eau. La deuxième session (test) dure 5

minutes au cours de laquelle trois paramètres sont mesurés en utilisant une caméra vidéo: le temps d'immobilité qui est un indicateur du comportement résigné de l'animal, le temps d'escalade et le temps de nage. Ces deux derniers paramètres sont considérés comme un comportement actif de l'animal.



Figure 16: Test de la nage forcée

5. Prélèvement des échantillons et décapitation

5.1. Prélèvement du sang

Au dernier jour de cette expérimentation, des prélèvements sanguins ont été réalisés à partir du sinus rétro-orbital de l'œil à l'aide d'un capillaire hématocrite hépariné afin de doser les paramètres biochimiques. Le sang recueilli dans des tubes secs subit une centrifugation à 3000 tours/min pendant 15 minutes, le sérum obtenu est conservé à -20°C pour usage ultérieur.

5.2. Récupération du cerveau et préparation de l'homogénat

Après le dernier test comportemental, les rats sont décapités, les cerveaux récupérés pour ensuite isoler les tissus du cortex préfrontal et de l'hippocampe.

Le cerveau est extrait rapidement de la boîte crânienne en glissant délicatement une spatule à tête large entre la surface ventrale du cerveau et celle de l'os du crâne jusqu'à ce qu'elle soit complètement sous le cerveau, ensuite ce dernier a été rincé avec le sérum physiologique glacé de concentration isotonique puis transféré sur un couvercle d'une boîte Pétri qui est

déposée sur une enceinte remplie de la glace sèche où le cervelet a été enlevé et les deux hémisphères cérébraux ont été séparés à l'aide d'une lame ou un scalpel, ensuite l'utilisation de deux micro spatules courtes, permet de retirer l'hippocampe et d'isoler le cortex préfrontal.

5.2.1. Homogénat cérébral

Chaque tissu cérébral a été homogénéisé dans le tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) 1:10 (w/v, 1g du tissu avec 10 ml de TBS, pH 7.4), en utilisant un homogénéisateur ultrason (4 °C). L'homogénat obtenu est centrifugé à (9000 tours/min, 4°C, 15 min) puis le surnageant a été conservé à (-80 °C) pour un dosage ultérieur des paramètres de stress oxydatif.

5.2.2. Homogénat érythrocytaire

Le culot restant (érythrocytes) est récupéré et lysé par l'ajout de deux volumes d'eau distillée puis incubé durant 15 min au réfrigérateur, ensuite le mélange a été centrifugé à 4000 tours/min pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant récupéré constitue le lysat érythrocytaire qui servira pour le dosage des paramètres du stress oxydant.

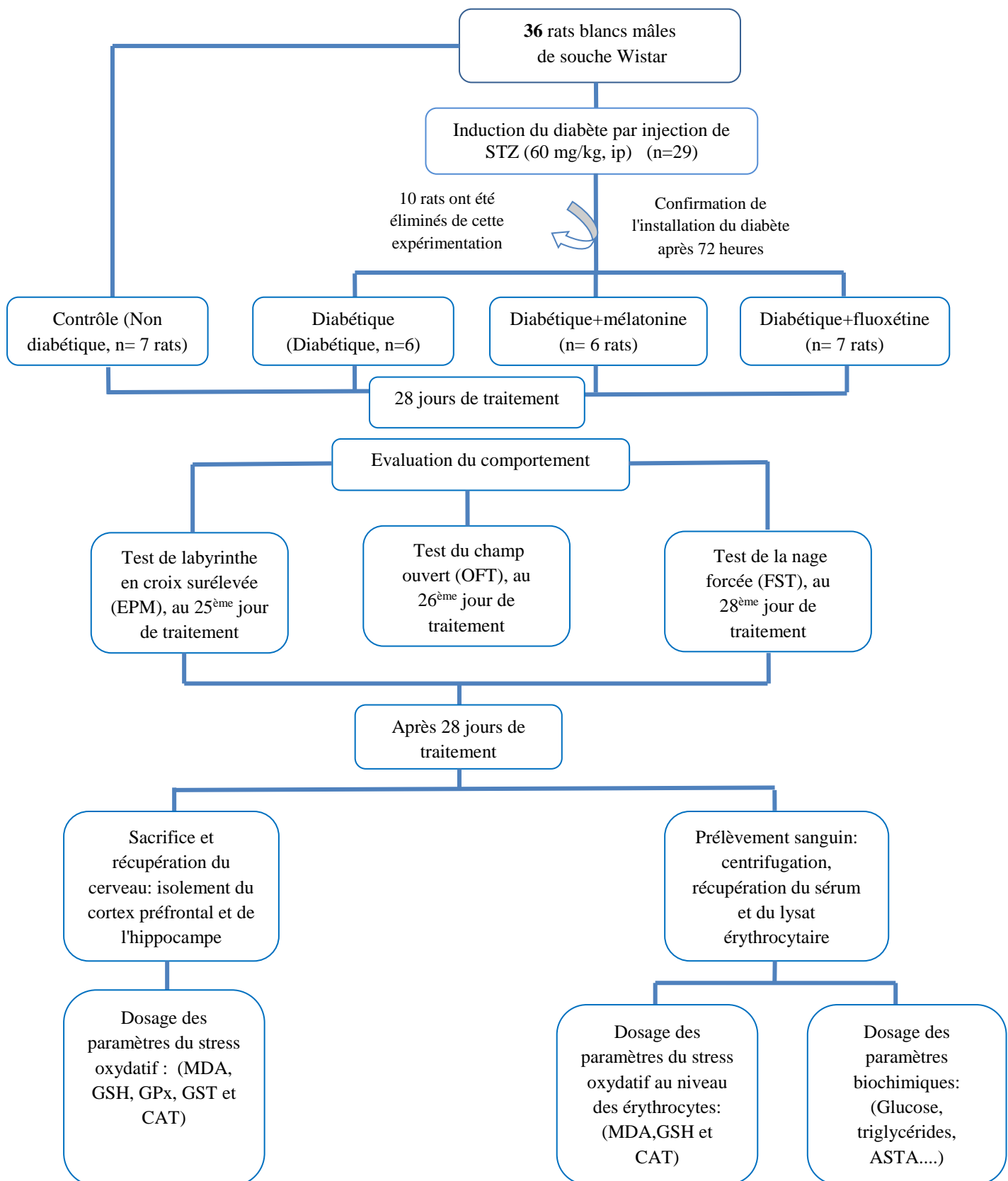


Figure 17: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

6. Dosage des paramètres biochimiques

6.1. Paramètres sanguins

6.1.1. Dosage de l'insuline

Le dosage quantitatif de l'insuline dans le sérum a été réalisé en utilisant l'analyseur (**cobas® e 411**), la méthode utilisée est basée sur le test immunologique par électrochimiluminescence (ECLIA).

- Principe de la méthode :

Un volume de 20 µl de sérum est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-insuline biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique marqué au ruthénium (Ru^{2+}) pour donner naissance à un complexe immun de type «sandwich». L'ajout de microparticules paramagnétiques tapissées de streptavidine au mélange réactionnel, va fixer le complexe précédent sur la phase solide par une liaison streptavidine-biotine puis le mélange réactionnel est transféré à la cellule de mesure.

Après la fixation de microparticules chargées par magnétisme sur l'électrode, à ce niveau une différence de potentiel est appliquée pour générer la forme excitée de Ru^{3+} qui émet des photons produisant une luminescence mesurée par un photomultiplicateur. Le signal généré est inversement proportionnel à la concentration d'insuline sérique et les résultats sont déterminés à l'aide d'une courbe de calibrage établie par l'analyseur.

6.1.2. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c)

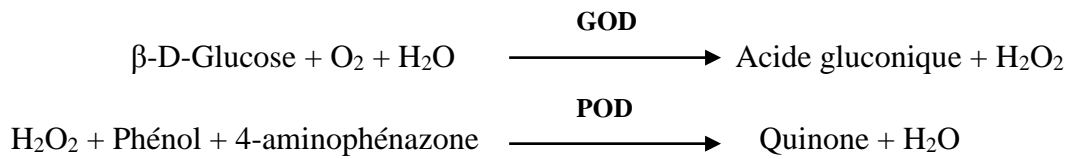
Ce dosage a été effectué au moyen d'un automate (ADAMS® A1c HA-8180V) basé sur la méthode de chromatographie liquide à haute performance. Le dosage de HbA1c peut s'effectuer sur le sang total en utilisant la chromatographie d'échange de cations en phase inverse.

6.1.3. Détermination de la glycémie

La glycémie a été déterminée par méthode enzymatique à la glucose oxydase.

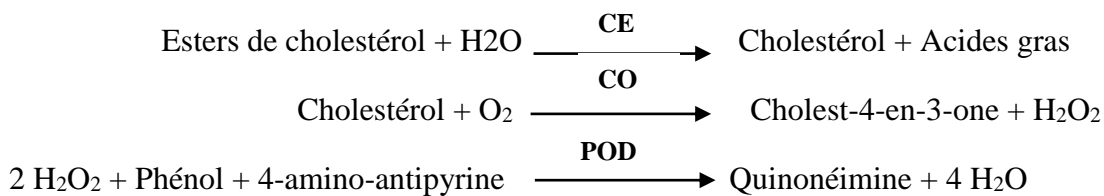
Cette méthode fait intervenir deux réactions enzymatiques couplées. Dans un premier temps la glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est utilisé comme substrat et conduit dans un deuxième

temps à l'oxydation du chromogène incolore (4-aminophénazone) en présence de peroxydase (POD), à la formation d'un composé coloré en rouge (quinonéimine) (Trinder, 1969; Kaplan, 1984).



6.1.4. Dosage du cholestérol total

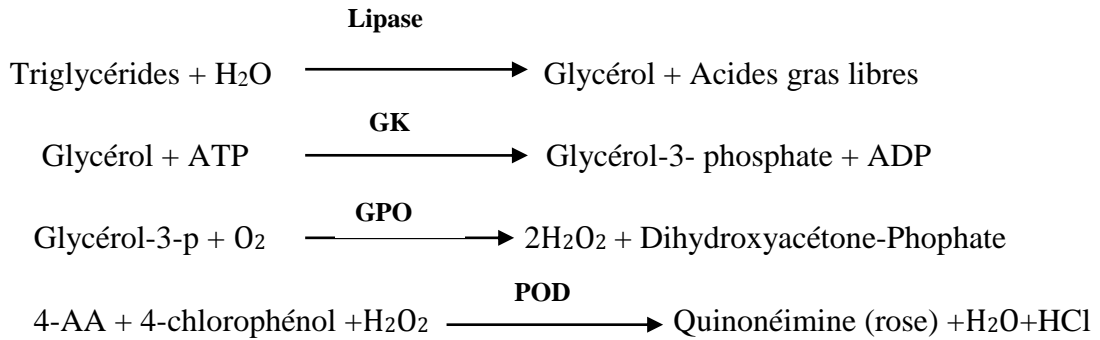
La détermination du cholestérol total a été effectuée selon une méthode enzymatique colorimétrique (Allain et al., 1974), selon les réactions suivantes :



6.1.5. Dosage des triglycérides

Ce dosage repose sur une méthode enzymatique colorimétrique (méthode de Fossati, (1982) couplée à une réaction de Trinder, (1969).

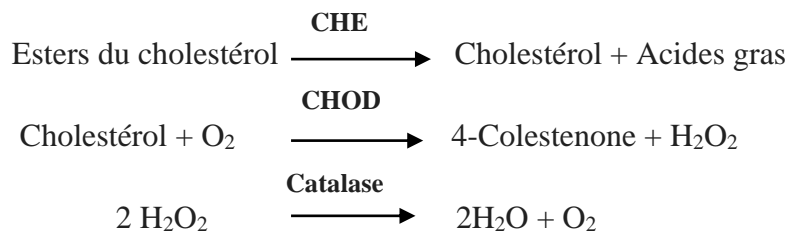
Les triglycérides incubés avec de la lipase (LPL) ce qui libère le glycérol et des acides gras libres. Le glycérol est phosphorylé par le glycérophosphate déshydrogénase (GPO) en présence de l'ATP et la glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'adénosine-5-diphosphate (ADP), ensuite le G3P va se transformer en Dihydroxyacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par le GPO. Au final, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec du 4-amino-antipyrine (4-AA) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne un complexe rose.



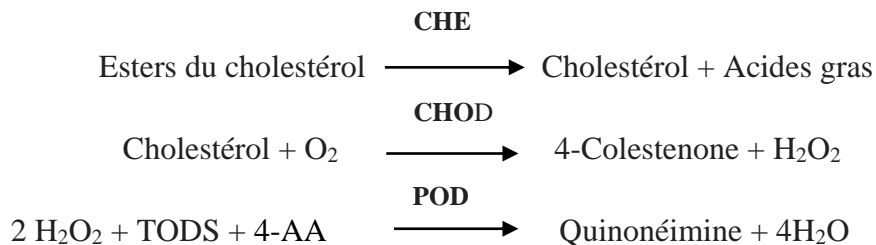
L'absorbance du complexe coloré (quinonéimine), proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon, est mesurée à 500 nm.

6.1.6. Dosage du cholestérol-LDL

La détermination du taux du cholestérol-LDL sérique a été réalisée par une méthode directe (Okada *et al.*, 1998). La réaction se déroule en 2 phases, la première phase consiste à solubiliser les lipoprotéines non-LDL par le détergent 1, ainsi le cholestérol généré, soumis à l'action de la cholestérol oxydase (CO) et de la cholestérol estérase (CE) produit un composé incolore.



La deuxième phase: le détergent 2 solubilise le cholestérol-LDL et le couple chromogénique développe une réaction colorée proportionnelle à la concentration en cholestérol-LDL.



Le couple chromogénique développe une réaction colorée proportionnelle à la concentration en cholestérol-LDL, la lecture s'effectue à 590 nm.

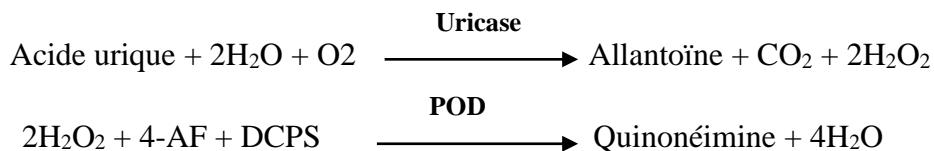
6.1.7. Dosage du cholestérol-HDL

Le dosage du cholestérol-HDL repose sur une méthode enzymatique colorimétrique (Burstein *et al.*, 1970).

En présence d'ions magnésium, les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) contenus dans le sérum se précipitent par addition d'acide phosphotungstique. Après centrifugation de ces derniers, le surnageant contenant les lipoprotéines de haute densité (HDL) est récupéré. L'emploi du réactif du cholestérol total permet de déterminer la fraction de cholestérol-HDL.

6.1.8. Dosage de l'acide urique

Dans une réaction d'oxydation l'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$), ce dernier en présence de peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et 2-4 Dichlorophénol Sulfonate (DCPS), donne naissance à un composé de couleur rose.

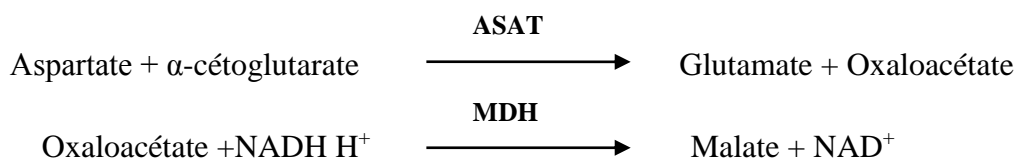


L'intensité de produit coloré (Quinonéimine) est proportionnelle à la concentration d'acide urique présent dans le sérum (Fossati *et al.*, 1980; Schultz, 1984).

6.1.9. Détermination de l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

L'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) est mesurée par la cinétique de diminution du taux de concentration en NADH. Cette dernière est directement proportionnelle à l'activité ASAT dans l'échantillon (Bergmeyer *et al.*, 1976).

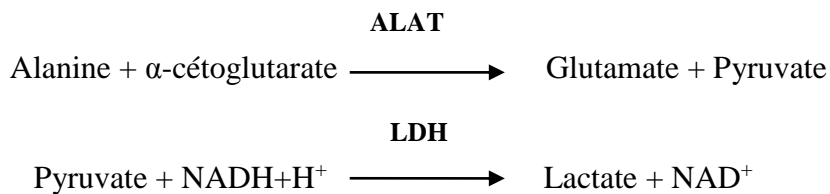
L'aspartate aminotransférase (ASAT) ou transaminase glutamate oxaloacétique (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate vers l'alpha-cétoglutarate en formant du glutamate et de l'oxalacétate. Ce dernier est réduit en malate en présence de malate déshydrogénase (MDH) et NADH H⁺:



6.1.10. Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT)

La mesure de l'activité d'alanine aminotransférase (ALAT) a été réalisée par une méthode cinétique, basée sur la vitesse de réduction de la concentration en NADH qui est directement proportionnelle à l'activité de l'alanine aminotransférase dans l'échantillon (Bergmeyer, 1980).

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate ce qui permet la formation du glutamate et du pyruvate. Ce dernier à l'aide du la lactate-déshydrogénase (LDH) et le NADH H⁺ est réduit au lactate.



6.1.11. Détermination de l'activité de Phosphatase alcaline (PAL)

Le dosage de l'activité de Phosphatase alcaline (PAL) a été réalisé en utilisant une méthode cinétique (Haussamen *et al.*, 1977) ou la PAL catalyse l'hydrolyse du Nitro-4-phénylphosphate (pNPP) à pH 10,4 libérant du p-nitrophénole et du phosphate selon la réaction suivante:



6.1.12. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine a été réalisé selon la méthode cinétique colorimétrique (Larsen, 1972). L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcalin pour former un complexe de couleur rouge. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon.

6.2. Dosage des paramètres du stress oxydatif au niveau tissulaire

6.2.1. Détermination du glutathion réduit (GSH) (Ellman, 1959)

Le dosage colorimétrique du glutathion est basé sur la réaction du groupement réducteur (SH) contenu dans l'échantillon et l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB). Cette réaction

libère un dérivé aromatique, l'acide thionitrobenzoïque (TNB) dont la DO mesurée à une λ de 412 nm exprime en fait la quantité de glutathion formé.

6.2.2. Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

La méthode utilisée pour la mesure de l'activité du GST est celle de Habig et al. (1974).

La GST catalyse la réaction de conjugaison entre le peptide endogène, le glutathion et un substrat modèle, le chlorodinitrobenzène (CDNB), la cinétique de formation du complexe absorbant (GSH-CDNB) est mesurée à 340 nm après 1 minute durant 5 minutes.

6.2.3. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler. (1984). Elle a été calculée par la diminution du taux de glutathion réduit (GSH) parallèlement à la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sous l'effet de GSH-Px:



6.2.4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode d'Aebi (1984), le principe repose sur la réaction de dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O). Cette activité est mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H_2O_2 .

6.2.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le Malondialdéhyde (MDA) est l'un des marqueurs de la peroxydation des lipides il est considéré comme un produit terminal formé lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFAs) par les radicaux libres. Le dosage du MDA est basé sur le test de TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique), en milieu acide et à chaud. La condensation du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique, donne naissance à un complexe de couleur rose qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie à 530 nm (Buege et Aust, 1984).

6.2.6. Dosage des protéines totales

La concentration des protéines totales au niveau tissulaire a été déterminée par la méthode colorimétrique de Bradford (1976), en utilisant le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-NH_2$) des protéines et forme un complexe de couleur bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des protéines.

7. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme d'erreur standard à la moyenne (\pm SEM), l'analyse de ces résultats a été effectuée en utilisant l'analyse de variance (ANOVA), suivie par le test post hoc de Newman-Keuls. La différence entre les moyennes est considérée comme:

- Significative, lorsque $P < 0,05$.
- Hautement significatives, lorsque ($P < 0,01$).
- Très hautement significatives, lorsque ($P < 0,001$).

Résultats et discussion

1. Effets des traitements sur le poids corporel et les paramètres métaboliques

1.2. Effets des traitements sur le poids corporel

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré une chute du poids corporel chez le lot diabétique non traité comparativement aux rats non diabétiques au bout de la 4^{ème} semaine (** $p < 0,001$; tabl.4) du traitement. Par contre, nous n'avons signalé aucun rétablissement du poids corporel chez le groupe diabétique traité par la mélatonine et la fluoxétine.

Tableau 4: Variation de poids corporel (g) chez les rats témoins et traités après 4 semaines du traitement

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	Non diabétique	Diabétique	Diabétique+ mélatonine	Diabétique+ Fluoxétine
Poids corporel initial (g)	231,50±5,15	230,00±4,31	234,30±3,10	231,60±3,10
Poids corporel final (g)	263,60±2,55	178,10±4,40***	179,10±3,98	169,20±4,28

*** $p < 0,001$ vs. Non diabétique.

1.3. Effets sur les paramètres métaboliques

1.3.1. Effets des traitements sur la consommation d'aliments

Les résultats du tableau 5 montrent que la consommation quotidienne d'aliments a augmenté considérablement chez les rats diabétiques comparativement à celle des non diabétiques. Néanmoins, nous n'avons noté aucun changement dans la consommation de nourriture chez le groupe diabétique traité par la mélatonine et la fluoxétine (tabl.5).

1.3.2. Effets des traitements sur la consommation d'eau

Durant notre suivi quotidien de la consommation d'eau pendant quatre semaines, nous avons constaté que le volume de l'eau consommé a augmenté de manière significative (tab. 5) chez le lot diabétique par rapport au groupe non diabétique. Par contre, nos résultats ne montrent aucun effet significatif après traitement par la mélatonine et la fluoxétine des rats diabétiques.

1.3.3. Effets des traitements sur le volume urinaire

Les résultats présentés dans le tableau 5 attestent que l'installation du diabète chez les rats a provoqué une augmentation hautement significative du volume urinaire en comparaison avec les rats non diabétiques (tabl.5). Alors que l'administration de la mélatonine et la fluoxétine aux animaux diabétiques pendant 28 jours, n'a provoqué aucun changement significatif du volume urinaire.

Tableau 5: Variation des paramètres métaboliques (la consommation d'aliments (g), la consommation d'eau (ml) et le volume urinaire (ml)) chez les différents groupes expérimentaux durant 28 jours de traitement

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	Non diabétique	Diabétique	Diabétique+ mélatonine	Diabétique+ Fluoxétine
Consommation d'eau (ml)	52,71±5,00	93,83±5,11***	97,33±3,67	100,70±2,52
Consommation d'aliments (g)	16,51±1,82	31,92±2,35***	27,73±1,83	28,04±1,09
Volume urinaire (ml)	14,91±1,56	27,92±1,38***	27,98±1,24	25,67±1,40

*** p< 0,001 vs. Groupe non diabétique.

✓ Discussion

Le diabète sucré est une maladie chronique endocrinienne, due soit à une insuffisance génétique ou acquise de la production d'insuline par le pancréas. L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à long terme à des troubles du métabolisme général et d'un dysfonctionnement de nombreuses fonctions au niveau de l'organisme (Raccah, 2004; Jacobson *et al.*, 2013).

L'utilisation des modèles animaux dans le cadre du diabète expérimental, particulièrement le diabète induit par la STZ, permet une meilleure compréhension de la physiopathologie du diabète de type 1 qui se caractérise par ses symptômes classiques, tels que l'amaigrissement, la polydipsie, la polyphagie et la polyurie (Cooke et Plotnick, 2008).

La diminution du poids corporel au cours du diabète sucré est généralement utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé général du rat.

Dans la présente étude, l'induction du diabète par la STZ a provoqué une perte du poids corporel chez les rats. Des résultats similaires ont été enregistrés par (Parisa *et al.*, 2007; Omary *et al.*, 2011) qui ont signalé une chute de poids corporel des rats Wistar rendus diabétiques par une injection intra péritonéale de STZ. Cette réduction de poids corporel peut être attribuée à l'accélération du catabolisme des lipides et des protéines causée par la non utilisation périphérique du glucose par les tissus insulinosensibles, ce qui conduit à une atrophie musculaire et une perte de protéines tissulaires (Widmaier *et al.*, 1995).

Dans nos conditions expérimentales, le traitement prolongé par la mélatonine et la fluoxétine ne provoque aucun changement du poids corporel chez les animaux diabétiques. Ces constatations sont en accord avec celles apportées par (Ha *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2016) qui ont noté que le traitement des rats diabétiques par la mélatonine n'exerce aucun effet sur le poids corporel.

La polyphagie est l'une des caractéristiques majeures du diabète sucré, la sensation de faim, implique que le glucose dans le sang ne peut être utilisé par les cellules en raison d'un manque d'insuline, ce qui oblige l'organisme à utiliser ses réserves lipidiques et protéiques pour son métabolisme énergétique (Sawadogo, 2014). En effet, durant notre période expérimentale, nous avons remarqué une élévation significative de la consommation alimentaire chez les rats diabétiques en comparaison avec les rats normaux. Des résultats similaires ont été apportés par Akbarzadeh *et al.* en 2007.

Nos résultats ont mis en évidence une polydipsie et une polyurie chez les rats rendus diabétiques et se manifestant dès les premiers jours du diabète. Ces résultats rejoignent ceux de la littérature (Akbarzadeh *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 2013), qui indiquent que la STZ provoque chez le rat une augmentation de la consommation d'eau et une élimination excessive des urines. La polydipsie associée à une hyperglycémie est caractérisée par une augmentation de l'absorption de l'eau, engendrée par la polyurie inhérente au diabète. La stimulation des centres hypothalamique de la soif serait aussi impliquée (Sawadogo, 2014).

Dans l'ensemble, les résultats de cette étude ne montrent aucun effet bénéfique du traitement par la mélatonine et la fluoxétine sur les paramètres métaboliques chez les rats diabétiques.

2. Effets des traitements sur les paramètres comportementaux

2.1. Effets des traitements sur les paramètres du labyrinthe en croix surélevée

Le tableau 6 représente les variations des paramètres du test de labyrinthe en croix surélevé au 25^{ème} jour de traitement chez les rats contrôles et traités.

Tableau 6: Paramètres du test du labyrinthe en croix surélevé chez les groupes expérimentaux

Paramètres comportementaux	Traitement			
	Non diabétique	Diabétique	Diabétique+mélatonine	Diabétique+fluoxétine
Nombre d'entrées dans les bras fermés	2,28 ± 0,50	4,00 ± 0,51*	2,16 ± 0,40 [#]	1,57 ± 0,29 ^{##}
Nombre d'entrées dans les bras ouverts	2,85 ± 0,55	0,83 ± 0,30*	2,33 ± 0,40 [#]	3,42 ± 0,36 ^{##}
Temps passé dans les bras fermés (sec)	232,40 ± 14,40	245,30 ± 14,53	251,70 ± 17,70	240,30 ± 21,08
Temps passé dans les bras ouverts (sec)	45,53 ± 9,83	25,46 ± 3,41	22,25 ± 4,50	50,58 ± 13,56

*p<0,05 vs. Groupe non diabétique. ^{##}p<0,01 vs. Groupe diabétique.

Les résultats obtenus démontrent que l'augmentation du nombre d'entrées dans les bras fermés chez les rats diabétiques est significative en comparaison avec les rats non diabétiques (*p<0,05, tabl.6; fig.18), ainsi une augmentation du nombre d'entrée dans les bras ouverts chez le même groupe. Le traitement des rats diabétiques par la mélatonine ou la fluoxétine a diminué le nombre d'entrées dans les bras fermés comparativement au groupe diabétique (p<0,05; p<0,01; respectivement, tabl.6; fig.18), le même traitement a pu augmenter le nombre d'entrées dans les bras ouverts comparativement aux animaux diabétiques non traités (p<0,05; p<0,01; respectivement, tabl.6; fig.18). Par contre nous n'avons pas constaté de différence significative dans le temps passé dans les bras fermés et ouverts chez les rats diabétiques en comparaison avec les rats témoins et diabétiques traités par la mélatonine et la fluoxétine.

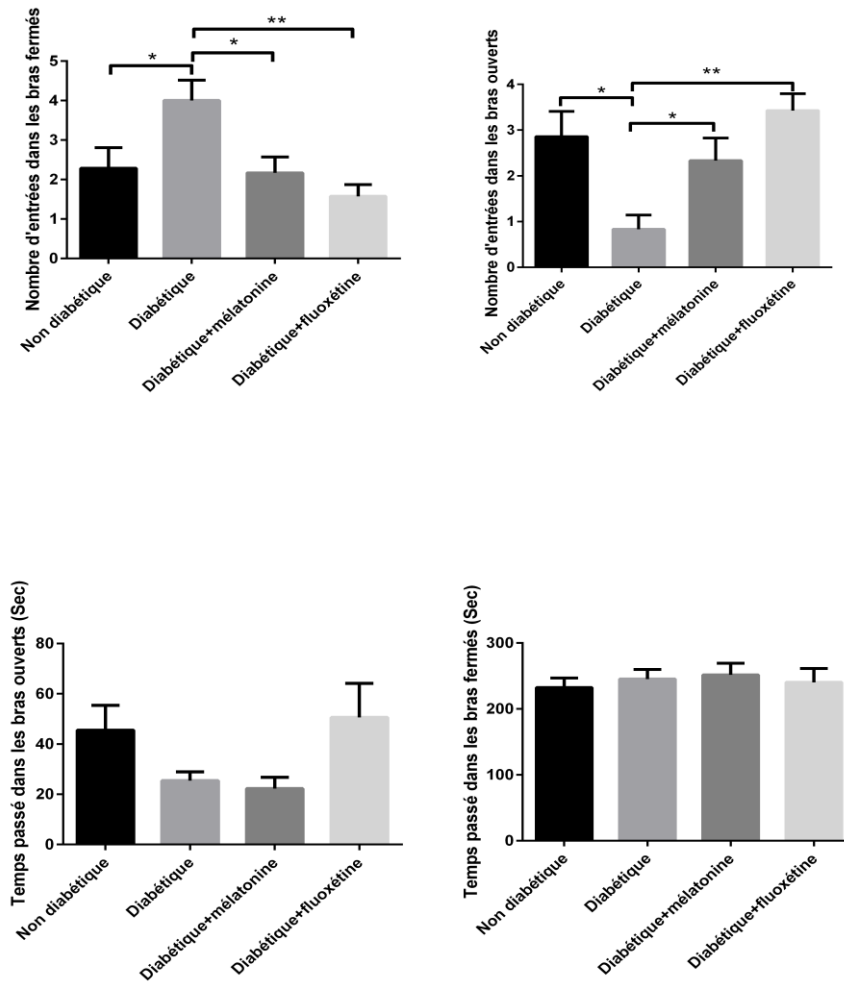


Figure 18: Variation des paramètres du labyrinthe en croix surélevé au 25^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (* p<0,05; ** p<0,01).

2.2. Effets des traitements sur les paramètres du champ ouvert

Le tableau 7 représente les variations des paramètres du test de champ ouvert au 26^{ème} jour de traitement chez les rats contrôles et traités à la mélatonine et la fluoxétine.

Tableau 7: Paramètres de test du champ ouvert chez les groupes expérimentaux

Paramètres comportementaux	Traitement			
	Non diabétique	Diabétique	Diabétique+mélatonine	Diabétique+fluoxétine
Temps d'immobilité (sec)	155,70 ± 15,36	240,80 ± 17,80**	193,20± 11,17#	184,40± 14,42#
Nombre d'entrées au centre	3,33 ± 0,55	1,16 ± 0,47	1,83 ± 0,60	2,57 ± 0,61
Distance totale parcourue	1036,00 ± 39,81	458,70 ± 46,02***	1055,00 ± 62,84###	1247,00 ± 54,38###

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Groupe non diabétique. #p<0,05; ###p<0,001 vs. Groupe diabétique.

L'induction du diabète a provoqué une augmentation hautement significative du temps d'immobilité chez le groupe diabétique (p<0,01; tabl.7; fig.19) et une diminution également hautement significative de la distance totale parcourue (p<0,001; tabl.7; fig.19) comparativement aux rats témoins. Chez les rats diabétiques, le traitement par la mélatonine et la fluoxétine a diminué significativement le temps d'immobilité et augmenté la distance totale parcourue comparativement au groupe diabétique (p<0,05; p<0,001; respectivement, tabl7; fig.19). Concernant les effets des traitements sur le nombre d'entrées dans la zone centrale, aucune différence significative n'a été observée entre les rats diabétiques traités par la mélatonine et ceux traités à la fluoxétine par rapport aux autres groupes (tabl.7; fig.19) .

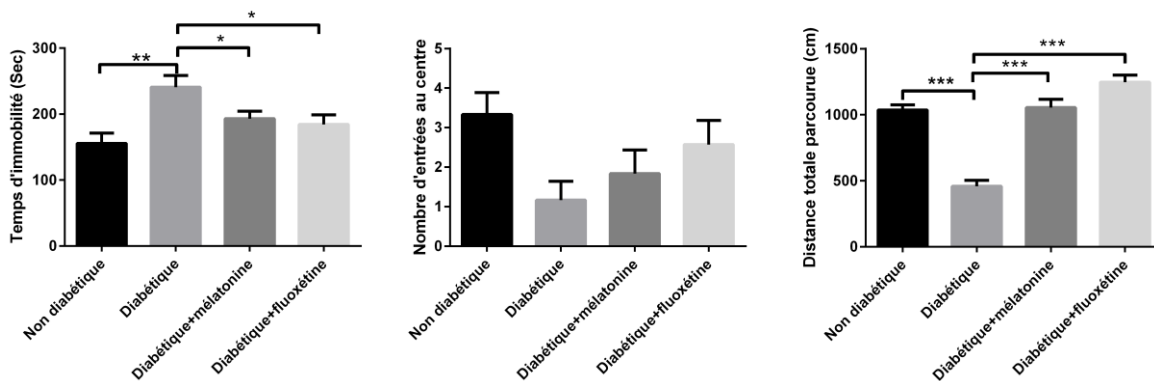


Figure 19: Variation des paramètres de champ ouvert au 26^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

2.3. Effets des traitements sur les paramètres de la nage forcée

Le tableau 8 représente les variations des paramètres du test de nage forcée au 28^{ème} jour de traitement chez les rats contrôles et traités à la mélatonine et la fluoxétine.

Tableau 8: Paramètres du test de la nage forcée chez les groupes expérimentaux

Paramètres comportementaux	Traitement			
	Non diabétique	Diabétique	Diabétique+mélatonine	Diabétique+fluoxétine
Temps d'immobilité (sec)	69,83 ± 5,95	130,20 ± 11,30 ^{***}	96,51 ± 3,79 [#]	37,96 ± 4,13 ^{###}
Temps de nage (sec)	119,50 ± 8,96	70,40 ± 9,69 ^{***}	122,50 ± 10,39 [#]	160,00 ± 6,43 ^{###}
Temps d'escalade (sec)	112,20 ± 4,49	88,11 ± 8,23	83,63 ± 8,13	103,20 ± 7,13

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Groupe non diabétique. #p<0,05; ###p<0,001 vs. Groupe diabétique.

L'analyse statistique des résultats a montré une augmentation hautement significative du temps d'immobilité et diminution de temps de la nage chez le groupe diabétique lorsqu'il est comparé au groupe témoins (p<0,001; p<0,001; respectivement, tabl.8; fig.20). Les animaux diabétiques traités à la mélatonine et la fluoxétine présentent un temps d'immobilité plus court par rapport au groupe diabétique (p<0,01; p<0,001; respectivement, tabl.8; fig.20), ainsi nous avons noté que les deux traitements chez les rats diabétiques augmentent significativement le temps de nage comparativement au groupe diabétique et témoin, toutefois nous remarquons une différence significative (p<0.05; tabl.8; fig.20) entre le traitement par la mélatonine et la fluoxétine chez les rats diabétiques au niveau du temps d'immobilité et de nage. Par contre, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les différents groupes concernant le temps d'escalade.

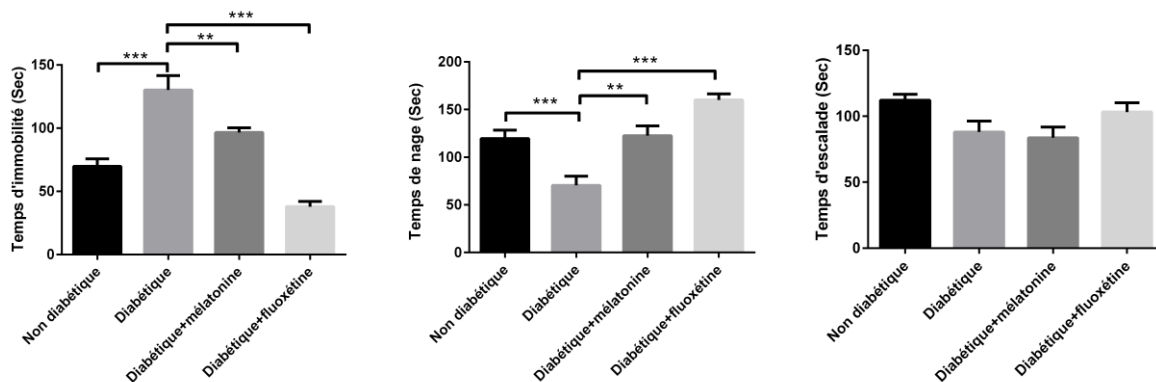


Figure 20: Variation des paramètres de nage forcée au 28^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (* p<0,01; *** p<0,001).

✓ Discussion

Plusieurs travaux de recherche chez les rongeurs ont indiqué que les désordres métaboliques engendrés par la persistance de l'état diabétique, jouent un rôle crucial dans l'apparition des

troubles dépressifs et le comportement anxieux (Hilakivi-Clarke *et al.*, 1990; Abraham *et al.*, 2010).

La présente étude met en évidence une réduction de l'activité locomotrice et un degré d'anxiété plus élevés chez les rats diabétiques en comparaison avec les rats normaux lorsque ils sont soumis au (EPM) et (OFT) respectivement. Ces deux modèles de comportement sont largement utilisés pour évaluer l'état anxieux et l'activité exploratoire chez le rat et la souris.

Le test du champ ouvert est beaucoup plus utilisé pour prédire une activité anxiolytique d'une nouvelle molécule et montre également une grande fiabilité pour apprécier la réactivité émotionnelle vis-à-vis d'un nouvel environnement. En général, les animaux évitent d'entrer dans l'aire centrale par rapport à l'aire périphérique, par conséquent une molécule dotée d'une activité anxiolytique va augmenter le nombre d'entrées et le temps passé dans la zone centrale. De même, le labyrinthe en croix surélevé est aussi utilisé pour discriminer un effet anxiolytique d'une molécule en mesurant le nombre d'entrées dans les quatre bras. Cet effet est plus marqué lorsqu'il provoque une augmentation de l'exploration des bras ouverts par l'animal.

Le phénotype anxieux des rats diabétiques est caractérisé durant cette étude par l'augmentation du nombre d'entrées dans les bras fermés et la diminution du nombre d'entrées dans les bras ouverts au cours de EPM, ainsi qu'une augmentation du temps d'immobilité et la diminution de la distance totale parcourues ont été observées dans l'OFT.

En revanche l'administration de la mélatonine et la fluoxétine aux rats diabétiques a renversé le comportement anxieux. Ceci est corroboré par le nombre élevé d'exploration des bras ouverts et la diminution du nombre d'entrées dans les bras fermés au cours de (EPM). D'un autre côté, les deux traitements ont amélioré l'activité locomotrice des animaux diabétiques en augmentant la distance parcourue par les rats et en diminuant le temps d'immobilité lors de l'OFT. Ceci dénote un effet anxiolytique de ces deux drogues.

Il a été rapporté que les différents types de neurotransmetteurs sont impliqués dans la neurobiologie de l'anxiété, ainsi leur régulation qui dépend à la neurotransmission mélatoninergique (Millan, 2003). Dans ce contexte, l'action anxiolytique de la mélatonine a été bien élucidée dans une étude menée par Ochoa-Sanchez *et al.* (2012), qui a démontré que l'effet anxiolytique de la mélatonine s'exerce via l'activation de récepteurs mélatoninergiques (MT₂) durant le test de l'EPM ainsi que dans celui de l'alimentation supprimée par la

nouveauté (NSFT), un autre test prédictif de l'activité anxiolytique des drogues. Une autre étude rapportée par De Angelis. (1996) chez les souris atteste bien de l'effet anxiolytique de la fluoxétine révélé durant le test de l'OFT.

Les résultats de notre étude montrent en fait que l'état diabétique est responsable de l'apparition du comportement dépressif chez les rats. Ce dernier est décelé au cours de notre expérimentation par l'utilisation du test de la nage forcée. En effet, les rats diabétiques présentaient un comportement de résignation plus prononcé comparativement aux non diabétiques. Ceci s'est traduite par une prolongation du temps d'immobilité et une diminution du comportement actif (le temps de nage). Ces résultats sont en adéquation avec ceux rapportés par (Ramanathan *et al.*, 1998; Wayhs *et al.*, 2010).

De nombreuses études chez les rongeurs ont montré l'interaction du système mélatoninergique avec les autres voies de neurotransmission, telles les voies, sérotoninergique, GABAergique et glutamatergique (Eison *et al.*, 1995; Raghavendra *et al.*, 2000; Mantovani *et al.*, 2003). Une étude récente de Haider *et al.* (2013) a suggéré que l'induction du diabète par la STZ chez le rat provoque une altération de la neurotransmission sérotoninergique, et pourrait être ainsi la cause des troubles du comportement.

Nos résultats montrent que le temps d'immobilité des rats traités par la mélatonine et la fluoxétine est plus court par rapport aux diabétiques témoins, ce qui explique l'effet antidépresseur de ces deux drogues. Cette diminution du temps d'immobilité est faite en faveur d'une augmentation du temps de nage, ainsi d'un point de vue neuropharmacologique, cette action comportementale peut être attribuée à l'interaction de ces deux drogues avec la neurotransmission sérotoninergique comme rapporté par Detke et Lucki. en 1995.

À ce titre, il a été trouvé que la mélatonine interagit avec les récepteurs sérotoninergiques (Monnet, 2002; Micale *et al.*, 2006), plus précisément, les récepteurs 5-HT_{2A} qui se comporteraient comme des antagonistes (Gorzalka *et al.*, 1999), étant donné que ces types de récepteurs ont une forte expression au niveau cérébral, chez le rat et notamment dans le cortex préfrontal (Amargós-Bosch *et al.*, 2004), ils sont aussi très disséminés chez les sujets suicidaires souffrant de dépression (Arango *et al.*, 1990). De même, Le traitement par la fluoxétine des rats diabétiques a pu renverser le comportement dépressif, cela pourrait s'expliquer par la diminution du temps d'immobilité et l'amélioration du comportement actif (temps de nage). Cette action antidépressive de la fluoxétine est faite par médiation sérotoninergique (Page *et al.*, 1999), éventuellement via l'interaction avec les récepteurs 5-HT_{2C} (Cryan et Lucki, 2000).

En plus, il a été démontré que les ISRS telles que, la fluvoxamine et la fluoxétine exercent un effet antidépresseur en diminuant le temps d'immobilité chez des souris rendues diabétiques par injection de STZ, au cours du test de la suspension caudale (Kamei *et al.*, 2003).

3. Effets des traitements sur les paramètres sanguins

Le tableau 9 représente les variations des paramètres biochimiques au niveau du sang des rats normaux, diabétiques traités par la mélatonine et la fluoxétine pendant 28 jours.

Tableau 9: Variations des paramètres sanguins chez les groupes expérimentaux

Paramètres sanguins	Groupes expérimentaux			
	Non diabétique	Diabétique	Diabétique+ Mélatonine	Diabétique+ Fluoxétine
Glucose (mg/dl)	91,78 ± 6,91	296,90 ± 14,06***	240,10 ± 22,03 [#]	179,40 ± 16,99 ^{###}
Insuline (µU/ml)	2,30±0,20	0,78±0,19***	0,80±20	0,70±0,14
Hémoglobine (%)	2,86 ± 0,64	9,09 ± 0,43***	6,95±0,74 [#]	4,65±0,56 ^{###}
Cholestérol (mg/dl)	101,60±5,23	140,30±6,69**	112,80±7,41 [#]	126,90± 5,60
C-HDL (mg/dl)	35,87± 3,61	26,49± 2,34	35,44±4,17	29,94± 4,41
C-LDL (mg/dl)	47,39±4,62	93,32±7,48***	66,32±5,81 [#]	83,49±5,34
Triglycérides (mg/dl)	124,60±9,09	256,00±15,79***	184,50±13,84 ^{##}	193,81±12,16 ^{##}
ASAT (UI/L)	70,29±6,85	106,30±5,52**	80,50±7,08 [#]	98,86±7,80
ALAT (UI/L)	28,98±4,50	71,00±7,32***	48,10±5,79 [#]	64,26±5,79
PAL (UI/L)	48,33±4,45	85,73±8,22**	59,83±6,49 [#]	80,00±7,39
Créatinine (mg/dl)	0,37±0,05	0,69±0,08*	0,39±0,10 [#]	0,59±0,05
Acide urique (mmol/l)	0,27±0,03	0,54±0,04***	0,36±0,04 [#]	0,57±0,05

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Groupe non diabétique. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. Groupe diabétique.

3.1. Effets des traitements sur la glycémie

Nous avons enregistré une augmentation du taux de la glycémie des rats diabétiques par rapport à ceux non diabétiques (p<0,001, tabl.9; fig.21). Par contre, l'administration quotidienne de la mélatonine et la fluoxétine durant 28 jours a provoqué un rétablissement de

la glycémie chez les animaux diabétiques pourvus d'un taux du glucose significativement diminué ($p < 0,05$, $p < 0,001$, tabl.9; fig.21).

3.2. Effets des traitements sur l'insulinémie

L'installation du diabète induit une diminution très hautement significative de l'insulinémie chez les rats diabétiques ($p < 0,001$, tabl.9; fig.21). Le traitement pendant 28 jours des rats diabétiques par la mélatonine et la fluoxétine ne provoque aucun changement dans le taux d'insuline.

3.3. Effets des traitements sur le taux de l'hémoglobine glyquée

Nos résultats montrent que le pourcentage de l'hémoglobine glyquée des rats diabétiques a augmenté significativement en comparaison avec celui des non diabétiques ($p < 0,001$, tabl.9; fig.21), alors qu'aucun changement significatif n'a été observé chez les rats diabétiques traités à la mélatonine et à la fluoxétine.

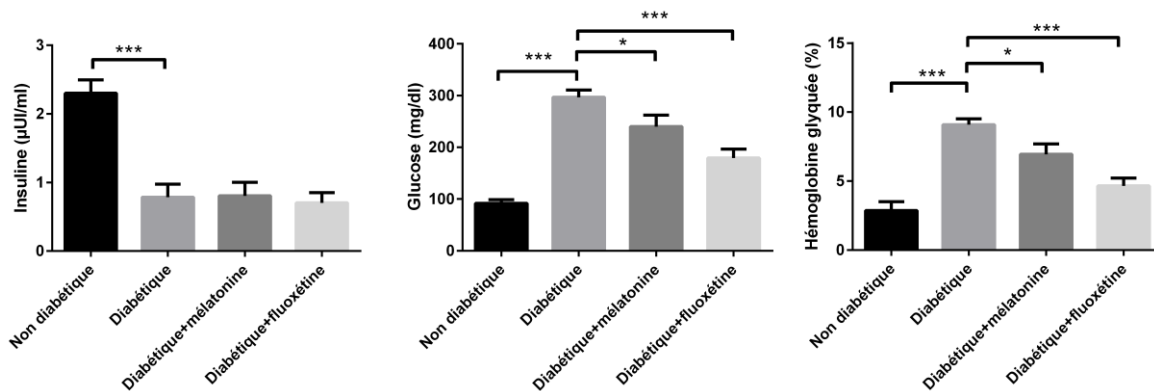


Figure 21: Variations des paramètres sanguins (le taux de l'insuline, du glucose et de l'hémoglobine), après le 28^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3.4. Effets des traitements sur les paramètres du profil lipidique

Dans la présente étude, nous avons souligné une augmentation hautement significative du cholestérol total et du cholestérol-LDL chez le groupe diabétique lorsqu'il est comparé avec le groupe non diabétique ($p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivement, tabl.9; fig.22), mais une réduction significative de ces deux paramètres a été notée uniquement chez les animaux diabétiques traités par la mélatonine ($p < 0,05$, tabl.9; fig.22).

En ce qui concerne le taux du cholestérol-HDL, nous avons noté une diminution de ce paramètre chez les rats diabétiques par rapport aux rats normaux et aucun traitement n'a eu d'influence sur le taux du cholestérol-HDL des rats diabétique.

Nous avons constaté également que le taux des triglycérides des animaux diabétiques a augmenté de manière très hautement significative en comparaison avec le lot des rats témoins ($p < 0,001$, tabl.9; fig.22), par contre pour les diabétiques traités par la mélatonine et la fluoxétine, nous avons noté une diminution de la triglycéridémie ($p < 0,01$, $p < 0,01$, respectivement, tabl.9; fig.22)

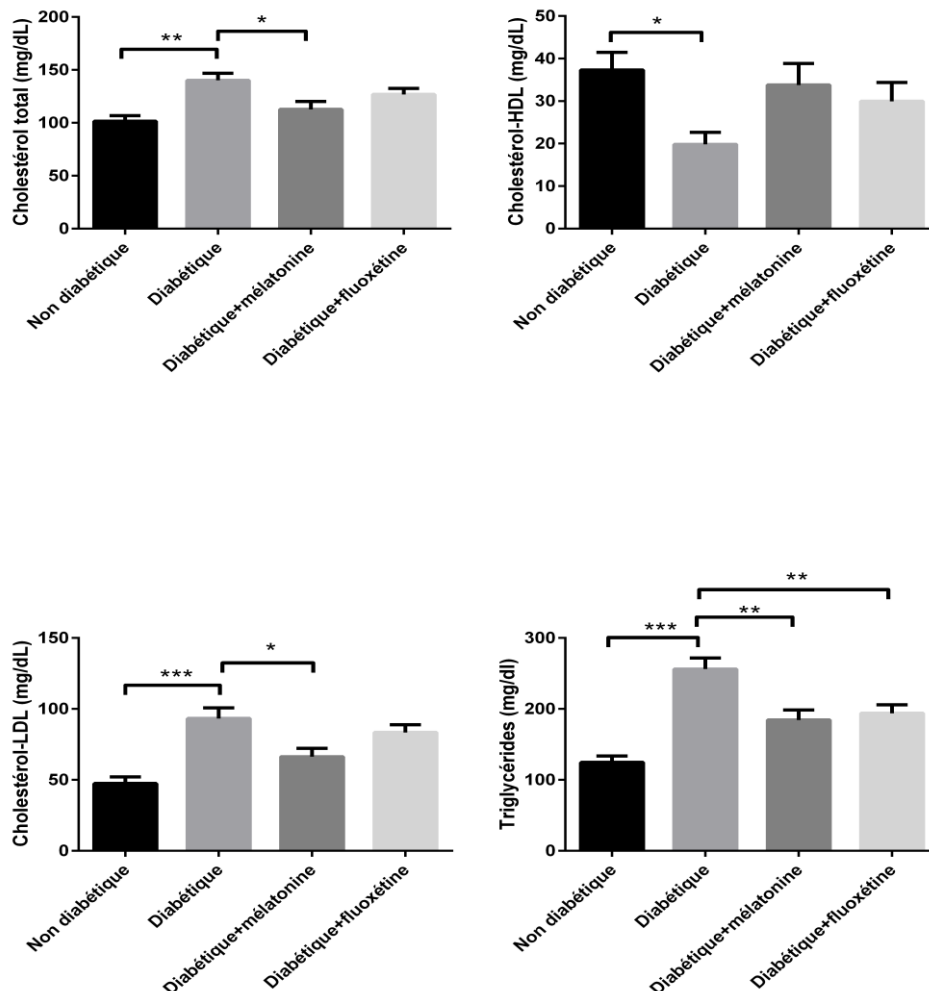


Figure 22: Variations des paramètres de profil lipidique (Cholestérol-total, C-HDL, C-LDL et les triglycérides), après le 28^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (* $p < 0,01$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.5. Effets sur l'activité des transaminases (ASAT et ALAT) et phosphatase alcaline (PAL)

Les résultats obtenus révèlent une élévation de l'activité des (TGO, TGP) des rats rendus diabétiques ($p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivement, tabl.9; fig.23), ainsi qu'une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique de la PAL observée chez les même rats ($p < 0,01$, tabl.9; fig.23). Uniquement le traitement par la mélatonine qui a pu réduire de façon significative l'activité de ces trois enzymes chez les rats diabétique ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,05$, respectivement, tabl.9; fig.23).

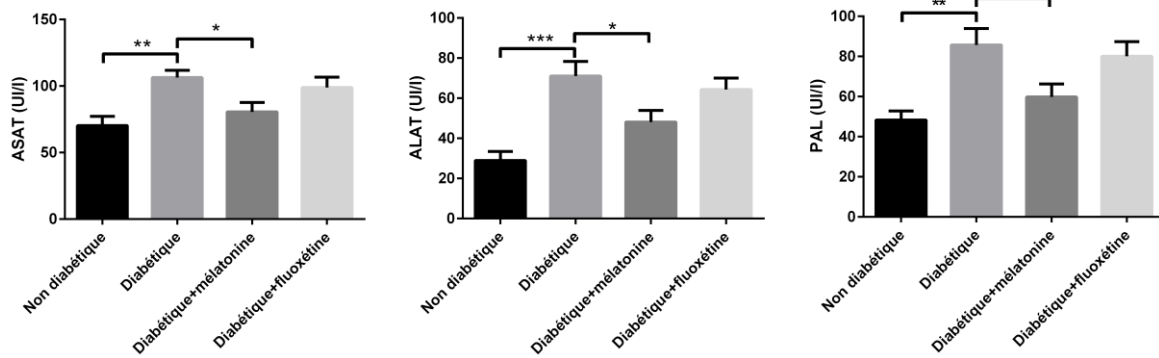


Figure 23: Variation de l'activité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline, après 28^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

3.6. Effet sur l'acide urique et la créatinine

Nos résultats montrent que l'uricémie et la créatinémie ont augmenté respectivement de manière significative chez le groupe diabétique lorsqu'il est comparé avec celui non diabétique (p<0,001, p<0,05, respectivement, tabl.9; fig.24). Chez les rats diabétiques, l'administration pendant quatre semaines de la mélatonine a réduit significativement le taux de l'acide urique et la créatinine (p<0,05, p<0,05, respectivement, tabl.9; fig.24), tandis que la fluoxétine n'exerce aucun effet significatif sur l'uricémie et la créatinémie.

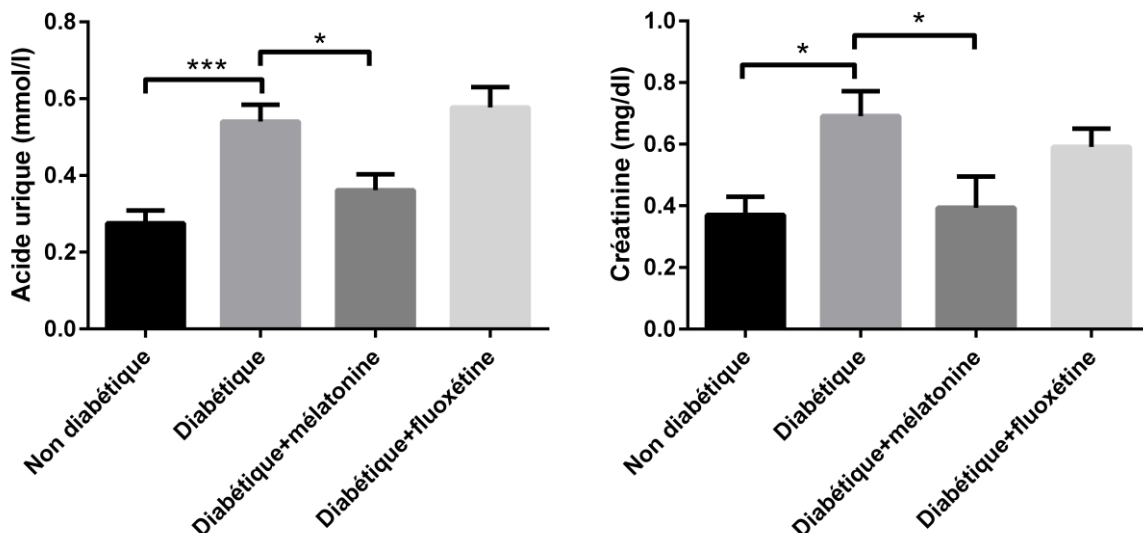


Figure 24: Variation du taux de l'acide urique et de la créatinine au niveau sanguin après 28^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (* p<0,05, *** p<0,001).

✓ Discussion

Le diabète sucré est un désordre endocrinien affectant le métabolisme glucidique, lipidique et protéique et se caractérise par un état d'hyperglycémie chronique associé à un déficit de la sécrétion d'insuline et / ou lorsque le corps ne peut pas utiliser l'insuline d'une manière efficace (TA, 2014), ce qui conduit à une augmentation du taux de glucose au niveau sanguin.

Dans la présente étude, l'injection intrapéritonéale de 60 mg/kg de STZ a causé une insulino-pénie chez les rats après 31 jours. Cela est dû à l'effet diabétogène et l'action cytotoxique de la STZ qui induit une destruction des cellules β du pancréas productrices d'insuline (Lenzen *et al.*, 2008). Les mêmes constatations sont rapportées par Achi *et al.* (2017) qui ont noté une diminution du taux d'insuline sérique chez des rats rendus diabétiques après injection de STZ. De plus, les lots diabétiques qui ont subi deux traitements à la mélatonine et la fluoxétine durant quatre semaines respectivement ne présentent aucune amélioration quand au niveau de l'insulinémie. Ceci suggère que la STZ aurait entraîné une destruction totale des cellules β , bien avant l'administration des traitements qui s'est faite tardivement après l'injection de STZ (Mahmoud *et al.*, 2005).

L'hyperglycémie est le signe clinique clé du diabète sucré, elle pourrait être la conséquence d'une diminution de l'utilisation du glucose périphérique, mais aussi peut être causée par une libération et une surproduction du glucose tissulaire par excès de la néoglucogenèse et la glycogénolyse (Shirwaikar *et al.*, 2004).

Après 31 jours de l'injection de STZ, la glycémie a augmenté considérablement chez les rats diabétiques non traités en absence de l'insuline, Cette hyperglycémie est due à la perte de l'intégrité des cellules bêta, sachant que les effets délétères de STZ sont clairement observés chez les rats après les 2-4 jours l'injection de 60 mg/kg de STZ (Akbarzadeh *et al.*, 2007).

Dans la présente expérimentation, l'administration de la mélatonine durant une période de 28 jours, pourrait rétablir certains paramètres sanguins dont la glycémie qui semblent augmenter après induction du diabète. En outre, plusieurs résultats de recherches ont démontré l'effet bénéfique de la mélatonine sur l'hyperglycémie au cours du diabète expérimental (Anwar et Meki, 2003; Kanter *et al.*, 2006; Elbe *et al.*, 2015; Amin *et al.*, 2015).

De même, la fluoxétine à son tour réduit significativement la glycémie des rats diabétiques, ceci dénote un activité hypoglycémiant de cette drogue, en effet il a été rapporté que la fluoxétine exerce un effet hypoglycémiant chez les souris diabétiques indépendamment de

l'insulinopénie (Erenmemisoglu *et al.*, 1999). Le mécanisme par lequel la fluoxétine agit, n'a pas été bien élucidé. Cependant, McIntyre *et al.* (2006), ont montré que les antidépresseurs tels que la fluoxétine agissant par la mise en jeu de divers mécanismes au niveau cérébral.

Le diabète se manifeste aussi par une augmentation du degré de glycation des protéines sanguines comme l'hémoglobine glyquée (Kamalakkannan *et al.*, 2006), étant donné que le dosage de cette dernière est très utilisé pour vérifier l'équilibre du diabète. Notre étude a révélé une élévation du pourcentage de l' HbA1c chez les animaux diabétiques, néanmoins cette augmentation a été renversée par l'administration de la mélatonine. Des résultats similaires ont été rapportés par (Montilla *et al.*, 1998; Amin *et al.*, 2015).

Le traitement par la fluoxétine durant 4 semaines réduit à son tour le taux de l'HbA1c des rats diabétiques. Le même effet de fluoxétine a été constaté sur le taux de ce paramètre chez les patients déprimés souffrant du diabète sucré (Lustman *et al.*, 2000).

Le diabète sucré est souvent accompagné d'une altération du profil lipidique se traduisant par une hyperlipidémie, cette dernière est caractérisée par une augmentation des taux du C-LDL, des triglycérides et une diminution du C-HDL, les impliquant ainsi dans le développement des maladies cardiovasculaires (Lecerf, 2000).

Dans notre étude, nous avons constaté que la STZ a provoqué un niveau très élevé de cholestérolémie et de triglycéridémie chez le groupe diabétique, ce qui est en accord avec les résultats de Elberry *et al.* (2015); Adam *et al.* (2016); Achi *et al.* (2017). Cependant, une amélioration du profil lipidique a été enregistrée chez les rats diabétiques traités à la mélatonine, qui pourrait être expliquée par la diminution des triglycérides, le cholestérol total et C-LDL. Ces résultats supportent ceux décrits par (Baydas *et al.*, 2002; Anwar *et al.*, 2003; Agil *et al.*, 2011).

De plus, un grand nombre d'études a porté sur l'effet bénéfique de la mélatonine sur la dyslipidémie, causée par la persistance de l'état diabétique afin de mieux comprendre son mécanisme d'action sur l'hyperlipidémie. Il a été trouvé que la mélatonine également augmente la clairance endogène du cholestérol (Tengattini *et al.*, 2008).

D'autre part, l'effet de la fluoxétine sur la dyslipidémie semble plus faible que celui de la mélatonine, nous avons noté un rétablissement uniquement au niveau de la triglycéridémie chez les rats diabétiques traités par la fluoxétine. Ce résultat confirme celui précédemment enregistré par notre laboratoire à savoir une réduction de la triglycéridémie des rats

diabétiques ayant reçu la fluoxétine (Rebai et Boudah, 2016). Dans ce contexte, Daubresse *et al.* (1996) et Ye *et al.* (2011) rapportent que la fluoxétine diminue l'hypertriglycémie des patients diabétiques de type 2.

L'exploration et l'évaluation biologique de la fonction hépatique repose toujours sur le dosage de certains marqueurs sanguins tels les transaminases (ASAT et ALAT) et la phosphatase alcaline (PAL) qui reflète l'activité fonctionnelle du foie. En cas d'une altération hépatocellulaire au cours du diabète sucré, le taux de ces enzymes augmente de façon significative au niveau sanguin, indiquant une dégénérescence ou bien une nécrose des cellules hépatiques. Une telle élévation a été remarquée dans notre expérimentation suite à l'injection de STZ. Ceci est en accord avec les conclusions rapportées par Maritim *et al.* (2003) et Hosseini *et al.* (2017). Outre ses propriétés antioxydantes, la mélatonine a été décrite comme une molécule exerçant une activité cytoprotectrice vis-à-vis des lésions hépatocytaires (Mathes, 2010).

Dans la présente étude, nous avons montré que l'administration de la mélatonine aux animaux diabétiques a diminué significativement les concentrations sériques de l'ASAT, l'ALAT et la PAL, à l'inverse de la fluoxétine qui n'exerce aucun effet sur le taux de ces enzymes. À ce titre, Shaker *et al.* (2009) et Grigorov *et al.* (2014) dénotent une réduction de l'activité des enzymes citées précédemment après le traitement prolongé à la mélatonine.

L'atteinte rénale dans le diabète peut s'exprimer principalement par l'apparition croissante de protéines dans les urines, mais aussi une détérioration de la capacité de filtration du rein avec augmentation de la créatinine au niveau sanguin.

Le dosage de l'acide urique, accompagné de celui de la créatinine, est utilisé pour évaluer la fonction rénale dans de nombreuses circonstances et pour suivre les patients atteints de pathologies chroniques telle que le diabète. En effet, l'augmentation des taux sanguins de la créatinine chez les rats diabétiques pourrait être considérée comme un biomarqueur de dysfonctionnement rénal et de la filtration glomérulaire. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux de recherche effectués sur le diabète expérimental où une augmentation marquée de l'uricémie et la créatininémie a été notée (Arulselvan *et al.*, 2006; Hosseini *et al.*, 2017), ainsi l'acide urique est considéré comme un antioxydant endogène, son élévation au niveau sanguin représente un signe révélateur de l'augmentation du stress oxydatif au cours du diabète. Cette élévation est due à l'activation des xanthines oxydases et la libération des purines par les cellules musculaires qui ont subi une dégénérescence liée au diabète

(Madianov *et al.*, 1999; Palsamy et Subramanian, 2008). Dans notre expérimentation, le traitement des rats diabétiques à la mélatonine normalise la concentration sérique de la créatinine. Ces constatations confirment celles rapportés par Onk *et al.* (2016).

Anwar et Meki. (2003) ont signalé une diminution significative de l'uricémie après administration de la mélatonine aux animaux diabétiques, cet effet bénéfique peut être attribué à la propriété antioxydante et régulatrice de la mélatonine sur les différentes voies métaboliques au cours du diabète.

Dans l'ensemble nos résultats ont mis en évidence que la mélatonine et la fluoxétine exerceraient un effet protecteur contre les désordres métaboliques engendrés par le diabète sucré, plus précisément sur les paramètres biochimiques au niveau périphérique où elles ont réduit l'hyperglycémie et amélioré le profil lipidique.

4. Effets des traitements sur les paramètres du stress oxydatif

4.1. Effets des traitements sur les paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes

Les données résumées dans le tableau 10 représentent les variations des paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes des rats normaux, diabétiques traités par la mélatonine et la fluoxétine pendant 28 jours.

Tableau 10: Paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes chez les groupes expérimentaux

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	Non diabétique	Diabétique	Diabétique+ Mélatonine	Diabétique+ Fluoxétine
Malondialdéhyde (MDA) (nmol/mg prot)	1,33±0,32	3,25±0,52**	1,78±0,26 [#]	2,17±1,32
Glutathion réduit (GSH) (nmol/mg prot)	73,03±4,73	31,03±6,14**	65,06±8,47 ^{##}	38,13±4,65
Catalase (µmol H ₂ O ₂ /min/mg prot)	91,40±10,59	44,94±10,24*	89,71±11,47 [#]	52,95±11,58

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Groupe non diabétique. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. Groupe diabétique.

Après analyse des résultats, nous avons noté une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau des érythrocytes des rats rendus diabétiques lorsqu'ils sont comparés avec les témoins (P<0,01, tabl.10; fig.25), ainsi une diminution hautement significative du taux de GSH a été observée chez les mêmes rats (P<0,01, tabl.10; fig.25), à l'inverse le traitement à la mélatonine a pu prévenir l'élévation de la peroxydation lipidique et la déplétion du GSH érythrocytaire chez les animaux diabétiques (P<0,05, P<0,01, respectivement tabl.10; fig.25).

En outre, l'activité de CAT a diminué de manière significative chez le groupe diabétique par rapport au groupe contrôle (P<0,05, tabl.10; fig.25). Par contre, aucun rétablissement de l'activité de cette enzyme n'a été remarqué chez les rats diabétiques traités par la mélatonine ou la fluoxétine.

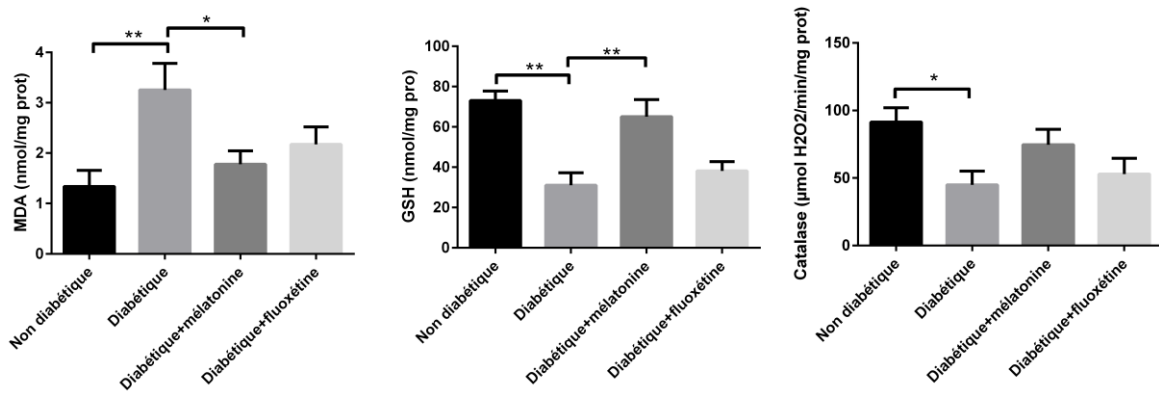


Figure 25: Variations des paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes après le 28^{ème} jour de traitement chez les groupes expérimentaux. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.2. Effet des traitements sur les paramètres du stress oxydatif au niveau cérébral

Les résultats illustrés dans le tableau 11 présentent les paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe des rats normaux, diabétiques traités par la mélatonine et la fluoxétine pendant 28 jours.

Tableau 11: Paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les groupes expérimentaux

Paramètres	Structure cérébrale	Groupes expérimentaux			
		Non diabétique	Diabétique	Diabétique+mélatonine	Diabétique+Fluoxétine
Malondialdéhyde (MDA) (nmol/mg prot)	Cortex préfrontal	13,79±1,34	34,46±4,02***	12,15±2,62##	26,35±2,51#
	Hippocampe	13,76±2,10	44,49±6,06***	26,19±4,44#	29,79±3,71#
Glutathion réduit (GSH) (nmol/mg prot)	Cortex préfrontal	26,14±3,10	7,50±1,01***	18,14±2,97#	15,45±2,37#
	Hippocampe	28,30±3,28	10,57±1,18***	21,00±2,65#	13,40±2,04
Catalase (µmol H2O2/min/mg prot)	Cortex Préfrontal	24,91±2,76	14,55±3,64*	26,22±2,69#	23,06±1,93#
	Hippocampe	28,20±2,92	14,94±2,34*	24,61±2,67	24,93±4,24

Glutathion peroxydase (GPx) (nmol GSH/mg prot)	Cortex Préfrontal	1,23±0,20	0,31±0,05**	1,47±0,19###	0,57±0,14
	Hippocampe	1,22±0,16	0,48±0,12**	1,23±0,20#	0,48±0,13
Glutathion-S-transférase (GST) (nmol CDNB/min/mg prot)	Cortex Préfrontal	0,49±0,03	0,31±0,05**	0,51±0,02##	0,32±0,02
	Hippocampe	0,74±0,17	0,23±0,04*	0,41±0,05	0,41±0,10

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Groupe non diabétique. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. Groupe diabétique.

Les résultats illustrés dans le tableau 11 ont montré une augmentation du taux du MDA et une diminution du GSH d'une manière significative au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les animaux diabétiques comparativement aux rats témoins (P<0,001, tabl.11; fig.26). Alors que le traitement par la mélatonine et la fluoxétine a pu rétablir ces deux paramètres. En outre, nous avons constaté une différence significative de l'effet de traitement au niveau du cortex préfrontal chez les rats diabétiques traités par la mélatonine et ceux traités à la fluoxétine. Il est possible d'observer que l'activité des enzymes antioxydantes de la CAT, la GPx et la GST dosée au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe a été diminuée significativement chez les rats diabétiques en comparaison avec le groupe non diabétique (P<0.05, P<0.01, P<0.01, respectivement tabl.11; fig.27). Toutefois, le traitement prolongé par la mélatonine des animaux diabétiques a amélioré l'activité enzymatique de CAT, la GPx et la GST du cortex préfrontal (P<0.05, P<0.001, P<0.01, respectivement, tabl.11; fig.27). Par contre aucun changement significatif n'a été enregistré concernant l'activité enzymatique de la GPx et la GST au niveau du cortex chez les rats diabétiques traités à la fluoxétine.

L'activité antioxydante des enzymes, la CAT, la GPx et la GST du groupe diabétique a été diminuée de façon significative au niveau de l'hippocampe par rapport au lot non diabétique (P<0.05, P<0.05, P<0.01, respectivement, tabl.11; fig.27). Alors que le traitement des rats diabétiques par la mélatonine montrent un rétablissement de l'activité de GPx de l'hippocampe en comparaison avec les rats diabétiques (P<0,05, tabl.11; fig.27). Cependant, nous ne notons

aucune amélioration de l'activité enzymatique chez le groupe diabétique traité par la fluoxétine.

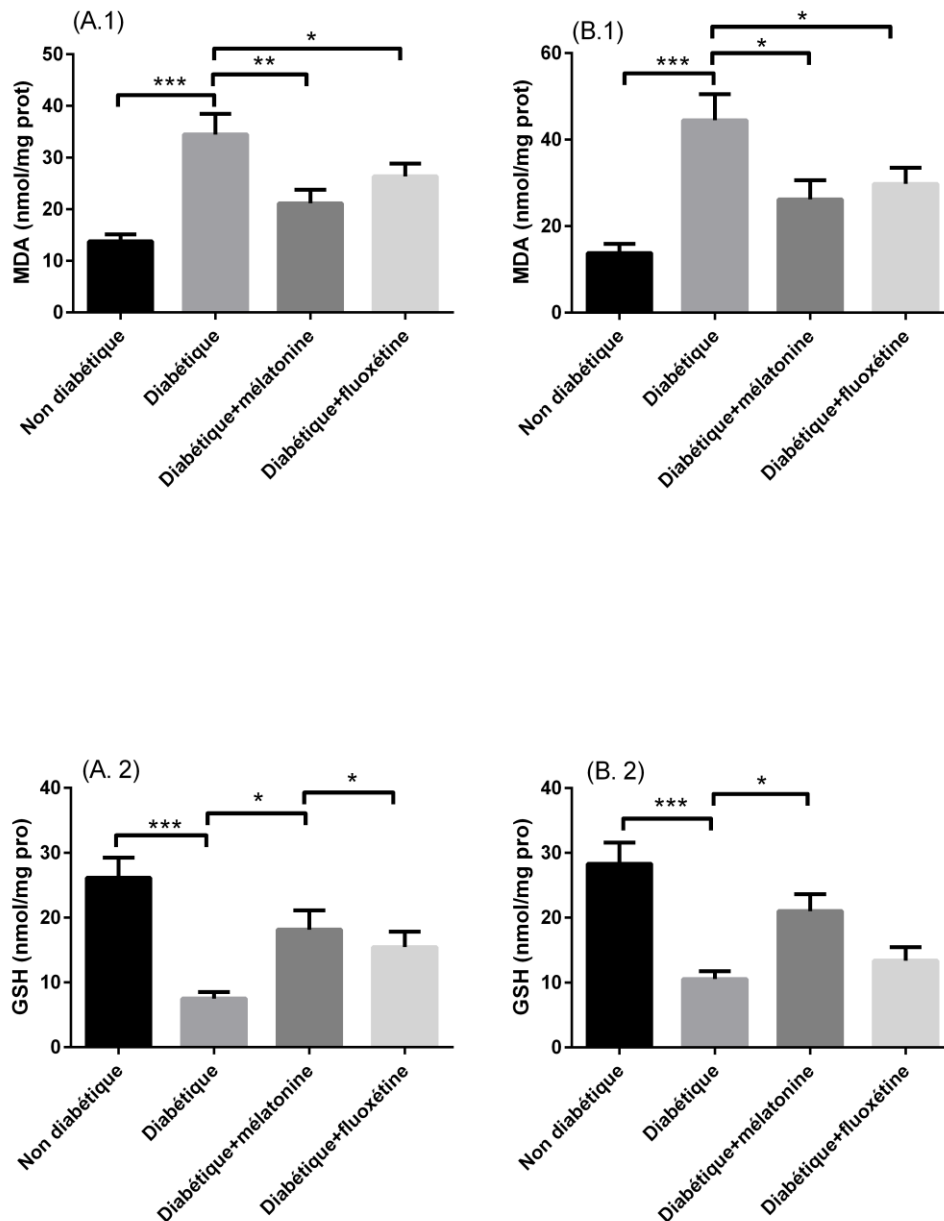


Figure 26: Variation des paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les groupes. (A): Mesure des paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal, (A.1): le taux du MDA; (A.2): le taux du GSH. (B): Mesure des paramètres du stress oxydatif au niveau de l'hippocampe, (B.1): le taux de (MDA); (B.2): le taux du GSH . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

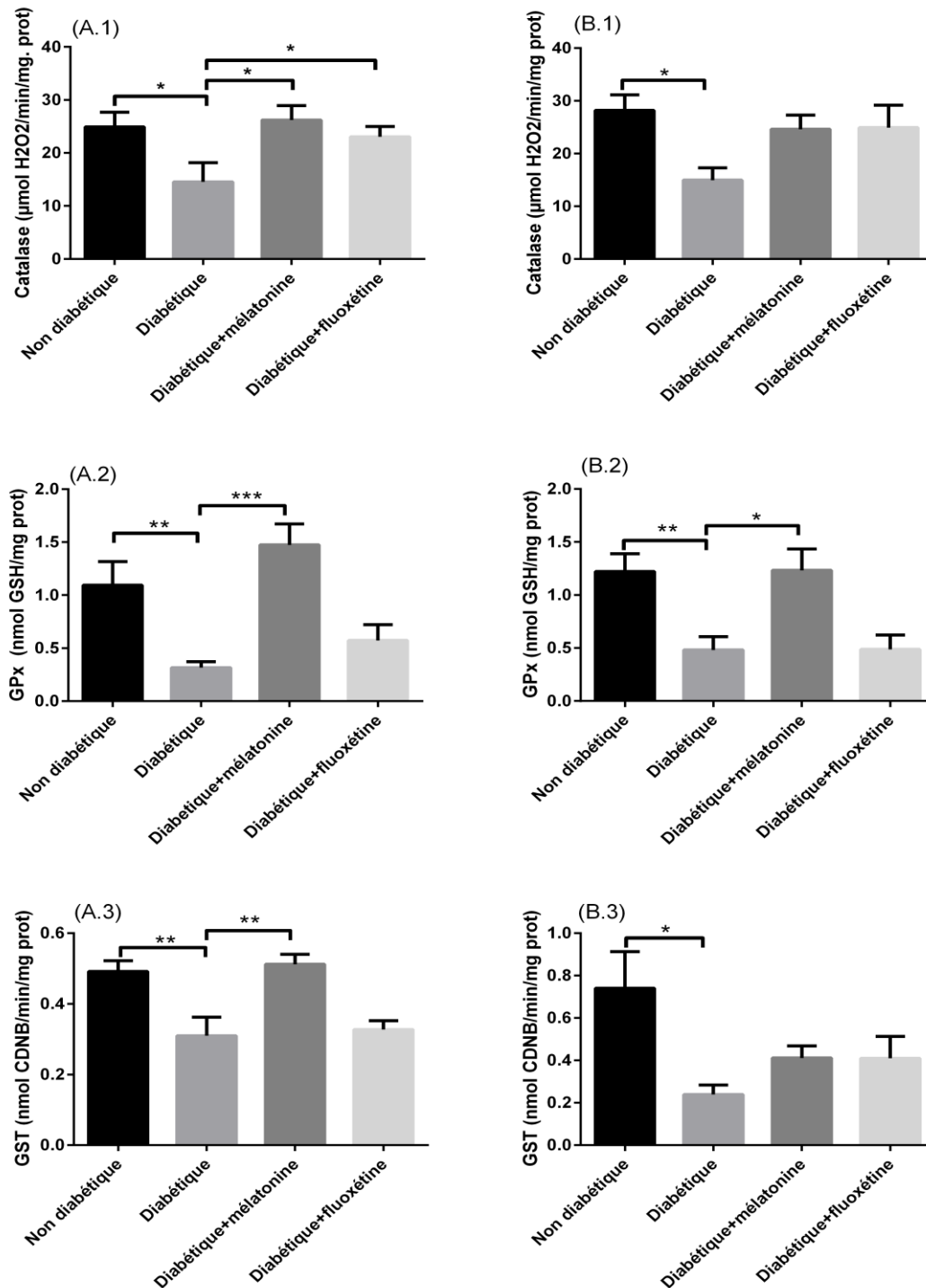


Figure 27: Variation des paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les groupes. (A): Mesure des paramètres du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal: (A.1): l'activité de la catalase; (A.2): l'activité de la glutathion peroxydase; (A.3): l'activité de la glutathion-s-transférase. (B): Mesure des paramètres du stress oxydatif au niveau de l'hippocampe: (B.1): l'activité de la catalase; (B.2): l'activité de la glutathion peroxydase; (B.3) l'activité de la glutathion-s-transférase. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

✓ Discussion

Les diabétiques présentent un état de stress oxydant permanent, caractérisé par une surproduction de radicaux libres par divers mécanismes (Matough *et al.*, 2012). Ces derniers sont à l'origine des anomalies métaboliques et des complications dégénératives du diabète sucré qui peuvent toucher plusieurs organes et fonctions.

En raison de leur consommation élevée d'oxygène, de forte teneur en acides gras polyinsaturés (PUFAs) et d'une faible défense antioxydante enzymatique, le cerveau et les érythrocytes présentent une vulnérabilité accrue au stress oxydatif induit par le diabète et deviennent exposés aux attaques des ERO générées en continu par l'auto oxydation élevée du glucose, des acides gras polyinsaturés et la glycation des protéines (Mahesh et Menon, 2004; Ayepola *et al.*, 2014; Kahya *et al.*, 2015).

Les résultats de la présente étude ont montré un déséquilibre dans le statut redox en faveur des pro oxydants mettant les érythrocytes dans un état du stress oxydatif. Ceci peut s'expliquer par le taux du MAD qui a augmenté de manière significative chez les animaux diabétiques, ainsi la diminution du taux de GSH suite à leur action de neutralisation des radicaux libres. Dans ce contexte, les mêmes effets ont été démontré par d'autres auteurs où le diabète expérimental induit une perturbation du système antioxydant, une augmentation de la peroxydation lipidique et une déplétion du GSH érythrocytaire (Vural *et al.*, 2001; Mahesh et Menon, 2004; Ozkol *et al.*, 2013).

Le traitement des animaux diabétiques par la mélatonine a empêché la déplétion de GSH et réduit la lipoperoxydation. Notons que la fluoxétine ne semble exercer aucun effet bénéfique sur le statut redox érythrocytaire. Ces résultats mettent en évidence la propriété antioxydante de la mélatonine déjà rapportée par plusieurs travaux (Montilla *et al.*, 1998; Vural *et al.*, 2001; Anwar et Meki, 2003).

Au niveau central, l'hyperglycémie chronique peut avoir de graves répercussions sur les structures cérébrales liées aux fonctions cognitives et comportementales, le changement pathologique touchant les principaux composants de la structure cellulaire des neurones, est attribué aux attaques radicalaires qui sont connus pour induire des dommages cellulaires au niveau cérébral (Da Silva Haeser *et al.*, 2007; Ceretta *et al.*, 2012).

D'après les résultats obtenus dans notre travail, l'élévation du stress oxydatif au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe a induit un comportement dépressif et anxieux chez les

rats diabétiques. Ceci s'est traduit par la diminution du nombre d'entrées dans les bras ouverts, la réduction de l'activité locomotrice dans l'EPM et l'augmentation du temps d'immobilité au cours de FST. Dans ce contexte, plusieurs études menées sur les rongeurs ont montré un déficit comportemental des animaux diabétiques lorsqu'ils sont soumis à certains tests comportementaux tels, l'OFT, l'EPM et le FST (Hilakivi-Clarke *et al.*, 1990; Haider *et al.*, 2013).

Le stress oxydatif engendré par la persistance de l'état diabétique entraîne au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe un dérèglement fonctionnel et un changement de neuroplasticité synaptique induits par les ERO (De Morais *et al.*, 2014; Castillo-Gómez *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016). Ces régions cérébrales impliquées dans la physiopathologie dépressive subissent une détérioration cellulaire conduisant à une atrophie neuronale pouvant être causée par une diminution d'expression des facteurs de croissance neuronale tel le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) qui joue un rôle critique dans la survie et la fonction des neurones (Nitta *et al.*, 2002; Rosso *et al.*, 2017).

Notre étude a mis en évidence une diminution de la peroxydation et une amélioration de l'activité de certaines enzymes de défense antioxydante au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe des rats diabétiques ayant reçu la mélatonine. Ceci pourrait être expliqué par la diminution du MDA et le maintien du taux de GSH au niveau de ces deux structures, d'où l'augmentation de l'activité enzymatique de CAT, GPx et GST du cortex préfrontal (l'activité de la CAT et la GST ne subit aucune amélioration au niveau de l'hippocampe). À ce titre, des études scientifiques (Reiter *et al.*, 2000; Baydas *et al.*, 2003; Tuzcu et Baydas, 2006) ont démontré l'effet protecteur de la mélatonine vis-à-vis du dommage cellulaire provoqué par le stress oxydatif sur les structures cérébrales tels, le cortex et l'hippocampe où elle contribuerait à la neutralisation des ERO par le recyclage de molécules antioxydantes endogènes comme le GSH.

De plus, la présente expérimentation a prouvé que la fluoxétine comme la mélatonine, a pu réduire la peroxydation lipidique en diminuant le taux du MDA du cortex préfrontal et de l'hippocampe. Toutefois, aucune restauration de l'activité enzymatique citée précédemment au niveau de cortex préfrontal et de l'hippocampe n'a été enregistrée (en dehors d'une amélioration de l'activité de CAT du cortex). Cet effet sur la lipoperoxydation au niveau du cortex a été déjà démontré dans notre étude, menée sur des rats diabétiques, soumis aux deux tests comportementaux, l'OFT et le FST (Rebai et Boudah, 2016).

En outre, au cours du diabète expérimental, des altérations cognitives et des troubles dépressifs engendrés par un déficit dans la neurogénèse hippocampique et l'altération de la plasticité synaptique ont été constatés, du probablement à l'hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), il en résulte une élévation des glucocorticoïdes circulants telle que la corticostérone (Magariños *et al.*, 2000; Stranahan *et al.*, 2008), ainsi il a été démontré que le traitement par la fluoxétine renverse le comportement dépressif et favorise la neurogénèse dans les régions hippocampiques chez des souris subissant une exposition à long terme de l'hormone du stress, la corticostérone (David *et al.*, 2009). De même, Moretti *et al.* (2012) ont montré qu'au cours du stress chronique imprédictible, sur un modèle animal de dépression, la fluoxétine réduit de façon significative le taux du MDA au niveau du cortex et de l'hippocampe et augmente l'activité de CAT chez les déprimés. Cet effet protecteur de la fluoxétine contre le stress oxydatif pourrait revenir aux propriétés cytoprotectives de cette drogue et son action restrictive exercée sur la production excessive des ions (Ca^{2+}) qui favorisent directement la génération des ERO (Li *et al.*, 2003). En plus, d'autres études ont montré que la fluoxétine inhibe le cytochrome P450 qui contribue à la production d'ERO (Nieuwstraten *et al.*, 2006; Gałeczki *et al.*, 2009).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'issue de cette étude a généré diverses conclusions et ouvre le champ à des perspectives pour un approfondissement et une meilleure compréhension des interrelations du diabète et des maladies psychosomatiques :

1. Choix de l'animal et du mode opératoire

Le choix du rat blanc comme modèle animal expérimental et l'induction du diabète par voie chimique (streptozotocine) s'est avéré être un choix judicieux et avantageux pour ce genre d'étude. En effet nous avons pu avoir un diabète stable avec zéro mortalité et de longue durée nous permettant ainsi de mener à terme le reste de notre investigation. Le rat s'est avéré être un modèle isomorphe puisque l'injection de la STZ a provoqué une reproduction fidèle des désordres du métabolisme général caractéristique du diabète, notamment une chute de poids corporel chez les animaux diabétiques, accompagné par une polydipsie, une polyphagie et une polyurie.

2. Action de la streptozotocine

a) Au niveau sérique

Le tableau biologique obtenu dans notre étude suite à l'injection de la STZ est identique à celui décrit dans la littérature, quoique le mécanisme d'action reste peu connu il est fort probable que son action se situe au niveau des îlots de Langerhans en réduisant la masse des cellules bêta, provoquant une insulino-pénie caractéristique d'une hyperglycémie chronique ou transitoire (Aughsteen, 2000; Szkudelski, 2001). Nous avons observé que l'absence d'insuline a été suivie d'altérations du métabolisme glucidique, lipidique, d'un déséquilibre de transaminases (ASAT, ALAT), ainsi que celui de la balance prooxydants/antioxydants au profit des ERO au niveau érythrocytaire.

Tous ces signes nous confirment l'installation du diabète sucré

b) Au niveau central

Notre travail a mis en évidence des perturbations neurocomportementales suite à l'installation du diabète. Selon nos tests ces altérations dans le comportement traduisent un état dépressif et anxieux chez les rats, et sont concomitantes en fait de l'augmentation de la peroxydation lipidique, de la diminution de l'activité enzymatique de certaines enzymes antioxydantes

(GSH-Px, GST et CAT) et enfin de la déplétion des taux du glutathion réduit (GSH) que nous avons analysées.

3. Effets de la mélatonine et de la fluoxétine

La présente étude a démontré clairement que la mélatonine et la fluoxétine exercent une activité régulatrice sur les différents paramètres comportementaux et biochimiques. Cet effet bénéfique de ces deux drogues est constaté par l'amélioration du comportement actif et de l'activité locomotrice des rats diabétiques, ainsi que par le rétablissement des paramètres biochimiques au niveau périphérique et central. En effet nous avons noté:

- Une diminution de la glycémie et le taux de l'hémoglobine glyquée chez les animaux diabétiques.
- une amélioration du profil lipidique et une diminution des biomarqueurs de l'altération de la fonction hépatique et rénale (ASAT, ALAT, PAL, créatinine et acide urique).
- Une diminution de la peroxydation lipidique au niveau des érythrocytes et cérébral (cortex préfrontal et hippocampe), mais aussi une amélioration de l'activité de certaines enzymes antioxydantes (particulièrement dans le cortex préfrontal pour les rats diabétiques traités à la mélatonine).

Il ressort clairement de cette étude que la mélatonine est dotée d'une forte activité antioxydante que celle de la fluoxétine, ainsi elle exercerait un effet antidépresseur chez les diabétiques.

4. Perspectives

Ce travail reste toutefois préliminaire, des études plus approfondies seront nécessaires afin de comprendre pourquoi un diabétiques sur quatre est déprimé, définir la direction à donner à cette association diabète-dépression et en proposer les mécanismes éventuellement. Certaines pistes nous semblent intéressantes à explorer comme par exemple l'étude moléculaire de l'expression des gènes qui codent pour les facteurs de croissance neuronale (BDNF, NGF).

Nous envisageons à court terme de compléter ce travail par une étude histologique du cortex préfrontal et de l'hippocampe afin de procéder à un constat de l'état des neurones, un dosage des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF α) et surtout celui de la sérotonine et son précurseur, le tryptophane au niveau des structures cérébrales étudiées. En effet la sérotonine

comme la dopamine sont les principaux neurotransmetteurs qui régulent l'humeur et le comportement psychologique, or de nombreuses études font le lien entre l'hyperglycémie et les états psycho-comportemento-cognitifs. Si bien qu'un déséquilibre dans le métabolisme des indolamines entraîne systématiquement une perturbation de l'humeur et une dépression. Ce qui a fait dire à Perlmutter que l'Alzheimer est un diabète de type 3.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abraham, P. M., Kuruvilla, K. P., Mathew, J., Malat, A., Joy, S., & Paulose, C. S.** (2010). Alterations in hippocampal serotonergic and INSR function in streptozotocin induced diabetic rats exposed to stress: neuroprotective role of pyridoxine and Aegle marmelose. *Journal of biomedical science*, 17(1), 1-15.
- Achi, N. K., Ohaeri, O. C., Ijeh, I. I., & Eleazu, C.** (2017). Modulation of the lipid profile and insulin levels of streptozotocin induced diabetic rats by ethanol extract of *Cnidioscolus aconitifolius* leaves and some fractions: Effect on the oral glucose tolerance of normoglycemic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 562-569.
- Adam, S. H., Giribabu, N., Rao, P. V., Sayem, A. S. M., Arya, A., Panichayupakaranant, P., ... & Salleh, N.** (2016). Rhinacanthin C ameliorates hyperglycaemia, hyperlipidemia and pancreatic destruction in streptozotocin–nicotinamide induced adult male diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 771, 173-190.
- Aebi, H.** (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Agil, A., Navarro-Alarcón, M., Ruiz, R., Abuhamadah, S., El-Mir, M. Y., & Vázquez, G. F.** (2011). Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research*, 50 (2), 207-212.
- Akbarzadeh, A., Norouzi, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, S. H., Farhangi, A., Verdi, A. A., ... & Rad, B. L.** (2007). Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(2), 60-64.
- Aksu, U., Guner, I., Yaman, O. M., Erman, H., Uzun, D., Sengezer-Inceli, M., ... & Sahin, G.** (2014). Fluoxetine ameliorates imbalance of redox homeostasis and inflammation in an acute kidney injury model. *Journal of physiology and biochemistry*, 70(4), 925-934.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. F. P. C., & Fu, P. C.** (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*, 20(4), 470-475.
- Amargós-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M. V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., ... & Artigas, F.** (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin 2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 14(3), 281-299.

- Amin, A. H., El-Missiry, M. A., & Othman, A. I.** (2015). Melatonin ameliorates metabolic risk factors, modulates apoptotic proteins, and protects the rat heart against diabetes-induced apoptosis. *European journal of pharmacology*, 747, 166-173.
- Anwar, M. M., & Meki, A. R. M.** (2003). Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(4), 539-547.
- Apel, K., & Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Arango, V., Ernsberger, P., Marzuk, P. M., Chen, J. S., Tierney, H., Stanley, M., ... & Mann, J. J.** (1990). Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT₂ and β -adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims. *Archives of General Psychiatry*, 47(11), 1038-1047.
- Arulselvan, P., Senthilkumar, G. P., Sathish Kumar, D., & Subramanian, S.** (2006). Anti-diabetic effect of *Murraya koenigii* leaves on streptozotocin induced diabetic rats. *Die Pharmazie*, 61(10), 874-877.
- Aughsteen, A. A.** (2000). An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice. *Journal of Electron Microscopy*, 49(5), 681-690.
- Ayepola, O. R., Brooks, N. L., & Oguntibeju, O. O.** (2014). Kolaviron Improved Resistance to Oxidative Stress and Inflammation in the Blood (Erythrocyte, Serum, and Plasma) of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Barat, P., Tastet, S., & Vautier, V.** (2011). Impact neuropsychologique à long terme du diabète de type 1 chez l'enfant. *Archives de pédiatrie*, 18(4), 432-440.
- Barclay, L. R. C., & Ingold, K. U.** (1980). Autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. *Journal of the American Chemical Society*, 102(26), 7792-7794.
- Barouki, R.** (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, 22(3), 266-272.

- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J. M., & Kellermann, O.** (2010). miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science*, 329(5998), 1537-1541.
- Baydas, G., Canatan, H., & Turkoglu, A.** (2002). Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *Journal of pineal research*, 32(4), 225-230.
- Bayr, H.** (2005). Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12), 498-501.
- Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., & Saravia, F.** (2006). Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *European Journal of Neuroscience*, 23(6), 1539-1546.
- Behr, G. A., Moreira, J. C., & Frey, B. N.** (2012). Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012,1-13.
- Bennett, R. A., & Pegg, A. E.** (1981). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer research*, 41(7): 2786-2790.
- Bergmeyer, H.U.** (1980). *Clinica Chimica Acta*, 105, 147-157.
- Bergmeyer, H.U. Bower, G.N. Horder Jr .M and Moss, D.W.** (1976). *Clinica Chimica Acta*, 70, 19-42.
- Biagetti, B., & Corcoy, R.** (2013). Hypoglycemia associated with fluoxetine treatment in a patient with type 1 diabetes. *World Journal of Clinical Cases*, 1(5), 169-171.
- Bilici, M., Efe, H., Koroğlu, M. A., Uydu, H. A., Bekaroğlu, M., & Değer, O.** (2001). Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *Journal of affective disorders*, 64(1), 43-51.

- Binfaré, R. W., Mantovani, M., Budni, J., Santos, A. R. S., & Rodrigues, A. L. S.** (2010). Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *European journal of pharmacology*, 638(1), 78-83.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Beaudoux, J. L., Peynet, J., Legrand, A., & Delattre, J.** (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels?. In *Annales de Biologie Clinique*, (4)59, 453-459.
- Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J. L., Théron, P., Peynet, J., Legrand, A., & Delattre, J.** (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 62(3), 147-157.
- Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*, 7, 248-254.
- Buege, J. A., & Aust, S. D.** (1984). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 105, 302-310.
- Burstein, M. S. H. R., Scholnick, H. R., & Morfin, R.** (1970). Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *Journal of lipid research*, 11(6), 583-595.
- Cadenas, E., & Davies, K. J.** (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 222-230.
- Caiaffo, V., Oliveira, B. D., Sá, F. B., & Evêncio Neto, J.** (2016). Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. *Pharmacology Research & Perspectives*, 4(3), 1-9.
- Cartes, P., Gianfreda, L., & Mora, M. L.** (2005). Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant and Soil*, 276(1-2), 359-367.
- Castanho, A.** (2013). Effets de l'aglomelatine et de la mélatonine sur les oscillations de l'horloge circadienne. Thèse de doctorat (université de Strasbourg). 194p.
- Castillo-Gómez, E., Coviello, S., Perez-Rando, M., Curto, Y., Carceller, H., Salvador, A., & Nacher, J.** (2015). Streptozotocin diabetic mice display depressive-like behavior and

alterations in the structure, neurotransmission and plasticity of medial prefrontal cortex interneurons. *Brain research bulletin*, 116, 45-56.

Catena-Dell'Osso, M., Fagiolini, A., Rotella, F., Baroni, S., & Marazziti, D. (2013). Glutamate system as target for development of novel antidepressants. *CNS spectrums*, 18(04), 188-198.

Ceretta, L. B., Réus, G. Z., Abelaira, H. M., Ribeiro, K. F., Zappellini, G., Felisbino, F. F., ... & Quevedo, J. (2012). Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Experimental diabetes research*, 2012, 1-8.

Chan, O., Inouye, K., Riddell, M. C., Vranic, M., & Matthews, S. G. (2003). Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva endocrinologica*, 28(2), 87-102.

Chanson, P., Timsit, J., & Charbonnel, B. (2000). Données actualisées de l'UKPDS: implications pour la prise en charge des patients diabétiques de type 2. *Médecine thérapeutique/Endocrinologie*, 2(3), 207-16.

Chawla, D., Bansal, S., Banerjee, B. D., Madhu, S. V., Kalra, O. P., & Tripathi, A. K. (2014). Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvascular research*, 95, 1-6.

Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.

Cooke, D. W., Plotnick, L. (2008). Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. *Pediatrics in review*, 29, 374-384.

Cryan, J. F., & Lucki, I. (2000). Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-hydroxytryptamine 2C receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295:(3), 1120-1126.

Da Silva Haeser, A., Sitta, A., Barschak, A. G., Deon, M., Barden, A. T., Schmitt, G. O., ... & Vargas, C. R. (2007). Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain research*, 1154, 137-143.

Daubresse, J. C., Kolanowski, J., Krzentowski, G., Kutnowski, M., Scheen, A., & Gaal, L. (1996). Usefulness of Fluoxetine in Obese Non-Insulin-Dependent Diabetics: A Multicenter Study. *Obesity Research*, 4(4), 391-396.

David, D. J. (2012). Mécanisme d'action des antidépresseurs: nouvelles approches. *L'Encéphale*, 38, S45-S48.

David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., ... & Artymyshyn, R. P. (2009). Neurogenesis-dependent and-independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62(4), 479-493.

De Angelis, L. (1996). Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 354(3), 379-383.

De Morais, H., de Souza, C. P., da Silva, L. M., Ferreira, D. M., Werner, M. F., Andreatini, R., & Zanoveli, J. M. (2014). Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behavioural brain research*, 258, 52-64.

Defraigne, J. O. (2005). Un mécanisme physiopathologique central a l'origine des complications du diabete?. *Revue médicale de Liege*, 60, 472-478.

Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63, 10-19.

Delattre, J., Bonnefont-Rousselot, D., Bordas-Fonfrède, M., & Jaudon, M. C. (1999). Diabète sucré et stress oxydant. *In Annales de biologie clinique*, 57(4), 437-44.

Delovitch, T. L., & Singh, B. (1997). The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*, 7, 727-738.

Detanico, B. C., Piato, Â. L., Freitas, J. J., Lhullier, F. L., Hidalgo, M. P., Caumo, W., & Elisabetsky, E. (2009). Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European journal of pharmacology*, 607(1), 121-125.

- Detka, J., Kurek, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Lasoń, W., & Budziszewska, B.** (2013). Neuroendocrine link between stress, depression and diabetes. *Pharmacological Reports*, 65(6), 1591-1600.
- Detke, M. J., & Lucki, I.** (1995). Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: The effects of water depth. *Behavioural Brain Research*, 73, 43-46.
- Drouin P., Blicke J.F., Charbonnel B., Eschwege E., Guillausseau P.J., Plouin P.F.** (1999). Diagnostic et classification du diabète Sucré: Les Nouveaux critères. *Diabete & Metabolism*, 25, 72-83.
- Eison, A. S., Freeman, R. P., Guss, V. B., Mullins, U. L., & Wright, R. N.** (1995). Melatonin agonists modulate 5-HT_{2A} receptor-mediated neurotransmission: behavioral and biochemical studies in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(1), 304-308.
- El Hage, C.** (2012). L'anxiété liée au sevrage à la cocaïne: étude comportementale et neuroanatomique. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I. p 49.
- Elbe, H., Vardi, N., Esrefoglu, M., Ates, B., Yologlu, S., & Taskapan, C.** (2015). Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats. *Human & experimental toxicology*, 34(1), 100-113.
- Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., Gabr, S. A., Nagy, A. A., & Abdel-Sattar, E.** (2015). Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 3(1), 37-44.
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., & Lenzen, S.** (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*, 43, 1528-1533.
- Erenmemisoglu A, Ozdogan UK, Saraymen R, Tutus A.** (1999). Effect of Some Antidepressants on Glycaemia and Insulin Levels of Normoglycaemic and Alloxan-induced Hyperglycaemic Mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 741-743.
- Erman, H., Guner, I., Yaman, M. O., Uzun, D. D., Gelisgen, R., Aksu, U., ... & Uzun, H.** (2015). The effects of fluoxetine on circulating oxidative damage parameters in rats exposed to aortic ischemia–reperfusion. *European journal of pharmacology*, 749, 56-61.

- Etuk, E. U.** (2010). Animal models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(2), 130-134.
- Facciolá, G., Hidestrand, M., von Bahr, C., & Tybring, G.** (2001). Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *European journal of clinical pharmacology*, 56(12), 881-888.
- Favier, A.** (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *In Annales de biologie clinique*, 55, 9-16.
- Favier, A.** (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, (novembre-décembre) (270), 108-115.
- Finkel, T.** (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology*, 15(2), 247-254.
- Flohé, L., & Günzler, W. A.** (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 105, 114-120.
- Fossati, P., & Prencipe, L.** (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*, 28(10), 2077-2080.
- Fossati, P., Prencipe, L., & Berti, G.** (1980). Use of 3, 5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical chemistry*, 26(2), 227-231.
- Fowler, M. J.** (2008). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes*, 26(2), 77-82.
- Frère, M.** (2011). Diabète, physiopathologie et conséquences. *Kinésithérapie, la revue*, 11(118), 24-28.
- Galecki, P., Szemraj, J., Bieńkiewicz, M., Zboralski, K., & Galecka, E.** (2009). Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 24(4), 277-286.
- Gillery, P.** (2006). Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré. *In Annales de Biologie Clinique*, 64(4), 309-314.

Goldenberg, R., Punthakee Z. (2013). Définition, classification et diagnostic du diabète, du prédiabète et du syndrome métabolique. *Canadian Journal of Diabetes*, 37, 369-372.

Gorzalka, B. B., Brotto, L. A., & Hong, J. J. (1999). Corticosterone regulation of 5-HT 2A receptor-mediated behaviors: Attenuation by melatonin. *Physiology & behavior*, 67(3), 439-442.

Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.

Grigorov, I., Bogojević, D., Jovanović, S., Petrović, A., Ivanović-Matić, S., Zolotarevski, L., ... & Martinović, V. (2014). Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 70(2), 441-450.

Guardiola-Lemaitre, B. (2005). Agonistes et antagonistes des récepteurs mélatoninergiques: effets pharmacologiques et perspectives thérapeutiques. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 63(6), 385-400.

Guedri, K. (2014). Etude des perturbations neurobiologiques et comportementales chez un modèle animal gonadectomisé. Thèse de doctorat. Université Badji-Mokhtar, Annaba. p 74.

Guérin-Dubourg, A. (2014). Étude des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le diabète de type 2: identification de biomarqueurs de glycoxydation et de facteurs de risque de complications vasculaires. Thèse de doctorat (Université de la Réunion). 170 p.

Guillet, C. (2010). Implication des produits terminaux de glycation dans les complications liées au diabète. *Nutrition clinique et métabolisme*, 24(3), 109-114.

Gülseren, L., Gülseren, S., Hekimsoy, Z., & Mete, L. (2005). Comparison of fluoxetine and paroxetine in type II diabetes mellitus patients. *Archives of medical research*, 36(2), 159-165.

Gupta, D., Kurhe, Y., & Radhakrishnan, M. (2014). Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: modulation of brain serotonin system. *Physiology & behavior*, 129, 73-78.

- Ha, H., Yu, M. R., & Kim, K. H.** (1999). Melatonin and taurine reduce early glomerulopathy in diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7), 944-950.
- Habdous, M., Siest, G., Herbeth, B., Vincent-Viry, M., & Visvikis, S.** (2004). Polymorphismes des glutathion S-transférases et pathologies humaines: bilan des études épidémiologiques. *In Annales de Biologie Clinique*, 62(1), 15-24.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B.** (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Haider, S., Ahmed, S., Tabassum, S., Memon, Z., Ikram, M., & Haleem, D. J.** (2013). Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. *Acta Neurologica Belgica*, 113(1), 35-41.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P.** (2007). Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10), 628-38.
- Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H.** (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS letters*, 486(1), 10-13.
- Hardeland, R.** (2011). Melatonin and its metabolites as antinitrosating and anti-nitrating agents. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 1, 67-81.
- Haussament, T. U.** (1977). Quantitative determination of serum alkaline phosphatase. *Clinica Chimica Acta*, 35, 271-273.
- Hawkins, C. L., Brown, B. E., & Davies, M. J.** (2001). Hypochlorite- and hypobromite-mediated radical formation and its role in cell lysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 395(2), 137-145.
- Hilakivi-Clarke, L. A., Wozniak, K. M., Durcan, M. J., & Linnoila, M.** (1990). Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiology & behavior*, 48(3), 429-433.

Hill S., Gingras J., Gucciardi E. (2013). The Lived Experience of Canadian University Students with Type 1 Diabetes Mellitus. *Canadian Journal of Diabetes*, 37, 237-242.

Hink, H. U., Santanam, N., Dikalov, S., McCann, L., Nguyen, A. D., Parthasarathy, S., ... & Fukai, T. (2002). Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(9), 1402-1408.

Hirsch-Rodriguez, E., Imbesi, M., Manev, R., Uz, T., & Manev, H. (2007). The pattern of melatonin receptor expression in the brain may influence antidepressant treatment. *Medical hypotheses*, 69(1), 120-124.

Ho, N., Sommers, M. S., & Lucki, I. (2013). Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: links to cognition and depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1346-1362.

Hosseini, A., Mollazadeh, H., Amiri, M. S., Sadeghnia, H. R., & Ghorbani, A. (2017). Effects of a standardized extract of Rheum turkestanicum Janischew root on diabetic changes in the kidney, liver and heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 605-611.

Hudson, B. I., Wendt, T., Bucciarelli, L. G., Rong, L. L., Naka, Y., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2005). Diabetic vascular disease: it's all the RAGE. *Antioxidants & redox signaling*, 7(11-12), 1588-1600.

Imbesi, M., Uz, T., Yildiz, S., Arslan, A. D., & Manev, H. (2006). Drug-and region-specific effects of protracted antidepressant and cocaine treatment on the content of melatonin MT1 and MT2 receptor mRNA in the mouse brain. *International journal of neuroprotection and neuroregeneration*, 2(3), 185.

Jacobson, A. M., Braffett, B. H., Cleary, P. A., Gubitosi-Klug, R. A., Larkin, M. E., & DCCT/EDIC Research Group. (2013). The long-term effects of type 1 diabetes treatment and complications on health-related quality of life. *Diabetes care*, 36(10), 3131-3138.

Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 53(S3), S26-S38.

-
- **Jiang, T., Chang, Q., Cai, J., Fan, J., Zhang, X., & Xu, G.** (2016). Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 1-10.
- Jones, R. D., Hancock, J. T., & Morice, A. H.** (2000). NADPH oxidase: a universal oxygen sensor?. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(5), 416-424.
- Kahya, M. C., Naziroğlu, M., & Çiğ, B.** (2015). Melatonin and selenium reduce plasma cytokine and brain oxidative stress levels in diabetic rats. *Brain injury*, 29(12), 1490-1496.
- Kamalakkannan, N., & Prince, P. S. M.** (2006). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 98(1), 97-103.
- Kamei, J., Miyata, S., Morita, K., Saitoh, A., & Takeda, H.** (2003). Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(2), 247-254.
- Kanter, M., Uysal, H., Karaca, T., & Sagmanligil, H. O.** (2006). Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic β -cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Archives of toxicology*, 80 (6), 362-369.
- Kaplan, L.A.** (1984). Glucose. The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. *Clinical Chemistry*, 1032-1036.
- Knight, J. A.** (2000). Review: free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(2), 145-158.
- Korczak, D. J., Pereira, S., Koulajian, K., Matejcek, A., & Giacca, A.** (2011). Type 1 diabetes mellitus and major depressive disorder: evidence for a biological link. *Diabetologia*, 54(10), 2483-2493.
- Krötz, F., Sohn, H. Y., & Pohl, U.** (2004). Reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(11), 1988-1996.

Lamprecht, M., Greilberger, J., & Oettl, K. (2004). Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *Nutrition*, 20(7), 728-730.

Lange, G. (2004). L'âge moyen de découverte du diabète de type 2 diffère significativement selon la catégorie sociale. Thèse de doctorat (Université Paris 7- Denis Diderot). 62 p.

Larsen, K. (1972). *Clinica Chimica Acta*, 41, 209-217 .

Lecerf, J. M. (2000). Lipides et diabète : comprendre, interpréter et traiter une dyslipidémie chez un diabétique De la physiologie à la physiopathologie. Act Med Int.- Métabolismes-Hormones-Nutrition, 4 (2), 63-68.

Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226.

Lenzen, S., & Panten, U. (1988). Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia*, 31, 337-342.

Leon, J., Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2005). Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of Pineal Research*, 38, 1-9.

Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587-2587.

Li, Y. F., Liu, Y. Q., Huang, W. C., & Luo, Z. P. (2003). Cytoprotective effect is one of common action pathways for antidepressants. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(10), 996-1000.

Lobato, K. R., Cardoso, C. C., Binfaré, R. W., Budni, J., Wagner, C. L., Brocardo, P. S., ... & Dafré, A. L. (2010). α -Tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. *Behavioural brain research*, 209(2), 249-259.

Lokrou, A., Taki, N. R., & Abodo, J. (2010). Syndrome hyperglycémique hyperosmolaire de diagnostic précoce: présentation et pronostic d'une série observée en Côte-d'Ivoire:

Hyperosmolar hyperglycemic syndrome of early diagnosis: Presentation and prognosis of a series from Ivory Coast. *Médecine des maladies Métaboliques*, 4(1), 83-87.

Luscher, B., Shen, Q., & Sahir, N. (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 16, 383-406.

Lustman, P. J., Freedland, K. E., Griffith, L. S., & Clouse, R. E. (2000). Fluoxetine for depression in diabetes: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes care*, 23(5), 618-623.

Lutz, J. D., Vanden Brink, B. M., Babu, N. K., Nelson, W. L., Kunze, K. L., & Isoherranen, N. (2013). Stereoselective inhibition of CYP2C19 and CYP3A4 by fluoxetine and its metabolite: implications for risk assessment of multiple time-dependent inhibitor systems. *Drug Metabolism and Disposition*, 113, 2056-2065.

Macmillan-Crow, L. A., & Cruthirds, D. L. (2001). Manganese superoxide dismutase in disease. *Free radical research*, 34(4), 325-336.

Madianov, I. V., Balabolkin, M. I., Markov, D. S., & Markova, T. N. (1999). Main causes of hyperuricemia in diabetes mellitus. *Terapevticheskii arkhiv*, 72(2), 55-58.

Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (2000). Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11056-11061.

Mahesh, T., & Menon, V. P. (2004). Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy research*, 18(2), 123-127.

Mahmoud, A.M., A.S.E.L. Mohandes, G. Sharara & R. Mahana. (2005). Comparative Study of the Effects of Melatonin and Vitamin E on Serum Insulin Level and Lipid Profile in Normal and Diabetic Rats. *Journal of the Medical Research Institute*, 26: 24-29.

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 (Université européenne de Bretagne). 233p.

Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Iyengar, S., Ball, S. G., & Russell, J. (2007).

Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *International journal of clinical practice*, 61(12), 2030-2040.

Mantovani, M., Pértile, R., Calixto, J. B., Santos, A. R., & Rodrigues, A. L. S. (2003). Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neuroscience letters*, 343(1), 1-4.

Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. 3. (2003). Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(5), 288-294.

Martin, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., Acuña-Castroviejo, D. (2000). Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in *t*-butylhydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB*, 14, 1677-1679.

Masiello, P. (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(5), 873-893.

Mathes, A. M. (2010). Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. A review. *World J Gastroenterol*, 16, 6087-6097.

Matough, F. A., Budin, S. B., Hamid, Z. A., Alwahaibi, N., & Mohamed, J. (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 12(1), 5.

Mayo, J. C., Sainz, R. M., Tan, D. X., Hardeland, R., Leon, J., Rodriguez, C., & Reiter, R. J. (2005). Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*, 165(1), 139-149.

McIntyre, R. S., Soczynska, J. K., Konarski, J. Z., & Kennedy, S. H. (2006). The effect of antidepressants on glucose homeostasis and insulin sensitivity: synthesis and mechanisms. *Expert opinion on drug safety*, 5(1), 157-168.

Mendez-David, I., Hen, R., Gardier, A. M., & David, D. J. (2013, May). Adult hippocampal neurogenesis: an actor in the antidepressant-like action. *In Annales pharmaceutiques françaises*, 71, 143-149.

- Ménard, C.** (2011). Mélatonine agoniste mélatoninergiques et luminothérapie dans les troubles du sommeil et du décalage horaire. Thèse de doctorat (université de Nantes). p 11.
- Micale, V., Arezzi, A., Rampello, L., & Drago, F.** (2006). Melatonin affects the immobility time of rats in the forced swim test: the role of serotonin neurotransmission. *European Neuropsychopharmacology*, 16(7), 538-545.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., & Thérond, P.** (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. *In Annales de Biologie Clinique*, 66(6), 605-620.
- Michel, R.** (2001). Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25(2), 91-93.
- Millan, M. J.** (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology*, 70(2), 83-244.
- Molinari, E. J., North, P. C., & Dubocovich, M. L.** (1996). 2-[125I] iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *European journal of pharmacology*, 301(1-3), 159-168.
- Molven, A., Ringdal, M., Nordbø, A. M., Ræder, H., Støy, J., Lipkind, G. M., ... & Undlien, D. E.** (2008). Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes*, 57(4), 1131-1135.
- Monnet, F. P.** (2002). Melatonin modulates [3H] serotonin release in the rat hippocampus: effects of circadian rhythm. *Journal of neuroendocrinology*, 14(3), 194-199.
- Montilla, P. L., Vargas, J. F., Túnez, I. F., Carmen, M., Agueda, M., Valdelvira, M., & Cabrera, E. S.** (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *Journal of pineal research*, 25(2), 94-100.
- Morel, Y., & Barouki, R.** (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Science*, 14, 713-721.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D. B., Budni, J., de Freitas, A. E., ... & Rodrigues, A. L. S.** (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses

depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of psychiatric research*, 46(3), 331-340.

Meyer, J. H., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A., ... & Houle, S. (2006). Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Archives of general psychiatry*, 63(11), 1209-1216.

Nauseef, W. M. (2014). Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 757-767.

Nieuwstraten, C., Labiris, N. R., & Holbrook, A. (2006). Systematic overview of drug interactions with antidepressant medications. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 51(5), 300-316.

Niki, E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 3-12.

Ninan, I. (2014). Synaptic regulation of affective behaviors; role of BDNF. *Neuropharmacology*, 76, 684-695.

Nitta, A., Murai, R., Suzuki, N., Ito, H., Nomoto, H., Katoh, G., ... & Furukawa, S. (2002). Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicology and teratology*, 24(5), 695-701.

Ochoa-Sanchez, R., Rainer, Q., Comai, S., Spadoni, G., Bedini, A., Rivara, S., ... & Gobbi, G. (2012). Anxiolytic effects of the melatonin MT 2 receptor partial agonist UCM765: Comparison with melatonin and diazepam. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 318-325.

Okada, M., Matsui, H., Ito, Y., Fujiwara, A., & Inano, K. (1998). Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: a new superior method. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 132(3), 195-201.

Omary, N., Labrousse, F., Bekkouche, F. H., & Akli, Y. D. A. (2011). Influence de la

streptozotocine sur l'axe corticotrope du rat Wistar (*Rattus norvegicus*). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80, 907-938.

Onk, D., Onk, O. A., Turkmen, K., Erol, H. S., Ayazoglu, T. A., Keles, O. N., ... & Topal, E. (2016). Melatonin attenuates contrast-induced nephropathy in diabetic rats: the role of interleukin-33 and oxidative stress. *Mediators of inflammation*, 2016, 1-10.

Ozkol, H., Tuluçe, Y., Dilsiz, N., & Koyuncu, I. (2013). Therapeutic potential of some plant extracts used in Turkish traditional medicine on streptozocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *The Journal of membrane biology*, 246(1), 47-55.

Page, M. E., Detke, M. J., Dalvi, A., Kirby, L. G., & Lucki, I. (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*, 147(2), 162-167.

Palsamy, P., & Subramanian, S. (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(9), 598-605.

Papp, M., Litwa, E., Gruca, P., & Mocaër, E. (2006). Anxiolytic-like activity of agomelatine and melatonin in three animal models of anxiety. *Behavioural pharmacology*, 17(1), 9-18.

Parisa, S., Somayeh, R., & Sedigheh, F. (2007). Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*. Effect on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacological Research*, 56, 261-266.

Passaro, A., Dalla Nora, E., Morieri, M. L., Soavi, C., Sanz, J. M., Zurlo, A., ... & Zuliani, G. (2014). Brain-derived neurotrophic factor plasma levels: relationship with dementia and diabetes in the elderly population. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(3), 294-302.

Perlmutter, D. (2014). *Grain Brain: The Surprising Truth about Wheat, Carbs, and Sugar - Your Brain's Silent Killers*. Yellow kite. ISBN: 9781444791921. 336 p.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.

- Poisson, C.** (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de doctorat (Université de Paris-Sud 11). 414 p.
- Porsolt, R.D, LePichon, M., Jalfre, M.** (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732.
- Puntarulo, S., & Cederbaum, A. I.** (1998). Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(7), 1324-1330.
- Reagan, L. P., MAGARIÑOS, A., & McEWEN, B. S.** (1999). Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 126-137.
- Raccach, D.** (2004). Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*, 1(1), 29-42.
- Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M.** (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 78, 13-31.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., & Abdollahi, M.** (2005). A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59(7), 365-373.
- Raghavendra, V., Kaur, G., & Kulkarni, S. K.** (2000). Anti-depressant action of melatonin in chronic forced swimming-induced behavioral despair in mice, role of peripheral benzodiazepine receptor modulation. *European Neuropsychopharmacology*, 10(6), 473-481.
- Ramanathan, M., Jaiswal, A. K., & Bhattacharya, S. K.** (1998). Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacology*, 135(4), 361-367.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Leon, J., Kilic, Ü., & Kilic, E.** (2005). When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Experimental biology and medicine*, 230(2), 104-117.

- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., & Qi, W.** (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell biochemistry and biophysics*, 34(2), 237-256.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Flores, L. J., & Czarnocki, Z.** (2007). Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*, 54(1), 1-9.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Ebisawa, T.** (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13(5), 1177-1185.
- Resmini, E., Minuto, F., Colao, A., & Ferone, D.** (2009). Secondary diabetes associated with principal endocrinopathies: the impact of new treatment modalities. *Acta diabetologica*, 46(2), 85-95.
- Retem, C., Bairi, A., Attalah, S., Siaud, P., & Tahraoui, A.** (2013). Study On Adaptive Capacity And Behavioral Stress Of Separation (Mother-Juvenile) In Rats Wistar. *Sciences & Technologie C*, (37), 9-15.
- Richard, M. J., Belleville, F., Chalas, J., Ceballos-Picot, I., Vitoux, D., Boyer, M. J., ... & Favier, A.** (1997). Les glutathion peroxydases: intérêt de leur dosage en biologie clinique. *In Annales de biologie clinique*, 55(3), 195-208.
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., & Reiter, R. J.** (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, 36(1), 1-9.
- Ross, R.** (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New England journal of medicine*, 340(2), 115-126.
- Rebai, R., Boudah, A.** (2016). International journal of toxicological and pharamacological research,(8)4, 232-2036.
- Rossi, F., Bellavite, P., Berton, G., Grzeskowiak, M., & Papini, E.** (1985). Mechanism of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process. *Pathology-Research and Practice*, 180(2), 136-142.
- Rosso, P., De Nicolò, S., Carito, V., Fiore, M., Iannitelli, A., Moreno, S., & Tirassa, P.** (2017). Ocular Nerve Growth Factor Administration Modulates Brain-derived Neurotrophic

Factor Signaling in Prefrontal Cortex of Healthy and Diabetic Rats. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 1-11.

Sager, J. E., Lutz, J. D., Foti, R. S., Davis, C., Kunze, K. L., & Isoherranen, N. (2014). Fluoxetine and norfluoxetine mediated complex drug-drug interactions: in vitro to in vivo correlation of effects on CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A4. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 95(6), 653-662.

Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., & Samini, F. (2014). Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus. *BioMed research international*, 2014, 1-13.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., ... & Belzung, C. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *science*, 301(5634), 805-809.

Sapolsky, R. M. (2001). Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12320-12322.

Sawadogo, S. (2014). Etude rétrospective d'une cohorte de diabétiques maliens à partir des registres de consultations ambulatoires remplis du 01 janvier 2012 au 31 mars 2013 dans 15 structures de santé. Thèse de doctorat. Université des Sciences, des Techniques et des Technologiques de Bamako. 66 p.

Shirwaikar, A., Rajendran, K., Kumar, C. D., & Bodla, R. (2004). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin–nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 171-175.

Saï, P., & Gouin, E. (1997). Modèles animaux spontanés de diabète insulino-dépendant (diabète de type1). *Veterinary Research, BioMed Central*, 28(3), 223-229.

Schmidt, A. J., Heiser, P., Hemmeter, U. M., Krieg, J. C., & Vedder, H. (2008). Effects of antidepressants on mRNA levels of antioxidant enzymes in human monocytic U-937 cells. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(6), 1567-1573.

-
- Schloesser, R. J., Martinowich, K., & Manji, H. K.** (2012). Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends in neurosciences*, 35(1), 36-46.
- Sennequier, N., & Vadon-Le Goff, S.** (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle. *MS. Médecine sciences*, 14(11), 1185-1195.
- Shaker, M. E., Houssen, M. E., Abo-Hashem, E. M., & Ibrahim, T. M.** (2009). Comparison of vitamin E, L-carnitine and melatonin in ameliorating carbon tetrachloride and diabetes induced hepatic oxidative stress. *Journal of physiology and biochemistry*, 65(3), 225-233.
- Sima, A. A., Kamiya, H., & Li, Z. G.** (2004). Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *European journal of pharmacology*, 490(1), 187-197.
- Spiga, F., Waite, E. J., Liu, Y., Kershaw, Y. M., Aguilera, G., & Lightman, S. L.** (2011). ACTH-dependent ultradian rhythm of corticosterone secretion. *Endocrinology*, 152(4), 1448-1457.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L.** (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, 25, 207-218.
- Steinbrenner, H., & Sies, H.** (2009). Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(11), 1478-1485.
- Stranahan, A. M., Arumugam, T. V., Cutler, R. G., Lee, K., Egan, J. M., & Mattson, M. P.** (2008). Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nature neuroscience*, 11(3), 309-317.
- Szkudelski, T.** (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537-546.
- Szkudelski, T., Kandulska, K., & Okulicz, M.** (1998). Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiological research*, 47: 343-346.
- TA, S.** (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37, S81-S90.

- Tan, D. X., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M. T., El-Sawi, M., Sainz, R. M., ... & Hardeland, R.** (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(2), 181-197.
- Tabner, B. J., Turnbull, S., El-Agnaf, O. M., & Allsop, D.** (2002). Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A β and α -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1076-1083.
- Tengattini, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Rodella, L. F., & Rezzani, R.** (2008). Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *Journal of pineal research*, 44(1), 16-25.
- Tenoutasse, S., Mouraux, T., & Dorchy, H.** (2010). L'acidocétose diabétique: diagnostic, prise en charge, prévention. *Revue Médicale de Bruxelles*, 31, 71-76.
- Thakur, A. K., Rai, G., Chatterjee, S. S., & Kumar, V.** (2016). Beneficial effects of an *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on cognitive functions in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical biology*, 54(9), 1528-1538.
- Tian, X., Liu, Y., Ren, G., Yin, L., Liang, X., Geng, T., ... & An, R.** (2016). Resveratrol limits diabetes-associated cognitive decline in rats by preventing oxidative stress and inflammation and modulating hippocampal structural synaptic plasticity. *Brain Research*, 1650, 1-9.
- Trinder, P.** (1969). *Annals of Clinical Biochemistry*, 6, 27-29.
- Trinder, P.** (1969). *Annals of Clinical Biochemistry*, 6, 24-33.
- Tuzcu, M., & Baydas, G.** (2006). Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *European journal of pharmacology*, 537(1), 106-110.
- Vakkuri, O., Leppäluoto, J., & Vuolteenaho, O.** (1984). Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. *Acta Endocrinologica*, 106(2), 152-157.

- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S.** (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, 10(14), 1677-1694.
- Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, S. O., & Aksoy, N.** (2001). Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *Journal of pineal research*, 31(3), 193-198.
- Wayhs, C. A. Y., Manfredini, V., Sitta, A., Deon, M., Ribas, G., Vanzin, C., ... & Vargas, C. R.** (2010). Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. *Metabolic brain disease*, 25(3), 297-304.
- Widmaier, J., Margenthaler J., & Sarel, I.** (1995). Regulation of pituitary-adrenocortical activity by free fatty acids in vivo and in vitro. *Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids*, 52, 179-183.
- Winiarska, K., Fraczyk, T., Malinska, D., Drozak, J., & Bryla, J.** (2006). Melatonin mitigates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *Journal of pineal research*, 40,168-176.
- Wong, D. T., Bymaster, F. P., & Engleman, E. A.** (1995). Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life sciences*, 57(5), 411-441.
- Ye, Z., Chen, L., Yang, Z., Li, Q., Huang, Y., He, M., ... & Hu, J.** (2011). Metabolic effects of fluoxetine in adults with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *PLoS One*, 6(7), e21551.
- Young, I. M., Leone, R. M., Francis, P., Stovell, P., & Silman, R. E.** (1985). Melatonin is metabolized to JV-acetyl serotonin and 6-hydroxymelatonin in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 60(1), 114-119.
- Zafir, A., & Banu, N.** (2007). Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. *European Journal of Pharmacology*, 572(1), 23-31.
- Zang, L.Y., Cosma, G., Gardner, H., Vallynathan, V.** (1998). Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425, 469-477.

Zghal-Mokni, I., Arfa, I., Elloumi-Zghal, H., Abid, A., Amrouche-Rached, C., Kaabi, B., ... & Jeddi, A. (2005). Étude de l'association entre la rétinopathie diabétique et un polymorphisme du gène de l'aldose réductase dans la population tunisienne. *Journal français d'ophtalmologie*, 28(4), 386-390.

Zhang, X., Liang, W., Mao, Y., Li, H., Yang, Y., & Tan, H. (2009). Hepatic glucokinase activity is the primary defect in alloxan-induced diabetes of mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63(3): 180-186.

Annexes

1. Paramètres sanguins

1.1. Détermination de la glycémie

- Réactifs:

Glucose Etalon	Glucose aqueux (standard)	100 mg/dl
Enzyme (R1)	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/l
	4-Aminophénazone (4-AP)	2.6 mmol/l
	Peroxydase (POD)	1000 U/l
Tampon (R2)	Phénol	0.3 mmol/l
	Tris pH 7.4	92 mmol/l

- Mode opératoire:

- Mélanger et incuber pendant 10 minutes à 37°C ou 20 minutes à température ambiante (15-25°C).
- Lire l'absorbance (A) de l'Étalon et l'échantillon contre le Blanc du réactif. La couleur est stable au moins 30 minutes.

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	--	10	--
Échantillon (µl)	--	--	10

- Calcul de concentration:

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Échantillon}}{(A) \text{ Étalon}} \times 100 \text{ (Concentration. Étalon).}$$

1.2. Dosage du cholestérol total

- Réactifs:

Réactif1	Phosphate	100 mmol/l
Tampons	Chloro-4-phénol	5 mmol/l
	Sodium chlorate	2,3 mmol/l

	Triton x100	1,5 ml/l
Réactif 3 Etalon	Cholestérol	200 mg/dl
Réactif 2 Enzymes	Cholestérol estérase (CHE)	170 U/l
	Cholestérol oxydase (CO)	100 U/L
	Peroxydase (POD)	1200 U/L
	4-amino-antipyrine (PAP)	0,25 mmol/L
	PEG 6000	167µmol/L

- Mode opératoire:

- Verser le contenu de flacon R2 (enzymes) dans le flacon R1(tampon).
- Mélanger doucement et attendre la dissolution complète (2 minutes).
- Ramener les réactifs et les échantillons à température ambiante.

	Blanc	Echantillon	Etalon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Echantillon (µl)	--	10	--
Etalon (µl)	--	--	10
Eau déminéralisée (µl)	--	10	--

- Mélanger et incuber 10 min à température ambiante ou 5 minutes à 37°C.
- Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 500 nm. La couleur est stable pendant 60 minutes.
- Calcule de la concentration :

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration de l'étalon).}$$

1.3. Dosage des triglycérides

- Réactifs:

Etalon	Glycérol	2,28mmol/l
	Triglycérides	200mg/dl
Tampon	PIPES	100 mmol/l
	Chlorure de magnésium	9,8 mmol/l
	Chloro-4-phénol	3,5 mmol/l
Enzymes	Lipoprotéïnlipase	1000 U/l
	Glycérol kinase (GK)	600 U/l
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	3000 U/l
	Peroxydase (POD)	1700 U/l
	4-amino-antipyrine (4-AP)	0,1 mM/l
	ATP	1,3 mmol/l

- Mode opératoire:

- Verser le contenu de flacon R2 (enzymes) dans le flacon R1(tampon).
- Agiter doucement et attendre la dissolution complète (2 minutes).

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Eau déminéralisée	10 µl	-	-
Etalon	-	10 µl	
Echantillon			10 µl

- Mélanger et incuber 10 min à température ambiante ou 5 minutes à 37°C.
- Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc réactif à 500 nm. La couleur est stable pendant 60 minutes.
- Calcule de la concentration:

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Echantillon}}{\text{(A) Etalon}} = \times 200 \text{ (Concentration de l'étalon)}$$

1.4. Dosage du cholestérol-LDL

- Réactifs:

Réactif 1	GOOD pH 7.0 (20°C	50 mmol/l
Enzymes	Cholestérol estérase (CHE)	380U/l
	Cholestérol oxydase (CHOD)	380 U/l
	Catalase	400 U/ml
	N- (2-hydroxy-3sulfofopropyl)-3,5-dimethoxyaniline (TODS)	0,45 mmol/l
Réactif2	GOOD PH 7.04	50 mmol/l
Enzymes	4- amino-antipyrine (4-AA)	1,00 mmol/l
	Peroxydase (POD)	1000 U/l
Réactif3	C-HDL/C-LDL sérum lyophilisé	
Etalon		

- Mode opératoire:

- Les réactifs R1 et R2 sont prêts a l'emploi.

- Reconstituer le flacon de l'étalon par 1 ml d'eau distillée, puis homogénéiser le contenu du flacon doucement et attendre 30 minutes avant l'utilisation.

-Ajuster le zéro de l'appareil avec l'eau distillée.

	Blanc	Echantillon	Standard
R 1 (µl)	300	300	300
Standard	-	-	4
Échantillon (µl)	-	4	-

	Blanc	Echantillon	Standard
R 2 (µl)	100	100	100

-Bien mélanger, laisser reposer 5 minutes à 37°C et enregistrer les absorbances (A) contre le blanc réactif.

$$\text{Cholestérol-LDL (md/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \text{ (Concentration de l'étalon).}$$

1.5. Dosage du cholestérol-HDL

- Réactifs:

Réactif précipitant (R)	Chlorure de magnésium (MgCl ₂ 6H ₂ O)	490 mmol/l
	Acide de phosphotungstate	13,9 mmol/l
Étalon	Réactif du cholestérol Enzymatique	200 mg/dl

- Mode opératoire:

- Précipitation: diluer les sérums dans une solution de NaCl 9 g/l,

- Sérum (500 µl)+ Réactif précipitant (50 µl).

- Mélanger, attendre 10 min et centrifuger durant 15 min à 5000 t/min.

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Enzyme			
Eau distillée	10 µl	-	-
Etalon	-	10 µl	
Echantillon			10 µl

- Mélanger, incuber 5 min à 37°C.
- Ajuster le zéro de l'appareil par le blanc réactif et lire l'absorbance à 500 nm.
- Calcul de la concentration:

$$\text{Cholestérol-HDL (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Echantillon}}{\text{(A) Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration de l'étalon)}$$

1.6. Dosage de l'acide urique

- Réactifs:

	Phosphate pH 7,4	50 mmol/l
Réactif 1		
Tampons	2-4 dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mmol/l
Réactif 2	Uricase	60 U/l
Enzymes	Peroxydase (POD)	660 U/l
	Ascorbate oxydase	200 U/L
	4 - Aminophénazone(4-AF)	1 mmol/l
Acide urique (Etalon)	Étalon primaire aqueux d'Acide urique	6 mg/dl 35,7 mmol/l

- Mode opératoire:

- Réactif de travail (RT): Dissoudre le contenu d'enzymes de R 2 dans un peu de tampon R 1.
- Fermer et mélanger doucement jusqu'à dissoudre le contenu. Le contenu est stable pendant 1 mois au réfrigérateur (2-8°C) ou 10 jours à température ambiante.

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail(ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µL)	--	25	--
Échantillon (µL)	--	--	25

- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et des échantillons contre le blanc à 520 nm et mélange et incubation 10 minutes à 15-25°C.

-Calcule de la concentration:

La concentration de l'acide urique est calculée par la formule suivante:

$$\text{Acide urique (mmol/l)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 35,7 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

1.7. Détermination de l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

- Réactifs:

Réactif1 Tampon	TRIS pH 7,8	80 mmol/l
	L-Aspartate	200 mmol/l
Réactif 2	NADH	0,18 mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/l
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/l
Substrat	α-cétoglutarate	12 mmol/l

- Mode opératoire:

- Dissoudre le contenu de R2 dans le tampon R1.
- Refermer et mélanger doucement, jusqu'à ce que le contenu soit totalement dissout.

Réactif de travail (ml)	1,0
Echantillon (μL)	100

-Mélanger et incuber pendant 1 minute

- Lire l'absorbation (A) initiale de l'échantillon à 340 nm et mettre en route le chronomètre et lire l'absorbation à chaque minute pendant 3 minutes.

- Mesure de l'activité catalytique de l'ASAT

$$\text{L'activité de l'ASAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

1.8. Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT)

- Réactifs:

Tampon Réactif 1	L-Alanine	500 mmol/l
	TRIS pH 7,8	100 mmol/l
Substrat Réactif 2	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/l
	α-cétoglutarate	15 mmol/l
	NADH	0,18 mmol/l

- Mode opératoire:

- Dissoudre le contenu de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8°C ou 24 heures à 20-25°C.

Echantillon (ml)	100
Réactif de travail (ml)	1,0

- Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.

- Mélanger et incuber 1 minute. Mesurer la diminution de la densité optique de l'échantillon à 340 nm. par minute pendant 1 à 3 minutes.

- Mesure de l'activité catalytique de l'ALAT:

$$\text{Activité de l'ALAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

1.9. Détermination de l'activité de la PAL

- Réactifs:

Réactif1	Tampon diéthanolamine (pH 9.8)	1mmol/l
	Chlorure de magnésium	0,5 mmol/l
Réactif2	Nitro-4-phénylphosphate	10 mmol/l

- Mode opératoire:

- Dissoudre le contenu de R2 dans le tampon R1.

- Mélanger doucement jusqu'à dissoudre le contenu. Le réactif de travail est stable 5 jour à (15-25°C) et 15 jours à (2-8°C).

Echantillon (µl)	20
Réactif de travail (ml)	1,0

- Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.

- Mélanger et incuber 1 minute. Mesurer l'augmentation moyenne de la D.O de l'échantillon à 405 nm. par minute pendant 1 à 3 minutes.

- Mesure de l'activité catalytique de la PAL:

$$\text{Activité de la PAL (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 2750$$

1.10. Dosage de la créatinine

- Réactifs:

Réactif 1: Réactif picrique	Acide picrique	17,5 mmol/l
Réactif 2: Réactif alcalin	Hydroxyde de sodium	1,6 mmol/l
Etalon	Créatinine aqueuse	2 mg/dL

- Mode opératoire:

- Mélanger à parts égales un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2. Le réactif du travail est stable pendant 1 mois à 20-25°C.

Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µ.L)	--	100	--
Echantillon (µ.L)	--	--	100

-Mélanger puis lire à 492 nm la densité optique (A1) après 30secondes et la deuxième (A2) après exactement 60 secondes.

-Calcule de concentration:

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{(\Delta A) \text{ Echantillon} - (\Delta A) \text{ Blanc}}{(\Delta A) \text{ Etalon} - (\Delta A) \text{ Blanc}} \times 2 \text{ (Concentration de l'étalon)}$$

(ΔA) = A2-A1

2. Dosage des paramètres du stress oxydatif au niveau tissulaire

2.1. Détermination du glutathion réduit (GSH) (Ellman, 1959)

- Mode opératoire:

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- Rajouter 0.2 ml de la solution d'acide sulfosalicylique (0.25%) et laisser le tout dans un bain de glace durant 15 min.

- Centrifuger à 1000 tours/min durant 15 min.
- Récupérer 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0,02M d'EDTA, pH 9.6).
- Additionner 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M.
- Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc (réactif).

- Calcul de concentration:

La concentration du GSH exprimée en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot).

$$\text{GSH (nmol/mg protéine)} = \frac{\text{DO} \times \text{L} \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protéines}}$$

- 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant.
- L : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat, 0.2 ml d'acide sulfosalicylique..)
- DO : Densité optique.
- 0.5 : Volume du surnageant.
- 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.
- 0.8 : Volume de l'homogénat.

2.2. Dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST)

- Mode opératoire:

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
GSH (0.1 M)	100	100
Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4)	850	830
CDNB (0.02 M)	50	50
Homogénat	-	20

- Calcul de l'activité de GST:

L'activité catalytique de GST est exprimée en nanomoles de CDNB par minute par milligramme de protéines (nmol CDNB/min/mg prot).

$$\text{GST (nmol CDNB/min/mg prot)} = \frac{\Delta \text{ DO échantillon} - \Delta \text{ DO Blanc}}{\epsilon \times L \times \text{mg prot}}$$

- $\Delta \text{ DO échantillon} - \Delta \text{ DO blanc}$: moyenne des DO des échantillons par minute - moyenne des DO des Blancs par minute.
- L : Trajet optique de la cuve = 1cm.
- ϵ : Coefficient d'extinction moléculaire du CDNB ($9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.3. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

- Mode opératoire:
 - Prélever 0.2 ml de l'homogénat.
 - Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
 - Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
 - Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
 - Ajouter 0.2mL de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10minutes.
 - Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
 - Ajouter 0.2 ml de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
 - Ajouter 1 ml de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
 - Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
 - Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes
 - Prélever 0,48 ml du surnageant.
 - Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
 - Ajouter 0,32 ml de DTNB (1 mM).

- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

- Calcul de l'activité de la GSH-Px :

L'activité de la GSH-Px exprimé en nanomoles de GSH oxydé par milligramme de protéines (nmol GSH/mg prot).

$$\text{GPx (nmol GSH/mg prot)} = \frac{\text{X (nmol de GSH réduit)} \times 5}{\text{mg prot}}$$

$$\text{X} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}}{\text{DO étalon}}$$

2.4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

- Mode opératoire:

Réactifs	Blanc (μ.L)	Essai (μL)
H ₂ O ₂ (0,5 M)	200	200
Tampon phosphate (0,1 M) pH 7,5	800	780
Surnageant (S9)	-	20

- Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.

- La lecture de l'absorbance est réalisée après chaque 15 secondes pendant 1 minute de mesure.

- Calcul de l'activité enzymatique (CAT):

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en micromoles de H₂O₂ par minute par milligramme de protéines.

$$\text{CAT (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{/min/mg protéines)} = \frac{\Delta\text{DO} \times d}{\epsilon \times L \times X \times Fd}$$

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes.
- d: Dilution de l'échantillon.
- ϵ : Coefficient d'extinction du H_2O_2 (0,04 mM⁻¹.Cm⁻¹).
- L : Trajet optique (la cuve) (1 cm).
- X : Quantité des protéines en mg/ml.
- Fd : Facteur de dilution du H_2O_2 dans le tampon (0,02).

2.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

- Mode opératoire:
 - Prélevé 125 μ l de l'homogénat (surnageant).
 - Additionner 50 μ l de la solution tampon TBS.
 - Ajouter 125 μ l de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
 - Vortexer puis Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min à 4°C
 - Pipeter 200 μ l du surnageant.
 - Ajouter 40 μ l du HCl (0.6 M).
 - Adjoindre 160 μ l de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM).
 - Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 min.

- Calcul de concentration (MDA):

La concentration de MDA exprimé en nanomoles par milligramme de protéines dans l'échantillon:

$$\text{MDA (nmol/mg prot)} = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot \chi \cdot L \cdot Fd}$$

- C: Concentration de MDA en nanomoles/mg de protéine
- DO: Densité optique lue à 530 nm
- Fd: Facteur de dilution; Fd = 0,2083.
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA (1.56×10^5 M⁻¹ cm⁻¹)
- L: Longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- χ : Concentration du surnageant en protéines (mg/ml) Concentration du surnageant en protéines (mg/ml).

2.6. Dosage des protéines totales

- Mode opératoire:
 - Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
 - Adjoindre 5 ml du réactif de Bradford.
 - Agiter et laisser reposer 5 min.
 - Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc (l'eau distillée).

-Calcule de la concentration des protéines:

Une courbe d'étalonnage est préalablement tracée où la densité optique obtenue est rapportée.

Une gamme étalon d'albumine sérique

bovine (SAB) (0 → 1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions est utilisée pour comparer et déterminer la concentration des protéines.

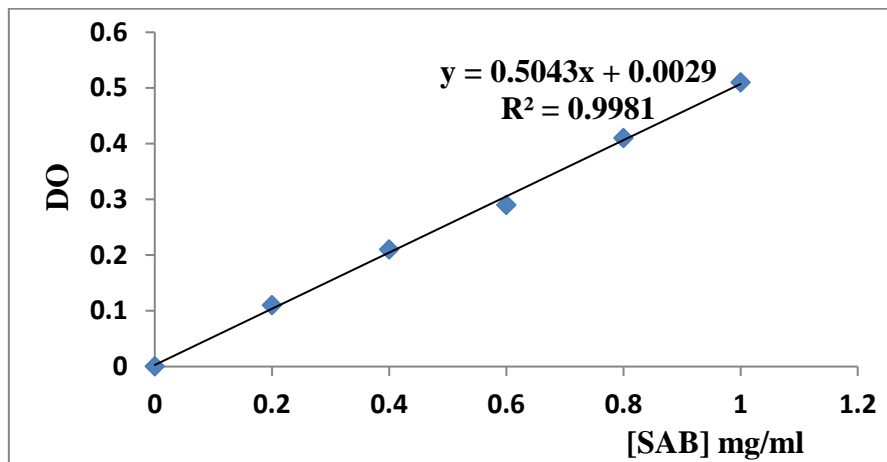


Figure: Courbe d'étalonnage pour la détermination des concentrations de protéine totale.

Nom: REBAI Prénom: Redouane	Diplôme: Doctorat de 3 ^{ème} cycle
	Date de soutenance: le 25/05/2017
Intitulé: Corrélations entre le comportement dépressif, le profil lipidique et les paramètres du stress oxydatif au cours du diabète expérimental: Effet protecteur de la mélatonine et de la fluoxétine	
<p>Résumé:</p> <p>L'hyperglycémie chronique s'accompagne d'une production excessive des radicaux libres par divers mécanismes. Ceci est un signe indicateur du stress oxydatif qui se trouve impliqué dans l'aggravation des complications chroniques liées au diabète sucré. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets bénéfiques de la mélatonine et la fluoxétine sur les désordres métaboliques induits par le diabète, ainsi que sur les paramètres du stress oxydatif qui pourrait jouer un rôle causal dans l'apparition du comportement dépressif chez les rats rendus diabétiques suite à une injection intrapéritonéale de streptozotocine (60 mg/kg). Après 72 heures, les rats rendus diabétiques ont été traités par la mélatonine et la fluoxétine pendant 4 semaines. Des tests comportementaux tels que le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM), le champ ouvert (OFT) et la nage forcée (FST), ont été réalisés au cours de la dernière semaine de traitement pour vérifier les effets antidépresseurs et anxiolytiques de ces deux drogues.</p> <p>À la fin de cette expérimentation, des prélèvements sanguins ont été effectués pour le dosage de quelques paramètres sanguins, ainsi que la détermination des marqueurs du stress oxydatif érythrocytaire et au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe.</p> <p>Nos résultats ont montré que le traitement à la mélatonine et la fluoxétine a amélioré significativement le comportement anxieux chez les rats diabétiques durant l'EPM et l'OFT, le même traitement a pu renverser le comportement dépressif dans le FST.</p> <p>Il a été noté par ailleurs que les deux traitements exercent un effet régulateur sur la glycémie et les paramètres du profil lipidique, ainsi ces deux drogues diminuent la lipoperoxydation érythrocytaire et améliorent le statut antioxydant au niveau des structures cérébrales impliquées dans la physiopathologie dépressive.</p> <p>Toutefois, l'ensemble de ces résultats montre clairement que la mélatonine est dotée d'une activité antioxydante plus puissante que celle de la fluoxétine, et ainsi elle exercerait un effet antidépresseur.</p> <p>Mots clés: Diabète sucré, Dépression, Mélatonine, Fluoxétine, Désordres métaboliques, Stress oxydatif.</p>	