



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: 71/DS/2018

N° de Série : 03/BCH/2018

Thèse

***Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Science en Biologie Cellulaire et
Moléculaire***

Option : Pharmacotoxicologie Cellulaire et Moléculaire

Intitulée

**Etude des propriétés antidiabétiques, antioxydantes et anti-
inflammatoires des extraits hydrosolubles d'*Anvillea
radiata* Coss. & Dur. sur le diabète de type 2 expérimental
induit par le régime (high fat) chez la souris C57/BL6J.**

Présenté par :

Mr. KANDOULI CHOUAIB

Soutenue le : 13/05/2018

Devant le jury :

Président :	Mme AMEDDAH S.	Professeur Univ. FMC
Directrice :	Mme MECHAKRA A.	Professeur Univ. FMC
Co-directrice:	Mme PIETRI S.	Directrice de Recherche au CNRS, Univ. Aix Marseille. France.
Examineurs :	Mr ARAR L.	Professeur Univ. Sétif 1
	Mme BENDJEDOU D.	Professeur Univ. 8 Mai Guelma

Année universitaire 2017-2018

Remerciements

Les travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés grâce à la collaboration avec le laboratoire de l'institut de Chimie Radicalaire (UMR CNRS 7273) au sein de l'équipe Sondes Moléculaires en Biologie et Stress Oxydant, Université D'AIX MARSEILLE, FRANCE.

Je tiens à remercier *Mme Mechakra Aïcha*, ma Directrice de thèse qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail et qui l'a orienté du début à la fin ainsi que pour ses conseils scientifiques, son soutien dans toutes mes démarches et sa compréhension. Merci pour avoir toujours été disponibles et pour avoir été à mon écoute, pour m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à *Mme Sylvia PIETRI* Co-directrice de thèse pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour avoir codirigé mes travaux de recherche. Je tiens à exprimer toute ma gratitude pour son encadrement de qualité et pour m'avoir accordé son confiance. Vous m'avez donné toute l'autonomie pour mes travaux, une liberté totale de réfléchir, un support extraordinaire de conseils et de matériels, toujours près de moi pour m'aider.

Mes remerciements vont aussi au Professeur *Souad Amadeh* pour avoir bien voulu présider le jury de ma thèse.

Je tiens à remercier très sincèrement le Professeur *Lakhmessi Arar* (Rapporteur et Examineur) pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Professeur **Dalila BENDJEDOU** (Rapporteur et Examinatrice) pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à remercier **Mme Anne MERCIER**, Chargée de Recherche au CNRS pour ses conseils, sa patience, sa gentillesse, son implication depuis le début de ce projet.

Je tiens à remercier **Emilie RICQUEBOURG**, pour toute l'aide et conseils qu'elle m'a apportés pour m'avoir aidé à afin de réaliser mes expériences de cytotoxicité.

Je remercie beaucoup **Mathieu cassien**, pour son support technique durant ma thèse, ses conseils scientifiques et sa sympathie, c'est très agréable de discuter avec lui.

Je remercie également toute l'équipe **SMBSO** pour leur sympathie et leur gentillesse et pour leurs conseils et leur disponibilité, en particulier **Marcel CULCASI**, Chargé de Recherche au CNRS, **Sophie Thétiot-Laurent**, Maître de Conférences à Aix-Marseille Université, **Patrick BERNASCONI**, Ingénieur d'Etudes au CNRS, **Mmes Brigitte NAOURI**, Agent Technique, ainsi que **Nicolas VIDAL**, Ingénieur et **Pierre STOCKER**, Maître de Conférences à Aix-Marseille Université.

Je remercie enfin **Mme Valérie PIQUE**, Ingénieure d'Etudes à Aix-Marseille-Université, surtout pour son aide dans la partie d'extraction.

Mes plus profonds remerciements vont à mes **parents, frères et sœurs**. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la

réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude

Enfin, mais non des moindres, tous mes remerciements à ma femme pour son soutien quotidien indéfectible, sans lequel cette thèse n'aurait jamais vu le jour, pour la rigueur et la qualité de son approche scientifique sur le terrain et surtout devant la feuille.

Je ne saurai finir sans parler de toutes ces personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Liste des abréviations	I
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	VI
Introduction générale	1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Diabète et stress oxydant	4
I. Le diabète	4
1. Définitions et généralités	4
2. Types de diabète	4
2.1. Diabète insulino-dépendant (DID)	4
2.2. Diabète non insulino-dépendant (DNID)	4
2.2.1. L'insulinorésistance (IR)	4
2.2.2. Lien physiopathologique entre insulinorésistance, obésité et diabète de type 2	5
3. Epidémiologie du diabète de type 2	6
4. Les complications du diabète	7
II. Les mécanismes toxiques de l'hyperglycémie chronique et stress oxydant	7
1. Stress oxydant	7
1.1. Les radicaux libres	8
1.2. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS)	9
1.3. Sources de radicaux libres	10
2. Systèmes de défenses antioxydants	11
2.1. Les systèmes de défenses enzymatiques.	12
2.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)	12
2.1.2. Les glutathions peroxydases	13
2.1.3. Le système thiorédoxine	13

2.1.4. La catalase	13
2.2. Les systèmes de défenses non enzymatiques	13
2.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols	13
2.2.2. La vitamine E (α -tocophérol)	14
2.2.3. La vitamine C (acide ascorbique)	14
2.2.4. Les polyphénols	14
2.3. Les oligoéléments.	15
2.3.1. Le sélénium.	15
2.3.2. Le cuivre	15
2.3.3. Le zinc	15
3. Sources des radicaux libres aux cours des états d'hyperglycémie	16
3.1. Auto-oxydation du glucose	16
3.2. Glycation des protéines	16
3.3. Voie des polyols	17
3.4. La voie de la protéine kinase C	18
3.5. La voie des hexoamines	18
3.6. Production des radicaux libres par la mitochondrie	20
4. Altération des défenses antioxydantes au cours du DT2	22
4.1. Marqueurs circulants	22
4.2. Marqueurs pancréatiques	24
III. Types de traitements du diabète type 2	24
1. Mesures hygiéno-diététiques	24
1.1. Les mesures nutritionnelles	24
1.2. Activité physique	25
2. Traitement pharmacologique (antidiabétiques oraux)	25
2.1. Sulfamides hypoglycémiantes	26
2.1.1. Pharmacodynamie	26
2.1.2. Effets indésirables	26
2.2. Biguanides (metformine)	27
2.2.1. Pharmacodynamie	27
2.2.2. Effets indésirables	27
2.3. Thiazolidinediones ou glitazones	28
2.3.1. Pharmacodynamie	28

2.3.2. Effets secondaires	28
2.4. Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidases	29
2.4.1. Pharmacodynamie	29
2.4.2. Effets secondaires	29
Chapitre 2 : Phytothérapie et principes actifs des plantes	30
I. Phytothérapie	30
1. Introduction	30
2. La phytothérapie dans le monde	31
3. La phytothérapie en Algérie	33
4. Ethnopharmacologie	33
5. Modes d'actions des plantes antidiabétiques	39
II. Principes actifs hypoglycémiants des plantes médicinales	39
1. Polyphénols	39
2. Flavonoïdes	41
3. Alcaloïdes	42
4. Tanins	43
5. Terpènes	43
6. Polysaccharides	44
III. <i>Anvillea radiata</i> Coss & Dur	44
1. Données botanique	44
2. Répartition géographique	45
3. Description morphologique	45
4. Classification	46
5. La médecine traditionnelle et les connaissances locales	46
6. Constituants	46

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal	49
2. Préparation des extraits	49
2.1. Extrait aqueux lyophilisé	49
2.2. Extraction par les solvants	49
3. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes	52

3.1. Dosage des polyphénols totaux	52
3.2. Dosage des flavonoïdes	52
3.3. Analyse des composés phénoliques par HPLC-DAD	53
4. Evaluation des capacités antioxydantes des composés	53
4.1. Chélation du fer	54
4.2. Inhibition de dégradation du désoxyribose	54
4.3. Préparation des LDL	55
4.4. Test du DPPH	55
4.5. Test TRAP	57
4.6. Test ORAC-FL	59
4.7. Test d'inhibition de la xanthine oxydase	61
4.8. Protocole expérimental du test du quenching du superoxyde	62
4.9. Etude par ESR des radicaux libre peu persistant: le spin trapping	63
5. Inhibition des enzymes hydrolysant les carbohydrates	64
5.1. Test d'inhibition de l' α -amylase pancréatique	64
5.2. Dosages d'inhibition de l' α -glucosidase	65
6. Culture cellulaire	65
6.1. Culture des cellules A549, NHLF et INS-1E	66
6.2. Protocole de mise en culture et d'exposition des cellules	68
6.3. Comptage des cellules adhérentes	69
6.4. Dosage de la cytotoxicité	70
6.4.1. Test FMCA	71
6.4.2. Test MTT	72
6.4.3. Test ATP bioluminescence	74
6.4.4. Test d'activité caspase-3	77
7. Animaux et conception d'étude	77
7.1. Activité hypoglycémique aiguë des extraits	79
7.2. Test oral de tolérance au glucose (OGTT) chez les souris traitées à long terme	79
8. Dosage biochimique	80
8.1. Dosage du cholestérol total	80
8.2. Dosage du glucose	81
8.3. Le dosage de l'insuline	81

8.4. Dosage du GSH / GSSG	82
8.5. Dosage du Hb/HbAc-1	82
8.6. Dosage du Glycogène	82
8.7. Dosage des marqueurs inflammatoires (cytokine / chemokine)	83
9. Dosage des protéines de carbonyles	83
10. L'activité de la NADPH oxydase dans le muscle ventriculaire et le muscle squelettique	84
11. Dosage des protéines totales	84
12. Analyse des données	85

Résultats et discussion

1. Analyses TPC, TFC et HPLC	86
2. Propriétés antioxydantes in vitro	91
2.1. DPPH, ORAC et TRAP	91
2.2. Effet scavenger des radicaux superoxydes et effets inhibiteurs sur les pro-oxydants	94
2.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles des extraits hydrosolubles	96
3. Activités inhibitrices contre les enzymes digestives	99
4. Etudes de cytotoxicité	102
5. Effet protecteur sur l'oxydation des LDL	104
6. Effet protecteur sur des cellules bêta-pancréatiques de rat en culture dans des conditions de glucose élevé	106
7. Toxicité orale aiguë d'extraits sur des souris C57BL / 6 J	108
8. Effet antidiabétique sur des souris C57BL / 6 J nourries à la graisse	108
8.1. Activité hypoglycémiant aiguë des extraits: étude de détermination de la dose	108
8.2. Etude à long terme sur les souris diabétiques: prise de nourriture, poids corporel et poids de la graisse corporelle	111
8.3. Effet sur la glycémie et l'insuline, tolérance au glucose, glycation de l'hémoglobine, hyperleptinémie et hyperlipidémie	115
8.4. Les marqueurs de stress oxydatif et les niveaux de cytokines inflammatoires	116

Conclusion générale et perspectives	119
Références bibliographiques	121
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

AAPH	Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride
AQL	Lyophilized aqueous extract
AR	Aqueous residual
AP-1	Protéine activatrice 1
C8-dG-AP	N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene
CAT	Catalase
CNPG3	2-chloro-4-nitrophenol- α -D-maltotrioside
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPI	Diphenyleneiodonium
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTPA	Diethylenetriaminepentaacetic acid
ESM	Ecart standard à la moyenne
ET	Ecart type
eNOS	NO synthase endothéliale
FBM	Fibroblast basal medium
FGM	Fibroblast growth medium
FMCA	Fluorometric microculture cytotoxicity assay
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
GPx	Glutathion peroxydase
Grx	Glutaredoxine
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion-S-transférases
Hb	Hémoglobine
HbA_{1c}	Glycosylated hemoglobin
HFD	High-fat diet
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL	Lipoprotéines de haute densité

HO•	Radical hydroxyles
HOO•	Radical hydroperoxyde
IL-	Interleukine
LDL	Lipoprotéines de faible densité
MCC	Metal chelating capacity
MCP-1	Monocyte-chemoattractant protein 1
Met	Metformin
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NBDH	7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MDA	Malondialdéhyde
NAC	N-acetyl-cysteine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHLF	Normal human lung fibroblast
Nox	NADPH oxydases
NQO1	NADPH quinone oxydoréductase 1
Nrf-2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OGTT	Oral glucose tolerance test
ORAC	Oxygen radical absorbing capacity
O₂•⁻	Radical superoxyde
ONOO⁻	Ion peroxy-nitrique
PE	Petroleum ether
pNPG	p-nitrophenyl- α -D-glucoopyranoside
PPA	porcine pancreatic α -amylase
PKC	Protein kinase C
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RIP	Rat intestinal acetone powder
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SD	Standard diet
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide 2-thiobarbituric

TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TFC	Total flavonoid content
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
TPC	Total phenolic content
TRAP	Total radical antioxidant potential
Trx	Thioredoxine;
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vit	Vitamine
XO	Xanthine oxydase

Liste des figures

Figure 1.	Distribution des antioxydants dans la cellule	12
Figure 2.	Contribution de l'auto-oxydation du glucose et de la production de radicaux hydroxyles à l'altération des protéines induites par le glucose	16
Figure 3.	Voie des polyols et autres voies métaboliques induites par l'hyperglycémie	18
Figure 4.	le flux de la voie des hexosamines	20
Figure 5.	production de l'anion superoxyde par la mitochondrie	21
Figure 6.	La mitochondrie : le lien unificateur entre les différents mécanismes pathogéniques proposés dans les complications associées au diabète	22
Figure 7.	Aspects morphologique d' <i>Anvillea radiata</i> Coss. & Dur	45
Figure 8.	Structure des flavonoïdes aglycones identifiés dans l'extrait méthanolique d' <i>Anvillea radiata</i>	47
Figure 9.	Schéma du protocole d'extraction d' <i>Anvillea radiata</i> Coss & Dur.	51
Figure 10.	Réaction de réduction du radical DPPH	56
Figure 11.	Mécanisme d'oxydation du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène	57
Figure 12.	Principe du test ORAC	59
Figure 13.	Principe du test du quenching	62
Figure 14.	(A) A549 et (B) NHLF à faible et forte densité	68
Figure 15.	Schéma du mécanisme de réaction du FDA	71
Figure 16.	Schéma du mécanisme de réaction du MTT	73

Figure 17.	Schéma du mécanisme de réaction de la luciférine	75
Figure 18.	Chromatogrammes HPLC-DAD des composés phénoliques <i>d'A. radiata</i> détectés à 280 nm dans divers extraits.	90
Figure 19.	Radicaux hydroxylés piégés par des extraits hydrosolubles <i>d'A. radiata</i> .	98
Figure 20.	Oxydation de la LDL humaine (50 µg de protéines/ml) après incubation avec du CuSO ₄ (2 mM) dans du PBS.	105
Figure 21.	Effet protecteur des extraits <i>d'A. radiata</i> contre la toxicité induite par le glucose élevé dans les cellules bêta.	107
Figure 22.	Effet hypoglycémiant aigu et test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) chez des souris ayant reçu des extraits <i>d'A. radiata</i> .	110
Figure 23.	Activité de la NADPH oxydase dans (A) le muscle squelettique des membres postérieurs et (B) homogénats myocardiques chez des souris soumises à un régime HFD traitées avec des extraits <i>d'A. radiata</i>	118

Liste des tableaux

Tableau 1.	Radicaux libres produits au cours de la réduction de l'oxygène	8
Tableau 2.	Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle et complémentaire dans le monde	32
Tableau 3.	plantes antidiabétiques les plus utilisées en Algérie	35
Tableau 4.	Répartition des souris en groupes expérimentaux	78
Tableau 5.	Teneur totale en phénol (PTC), teneur totale en flavonoïdes (TFC) et concentrations de composés phénoliques ^a dans les extraits d' <i>A. radiata</i> détectés par HPLC-DAD	88
Tableau 6.	Capacités antioxydantes dans les tests DPPH, ORAC et TRAP	92
Tableau 7.	Coefficients de corrélation de Pearson (R ²) entre l'activités antioxydantes et le contenu phytochimique d' <i>A. radiata</i>	92
Tableau 8.	Inhibition de la xanthine oxydase (XO), quenching du superoxyde et capacité de chélation des métaux (MCC)	95
Tableau 9.	Activités Inhibitrices contre l' α -amylase pancréatique porcine (PPA) et les α -glucosidases de <i>S. cerevisiae</i> (SC) et de la poudre intestinale d'acétone de rat (RIP)	101
Tableau 10.	Cytotoxicité contre les cellules cancéreuses du poumon humain (A549) et les fibroblastes normaux (NHFLF)	103
Tableau 11.	Effets antidiabétiques, antioxydants et anti-inflammatoires des traitements chez les souris C57BL / 6J	113

INTRODUCTION GENERALE

Le diabète sucré est une maladie complexe tant par ses mécanismes physiopathologiques que par son déterminisme génétique ainsi que la genèse de ses complications. C'est un groupe hétérogène de maladies métaboliques dont la caractéristique principale est une hyperglycémie résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (Sharma *et al.* 2008).

Cette maladie chronique prend les proportions d'une véritable épidémie. Sa prévalence au sein de la population mondiale est estimée de 425 millions de patients (FDI *Atlas* 2017). Elle est responsable de 9% de la mortalité totale, tuant chaque année 4 millions de malades (OMS 2016). L'évolution du nombre de diabétiques s'accroît de manière exponentielle et, selon les prévisions de l'OMS, plus de 622 millions d'individus seront diabétiques en 2040 (FDI 2017).

Le cout humain et financier de la maladie en fait un problème de santé publique majeur en Algérie et dans les pays en voie de développement. Elle est responsable de complications chroniques liées aux conséquences vasculaires de la maladie telles que l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose, la néphropathie et la neuropathie. Ces complications sont longtemps supposées liées à l'élévation chronique du glucose et au stress oxydant (Baynes 1991).

La multiplicité des sources de formation de radicaux libres fait du diabète une maladie particulièrement sujette au stress oxydant. Des concentrations élevées de glucose extra- ou intra-cellulaires induisent un stress oxydant par plusieurs mécanismes comme il a pu être montré dans le diabète expérimental chez l'animal (Asayama *et al.* 1989) et dans les diabètes de type 1 et de type 2 chez les patients (Nourooz-Zadeh *et al.* 1997; Szaleczky *et al.* 1999). L'équilibre glycémique joue donc un rôle très important dans la balance prooxydant/antioxydant (Bonfont-Rousselot *et al.* 2000)

L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindoue, grecque et romaine. Le pouvoir thérapeutique des plantes était connu par nos ancêtres de façon empirique. Ainsi, on ignorait tout de la composition chimique des remèdes utilisés tous les jours par de nombreuses populations, pour les soins de santé. Dans les pays en voie de développement, entre 70 et 95% de la population a recours aux plantes médicinales pour les soins primaires par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu

démontrer une réelle efficacité. Il est estimé qu'au moins 25% de tous les médicaments modernes sont dérivés, directement ou indirectement, à partir de plantes médicinales, principalement grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles (Robinson & Zhang 2011). De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (Flet 1984)

Le traitement moderne du diabète fait appel à plusieurs familles d'hypoglycémiantes oraux comme les biguanides et les thiazolidinediones qui agissent sur l'insulino-résistance et les sulfamides et les glitinides qui agissent en stimulant l'insulino-sécrétion. Cependant aucun des médicaments utilisé pour le traitement du diabète n'agit simultanément sur les deux facteurs pathogéniques du diabète ou améliore aussi les anomalies du métabolisme lipidique associées le plus souvent au diabète de type II. Le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas, ce qui conduit à long terme à l'émergence de complications très sérieuses. L'essor récent de la phytothérapie offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques (Eddouks *et al.* 2007) .

L'Algérie, riche par sa biodiversité et son climat, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules hypoglycémiantes originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication.

Sachant que le diabète constitue un véritable fléau dans notre pays, le nombre d'études en matière de recherche de nouvelles molécules capable de prévenir ou même de retarder l'apparition des complications liées au diabète, reste très limitée.

Plusieurs plantes sahariennes, fréquemment utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, se sont vues reconnaître un effet thérapeutique contre plusieurs maladies telles que le diabète qui a connu une émergence avec le changement de mode de vie et des régimes alimentaires de la population algérienne. L'espèce que nous avons étudié est *Anvillea radiata* Coss. & Dur. de la famille des Asteraceae. Cette plante est surtout reconnue en thérapeutique traditionnelle pour traiter des pathologie broncho-pulmonaires,

digestives, les troubles gastro-intestinaux, l'indigestion et les maladies du foie (Hammiche & Maiza 2006). Les pousses d'*Anvillea radiata* en infusion à froid ou à chaud, sont utilisées comme remède contre le diabète (Ghourri *et al.* 2013;Fakchich & Elachouri 2014).

Le présent travail s'insère dans le cadre du programme destiné à la valorisation de la flore algérienne par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs. Cette thèse est subdivisée en deux grandes parties, l'une bibliographique et l'autre expérimentale. La synthèse bibliographique comporte un rappel sur le diabète de type 2, les mécanismes toxiques de l'hyperglycémie chronique, le stress oxydant, phytothérapie et l'intérêt thérapeutique des biomolécules. Après la mise en place des procédures d'extraction d'*Anvillea radiata* et afin d'améliorer la standardisation de composés actifs, la partie expérimentale a permis la réalisation des études suivantes.

- Un fractionnement des composés phénoliques par entraînement avec différents solvants organiques.
- La quantification des composés phénoliques et flavonoïdes présents dans les différents extraits.
- La détermination de la composition chimique des extraits méthanoliques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD).
- L'identification et la caractérisation de la capacité antioxydante de différentes fractions en utilisant plusieurs méthodes différentes et la détermination de leurs propriétés de cytotoxicités vis-à-vis des cellules en culture normales et cancéreuses.
- L'évaluation pour la première fois, *in vitro*, des activités inhibitrices de l' α -amylase et de l' α -glucosidase des extraits.
- L'étude de l'effet protecteur des extraits sur des cellules β de rat en culture exposées à des conditions d'hyperglycémie.
- La détermination de l'effet de l'administration orale de deux extraits potentiellement pharmacologiques sur l'hyperglycémie, le stress oxydatif, les biomarqueurs métaboliques et inflammatoires du diabète de type 2 et l'obésité induit par le régime enrichi en gras (HDF) chez un modèle des souris C57 / BL6J.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Diabète et stress oxydant

I. Le diabète

1. Définitions et généralités

Le diabète est une maladie fréquente, connue depuis fort longtemps, très répandue en ce début de XXI^{ème} siècle. C'est une pathologie chronique, caractérisée par une hyperglycémie. L'OMS le définit par une glycémie supérieure à 1.26 g/l à jeun. Cette maladie est incurable, mais peut néanmoins être traitée efficacement.

Le diabète est un désordre du métabolisme lipidique, glucidique et protéique attribué à la production diminuée de l'insuline ou à une résistance anormale à cette hormone qui entraîne une hausse du taux de glucose.

2. Types de diabète

2.1. Diabète insulindépendant (DID)

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

2.2. Diabète non insulindépendant (DNID)

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle. L'hyperglycémie est due à une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β du pancréas endocrine, et une diminution de la sensibilité tissulaire principalement des muscles squelettiques, du tissu adipeux et du foie aux effets de l'insuline, ce qui se traduit par une insulino-résistance.

2.2.1. L'insulino-résistance (IR)

L'IR peut être définie par la nécessité d'un excès d'insuline pour obtenir une réponse équivalente à la normale. Elle se traduit par une moindre efficacité de la réponse biologique à l'insuline sur ses tissus périphériques. Bien que les effets de l'insuline sur les

cellules cibles (adipeuses, musculaires, hépatiques) soit multiples, le terme d'insulinorésistance se réfère presque exclusivement à l'effet de l'insuline sur le maintien de l'homéostasie du glucose.

2.2.2. Lien physiopathologique entre insulino-résistance, obésité et diabète de type 2

L'existence d'une prédisposition génétique est très probable, l'histoire familiale et l'appartenance à un groupe ethnique sont des facteurs de risques majeurs de développer un diabète de type 2. Il est maintenant admis que l'insulinorésistance a une composante génétique, mais qu'elle peut également être acquise sous l'action de facteurs environnementaux.

L'IR est fortement corrélée à l'accumulation de métabolites toxiques des acides gras dans les tissus cibles (Dumas *et al.* 2009) ainsi qu'à de nombreux défauts et dysfonctionnements affectant par exemple le nombre de récepteurs de l'insuline, la baisse d'activité de kinases, la concentration et la phosphorylation des substrats du récepteur d'insuline IRS-1, la translocation des transporteurs de glucose et l'activité d'enzymes intracellulaires (Saltiel & Kahn 2001). Les anomalies dans la régulation des transporteurs de glucose (GLUT4) peuvent conduire à l'insulinorésistance car l'insuline est responsable de la migration des vésicules intracellulaires contenant du GLUT4 vers la membrane pour augmenter le nombre de transporteurs membranaires de glucose. Il a été montré que le stress oxydant inhibe la translocation du récepteur du glucose GLUT4 de la membrane plasmique dans la lignée cellulaire 3T3-L1 (lignée d'adipocytes de rat), induisant ainsi une augmentation de la résistance à l'insuline dans ces cellules (Tirosh *et al.* 1999).

De nombreuses études ont également montré des relations étroites entre les dysfonctionnements mitochondriaux et l'insulinorésistance, que ce soit au niveau musculaire (Befroy *et al.* 2007) ou hépatique mais également dans le tissu adipeux, les vaisseaux et le pancréas (Brownlee 2005; Ashrafian *et al.* 2007; Nisoli *et al.* 2007). La question est de déterminer si les dysfonctionnements mitochondriaux observés sont la cause ou la conséquence de la survenue de l'insulinorésistance (Dumas *et al.* 2009).

Certains travaux ont montré que l'augmentation de la concentration en insuline induite par l'insulinorésistance, ainsi que celle des acides gras libres et des glucides, accroît la production de radicaux libres, induisant ainsi un stress oxydant, et active les

voies métaboliques génératrices de ces radicaux, ce qui en retour aggrave les défauts de sécrétion d'insuline, et de ce fait, elle accélère l'installation du diabète de type 2 (Evans *et al.* 2003). L'attaque radicalaire modifie aussi la transcription des transporteurs du glucose (Bloch-Damti & Bashan 2005); le taux de GLUT1 est augmenté alors que le GLUT4 est réduit, empêchant ainsi l'incorporation du glucose dans les cellules. C'est ainsi que l'excès d'acides gras libres diminue l'apport de glucose aux cellules musculaires, entraînant une diminution de la synthèse de glycogène et de l'oxydation du glucose, introduisant la notion de lipotoxicité musculaire (Griffin *et al.* 1999).

Le développement de l'obésité abdominale participe largement à l'insulinorésistance; Une perte ou un gain de poids sont étroitement corrélés à des variations de sensibilité à l'insuline, ce qui est un argument fort en faveur d'une relation de cause à effet entre obésité et insulino-résistance.

Chez les obèses on observe une augmentation des acides gras libres issus de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux. Un excès d'acides gras libres circulants contribue à la diminution de l'utilisation du glucose par les cellules. De plus, une augmentation des métabolites des acides gras (diacylglycérol, acyl-CoA) au niveau des muscles stimule la phosphorylation des récepteurs à l'insuline par la protéine kinase C et inhibe les mécanismes de la signalisation insulinique, ceci entraînant une réduction du transport du glucose dans la cellule (Poitout & Robertson 2008).

Le tissu adipeux contient différents éléments stroma-vasculaires en sus des adipocytes : matrice du tissu conjonctif, tissu nerveux, cellules immunitaires (Frayn *et al.* 2003). Malgré cela, ces composants fonctionnent comme une unité intégrée, ce qui fait du tissu adipeux un vrai organe hautement actif du point de vue métabolique et endocrine; par conséquent capable de sécréter des hormones endocrines comme la leptine et l'adiponectine, ainsi que de nombreuses autres protéines. Ces substances peuvent conduire à l'insulinorésistance *via* de nombreux mécanismes parmi lesquels on peut citer la sécrétion de cytokines (TNF α) (Drews *et al.* 2010), la diminution de l'adiponectine et la libération d'acides gras libres dans la circulation (Bjorndal *et al.* 2011).

3. Epidémiologie du diabète de type 2

Le mode de vie des pays riches ou en voie de développement entraîne une sédentarisation des personnes et une alimentation plus riche en graisse et en sucre rapide,

ceci induisant une augmentation des pathologies cardio-vasculaires ainsi qu'une augmentation des cas de diabète de type 2.

Le diabète de type 2 représente 90% des cas de diabète dans les pays riches. Il est estimé que 314 millions de personnes dans le monde souffrent à l'heure actuelle d'intolérance au glucose. En 2007 le nombre de personnes diabétiques dans le monde était estimé à 246 millions ce qui représente 5,9% de la population âgée de 20 à 80 ans. En Europe on estime à 53 millions le nombre de personnes atteintes par le diabète (WHO 2016). La prévalence du diabète de type 2 (DT2) est de 6,4 % dans le monde, et de 12,3 % en Algérie (TAHINA 2007). L'Algérie, en phase de transition épidémiologique, appartient au groupe des pays où l'augmentation attendue du nombre de diabétiques au cours des 25 prochaines années est l'une des plus élevées. On estime que 333 millions de personnes dans le monde seront atteintes du diabète de type 2 en 2025 ce qui est un chiffre dangereux pour la santé publique (WHO 2016).

4. Les complications du diabète

Dans le diabète, l'hyperglycémie chronique provoque l'apparition de complications aiguës (coma, acidocétosique ou hypoglycémique) et à moyen et long terme, des complications chroniques. Ces dernières consistent en une altération de la structure et des fonctions des microvaisseaux (microangiopathie), et des macrovaisseaux (macroangiopathie). La microangiopathie est en cause dans la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie diabétiques tandis que la macroangiopathie est responsable des accidents cardio-vasculaires, vasculaires cérébraux et d'ischémie des membres inférieurs. L'apparition des ces complications justifie une normalisation glycémique la plus précoce possible.

II. Les mécanismes toxiques de l'hyperglycémie chronique et stress oxydant

1. Stress oxydant

Il est admis que le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le potentiel antioxydant de l'organisme. Différentes études ont montré que le diabète sucré est associé à une augmentation de la

production des radicaux libres d'une part, et d'une diminution du potentiel antioxydant d'une autre part.

1.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres, se réfèrent à un atome ou une molécule, la plupart du temps très réactive, qui contient un nombre impair d'électrons dans sa dernière couche électronique. C'est la présence de cet électron «célibataire» qui confère une grande réactivité à ces espèces, généralement nommées «**espèces réactives de l'oxygène**» (Tableau 1) (Delattre *et al.* 2005). Il faut cependant noter qu'il existe des radicaux libres relativement (radical ascorbyle), voire très persistants (radical DPPH), cette stabilité étant apportée par des mécanismes d'hyperconjugaison, ou liée à un fort encombrement stérique.

Tableau 1: Radicaux libres centrés sur l'oxygène.

$O_2^{\bullet -}$	radical superoxyde
HO_2^{\bullet}	radical perhydroxyle
$\bullet OH$	radical hydroxyle
RO_2^{\bullet}	radical peroxyde
RO^{\bullet}	radical alkoxyde

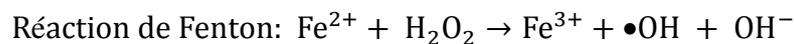
La production excessive de radicaux libres associée au développement de nombreuses maladies peut induire et/ou entretenir un déséquilibre entre la formation des composés oxydants et le niveau des molécules ou enzymes ayant une fonction antioxydante dans la cellule, ceci entraînant des dégradations des molécules assurant la structure et les fonctions cellulaires. Un état dit de **stress oxydant** est alors généré (Rasilainen *et al.* 2002).

1.2. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS)

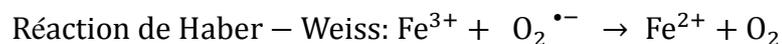
Le métabolisme de l'oxygène dans l'organisme se passe, dans des situations normales, par sa réduction quasi-totale en eau, utilisant quatre électrons dans la chaîne respiratoire. L'oxygène (O₂) que nous respirons est métabolisé dans notre corps comme suit: environ 85 à 90% sont utilisés par les mitochondries, à travers la chaîne respiratoire, et les 10 à 15% restants sont utilisés par divers enzymes oxydases et oxygénases et aussi par réactions chimiques d'oxydation directe.



L'anion superoxyde (O₂^{•-}) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet O₂^{•-} entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'H₂O₂ n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, H₂O₂ se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe²⁺), en un ion OH⁻ et un radical hydroxyle (•OH) (Gutteridge & Halliwell 1992; Delattre *et al.* 2005)



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde (O₂^{•-}) qui régénère Fe³⁺ en Fe²⁺ selon la réaction d'Haber-Weiss.



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et de fer permet la production de radical hydroxyle ($\bullet OH$).

L' $\bullet OH$ avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' $\bullet OH$ apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (Gutteridge & Halliwell 1992).

1.3. Sources de radicaux libres

Toute réaction biochimique faisant intervenir l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production de radicaux libres. En tant que résidus de réactions énergétiques ou de défenses immunes, les radicaux libres sont naturellement présents dans l'organisme, et sont générés essentiellement par des mécanismes physiologiques. Ces mécanismes sont soit enzymatiques soit non enzymatiques. Les sources enzymatiques sont liées aux processus de phagocytose ou de détoxification au niveau du réticulum endoplasmique, des peroxysomes ou de la membrane plasmique. Elles incluent les NADPH oxydases (NOX), localisées à la membrane des polynucléaires, des macrophages et des cellules endothéliales (Vignais 2002), et les oxygénases cellulaires dépendantes du cytochrome P450 (Coon et al. 1992).

La conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase constitue une autre source enzymatique de superoxyde et d' H_2O_2 ; elle a été impliquée dans divers processus délétères in vivo (Yokoyama et al. 1990). La voie des lipoxygénases (LOX) et des cycloxygénases (COX) génère également des ROS (Kuehl, Jr. & Egan 1980).

Les sources non enzymatiques de superoxyde sont représentées par la respiration mitochondriale et les réactions d'oxydo-réduction (fer, cuivre). Ces réactions procèdent d'un transfert direct d'électron sur l'oxygène par des coenzymes réduits ou des groupements prosthétiques, ou encore des xénobiotiques.

2. Systèmes de défenses antioxydants

On appelle antioxydant toute molécule ayant la faculté de diminuer ou d'empêcher l'oxydation d'autres substances. Dans cette définition fonctionnelle, on admet par ailleurs, que la concentration de l'antioxydant est inférieure proportionnellement au substrat oxydable. Les systèmes antioxydants assurent une double ligne de défense et l'on peut schématiquement scinder en deux grandes familles, selon qu'ils (i) préviennent directement la formation radicalaire (antioxydants primaires) ; ou (ii) épurent les ROS (antioxydants secondaires).

Dans les conditions physiologiques normales, la production de radicaux libres est parfaitement contrôlée par une riposte antioxydante fine et polymorphe (à l'image de la diversité des formes et des lieux de production des ROS), autorisant une adaptation subtile aux niveaux de radicaux générés (Halliwell 1994). Ainsi, un équilibre permanent de la balance pro-/anti-oxydants est assurée. Les stratégies antioxydantes sont nombreuses et mettent en jeu des systèmes d'une remarquable variété physico-chimique, à la fois enzymatiques et non enzymatiques, dans tous les compartiments organiques (intra/extracellulaires, mitochondriaux, membranaires) (Figure 1). Le recours séquentiel à ces différents systèmes assure des défenses tout à la fois redondantes, complémentaires et synergiques, dans la prise en charge des ROS. Les composés antioxydants non enzymatiques regroupent des petites molécules hydro et liposolubles chargées de piéger les espèces radicalaires, alors que les enzymes antioxydantes dégradent les superoxydes et les peroxydes (Halliwell 1994).

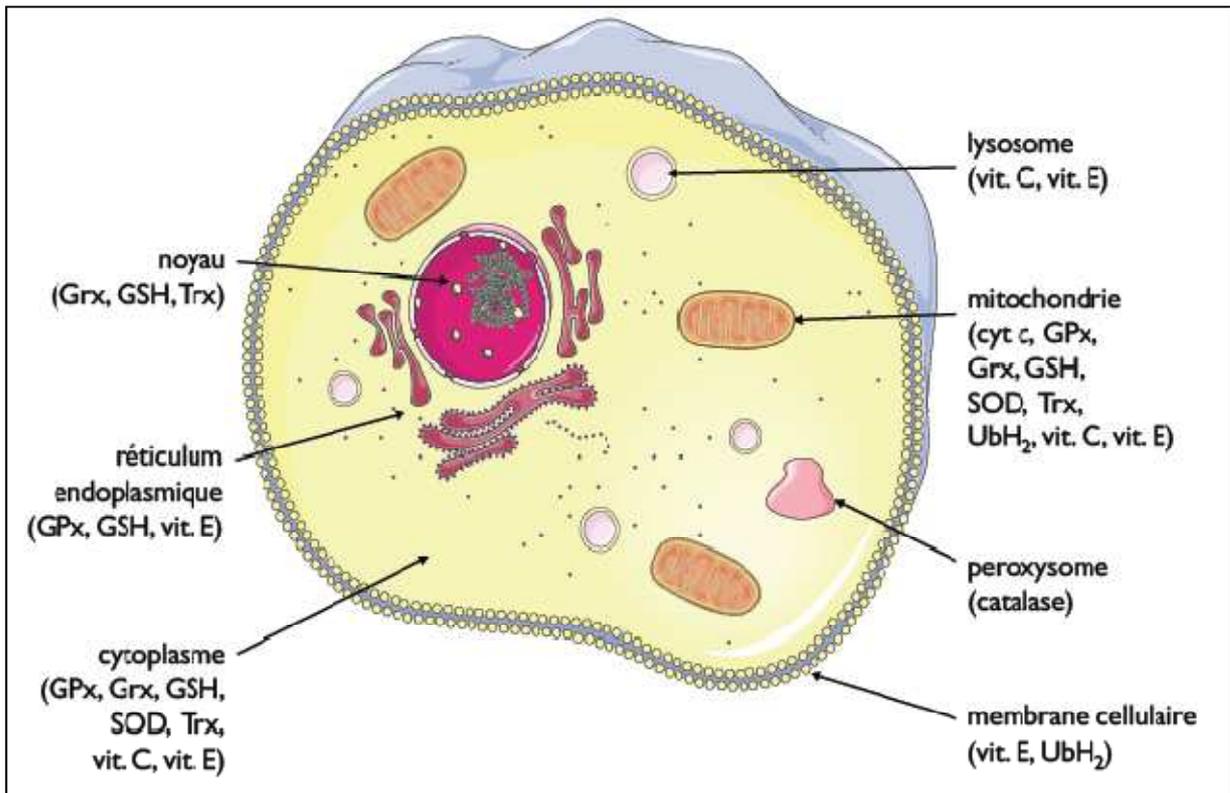


Figure 1. Distribution des antioxydants dans la cellule (Lacraz 2009). Les systèmes antioxydants intègrent l'ensemble de l'espace cellulaire. GPx, glutathion peroxydase; Grx, glutaredoxine; GSH, glutathion réduit; SOD, superoxyde dismutase ; Trx, thioredoxine; vit, vitamine.

2.1. Les systèmes de défenses enzymatiques.

2.1.1. Les superoxydes dismutases.

Les superoxydes dismutases (**SOD**) sont des métalloprotéines. Elles sont en première ligne dans le système de défense du stress oxydant. Elles assurent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Il existe trois isoenzymes de la SOD: la Cu/Zn-SOD1 présente dans le cytosol, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3 (Soulere et al. 2002). La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et représente le système de défense majeur dans la paroi des artères. L'expression de la SOD3 est augmentée par les facteurs vasoactifs comme l'histamine, l'endothéline I et l'angiotensine II, et diminuée par l'homocystéine (Fridovich 1995).

2.1.2. Les glutathions peroxydases

Les glutathions peroxydases (GPxs) sont des sélénoprotéines. Elles réduisent les peroxydes lipidiques formés par l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Le taux de GPxs est effondré en cas de déficit en sélénium. A partir d'un taux élevé en sélénium la concentration en GPxs atteint un plateau. Le dosage des GPxs ne peut être utilisé comme marqueur d'une intoxication au sélénium. La synthèse des GPxs étant rénale et hépatique, l'insuffisance rénale et/ou hépatique peuvent faire varier leurs taux (Delattre *et al.* 2005).

2.1.3. Le système thiorédoxine

La thiorédoxine est l'antioxydant majeur qui maintient les protéines intracellulaires à l'état réduit. Elle est régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase et contient un groupement sélénocystéine dans son site actif. De plus, elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène. Elle permet également la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Hattori *et al.* 2003).

2.1.4. La catalase.

La catalase est une enzyme héminique constituée de quatre sous-unités contenant chacune un groupement héminique Fe^{2+} lié au site actif. Elle est localisée dans les peroxysomes et les hématies. La réaction que catalyse cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et eau (Putnam *et al.* 2000).

2.2. Les systèmes de défenses non enzymatiques

2.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols

Le glutathion est formé par la condensation de trois acides aminés (acide glutamique, cystéine et glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire dans la cellule où il est présent sous forme réduite (GSH). En condition physiologique normale, sa forme oxydée (GSSG) est présente en très faible concentration. Le rapport GSH/GSSG est un excellent marqueur de la peroxydation lipidique. Ce rapport tend à diminuer lors d'un exercice physique intense et au cours du vieillissement. Le glutathion possède d'autres propriétés antioxydantes comme: cofacteur de la GPx, chélateur de métaux de transition, régénérateur final des

vitamines E et C. Toutes les protéines qui contiennent des groupements thiols, dont l'albumine, participent aux défenses antioxydantes contre les ROS (Rahman & MacNee 2000).

2.2.2. La vitamine E (α -tocophérol)

La vitamine E est présente dans les huiles végétales, principalement dans l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive. Elle se trouve aussi en moindre quantité dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, la margarine et les poissons gras. C'est le principal antioxydant de la famille des tocophérols et le principal antioxydant contenu dans les LDL. Chaque LDL contient en moyenne 6 à 12 molécules d' α -tocophérol. La Vit. E est incorporée dans ces particules au cours de leur métabolisme, grâce à une protéine appelée α -tocophérol transfer protein (Lopez et al. 2005). Cette vitamine permet, lors de l'initiation de la peroxydation lipidique suite à une attaque radicalaire, d'inhiber la propagation radicalaire en cédant un de ses atomes d'hydrogène situé sur le noyau phénolique. Cette action permet de réduire le radical R-O₂•. La Vit. E peut aussi réagir avec les radicaux •OH et O₂•⁻ même si ces réactions, en théorie réalisables, restent peu probables au vu de leur lenteur. Enfin, la Vit. E peut réguler à la hausse les enzymes antioxydantes (SOD, GPx, CAT du foie, GST et NADPH réductase) (Lopez *et al.* 2005).

2.2.3. La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les milieux intra- et extracellulaires (compartiments hydrophiles) où elle se retrouve sous la forme d'anion ascorbate. Il agit principalement en piégeant directement les ROS avec une préférence pour le radical O₂•⁻ et le ONOO⁻. Il est aussi capable de recycler la Vit. E de manière à agir en synergie avec cette dernière dans la prévention de la peroxydation lipidique (Kaliora et al. 2006).

2.2.4. Les polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres,

d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre et al. 2005). Les plus utilisés sont la quercétine, le resvératrol et la curcumine. Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et, en plus d'autres constituants, un ou plusieurs groupes hydroxyle tels que les flavonoïdes contenus dans les légumes, les fruits, le thé, le vin ont des effets protecteurs vis-à-vis du diabète et des maladies cardiovasculaires.

2.3. Les oligoéléments

2.3.1. Le sélénium

Le sélénium est un cofacteur de la GPx, il est donc antioxydant de façon indirecte. On retrouve le sélénium organique dans l'alimentation, sous forme d'un acide aminé, la sélénocystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique conduisant à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de la GPx.

2.3.2. Le cuivre

A concentration physiologique le cuivre est le cofacteur d'une SOD, cependant, il peut jouer un rôle dans la production des ROS (réaction de Fenton) lorsque sa concentration est élevée.

2.3.3. Le zinc

Le zinc est un cofacteur essentiel de la SOD. Il protège les groupements thiols des protéines. Il peut inhiber les réactions de formation des ROS induites par les métaux de transition comme le fer ou le cuivre (Delattre et al. 2005).

3. Sources des radicaux libres aux cours des états d'hyperglycémie

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans le développement d'un stress oxydant en présence de concentrations élevées en glucose : l'auto-oxydation du glucose, la glycation des protéines, la voie des polyols, la voie des PKC, la voie des hexosamines et l'activation de l'angiotensine II.

3.1. Auto-oxydation du glucose

Le glucose, sous sa forme ène-diol, et en présence de métaux de transition, donne naissance à un radical anionique ène-diol ; celui-ci, en réduisant l'oxygène moléculaire, libère des anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), au cours de cette réaction, il y a formation concomitante d'un composé carbonyle. L'anion superoxyde peut se dismuter en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de métaux de transition, produit des radicaux hydroxyle ($\bullet OH$) qui sont extrêmement réactifs (Hunt *et al.* 1990).

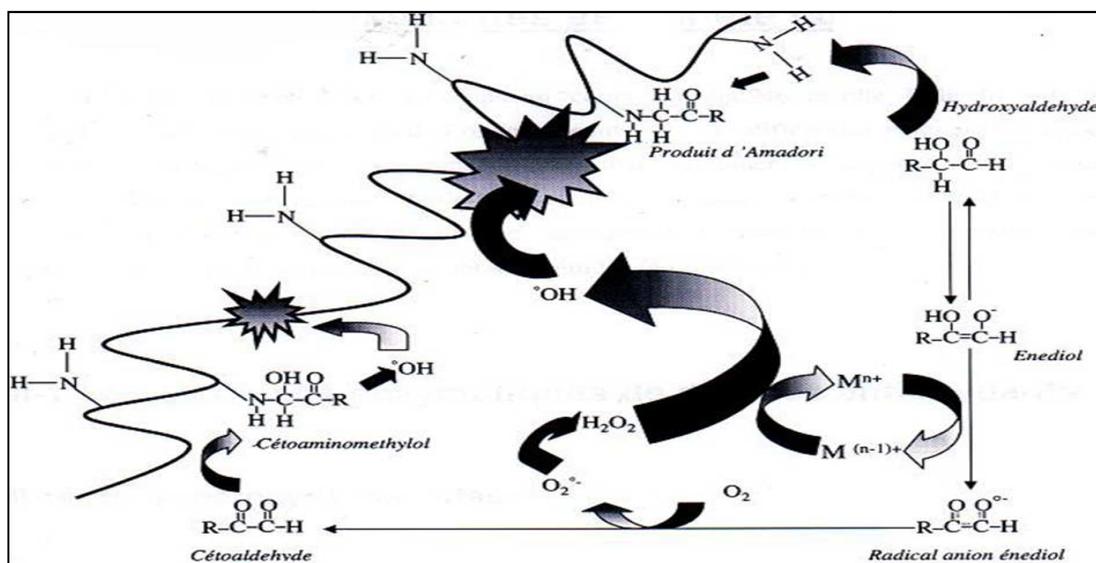


Figure 2 : Contribution de l'auto-oxydation du glucose et de la production de radicaux hydroxyles à l'altération des protéines induites par le glucose (Hunt *et al.* 1988)

3.2. Glycation des protéines

La glycation des protéines résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose et les groupements amines libres des protéines (fonction amine N terminale et/ou fonction amine de la chaîne latérale des lysines). Cette liaison donne naissance à des produits dits d'Amadori qui présentent la particularité de posséder un groupement cétoal (fonction cétone et fonction alcool secondaire portées par deux

carbones contigus). Cette fonction cétole peut, en présence de métaux de transition, céder un électron à l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation d'anions superoxyde (Gillery *et al.* 1988; Sakurai & Tsuchiya 1988).

Depuis cette observation originale, les recherches réalisées dans ce domaine ont montré que de nombreuses interrelations existent entre le stress oxydant et la glycation des protéines et qu'elles sont extrêmement complexes. De nouvelles définitions ont vu le jour telles que la glyco-oxydation (Kennedy & Lyons 1997).

Le terme de glyco-oxydation a été proposé par (Baynes 1991) pour caractériser les modifications des protéines pour lesquelles des réactions d'oxydation sont associées à la glycation. Ainsi, certains produits terminaux de glycation avancée (AGE) sont formés à partir des produits d'Amadori, soit par une voie non oxydative, soit par une voie oxydative faisant intervenir les radicaux libres oxygénés. La glyco-oxydation concerne la deuxième voie. Une fois formés, les AGE peuvent influencer la fonction cellulaire en se liant à plusieurs sites membranaires, y compris leur récepteur (RAGE). L'interaction des AGE au RAGE conduit à la génération intracellulaire des radicaux libres de l'oxygène et, parallèlement, l'épuisement des antioxydants (Bohlender *et al.* 2005).

3.3. Voie des polyols

Dans le diabète, le glucose excédentaire ne peut plus être métabolisé par la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Il est pris en charge par la voie des polyols. Sous l'action de l'aldose réductase, il est réduit en sorbitol qui est alors oxydé en fructose par la sorbitol déshydrogénase. L'aldose réductase requiert, comme cofacteur, le NADPH. De ce fait, un flux excessivement élevé de la voie des polyols entraîne une déplétion intracellulaire de NADPH. Or, des enzymes anti-oxydantes comme la glutathion réductase, qui régénère le glutathion réduit, agissent en présence de NADPH. Ainsi, la déplétion intracellulaire de ce cofacteur, en diminuant l'activité de la glutathion réductase, conduit à une diminution du taux intracellulaire de glutathion réduit, un facteur important de protection vis-à-vis des dommages créés par les radicaux libres oxygénés (Teschfamiar 1994). La déplétion intracellulaire en NADPH entraîne un autre effet délétère, celui de diminuer la synthèse du monoxyde d'azote (NO[•]). En effet, le NADPH est le cofacteur de la NO synthase dont le rôle est de synthétiser le monoxyde d'azote à partir de L- arginine. De plus, le métabolisme du NO[•] peut être également altéré par une production anormale

d'anions superoxyde, conséquence d'une concentration intracellulaire anormalement élevée en glucose. En effet, les anions superoxyde sont impliqués dans l'inactivation physiologique de NO^\bullet ; ils réagissent avec celui-ci pour former du peroxyde d'azote (OONO^-) qui est lui-même un agent oxydant potentiellement puissant suite à sa décomposition en dioxyde d'azote (NO_2) et en radical hydroxyle ($^\bullet\text{OH}$) (Tesfamariam 1994). Une concentration intracellulaire anormalement élevée du glucose semble donc être à l'origine de plusieurs anomalies du métabolisme du monoxyde d'azote. Ainsi, il a été émis l'hypothèse que ces anomalies pourraient être à l'origine de certaines complications vasculaires rencontrées dans le diabète (Tang *et al.* 2012;Kaiserova *et al.* 2008).

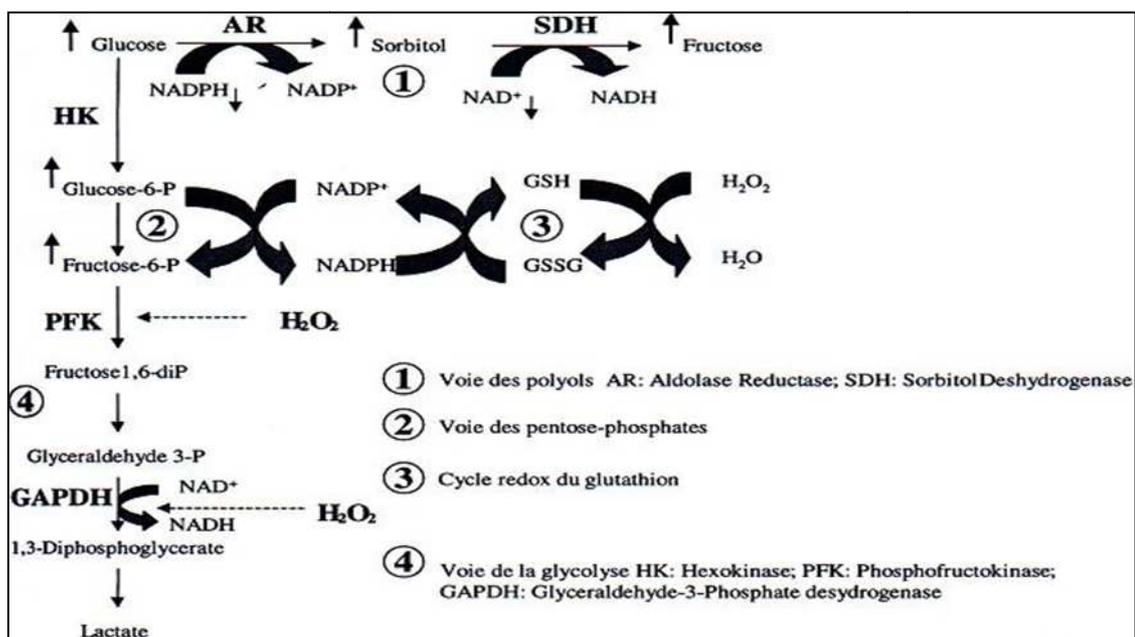


Figure 3: Voie des polyols et autres voies métaboliques induites par l'hyperglycémie

3.4. La voie de la protéine kinase C

La biotransformation augmentée du glucose en glyceraldéhyde-3-phosphate et sa conversion en DHAP (dihydroxyacétone phosphate) produisent une concentration accrue en substrat entraînant la formation de DAG (diacylglycérol). L'augmentation de la concentration en (DAG) dans la cellule conduit à l'activation de PKC (Ways & Sheetz 2000). Les conséquences vasculaires de cette activation sont multiples.

- Modification de la réactivité vasculaire; dès le début de la maladie, il a été montré une modification des flux sanguins en raison d'une anomalie de l'autorégulation qui résulterait :
 - *d'une hyperexpression de l'endothéline, puissant vasoconstricteur.
 - * d'une modification de la réponse à l'oxyde nitrique.
 - * d'une augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine et de la sensibilité vasculaire à l'angiotensine II.

- Inhibition de l'activité de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase impliquée dans les mouvements ioniques participant au maintien de l'intégrité cellulaire.
- Activation des NADPH oxydases, ce qui favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène

3.5. La voie des hexosamines

Lorsque les concentrations de glucose intracellulaire sont élevées, la majorité de ce dernier est métabolisée *via* la glycolyse. Cependant, une partie du fructose -6 phosphate est détournée de cette voie et est convertie en glucosamine-6 phosphate par la glutamine fructose-6 phosphate aminotransférase. Celui-ci est ensuite converti en uridine diphosphate N-acétylglucosamine (Kolm-Litty *et al.* 1998), qui va modifier différents facteurs de transcription conduisant à l'expression de gènes et à la synthèse de protéines tels que Transforming Growth Factor-B (TGF-β) et Plasminogen Activator Inhibitor-I (PAI-1) (Du *et al.* 2000).

Le glucosamine-6-phosphate produit par la voie des hexosamines inhibe l'activité du glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), enzyme clé de la voie des pentoses phosphate (Brownlee 2001). L'activation de la G6PD est couplée par la réduction de NADP⁺ en NADPH⁺, ensuite l'activation de la voie des hexosamines provoque la baisse du rapport NADPH⁺/NADP⁺ (Brownlee 2005).

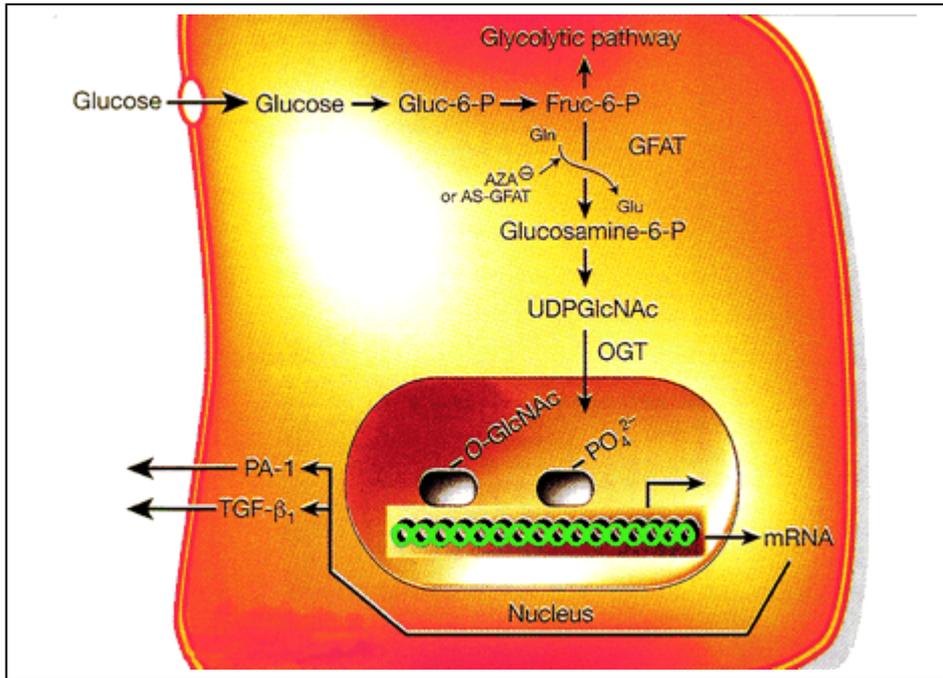


Figure 4: le flux de la voie des hexosamines (Brownlee 2005) .

3.6. Production des radicaux libres par la mitochondrie

La source principale des radicaux libres au cours des états d'hyperglycémie est bien la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Le taux élevé du glucose favorise un gradient électrochimique (de protons) au niveau de la membrane interne mitochondriale suite à une activation des donneurs d'électrons du cycle des acides tricarboxyliques, ce qui induit une forte production de l'anion superoxyde (Brownlee 2005;Kashihara *et al.* 2010). Elle produirait en effet 90 % des ROS cellulaires.

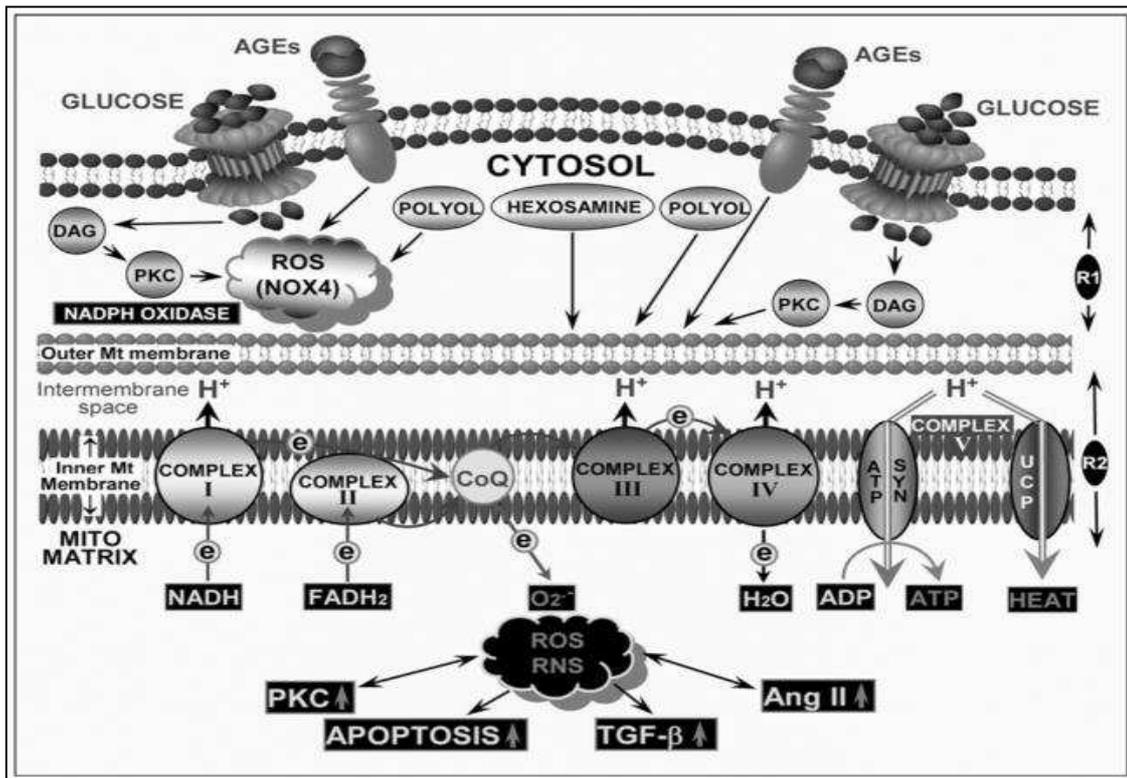


Figure 5: production de l'anion superoxyde par la mitochondrie (Kashihara *et al.* 2010)

En 2000, l'équipe de Brownlee (Du *et al.* 2000; Nishikawa *et al.* 2000) ont formulé une hypothèse biochimique reliant directement les ROS produits par la mitochondrie, plus particulièrement l'anion superoxyde, à la voie des polyols, à l'activation de la PKC, la formation d'AGE dérivés du méthylglyoxal, la voie des hexosamines et l'activation de NF- κ B (figure 6). Les auteurs démontrent en effet, que la normalisation de la production de l'anion superoxyde mitochondrial (au moyen d'agent bloquant de la chaîne respiratoire mitochondriale, de mimétiques de la SOD ou en surexprimant la SOD mitochondriale) abolit les différentes voies métaboliques induites par l'hyperglycémie dans les cellules endothéliales aortiques bovines, suggérant que celles-ci soient sous contrôle de l'anion superoxyde généré en excès.

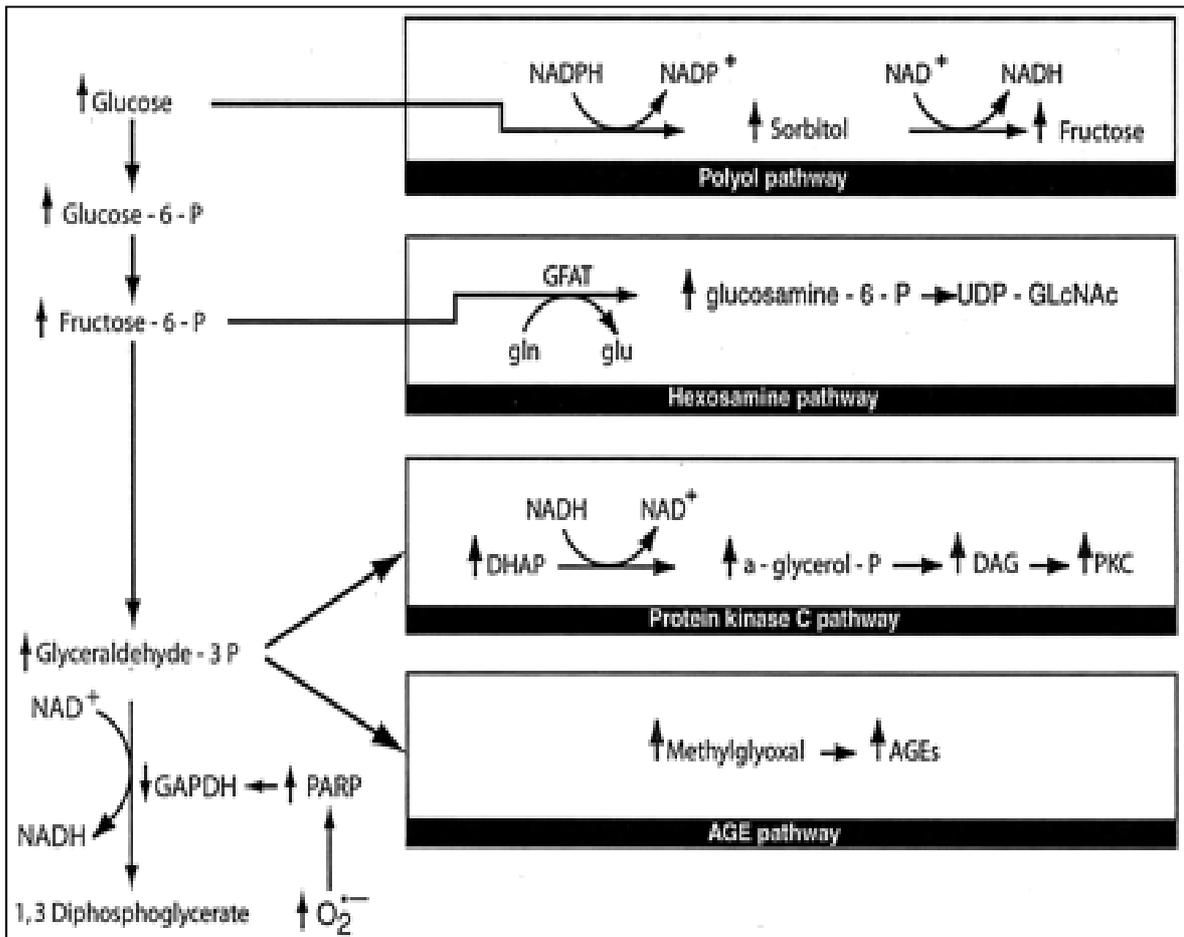


Figure 6: la mitochondrie : le lien unificateur entre les différents mécanismes pathogéniques proposés dans les complications associées au diabète (Brownlee 2005).

4. Altération des défenses antioxydantes au cours du DT2

4.1. Marqueurs circulants

De nombreuses corrélations cliniques permettent d'associer le stress oxydant et la toxicité de l'hyperglycémie. La fréquence de marqueurs du stress oxydant en est la manifestation dans l'espace cellulaire et extracellulaire. Par exemple, les niveaux circulants de marqueurs qui reflètent l'oxydation des bases de l'ADN (8-OHdG) (Shin *et al.* 2001) et des lipides (TBARS, 8-epi-PGF2α) (Turk *et al.* 2002; Gopaul *et al.* 1995) sont accrus, de même que la présence des ROS, chez les sujets DT2 (Guzik *et al.* 2002). L'oxydation et la nitration des protéines est une autre manifestation de l'hyperglycémie. En effet, la nitrotyrosine est détectée au niveau artériel en réponse à l'hyperglycémie chez le sujet DT2

et l'animal diabétique (Ceriello *et al.* 2002) . Divers marqueurs de stress oxydant (H_2O_2 et MDA) peuvent néanmoins régresser suite à un traitement intensif de l'hyperglycémie (Wierusz-Wysocka *et al.* 1995).

Concernant les défenses circulantes, elles sont inversement corrélées aux taux d'hémoglobine glyquée (Maxwell *et al.* 1997). De plus, la concentration en GSH, l'activité des enzymes catalase, ainsi que le transport des thiols, sont diminués (Turk *et al.* 2002;Dincer *et al.* 2002;De *et al.* 1998;Yoshida *et al.* 1995). Agent anti-diabétique (Yoshida *et al.* 1995) ou perfusion de GSH (De *et al.* 1998) sont néanmoins en mesure d'améliorer ces paramètres. Ces déséquilibres s'accompagnent également, au niveau circulant, d'une diminution des taux d'acide urique et d'acide ascorbique (Maxwell *et al.* 1997) .

Le taux de la vitamine E est diminué dans les plaquettes des diabétiques de type 2 par rapport aux plaquettes de sujets contrôles, bien que les taux de vitamine E mesurés dans les plasma soient identiques (Wolff 1993).

La diminution des antioxydants pourrait s'expliquer, entre autres, par la glycation des enzymes qui entrainerait leur inactivation comme cela a été décrit pour la GPx1 et la SOD érythrocytaires ainsi que pour la SOD plasmatique. D'autres études ont montré que la glycation de la catalase et de la glutathion réductase était possible *in vitro*.

La diminution de la réserve antioxydante au cours du diabète peut être aussi expliquée par une carence de la disponibilité en NADPH, H^+ , un cofacteur requis pour le recyclage de la GSH à partir de la GSSG et aboutit ainsi à la génération du stress oxydant dans de nombreux tissus et contribuer donc à la pathogenèse des complications diabétiques. Cette diminution en NADPH est induite soit par l'activation de la voie des polyols, soit par réduction de la voie des pentoses-phosphate et de la glycolyse, soit par l'inhibition de la G6PD par le glucosamine-6-phosphate. La diminution de la disponibilité de NADPH+ diminue également l'activité de la catalase enzyme responsable de la conversion de l' H_2O_2 en H_2O (Mohora *et al.* 2007).

L'ensemble de ces anomalies explique vraisemblablement de moindres capacités fonctionnelles de défenses au niveau circulant (Opara *et al.* 1999). Signalons aussi que, dans le cadre des complications secondaires liées au diabète, on associe facilement la genèse de la plaque d'athérome au stress oxydant, puisque les radicaux jouent un rôle clé

dans l'oxydation des LDL (Steinberg *et al.* 1989), qui transforment les monocytes en cellules spumeuses.

4.2. Marqueurs pancréatiques

Les données rapportant l'état de stress oxydant sur les tissus frais humains sont *quasi* inexistantes. Parallèlement à l'existence d'une masse β -cellulaire réduite, quelques marqueurs de dommages oxydatifs ont néanmoins été rapportés chez les sujets DT2. Notamment Sakuraba *et al.* qui ont montré que le 8-OHdG est corrélé à la faible masse β -cellulaire et les HNE sont accrus, tandis que l'expression de SOD-1 est réduite (Sakuraba *et al.* 2002).

II. Types de traitements du diabète type 2

1. Mesures hygiéno-diététiques

1.1. Les mesures nutritionnelles

Selon l'OMS « Une mauvaise alimentation et la sédentarité comptent parmi les principales causes de maladies non transmissibles majeures, y compris les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 ». En général, un régime équilibré associé à une activité physique régulière permet de maintenir un poids normal. Par ailleurs, éviter la cigarette et la sédentarité permet d'éliminer l'atteinte du diabète de type 2 (Schulze & Hu 2005). Des études ont montré que les régimes à index glycémique bas ont plus d'effets bénéfiques que les régimes à index élevé sur le LDL-cholestérol et le HDL cholestérol, l'insulino-résistance et sur l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1. Le régime contenant les glucides complexes que l'on retrouve dans les fruits, les légumes et les graines entières (des aliments satiétogènes), permet un apport de moins de calories que les aliments riches en graisses. Les aliments riches en vitamines, minéraux et fibres sont également conseillés aux diabétiques. Ce régime a toujours montré un effet sur la réduction de la mortalité chez les patients à haut risque (Astrup 2001). Il est recommandé de maintenir à l'âge adulte un poids normal avec un indice de masse corporel (IMC), une activité physique régulière et de prévenir l'obésité abdominale. Les graisses saturées doivent également être inférieures à 7 % de l'énergie totale (Steyn *et al.* 2004).

Un régime riche en graisses induit plus une obésité que celui riche en glucides et pauvre en graisses, ces deux régimes étant associés à une sédentarité (Shepard *et al.* 2001).

Augmenter l'activité physique et réduire la consommation de graisses est en effet plus efficace pour la prévention de l'augmentation du poids et de l'obésité (Astrup 1999).

1.2. Activité physique

L'activité physique régulière est recommandée depuis longtemps aux patients diabétiques. Elle améliore les anomalies du syndrome métabolique : augmentation de la sensibilité à l'insuline, diminution de la masse grasse, modification du profil lipidique dans un sens moins altéragène, augmentation de la fibrinolyse, diminution de la pression artérielle et diminution de l'incidence du diabète type 2 (Perez-Martin *et al.* 2001; Balkau *et al.* 2008).

Il a été montré que l'exercice physique réduisait les taux du cholestérol, des triglycérides et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Hebert & Lopez 1975).

Ces résultats semblent en relation avec l'augmentation de l'expression des transporteurs du glucose et/ou la stimulation de l'expression des récepteurs 1 à l'insuline au niveau du muscle induite par l'exercice physique. Cet exercice permet d'augmenter la dépense énergétique et par conséquent la réduction du poids corporel (Dohm 2002; Henriksen 2002).

2. Traitement pharmacologique (antidiabétiques oraux)

Les antidiabétiques oraux, associés à des mesures hygiéno-diététiques constituent le traitement initial et essentiel du diabète de type 2. En cas d'échec thérapeutique témoignant d'un déficit majeur de l'insulino-sécrétion, l'insuline doit être envisagée (l'insulinothérapie ne sera pas développée ici). Les antidiabétiques oraux peuvent être classés en cinq familles pharmacologiques selon leur site d'action :

- ✓ les sulfamides et les glinides stimulent la sécrétion d'insuline par la cellule β ,
- ✓ la metformine agit essentiellement en diminuant la production hépatique de glucose mais potentialiserait aussi l'action de l'insuline au niveau musculaire,
- ✓ les glitazones augmenteraient la captation musculaire du glucose par la baisse des triglycérides et acides gras libres circulants,
- ✓ les inhibiteurs des alphaglucosidases (acarbose, miglitol) diminuent l'absorption par la muqueuse intestinale des sucres apportés par l'alimentation, et ont donc essentiellement une action sur la glycémie post-prandiale.

Sulfamides, glinides, glitazones et metformine diminuent l'insulino-résistance.

2.1. Sulfamides hypoglycémiant

Les sulfamides hypoglycémiant ou sulfonylurées ont été découverts en 1942 et leur utilisation a débuté avec le carbutamide en 1955. Le dérivé le plus récent est le glimépiride (1996), efficace avec une seule prise quotidienne (Chehade & Mooradian 2000; Campbell 2000).

2.1.1. Pharmacodynamie

Les sulfamides hypoglycémiant agissent principalement en stimulant la libération d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Cet effet repose sur une augmentation de la réponse de ces cellules au stimulus physiologique qu'est le glucose. Ils se lient à une protéine membranaire qui est leur récepteur spécifique, provoquant la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP au niveau de la membrane de la cellule β . La fermeture de ces canaux potassiques induit une dépolarisation de la membrane, entraînant une augmentation de l'entrée de calcium dans la cellule (par ouverture des canaux calciques). L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire stimule la libération d'insuline par exocytose des granules d'insuline. De plus, les sulfonylurées semblent exercer des effets extrapancréatiques par amélioration de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline et diminution de la captation d'insuline par le foie (Chatterjee & Davies 2015; Waldhausl 1996).

2.1.2. Effets indésirables

Des effets indésirables sont observés chez 3 à 4 % des patients recevant des sulfamides hypoglycémiant : réactions cutanées (0,1 %), troubles gastro-duodénaux (1 à 3 %) ; les complications hématologiques sont rares, 0,1 % (anémie hémolytique, thrombopénie, agranulocytose). L'hypoglycémie est l'effet secondaire le plus grave associé à l'utilisation des sulfamides hypoglycémiant surtout chez les sujets âgés et les patients avec une insuffisance rénale sont les plus exposés aux accidents hypoglycémiques (Krentz *et al.* 1994).

Les autres facteurs de risque de survenue d'accidents hypoglycémiques identifiés sont la prise de boissons alcoolisées, la suppression d'un repas, un exercice physique inhabituel, la malnutrition, la prise de médicaments potentialisateurs, une hyperglycémie

modérée avant traitement, un non respect de la majoration progressive des doses de sulfamides hypoglycémisants et une hépatopathie. Les hypoglycémies apparaissent plus nombreuses et plus sévères avec le glibenclamide (Krentz *et al.* 1994).

2.2. Biguanides (metformine)

Commercialisées depuis les années 50, les biguanides n'ont aujourd'hui pour seul représentant que la metformine, depuis le retrait vers la fin des années 1970 de la phenformine et de la buformine en raison d'un risque important d'acidose lactique (Chehade & Mooradian 2000;Campbell 2000).

2.2.1. Pharmacodynamie

Contrairement aux sulfamides, la metformine ne stimule pas la sécrétion d'insuline : elle n'a pas d'effet hypoglycémiant chez le sujet non diabétique ; chez le diabétique, elle permet de réduire l'hyperglycémie sans entraîner d'accident hypoglycémique (sauf en cas de jeûne ou d'association synergique). Le mode d'action périphérique de la metformine est une diminution de la production hépatique de glucose (néoglucogénèse) à partir du lactate et du pyruvate, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline et de l'utilisation cellulaire du glucose par une action sur les substrats IRS du récepteur de l'insuline. Elle entraîne également un ralentissement de l'absorption intestinale du glucose. Elle aurait des effets favorables sur le métabolisme lipidique, en réduisant le cholestérol total et le LDL-cholestérol, ainsi que les triglycérides totaux (Campbell 2000;DeFronzo *et al.* 1991) .

2.2.2. Effets indésirables

Les principaux effets secondaires rencontrés en pratique courante sont digestifs (anorexie, nausées, troubles du transit, diarrhée, goût métallique dans la bouche). Ils sont prévenus par la majoration progressive des posologies et la prise de metformine avec des aliments ou juste après les repas.

L'effet indésirable le plus grave des biguanides est l'acidose lactique. Son incidence était élevée avec la phenformine actuellement retirée du marché : 0,4/ 1000 patients - année ; l'incidence de cet accident est faible avec la metformine : 0,024 / 1000 patients – année (1 patient-année = 1 patient traité pendant une année par 1 molécule donnée).

La metformine n'est pas métabolisée par biotransformations; elle est présente dans le plasma sous forme libre et est éliminée par le rein. Donc, en cas d'insuffisance rénale, la metformine risque de s'accumuler et donc une contre-indication à sa prescription (Krentz *et al.* 1994).

2.3. Thiazolidinediones ou glitazones

Le premier représentant des thiazolidinediones, la troglitazone, a été mis sur le marché japonais puis américain et anglais en 1997 (Chehade & Mooradian 2000;Day 1999).

2.3.1. Pharmacodynamie

Les thiazolidinediones semblent améliorer la sensibilité périphérique à l'insuline au niveau des tissus adipeux, du muscle et du foie. Elles stimulent l'adipogénèse ce qui conduit à une diminution des acides gras libres circulants. La captation du glucose est ainsi améliorée. Elles diminueraient l'insulino-résistance par action sur les récepteurs activateurs de la prolifération des peroxysomes dénommés *peroxisomal proliferator activated receptor gamma* (PPAR- γ). Ces derniers modulent la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (activation des GLUT 4 et diminution de la gluconéogenèse hépatique) et dans le métabolisme des lipides (stimulation de l'adipogénèse et augmentation du stockage des acides gras) disponibles dans les adipocytes et les myocytes, ou restent à explorer telles que la diminution du TNF α ou de la leptine (Day 1999).

2.3.2. Effets secondaires

Les glitazones augmentent le poids corporel (2 à 3 kg) par accumulation de lipides au niveau sous cutané (augmentation de la lipogénèse et adipogénèse, et diminution de la lipolyse), ce qui pourrait être problématique pour les personnes souffrant déjà d'embonpoint. Elle est aussi responsable de la réduction de la masse osseuse qui pourrait augmenter l'incidence de fracture des membres supérieurs (main, humérus) et inférieurs (pieds, chevilles) surtout chez les femmes post ménopausées sous traitements de glitazone. De plus, plusieurs études ont rapporté que la prise de rosiglitazone augmente le risque d'insuffisance cardiaque en induisant une rétention de fluide avec œdèmes chez certains patients et par conséquent pourrait induire le risque d'infarctus du myocarde. En Europe,

l'EMA (Agence européenne du médicament) a évalué le rapport bénéfices/risques de la prise de la rosiglitazone dans le traitement du diabète de type 2 et a recommandé la suspension des autorisations de mise sur le marché des ces médicaments en raison de l'augmentation du risque cardiovasculaire engendré (Campbell 2000;Krentz *et al.* 1994).

La rosiglitazone est donc prescrite avec le consentement du patient et en dernier lieu, lorsqu'aucun autre antidiabétique ne suffit pour contrôler adéquatement la glycémie sanguine.

2.4. Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase

2.4.1. Pharmacodynamie

Les α -glucosidases intestinales, sont des enzymes qui se retrouvent au niveau de la surface des villosités de l'intestin grêle. Ils sont responsables de l'hydrolyse des résidus d'amidon, d'oligosaccharides et de disaccharides afin de libérer du glucose. Cette hydrolyse est nécessaire à l'absorption digestive des glucides, puisque seuls les monosaccharides (glucose ou fructose) peuvent y être absorbés. L'inhibition de cette enzyme par l'acarbose (Glucobay®), le miglitol (Diastabol®) ou l'émiglitate réduit ou ralentit l'absorption digestive intestinale du glucose, aboutissant donc à une baisse des glycémies postprandiales. Cette classe de médicaments est par contre moins puissante que les autres antidiabétiques oraux et leur efficacité n'est pas démontrée à long terme. Elles sont utilisées pour les patients ayant une légère hyperglycémie postprandiale (Johnston *et al.* 1998;Hotta *et al.* 1993).

2.4.2. Effets secondaires

Les principaux effets secondaires des inhibiteurs des alphaglucohydrolases intestinales sont digestifs, liés à l'arrivée d'oligosaccharides dans le colon, favorisant la croissance bactérienne et à la présence de substance osmotiquement actives dans la lumière intestinale; les manifestations cliniques, qui affectent dans certaines séries jusqu'à 50 % des patients, sont représentées par des flatulences, un météorisme et de la diarrhée. La majoration progressive de la posologie limite ces effets secondaires. L'acarbose peut être utilisé chez l'insuffisant rénal lorsque le débit de filtration glomérulaire est > 25 ml/min. L'acarbose et le miglitol n'induisent pas d'hypoglycémie lorsqu'ils sont utilisés seuls.

L'acarbose et le miglitol sont contre-indiqués durant la grossesse et l'allaitement (Dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché) (Krentz *et al.* 1994).

Chapitre 2 : Phytothérapie et principes actifs des plantes

I. Phytothérapie

1. Introduction

Le traitement actuel du diabète est efficace dans la baisse de la glycémie, cependant le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas, ce qui conduit à long terme à l'émergence de complications très sérieuses. L'essor récent de la phytothérapie offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques. L'Algérie (comme le Maroc!!), riche par sa biodiversité et son climat, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules hypoglycémiantes originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication.

L'humanité n'a pas attendu la seconde moitié du XX^e siècle pour se soigner. Depuis des millénaires, tous les peuples ont élaboré des médecines selon leur intelligence, leur génie, leur conception culturelle de la santé et de la maladie et les rapports qu'ils entretenaient avec leur environnement. L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique aussi vieille que l'histoire de l'humanité. D'après les données archéologiques et anthropologiques, cette pratique remonterait à l'âge paléolithique moyen il y a quelque soixante mille ans.

L'expression « médecine traditionnelle » se rapporte aux pratiques, méthodes, savoirs et croyances en matière de santé qui impliquent l'usage à des fins médicales de plantes, de parties d'animaux et de minéraux, de thérapies spirituelles, de techniques et d'exercices manuels, séparément ou en association, pour soigner, diagnostiquer et prévenir les maladies ou préserver la santé (WHO 2002).

2. La phytothérapie dans le monde

La phytothérapie est une thérapie médicale qui utilise les plantes pour élaborer des remèdes destinés à améliorer le bien-être général et à soigner. Nombre de plantes contiennent des principes actifs qui peuvent avoir les mêmes propriétés que des médicaments de synthèse. Au contraire de l'allopathie qui utilise des principes actifs purs pour produire des médicaments, la phytothérapie utilise la plante ou ses extraits. Les plantes médicinales sont faciles à utiliser, seraient potentiellement efficaces et peu coûteuses. Le mode de préparation et d'administration sont des facteurs déterminants dans un traitement.

Actuellement, selon les estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays sous-développés, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires (Farnsworth *et al.* 1985). Il est aujourd'hui largement reconnu que le monde végétal constitue la source majeure de médicaments, grâce à la richesse des produits dits du métabolisme secondaire. Les plantes sont une source inépuisable de substances biochimiques : tanins, glucosides, polyphénols, flavonoïdes, saponines, etc., et qui procurent des propriétés curatives appréciables et qu'aucune chimie synthétique et combinatoire ne peut nous offrir.

L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, surtout dans le cas des maladies chroniques, la forte incidence des effets indésirables qui leur sont associés et l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les pays en voie de développement font qu'une large tranche de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine naturelle, complémentaire ou parallèle pour se soigner (voir tab. 2)(Eddouks *et al.* 2007).

Tableau 2. Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle et complémentaire dans le monde (Eddouks *et al.* 2007)

Pays ou région	Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle
Afrique	Utilisée par 80 % de la population locale pour les soins primaires.
Australie	Utilisée par 49 % d'adultes.
Chine	Intervient pour 30 à 50 % dans les systèmes de santé. Complètement intégrée dans les systèmes de santé. 95 % des hôpitaux ont des unités de médecine traditionnelle
Inde	Largement utilisée. 2 860 hôpitaux ont des unités de médecine traditionnelle.
Indonésie	Utilisée par 40 % de la population totale et 70 % de la population rurale
Japon	72 % des médecins pratiquent la médecine traditionnelle.
Thaïlande	Intégrée dans 1 120 centres hospitaliers
Vietnam	Complètement intégrée dans les systèmes de santé. 30 % de la population se soignent par la médecine traditionnelle.
Pays occidentaux	La médecine traditionnelle ou complémentaire n'est pas intégrée dans les systèmes de soin moderne. * France : 75 % de la population a recours à la médecine traditionnelle au moins une fois. * Allemagne : 77 % des cliniques pratiquent l'acupuncture. *Etats-Unis : de 29 à 42 % de la population utilisent la médecine complémentaire.

3. La phytothérapie en Algérie

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales ont été le principal, voir l'unique recours de la médecine. En Algérie, les plantes médicinales et les remèdes n'ont jamais été totalement abandonnés et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne.

Les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement de plusieurs maladies en Algérie, y compris le diabète. Des enquêtes ethnobotaniques récentes effectuées dans le but de répertorier les plantes médicinales antidiabétiques dans l'Ouest Algérien (Allali *et al.* 2008) et l'Est Algérien (Hamza *et al.* 2015), soulignent l'importance qu'occupe ce patrimoine végétal dans la pharmacopée traditionnelle et surtout dans le traitement du diabète. Dans la région de Tlemcen, les informations ethnobotaniques recueillies par Benmehdi en 2000 confirment l'importante dépendance de la population locale vis-à-vis les plantes médicinales pour traiter le diabète. Plus de 80 espèces de plantes médicinales ont été répertoriées dans cette région et sont utilisées seules ou en combinaison avec les médicaments de synthèses (Benmehdi, 2000).

De nombreuses plantes utilisées en Algérie sont réputées posséder une action antidiabétique avec un usage fréquent dans une grande partie de la population. Parmi ces plantes, certaines ont un effet déjà mis en évidence telles que : *Ajuga iva* (Boudjelal *et al.* 2015; Taleb-Senouci *et al.* 2009) *Trigonella foenum-graecum* (Hamza *et al.* 2015; Mowla *et al.* 2009), *Artemisia herba-alba* (Hamza *et al.* 2015; Boudjelal *et al.* 2015) *Nigella sativa* (Alimohammadi *et al.* 2016), *Zygophyllum album*, (Mnafgui *et al.* 2016), *Globularia alypum* (Jouad *et al.* 2002) . Cependant, un grand nombre de plantes réputées antidiabétiques n'a pas encore fait l'objet d'études expérimentales.

4. Ethnopharmacologie

L'approche ethnopharmacologique, qui vise l'évaluation scientifique de l'ensemble des pratiques traditionnelles relatives à la médication par les plantes et les substances d'origine naturelle et la mise en évidence de leurs propriétés curatives, constitue la principale voie de découverte de nouvelles molécules candidates à servir de médicaments (Fabricant & Farnsworth 2001; Farnsworth *et al.* 1985). Ainsi, sur 252 médicaments

considérés comme essentiels par l’OMS, plus de 11 % sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales (Rates 2001).

Plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques ont été menées à travers le monde pour recenser les plantes antidiabétiques utilisées dans les différentes pharmacopées traditionnelles (Jouad *et al.* 2001; Wang & Ng 1999; Minaiyan *et al.* 2011; Ostovan *et al.* 2017). Les informations ethnobotaniques recueillies dans plusieurs régions du monde estiment que plus de 1 200 espèces végétales, soit plus de 725 genres appartenant à 183 familles, sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes (Bailey & Day 1989; Marles & Farnsworth 1995). Les investigations ethnopharmacologiques sont actuellement centrées sur la validation expérimentale des propriétés curatives, traditionnellement attribuées à ces remèdes. Dans 81 % des cas, les indications traditionnelles de plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées (Marles & Farnsworth 1995). Certaines de ces plantes, dont l’activité pharmacologique a été confirmée sur des modèles animaux, ont également fait l’objet de plusieurs études cliniques (Ernst 1997). Pour plusieurs plantes, les composés actifs responsables de l’activité pharmacologique ont été identifiés et isolés et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets thérapeutiques ont été partiellement ou complètement élucidés.

L’approche ethnopharmacologique est d’une grande importance dans ce domaine, elle pourrait conduire à la découverte de nouveaux médicaments pour le traitement pharmacologique du diabète (Oubre *et al.* 1997). L’exemple classique est celui de *Galega officinalis*, une plante largement utilisée dans le traitement du diabète en Europe médiévale. Les premières investigations ont révélé la présence de guanidines en forte concentration dans cette plante (Oubre *et al.* 1997). Plus tard, les propriétés hypoglycémiantes des guanidines ont été mises en évidence, ce qui a conduit à la découverte de la troisième génération des guanidines.

Tableau 3. Plantes antidiabétiques les plus utilisées en Algérie (Hammiche & Maiza 2006;Azzi *et al.* 2012)

Famille	Nom latin	Nom vernaculaire	Nom français	Partie utilisée	mode de préparation
Amaranthaceae	<i>Atriplex halimus L.</i>	El gtaf	Atriplex	Feuilles	Décoc
	<i>Allium sativum L.</i>	Toum	Ail	Bulbe	Cru
	<i>Allium cepa L.</i>	Elbesla	Onion	Bulbe	Cru
Apiaceae	<i>Ammi visnaga Lam.</i>		Khella, Ammi		
	<i>Apium graveolens L.</i>	Bachnikha	Céleri	Fruit	Décoc
	<i>Petroselinum crispum (Mill.) Fuss</i>	Krafess	Persil	Graine,Partie aérienne	Décoc, cru
	<i>Ammoides pusilla (Brot.) Breistr.</i>	Maâdnous		Graine, Partie aérienne	Décoc, cru
	<i>Pituranthos chloranthus B. and H</i>	Nûnkha	Ptychotis	Partie aérienne	Infu
	<i>Pituranthos scoparius B and L</i>	Aljène	Not found	Partie aérienne	Infu
Apocynaceae	<i>Nerium oleander L</i>	Guezeh	Not found	Partie aérienne	Infu
	<i>Nerium oleander L</i>	Defla	Laurier rose	Feuille	Décoc, infu,macera
Asclepiadaceae	<i>Periploca laevigata Ait</i>	Hallaba	Not found	Partie aérienne, graine	Décoc
	<i>Solenostemma oleifolium B. and B</i>	ardjel	Not found	Partie aérienne, feuille	Décoc
Asteraceae	<i>Anacyclus pyrethrum (L.) Link</i>	Tagandass	Pyrèthre	Racine	Décoc
	<i>Matricaria chamomilla L.</i>	Babounidj	Camomille sauvage	Racine, feuille, fleur	Infu
	<i>Artemisia absinthium L.</i>	Chiba	Absinthe	Partie aérienne	Infu
	<i>Artemisia herba-alba Asso</i>	Chih	Armoise blanche	Tige, Partie aérienne,	Poud, décoc, infu
	<i>Helianthus annuus L.</i>	Nouarat chameess	Tournesol	racine	Poud
	<i>Taraxacum officinale F.H. Wigg.</i>	Garnina	Pissenlit officinal	Racine	Décoc, poud
	<i>Dittrichia viscosa (L.) Greuter</i>	Magramâne	Aunée visqueuse	Racine, feuille	Décoc

	<i>Arctium lappa L.</i>	Arkitoun	Bardane	Racine, feuille, fleur	Décoc, infu
	<i>Anvillea radiata C. and D.</i>	Noug	Not found	Partie aérienne	Décoc, infu
	<i>Astericus graveolens (Forsk.) DC.</i>	Amayou	Tournesol	Partie aérienne	Décoc
	<i>Pulicaria crispa Schultz.</i>	Arfedj	Not found	Partie aérienne	Décoc
	<i>Pulicaria undulata (L.)</i>	Not found	Not found	Partie aérienne	Décoc
Berberidaceae	<i>Berberis vulgaris L.</i>	Elghris	L'épine-vinette	Racine, feuille	Décoc, infu
Brassicaceae	<i>Lepidium sativum L.</i>	Hab err-chad	Resson alenoise	Graine	Décoc
	<i>Raphanus sativus L.</i>	Jirjir, fidjel	Radis	Graine	Infu
	<i>Brassica oleracea L.</i>	Kroumb	Chou	Partie aérienne	Décoc, jus
Cactaceae	<i>Opuntia ficus-indica (L.) Mill.</i>	Hindiya	Figuier de Barbarie	Fleur	Décoc
Caryophyllaceae	<i>Paronychia arabica L.</i>	souifa	Not found	Partie aérienne	Infu
Capparaceae	<i>Capparis spinosa L.</i>	Kebbar	Câprier	Partie aérienne, fruit	Décoc
Cucurbitaceae	<i>Citrullus colocynthis (L.) Schrad.</i>	Handal, lahdedj	Coloquinte	Fruit	Mecera, usage externe
Cupressaceae	<i>Tetraclinis articulata (Vahl) Mast.</i>	Araâr	Thuya	Feuille	Macera
Fabaceae	<i>Lupinus albus L.</i>	Termas mur	Lupin blanc	Graine	Décoc
	<i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	Halba	Fenugrec	Graine	Décoc, macera, poud
	<i>Retama raetam (Forssk.) Webb</i>	R'tum	Retam	Feuille	Décoc
Gentianaceae	<i>Centaurium erythraea Rafn</i>	Merrâret lehnech	Petite centaurée	Partie aérienne	Infu
Geraniaceae	<i>Geranium robertianum L.</i>	Laatarcha	Géranium Robert	Feuille, fleur	Infu

Lamiaceae	<i>Ajuga iva (L.) Schreb.</i> <i>Lavandula stoechas L.</i> <i>Marrubium vulgare L.</i> <i>Mentha pulegium L.</i> <i>Origanum compactum Benth.</i> <i>Origanum majorana L.</i> <i>Rosmarinus officinalis L.</i> <i>Salvia officinalis L.</i>	Chendgoura Halhal Marrîwa Fliou Zâtar Bardakouche Yazir, barakella Mrimra, salmiya	Ivette, petit if Lavande Marrube blanc Pouliot Origan Marjolaine Romarin Sauge	Partie aérienne Feuille Partie aérienne Partie aérienne Feuille Feuille Partie aérienne, feuille Feuille	Décoc Décoc, infu Décoc Infu Infu Infu Décoc, infu Infu
Lauraceae	<i>Cinnamomum cassia Lour.</i> <i>Laurus nobilis L.</i> <i>Marrubium deserti De Noe.</i>	El Korfa Rand Meriout	Cannelle Laurier Not foud	Partie aérienne Feuille Feuille	Décoc Infu Infu
Lythraceae	<i>Lawsonia inermis L.</i> <i>Punica granatum L.</i>	Hanna Rommane	Henné Grenadier	Feuille Précarpe	Décoc Décoc, poud
Moraceae	<i>Ficus carica L.</i>	Karmouss	Figuier	Feuille, fruit	Décoc, Cru
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus Labill.</i> <i>Maerua crassifolia Forsk</i>	Kalitouss Rihan	Eucalyptus Myrthe	Feuille, fruit Feuille	Décoc Infu
Oleaceae	<i>Olea europaea L.</i>	Zitoun, Zebouj	Olivier	Feuille, fruit	Décoc, infu , huile
Orobanchaceae	<i>Cistanche tinctoria (Desf.) Beck.</i>	Danoun	Not found	Partie aérienne	Décoc
Pedaliaceae	<i>Sesamum indicum L.</i>	Jenjlen	Sésame	Graine	Infu
Plantaginaceae	<i>Globularia alypum L</i>	tasselgha	Globulaire	Feuille	Décoc, infu
Ranunculaceae	<i>Nigella sativa L.</i>	Sanouj, El haba Sawda	Nigelle	Graine	Décoc, poud

Rhamnaceae	<i>Ziziphus lotus (L.) Lam.</i>	Sadra	Jujubier	Feuille	Décoc
Rosaceas	<i>Crataegus laevigata (Poir.) DC.</i>	Zaârour, Ain Bagra	Aubépine	Fruit	Décoc
	<i>Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl</i>	Lmzah	Néflier	Feuille	Décoc
	<i>Prunus dulcis (Mill.) D.A.Webb</i>	Louz mur	Amandier	Graine	Décoc, infu
Salvadoraceae	<i>Salvadora persica</i> Garcin	Missouak	Arabe brosse à dent	Cortex	Décoc
Salicaceas	<i>Populus nigra L.</i>	Safsaf	Peuplier noir	Feuille	Décoc
Solanaceae	<i>Capsicum frutescens L.</i>	Felfel har	Chili pepper	Graine	Cru
Theaceae	<i>Camellia sinensis (L.) Kuntze</i>	Tay	thé vert	Feuille	Infu, décoc
Urticaceae	<i>Urtica dioica L.</i>	Harriga	Ortie	Partie aérienne	Infu
Verbenaceae	<i>Aloysia citriodora Palau</i>	Louiza	Verveine	Feuille	Infu, décoc
Xanthorrhoeaceae	<i>Aloe vera (L.) Burm.f.</i>	Morw sbar, Siber	Aloès	Feuille	Infu
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	Zenjabil, Skingebir	Gingembre	Rhizome	Macera
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum album L.</i>	Aggaya	Not found	Feuille	Infu
	<i>Peganum harmala L.</i>	Harmel	Harmel	Graine	Macera
	<i>Balanites aegyptiaca Del</i>	Zekkoum	Acacia dattier	Feuille	Décoc

Décoc: décoction; Infu: infusion; Macera: macération.

5. Modes d'actions des plantes antidiabétiques

Une très grande variété de mécanismes est impliquée dans la baisse du niveau de glucose dans le sang. Ceci est dû à la grande variété de classes chimiques des constituants hypoglycémiantes provenant des plantes. L'activité antidiabétique des plantes peut dépendre de plusieurs mécanismes (Cefalu *et al.* 2011).

- ✓ Réduction de la résistance à l'insuline ;
- ✓ Stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β ou/et inhibition du processus de dégradation de l'insuline ;
- ✓ Apport de quelques éléments nécessaires comme le Calcium, le Zinc, le Magnésium, le Manganèse et le Cuivre pour les cellules β ;
- ✓ Régénération ou/et réparation des cellules pancréatiques β lésées ;
- ✓ Effet protecteur de la destruction des cellules β ;
- ✓ Augmentation le nombre de cellules β dans les îlots de Langerhans ;
- ✓ Inhibition de la réabsorption rénale du glucose ;
- ✓ Inhibition de β -galactosidase, α -glucosidase et α -amylase ;
- ✓ Prévention du stress oxydatif, qui peut être impliqué dans le dysfonctionnement des cellules β ;
- ✓ Stimulation de la glycogénèse et de la glycolyse hépatique ;

II. Principes actifs hypoglycémiantes des plantes médicinales

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les métabolites naturellement présents qui lui confèrent son activité thérapeutique. Ces composants sont souvent en quantité extrêmement faible en ce qui concerne les métabolites secondaires. Les plantes sont une source inépuisable de substances pharmacologiques (alcaloïdes, polyphénols, terpènes, polysaccharides, etc.) qui procurent des propriétés curatives appréciables.

1. Polyphénols

Les polyphénols sont des agents réducteurs, c'est-à-dire des molécules qui possèdent des propriétés antioxydantes et antidiabétiques. Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composants comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ils pourraient contribuer aux propriétés antidiabétiques.

Diverses études expérimentales ont mis en évidence des activités hypoglycémiantes de certains polyphénols (Peungvicha *et al.* 1998). Les polyphénols pourraient favoriser la captation du glucose plasmatique par les cellules et en augmenter son utilisation, deux éléments qui améliorent la sensibilité à l'insuline. Plus précisément, les polyphénols ou leurs métabolites en circulation agiraient directement en modulant l'activité ou l'expression de différentes molécules impliquées dans les voies de signalisation cellulaire de l'insuline afin de stimuler la captation du glucose par les transporteurs GLUT4 ou GLUT1 (Kim *et al.* 2016). Ainsi, l'acide 4-hydroxybenzoïque, les anthocyanes mais aussi un extrait de thé vert administré oralement chez le rat diminuent le pic de glycémie après un test de tolérance au glucose ou après la consommation d'un régime riche en maltose (Peungvicha *et al.* 1998; Sabu *et al.* 2002). De tels effets pourraient s'expliquer par une inhibition de glucosidases ou de transporteurs de glucose au niveau de la barrière intestinale qui limiterait ainsi l'absorption intestinale du glucose.

Une hypothèse explique les effets hypoglycémiantes des polyphénols par une augmentation de la captation du glucose par les tissus périphériques. Cet effet est démontré par une augmentation de l'absorption du glucose par des cellules musculaires, ou des adipocytes de rats ou de souris mises en culture en présence d'acide caféique ou d'épigallocatechine gallate (RA & Polansky 2002).

L'administration orale de l'acide férulique à des doses faibles produit une activité hypoglycémiantes significative dans le diabète de type 1 (induit chez la souris par la STZ) et dans le diabète de type 2. Certains polyphénols pourraient avoir une action sur la glycémie en modifiant la réabsorption rénale du glucose, comme cela avait déjà été mis en évidence avec la phloridzine, ou démontré par un régime supplémenté en pommes lyophilisées, chez le rat rendu diabétique par la STZ (Dimitrakoudis *et al.* 1992).

Deux essais cliniques ont été réalisés, l'une portant sur des sujets atteints d'un diabète de type 2 recevant par voie orale un complexe d'extrait d'orange rouge (50 mg/j) pendant 2 mois (Bonina *et al.* 2002). La deuxième tenant sur des patients diabétiques de type 1 recevant un extrait enrichi en flavonoïdes et hespéridine (Keenoy *et al.* 1999). Les résultats de ces deux études montrent que le traitement des patients diabétiques avec différentes classes de polyphénols pourrait être bénéfique sur le plan thérapeutique afin de protéger contre les complications du diabète.

2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides. Les flavonosides sont très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes); tous (plus de 6000 structures) possèdent le même élément structural de base, le noyau flavane constitué de deux noyaux aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C (Vinayagam & Xu 2015).

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités hypocholestérolémiantes, antiinflammatoires, antihypertensives et antidiabétiques (Kim *et al.* 2004).

Les flavonoïdes peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. C'est le cas de la myricétine qui possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques (Ong & Khoo 2000).

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces ROS, par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ROS (Fiorucci *et al.* 2006).

La (-)-épicatéchine possède un effet protecteur des rats *Wistar* contre l'action diabéto-gène de l'alloxane. Ce flavanol agit en mimant l'action de l'insuline dans son action sur la membrane érythrocytaire acétylcholinestérase. Cet effet « insuline-like » est très prononcé chez les patients diabétiques de type 2 (Rizvi & Zaid 2001).

Certains flavonoïdes tels que la quercétine, la naringénine et le chrysin augmentent significativement la sécrétion d'insuline à partir des îlots de Langerhans isolés de rats. L'administration intrapéritonéale de la quercétine pour des rats normaux et rendus diabétiques par la streptozotocine, induit une réduction des taux de glucose sanguin des rats diabétiques; ceux des rats normaux ne sont pas touchés par cette action.

La quercétine diminue également les taux de glucose chez des rats diabétiques en réponse à un test de tolérance au glucose. Elle réduit significativement le cholestérol et les

triglycérides plasmatiques, augmente l'activité des glucokinases hépatiques probablement par l'augmentation de la sécrétion d'insuline, à partir des îlots pancréatiques des rats diabétiques (Vessal *et al.* 2003).

3. Alcaloïdes

Plusieurs alcaloïdes isolés à partir de plantes médicinales ont montré une action hypoglycémiant sur différents modèles animaux. Le mode d'action est dû en partie à l'inhibition de l' α -glucosidase et à la diminution du transport du glucose à travers la barrière intestinale. D'autres alcaloïdes tels que la catharanthine, la vindoline et la vindolinine isolés à partir de *Catharanthus roseus* diminuent également le taux de glucose sanguin chez des rats normaux rendus diabétiques par la STZ (Chattopadhyay 1999;Tiong *et al.* 2013).

Parmi les alcaloïdes étudiés récemment, il apparaît plusieurs propriétés sont attribuées à la Berbérine : réduction de la production de glucose dans le foie, amélioration de la sensibilité à l'insuline, stimulation de l'absorption par les cellules du glucose sanguin et diminution du taux de sucre dans le sang. Ainsi, elle réduit de façon importante les problèmes potentiellement graves menaçant la vie des diabétiques en risquant de leur causer de terribles complications, comme l'insuffisance rénale (Chang 2017).

Le mécanisme d'action de la berbérine relève essentiellement de la régulation de l'AMPK (Adenosine Monophosphate activated Protein Kinase). Cette protéine kinase, activée par l'AMP, est une enzyme ubiquitaire fondamentale, qui participe à la normalisation du métabolisme énergétique et à la régulation de la prise alimentaire et de la sensibilité des tissus. Elle joue donc un rôle clef dans certaines pathologies métaboliques comme le diabète, l'insulino-résistance, l'obésité ou les complications liées au diabète (Zhao *et al.* 2012). Il a été démontré que les composés suivants, l'harmane, le norharmane, le pinoline et les beta-carbolines, sont connus pour avoir une action insulinosécrétrice par l'activation de l'imidazoline I3, site de fixation au niveau des cellules β pancréatiques. Ces composés augmentent la sécrétion d'insuline de deux à trois fois à partir des îlots de Langerhans isolés justifiant leur activité hypoglycémiant (Cooper *et al.* 2003).

4. Tanins

En 1962, Bate-Smith et Swain donnent aux tanins la définition suivante : « Ce sont des composants phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines ». On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins basés sur des différences structurales, les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables, ou tanins condensés.

Les tanins agissent sur le diabète lui-même au niveau cellulaire, en favorisant l'action de l'insuline (en diminuant la résistance à l'insuline) et sur les complications du diabète par leur pouvoir antioxydant et anti enzymatique, neutralisant l'effet des radicaux libres et limitant la réaction inflammatoire dans les différents tissus (Velayutham *et al.* 2012). Les proanthocyanidines exerceraient un effet antihyperglycémiant possiblement dû à l'activité insulino-mimétique d'une part et d'autre part en stimulant l'utilisation du glucose au niveau des cellules insulinosensitives *in vitro* (Pinent *et al.* 2004).

5. Terpènes

Les terpénoïdes et terpènes sont des composés aromatiques présents dans des milliers d'espèces de plantes, et sont à l'origine des différentes saveurs et parfums. Les triterpènes sont des composants bioactifs présents naturellement dans plusieurs plantes ayant une activité hypoglycémiante connue. Un triterpénoïde saponine isolé à partir de *Momordica charantia* a un effet « insuline-like » responsable de l'activité hypoglycémiante notamment dans le diabète de type 2 *in vitro* (Koneri *et al.* 2014) . L'andrographolide (diterpénoïde lactone) isolé à partir d'*Andrographis paniculata* exerce *in vitro* également une activité hypoglycémiante significative (Nugroho *et al.* 2014). Les cucurbitanes glycosides (momordicosides Q, R, S, et T) pourraient augmenter l'activité d'AMP-Kinase, une voie clé qui favorise l'absorption du glucose. En outre, les cucurbitanes améliorent l'oxydation des acides gras et l'élimination du glucose au cours des tests de tolérance au glucose chez les souris insulino-sensibles et insulino-résistantes. Ces résultats indiquent que les triterpénoïdes de *Momordica charantia* peuvent fournir des pistes en tant que classe de produits thérapeutiques pour le diabète et l'obésité (Tan *et al.* 2008).

6. Polysaccharides

Plusieurs plantes hypoglycémiantes indiennes contiennent des polysaccharides tels que : *Aloes vera*, *Ocimum sanctum*, *Alpinia galanga*. Un polysaccharide « protein-bound » isolé à partir du potiron (*Cucurbita maxima*) possède une activité hypoglycémiant à différentes doses (500 et 1000 mg/kg de poids) chez des rats rendus diabétiques par l'alloxane. Les résultats des études indiquent que ces polysaccharides augmentent l'insulinémie, en réduisant la glycémie et en améliorant la tolérance au glucose (Quanhong *et al.* 2005).

III. *Anvillea radiata* Coss & Dur

Le choix de la plante *Anvillea radiata* dans notre étude a été guidé par son usage dans la pharmacopée traditionnelle et par les études phytochimiques répertoriées dans la littérature.

1. Données botaniques

Les Asteraceae sont une famille cosmopolite comprenant plus de 1500 genres et plus de 25 000 espèces décrites dont 750 endémiques, distribuées principalement dans les zones tempérées du globe. C'est l'une des familles les plus importantes des angiospermes, la seconde en importance derrière celle des Orchidaceae.

Les Asteraceae sont des arbustes à feuillage persistant, des sous-arbrisseaux, des plantes herbacées vivaces, des plantes herbacées annuelles ou bisannuelles. Les caractères décrits ci-dessous sont ceux rencontrés le plus fréquemment mais il faut être conscient de la grande hétérogénéité de cette famille. Les feuilles sont simples, alternes ou opposées. Elles sont lobées ou dentées. Les canaux résinifères ou laticifères sont caractéristiques de la famille. Il en est de même pour l'inflorescence en capitule qui est un assemblage de nombreuses petites fleurs indépendantes entourées d'un involucre de bractées. L'ensemble donne l'impression d'une fleur unique. Les capitules sont généralement distribués en cymes, voire en épis ou en capitules composés. Le calice se transforme très souvent en aigrette avec des poils ou des barbes. Le fruit à une graine est souvent coiffé de l'aigrette. Cette immense famille est utile dans de nombreux domaines: plantes alimentaires

(tournesol); plantes insecticides (pyrèthre); plantes médicinales (camomille) (Barkely et al,2006).



Figure 7. Aspects morphologique d'*Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Photo prise par Benhouhou 2005).

2. Répartition géographique

Local: Nord et le centre du Sahara algérien (principalement les montagnes Tassili).

Régional: Afrique du Nord.

Mondial: Endémique du Sahara dans les dépressions sablo-argileuse.

3. Description morphologique

Anvillea radiata Coss. & Dur est une plante endémique saharienne poussant sous forme d'arbrisseau de 20 à 50 cm de hauteur, très rameux, à tiges et rameaux ligneux à la base. Les feuilles vert bleuté ont une forme de triangle allongée et à bord denté. Les inflorescences disposées en larges capitules jaune orangé sont entourées de feuilles rayonnantes qui passent progressivement aux bractées coriaces et piquantes. La plante dégage un léger parfum agréable. Les parties utilisées sont les capitules, les feuilles et les graines (Boullard 2001;Quezel 1963).

4. Classification

D'après Quezel et Santa (Quezel 1963), Guignard et Dupont (Guignard 2007) la classification qu'occupe *Anvillea radiata* Coss. & Dur est la suivante.

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophytes
Classe :	Eudicots
Ordre :	Asterales
Famille :	Asteraceae
Genre :	Anvillea
Espèce :	<i>Anvillea radiata</i> Coss. & Dur.
Nom vernaculaire en arabe :	<i>Noug</i>

5. La médecine traditionnelle et les connaissances locales

Selon la tradition locale, l'infusion ou la macération des feuilles et des tiges d'*Anvillea radiata* est utilisée dans le traitement des pathologie broncho-pulmonaires, digestives, troubles gastro-intestinaux, indigestion et les maladies du foie (Hammiche & Maiza 2006). Les pousses d'*Anvillea radiata* en infusion à froid ou à chaud, sont utilisées comme remède contre le diabète (Ghourri *et al.* 2013;Fakchich & Elachouri 2014)

6. Constituants

Anvillea radiata a fait l'objet de quelques études phytochimiques et pharmacologiques. En 2004, El Hassany et son équipe ont isolé à partir de la partie aérienne d'*Anvillea radiata* le germacranolide, 8 α et le 9 α -epoxyparthenolide, avec deux composés connus, 9 α -hydroxyparthenolide et parthenolid-9-one (Destandau *et al.* 2015;El Hassany *et al.* 2004). D'autres équipes ont identifié à partir d'*Anvillea radiata* les tanins, de l'oxalate de calcium, la saponine, les pectines, et le lactone sesquiterpénique (Lakhdar *et al.* 2013;Hamada & Ladjel 2015).

Vingt cinq composés phénoliques ont été caractérisés à partir de l'extrait méthanolique d'*Anvillea radiata*, dont sept composés correspondant aux dérivés d'acide chologinique et d'acide dicaffeoylquinique. Dix-huit flavonoïdes (dont cinq aglycones et treize glycosides) ont également été identifiés (Boukhris *et al.* 2016). Le 9 α -hydroxyparthenolide a été testé pour ses activités biologiques. Il a été démontré que ce composé possède une activité cytotoxique contre cinq lignées de cellules cancéreuses humaines et un pouvoir antibactérien contre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* et *Streptococcus C* (Moumou *et al.* 2014; El Hassany *et al.* 2004).

Dendougui *et al.* ont identifié 13 composés de flavonoïdes dont quatre aglycones et neuf flavonol glycosides (Dendougui *et al.* 2006).

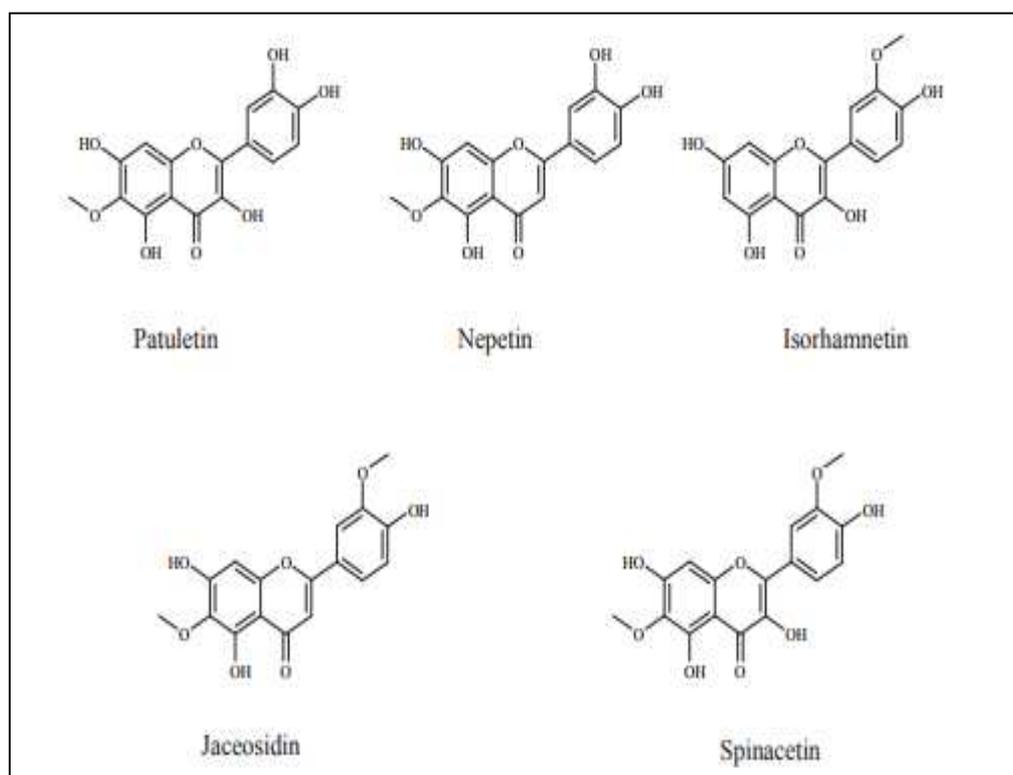


Figure 8. Structure des flavonoïdes aglycones identifiés dans l'extrait méthanolique d' *A radiata* (Boukhris *et al.* 2016).

Enfin, la caractérisation de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne d'*A. radiata* a fait l'objet d'une seule étude de (El Hanbali *et al.*, 2007). L'analyse chimique de cette huile révèle une prédominance en 6-oxocylonérolidol (66,6%) et en 6-

hydroxycyclonérolidol (11,4%). Ces auteurs rapportent également que ces huiles essentielles possèdent une excellente activité antimicrobienne vis-à-vis des microorganismes testées. A l'issue de cette recherche bibliographique, il est révélé aisément que les flavonoïdes et les sesquiterpènes lactones constituent principalement la majorité des métabolites secondaires que renferme cette plante. Ces composés possèdent des activités biologiques intéressantes (antifongique, antibactérienne, anti-inflammatoires anticancéreuse, antioxydante, ...) qui sont tout à fait typiques des plantes de la famille des Asteraceae en général.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

Les parties aériennes (fleurs et feuilles) d'*Anvillea radiata* Coss and Dur. a été récoltée de région d'El Oued (altitude, 69 m), au mois d'avril 2013. Les informations principales (nom locale, partie de plante collectée, méthode de préparation traditionnelle, usages médicaux habituels et administration) ont été obtenus auprès des habitants locaux ayant une connaissance ancestrale des propriétés curatives de la plante. La plante a été identifiée par le Prof. N. Khalfallah (Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Frères Mentouri (UFM), Constantine, Algérie. Un voucher spécimen (LBE13 / 01) a été déposé dans l'herbier de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'UFM. Le matériel végétal recueilli a été séché à une température ambiante à l'ombre pendant 30 jours et stocké dans un endroit sec avant utilisation.

2. Préparation des extraits

1.1. Extrait aqueux lyophilisé

Le matériel végétal séché (10 g) a été mis en suspension dans 200 ml d'eau chaude et agité pendant 30 minutes. Après filtration, l'extrait a été congelé dans l'azote liquide puis lyophilisé (CryotecModèle lyophilisant Cosmos, Saint-Gély-du-Fesc, France) à -80 °C. L'extrait aqueux lyophilisé (AQL) a été obtenu avec un rendement de 15% p/p et a été stocké à -20 °C jusqu'à utilisation.

1.2. Extraction par les solvants

Un diagramme schématique pour la préparation d'extraits organiques d'*A. radiata* est représenté sur la Figure 9.

Le protocole extractif a été effectué selon la méthode (Koleva *et al.* 2002;Bammou *et al.* 2015) et comporte les étapes suivantes. L'extraction a été réalisée par macération de 200 g de matériel végétal dans 1200 ml de méthanol, sous agitation magnétique pendant 24 h. Le mélange est filtré sur papier filtre Whatman n°1. La macération est renouvelée deux fois sur le résidu récupéré avec renouvellement du solvant pour permettre la solubilisation maximum des composés. Les trois macéras filtrés sont réunis pour donner l'extrait méthanolique brut. Celui-ci est évaporé à sec sous pression réduite à 37°C au *Rotavapor* et pesé pour déterminer son rendement. Le résidu sec est repris dans l'eau

distillée bouillante (300 ml) qui solubilise proportionnellement les flavonoïdes. La solution obtenue est laissée décanter pendant 24 heures puis filtrée sur tissu et papier filtre n° 1 afin d'éliminer les substances non phénoliques (impuretés, graisses, cires etc.). La solution aqueuse ainsi obtenue est soumise à une extraction liquide-liquide avec les solvants organiques suivants. La première extraction est réalisée l'éther de pétrole (4X100 ml) qui permet d'entraîner les graisses ainsi que les substances lipophiles; la deuxième avec l'acétate d'éthyle (4X100 ml) et la troisième avec le butanol (4X100 ml)

Le fractionnement est réalisé pendant 20 minutes et l'opération est répétée quatre fois. Les trois phases organiques ont été réunies et évaporées à sec sous pression réduite, puis pesées. La phase aqueuse résiduelle est également lyophilisée. Cinq fractions sont à la fin récupérées : fraction méthanolique (25,75 g, 12,8% p/p), fraction éther de pétrole (1,9 g, 0,95% p/p), fractions acétate d'éthyle (2,8 g, 1,4% p/p), fraction *n*-butanolique (2,9 g, 1,4% p/p) et fraction aqueuse résiduelle (12 g, 6% p/p). Les fractions ont été conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

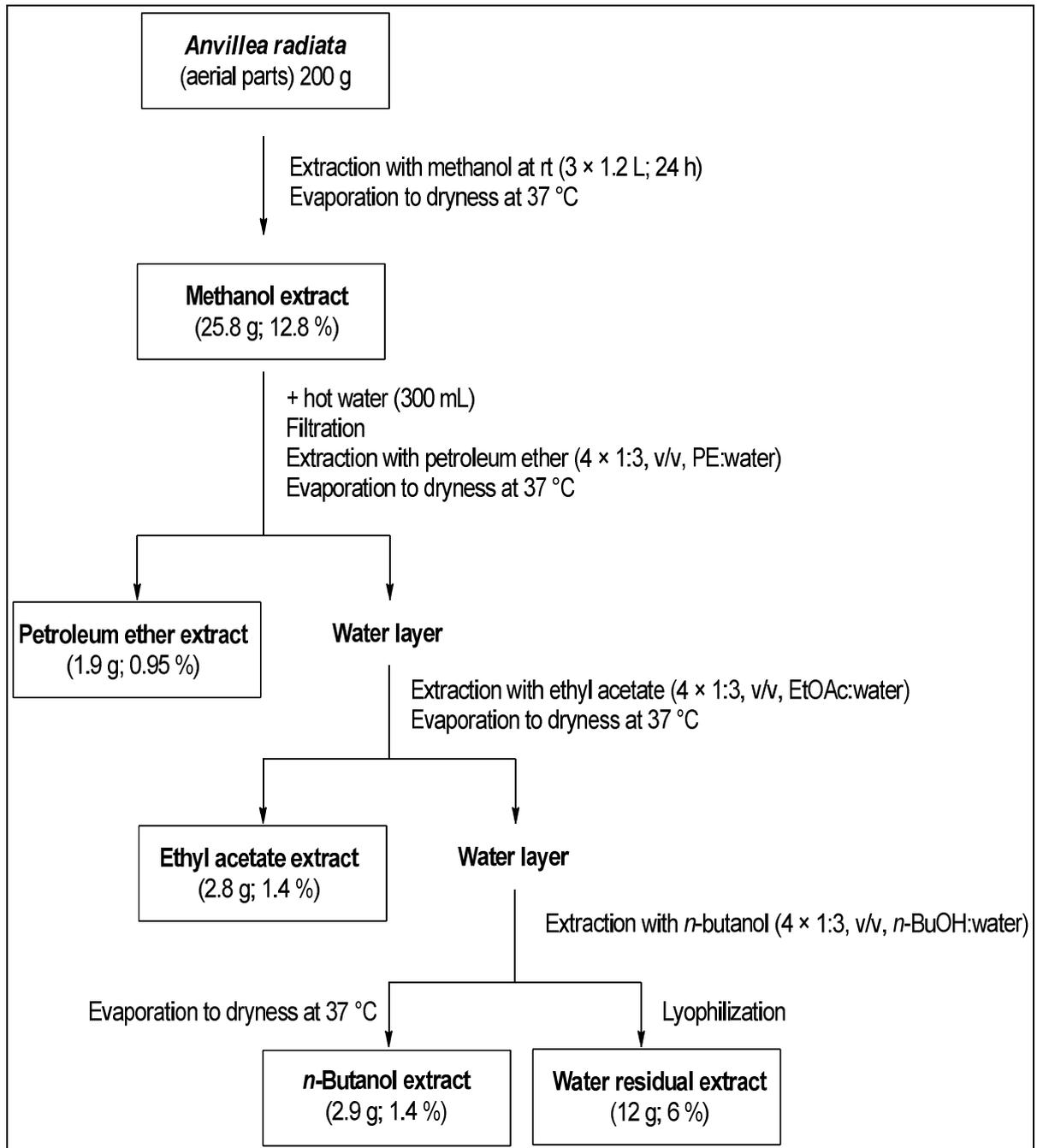


Figure 9. Schéma du protocole d'extraction d'*Anvillea radiata* Coss & Dur.

3. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits d' *A. radiata*, est effectué selon la méthode de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.* 1999). Le réactif utilisé est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif qui entraîne la formation d'un nouveau complexe d'oxydes métalliques de tungstène et de molybdène de couleur bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Le protocole du dosage est effectué comme suit : 20 µl de chaque extrait dissous dans le méthanol (0,1 mg/ml) sont ajoutés à 100 µl du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 80 µl de Na₂CO₃ (7,5 g/l) dilué également dans l'eau distillée, sont additionnés au mélange. L'ensemble préalablement agité est incubé à l'abri de la lumière pendant 2 heures. L'absorbance est ensuite mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV-visible (Tecan M 200). La concentration des polyphénols totaux pour chaque échantillon est calculée à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (0 à 25 µg/ml), établie avec l'acide gallique dans les mêmes conditions opératoires que les extraits (Annexe1). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g d'extrait).

3.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Ordonez *et al.* 2006), est utilisée pour déterminer les flavonoïdes dans les différents extraits. 100 µl de chaque échantillon (0,5mg/ml) dilués dans l'éthanol, est ajouté à 100 µl de la solution d'AlCl₃ (2% dans l'éthanol). Après 1 h d'incubation, l'absorbance est lue à 420 nm par un spectrophotomètre UV-visible. Les concentrations des flavonoïdes des différents extraits sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage (0-40 µg/ml), établie avec la Rutine (annexe 2), et sont exprimées en microgrammes équivalents de rutine par milligramme d'extrait (µg RUE/mg d'extrait).

3.3. Analyse des composés phénoliques par HPLC-DAD

Les composés phénoliques ont été étudiés par HPLC sur un système Merck Hitachi composé d'un module d'interface LaChrom L-7000 et un détecteur de matrice de photodiode L-7455 contrôlé par le logiciel de gestion software de chromatographie l'EZ Chrome. Pour chaque fraction (2 mg / mL dans le méthanol), les quantités moyennes de composés phénoliques ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage standards obtenues aux absorbances UV maximales des flavonoïdes et des hydroxybenzoïques et des composés hydroxycinnamiques, et ont été quantifiés en tant que GAE, équivalents d'acide caféique (CAE) et RUE / g de poids d'extrait, respectivement.

La HPLC en phase inverse a été réalisée à température ambiante sur une colonne Htec RP-18 (250Mm × 4 mm; 5 µm; Macherey-Nagel, France) en utilisant un gradient avec un débit de 0,8 ml / min. Le gradient se compose comme suit: solvant A (0,05% d'acide phosphorique dans l'eau, pH 2,6), solvant B (méthanol): 0-45 min, 30-60% B; 45-50 min, 60% B; 50-51 min, 30% B; 51-57 min, 30% B.

4. Evaluation des capacités antioxydantes

La majorité des tests d'évaluation de capacité antioxydante se base sur les mécanismes de transfert d'hydrogène (HAT) ou d'électron (ET). Contrairement aux tests HAT basés sur des réactions compétitives entre l'antioxydant et un substrat, vis à vis d'un radical libre généré thermiquement, les tests de type ET mesurent la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant. Ces tests emploient un antioxydant qui, en présence d'un oxydant-sonde, change de coloration après réduction. Les tests HAT utilisent des méthodes de dosage colorimétrique et fluorimétrique. De manière générale, ils mettent en œuvre un générateur thermique de radical donnant un flux régulier de radicaux peroxydes dans une solution saturée en air. L'usage d'une sonde moléculaire permet de suivre la réaction par fluorescence ou détection UV.

4.1. Chélation du fer

La capacité chélatrice des extraits de la plante est déterminée selon la méthode de (Ambigaipalan *et al.* 2016). La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} .

Un volume de 200 μl des solutions méthanolique des extraits à différentes concentrations (0.3–2.4 mg/ml) ou du chélateur standard (EDTA) sont additionnées à 10 μl de chlorure de fer (FeCl_2) (2 mM). Après 5 min d'incubation, 100 μl de ferrosine (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe^{2+} -ferrosine est mesurée à 562 nm et la courbe d'étalonnage est construite avec EDTA. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous:

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [100 \times (A_0 - A) / A_0]$$

A_0 : absorbance du contrôle.

A : absorbance de l'échantillon ou standard.

Les résultats sont exprimés en micromoles d'EDTA équivalents (EDTAE) par gramme d'échantillon ($\mu\text{moles d'EDTAE.g}^{-1}$)

4.2. Inhibition de dégradation du désoxyribose

Dans la technique de mesure de l'inhibition de dégradation du désoxyribose, le système implique l'auto oxydation du complexe Fe^{2+} —EDTA dans un milieu aqueux pour former O_2 qui est rapidement dismuté en H_2O_2 à pH 7,4. Après, ce dernier interagit avec Fe^{2+} pour former les radicaux OH en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (réaction de Fenton). La dégradation du désoxyribose par les radicaux OH dégage certains produits estimés en malonaldéhyde (MDA), un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique dans un milieu acide. La présence des anti-radicaux protège et diminue la production des MDA (Aruoma *et al.* 1987; Halliwell *et al.* 1987).

Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants. 500 μl des différentes concentrations en AQL, AR, *n*-BuOH et Mannitol sont ajoutés au mélange réactionnel contenant, 0,1 ml de la solution tampon phosphate (20 mM, pH = 7.4), 0.1 ml de l'EDTA (100 μM), 0,1 ml de FeCl_3 (100 μM) et 0,1 ml de 2- désoxyribose (2,8 μM). La réaction est commencée par l'addition de 0,1 ml d'acide ascorbique (100 μM) et 0,1 ml de H_2O_2 (1

mM). Après l'incubation à 37°C pendant 1 heure, 0,5 ml de l'acide thiobarbutirique (TBA) (10 g/l) est ajouté dans le milieu réactionnel suivi par 0,5 ml de l'acide acétique. Les mélanges sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min et puis sont refroidi avec de l'eau. L'absorbance des solutions est mesurée à 532 nm avec le spectrophotomètre contre le blanc. La capacité du piégeage du radical hydroxyle en présence ou absence d'EDTA est évaluée selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [100 \times (A_0 - A) / A_0]$$

A_0 : représente l'absorbance du contrôle sans extrait,

A : représente l'absorbance de l'extrait.

4.3. Préparation des LDL

Les LDL sont isolées à partir de plasmas humains, provenant de sujets sains, par ultracentrifugation différentielle sur gradient de bromure de potassium. Les LDL séparées du surnageant sont purifiées par dialyse contre une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) (Miranda *et al.* 2000). Ensuite, l'inhibition de l'oxydation des LDL par les extraits a été testée dans des microplaques, en incubant à 37 ° C des solutions LDL (50 µg de protéines par ml) dans du PBS en présence de CuSO₄ (2 µM) et des extraits dissous dans l'éthanol pour atteindre une concentration finale allant de 5 -50 µg/ml et un volume final de 200 µl / puits. L'oxydation des LDL a été mesurée par une surveillance continue de 6 h de formation d'hydroperoxyde de diène conjugué à 234 nm contre des blancs appropriées (PBS au lieu de LDL et de sulfate de cuivre). Après 6 heures d'incubation, on ajoute dans chaque puit un mélange d'acide trichloroacétique et de TBA (1% dans NaOH à 0,5%), les échantillons ont été chauffés à 90 ° C pendant 20 min, puis centrifugés et la quantité de TBARS a été mesurée à 534 nm avec un lecteur de microplaques.

4.4. Test du DPPH

Le test du DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) consiste en une mesure de la capacité d'un composé antioxydant à réduire le radical libre persistant DPPH• (0.19 mM) par spectrophotométrie visible (Alencar *et al.* 2008). Le DPPH• est un radical stable d'une coloration violette, due à la présence d'un électron non apparié sur l'atome d'azote, possédant un maximum d'absorption dans le visible à 517 nm en solution alcoolique.

L'absorbance de la solution du DPPH• diminue en donnant une couleur jaune, voire incolore, quand l'électron célibataire sur l'atome d'azote du DPPH• est réduit par un atome d'hydrogène provenant du produit antioxydant (Figure). La capacité antioxydante augmente d'autant plus que la substance réduit le DPPH•.

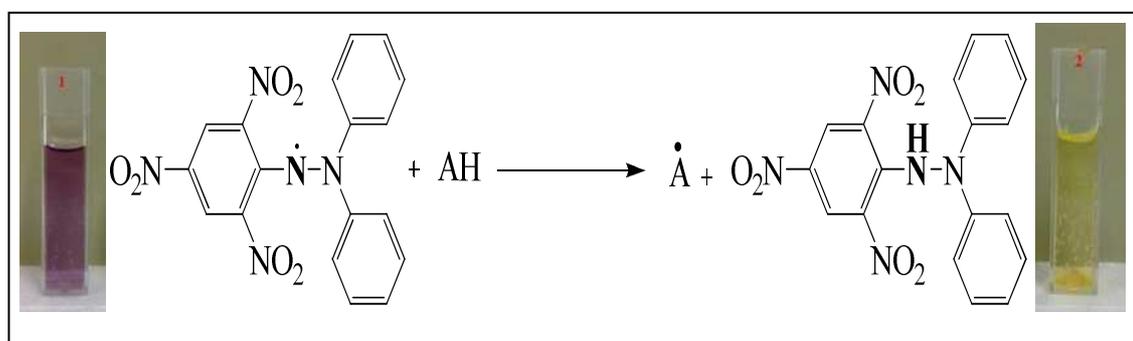


Figure 10. Réaction de réduction du radical DPPH

Une solution de DPPH à 75 mg.l-1 (0.19 mM) est préparée dans le méthanol (MeOH) et laissée en agitation durant 2 h à l'abri de la lumière. Des solutions mères des extraits à tester sont préparées dans du MeOH à 2 mg/ml. 100 µl des SM des composés à analyser sont placés dans une plaque, des dilutions en cascade sont effectuées dans le but d'obtenir une gamme de concentrations finales comprises entre 20 et 660 µg/ml. Le DPPH (200 µl) est ajouté de manière simultanée dans chaque puit. La plaque est placée dans le spectrophotomètre et agitée pendant 1 min. L'absorbance du DPPH est enregistrée 3-90 min après addition du DPPH à $\lambda = 517$ nm. Chaque mesure de l'absorbance est réalisée en triplicata. L'ensemble des valeurs de RLU enregistrées permettent d'obtenir une courbe reflétant la réduction du DPPH• par le produit suspecté antioxydant testé permettant la détermination de l'IC₅₀ du composé. L'absorbance à 517 nm de la solution ne contenant que du DPPH• non réduit représente une valeur égale à 100 %.

L'activité DPPH• scavenger est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous:

$$\text{Inhibition (\%)} = [100 \times (A_0 - A) / A_0]$$

A₀ : absorbance du contrôle.

A : absorbance de l'échantillon ou standard.

La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa IC_{50} est petite. L'indice IC_{50} montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du $DPPH\cdot$ avec 50% ($\mu\text{g/ml}$). Le temps requis pour atteindre la IC_{50} est définie par TIC_{50} dont, dépendamment de la valeur, l'antioxydant sera catégorisé de la manière suivante ; inférieur à 5 minutes : rapide ; entre 5 et 30 minutes : intermédiaire et plus de 30 minutes: lente

4.5. Test TRAP

Le test TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) est basé sur la protection conférée par un antioxydant sur la dégradation du luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) lors d'une réaction de peroxydation déclenchée par thermolyse, en présence d'oxygène et d'un initiateur radicalaire: l'AAPH (2,2'-Azobis(2-méthylpropionamide) dihydrochloride). Ainsi, l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène peut être résumée par la Figure (11) ci-dessous.

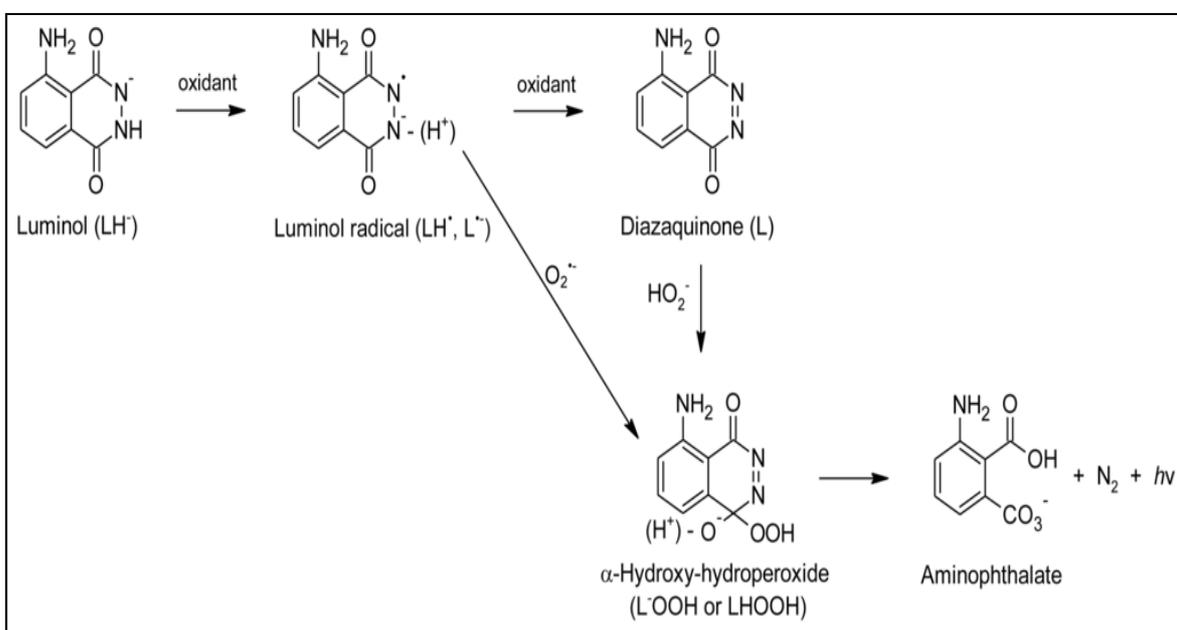


Figure 11. Mécanisme d'oxydation du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène.

L'activité antioxydante du composé testé est évaluée par la durée de la période d'inhibition de la luminescence, dite "temps d'induction". Le temps d'induction de la substance antioxydante testée est comparé à celui du Trolox, analogue hydrosoluble de la

vitamine E, comme antioxydant de référence (Cassien *et al.* 2016). La solution d'AAPH à 150 mM est préparée dans une solution de tampon Tris à 0,1 M tamponné à pH 7,4 avec une solution de HCl 1 N. Cette solution est placée dans l'étuve à 37 °C pendant 30 min pour initier la réaction radicalaire. La solution mère de luminol (4,19 mM) est préparée dans une solution de tampon Tris-HCl et conservée dans le noir à 4 °C. La solution mère de luminol est diluée pour obtenir une concentration finale à 81.6 µM).

Les solutions des extraits à tester sont préparées dans le DMSO ou dans l'eau, à une concentration initiale de 200 mg/ml, pour effectuer des dilutions dans le tampon Tris-HCl. Dans un volume réactionnel de 3 mL, sont introduits 2 mL d'AAPH (233 mM), 0,5 mL de luminol (13 µM) et 0,5 mL du produit antioxydant à tester dilué à différentes concentrations dans Tris-HCl (gamme de concentration finale de 0,4 µg /ml à 25 µg/ml).

Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions avec différentes concentrations de Trolox (16.6 à 0.52 µM finales). Chaque concentration est effectuée en duplicata. Le tube contenant le mélange est placé dans le luminomètre (Titertek-Berthold Sirius luminometer, Pforzheim, Germany) et la luminescence suivie pendant deux heures. Un tube contenant 2 mL d'AAPH, 0,5mL de luminol et 0,5mL du tampon Tris-HCl constitue le blanc et sa luminescence est suivie dans les mêmes conditions que l'échantillon à tester.

Le résultat est exprimé en micromoles de Trolox équivalents (ET) par gramme d'échantillon (µmoles de TE.g-1), en mesurant la différence d'aire sous la courbe (DAUC), de la luminescence en fonction du temps, entre l'échantillon et le blanc.).

$$TE = \frac{[Trolox] \times \Delta AUC_{Sample}}{[Sample] \times \Delta AUC_{Trolox}}$$

Où
$$\Delta AUC_{Sample (Trolox)} = AUC_{Blank} - AUC_{Sample (Trolox)}$$

4.6. Test ORAC-FL

La méthode ORAC-FL (Oxygen Radical Absorbance Capacity Fluorescein) permet une mesure globale du pouvoir antioxydant de substances pures ou en mélange. Ce test fournit une meilleure mesure directe de la capacité antioxydante des composés lipophiles et hydrophiles (Huang, 2002). Le test ORAC est basé sur l'inhibition de l'oxydation, initiée par décomposition thermique, de radicaux peroxydes induits par les composés azoïques tels que l'AAPH. La génération de ROS à partir de la décomposition thermique de l'AAPH, "quenche"/éteint au cours du temps le signal provenant de la fluorescéine. La réaction du radical peroxyde avec la fluorescéine de sodium (FL) suit un mécanisme HAT. L'addition ultérieure d'un antioxydant permet de produire un signal de fluorescence plus stable (Figure 12). La stabilité du signal est fonction de la capacité antioxydante du produit testé (Davalos *et al.* 2004).

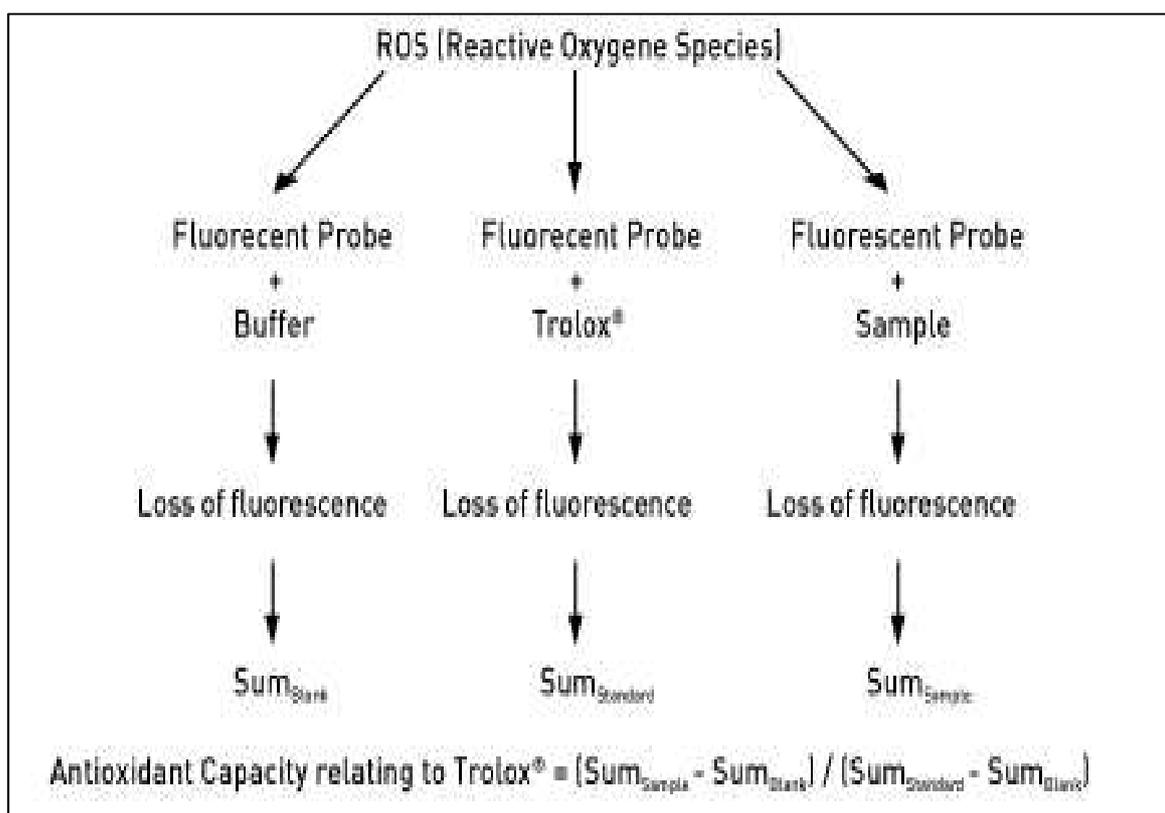


Figure 12. Principe du test ORAC

Les extraits sont directement dissoutes dans du DMSO ou dans l'eau, à une concentration de 200 mg/ml puis diluées à différentes concentrations dans du tampon

phosphate 100 mM tamponné à pH 7,4 avec une solution aqueuse d'HCl à 1 N. L'AAPH est dissous dans du tampon phosphate pour constituer une solution à 153 mM, puis placée à l'étuve (37 °C) à l'abri de la lumière. La solution d'AAPH est instable dans le temps. La FL est diluée dans du PBS 1X à pH 7,4 pour avoir une concentration de 82,1 nM et placée à l'abri de la lumière. Une solution stock de Trolox (100 mM) est dissous dans du DMSO puis diluée dans du PBS 1X à pH 7,4 à différentes concentrations selon l'activité du produit.

Des dilutions successives de ces solutions permettent d'obtenir les autres concentrations à tester (de 0,94 à 7,5 µg/ml finales). Le test s'effectue dans une microplaque 96 puits spécifique pour le fluorimètre en polystyrène noir. Dans chaque puits sont introduits 25 µl des différentes concentrations de l'échantillon (concentration finale de 0.94 à 7,5 µg/ml), 150 µl de fluorescéine de sodium (concentration finale 60 nM).

La microplaque est incubée pendant 15 min à 37 °C dans le fluorimètre à plaques, puis 25 µl d'AAPH sont ajoutés de manière simultanée dans chaque puits (concentration finale 19 mM). L'intensité de la fluorescence est relevée en utilisant une longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) de 485 nm et une longueur d'onde d'émission (λ_{em}) de 530 nm sur un temps de 70 min avec mesure toutes les 2 min. Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions avec différentes concentrations de Trolox (0,4 à 12,5 µM finales). Chaque concentration est effectuée en duplicata. Le résultat est exprimé en micromoles de Trolox équivalents (ET) par gramme d'échantillon (µmoles de TE.g-1).

Les valeurs ORAC sont calculées en tenant compte de l'aire sous la courbe (AUC) de chaque échantillon et du standard (Trolox) pour l'ensemble des concentrations étudiées. L'AUC est calculé de la manière suivante.

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=70} f_i/f_0$$

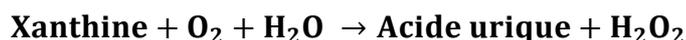
Où f_0 est la lecture de la fluorescence initiale à 0 min et f_i est la lecture de fluorescence au temps i .

Les valeurs relatives d'ORAC sont exprimées en équivalent Trolox (TE). Ces valeurs sont issues de la projection de la valeur de l'AUC de chaque composé ($AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}$) sur la courbe de tendance (type de régression linéaire) issue des valeurs des AUC du Trolox® ($AUC_{\text{trolox}} - AUC_{\text{blanc}}$).

4.7. Test d'inhibition de la xanthine oxydase

Lors de l'oxydation de la xanthine (X) par l'enzyme xanthine oxydase, la production d'acide urique est caractérisée par un maximum d'absorption à 295 nm, qui s'accompagne d'une libération conjointe de radical superoxyde. La présence d'un inhibiteur de l'enzyme XO dans le milieu réactionnel aura pour effet la diminution de la concentration en acide urique et du radical superoxyde.

La capacité de l'antioxydant à inhiber la xanthine oxydase est évaluée en mesurant la quantité d'acide urique formée par spectrophotométrie UV. Dans un premier temps, nous mesurons un signal témoin avec l'enzyme uniquement. Ensuite, nous rajoutons le composé à tester et nous suivons l'évolution de la diminution de ce signal (Cos *et al.* 1998). La réaction de production d'acide urique par la XO est la suivante:



Le test s'effectue dans une microplaque UV 96 puits (TECAN infinite M200, Switzerland). Les solutions employées sont les suivantes: tampon phosphate à 0,2 M (pH 7,5), solution de Xanthine à 500 μM dans le tampon phosphate, solution d'EDTA à 0.1 mM dans le tampon phosphate, solution de XO diluée dans le tampon phosphate pour obtenir une concentration de 23,32 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$, des solutions de produits à tester depuis des solutions stocks à 200 mg/ml dans le DMSO. Dans les puits sont introduits 150 μl de produits à tester (concentration finale de 18,5 à 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou de tampon phosphate pour les puits témoins, 25 μl d'EDTA (concentration finale de 10 μM), 25 μl de Xanthine (concentration finale de 50 μM) et 50 μl de XO (concentration finale de 23,32 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$) ou de tampon phosphate pour les puits du blanc.

La plaque est incubée pendant 30 min à 37 °C et l'absorbance UV est mesurée à T= 30 min à $\lambda = 295$ nm. La production d'acide urique est calculée pour chaque concentration comme la différence d'absorbance entre l'échantillon avec XO et le blanc sans XO.

4.8. Protocole expérimental du test du quenching du superoxyde

Ce test permet de mesurer la capacité d'un composé à piéger certaines ROS telles que le H_2O_2 et/ou le radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ en fonction du pH de la solution employée lors du test. Un pH de 7,4 favorisant la formation de ces deux espèces alors que l'emploi d'un pH 10,2 favorisera seulement la formation du radical superoxyde. En présence d'allopurinol, la XO entraîne une génération des ROS ainsi que la formation d'oxypurinol. La présence de ces composés en solution va favoriser une inhibition du signal de chimiluminescence engendré par la présence de lucigénine en solution (Stoica *et al.* 2011). Cette réaction peut être caractérisée selon la Figure .

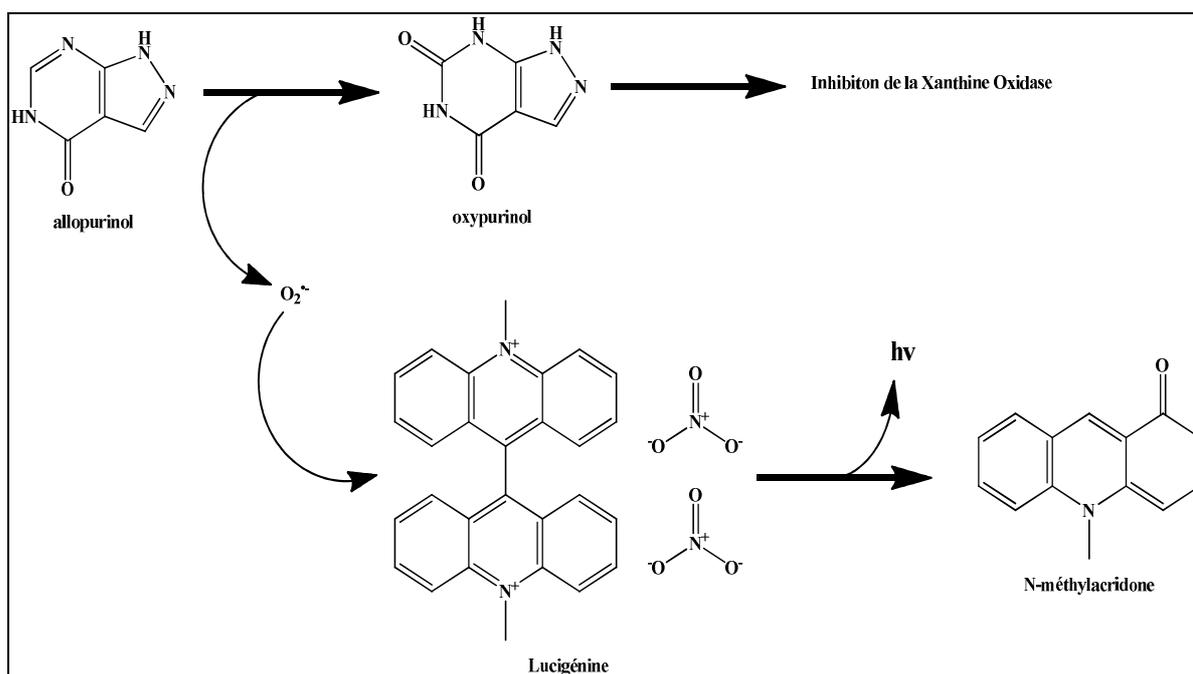


Figure 13. Principe du test du quenching

Le test s'effectue dans des tubes en polystyrène ou en verre. Dans le tube sont introduits 1,7 ml de tampon glycine (TG) à 6,25 mM (pH 7.4), 2.4 à 48 μl des extraits testés (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 300 μl d'allopurinol à 100 μM dans le TG (concentration finale 12,5

μM), 100 μl de XO (concentration finale 0,458 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$) en agitant puis on ajoute 300 μl de lucigénine à 100 μM dans le TG (concentration finale 12.5 μM).

La luminescence est relevée à 25 °C avec une cinétique de 4 min. Une mesure du blanc est effectuée avec tous les réactifs en absence du composé à tester. La SOD est utilisée comme référence. Toutes les mesures sont effectuées en triplicata. Une comparaison de l'aire sous la courbe (ASC ou AUC; soit le calcul de l'intégrale de la fonction issue de la courbe) entre la réaction sans composé (Blanc) et avec le composé étudié permet de déterminer la capacité du produit testé. Le calcul de l'AUC de chaque courbe est réalisé jusqu'à une valeur définie par l'utilisateur (par exemple 150 s). L'AUC du blanc représente une valeur égale à 100 % de quenching. Le rapport entre les valeurs issues du calcul des différents AUC face à la valeur du blanc permet d'obtenir le graphe suivant ainsi que la détermination de l' IC_{50} du composé.

4.9. Etude par ESR des radicaux libres peu persistants (le spin trapping)

La technique du Spin Trapping permet d'étudier des radicaux libres instables en faisant réagir le radical instable avec une molécule piège initialement introduite dans le milieu. Il s'ensuit la formation d'un nouveau radical appelé adduit de piégeage stable thermodynamiquement et observable par RPE dans les conditions physiologiques (température et pH).

La spectrométrie EPR a été utilisée selon les protocoles décrit par (Alencar *et al.* 2009). L'activité de piégeage de $\cdot\text{OH}$ des extraits sélectionnés a été déterminée en mesurant l'inhibition dose pendante de son adduit de spin DMPO à température ambiante. Des aliquots des extraits testés (0,01-10 mg/ml , concentration finale) dissous dans le tampon KH_2PO_4 (20 mM , pH 7,4) contenant du DTPA (1 mM) et du DMPO (5 mM) ont été incubés pendant 80 s avec un mélange de H_2O_2 (0,5 mM) et FeSO_4 (0,5 mM).

Les échantillons ont été placés immédiatement dans des capillaires en verre et des spectres EPR de bande X (9,81 GHz) ont été enregistrés sur un instrument Bruker ESP 300 (Karlsruhe, Allemagne) en utilisant les paramètres suivants: fréquence de modulation, 100 kHz; Puissance de micro-onde, 10 mW; Largeur de balayage, 0,07 mT; Résolution d'axe de champ, 2048 points; Gain du récepteur, 8×10^3 ; Amplitude de modulation, 0,05 mT;

Constante de temps, 5,12 ms et taux de balayage, 0,33 mT / s. Les intensités de signal EPR I et I₀ (tampon au lieu de la fraction testé) ont été quantifiées par double intégration des spectres simulés comme décrit (Bailey *et al.* 2014). En outre, les constantes de vitesse de piégeage relatif ont été estimées en comparant les pentes de I₀ / I aux courbes de régression linéaire de concentration selon une méthode précédente (Finkelstein *et al.*, 1980).

5. Inhibition des enzymes hydrolysant les glucides

Tous les essais décrits ci-dessous ont été réalisés à partir de solutions stock des extraits à 200 mg/ml dissout dans de l'eau distillée pure (fraction AQL et AR) ou en présence de DMSO à 4% (autres extraits). Dans ce dernier cas, la concentration finale de DMSO dans les échantillons testés était < 1% et ne réagit pas avec le test. L' α -amylase pancréatique porcine (EC 3.2.1.1, type VI-B), l' α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, EC 3.2.1.20, type I), la poudre d'acétone intestinale de rat (RIP), le 2-chloro-4-nitrophénol - α -D-maltotriose (CNPG3) et le p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (pNPG) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

5.1. Test d'inhibition de l' α -amylase pancréatique

Le test a été effectué dans des microplaques en utilisant le CNPG3 comme substrat selon la méthode décrite par (Gella *et al.* 1997). Les solutions d' α -amylase pancréatique porcine (PPA, 0,5 U / ml) et de CNPG3 (60 mM) sont préparées dans le tampon KH₂PO₄ (40 mM, pH 6,9), contenant 2,25 mM de NaCl et 1 mM de CaCl₂. La solution enzymatique (30 μ L / puits) est ajoutée à la solution de l'extrait (60 μ L/ puits) dissout dans le solvant approprié (0,5-400 μ g /ml, concentration finale). Après 10 min d'incubation à 37 ° C, on a ajouté 120 μ L / puits de CNPG3 et le plaque est incubée par la suite à 37 ° C pendant 10 min. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 405 nm avec un lecteur de microplaque (TECAN) et le pourcentage d'activité inhibitrice est calculé en utilisant l'équation (1).

$$\text{Inhibition (\%)} = [100 \times (A_0 - A) / A_0]$$

A₀: représente l'absorbance du contrôle sans extrait,

A : représente l'absorbance de l'extrait.

5.2. Dosage d'inhibition de l' α -glucosidase

Le test a été effectué dans des microplaques en utilisant le pNPG comme substrat selon (Oki *et al.* 1999) avec une légère modification. Les solutions de pNPG (2 mM) stockées dans le tampon KH₂PO₄ (0,1 M, pH 7) sont fraîchement préparées. Dans le test, en utilisant l' **α -glucosidase de SC**, les échantillons (45 μ l/puits) dissouts dans le solvant approprié (0,45-20 μ g/ml, concentration finale) sont incubés pendant 10 min à 37 ° C avec 25 μ L/puits de l'enzyme (0,034 U/ml) et 100 μ l/puits de solution de pNPG (0,8 mM, concentration finale). La réaction est arrêtée en ajoutant 80 μ L/puits de sodium de carbonate (0,2 M).

Dans le dosage, en utilisant l' **α -glucosidase de RIP**, la poudre (10 mg) est mise en suspension dans 2 ml de tampon de maléate (0,1 M, pH 6,9). La solution est soumise à une sonication dans un bain de glace (12 cycles de sonication 30 s suivis de 30 s repos) puis centrifugée à 5600 g à 4 °C pendant 15 min. Le surnageant (40 μ l /puits) est immédiatement ajouté à un mélange d'extrait (40 μ l/puits) dissout dans le solvant approprié (25-1500 μ g/ml, concentration finale) et 40 μ L/puits de tampon (0,1 M, PH 6,9), suite d'une incubation. Après incubation à 37 °C pendant 15 min, on ajoute 80 μ l /puits de pNPG et on incube la plaque à 37 ° C pendant 30 min.

La réaction est arrêtée en ajoutant 80 μ l / puits de Tris base (0,5 M). Dans les deux tests, l'absorbance est mesurée à 405 nm avec un lecteur de microplaque et le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant l'équation 1 où A_0 est l'absorbance du témoin (tampon au lieu de l'extrait)

6. Culture cellulaire

Il a été utilisé des flasques de culture de 25 et 75 cm² à col incliné avec des capuchons filtrants (0,2 μ m) de BD falcon de D. Dutscher (Strasbourg, France), des microplaques stériles 96 puits NUNCTM à fond plat, traités avec leur couvercle (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Les flacons de culture cellulaire proviennent de la Société Greiner Bio-One (Allemagne). Les microplaques 96 puits NUNCTM à fond plat non stériles opaques blanches et noires (Termo Scientific, Denmark).

Le sérum de veau fœtal (SVF) et la solution de pénicilline / streptomycine (PS) contenant 10 000 Unités.mL⁻¹ de pénicilline et 10 mg.mL⁻¹ de streptomycine viennent de PAA Laboratoires (France). Le Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), le bleu trypan 0,4 %, le Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) avec Ca²⁺ et Mg²⁺ et le GlutaMAX® sont achetés à Invitrogen (Villebon-sur-Yvette, France). Le milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), la trypsine-EDTA 0,05 % Gibco arrive de Life technologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA).

Une solution aqueuse de PBS (phosphate-buffered saline) à pH 7,4 contenant 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de Na₂HPO₄, 1,47 mM de KH₂PO₄ a été préparée. Dans certains cas, 0,1 mM de CaCl₂ et 1 mM de MgCl₂ ont été rajoutés pour obtenir du PBS⁺⁺ (préparation du PFA). Les solutions sont ensuite filtrées (0,2 µm) sous la hotte à flux laminaire pour les maintenir stériles.

6.1. Culture des cellules A549, NHLF et INS-1E

Les cellules épithéliales alvéolaires A549 (ATCC® : CCL-185) proviennent d'un adénocarcinome pulmonaire humain. Elles ont été fournies par notre collaborateur Hervé Kovacic du Laboratoire de Biophysique, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université (UMR INSERM 911 CRO2). Les cellules sont décongelées dans un milieu de culture complet supplémenté à 12,5 % de SVF. Elles sont utilisées de leur passage P 20 à P 36. Elles sontensemencées à une concentration comprise entre 8.10³ et 5.10⁴ cellules.cm⁻² pour une période de croissance comprise entre 2 à 4 jours. Elles sont cultivées dans du RPMI supplémenté avec 10 % de SVF (préalablement inactivé) et 1 % de solution de pénicilline/streptomycine (PS) de 10 000 U.ml⁻¹ de penicilline et 10 mg.ml⁻¹ de streptomycine (PAA). Leur milieu de culture est renouvelé 2 à 3 fois par semaine.

Les fibroblastes sont des cellules, dites de soutien, du tissu conjonctif qui participe au remodelage des voies aériennes. Pour nos études nous avons utilisé des cellules de type A549 et NHLF (

Figure 14) étant respectivement des cellules issues de lignées cellulaires et de culture primaire. Les cellules NHLF sont isolées à partir de parenchyme pulmonaire humain. Ces cellules sont non immortalisées et non transformées. L'avantage de ce type cellulaire réside dans le fait que ces cellules diploïdes, conservent tous les caractères des cellules "normales". Ces fibroblastes, de type adhérent, ont été mis en culture dans des flasques

plastiques stériles contenant du milieu de culture complet FBM contenant les facteurs de croissance suivant: facteur de croissance de fibroblaste humain de type B (hFGF-B, 0,1 %), insuline (0,1 %), sérum fœtal bovin (SFB, 2 %), sulfate de Gentamicin + Amphotenicin-B (GA, 0.1 %)..

Les cellules bêta pancréatiques INS-1E de rat ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant du glucose (11 mM), du sérum bovin fœtal (10%), de la glutamine (2 mM), du pyruvate de sodium (1 mM) HEPES (10 mM), le β -mercaptoéthanol (0,05 mM), la pénicilline et la streptomycine selon les procédures établies par (Merglen *et al.* 2004). Les cellules ont ensuite été exposées à un milieu contenant une concentration de glucose élevée (25 mM) ou normale (5 mM) pendant 84 h dans des plaques à 96 puits en présence d'extraits (2-200 μ g /mL) ou 0,1% de DMSO dans le milieu de culture. Le milieu a été renouvelé tous les jours jusqu'à l'analyse de la viabilité (dosage MTT), de l'activité métabolique (teneur ATP intracellulaire) et de l'apoptose (activité caspase-3).

L'aspect morphologique des cellules est contrôlé sous microscope avant et après chaque manipulation. La centrifugation des cellules est effectuée à 1 200 trs.min⁻¹ pendant 5 minutes et après chaque trypsination des cellules (trypsine- EDTA 0,05 %). Les cellules peuvent être conservées par congélation à -80 °C puis stockées dans l'azote liquide dans une solution contenant 95 % de milieu de culture complet et 5 % de DMSO.

La phase de croissance exponentielle des cellules est réalisée à 37 °C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité.

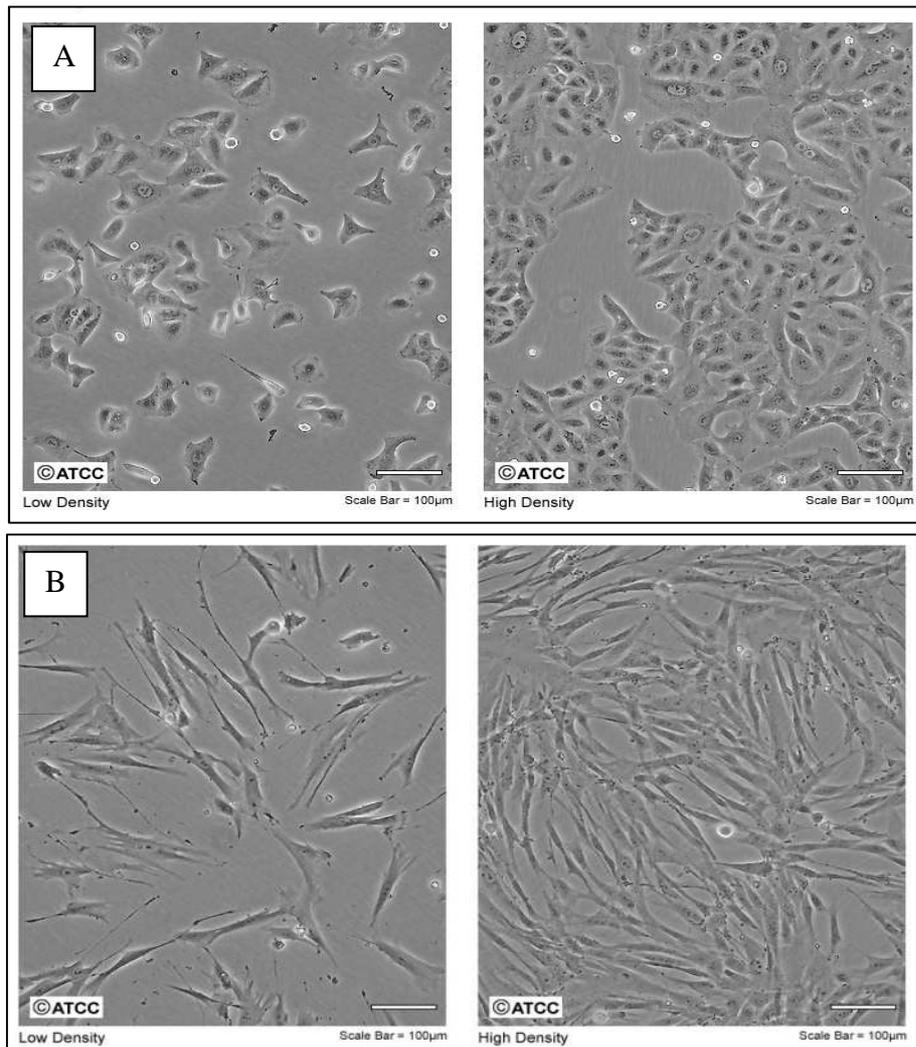


Figure 14. (A) A549 et (B) NHLF à faible et forte densité (site ATCC, 2017)

6.2. Protocole de mise en culture et d'exposition des cellules

Les cellules utilisées ont été précédemment congelées (azote liquide) dans le milieu de culture complet supplémenté à 12,5 % de SFB et de 5 % DMSO. Le milieu est resuspendu dans 5 ml (T25) à 10 ml (T75) de milieu de culture complet puis centrifugé. Le culot est repris dans 1 ml de milieu de culture puis placé dans une flasque avec le milieu de culture correspondant. Pour les A549 le milieu de culture complet est supplémenté à 12,5 % de SFB lors du premier passage puis la supplémentation est diminuée pour revenir à une valeur de 10 %. Les cellules sont ensemencées dans des flasques à une concentration comprise entre $2 \cdot 10^3$ et $1 \cdot 10^4$ cellules. cm^{-3} et elles sont incubées pendant la nuit à 37 °C sous une atmosphère contrôlée à 5 % de CO_2 et 95 % d'humidité. L'adhérence des cellules est contrôlée le lendemain, et si besoin le milieu supplémenté est renouvelé. Une fois les

cellules arrivées à confluence (entre 24 - 48 h), le milieu est éliminé par aspiration et les cellules sont rincées avec du PBS (-/-). L'ajout de 6 ml d'une solution de trypsine-EDTA 1X permet aux cellules de se détacher suite à l'activation de ce dernier par incubation (2 - 6 min à 37 °C). Son action est arrêtée par ajout de 1 ml de SFB. 13 ml de PBS (-/-) est ajouté à la suspension puis centrifugée 5 min à 20 °C et 220 G, le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension avec 10 ml de milieu. Les cellules obtenues peuvent être ensemencées à nouveau dans de nouvelles flasques (0.8 ml de suspension cellulaire + 13 ml de milieu) ou dans les microplaques 96 puits ou congelées avec 95 % de milieu (DMEM + 12.5 % SFB) et 5 % de DMSO. Les cryotubes sont placés au -80 °C durant 24 h puis placés dans l'azote liquide. Les cellules utilisées pour les tests de cytotoxicité sont ensemencées dans des microplaques 96 puits à une densité de 1.5×10^4 cellules.cm⁻³ avec un volume final de 100 µl de milieu dans chaque puits.

Les différents extraits sont testés en présence de 0.2 % de DMSO (v/v). Les solutions mères des composés et des produits utilisés comme référence sont préparées dans 100 % de DMSO. Puis des dilutions successives sont réalisées dans le milieu de culture jusqu'à l'obtention d'une solution à concentration finale en DMSO de l'ordre de 0.2 %. A partir de cette solution est réalisée une gamme de concentration par dilution dans du milieu de culture additionné à du DMSO à 0.2 % (v/v). Une fois les cellules arrivées à confluence, le milieu est éliminé et dans chaque puits est introduit le milieu contenant les extraits à tester (200 µl). Chaque expérimentation représente une série complète contenant: des puits contrôles (milieu de culture), des témoins véhicules (milieu de culture + DMSO 0.1 %), des puits témoins positif (milieu de culture associé à des composés de référence) et les puits contenant les différentes concentrations des extraits à tester (5 µg/ml à 500µg/ml). Les cellules sont incubées en présence des produits durant 48 et/ou 72 h. A la fin de la période d'incubations la cytotoxicité est évaluée avec le test adéquat.

6.3. Comptage des cellules adhérentes

Une fois les cellules arrivées à confluence. La flasque est rincée avec du HBSS. Les cellules sont détachées de la boîte par incubation à 37 °C avec 1 à 2 mL de trypsine-EDTA 0,05 % pendant 2 min. La réaction est arrêtée par excès de substrat en ajoutant du RPMI contenant 10 % de SVF. Les cellules sont mises en suspension dans un volume final de 5 mL et un aliquote est prélevé et mis au 1 : 20 dans du bleu de trypan (BT à 0,2 % dans du PBS). Les cellules viables non colorées au BT sont comptées à l'aide d'une cellule de C-

Chip. Le nombre obtenu de cellules est rapporté à 64 carreaux (Nbre cellules₆₄). Cette surface équivaut dans la cellule de C-Chip à 0,1 mm³ et par conséquent à 10⁻⁴ mL. Pour déterminer le nombre de cellules totales contenues dans la suspension cellulaire, le calcul général suivant est effectué :

$$\text{Nbre cellules totales} = (\text{Nbre cellules}_{64} \div 4) \times \text{facteur dilution avec BT} \times 10^4 \times \text{Volume final suspension}$$

Le nombre de cellules que l'on veut réensemencer (passage cellulaire) est déterminé. Puis le volume à introduire dans les flasques est calculé selon le calcul suivant :

$$\frac{\text{Nombre cellules totales}}{\text{Nombre cellules voulues}} = \text{Facteur dilution}$$

$$\frac{5 \text{ mL}}{\text{Facteur dilution}} = \text{Volume suspension cellulaire à prélever}$$

6.4. Dosage de la cytotoxicité

Il est utilisé pour ces dosages : le diméthylsulfoxyde (DMSO) de pureté > 99 % de Fisher Scientific (Illkirch, France), la fluorescéine diacétate (FDA) et le Triton (octyl phenoxy polyethoxyethanol) X-100, de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), le cristal violet de RAL Kuhlmann (RAL Diagnostics, France), le MTT de Calbiochem (Merck, Allemagne), de l'éthanol 96 ° du Laboratoire Pharmaceutique API (Vailhauques, France). une solution de Triton à 10 % w / v permettant la lyse cellulaire. Les résultats des différents tests réalisés en triplicate sont établis selon une courbe dose (µM) / réponse (%) avec le logiciel Prism. L'absorbance moyenne des puits véhicules est considérée comme le 100 %, et le % des cellules qui croît dans chaque puits est calculé (logiciel Excel) et exprimé en % des valeurs du véhicule (contrôle + DMSO 0,2%).

6.4.1. Test FMCA

Le test FMCA (fluorometric microculture cytotoxicity assay) (Figure. 15) est un test fluorométrique permettant d'étudier la cytotoxicité des microcultures (Lovborg *et al.* 2009; Larsson *et al.* 1993).

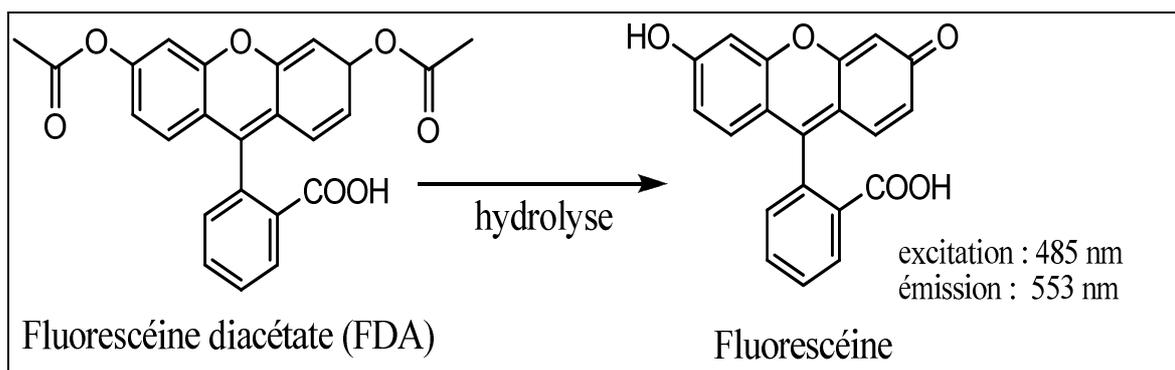


Figure 15. Schéma du mécanisme de réaction du FDA.

Ce test est basé sur la mesure de la fluorescence générée par l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA) dans les cellules avec des membranes plasmiques vivantes. Les cellules qui ont été incubées avec la FDA sont rincées puis lysées avec du Triton (t-octylphenoxy-polyéthoxylethanol). L'émission de la fluorescence de la fluorescéine est mesurée à 553 nm, suite à son excitation à 485 nm. L'intensité est dépendante de la quantité de cellules intactes et elle est ainsi proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans les puits.

Ce test est fréquemment utilisé pour l'évaluation des composés chimiothérapeutiques (Larsson *et al.* 1993). Il nécessite l'utilisation d'un marqueur fluorescent ce qui lui permet d'éviter toutes interférences avec les éléments cellulaires lors des mesures, mais il rend obligatoire de travailler dans l'obscurité. Ce test a été utilisé dans notre présent travail sur les cellules A549 et NHLF.

La solution stock de FDA à $2,4 \cdot 10^{-2}$ M (soit $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dissoute dans du DMSO est conservée à -20°C , protégée de la lumière. La solution fille de FDA à $4,8 \mu\text{M}$ est obtenue

par dilution de la solution stock de FDA dans du PBS (Wu & Ho 2006; Larsson *et al.* 1993; Cassien *et al.* 2016).

Après l'induction des cellules A549 et NHLF, la microplaque est rincée au PBS⁺⁺. Il est ajouté dans chaque puits 200 μ L de la solution de FDA diluée. Puis la plaque est incubée dans l'étuve pendant 30 min à 37 °C. On rajoute alors 80 μ L du Triton à une concentration finale de 3 % v/v, puis la plaque est incubée 5 min. Ensuite, 200 μ L de cellules lysées sont collectées et déposées dans une microplaque noire. La fluorescence générée par chaque puits est mesurée par un détecteur de fluorescence, la longueur d'excitation est de 485 nm et celle de l'émission est de 535 nm. Les fluorescences obtenues, proportionnelles au nombre de cellules vivantes, sont exprimées en % de viabilité cellulaire. La IC₅₀ est définie comme la concentration permettant d'atteindre un index de survie (IS, c.à.d. un nombre de cellules vivantes) égal à 50 % de la valeur de RFU des puits contrôles.

Le test MTT basé sur un paramètre colorimétrique est d'utilisation simple.

6.4.2. Test MTT

Le test du MTT est un test de la viabilité cellulaire performant qui mesure l'activité des cellules vivantes via l'activité du métabolisme mitochondrial (Putnam *et al.* 2002; Weyermann *et al.* 2005). C'est le test le plus utilisé *in vitro* (résistance et sensibilité aux anti-cancéreux, toxicité sur les cellules gliales) (Razafimanjato *et al.* 2011; Ulukaya *et al.* 2008).

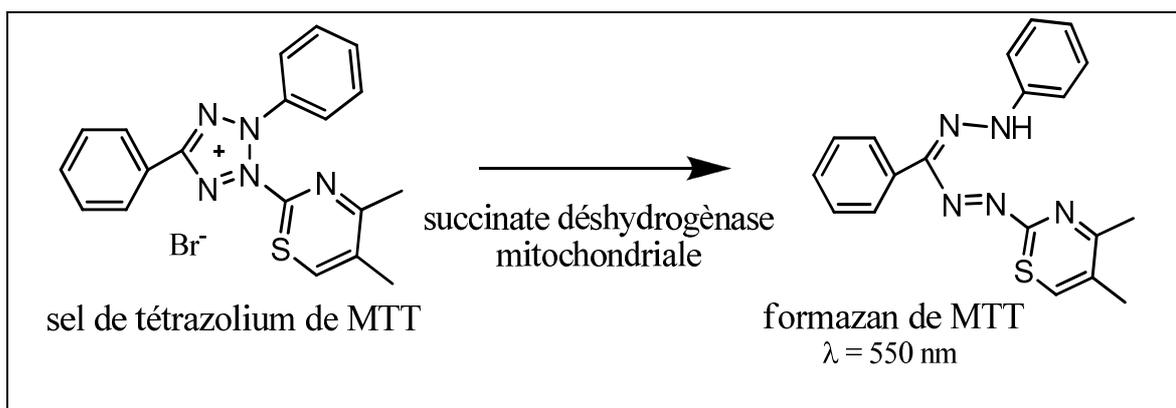


Figure 16. Schéma du mécanisme de réaction du MTT.

Ce test repose sur la capacité des cellules vivantes à capturer et réduire le sel de tétrazolium de MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) soluble de couleur jaune par la succinate déshydrogénase mitochondriale en un précipité de formazan de MTT insoluble coloré en bleu-magenta (Figure 16). Les cristaux de formazan sont ensuite dissouts dans du DMSO. L'absorption du formazan dissout se fait à 550 nm dans la région visible. Elle est corrélée avec le nombre de cellules vivantes intactes (Razafimanjato *et al.* 2011;Ulukaya *et al.* 2008)

Le test MTT est le moins coûteux et le plus fréquemment employé (Ulukaya *et al.* 2008;Weyermann *et al.* 2005;Chiba *et al.* 1998). Cependant la production maximale du MTT-formazan est différente selon les lignées cellulaires, et la quantité de MTT doit être adaptée. Certains fibroblastes ont une faible activité de leur succinate déshydrogénase et le test MTT ne pourra pas être utilisé (Vian *et al.* 1995). La formation de formazan peut aussi être significativement influencée par les nucléotides pyridines, le pH et la concentration en D-glucose du milieu de culture, (Chiba *et al.* 1998). Certains composés testés, comme des agents réducteurs et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale, peuvent également interférer avec le MTT et conduire à des faux négatifs (Ulukaya *et al.* 2008).

Après l'incubation des cellules, le milieu de culture est enlevé. Le test MTT est réalisé (Culcasi *et al.* 2012). Dans la microplaque, il est ajouté 10 μL de MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans du PBS) et incubée 3 h, puis révélée par ajout de 100 μL de DMSO pour solubiliser

les cristaux formés. Les plaques sont ensuite agitées (5 min) jusqu'à homogénéisation de la coloration dont l'absorbance est mesurée à 570 nm avec un lecteur de plaques à UV-visible (Multiskan, Labsystem, France). L'absorbance (A) mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules induites avec seulement du DMSO à 0,2% (véhicule) correspondant à 100 % de viabilité selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{(A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}})}{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{blanc}})} \times 100$$

La IC₅₀ est définie comme la concentration permettant d'atteindre un index de survie (IS, c.à.d. un nombre de cellules vivantes) égal à 50 % de la valeur d'absorbance moyenne des puits contrôles.

6.4.3. Test ATP bioluminescence

La compréhension et la caractérisation de la réaction de bioluminescence ont permis le développement de techniques basées sur la luciférase. Cette technique est utilisée pour la quantification de composés qui sont liés à la production d'ATP ou participant à la réaction lumineuse (Marques & Esteves da Silva 2009). Elle est aussi utilisée dans de nouvelles applications avec l'introduction de marqueurs bioluminescent dans des gènes pour étudier des molécules biologiques (Zamaraeva *et al.* 2005) et *in vivo* pour la bio-imagerie (Roda *et al.* 2003) .

Le test ATP (adénosine triphosphate) bioluminescence permet d'estimer l'activité métabolique cellulaire par la quantification de l'ATP cellulaire par une technique de bioluminescence. Il est connu pour étudier la cytotoxicité de molécules et la prolifération cellulaire des cellules d'eucaryotes telles que les cellules animales et des cellules procaryotes comme les bactéries (Lafond *et al.* 2010). La quantification de l'ATP est une procédure fondamentale dans les industries alimentaires en vue d'indiquer la contamination bactérienne pour garantir la sécurité sanitaire. Ce test permet, depuis 1984, d'étudier la chémosensibilité des lignées cellulaires et des tumeurs (Andreotti *et al.* 1995).

La réaction de bioluminescence (Figure 17) induite par le complexe luciférine-luciférase permet de quantifier la quantité d'ATP intracellulaires présente (Razafimanjato *et al.* 2011).

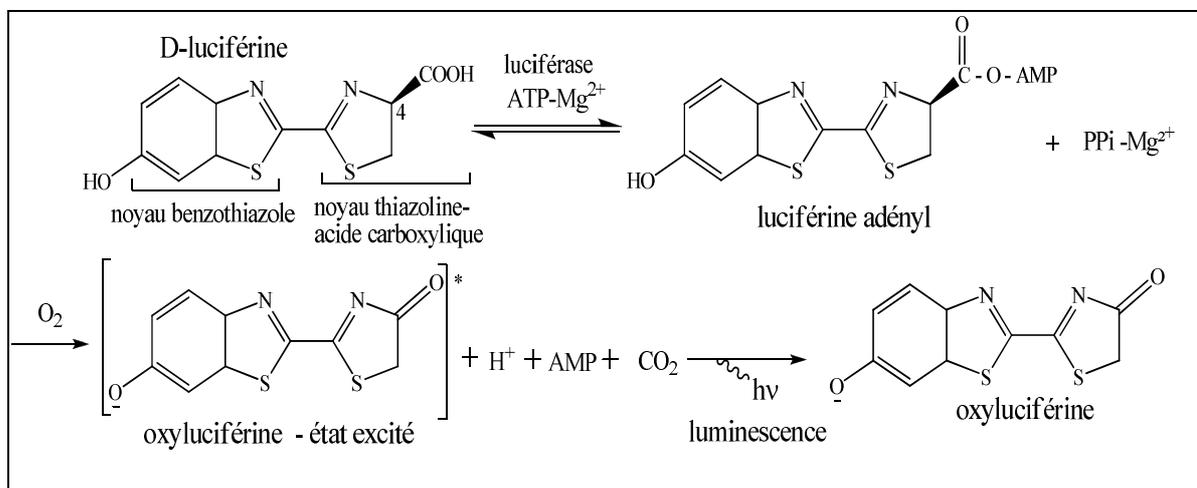


Figure 17. Schéma du mécanisme de réaction de la luciférine (Day *et al.* 2004).

La D-luciférine ($D.LH_2$) [l'acide (S)-2-(6'-hydroxy-2'benzothiazolyl)-2-thiazoline-4-carboxylique] avec l'ion magnésium (Mg^{2+}) et le métabolite ATP présent naturellement dans les cellules vivantes, en présence d'une enzyme la luciférase (luciferine 4-monooxygénase) forme un complexe ternaire. Le groupe carboxylique du carbone C₄ du noyau thiazoline de la $D.LH_2$ effectue une substitution nucléophile avec le groupe phosphate de l'ATP. Et il aboutit au départ du pyrophosphate inorganique (PPi) et à la fixation de l'adénylate de transferts (5'-AMP) sur la $D.LH_2$. Cette réaction d'adénylation produit un anhydride mixte la luciféryl-adénylate ($D.LH_2$ -AMP). L'attaque nucléophile par la molécule d'oxygène entraîne une succession d'évènements qui aboutit, après l'abstraction d'un proton, la libération de l'AMP (adénosine monophosphate) et de CO₂, à la formation de la molécule d'oxyluciférine en état excité électroniquement (sigulet). Puis la relaxation d'un photon produit une réaction chimique de décomposition de l'état excité vers l'état inférieur initial de base qui est mesuré par le luminomètre (Marques & Esteves da Silva 2009; Nakatsu *et al.* 2006; Nakatsu *et al.* 2006; Day *et al.* 2004).

L'ATP des cellules étudiées est extrait par une lyse au Triton dans un milieu sans calcium ni magnésium et à température ambiante afin de ne pas activer les ATPases

(adénosine triphosphatases) qui hydrolysent l'ATP (Le Bell Y. 1981). L'intensité lumineuse mesurée est linéaire à la concentration d'ATP (Weyermann *et al.* 2005).

Ce test basé sur la luminescence (technologie avancée) et sur l'action enzymatique permet des mesures de toxicité *in vitro* spécifiques et très sensibles (Ulukaya *et al.* 2008; Marques & Esteves da Silva 2009). Le taux d'ATP est relativement constant dans les cellules viables pour chaque type de cellules. Cependant, l'ATP est rapidement dégradé par les ATPases lorsque le cycle respiratoire cellulaire est perturbé par une molécule toxique ou se déroule en aérobie. *In vitro*, le complexe luciférase D_{LH_2} -AMP peut réagir dans le noir avec l'oxygène, et produire du dehydroluciféryl-AMP et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De plus, le temps de luminescence est limité et la luciférase est une enzyme sensible au pH (Marques & Esteves da Silva 2009).

L'ATP contenu dans les cellules est une mesure indirecte de la mesure de leur état de croissance ou de mort.

La solution de Triton à 1 % est réalisée à partir de la solution stock de Triton à 10 %. Le réactif luciférine-luciférase dilué, conservé à 4 °C, est obtenu à partir du tampon pour l'ATP bioluminescence et le réactif luciférine-luciférase x 50 est conservé à -20 °C. (Lafond M. *et al.* 2010)

La microplaque 96 puits, contenant les cellules INS-1E beta induites, est vidée puis rincée avec du PBS⁺⁺. Les cellules sont ensuite lysées par addition de 100 µL de Triton à 1 %. Après une incubation de 5 min à température ambiante, 50 µL de cellules lysées sont collectées et transférées sur une plaque opaque blanche. Le mélange est homogénéisé et incubé 30 sec. Puis il est rajouté rapidement 100 µL de réactif luciférine-luciférase (Biofax A®, Yelen, Ensuès la Redonne, France; <http://www.yelen-analytics.com>) dilué dans les puits. La luminescence émise est quantifiée après 5 min à 25 °C pendant 1 sec avec un luminomètre à microplaque mono-tube (Infinite M200 de TECAN).

L'intensité de la bioluminescence obtenue est exprimée en unité relative (RLU) et elle est proportionnelle à la concentration d'ATP restant dans les cellules. Puis ces résultats sont exprimés en % des valeurs initiales du véhicule (contrôle + DMSO 0,2%). Une courbe d'étalonnage a été obtenue à partir d'échantillons ATP standard en utilisant 50 µL de solutions ATP 0,01-100 µM. Pour chaque extrait de test, des courbes dose-réponse ont été

établies et des valeurs IC50 ont été obtenues en tant que concentration inhibant 50% de la luminescence.

6.4.4. Test d'activité caspase-3

Pour la mesure de la caspase-3, l'activité enzymatique intracellulaire des lysats cellulaires a été mesurée fluorimètre à microplaque (Infinite M200 de TECAN) utilisant un dosage de kit de microplaque commercial (Fischer Scientific, France). Le principe est le suivant : Le substrat synthétique est couplé à la molécule d'AFC (7-amino-4-trifluorométhyl coumarin). Le clivage du substrat marqué, DEVD-AFC pour la caspase 3 permet la libération d'AFC. L'activité de l'enzyme est ensuite corrélée à la quantité d'AFC présente dans le milieu.

7. Animaux et conception d'étude

Le régime standard (SD, 11% d'énergie par graisse) et le régime high-fat (HFD, 60% d'énergie par graisse) ont été achetés chez Safe (Augy, France). Tous les régimes contiennent 20% de protéines. Les soins animaux et les procédures expérimentales ont été réalisés conformément aux règles du Conseil de l'Union européenne (Directives révisées 2010/63 / UE). Ce protocole a été soumis à l'examen du comité local d'éthique de la recherche animale et a été approuvé pour le projet FEDER-AdiabaOx (2008, N ° 13851). L'Université Aix Marseille et le CNRS ont une licence pour le logement et l'expérimentation animale (accord C13-055-06) et l'étude était sous la supervision d'un vétérinaire au CNRS. Cent soixante huit souris femelles C57BL / 6J de 4 semaines ont été achetées auprès du CERJ (Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) et maintenues dans des conditions classiques avec une température contrôlée (22 ± 3 ° C) et une lumière de 12 h / Cycle sombre et accès aux aliments et à l'eau *ad libitum*.

Un environnement enrichi, en utilisant des roues, des tunnels et des jouets, a été promu activité physique et sociale. Après une semaine d'adaptation, les souris ont été assignées au hasard à trois protocoles expérimentaux décrits ci-après. Un premier protocole a examiné la toxicité aiguë par voie orale de AQL et de l'extrait de butanol à 2000 mg / kg chez les animaux ayant reçu un régime standard pendant 16 semaines (n = 4/groupe) selon la procédure de (Yamanaka *et al.* 1990). Les extraits dissouts dans une suspension aqueuse de carboxyméthylcellulose à 0,5% (en tant que véhicule), ont été administrés par voie orale dans la limite de 0,1 ml / 10 g de poids corporel. Un deuxième protocole consiste une étude

de l'activité hypoglycémiant aiguë des extraits chez les animaux ayant reçu un régime High Fat pendant 16 semaines par rapport au glibenclamide (n = 6 / groupe) comme détaillé ci-dessous. Dans une troisième série d'études, les effets antidiabétiques et antihyperglycémiques à long terme des extraits ont été évalués sur les 84 souris restantes qui ont été divisées au hasard en six groupes expérimentaux (n = 12):

Tableau 4. Répartition des souris en groupes expérimentaux

Groupes	Régimes
Groupe SD	SD est donné pendant 28 semaines.
Groupe HFD	HFD est donné pour 28 semaines.
Groupe [HFD + AQL]	HFD est administré pendant 16 semaines, suivi d'une HFD complétée par AQL (150 mg / kg) pendant 12 semaines.
Groupe [HFD + AQL75]	HFD est donné pendant 16 semaines, suivi d'une HFD complétée par AQL (75 mg / kg) pendant 12 semaines.
Groupe [HFD + n-BuOH]	HFD est administré pendant 16 semaines, suivi d'un HDF complété par l'extrait butanolique (150 mg / kg) pendant 12 semaines.
Groupe [HFD + Met]	HFD est administré pendant 16 semaines, suivie d'une HFD complétée avec de la metformine (150 mg / kg) pendant 12 semaines
Groupe [HFD + Met75 + AQL75]	HFD est administré pendant 16 semaines, suivi d'une HFD complétée par un mélange de metformine (75 mg / kg) et AQL (75 mg / kg) pendant 12 semaines.

Les mesures hebdomadaires des poids et les estimations quotidiennes de l'apport alimentaire et des signes cliniques de souffrance, la perte de poids et la morbidité ont été enregistrées.

À la semaine 16 (avant incorporation d'extraits dans le Nourriture) et 28, des échantillons de sang ont été prélevés à travers la veine de la queue sous anesthésie locale induite par une application de lidocaïne à 0,25% dans la pommade. La concentration de glucose sanguin a été mesurée à l'aide d'un analyseur automatique de glycémie complète (Freestyle Optium Neo, Abbott).

7.1. Activité hypoglycémique aiguë des extraits

Dans cette série d'expériences, des doses uniques d'extrait de butanol (25, 75, 150 et 250 mg / kg) ou de glibenclamide (15 mg / kg) dissous dans le véhicule (voir ci-dessus) ont été administrées par voie orale à travers une mince canule souple. La concentration de glucose a été surveillée dans des échantillons de sang (5 µL) recueillis à partir de la veine de queue à 0, 0,5, 1, 3 et 4 h après administration. La concentration de glucose sanguin a été mesurée par un auto-analyseur de glucose sanguin commercial.

7.2. Test oral de tolérance au glucose (OGTT) chez les souris traitées à long terme

Au bout de 28 semaines de traitements, l'OGTT a été effectué sur n = 6 animaux / groupe jeûne préalablement pendant 8 h. Une canule mince a été insérée par voie orale et a permis l'administration à chaque animal de 3 g / kg de solution de glucose (20% p / v dans une solution saline normale, Laboratoire Lavoisier, France) dans la limite de 0,1 ml / 10 g de poids corporel. Le sang de queue (6 µL) a été recueilli à 0, 20, 40, 60, 90 et 120 min après application de lidocaïne à 0,25% dans la pommade. La concentration de glucose sanguin a été mesurée, une courbe dans le temps a été générée et l'AUC a été calculée.

À la suite de l'étude OGTT, les souris ont été maintenues dans leurs régimes respectifs pendant cinq jours supplémentaires, puis jeûne pendant la nuit et profondément anesthésié à l'aide de sévoflurane (2-4%) livré avec un mélange O₂ / air dans une chambre anesthésique (Abbott, Rungis, France) avant le sacrifice par dislocation cervicale.

Le sang a été retiré par ponction cardiaque orbitaire et a été immédiatement testé pour le taux de glutathion réduits (GSH) et de glutathion oxydé (GSSG) en utilisant un kit

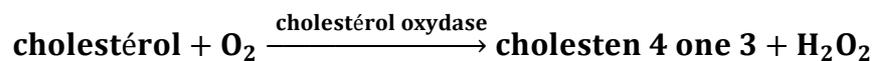
commercial de dosage de glutathion (Caymann Chemical, Bertin Pharma, France). Des échantillons d'hémolyzates de sang ont été utilisés pour la détermination de l'hémoglobine (Hb) et de l'hémoglobine glycosylée (HbA1C, exprimée en pourcentage de la teneur totale en Hb) comme décrit (Dey *et al.* 2015). Les échantillons de plasma ont été isolés par centrifugation (1650 g pendant 15 min à 3 ° C) et stockés à -80 ° C pour analyser les taux de glucose , d'insuline , des protéines carbonyliques et des marqueurs inflammatoires (voir ci-dessous). Les tissus et les organes ont été rapidement disséqués, lavés avec une solution saline et stockés à -80 ° C pour une analyse plus approfondie.

8. Dosage biochimique

Les dosages ont été réalisés à l'aide des kits Biolabo (Maizy, France) contenant les réactifs, les standards ainsi qu'un protocole permettant la réalisation des tests.

8.1. Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total (méthode CHOD-PAP) a été réalisé à 37 °C sur le plasma décongelé, récupéré sur héparine de lithium ou EDTA. La méthode utilisée est basée sur les étapes réactionnelles suivantes:



La formation de quinonéimine peut alors être quantifiée par une lecture de l'absorbance qui est, proportionnellement reliée à la quantité de cholestérol initiale de l'échantillon dosé selon (Allain *et al.* 1974).

8.2. Dosage du glucose

Le dosage de la glycémie est réalisé par le Kit GLUCOSE GOD-PAP de BIOLABO. Le principe du test, est basé sur la méthode de Trinder (Trinder, 1969); le glucose est oxydé par la Glucose Oxydase en acide gluconique et H_2O_2 réagit en présence de peroxydase avec le chloro-4-phénol et la 4-amino-antipyrine pour former une quinonéimine (chromogène rose).



La concentration du complexe coloré, proportionnelle à la concentration du glucose dans les échantillons, est mesurée par spectrophotométrie à 500 nm.

8.3. Le dosage de l'insuline

Le test est réalisé par le Kit EIA à 96 puits (MOUSE INSULIN ENZYME IMMUNOASSAY KIT). Les puits sont aliquotés par des anticorps de type IgG produits par des cochons d'inde; à cela on ajoute un antisérum spécifiquement dirigé contre l'insuline de souris. L'insuline contenue dans les échantillons ou les standards est ajoutée et la dernière composante est le deuxième anticorps, anti-insuline lié à une enzyme l'acétylcholinestérase (AChE). Après incubation, un lavage des puits est nécessaire pour l'élimination de l'excès d'anticorps. Le réactif de Ellman contenant le substrat spécifique à l'AChE est ajouté aux 96 puits de la plaque, la coloration jaune apparaît après 1,5 heure d'agitation à température ambiante. La lecture se fait par spectrophotométrie, utilisant un lecteur de plaque entre 404-414 nm.

8.4. Dosage du GSH / GSSG

Le kit de dosage GSH de Cayman utilise une méthode de recyclage enzymatique, en utilisant la glutathion réductase pour la quantification de GSH. Le groupe sulfhydryle de GSH réagit avec le DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque, Ellman's Réactif) et produit un acide 5-thio-2-nitrobenzoïque coloré jaune (TNB). Le disulfure mélangé, le GSTNB (entre GSH et TNB) produit de manière concomitante, est réduit par la glutathion réductase pour recycler le GSH et produire plus de TNB. Le taux de production de TNB est directement proportionnel à cette réaction de recyclage qui, à son tour, est directement proportionnelle à la concentration de GSH dans l'échantillon. La mesure de l'absorbance de TNB à 405 ou 412 nm fournit une estimation précise du GSH dans l'échantillon. Le GSH est facilement oxydé au dimère disulfure GSSG. En raison de l'utilisation de la glutathion réductase dans le kit de dosage Cayman GSH, GSH et GSSG sont mesurés et le dosage reflète le glutathion total. Le kit peut également être utilisé pour mesurer uniquement le GSSG en suivant un protocole alternatif.

8.5. Dosage du Hb/HbAc-1

Le kit de dosage Hb/HbAc-1 de Cayman est basé sur la réaction de phénol-acide sulfurique avec les glucides. Les hémolyzates ont été traités avec l'acide oxalique dans HCl, les protéines ont été précipités avec de l'acide trichloroacétique et les sucres libres et l'hydroxyméthyl furfural dans le surnageant exempt de protéines ont été traités avec du phénol et de l'acide sulfurique pour former la couleur..

8.6. Dosage du Glycogène

Le glycogène est un polysaccharide qui constitue la principale forme de stockage du glucose dans les cellules animales et humaines. Le glycogène est principalement constitué par le foie et les muscles, mais il peut également être réalisé par glycogénèse dans le cerveau et l'estomac. Cayman's Glycogen Assay fournit un outil simple, reproductible et sensible pour le dosage du glycogène à partir des tissus. Dans ce dosage, le glycogène est hydrolysé par l'amyloglucosidase pour former du β -D-glucose, qui est ensuite spécifiquement oxydé en D-glucono- δ -lactone par du peroxyde d'hydrogène contenant de la glucose-oxydase dans le procédé. Le peroxyde d'hydrogène, en présence de peroxydase, réagit avec la 10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine (ADHP) pour générer le resorufin

produit hautement fluorescent qui est mesuré à une longueur d'onde d'excitation de 530-540 nm et une longueur d'onde d'émission de 585-595 nm.

8.7. Dosage des marqueurs inflammatoires (cytokine / chemokine)

Le dosage des marqueurs inflammatoires chez le souris ont été réalisés avec un kit Millipore à façon (RECYTMAG-65K; Miliplex Map, Merck, France) sur un Magpix (Luminex Corporation) couplé au logiciel Xponent 4 au centre d'immunophénomique du CIPHE, en suivant le protocole du kit. La Technologie Luminex™ est une technologie récente qui repose sur le principe de la cytométrie en flux en alliant l'utilisation de microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers. Les billes utilisées peuvent être couplées à leur surface avec des sondes oligonucléotidiques, des peptides ou des anticorps, permettant ainsi la détection d'allèles, d'anticorps ou de peptides. Nous avons testé 4 marqueurs: TNF α , IL6, MCP-1, Leptine. Les plasmas prélevés sur EDTA sont dilués de moitié dans la solution de dilution du kit ayant subi moins de deux cycles de congélation/décongélation. Les concentrations des échantillons sont obtenues à partir des courbes expérimentales mesurant l'intensité fluorescente médiane (MFI) en fonction de la concentration en pg.ml⁻¹.

9. Dosage des protéines de carbonyles

Les protéines de protéines de plasma ont été dosées en utilisant une méthode fluorimétrique basée sur la dérivatisation avec le 7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole (NBDH, Sigma-Aldrich) (Stocker *et al.* 2015). Les échantillons de plasma ont été dilués avec 4 vol de PBS 0,1X avant analyse. Ensuite, 100 μ L d'échantillons dilués ont été placés dans des microplaques à 96 puits et ont réagi pendant 15 minutes à température ambiante avec une aliquote (100 μ L) du kit de dosage NBDH (Carbofax®, Yelen). La concentration des carbonyles à base de NBDH a été déterminée par fluorescence (émission déterminée à 560 nm en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 480 nm) par rapport aux courbes d'étalonnage standard construites à partir de sérum albumine bovine oxydée. Les teneurs en carboxyle des protéines ont été calculées par rapport à la teneur totale en protéines obtenue à l'aide du kit de dosage de la protéine Pierce BCA (Fisher Scientific) et exprimées en nmol par mg de protéines.

10. L'activité de la NADPH oxydase dans le muscle ventriculaire et le muscle squelettique

La production d'O₂ déclenchée par NADPH oxydase dans le tissu musculaire du ventricule cardiaque et du squelette a été surveillée par chimiluminescence en présence de NADPH (Yokota *et al.* 2009). En bref, le corps récidive et le tissu musculaire des membres postérieurs ont été congelés instantanément avec du N₂ liquide et homogénéisés dans un tampon contenant 250 mM de saccharose et 10 mM de HEPES. Après centrifugation (12000 g, 10 min à 3 ° C), 5 µL du lysat ont été mélangés dans chaque puits avec 200 µL de tampon contenant (en mM): NaCl (98), NaHCO₃ (25), KCl (4.7), KH₂PO₄ (1,5), MgSO₄ (1,2), glucose (11) et HEPES-Na (20). La chimiluminescence a été surveillée après addition de 5 µM de lucigénine et 100 µM de NADPH pour le début de la réaction. Dans tous les groupes, des expériences de contrôle ont été effectuées en présence de l'acide O₂-4-dihydroxy-1,3-benzène-disulfonique perméable aux cellules (Tiron, 20 mM) ou l'inhibiteur de la flavoprotéine diphénylèneiodonium (DPI, 10 µM).

11. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales (méthode Biuret) a été réalisé sur le plasma récupéré sur héparine de lithium ou EDTA décongelé. La composition globale en protéines d'un sérum ou d'un plasma doit être étudiée par détermination du contenu en protéines totales. La méthode utilisée est basée sur la réaction :



La formation de complexe coloré peut alors être quantifiée par une lecture de l'absorbance (à 550 nm) qui est, proportionnellement reliée à la quantité de protéines totales de l'échantillon dosé.

12. Analyse des données

Les traitements statistiques sont effectués avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). Les différences sont considérées comme significatives lorsque $P < 0.05$ [ns= non significatif ($p > 0.05$); *= significatif ($p < 0.05$); **= très significatif ($p < 0.01$); ***= hautement significatif ($p < 0.001$)]. Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm écart type à la moyenne. Les corrélations entre les données des analyses antioxydantes ont été calculées en utilisant les coefficients de corrélation de Pearson (r^2). Pour les autres expérimentations, les différences issues des traitements ont été analysées en utilisant le test de Mann-Whitney ou l'analyse de variance à une voie (ANOVA 1) suivie lorsqu'un effet significatif apparaît d'un test de comparaison multiple (Test de Newman-Keuls ou de Tukey).

RESULTAS ET DISCUSSION

1. Analyses TPC, TFC et HPLC

Les composés phénoliques sont des composés phytochimiques antioxydants avec des effets bénéfiques bien documentés sur la santé (Del Rio *et al.* 2013) et dans les plantes désertiques / steppiques comme *A. radiata*, ils sont censés fournir une protection renforcée contre les conditions sévères de stress oxydant environnementales. Pour augmenter le teneur des polyphénols totaux (TPC) de l'extrait aqueux lyophilisé (AQL) obtenu par lyophilisation d'un extrait d'eau chaude des parties aériennes de la plante similaire à l'infusion / décoction traditionnelle, une procédure d'extraction organique en plusieurs étapes utilisant d'abord du méthanol, suivie d'une séparation en trois étapes de la phase aqueuse avec du éther de pétrole, de l'acétate d'éthyle et du n-butanol a été réalisée (figure 9). Le TPC, le TFC et le rapport TFC /TPC de l'AQL, l'extrait méthanolique et ses fractions dérivées sont résumés dans le tableau 5. Comme montré sur le tableau 5 ci-dessus, il ya une variabilité dans la teneur des polyphénols totaux dans nos différents extraits. Selon les résultats présenté dans le tableau 5, la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne présente une teneur de polyphénols de 158,9 mg EAG/g de matière sèche, suivie par la fraction n-butanol de la même partie avec un taux de 122,5 mg EAG/1g de matière sèche, tandis que dans on note de faible teneur 36,9 mg EAG/1g de matière sèche, 29,9 mg EAG/1g de matière sèche dans la fraction aqueux résiduelle (AR) et d'éther de pétrole (PE) respectivement. Le classement de TPC dans ces extraits est comme suit : acétate d'éthyle > n-butanol > AQL> méthanol> AR fraction>PE.

Nos résultats ont démontré une teneur élevée en composés phénoliques et flavonoïdes pour l'extrait AQL et de méthanol qui représente la moyenne des valeurs indiquées pour les extraits hydroalcooliques d'*A. radiata* p. Ex., 57 mg GAE / g dans (Hamada & Ladjel 2015) ou 100-200 mg GAE / g dans (Bammou *et al.* 2015), reflétant éventuellement une variabilité géographique ou saisonnière, ou des différences dans les procédures de séchage des plantes.

Les différences marginales trouvées entre les extraits aqueux et de méthanol concernant TPC et TFC ne sont pas surprenants car ces solvants peuvent dissoudre également une grande partie des composés phénoliques polaires (Daneshfar *et al.* 2008). Cependant, l'utilisation d'extrait de méthanol comme matière de départ pour un fractionnement supplémentaire a été jugée plus pertinente puisqu'elle a significativement favorisé la récupération des flavonoïdes, c'est-à-dire, une augmentation de 40 à 75% du rapport TFC / TPC entre les extraits a été

enregistrée (tableau 5). Comme prévu, les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol ont montré les TPC et TFC les plus élevés par rapport à l'extrait méthanolique.

Tableau 5. Teneur totale en phénol (TPC), teneur totale en flavonoïdes (TFC) et concentrations de composés phénoliques^a dans les extraits *d'A. radiata* détectés par HPLC-DAD

Extract ^b	TPC (mg GAE ^c / g)	TFC (mg RUE / g)	TFC/TPC	Principaux composés phénoliques		
				Dérivés hydroxycinnamique (mg CAE/g)	flavonoïdes (mg RUE/g)	Dérivés hydroxybenzoïque (mg GAE / g)
AQL	77.4 ± 3.5*	32.5 ± 0.3*	0.42 ± 0.03	17.89 ± 1.07*	13.28 ± 1.23*	1.41 ± 0.09*
MeOH-ext	65.8 ± 1.8*	48.4 ± 0.9*	0.74 ± 0.04*	24.10 ± 1.44*	29.01 ± 2.63 [#]	3.05 ± 0.20 [#]
PE-ext	29.9 ± 1.2 [§]	15.5 ± 0.6 [§]	0.51 ± 0.04	4.05 ± 0.38 [§]	1.73 ± 0.10 [§]	0.47 ± 0.03 [§]
EtOAc-ext	158.9 ± 5.3 [‡]	63.1 ± 1.8 [#]	0.40 ± 0.05	90.91 ± 5.16 [‡]	66.82 ± 13.81 [‡]	nd ^d
<i>n</i> -BuOH-ext	122.5 ± 3.2 [#]	59.6 ± 1.1 [#]	0.48 ± 0.02	56.38 ± 3.20 [#]	39.65 ± 2.85 [#]	3.6 ± 0.23 [#]
AR	36.9 ± 1.3 [§]	8.3 ± 0.1 [§]	0.22 ± 0.01 [§]	6.68 ± 0.40 [§]	nd	nd

Statistiques: Les mêmes symboles *, §, # ou ‡ indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,02$) des autres par test ANOVA à un facteur suivi du test des comparaisons multiples de Newman-Keuls.

^a Les valeurs sont exprimées par gramme d'extrait et représentent la moyenne ± SEM de 3-6 expériences indépendantes réalisées en triplicata

^b AQL, extrait aqueux lyophilisé; MeOH-ext, extrait méthanolique; PE-ext, extrait éther de pétrole; EtOAc-ext, extrait acétate d'éthyle; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique AR fraction, fraction aqueux résiduelle.

^c GAE, équivalents d'acide gallique; RUE, équivalents de rutine; CAE, équivalents d'acide caféique.

^d nd: non-détecté.

Récemment, l'utilisation d'une procédure de partition de l'eau similaire avec de l'acétate d'éthyle et du n-butanol a conduit à un TPC optimisé à partir d'extraits d'hexane de *Rhododendron anthopogonoides* (Jing *et al.* 2015). Dû au plus faible TPC et TFC récupérés dans les fractions PE et AR, les résultats ont indiqué que les composés phénoliques totaux des parties aériennes d' *A. radiata* pourraient être enrichis dans les fractions hydroalcooliques et acétate d'éthyle.

Comme le TPC et le TFC ont été déterminés plus avant, l'identification et la quantification du profil phénolique dans les six extraits d' *A. radiata* a été réalisée par HPLC en utilisant un détecteur à matrice de diodes (DAD). Les chromatogrammes représentatifs sont représentés sur la Figure 18. L'analyse qualitative et quantitative de chaque extrait est présentée dans le tableau 5. Les dérivés hydroxycinnamiques et flavonoïdes, qui sont présents en quantités significatives dans les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol avec une gamme de composés tout à fait différente (figure 18), ont encore été trouvés avec de bons rendements dans l'extrait AQL et méthanol, alors qu'ils ont été récupérés en faibles quantités ou même traces dans les fractions PE et AR. Selon leur polarité plus élevée, les dérivés hydroxybenzoïques sont apparus en tant que constituants mineurs dans les extraits hydroalcooliques. Ces classes de composés phénoliques ont été facilement identifiées par comparaison avec les temps de rétention (t_R) et les spectres UV d'échantillons standards authentiques d'acides galliques ($t_R = 4,2\text{min}$) et caféïques ($t_R = 13,4\text{min}$), et de rutine ($t_R = 28,2\text{min}$) aux longueurs d'onde d'absorption maximale de 280, 320 et 350 nm, respectivement.

L'AQL et l'extrait méthanolique présentent des profils HPLC-DAD proches, qui ne diffèrent que par quelques flavonoïdes supplémentaires. L'efficacité du schéma de fractionnement d' *A. radiata* (figure 9) est illustrée par le fait que la fraction AR ne contenait que des traces de dérivés hydroxycinnamiques (figure 18). De plus, la fraction butanol a conservé une teneur en flavonoïdes de ~ 40 mg RUE / g, correspondant à celui rapporté par (Dendougui *et al.* 2006) qui extrait une quantité similaire de matière sèche d' *A. radiata* en utilisant du méthanol. Parmi les contenus phytochimiques, des corrélations fortes ont été obtenues entre les TPC et les dérivés hydroxycinnamiques ($r^2 = 0.956$, $P < 0.001$) ou les flavonoïdes ($r^2 = 0.892$, $P < 0.01$), alors que les composés hydroxybenzoïques ne sont pas corrélés ($P > 0.05$) (Tableau 7).

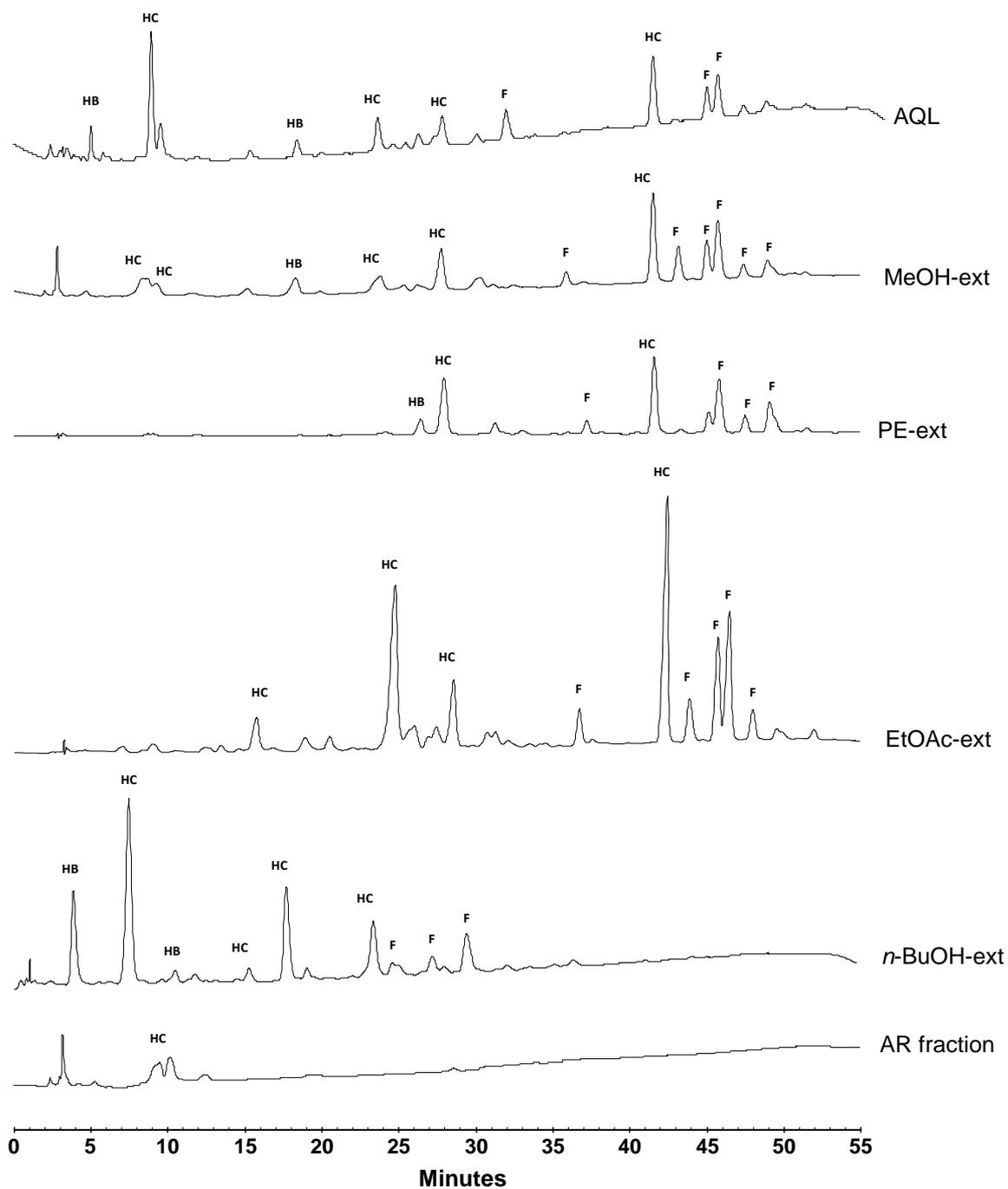


Figure 18. Chromatogrammes HPLC-DAD des composés phénoliques *d'A. radiata* détectés à 280 nm dans divers extraits.

AQL, extrait aqueux lyophilisé; MeOH-ext, extrait méthanolique; PE-ext, extrait éther de pétrole; EtOAc-ext, extrait acétate d'éthyle; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique AR fraction, fraction aqueux résiduelle; HB, dérivés de l'acide hydroxybenzoïque; HC, dérivés de l'acide hydroxycinnamique; F, dérivés de flavonoïdes.

2. Propriétés antioxydantes *in vitro*

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par une série d'essais qui diffèrent par leurs paramètres, c'est-à-dire, les mécanismes impliqués et / ou les cibles.

2.1. DPPH, ORAC et TRAP

Les résultats de DPPH (réalisée dans le méthanol et mesurant globalement l'activité de réduction des radicaux libres (Ambigaipalan *et al.* 2016; Foti 2015)), ORAC et TRAP (tous deux effectués en tampon et mesurant le piégeage de radicaux peroxydes) sont montrés dans le tableau 6. Dans le test DPPH, où une valeur IC₅₀ plus faible indique une activité accrue, les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol ont présenté l'activité la plus élevée (IC₅₀ ~ 45 µg/ml) (tableau 6). La fraction AR et l'extrait de PE étaient 5-10 fois moins puissants et la metformine médicament antidiabétique standard s'est révélée inactive (IC₅₀ > 500 µg / mL). Un tel effet scavenger de DPPH plus élevé pour l'acétate d'éthyle et le butanol contre les extraits de méthanol ont déjà été observés (Benhammou *et al.* 2009; Jing *et al.* 2015). En comparaison avec la littérature (Bammou *et al.* 2015), la méthode développée dans la présente étude pour préparer des extraits de AQL, de méthanol et d'acétate d'éthyle d' *A. radiata* a significativement amélioré l'activité scavenger de DPPH. Une analyse de la relation entre les données TPC, TFC et DPPH a indiqué de bonnes corrélations ($P < 0,05$) entre ces paramètres, avec les coefficients de Pearson $r^2 = 0,672$ pour TPC et $r^2 = 0,678$ pour TFC (tableau 7).

Les composés phénoliques acide caféique, quercétine et acide gallique ont montré des activités beaucoup plus fortes dans le test DPPH, avec des valeurs IC₅₀ de $4,71 \pm 0,05$, $1,71 \pm 0,39$ et $1,26 \pm 0,01$ µg/mL, respectivement (tableau 6). Étant une réaction à base d'électron unique avec des intermédiaires radicaux phénoxydes, la désactivation du DPPH est favorisée dans les composés phénoliques contenant du catéchol (comme dans l'acide caféique et la quercétine) ou du pyrogallol (comme dans l'acide gallique) moieties (Alov *et al.* 2015; Foti 2015). Ceci pourrait expliquer les activités plus élevées observées dans les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol qui sont enrichis en constituants hydroxycinnamiques structurellement apparentés (Tableau 5 et Figure 18) ayant des propriétés antioxydantes connues (Shahidi & Chandrasekara 2010). Une bonne corrélation a été trouvée entre les données de DPPH et les teneurs en hydroxycinnamiques ($r^2=0,534$, $P < 0,05$) (tableau 7).

Enfin, les valeurs TIC₅₀ ont été déterminées pour caractériser le comportement cinétique des extraits dans le piégeage de DPPH. Selon un classement antérieur (Sanchez-Moreno *et al.*

1998), l'acide caféique est un scavenger rapide ($TIC_{50} = 8,8$ min), les extraits AQL, acétate d'éthyle et butanol ont montré des propriétés cinétiques intermédiaires similaires à celle de l'acide gallique ($TIC_{50} = 29,8$ min), tandis que les extraits de méthanol et de PE, et la fraction AR étaient les pièges les plus lents, comparables à la quercétine ($TIC_{50} > 60$ min) (tableau 6).

Tableau 6. Capacités antioxydantes dans les tests DPPH, ORAC et TRAP^a.

Extract ^b	DPPH		ORAC	TRAP
	IC ₅₀ (μg/mL)	TIC ₅₀ (min) ^c	μmole TE ^d / g	μmole TE/ g
AQL	130.3 ± 4.3*	23.7*	1390 ± 50*	512.4 ± 21.2*
MeOH-ext	140.3 ± 5.2*	46.1	1475 ± 95*	498.5 ± 19.9*
PE-ext	518.7 ± 35.7 [§]	42.7	363 ± 11 [§]	15.3 ± 4.2 [§]
EtOAc-ext	43.5 ± 0.1 [#]	22.6*	3900 ± 20 [‡]	935.0 ± 44.0 [#]
<i>n</i> -BuOH-ext	47.9 ± 2.6 [#]	24.6*	3315 ± 98 [#]	787.7 ± 45.2 [#]
AR	283.3 ± 25.1 [§]	59.3	503 ± 69 [§]	32.9 ± 6.8 [§]

Statistiques: Les mêmes symboles *, §, # ou ‡ indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,02$) des autres par test ANOVA à un facteur suivi du test des comparaisons multiples de Newman-Keuls

^a Valeurs représentent la moyenne ± SEM de 3-6 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

^b AQL, extrait aqueux lyophilisé; MeOH-ext, extrait méthanolique; PE-ext, extrait éther de pétrole; EtOAc-ext, extrait acétate d'éthyle; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique AR fraction, fraction aqueux résiduelle

^c Temps d'atteindre l'état d'équilibre à IC₅₀.

^d Équivalent Trolox.

La capacité antioxydante déterminée par ORAC et TRAP a constamment montré une augmentation significative pour les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol par rapport à l'extrait initial AQL et de méthanol (tableau 6). Des corrélations très significatives ont été trouvées entre ORAC ($r^2 = 0,950$, $P < 0,001$) ou TRAP ($r^2 = 0,821$, $P < 0,01$) et les teneurs en dérivés hydroxycinnamiques (tableau 7). Les corrélations sont restées fortes concernant les teneurs en flavonoïdes, avec les coefficients de Pearson $r^2 = 0,893$, $P < 0,01$ pour ORAC et $r^2 = 0,832$, $P < 0,05$ pour TRAP (tableau 7). Encore une fois, la metformine s'est avérée inefficace dans les tests TRAP et ORAC.

Tableau 7. Coefficients de corrélation de Pearson (R^2) entre l'activité antioxydante et le contenu phytochimique d'*A. radiata*.

	TPC	TFC	Hydroxy-benzoate	Hydroxy-cinnamate	Flavonoid	DPPH	ORAC	TRAP	O ₂ ⁻ Quenching	MCC
TPC	1	0.8107**	0.658	0.956***	0.891**	0.672*	0.978***	0.925**	0.711*	0.434
TFC		1	0.982**	0.760*	0.860*	0.678*	0.893**	0.832*	0.776*	0.294
Hydorxybenzoate			1	0.784	0.988**	0.688	0.748	0.763	0.593	0.845*
Hydorxycinnamate				1	0.955**	0.534*	0.950***	0.821**	0.556*	0.405
Flavonoid					1	0.575	0.893**	0.832*	0.448	0.640*
DPPH						1	0.657*	0.801**	0.926**	0.657*
ORAC							1	0.915**	0.410	0.464
TRAP								1	0.557*	0.384
O ₂ ⁻ quenching									1	0.689*
MCC										1

Statistiques: Les valeurs sont significativement différentes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$) par coefficient de corrélation de Pearson. MCC, capacité de chélation des métaux.

2.2. Effet scavenger des radicaux superoxydes et effets inhibiteurs sur les pro-oxydants

Pour limiter le stress oxydatif, l'inhibition de l' $O_2^{\bullet-}$ et/ou de certaines sources biologiques et conditions de production pourrait être pertinente pour l'utilisation médicinale d'*A. radiata*. Les résultats de l'inhibition de XO (en mesurant la production d'acide urique selon (Cos *et al.* 1998), le piégeage de $O_2^{\bullet-}$ (par une méthode de fluorescence (Cassien *et al.* 2016)) et la détermination de MCC (par le ferrozine (Ambigaipalan *et al.* 2016) effectuées dans du méthanol) sont indiquées dans le tableau 8. Seuls les extraits de AQL, de méthanol, d'acétate d'éthyle et de butanol ont montré une faible activité inhibitrice de XO ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) par rapport à des inhibiteurs assez puissants (allopurinol et quercétine) ou modérés (acides caféique et gallique).

Le tableau 8 montre que les mêmes extraits démontrant une inhibition appréciable contre XO possèdent des activités de piégeage de $O_2^{\bullet-}$ beaucoup plus fortes (c'est-à-dire environ 1000 fois), comme indiqué par des valeurs de IC_{50} significativement inférieures à $0,3 \mu\text{g/mL}$. De fortes corrélations positives ($P < 0,05$) ont été obtenues entre le piégeage de $O_2^{\bullet-}$ et TPC ($r^2 = 0,711$), TFC ($r^2 = 0,776$) et les dérivés hydroxycinnamiques ($r^2 = 0,556$), mais pas avec les dérivés hydroxybenzoïques (tableau 7), suggérant la participation des composés phénoliques des extraits (et en particulier des hydroxycinnamates).

La valeur MCC, indice de la capacité des composés à inhiber la peroxydation lipidique induite par le fer en formant des complexes avec Fe^{2+} , présente de fortes variations entre les extraits, dans l'ordre décroissant: PE > AQL \approx méthanol > acétate d'éthyle \approx fraction AR \approx butanol (tableau 8). Globalement, les activités étaient faibles à modérées par rapport aux composés de référence, mais des corrélations non significatives ont été trouvées entre le MCC des extraits et TPC, TFC, ou l'une des activités de piégeage des radicaux peroxyde (TRAP, ORAC) et $O_2^{\bullet-}$, indices testés ci-dessus ($r^2 = 0,294 - 0,464$) (tableau 7). une corrélation inverse a été observée entre l'activité réductrice de MCC et DPPH ($r^2 = 0,657$, $P < 0,05$) (tableau 7), en accord avec les observations précédentes (Zhao *et al.* 2008), suggérant que les extraits ayant une capacité MCC plus élevée pourraient avoir une activité de piégeage plus faible. Notamment, une corrélation négative a été trouvée entre MCC et la teneur en flavonoïdes déterminée par HPLC ($r = -0,853$, $P < 0,05$) (tableau 7) suggère que dans la plupart des extraits, les flavonoïdes peuvent être principalement sous forme de complexe

métal-flavonoïde, avec une faible capacité de chélation mais des propriétés anti-oxydantes accrues (Liu & Guo 2015), plutôt que des conjugués glycosidiques.

Tableau 8. Inhibition de la xanthine oxydase (XO), quenching du superoxyde et capacité de chélation des métaux (MCC)^a.

Extrait ou composé ^b	XO inhibition	Superoxide quenching	MCC
	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	μmol EDTAE/g ^c
AQL	531.0 ± 6.1*	0.222 ± 0.005*	40.1 ± 4.3*
MeOH-ext	309.3 ± 8.7†	0.267 ± 0.007*	35.4 ± 4.7*
PE-ext	> 2400 [§]	1.740 ± 0.030 [§]	70.9 ± 9.2*
EtOAc-ext	120.3 ± 8.2 [#]	0.145 ± 0.005 [#]	15.2 ± 0.9 [#]
<i>n</i> -BuOH-ext	352.0 ± 8.7†	0.186 ± 0.009 [#]	10.0 ± 1.4 [#]
AR	> 2400 [§]	0.554 ± 0.005 [§]	19.0 ± 0.7 [#]
Acide caffeique	19.5 ± 2.1‡	0.013 ± 0.000‡	123.4 ± 1.9†
Quercetine	4.2 ± 0.2‡	0.083 ± 0.006‡	102.1 ± 1.2‡
Acide gallique	41.12 ± 1‡	0.002 ± 0.000‡	88.2 ± 1.8‡
Allopurinol	1.1 ± 0.1	—	—
Metformine	> 1000	>100	—

Statistiques: Les mêmes symboles *, §, # ou ‡ indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) des autres par test ANOVA à deux facteur suivi du test des comparaisons multiples de Newman-Keuls.

^a Valeurs représentent la moyenne ± SEM de 3-6 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

^b AQL, extrait aqueux lyophilisé; MeOH-ext, extrait méthanolique; PE-ext, extrait éther de pétrole; EtOAc-ext, extrait acétate d'éthyle; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique AR fraction, fraction aqueux résiduelle

^cEquivalents d'EDTA.

2.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles des extraits hydrosolubles

L'activité inhibitrice HO[•] a d'abord été déterminée en utilisant un dosage radiomimétique (avec EDTA) et spécifique au site (sans EDTA) de désoxyribose dans un tampon phosphate, pH 7,4. Tous les trois extraits solubles dans l'eau présentent une inhibition de dégradation oxydative du désoxyribose dépendante de la concentration dans les deux conditions, avec un pic à environ 0,25 mg/mL et une plus grande activité observée dans le dosage radiomimétique (figure 19A). Le pouvoir de piégeage de HO[•] libres estimé par dosage radiomimétique (Halliwell *et al.* 1987) entre les extraits est dans l'ordre suivant: butanol ≈ AQL > fraction AR. Le pouvoir de chélation du fer, estimé par le test spécifique au site (Aruoma *et al.* 1987), a diminué entre les extraits dans l'ordre suivant: butanol > AQL ≈ fraction AR, une divergence avec les données MCC (tableau 8) peut provenir des différences de solvant et de pH. A une concentration de 0,3 mg/ml, tous les échantillons présentent une augmentation marquée de l'absorbance, en particulier dans des conditions radiomimétiques (figure 19A). Un tel effet pro-oxydant dans le dosage du désoxyribose est commun à plusieurs polyphénols et flavonoïdes dérivés de plantes tels que la quercétine (Puppo 1992), et la forte activité observée dans l'extrait de butanol peut être liée à ses teneurs élevées en TPC et en TFC (Tableau 5).

En outre, le taux constant relatif de piégeage de HO[•] par les extraits a été estimé en déterminant les pentes de la courbe de 1/A₅₃₂ contre la concentration dans le dosage radiomimétique (figure 19B). En utilisant cette méthode, un taux constant de 1,9 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹ a été obtenu pour le mannitol, en accord avec les données de la littérature (Halliwell *et al.* 1987). Ainsi, les taux constants apparents calculés pour l'extrait de butanol, AQL et la fraction AR sont respectivement de 11,2 × 10⁹, 9,5 × 10⁹ et de 6,3 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹.

Dans une seconde série d'expériences, l'EPR spin-trapping a été utilisé comme méthode alternative pour mesurer l'activité inhibitrice de HO[•]. Les radicaux hydroxyles générés dans un système Fe²⁺ -H₂O₂ ont été piégés par le spin trap DMPO pour former des adduits qui peuvent être détectés par EPR. Le signal est inhibé par les piègeurs de HO[•] qui sont en compétition avec le DMPO pour HO[•]. Les résultats ont confirmé les fortes activités de piégeage du HO[•] observées dans le dosage radiomimétique du désoxyribose, avec une inhibition dépendant de la concentration des signaux EPR obtenus jusqu'à 10 mg/mL pour chaque extrait. Il doit être souligné que dans toutes les expériences avec l'extrait de butanol, aucun signal supplémentaire n'a été détecté, par exemple, des adduits centrés sur le carbone

secondaire provenant de la réaction de HO[•] avec du n-butanol résiduel. En utilisant une méthodologie établie (Finkelstein *et al.* 1980), les taux constants apparents pour le piégeage de HO[•] ont été estimés à partir des pentes des courbes cinétiques compétitives montrées sur la figure 19C. Comparé à la puissance de piégeage de l'extrait de butanol, d'autres extraits sont apparus moins efficaces dans le test EPR (-62% pour AQL et -79% pour la fraction AR) par rapport au dosage radiomimétique de désoxyribose (-15% pour AQL et -44% pour la fraction AR).

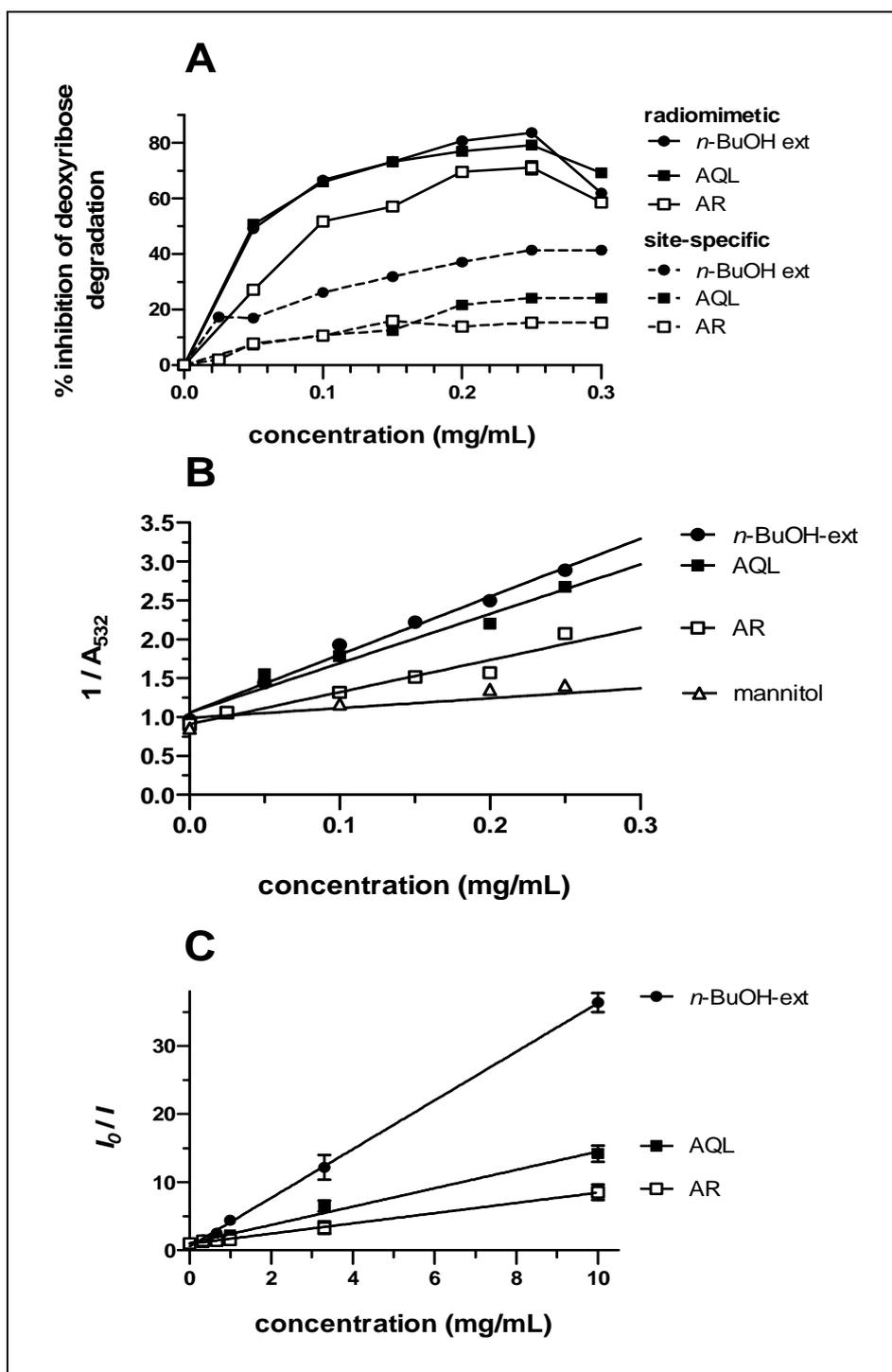


Figure 19. Radicaux hydroxylés piégés par des extraits hydrosolubles *d'A. radiata*.

Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n = 3-6$). (A) Effet concentration-dépendant des extraits sur $[Fe^{3+}$ -ascorbate- $H_2O_2]$ la dégradation du désoxyribose en présence (radiomimétique) ou absence (spécifique au site) de l'EDTA. (B) Détermination des constantes de vitesse pour le piégeage HO^\bullet . Les absorbances à 532 nm (A_{532}) ont été mesurées dans le dosage radiomimétique de désoxyribose. (C) Les courbes de compétition cinétiques pour le piégeage sur DMPO de $[Fe^{2+}$ - $H_2O_2]$ - HO^\bullet généré en présence d'extraits. AQL, extrait aqueux lyophilisé; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique; AR fraction, fraction aqueux résiduelle. I_0 et I représentent les intensités du signal EPR dans le contrôle sans extrait et l'échantillon, respectivement.

3. Activités inhibitrices contre les enzymes digestives

La surveillance des taux de glucose sanguin postprandial utilisant des inhibiteurs d'enzymes hydrolysant les carbohydrates provenant de sources naturelles est considéré comme une approche thérapeutique économiquement intéressante dans le traitement du diabète de type 2 puisque l'utilisation de drogues synthétiques est souvent associée à des effets indésirables gastro-intestinaux.

Les activités inhibitrices des extraits d'*A. radiata* contre l' α -amylase pancréatique et deux sources d' α -glucosidase (SC et RIP) ont été évaluées. Les inhibiteurs, le voglibose, le miglitol et l'acarbose, et les flavonoïdes de structure similaire, la lutéoline et la myricétine, ont été utilisés comme témoins positifs. Deux dosages d' α -glucosidases ont été réalisés parce que les enzymes d'origines différentes sont connus pour différer fortement dans les essais d'inhibition en raison de leur structure différente (Oki *et al.* 1999). Le tableau 9 montre les valeurs IC₅₀ et les concentrations d'échantillons associés avec l'inhibition maximale atteinte. Les activités inhibitrices de l' α -amylase ont diminué entre les extraits dans l'ordre suivant : acétate d'éthyle > butanol > méthanol \approx AQL, tandis que l'extrait de PE et la fraction AR étaient inactifs (non représentés). Il est à noter, qu'une inhibition plus forte de l'activité de l' α -amylase a été rapportée pour l'acétate d'éthyle et le butanol contre les extraits de PE de feuilles de *Phyllostachys edulis* et les auteurs ont conclu que les niveaux élevés de flavonoïdes contenus dans les fractions polaires peuvent agir en retardant la digestion de l'enzyme carbohydrate et en interagissant directement avec l'amidon (Yang *et al.* 2014). Les effets prononcés de l'acarbose et des deux flavonoïdes indiqués dans le tableau 9 sont en accord avec des déterminations antérieures dans des conditions similaires (Oki *et al.* 1999; Olaokun *et al.* 2013; Tadera *et al.* 2006) et, en relation avec les constituants flavonoïdes des quatre extraits actifs, une bonne corrélation était trouvé entre leur capacité d'inhibition de l' α -amylase et leurs TPC ($r^2 = 0,912$, $P < 0,05$), TFC ($r^2 = 0,973$, $P < 0,01$) et contenu hydroxycinnamique ($r^2=0,988$, $P < 0,01$).

Les activités inhibitrices de l' α -glucosidase SC et RIP ont diminué entre les extraits dans l'ordre suivant: acétate d'éthyle \approx AQL > butanol > méthanol, et butanol > acétate d'éthyle > AQL \gg méthanol, respectivement (tableau 9). Dans les deux dosages, l'extrait de PE et la fraction AR étaient de nouveau inactifs (non représentés). Dans le test SC, aucune IC₅₀ n'a été trouvée pour les extraits, le miglitol et le voglibose, tandis que l'acarbose et les deux flavonoïdes, présentent des efficacités au moins deux fois meilleures. Dans le test RIP, les

deux flavonoïdes étaient de faibles inhibiteurs de l' α -glucosidase alors que le voglibose, le miglitol et l'acarbose présentent des propriétés plus fortes (tableau 9), en accord avec des mesures antérieures (Oki *et al.* 1999). En utilisant un test SC, Silva *et al.* (Silva *et al.* 2016) ont signalé une forte activité inhibitrice de l' α -glucosidase SC pour les extraits d'acétate d'éthyle d'*Eremanthus crotonides* (Asteraceae) et identifié plusieurs constituants polyphénoliques actifs tels que la quercétine, la quercétine-3-méthyléther, la lutéoline et les dérivés de l'ester n-butylique de l'acide caféoylquinique. Cependant, dans les deux dosages d' α -glucosidase effectués dans la présente étude, aucune corrélation n'a été trouvée entre la puissance d'inhibition et le TPC et le TFC des extraits.

La plupart des études sur les extraits de plantes ou les phytoconstituants qui peuvent contribuer au traitement du diabète ont focalisé sur l'inhibition de l' α -amylase et de l' α -glucosidase, qui catalysent la digestion des glucides en glucose (Sales *et al.* 2012;Etxeberria *et al.* 2012). Plusieurs membres appartenant à la famille des Asteraceae ont été proposés comme agents antidiabétiques fonctionnels (Sidhu & Sharma 2013;Silva *et al.* 2016), une propriété associée au potentiel inhibiteur enzymatique de leurs constituants polyphénoliques, en particulier les flavonoïdes (Silva *et al.* 2016).

Tableau 9. Activités Inhibitrices contre l' α -amylase pancréatique porcine (PPA) et les α -glucosidases de *S. cerevisiae* (SC) et de la poudre intestinale d'acétone de rat (RIP) ^a

Extrait ou composé ^b	α -amylase (PPA)		α -glucosidase (SC)		α -glucosidase (RIP)	
	IC ₅₀ (μ g/mL)	inhibition (%) ^c	IC ₅₀ (μ g/mL)	inhibition (%) ^d	IC ₅₀ (μ g/mL)	inhibition (%) ^e
AQL	nm ^e	27.7 \pm 2.4*	Nm	34.6 \pm 1.7*	992 \pm 40*	50.5 \pm 1.0*
MeOH-ext	nm	35.9 \pm 2.9*	Nm	17.7 \pm 3.1 [§]	nm	18.3 \pm 0.1 [§]
EtOAc-ext	135.7 \pm 12.4 [§]	89.3 \pm 3.2 [§]	Nm	38.3 \pm 6.1*	837 \pm 25 [§]	73.2 \pm 7.8 [#]
<i>n</i> -BuOH-ext	254.7 \pm 5.2 [#]	55.2 \pm 1.2 [#]	Nm	24.8 \pm 3.1 [#]	561 \pm 53 [#]	64.5 \pm 2.1
Acarbose	0.57 \pm 0.03	> 99	114.4 \pm 3.9	63.7 \pm 2.2	18.9 \pm 0.1	62.4 \pm 2.6
Luteoline	4.58 \pm 0.52	> 99	3.8 \pm 0.4	84.6 \pm 0.8	nm	17.1 \pm 1.9
Myricetine	7.31 \pm 0.54	61.2 \pm 2.8	3.2 \pm 0.4	89.5 \pm 1.6	nm	25.3 \pm 1.1
Miglitole	nm	24.9 \pm 4.6	Nm	20.6 \pm 2.2	19.6 \pm 0.1	67.3 \pm 1.8
Voglibose	nm	23.5 \pm 2.9	Nm	12.5 \pm 3.0	0.35 \pm 0.05	70.9 \pm 1.1

^a Valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3-5 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

^b AQL, extrait aqueux lyophilisé; MeOH-ext, extrait méthanolique; EtOAc-ext, extrait acétate d'éthyle; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique.

^c Concentration donnant un pouvoir inhibiteur maximal: extraits, 286 μ g/mL; acarbose, 6.2 μ g/mL; luteolin et myricetin, 42 μ g/mL; miglitole et voglibose, 62 μ g/mL. ^d Concentration donnant un pouvoir inhibiteur maximal: extraits, 1.4 mg/mL; acarbose, 274 μ g/mL; luteolin and myricetin, 42 μ g/mL; miglitole et voglibose, 20 μ g/mL. ^e Concentration donnant un pouvoir inhibiteur maximal: extraits, 1.0 mg/mL; acarbose, 93 μ g/mL; miglitole et voglibose, 3 μ g/mL. ^e non mesurable

Statistiques: Les mêmes symboles *, §, ou # indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) des autres par test ANOVA à deux facteurs suivi du test des comparaisons multiples de Newman-Keuls.

4. Etudes de cytotoxicité

Les propriétés cytotoxiques des quatre extraits présentant les activités les plus élevées dans les tests antioxydants et les dosages d'inhibition enzymatique ont été criblés contre des cellules A549 et NHLF en mettant en œuvre la viabilité des cellules FMCA et MTT, et des dosages de l'activité métabolique. Les cellules ont été incubées dans du DMEM contenant 0,2% de DMSO comme véhicule pendant 48 h. Avant les expériences, on a vérifié que l'ajout de 0,2% de DMSO dans le milieu de culture n'induisait aucune perte de viabilité des cellules confluentes après une incubation de 48 h (non représentée). Les résultats ont montré des effets cytotoxiques très faibles de l'AQL et de l'extrait de butanol, avec des valeurs $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ dans les deux lignées cellulaires, NHLF étant naturellement plus sensible (Tableau 10). Une viabilité cellulaire beaucoup plus faible a été observée pour les extraits de méthanol et d'acétate d'éthyle et, pour cette dernière fraction, on peut proposer que la cytotoxicité puisse être liée à la présence de constituants faiblement polaires tels que les conjugués flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines ou les tanins qui peuvent interférer avec les membranes cellulaires à des concentrations élevées.

Au total, les extraits plus solubles AQL et de butanol, qui présentent des propriétés antioxydantes optimisées, inhibitrices enzymatiques et cytotoxiques faibles comparables à la metformine (Tableau 10), ont été jugé approprié pour d'autres essais *in vivo*.

Tableau 10. Cytotoxicité contre les cellules cancéreuses du poumon humain (A549) et les fibroblastes normaux (NHLF)^a

Extrait ou composé ^b	MTT IC ₅₀ (μg/mL) ^c		FMCA IC ₅₀ (μg/mL)	
	A549	NHLF	A549	NHLF
AQL	360 ± 12*	270 ± 13*	365 ± 21*	252 ± 6*
Methanol	143 ± 2 [§]	35 ± 3 [§]	123 ± 2 [§]	23 ± 1 [§]
Ethyl acetate	118 ± 2 [#]	24 ± 1 [#]	108 ± 2 [#]	17 ± 2 [#]
n-butanol	> 400	> 400	> 400	> 400
Metformine	> 400	> 400	> 400	> 400

Statistiques: Les mêmes symboles *, §, ou # indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) des autres par test ANOVA à deux facteurs suivi du test des comparaisons multiples de Newman-Keuls.

^a Valeurs représentent la moyenne ± SEM de 4-8 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

^b AQL, extrait aqueux lyophilisé; MeOH-ext, extrait méthanolique; EtOAc-ext, extrait acétate d'éthyle; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique.

^c IC₅₀ est définie comme la concentration de l'échantillon résultant en 50% de viabilité cellulaire après 48h et calculée à partir des courbes concentration-réponse.

5. Effet protecteur sur l'oxydation des LDL

Les dommages oxydatifs des molécules lipidiques sont une des premières étapes dans le développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires provoquées par l'hyperlipidémie et sa prévention par les antioxydants peut être une approche thérapeutique efficace. Les LDL humaines ont été oxydées *in vitro* par des ions cuivre en présence de 5-30 µg/mL d'AQL, d'extrait de butanol ou de metformine et le degré d'oxydation des LDL a été évalué en surveillant la production de diènes conjugués (à 234 nm) pendant 6h à 37°C et formation de TBARS (à 532 nm) immédiatement après l'incubation. Les deux extraits, à 5 µg/mL, mais pas la metformine, inhibent significativement la formation de diènes conjugués par rapport aux LDL oxydés sans extrait ($P < 0,05$ par ANOVA à deux voies), et les profils cinétiques indiquent un temps de latence différencié (> 4 h) pour la formation de diène maximal qui atteint un pic à 4 h dans le témoin (figure 20A). Relativement à l'oxydation des LDL témoins, les taux de TBARS sont significativement diminués par l'AQL et l'extrait de butanol d'une manière dépendante de la concentration (Figure 20B), avec des valeurs IC_{50} de 7,1 µg/mL et 4,2 µg/mL, respectivement. Dans ces expériences, les flavonoïdes quercétine ($IC_{50}=0,32\mu\text{g/mL}$) et la lutéoline ($IC_{50} = 0,98 \mu\text{g/mL}$), mais pas la naringénine sont des inhibiteurs plus puissants, conformément aux données de la littérature (Miranda *et al.* 2000). Encore une fois, la metformine est inefficace comme antioxydant dans la réduction de l'oxydation des LDL par rapport aux extraits.

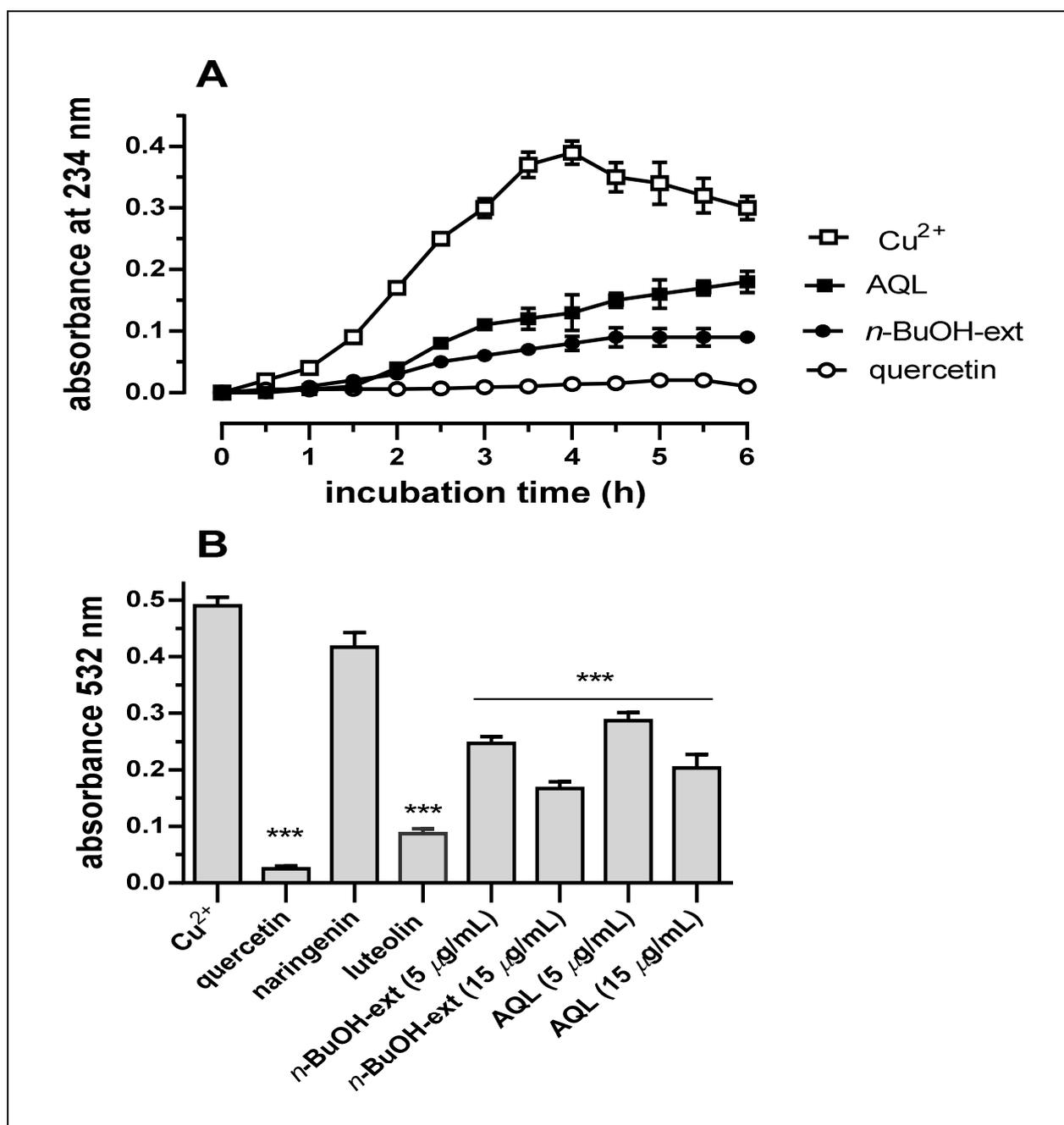


Figure 20. Oxydation de la LDL humaine (50 µg de protéines/ml) après incubation avec du CuSO₄ (2 mM) dans du PBS.

(A) Au cours du temps de la formation de diènes conjugués en l'absence ou la présence de composés testés (5 µg / ml). (B) Taux de TBARS après 6 h d'incubation en l'absence ou en présence de composés testés: quercétine et lutéoline (2 µg/mL), naringénine (25 µg/mL), metformine (25 µg/mL) ou des extraits d'*A. radiata* (5 ou 15 µg/mL). Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n = 3-6). Statistiques: *** $P < 0,001$ vs Cu²⁺ (témoin) par ANOVA à un facteur suivi de tests de comparaisons multiples.

6. Effet protecteur sur des cellules bêta-pancréatiques de rat en culture dans des conditions de glucose élevé

Dans cette étude, on a évalué si l'extrait d'AQL et de butanol peuvent favoriser la viabilité et l'activité métabolique des cellules bêta INS-1E du rat exposées à un milieu hyperglycémique imitant les conditions du diabète. Comme prévu, la viabilité cellulaire et l'activité métabolique ont été significativement réduites à environ 50% des valeurs témoins lorsque les cellules bêta ont été exposées pendant 84 h à un taux de glucose élevé (figures 21A et B). Les cellules exposées à la concentration la plus élevée de glucose de 25 mM sont apoptotiques comme en témoigne une augmentation d'environ 1,5 fois de l'activité de la caspase-3 par rapport aux conditions normales (figure 21C). Les dommages cellulaires induits par l'hyperglycémie ont été prévenus de façon dose-dépendante par l'application de 1-15 µg/mL de chaque extrait (Figure 21), ce qui suggère qu'ils peuvent être efficaces comme agents anti-apoptotiques et protecteurs à des doses compatibles avec les concentrations plasmatiques aussi bas que 5 µg/mL. En outre, ces effets des extraits sont comparables à ceux de 3 µg/mL de quercétine, ce qui suggère que la fraction phénolique de l'extrait peut être au centre de l'activité protectrice.

Bien que les données des tableaux 6 et 8 soient compatibles avec une faible propriété antioxydante et piégeante de la metformine, elles ont néanmoins exercé un effet protecteur sur les cellules bêta à 2 µg/mL, possiblement en corrigeant les anomalies du métabolisme calcique intracellulaire dans les tissus insulino-sensibles (Viollet *et al.* 2012). Un fait intéressant est que l'ajout de 5 µg/mL de AQL a fortement renforcé cet effet protecteur de la metformine sur la survie des cellules bêta (figure 21).

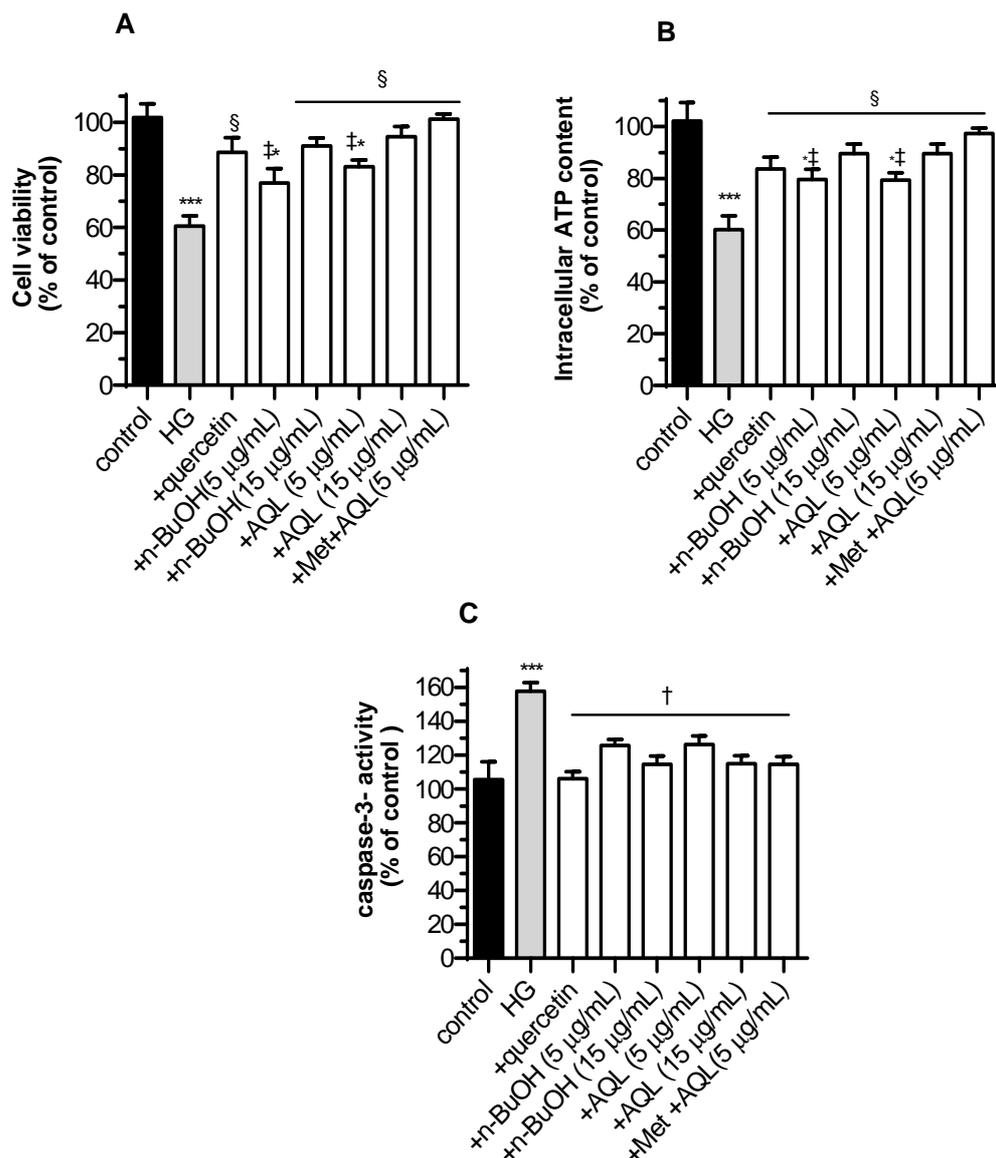


Figure 21. Effet protecteur des extraits d'*A. radiata* contre la toxicité induite par le glucose élevé dans les cellules bêta.

La viabilité cellulaire et l'apoptose ont été évaluées par (A) l'activité métabolique à base de MTT, (B) la teneur en ATP intracellulaire, (C) l'activité de la caspase-3 cytosolique.

Les cellules INS-1E ont été incubées dans du milieu RPMI 1640 contenant du glucose normal (témoin, 5 mM) ou du glucose (HG, 25 mM) pendant 84 h en l'absence ou en présence de composés testés: quercétine (3 µg/mL), AQL et extrait au butanol (5 ou 15 µg/mL) ou [Met + AQL] (à 2 et 5 µg/mL, respectivement).

Statistiques: * $P < 0,05$ et *** $P < 0,001$ vs contrôle, § $P < 0,01$ et † $P < 0,001$ vs HG et ‡ $P < 0,05$ vs [Met + AQL], par ANOVA à un facteur suivi par les tests de comparaisons multiples de Tukey.

7. Toxicité orale aiguë d'extraits sur des souris C57BL / 6 J

Aucun des animaux recevant par voie orale 2000 mg/kg d'AQL ou d'extrait de butanol n'est mort jusqu'à 10 jours, et n'a montré aucun signe de douleur, de détresse et de souffrance, il a été considéré que la DL50 est ≥ 4000 mg / kg dans les deux cas. Selon (Yamanaka *et al.* 1990), les extraits ayant une toxicité aussi faible ne nécessitent pas de tests supplémentaires pour détecter des effets létaux. Par conséquent, les prochaines études pharmacologiques ont été réalisées en utilisant la gamme de dose non toxique de 25 à 250 mg/kg de poids corporel, ce qui est pertinent pour l'utilisation de la plante en médecine traditionnelle (Ghourri *et al.* 2013).

8. Effet antidiabétique sur des souris C57BL / 6 J nourries à la graisse

Le potentiel des plantes exerçant des activités hypoglycémiques et/ou mimétiques de l'insuline à se développer en tant qu'antidiabétiques naturels est de plus en plus exploité. Leur activité biologique repose sur différents mécanismes, notamment l'inhibition des enzymes hydrolysant les hydrates de carbone, l'inhibition de la réabsorption rénale du glucose, la stimulation de la sécrétion d'insuline ou la réduction de la résistance à l'insuline, l'augmentation du nombre et de la taille des cellules dans les îlots de Langerhans, l'inhibition de la production de glucose et régulation à la hausse des transporteurs de glucose ou de l'activité antioxydante (Rios *et al.* 2015). Même si *A. radiata* fait depuis longtemps partie de la médecine traditionnelle saharienne pour traiter les maladies liées à l'hyperglycémie (Bnouham *et al.* 2006; Hammiche & Maiza 2006; Ghourri *et al.* 2013) on en sait très peu sur l'utilité de la plante dans le traitement du diabète expérimental. Compte tenu du fort pouvoir antioxydant, du piégeage radicalaire, des propriétés inhibitrices des enzymes et de l'activité protectrice des lipoprotéines et des cellules pancréatiques de l'AQL et de l'extrait de butanol établis ci-dessus, leur potentiel *in vivo* a été étudié chez des souris C57BL/6 J nourries au HFD pour déterminer (i) leur activité dose-réponse hypoglycémiant aiguë dans le sang dans les 4 h, et (ii) leur activité anti-hyperglycémique et antidiabétique après traitement oral à long terme, dans le but de délimiter les mécanismes sous-jacents.

8.1. Activité hypoglycémiant aiguë des extraits: étude de détermination de la dose

Les souris sous HFD pendant 16 semaines ont reçu les extraits par voie orale à 25, 75, 150 et 250 mg/kg ou 15 mg/kg de glibenclamide et les taux de glucose sanguin ont été

surveillés jusqu'à 4 h après le traitement. Les deux extraits ont montré une puissante propriété hypoglycémique atteignant un maximum à 150 mg/kg, avec un effet comparable à celui du glibenclamide à la dose de 15 mg/kg (figure 22A). Par conséquent, la dose 150 mg/kg est sélectionnés pour des études in vivo à long terme sur des extraits *d'A. radiata*.

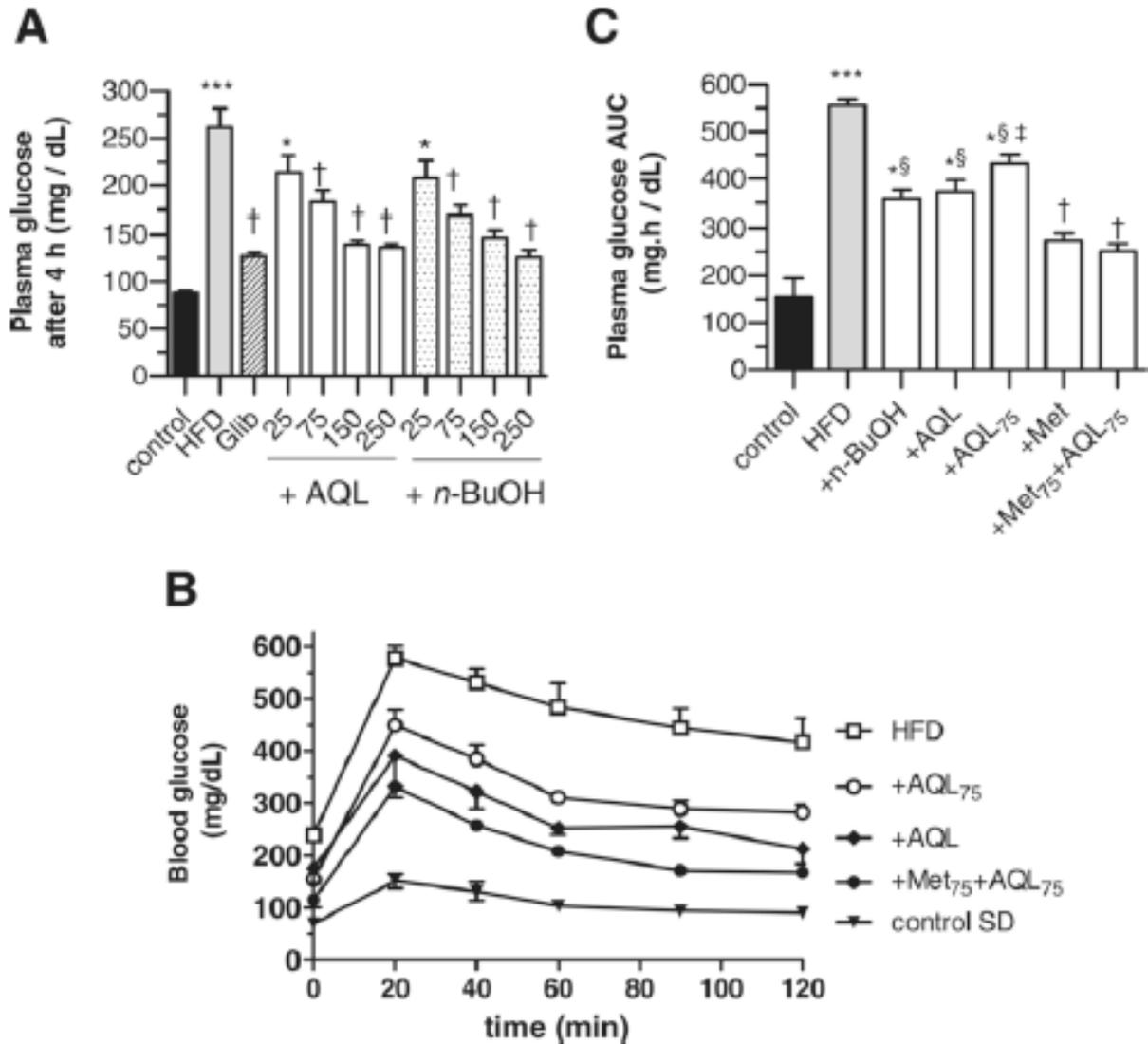


Figure 22. Effet hypoglycémiant aigu et test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) chez des souris ayant reçu des extraits d'*A. radiata*.

(A) Niveaux de glucose dans le sang après un traitement oral aigu.

(B) les niveaux de glucose dans le sang pendant OGTT.

(C) Zone sous la courbe des niveaux de glucose dans le sang pendant OGTT.

Traitements: contrôle, souris nourries avec un régime standard; HFD, souris en alimentation riche en graisses pendant 28 semaines ; + n-BuOH, souris en HFD pendant 16 semaines, puis extrait HFD + butanol (150 mg/kg) pendant 12 semaines; + AQL, souris sur HFD pendant 16 semaines, suivi de HFD + AQL (150 mg/kg) pendant 12 semaines; + AQL₇₅, souris sur HFD pendant 16 semaines, suivi de HFD + AQL (75 mg/kg) pendant 12 semaines; + Met, souris sur HFD pendant 16 semaines, suivi de HFD + metformine (150 mg/kg) pendant 12 semaines; + Met₇₅ + AQL₇₅, souris sur HFD pendant 16 semaines, suivi par HFD + [metformin + AQL] (tous les deux à 75 mg/kg) pendant 12 semaines.

Statistiques: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$ vs témoin; § $P < 0,01$ et † $P < 0,001$ vs HFD et ‡ $P < 0,05$ vs [Met₇₅ + AQL₇₅], par ANOVA a un facteur suivi des tests de comparaison multiple de Tukey.

8.2. Etude à long terme sur les souris diabétiques: prise de nourriture, poids corporel et poids de la graisse corporelle

Au début des traitements, le poids corporel moyen était de $17,1 \pm 1,1$ g ($n = 84$). Le tableau 11 montre que, après 28 semaines, les animaux du groupe HFD ont montré une prise de poids significativement plus élevée (+ 242%, correspondant à 0,85 g/semaine) par rapport au groupe contrôle SD (+ 175%, correspondant à 0,45 g/semaine). Une fois l'induction de l'obésité a été caractérisée à 16 semaines, c'est-à-dire que les poids moyens sont de $30,7 \pm 0,2$ g dans le groupe HFD et de $22,5 \pm 0,1$ g dans le groupe SD, cinq sous-groupes d'animaux du groupe HFD sont distribués dans [HFD + AQL], [HFD + AQL₇₅], [HFD + n-BuOH], [HFD + Met] et [HDF + Met₇₅ + AQL₇₅] et ont reçu en supplément 150 mg/kg de poids corporel du composé test correspondant pendant les 12 semaines restantes à l'exception des groupes [HFD + AQL₇₅] et [HDF + Met₇₅ + AQL₇₅] où les doses de AQL et Met sont de 75 mg/kg. Alors que pendant cette période le groupe HFD a continué à montrer un poids corporel plus élevé comparé au groupe SD, cette tendance de gain de poids a été significativement prévenue dans les groupes traités à 150 mg/kg, avec des prises de poids final comparables de +200%, +198% et +199% dans les groupes [HFD + AQL], [HFD + n-BuOH] et [HDF + Met], respectivement (correspondant à environ 0,65 g/semaine) (Tableau 11).

A la dose la plus faible de 75 mg/kg, l'AQL prévient toujours le développement de l'obésité (+ 206%) et l'ajout de metformine améliore même la réduction de poids (+ 191% dans le groupe [Met₇₅ + AQL₇₅]). À la fin du traitement, le pourcentage de masse grasse corporelle a été de 10% dans le groupe SD, qui a fortement augmenté jusqu'à 22% dans le groupe HFD, significativement diminué à seulement 12% dans les groupes [HFD + n-BuOH] et [HFD + Met₇₅ + AQL₇₅] et est resté dans les 14-16% dans les autres groupes traités. Comme aucun changement n'a été observé parmi les groupes concernant l'apport alimentaire (Tableau 11), la différence d'apport calorique dans le groupe HFD (c'est-à-dire environ 1,5 fois par rapport au groupe SD) est probablement responsable du gain observé dans la masse corporelle et la masse grasse.

Les résultats du groupe HFD sont en accord avec les rapports précédents sur la sensibilité de la souche C57BL /6J à développer une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une obésité lors de l'administration de HFD contenant 30-60% de graisse. Ces caractéristiques ont été rapportées pour les études de l'action curative des médicaments traditionnels dans le diabète insulino-résistant de type 2 (Gallou-Kabani *et al.* 2007; Yokota *et al.* 2009; Hamza *et al.* 2012).

Ainsi, il a été conclu que les deux extraits testés pourraient significativement réduire l'augmentation induite par le HFD du poids corporel et de l'adiposité sans affecter l'apport calorique.

Tableau 11. Effets antidiabétiques, antioxydants et anti-inflammatoires des traitements chez les souris C57BL / 6J^a.

Paramètres	^b Groupes expérimentaux						
	Control SD	HFD	[HFD+AQL]	[HFD+AQL ₇₅]	[HF+n-BuOH]	[HFD+Met]	[HFD+Met ₇₅ +AQL ₇₅]
Poids corporel (g)	29.8 ± 0.8	41.9 ± 1.0***	34.8 ± 0.9*†	35.8 ± 1.0*†‡	33.6 ± 0.9*†	33.9 ± 0.4*†	31.7 ± 0.7†
Apport alimentaire (g) ^c	286 ± 6	279 ± 12	281 ± 9	282 ± 4	285 ± 8	283 ± 1	285 ± 3
Masse grasse totale (g)	2.91 ± 0.03	8.99 ± 0.12*	4.87 ± 0.04*§	5.31 ± 0.08*§	4.07 ± 0.18*†	4.61 ± 0.07*§	3.71 ± 0.06†
Glucose (mg/dL)	85.9 ± 1.3	260.4 ± 7.4***	135.7 ± 4.4*†‡	143.5 ± 3.8†‡	137.0 ± 19.8*†	124.2 ± 2.5*†	107.5 ± 2.3†
Insuline (ng/mL)	1.8 ± 0.2	4.8 ± 0.5***	3.1 ± 0.4†	3.3 ± 0.3*†	2.7 ± 0.2†	2.5 ± 0.3†	2.2 ± 0.2†
HbA _{1C} (%) ^d	5.1 ± 0.1	8.6 ± 0.3***	5.9 ± 0.3†	6.3 ± 0.2*†	5.8 ± 0.1†	5.8 ± 0.2†	5.3 ± 0.2†
Leptine (ng/mL)	7.1 ± 1.2	36.8 ± 2.3***	15.8 ± 1.3*†	18.7 ± 1.7*†	15.3 ± 2.2†	24.0 ± 1.9*†‡	14.3 ± 1.1†
T-cholestérol (mg/dL)	53.8 ± 5.8	115.8 ± 6.5***	76.8 ± 1.2**†	88.0 ± 3.8**§	67.8 ± 2.3†	85.4 ± 3.7**†	80.1 ± 3.9**†
Triglycérides (mg/dL)	64.9 ± 2.1	111.7 ± 9.5***	82.1 ± 5.1†	89.8 ± 3.9**§	69.8 ± 3.6†	78.3 ± 2.2†	72.7 ± 3.9†
Triglycérides du foie (mg/g)	0.69 ± 0.04	6.96 ± 1.00***	2.59 ± 0.45†	2.93 ± 0.31*§	1.99 ± 0.29†	2.09 ± 0.23†	1.71 ± 0.24†
Glycogène du foie (mg/100g)	49.2 ± 2.9	19.1 ± 2.9**	38.3 ± 3.5†	35.4 ± 6.1*§	31.4 ± 6.1*§	40.3 ± 3.5§	45.3 ± 4.1†

GSH/GSSG	3.01 ± 0.07	2.08 ± 0.16***	2.99 ± 0.05 [†]	2.68 ± 0.09 [§]	2.65 ± 0.16 [§]	2.19 ± 0.11* [‡]	3.12 ± 0.08 [†]
PC (nmol/mg proteins)	0.99 ± 0.11	1.67 ± 0.12***	1.18 ± 0.12 [§]	1.26 ± 0.11 [§]	1.23 ± 0.10 [§]	1.48 ± 0.05 [‡]	1.09 ± 0.03 [†]
IL-6 (pg/mL)	9.9 ± 1.0	23.1 ± 0.9**	14.0 ± 1.9 [†]	16.6 ± 2.1* [†]	14.6 ± 2.0 [†]	16.9 ± 1.3* [†]	12.1 ± 1.0 [†]
MCP-1 (pg/mL)	48.2 ± 5.3	55.7 ± 4.4	45.3 ± 7.2	51.0 ± 5.1	56.0 ± 8.1	48.3 ± 2.2	50.0 ± 4.1
TNF-α (pg/mL)	43.5 ± 1.9	87.3 ± 4.9**	56.3 ± 3.5 [†]	61.4 ± 6.1* [§]	65.4 ± 6.1* [§]	59.9 ± 6.3 [†]	51.4 ± 6.1 [§]

Statistiques: Les valeurs sont significativement différentes des témoins (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$), HFD (§ $P < 0,05$ et † $P < 0,001$) et ‡ $P < 0,05$ vs [Met₇₅ + AQL₇₅], par ANOVA à un facteur suivi du test de comparaison multiple de Tukey.

^a Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 6-12 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les dosages ont été effectués dans du plasma sanguin sauf indication contraire.

^b Groupes et traitements: SD, souris témoins nourries avec un régime standard; HFD, souris nourries avec un régime riche en graisses (60% de matières grasses); AQL, extrait aqueux lyophilisé; n-BuOH, extrait de butanol, Met, metformine. Des extraits et de la metformine ont été administrés à 150 mg/kg/jour pendant 12 semaines consécutives à une induction de HFD de 16 semaines, sauf pour les groupes avec AQL₇₅ et Met₇₅ pour lesquels les doses étaient de 75 mg/kg/jour.

^c Nourriture moyenne consommée par souris mise en commun sur 12 semaines.

^d Abréviations: HbA_{1C}, hémoglobine glycosylée; T-cholestérol, cholestérol total; GSH / GSSG; rapport du glutathion réduit à oxydé; PC, protéines carbonyles; IL-6, interleukine-6; MCP-1, protéine monocyttaire chimioattractive 1; TNF-α, facteur de nécrose tumorale-

8.3. Effet sur la glycémie et l'insuline, tolérance au glucose, glycation de l'hémoglobine, hyperleptinémie et hyperlipidémie

Au début des traitements, les taux initiaux de glucose et d'insuline à jeun étaient respectivement de 80,4-82,6 mg/dL et de 1,2-1,6 ng/mL, une augmentation de ~300% et ~270%, respectivement, a été observée à la semaine 28 chez les souris HFD (tableau 11). Le traitement avec l'AQL ou l'extrait de butanol à la dose de 150 mg / kg et, dans une moindre mesure, à 75 mg / kg de AQL, a réduit significativement la glycémie et l'hyperinsulinémie modérée par rapport au groupe HFD. De manière prévisible, la metformine sensibilisatrice à l'insuline a montré de puissantes propriétés antihyperglycémiques à 150 mg/kg, avec un effet hypoglycémiant légèrement meilleur, mais non significatif, par rapport à l'AQL et à l'extrait de butanol à la même dose (Tableau 11).

Comparativement aux souris SD, les animaux sous HFD ont développé un diabète de type 2 avec des caractéristiques de résistance à l'insuline comme indiqué par le test OGTT. Le taux de glucose sanguin observé à 90 min est significativement réduit par un traitement avec AQL seul (150 mg/kg) ou un mélange de metformine et AQL (tous les deux à 75 mg/kg) d'une manière dépendante de la dose (figure 22B). L'amélioration de l'exposition globale au glucose a été évaluée dans les groupes supplémentés par AQL et extrait de butanol en calculant l'AUC qui a diminué de 34%, 33%, 22%, 48% et 55% dans l'AQL, butanol (150 mg/kg) , AQL₇₅, Met (à 150 mg/kg) et [Met₇₅ + AQL₇₅], respectivement (figure 22C).

Comme le montre le tableau 11, la teneur en HbA1C du groupe HFD est significativement augmentée ($P < 0,001$) par rapport au groupe SD, en conséquence de taux élevés de glucose circulant à long terme qui réagissent avec l'hémoglobine et d'autres protéines. Tous les traitements ont significativement diminué le taux d'HbA1C vers la valeur témoin, avec une meilleure efficacité présentée par la combinaison d'AQL et de metformine (les deux à 75 mg/kg), un effet compatible avec la propriété améliorée de ce mélange dans la normalisation de la glycémie et de l'hyperinsulinémie (figures 22B et C).

De plus, les données du tableau 11 ont également révélé que les traitements améliorent significativement le métabolisme et l'accumulation des lipides chez les souris diabétiques. L'hyperleptinémie a été réduite de 34,8-61,1%, les taux circulants de cholestérol et de triglycérides ont diminué respectivement de 24,0-41,5% et de 19,6-37,5%, et l'accumulation de triglycérides dans le tissu hépatique a été considérablement réduite de 57,9-75,4%. Il convient de noter que les traitements à base d'AQL ou d'extrait de butanol ont fortement diminué la masse du tissu adipeux et ont ramené les taux de cholestérol et de triglycérides à des valeurs normales, suggérant qu'ils pourraient exercer une activité lipolytique et/ou anti-adipocytaire. Chez les plantes médicinales, l'amélioration de l'efficacité anti-obésité et anti-dislipidémie a été liée à une teneur élevée en dérivés de l'acide hydroxycinnamique (Alam *et al.* 2016), caractéristique de l'extrait de butanol développé ici (Tableau 5).

Enfin, la teneur en glycogène hépatique des souris HFD est significativement appauvrie ($P < 0,01$) par rapport au groupe SD (Tableau 11), révélant une augmentation des activités des enzymes gluconéogéniques en raison de l'action altérée de l'insuline. Tous les traitements et la metformine ont fortement protégé la perte de glycogène hépatique, résultat qui peut être lié à la capacité de l'antidiabétique à réduire la gluconéogenèse hépatique et à améliorer l'absorption du glucose et la protection des cellules des îlots pancréatiques (Viollet *et al.* 2012). Cette hypothèse semble confirmée pour l'extrait AQL et de butanol en raison des résultats de l'étude sur les cellules bêta (figure 21).

8.4. Les marqueurs de stress oxydatif et les niveaux de cytokines inflammatoires

Il existe un consensus selon lequel l'hyperglycémie chronique chez les diabétiques de type 2 induit une cascade d'événements pathologiques, notamment la formation de ROS, la consommation d'antioxydants, l'augmentation de la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines et le dysfonctionnement des cellules bêta (Giacco & Brownlee 2010; Meigs 2010). Un tel état de stress oxydatif accru a été détecté dans le groupe HFD qui a démontré des niveaux abaissés de GSH/GSSG dans le sang d'environ 30% et une augmentation de 70% de la formation de protéines carbonyles par rapport au groupe SD. Les deux traitements à *A. radiata* ont complètement rétabli les niveaux normaux (pour le rapport du glutathion réduit ou oxydé) ou partiellement (oxydation des protéines) (Tableau 11), suggérant l'implication de mécanismes antioxydants tels que ceux trouvés *in vitro*

(Tableaux 6 et 8). Des études cliniques ont rapporté une bonne corrélation entre des niveaux élevés de protéines carbonyles et un mauvais contrôle glycémique (c.-à-d. quand $Hb_{A1c} > 7$), une déplétion en GSH, une altération des oligo-éléments et une peroxydation lipidique (Whiting *et al.* 2008). Bien que 150 mg/kg de metformine a produit une réduction substantielle de l'hyperglycémie et de l' Hb_{A1c} , elle n'a pas affecté de manière significative les marqueurs de stress oxydatif fournis par les extraits d'*A. radiata* à la même dose (Tableau 11). Comme dans l'étude cellulaire, un effet synergique de la metformine avec 75 mg/kg d'AQL a conduit à une normalisation du rapport GSH/GSSG sanguin et du taux de protéines carbonyles.

Le stress oxydatif associé au diabète affecte négativement (i) la fonction et la structure du myocarde, conduisant à une cardiomyopathie diabétique et à une insuffisance cardiaque, et (ii) la respiration mitochondriale du muscle squelettique, entraînant une altération de la tolérance à l'effort (Yokota *et al.* 2009; Meigs 2010). En particulier, la libération de $O_2^{\cdot-}$ consécutive à l'activation de la NADPH oxydase a été incriminée comme déclencheur de la physiopathologie des muscles cardio-vasculaire et squelettique induite par le diabète, car des taux élevés de glucose, d'acides gras ou d'insuline sont responsables des lésions mitochondriales et de l'altération de la capacité contractile dans les cellules musculaires (Yokota *et al.* 2009; Meigs 2010).

En conséquence, le myocarde et le muscle du membre postérieur des souris qui consomment un régime HFD pendant 28 semaines ont montré une forte augmentation de l'activité NADPH oxydase détectée par la lucigénine luminescence (figure 23), qui a été abolie lorsque le tissu a été traité avec l'inhibiteur NADPH DPI ou l' $O_2^{\cdot-}$ scavenger Tiron (données non montrées). Cette production de NADPH-dépendante à $O_2^{\cdot-}$ dans les deux types de tissus d'animaux diabétiques est fortement limitée par un traitement à 150 mg/kg de chaque extrait ou de metformine, ce dernier étant significativement moins actif dans le myocarde (figure 23B). Un effet dose-dépendant a été trouvé lorsque la dose AQL a été abaissée à 75 mg/kg et une fois de plus une meilleure réponse globale a été obtenue dans les groupes [Met₇₅ + AQL₇₅] par rapport à AQL₇₅.

Une autre caractéristique du syndrome métabolique associé à l'obésité est l'établissement d'un état inflammatoire chronique (légère), avec la libération de médiateurs inflammatoires qui pourraient jouer un rôle crucial dans la résistance à l'insuline (Akash *et al.* 2013). Le tableau 11 montre que les deux niveaux de cytokines IL-6 et TNF- α , mais pas

MCP-1, ont été fortement modifiés chez les souris du groupe HFD pendant 28 semaines. Parmi les extraits testés, AQL a démontré une activité anti-inflammatoire légèrement supérieure caractérisée par une meilleure action sur le TNF- α . Des études récentes ont rapporté que les extraits de plantes peuvent servir de double matériel hypoglycémique et anti-inflammatoire (Heyman *et al.* 2014), ou peuvent être utilisés comme traitements hypolipidémiques agissant éventuellement sur les voies cellulaires impliquées dans l'expression de l'adipogenèse (Lee *et al.* 2014).

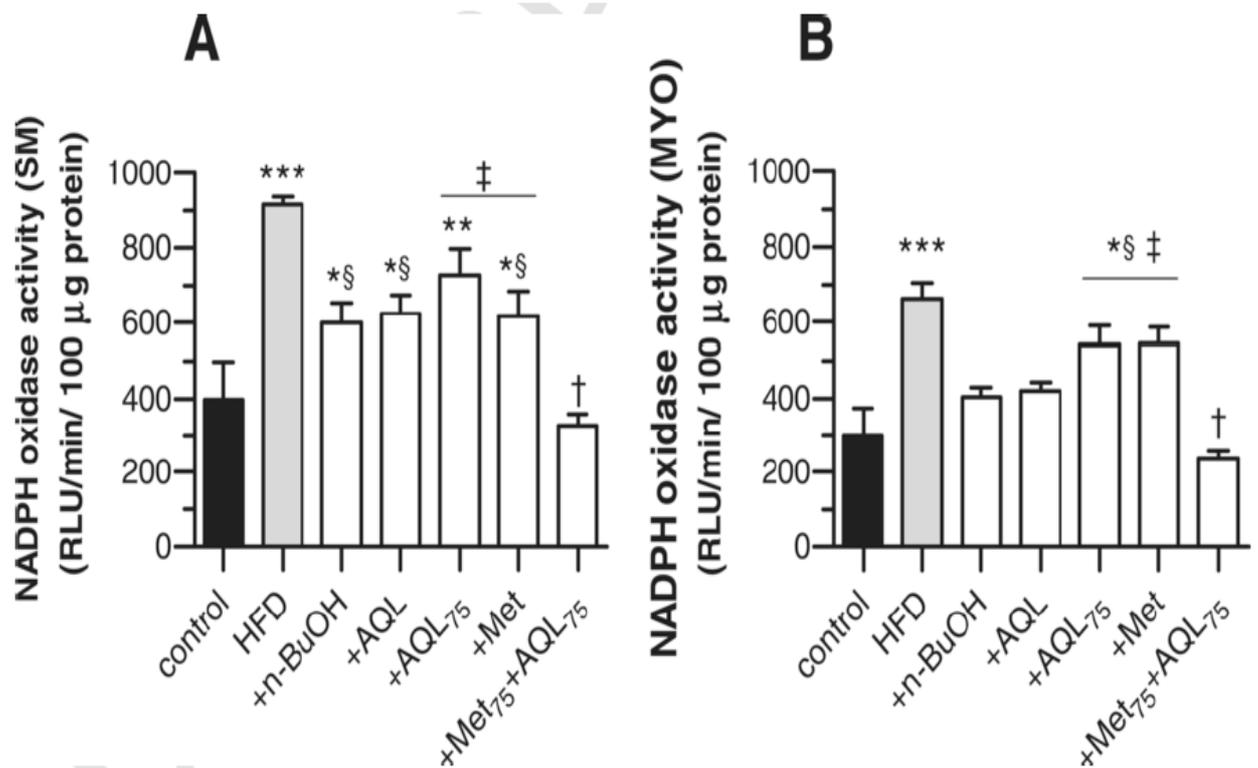


Figure 23. Activité de la NADPH oxydase dans (A) le muscle squelettique des membres postérieurs et (B) homogénats myocardiques chez des souris soumises à un régime HFD traitées avec des extraits d'*A. radiata*.

Traitements: voir la légende de la Figure 22.

Statistiques: * $P < 0,05$ et *** $P < 0,001$ vs témoin; § $P < 0,01$ et † $P < 0,001$ vs HFD et ‡ $P < 0,05$ vs [Met₇₅ + AQL₇₅], par ANOVA a un facteur suivi des tests de comparaison multiple de Tukey.

*CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES*

Notre travail a été motivé d'abord, par le souci de valoriser et de promouvoir les plantes médicinales de l'Algérie afin de faciliter l'accès des populations à des remèdes traditionnels améliorés à moindre coût. Mais aussi par la nécessité de la valorisation d'une plante d'Asteraceae algérienne, *Anvillea radiata* Coss. & Dur., par la recherche des composés qui peuvent avoir une utilisation thérapeutique. Il s'agit de renforcer la connaissance phytochimique de ces extraits de plante et de mettre en évidence des traceurs spécifiques pour cette plante en vue de l'utilisation ultérieure de ses extraits dans l'industrie pharmaceutique.

Le diabète de type 2 étudié dans le présent travail est une maladie métabolique largement répandue, qui voit sa prévalence augmenter rapidement dans le monde, puisque son incidence augmentera, selon les données de l'OMS, de 40-45 % (51 à 72 millions de personnes) entre 1995 et 2025. Son impact socio-économique est donc considérable,

La découverte des relations étroites entre l'obésité, les maladies cardiovasculaires, l'insulinorésistance et les dégradations métaboliques, se développant en relation avec l'installation d'un stress oxydant, nous a conduit à considérer l'apport potentiel de composés naturels qui pourraient être à la fois antioxydants, insulino-sensibilisateurs et hypoglycémiants, comme des facteurs de choix dans la stratégie de prévention ou d'amélioration des conséquences de ces pathologies.

En résumé, il s'agit de la première étude à rationaliser l'utilisation traditionnelle d'*Anvillea radiata* pour le traitement de l'hyperglycémie et des complications diabétiques. L'extrait aqueux lyophilisés AQL et *n*-butanol de la partie aérienne de la plante ont démontré une forte activité antihyperglycémique, antihyperlipidémique et anti-inflammatoire, et retardés les dommages myocardiques et musculaires induits par le stress oxydatif chez les souris C57/BL6J parce qu'ils souffrent d'un diabète de type 2 semblable à celui des humains suivant un régime riche en gras (Frode & Medeiros 2008). Les extraits de cette plantes sélectionnées, administrées par voie orale journalièrement durant 12 semaines de traitement, réduisent la glycémie chez les souris HDF diabétiques après traitement, de manière significative, ce qui suggère et confirme l'activité antihyperglycémiant de ces extraits chez ce modèle animal de diabète de type 2.

L'apport de ces produits à un effet sur la prise alimentaire. On observe parallèlement une amélioration de la glycémie, l'insulinémie et l'insulinorésistance. Etant donné, que ce

modèle animal génétiquement modifié présente certaines limites, des études supplémentaires ont été réalisées *in vitro* pour étudier les mécanismes d'action moléculaires potentiellement complémentaires qui peuvent soutenir l'efficacité de la plante chez l'homme. Parmi ceux-ci, l'inhibition de l' α -amylase et de l' α -glucosidase, l'effet antioxydants et de piégeage des radicaux libres et la protection des cellules β pancréatiques ont été identifiés. Les deux extraits présentent également des effets puissants insulino-sensibilisants comparables à ceux de la metformine. Les résultats actuels seront utiles pour évaluer l'intérêt des extraits d'*A. radiata* dans le traitement de la neuropathie diabétique, une complication majeure associée au dysfonctionnement mitochondrial, au stress oxydatif et aux lésions induites par l'inflammation dans les neurones et les cellules gliales. (Sandireddy *et al.* 2014;Singh *et al.* 2013). Pour ce but, des protocoles plus spécifiques permettant la surveillance de la vitesse de conduction nerveuse et de la lésion du nerf périphérique sont indispensables (Yadav *et al.* 2014;Yang *et al.* 2015). Généralement, on pense que le matériel dérivé d'*A. radiata* est particulièrement approprié pour développer un nutraceutique pour le management du diabète de type 2 et de l'obésité ou pour une thérapie additionnelle avec la metformine.

Outre ces études expérimentales, les résultats encourageant de cette thèse amèneront sans doute à effectuer d'autres travaux pour élucider les cibles moléculaires de cette plante au niveau des cellules bêta pancréatique. Il serait aussi important de déterminer l'action de cette plante sur les transporteurs de glucose constitutifs (Glut1) et ceux insulino-dépendants (Glut4) afin de bien comprendre les modalités par lesquelles les extraits d'*Anvillea radiata* potentialisent le transport de glucose chez les cellules de muscle squelettique et les adipocytes.

Un développement futur de ce travail pourrait consister en une étude phytochimique visant l'identification et la purification des principes actifs de cette plante. Ainsi, il est intéressant d'étudier leur biodisponibilité après administration orale, en mettant en œuvre des techniques analytiques dans les fluides biologiques, ainsi que leurs probables modes d'action dans le traitement de la neuropathie diabétique. Il est bien recommandé de mener une étude sur l'action du régime en gras au cours de temps sur la respiration mitochondriale, un vecteur très important dans les mécanismes aboutissant aux dommages du myocarde après ischémie/reperfusion.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

References

Akash M. S., Rehman K., & Chen S. (2013) Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J.Cell Biochem.* 114: 525-531.

Alam M. A., Subhan N., Hossain H., Hossain M., Reza H. M., Rahman M. M., & Ullah M. O. (2016) Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr.Metab (Lond)* 13: 27.

Alencar J., Gosset G., Rahmouni H., Culcasi M., Robin M., Reynier J. P., Piccerelle P., & Pietri S. (2008) Development of spray- and freeze-dried high-concentration sesamol emulsions and antioxidant evaluation in fibroblasts and UV-exposed rat skin slices. *Drug Dev.Res* 69: 266.

Alencar J., Gosset G., Robin M., Pique V., Culcasi M., Clement J. L., Mercier A., & Pietri S. (2009) Improving the stability and antioxidant properties of sesame oil: water-soluble spray-dried emulsions from new transesterified phenolic derivatives. *J.Agric.Food Chem* 57: 7311-7323.

Alimohammadi S., Hobbenaghi R., Javanbakht J., Kheradmand D., Mortezaee R., Tavakoli M., Khadivar F., & Akbari H. (2016) Retraction note: Protective and antidiabetic effects of extract from *Nigella sativa* on blood glucose concentrations against streptozotocin (STZ)-induced diabetic in rats: an experimental study with histopathological evaluation. *Diagn.Pathol.* 11: 125.

Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S., Richmond W., & Fu P. C. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin.Chem.* 20: 470-475.

Allali H., Benmehdi H., Dib M A., Tabti B., & B. N. (2008) Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian journal of chemistry* 20 : 2701-2710.

Alov P., Tsakovska I., & Pajeva I. (2015) Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Curr Top.Med Chem* 15: 85-104.

Ambigaipalan P., de Camargo A. C., & Shahidi F. (2016) Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. *J.Agric.Food Chem* 64: 6584-6604.

Andreotti P. E., Cree I. A., Kurbacher C. M., Hartmann D. M., Linder D., Harel G., Gleiberman I., Caruso P. A., Ricks S. H., Untch M., & . (1995) Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 55: 5276-5282.

Aruoma O. I., Grootveld M., & Halliwell B. (1987) The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with a site-specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule.. *J.Inorg.Biochem.* 29: 289-299.

Asayama K., Hayashibe H., Dobashi K., Niitsu T., Miyao A., & Kato K. (1989) Antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in various tissues of diabetic and starved rats. *Diabetes Res.* 12: 85-91.

Ashrafian H., Frenneaux M. P., & Opie L. H. (2007) Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation* 116: 434-448.

Astrup A. (1999) Macronutrient balances and obesity: the role of diet and physical activity. *Public Health Nutr.* 2: 341-347.

Astrup A. (2001) The role of dietary fat in the prevention and treatment of obesity. Efficacy and safety of low-fat diets. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 25 Suppl 1: S46-S50.

Azzi R., Djakiri R., Lahfa F., Sekkal F. Z., enmehdi H., & elkacem N. (2012) Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research Vol.6(10), pp.2041-2050* 6: 2041-2050.

Bailey C. J. & Day C. (1989) Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 12: 553-564.

Bailey D. M., Lundby C., Berg R. M., Taudorf S., Rahmouni H., Gutowski M., Mulholland C. W., Sullivan J. L., Swenson E. R., McEneny J., Young I. S., Pedersen B.

K., Moller K., Pietri S., & Culcasi M. (2014) On the antioxidant properties of erythropoietin and its association with the oxidative-nitrosative stress response to hypoxia in humans. *Acta Physiol (Oxf)* 212: 175-187.

Balkau B., Mhamdi L., Oppert J. M., Nolan J., Golay A., Porcellati F., Laakso M., & Ferrannini E. (2008) Physical activity and insulin sensitivity: the RISC study. *Diabetes* 57: 2613-2618.

Bammou M., Sellam K., & ElRhaffari L. (2015) Bioactivity of *Anvillea radiata* Coss & Dur. collected from the southeast of Morocco. *Eur.Sci.J.* 11: 233-244.

Baynes J. W. (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412.

Befroy D. E., Petersen K. F., Dufour S., Mason G. F., de Graaf R. A., Rothman D. L., & Shulman G. I. (2007) Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 56: 1376-1381.

Benhammou N., Bekkara F. A., & Panovska T. K. (2009) Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C.R.Chim.* 12: 1259-1266.

Bjorndal B., Burri L., Staalesen V., Skorve J., & Berge R. K. (2011) Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J.Obes.* 2011: 490650.

Bloch-Damti A. & Bashan N. (2005) Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid.Redox.Signal.* 7: 1553-1567.

Bnouham M., Ziyat A., Mekhfi H., Tahri A., & Legssyer A. (2006) Medicinal plants with potential antidiabetic activity. A review of ten years of herbal medicine research (1990.2000). *Int.J.Diabetes Metabol.* 14: 1-25.

Bohlender J. M., Franke S., Stein G., & Wolf G. (2005) Advanced glycation end products and the kidney. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 289: F645-F659.

Bonina F. P., Leotta C., Scalia G., Puglia C., Trombetta D., Tringali G., Roccazzello A. M., Rapisarda P., & Saija A. (2002) Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes Nutr.Metab* 15: 14-19.

Bonnefont-Rousselot D., Bastard J. P., Jaudon M. C., & Delattre J. (2000) Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26: 163-176.

Boudjelal A., Siracusa L., Henchiri C., Sarri M., Abderrahim B., Baali F., & Ruberto G. (2015) Antidiabetic Effects of Aqueous Infusions of Artemisia herba-alba and Ajuga iva in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Planta Med* 81: 696-704.

Boukhris M. A., Destandau E., I Hakmaoui A., El Rhaffari L., & Elfakir C. (2016) A dereplication strategy for the identification of new phenolic compounds from *Anvillea radiata* (Coss. & Durieu). *C.R.Chimie* 19: 1124-1134.

Boullard B. (2001) *Plantes médicinales du monde. Croyances et réalités.*

Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820.

Brownlee M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625.

Campbell I. W. (2000) Antidiabetic drugs present and future: will improving insulin resistance benefit cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus? *Drugs* 60: 1017-1028.

Cassien M., Petrocchi C., Thetiot-Laurent S., Robin M., Ricquebourg E., Kandouli C., Asteian A., Rockenbauer A., Mercier A., Culcasi M., & Pietri S. (2016) On the vasoprotective mechanisms underlying novel beta-phosphorylated nitrones: Focus on free radical characterization, scavenging and NO-donation in a biological model of oxidative stress. *Eur.J.Med Chem* 119: 197-217.

Cefalu W. T., Stephens J. M., & Ribnicky D. M. (2011) *Diabetes and Herbal (Botanical) Medicine.*

Ceriello A., Quagliaro L., D'Amico M., Di F. C., Marfella R., Nappo F., Berrino L., Rossi F., & Giugliano D. (2002) Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51: 1076-1082.

Chang W. (2017) Non-coding RNAs and Berberine: A new mechanism of its anti-diabetic activities. *Eur.J.Pharmacol.* 795: 8-12.

Chatterjee S. & Davies M. J. (2015) Current management of diabetes mellitus and future directions in care. *Postgrad.Med J.* 91: 612-621.

Chattopadhyay R. R. (1999) Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract: part V. *J.Ethnopharmacol.* 67: 373-376.

Chehade J. M. & Mooradian A. D. (2000) A rational approach to drug therapy of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 60: 95-113.

Chiba K., Kawakami K., & Tohyama K. (1998) Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol.In Vitro* 12: 251-258.

Coon M. J., Ding X. X., Pernecky S. J., & Vaz A. D. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 6: 669-673.

Cooper E. J., Hudson A. L., Parker C. A., & Morgan N. G. (2003) Effects of the beta-carbolines, harmaline and pinoline, on insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *Eur.J.Pharmacol.* 482: 189-196.

Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van P. B., Pieters L., Vlietinck A. J., & Vanden Berghe D. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J.Nat.Prod.* 61: 71-76.

Culcasi M., Benameur L., Mercier A., Lucchesi C., Rahmouni H., Asteian A., Casano G., Botta A., Kovacic H., & Pietri S. (2012) EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to cerium oxide nanoparticles: evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation. *Chem Biol.Interact.* 199: 161-176.

Daneshfar A., Ghaziaskar H. S., & Homayoun N. (2008) Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *J.Chem.Eng.Data* 53: 776-778.

Davalos A., Gomez-Cordoves C., & Bartolome B. (2004) Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J.Agric.Food Chem* 52: 48-54.

Day C. (1999) Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet.Med* 16: 179-192.

Day J. C., Tisi L. C., & Bailey M. J. (2004) Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. *Luminescence*. 19: 8-20.

De M. G., Bravi M. C., Laurenti O., Cassone-Faldetta M., Armiento A., Ferri C., & Balsano F. (1998) Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47: 993-997.

DeFronzo R. A., Barzilai N., & Simonson D. C. (1991) Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 73: 1294-1301.

Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J. P., Tognolini M., Borges G., & Crozier A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid.Redox.Signal.* 18: 1818-1892.

Delattre J., Beaudoux J.-L. X., & Bonnefont-Rousselot D. (2005) Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques., 1^{er} ed edn. Paris.

Dendougui H., Jay M., Benayache F., & Benayache S. (2006) Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae). *Biochem.Syst.Ecol.* 34: 718-720.

Destandau E., Boukhris M. A., Zubrzycki S., Akssira M., Rhaffari L. E., & Elfakir C. (2015) Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillea radiata*. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 985: 29-37.

Dey P., Saha M. R., Chowdhuri S. R., Sen A., Sarkar M. P., Haldar B., & Chaudhuri T. K. (2015) Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant Nerium oleander through alloxan induced diabetes in mice. *J.Ethnopharmacol.* 161: 128-137.

Dimitrakoudis D., Vranic M., & Klip A. (1992) Effects of hyperglycemia on glucose transporters of the muscle: use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia. *J.Am.Soc.Nephrol.* 3: 1078-1091.

Dincer Y., Akcay T., Alademir Z., & Ilkova H. (2002) Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutat.Res.* 505: 75-81.

Dohm G. L. (2002) Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. *J.Appl.Physiol (1985.)* 93: 782-787.

Drews G., Krippeit-Drews P., & Dufer M. (2010) Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch.* 460: 703-718.

Du X. L., Edelstein D., Rossetti L., Fantus I. G., Goldberg H., Ziyadeh F., Wu J., & Brownlee M. (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 12222-12226.

Dumas J. F., Simard G., Flamment M., Ducluzeau P. H., & Ritz P. (2009) Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans? *Diabetes Metab* 35: 159-167.

Eddouks M., Ouahidi M. L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., & Lemhadri A. (2007) L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 5: 194-203.

El Hassany B., El Hanbali F., Akssira M., Mellouki F., Haidour A., & Barrero A. F. (2004) Germacranolides from *Anvillea radiata*. *Fitoterapia* 75: 573-576.

Ernst E. (1997) Plants with hypoglycemic activity in humans. *Phytomedicine.* 4: 73-78.

Etxeberria U., de la Garza A. L., Campion J., Martinez J. A., & Milagro F. I. (2012) Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert.Opin.Ther.Targets*. 16: 269-297.

Evans J. L., Goldfine I. D., Maddux B. A., & Grodsky G. M. (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 52: 1-8.

Fabricant D. S. & Farnsworth N. R. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ.Health Perspect*. 109 Suppl 1: 69-75.

Fakchich J. & Elachouri M. (2014) Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J.Ethnopharmacol*. 154: 76-87.

Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D., & Guo Z. (1985) Medicinal plants in therapy. *Bull.World Health Organ* 63: 965-981.

Finkelstein E., Rosen G. M., & Rauckman E. J. (1980) Spin trapping. kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. *J.Am.Chem.Soc*. 102: 4994-4999.

Fiorucci S., Golebiowski J., Cabrol-Bass D., & Antonczak S. (2006) Molecular simulations reveal a new entry site in quercetin 2,3-dioxygenase. A pathway for dioxygen? *Proteins* 64: 845-850.

Flet C. (1984) Les substances naturelles sources de médicaments nouveaux, Le Moniteur edn.

Foti M. C. (2015) Use and Abuse of the DPPH(*) Radical. *J.Agric.Food Chem* 63: 8765-8776.

Frayn K. N., Karpe F., Fielding B. A., Macdonald I. A., & Coppack S. W. (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord*. 27: 875-888.

Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev.Biochem.* 64: 97-112.

Frode T. S. & Medeiros Y. S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J.Ethnopharmacol.* 115: 173-183.

Gallou-Kabani C., Vige A., Gross M. S., Rabes J. P., Boileau C., Larue-Achagiotis C., Tome D., Jais J. P., & Junien C. (2007) C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity.(Silver.Spring)* 15: 1996-2005.

Gella F. J., Gubern G., Vidal R., & Canalias F. (1997) Determination of total and pancreatic alpha-amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl-alpha-D-maltotriose as substrate. *Clin.Chim.Acta* 259: 147-160.

Ghourri M., Zidane L., & Douira A. (2013) Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Sahara marocain (Tan-Tan). *J.Anim.Plant Sci., 17, 2388-2411.* 17: 2388-2411.

Giacco F. & Brownlee M. (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ.Res.* 107: 1058-1070.

Gillery P., Monboisse J. C., Maquart F. X., & Borel J. P. (1988) Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab* 14: 25-30.

Gopaul N. K., Anggard E. E., Mallet A. I., Betteridge D. J., Wolff S. P., & Nourooz-Zadeh J. (1995) Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 368: 225-229.

Griffin M. E., Marcucci M. J., Cline G. W., Bell K., Barucci N., Lee D., Goodyear L. J., Kraegen E. W., White M. F., & Shulman G. I. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274.

Guignard J. L. & Dupont F. (2007) Botanique: Systématique moléculaire , 14th edn.

Gutteridge J. M. & Halliwell B. (1992) Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic.Biol.Med.* 12: 93-95.

Guzik T. J., Mussa S., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R., & Channon K. M. (2002) Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105: 1656-1662.

Halliwell B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724.

Halliwell B., Gutteridge J. M., & Aruoma O. I. (1987) The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal.Biochem.* 165: 215-219.

Hamada D. & Ladjel S. (2015) Chemical composition, in-vitro anti-microbial and antioxidant activities of the methanolic extract of *Anvillea radiata Asteraceae*. *Res.J.Pharm.Biol.Chem.Sci* 6: 1367-1373.

Hammiche V. & Maiza K. (2006) Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J.Ethnopharmacol.* 105: 358-367.

Hamza N., Berke B., Cheze C., Le G. R., Umar A., Agli A. N., Lassalle R., Jove J., Gin H., & Moore N. (2012) Preventive and curative effect of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds in C57BL/6J models of type 2 diabetes induced by high-fat diet. *J.Ethnopharmacol.* 142: 516-522.

Hamza N., Berke B., Cheze C., Marais S., Lorrain S., Abdouelfath A., Lassalle R., Carles D., Gin H., & Moore N. (2015) Effect of *Centaurium erythraea* Rafn, *Artemisia herba-alba* Asso and *Trigonella foenum-graecum* L. on liver fat accumulation in C57BL/6J mice with high-fat diet-induced type 2 diabetes. *J.Ethnopharmacol.* 171: 4-11.

Hattori I., Nakamura H I., Masutai H., Nishinaka Y., Mitsui A., & Yodoi J. (2003) Thioredoxin-dependent redox regulation - implication in aging and neurological diseases.

In: *Critical review of oxidative stress and aging* (eds R. G. Cutler and H. Rodriguez) pp. 87-101.

Hebert J. A. & Lopez A. (1975) Metabolic effects of exercise. II. Residual metabolic effects of exercise in rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med* 148: 646-649.

Henriksen E. J. (2002) Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J.Appl.Physiol* (1985.) 93: 788-796.

Heyman L., Axling U., Blanco N., Sterner O., Holm C., & Berger K. (2014) Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice. *J.Nutr.Metab.* 1-12.

Hotta N., Kakuta H., Sano T., Matsumae H., Yamada H., Kitazawa S., & Sakamoto N. (1993) Long-term effect of acarbose on glycaemic control in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a placebo-controlled double-blind study. *Diabet.Med* 10: 134-138.

Hunt J. V., Dean R. T., & Wolff S. P. (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem.J.* 256: 205-212.

Hunt J. V., Smith C. C., & Wolff S. P. (1990) Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39: 1420-1424.

Jing L., Ma H., Fan P., Gao R., & Jia Z. (2015) Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *BMC.Complement Altern.Med* 15: 287.

Johnston P. S., Feig P. U., Coniff R. F., Krol A., Davidson J. A., & Haffner S. M. (1998) Long-term titrated-dose alpha-glucosidase inhibition in non-insulin-requiring Hispanic NIDDM patients. *Diabetes Care* 21: 409-415.

Jouad H., Haloui M., Rhiouani H., El H. J., & Eddouks M. (2001) Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J.Ethnopharmacol.* 77: 175-182.

Jouad H., Maghrani M., & Eddouks M. (2002) Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J.Ethnopharmacol.* 81: 351-356.

Kaiserova K., Tang X. L., Srivastava S., & Bhatnagar A. (2008) Role of nitric oxide in regulating aldose reductase activation in the ischemic heart. *J.Biol.Chem.* 283: 9101-9112.

Kaliora A. C., Dedoussis G. V., & Schmidt H. (2006) Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187: 1-17.

Kashihara N., Haruna Y., Kondeti V. K., & Kanwar Y. S. (2010) Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Curr Med Chem* 17: 4256-4269.

Keenoy B., Vertommen J., & De L., I (1999) The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in Type 1 diabetic patients. *Diabetes Nutr.Metab* 12: 256-263.

Kennedy A. L. & Lyons T. J. (1997) Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of diabetic complications. *Metabolism* 46: 14-21.

Kim H. P., Son K. H., Chang H. W., & Kang S. S. (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J.Pharmacol.Sci.* 96: 229-245.

Kim Y., Keogh J. B., & Clifton P. M. (2016) Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients.* 8.

Koleva I. I., van Beek T. A., Linssen J. P., de G. A., & Evstatieva L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem.Anal.* 13: 8-17.

Kolm-Litty V., Tippmer S., Haring H. U., & Schleicher E. (1998) Glucosamine induces translocation of protein kinase C isoenzymes in mesangial cells. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 106: 377-383.

Koneri R. B., Samaddar S., & Ramaiah C. T. (2014) Antidiabetic activity of a triterpenoid saponin isolated from *Momordica cymbalaria* Fenzl. *Indian J.Exp.Biol.* 52: 46-52.

Krentz A. J., Ferner R. E., & Bailey C. J. (1994) Comparative tolerability profiles of oral antidiabetic agents. *Drug Saf* 11: 223-241.

Kuehl F. A., Jr. & Egan R. W. (1980) Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* 210: 978-984.

Lacraz G. Relation entre Stress Oxydant et Homeostasie Glucidique au cours du Diabete de Type 2 : Adaptation de la Cellule Pancreatique. 33. 2009. Universite Paris-Diderot - Paris VII.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Lafond M., Vidal N., Letourneux Y., & Brunel J. M. (2010) A comparison of three rapid and accurate bioluminescent antibiotic susceptibility tests. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 61: 16-19.

Lakhdar M., Kaid Harche M., Larbi B., & Sarbani A. (2013) Phytochemical analysis and antifungal activity of *Anvillea radiata*. *World Appl.Sci.J.* 26: 165-171.

Larsson R., Fridborg H., Kristensen J., Sundstrom C., & Nygren P. (1993) In vitro testing of chemotherapeutic drug combinations in acute myelocytic leukaemia using the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Br.J.Cancer* 67: 969-974.

Lee I. C., Kim D. Y., & Choi B. Y. (2014) Antioxidative Activity of Blueberry Leaf Extract Prevents High-fat Diet-induced Obesity in C57BL/6 Mice. *J.Cancer Prev.* 19: 209-215.

Liu Y. & Guo M. (2015) Studies on transition metal-quercetin complexes using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Molecules.* 20: 8583-8594.

Lopez G. V., Batthyany C., Blanco F., Botti H., Trostchansky A., Migliaro E., Radi R., Gonzalez M., Cerecetto H., & Rubbo H. (2005) Design, synthesis, and biological

characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorg.Med Chem* 13: 5787-5796.

Lovborg H., Burman R., & Gullbo J. (2009) Structure-activity relationship analysis of cytotoxic cyanoguanidines: selection of CHS 828 as candidate drug. *BMC.Res Notes* 2: 114.

Maiese K., Morhan S. D., & Chong Z. Z. (2007) Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr.Neurovasc.Res.* 4: 63-71.

Marles R. J. & Farnsworth N. R. (1995) Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine.* 2: 137-189.

Marques S. M. & Esteves da Silva J. C. (2009) Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB.Life* 61: 6-17.

Maxwell S. R., Thomason H., Sandler D., LeGuen C., Baxter M. A., Thorpe G. H., Jones A. F., & Barnett A. H. (1997) Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann.Clin.Biochem.* 34 (Pt 6): 638-644.

Meigs J. B. (2010) Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention: the Kelly West award lecture 2009. *Diabetes Care* 33: 1865-1871.

Merglen A., Theander S., Rubi B., Chaffard G., Wollheim C. B., & Maechler P. (2004) Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145: 667-678.

Minaiyan M., Zolfaghari B., & Kamal A. (2011) Effect of Hydroalcoholic and Buthanolic Extract of Cucumis sativus Seeds on Blood Glucose Level of Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Iran J.Basic Med Sci.* 14: 436-442.

Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., & Buhler D. R. (2000) Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro. *J.Agric.Food Chem* 48: 3876-3884.

Mnafgui K., Kchaou M., Ben S. H., Hajji R., Khabbabi G., Elfeki A., Allouche N., & Gharsallah N. (2016) Essential oil of *Zygophyllum album* inhibits key-digestive enzymes related to diabetes and hypertension and attenuates symptoms of diarrhea in alloxan-induced diabetic rats. *Pharm.Biol.* 54: 1326-1333.

Mohora M., Greabu M., Muscurel C., DuNa C., & Totan A. (2007) The sources and the targetsof oxidative stress in the etiology of diabetic complications. *Romanian J.Biophys* 17: 63-84.

Moumou M., El B. A., Allouchi H., El H. A., Benharref A., Mathieu V., Guillaumet G., & Akssira M. (2014) Synthesis and biological evaluation of 9alpha- and 9beta-hydroxyamino-parthenolides as novel anticancer agents. *Bioorg.Med Chem Lett.* 24: 4014-4018.

Mowla A., Alauddin M., Rahman M. A., & Ahmed K. (2009) Antihyperglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed extract in alloxan-induced diabetic rats and its use in diabetes mellitus: a brief qualitative phytochemical and acute toxicity test on the extract. *Afr.J.Tradit.Complement Altern.Med* 6: 255-261.

Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Sakata K., & Kato H. (2006) Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature, Letters* 440: 372-376.

Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M. A., Beebe D., Oates P. J., Hammes H. P., Giardino I., & Brownlee M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790.

Nisoli E., Clementi E., Carruba M. O., & Moncada S. (2007) Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circ.Res.* 100: 795-806.

Nourooz-Zadeh J., Rahimi A., Tajaddini-Sarmadi J., Tritschler H., Rosen P., Halliwell B., & Betteridge D. J. (1997) Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 40: 647-653.

Nugroho A. E., Rais I. R., Setiawan I., Pratiwi P. Y., Hadibarata T., Tegar M., & Pramono S. (2014) Pancreatic effect of andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. *Pak.J.Biol.Sci.* 17: 22-31.

Oki T., Matsui T., & Osajima Y. (1999) Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J.Agric.Food Chem* 47: 550-553.

Olaokun O. O., McGaw L. J., Eloff J. N., & Naidoo V. (2013) Evaluation of the inhibition of carbohydrate hydrolysing enzymes, antioxidant activity and polyphenolic content of extracts of ten African *Ficus* species (Moraceae) used traditionally to treat diabetes. *BMC.Complement Altern.Med* 13: 94.

Ong K. C. & Khoo H. E. (2000) Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* 67: 1695-1705.

Opara E. C., Abdel-Rahman E., Soliman S., Kamel W. A., Souka S., Lowe J. E., & Abdel-Aleem S. (1999) Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism* 48: 1414-1417.

Ordonez A. A. L., Gomez J. D., Vattuone M. A., & Isla M. I. (2006) Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem* 97: 452-458.

Ostovan F., Gol A., & Javadi A. (2017) Investigating the effects of *Citrullus colocynthis* pulp on oxidative stress in testes and epididymis in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Int.J.Reprod.Biomed.(Yazd.)* 15: 41-48.

Oubre A. Y., Carlson T. J., King S. R., & Reaven G. M. (1997) From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia* 40: 614-617.

Perez-Martin A., Raynaud E., & Mercier J. (2001) Insulin resistance and associated metabolic abnormalities in muscle: effects of exercise. *Obes.Rev.* 2: 47-59.

Peungvicha P., Thirawarapan S. S., & Watanabe H. (1998) Possible mechanism of hypoglycemic effect of 4-hydroxybenzoic acid, a constituent of *Pandanus odoratus* root. *Jpn.J.Pharmacol.* 78: 395-398.

Pinent M., Blay M., Blade M. C., Salvado M. J., Arola L., & Ardevol A. (2004) Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 145: 4985-4990.

Poitout V. & Robertson R. P. (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr.Rev.* 29: 351-366.

Puppo A. (1992) Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry* 31: 85-88.

Putnam C. D., Arvai A. S., Bourne Y., & Tainer J. A. (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J.Mol.Biol.* 296: 295-309.

Putnam K. P., Bombick D. W., & Doolittle D. J. (2002) Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol.In Vitro* 16: 599-607.

Quanhong L., Caili F., Yukui R., Guanghui H., & Tongyi C. (2005) Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. *Plant Foods Hum.Nutr.* 60: 13-16.

QUEZEL P. & SANTAS (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

RA C. & Polansky M. M. (2002) Tea enhances insulin activity. *J.Agric.Food Chem* 50: 7182-7186.

Rahman I. & MacNee W. (2000) Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur.Respir.J.* 16: 534-554.

Rasilainen S., Nieminen J. M., Levonen A. L., Otonkoski T., & Lapatto R. (2002) Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. *Biochem.Pharmacol.* 63: 1297-1304.

Rates S. M. (2001) Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.

Ravi K., Rajasekaran S., & Subramanian S. (2005) Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food Chem.Toxicol.* 43: 1433-1439.

Razafimanjato H., Benzaria A., Taieb N., Guo X. J., Vidal N., Di S. C., Varini K., & Maresca M. (2011) The ribotoxin deoxynivalenol affects the viability and functions of glial cells. *Glia* 59: 1672-1683.

Rios J. L., Francini F., & Schinella G. R. (2015) Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med* 81: 975-994.

Rizvi S. I. & Zaid M. A. (2001) Insulin-like effect of (-)epicatechin on erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 28: 776-778.

Robinson M. M. & Zhang Z. 2011. World Health Organization, Geneva.

Ref Type: Report

Roda A., Guardigli M., Pasini P., & Mirasoli M. (2003) Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening. *Anal.Bioanal.Chem* 377: 826-833.

Sabu M. C., Smitha K., & Kuttan R. (2002) Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J.Ethnopharmacol.* 83: 109-116.

Sakuraba H., Mizukami H., Yagihashi N., Wada R., Hanyu C., & Yagihashi S. (2002) Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45: 85-96.

Sakurai T. & Tsuchiya S. (1988) Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett.* 236: 406-410.

Sales P. M., Souza P. M., Simeoni L. A., & Silveira D. (2012) alpha-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J.Pharm.Pharm.Sci* 15: 141-183.

Saltiel A. R. & Kahn C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.

Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., & Saura-Calixto F. A. (1998) Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J.Sci.Food Agric.* 76: 270-276.

Sandireddy R., Yerra V. G., Areti A., Komirishetty P., & Kumar A. (2014) Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *Int.J.Endocrinol.* 1-10.

Schulze M. B. & Hu F. B. (2005) Primary prevention of diabetes: what can be done and how much can be prevented? *Annu.Rev.Public Health* 26: 445-467.

Shahidi F. & Chandrasekara A. (2010) Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem.Rev.* 9: 147-170.

Sharma B., Balomajumder C., & Roy P. (2008) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem.Toxicol.* 46: 2376-2383.

Shepard T. Y., Weil K. M., Sharp T. A., Grunwald G. K., Bell M. L., Hill J. O., & Eckel R. H. (2001) Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. *Am.J.Clin.Nutr.* 73: 703-708.

Shin C. S., Moon B. S., Park K. S., Kim S. Y., Park S. J., Chung M. H., & Lee H. K. (2001) Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care* 24: 733-737.

Sidhu M. C. & Sharma T. (2013) A database of antidiabetic plant species of family Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae and Moraceae. *Int.J.Herb.Med.* 2: 187-199.

Silva E. L., Lobo J. F., Vinther J. M., Borges R. M., & Staerk D. (2016) High-Resolution alpha-Glucosidase Inhibition Profiling Combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for Identification of Antidiabetic Compounds in *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae). *Molecules.* 21.

Singh R., Kaur N., Kishore L., & Gupta G. K. (2013) Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. *J.Ethnopharmacol.* 150: 51-70.

Singleton V. L., Orthofer R., & amuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 178.

Soulere L., Viode C., Perie J., & Hoffmann P. (2002) Selective inhibition of Fe-versus Cu/Zn-superoxide dismutases by 2,3-dihydroxybenzoic acid derivatives. *Chem Pharm.Bull.(Tokyo)* 50: 578-582.

Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C., & Witztum J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N.Engl.J.Med* 320: 915-924.

Steyn N. P., Mann J., Bennett P. H., Temple N., Zimmet P., Tuomilehto J., Lindstrom J., & Louheranta A. (2004) Diet, nutrition and the prevention of type 2 diabetes. *Public Health Nutr.* 7: 147-165.

Stocker P., Ricquebourg E., Vidal N., Villard C., Lafitte D., Sellami L., & Pietri S. (2015) Fluorimetric screening assay for protein carbonyl evaluation in biological samples. *Anal.Biochem.* 482: 55-61.

Stoica B. A., Bordeianu G., Stanescu R., Serban D. N., & Nechifor M. (2011) A new method for the quantification of superoxide dismutase mimics with an allopurinol-xanthine oxidase-lucigenin enhanced system. *J.Biol.Inorg.Chem.* 16: 753-761.

Szaleczky E., Prechl J., Feher J., & Somogyi A. (1999) Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus--a rational approach. *Postgrad.Med.J.* 75: 13-17.

Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., & Matsuoka T. (2006) Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J.Nutr.Sci Vitaminol.(Tokyo)* 52: 149-153.

TAHINA A. Transition épidémiologique et système de santé . Contrat n° ICA3-CT-2002-10011. 2007. République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.

Ref Type: Report

Taleb-Senouci D., Ghomari H., Krouf D., Bouderbala S., Prost J., Lacaille-Dubois M. A., & Bouchenak M. (2009) Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 16: 623-631.

Tan M. J., Ye J. M., Turner N., Hohnen-Behrens C., Ke C. Q., Tang C. P., Chen T., Weiss H. C., Gesing E. R., Rowland A., James D. E., & Ye Y. (2008) Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol*. 15: 263-273.

Tang W. H., Martin K. A., & Hwa J. (2012) Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol*. 3: 87.

Tesfamariam B. (1994) Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic.Biol.Med*. 16: 383-391.

Tiong S. H., Looi C. Y., Hazni H., Arya A., Paydar M., Wong W. F., Cheah S. C., Mustafa M. R., & Awang K. (2013) Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Molecules*. 18: 9770-9784.

Tirosh A., Potashnik R., Bashan N., & Rudich A. (1999) Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J.Biol.Chem* 274: 10595-10602.

Turk H. M., Sevinc A., Camci C., Cigli A., Buyukberber S., Savli H., & Bayraktar N. (2002) Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 39: 117-122.

Ulukaya E., Ozdikicioglu F., Oral A. Y., & Demirci M. (2008) The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol.In Vitro* 22: 232-239.

Velayutham R., Sankaradoss N., & Ahamed K. F. (2012) Protective effect of tannins from *Ficus racemosa* in hypercholesterolemia and diabetes induced vascular tissue damage in rats. *Asian Pac.J.Trop.Med* 5: 367-373.

Vessal M., Hemmati M., & Vasei M. (2003) Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* 135C: 357-364.

Vignais P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol.Life Sci.* 59: 1428-1459.

Vinayagam R. & Xu B. (2015) Antidiabetic properties of dietary flavonoids a cellular mechanism review. *Nutr.Metab (Lond)* 12: 60.

Viollet B., Guigas B., Sanz G. N., Leclerc J., Foretz M., & Andreelli F. (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin.Sci (Lond)* 122: 253-270.

Waldhausl W. (1996) Role of sulfonylureas in non-insulin-dependent diabetes mellitus: Part I--"The pros". *Horm.Metab Res.* 28: 517-521.

Wang H. X. & Ng T. B. (1999) Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sci.* 65: 2663-2677.

Ways D. K. & Sheetz M. J. (2000) The role of protein kinase C in the development of the complications of diabetes. *Vitam.Horm.* 60: 149-193.

Weyermann J., Lochmann D., & Zimmer A. (2005) A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int.J.Pharm.* 288: 369-376.

Whiting P. H., Kalansooriya A., Holbrook I., Haddad F., & Jennings P. E. (2008) The relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Br.J.Biomed.Sci* 65: 71-74.

Wierusz-Wysocka B., Wysocki H., Byks H., Zozulinska D., Wykretowicz A., & Kazmierczak M. (1995) Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 27: 193-197.

Wolff S. P. (1993) Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br.Med Bull.* 49: 642-652.

Wu J. Z. & Ho P. C. (2006) Evaluation of the in vitro activity and in vivo bioavailability of realgar nanoparticles prepared by cryo-grinding. *Eur.J.Pharm.Sci* 29: 35-44.

Yadav S. K., Nagori B. P., & Desai P. K. (2014) Pharmacological characterization of different fractions of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in streptozotocin induced experimental model of diabetic neuropathy. *J.Ethnopharmacol.* 152: 349-357.

Yamanaka S., Hashimoto M., Tobe M., Kobayashi K., Sekizawa J., & Nishimura M. (1990) A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. *Arch.Toxicol.* 64: 262-268.

Yang J. P., He H., & Lu Y. H. (2014) Four flavonoid compounds from *Phyllostachys edulis* leaf extract retard the digestion of starch and its working mechanisms. *J.Agric.Food Chem* 62: 7760-7770.

Yang X., Yao W., Li Q., Liu H., Shi H., Gao Y., & Xu L. (2015) Mechanism of Tang Luo Ning effect on attenuating of oxidative stress in sciatic nerve of STZ-induced diabetic rats. *J.Ethnopharmacol.* 174: 1-10.

Yokota T., Kinugawa S., Hirabayashi K., Matsushima S., Inoue N., Ohta Y., Hamaguchi S., Sobirin M. A., Ono T., Suga T., Kuroda S., Tanaka S., Terasaki F., Okita K., & Tsutsui H. (2009) Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 297: H1069-H1077.

Yokoyama Y., Beckman J. S., Beckman T. K., Wheat J. K., Cash T. G., Freeman B. A., & Parks D. A. (1990) Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am.J.Physiol* 258: G564-G570.

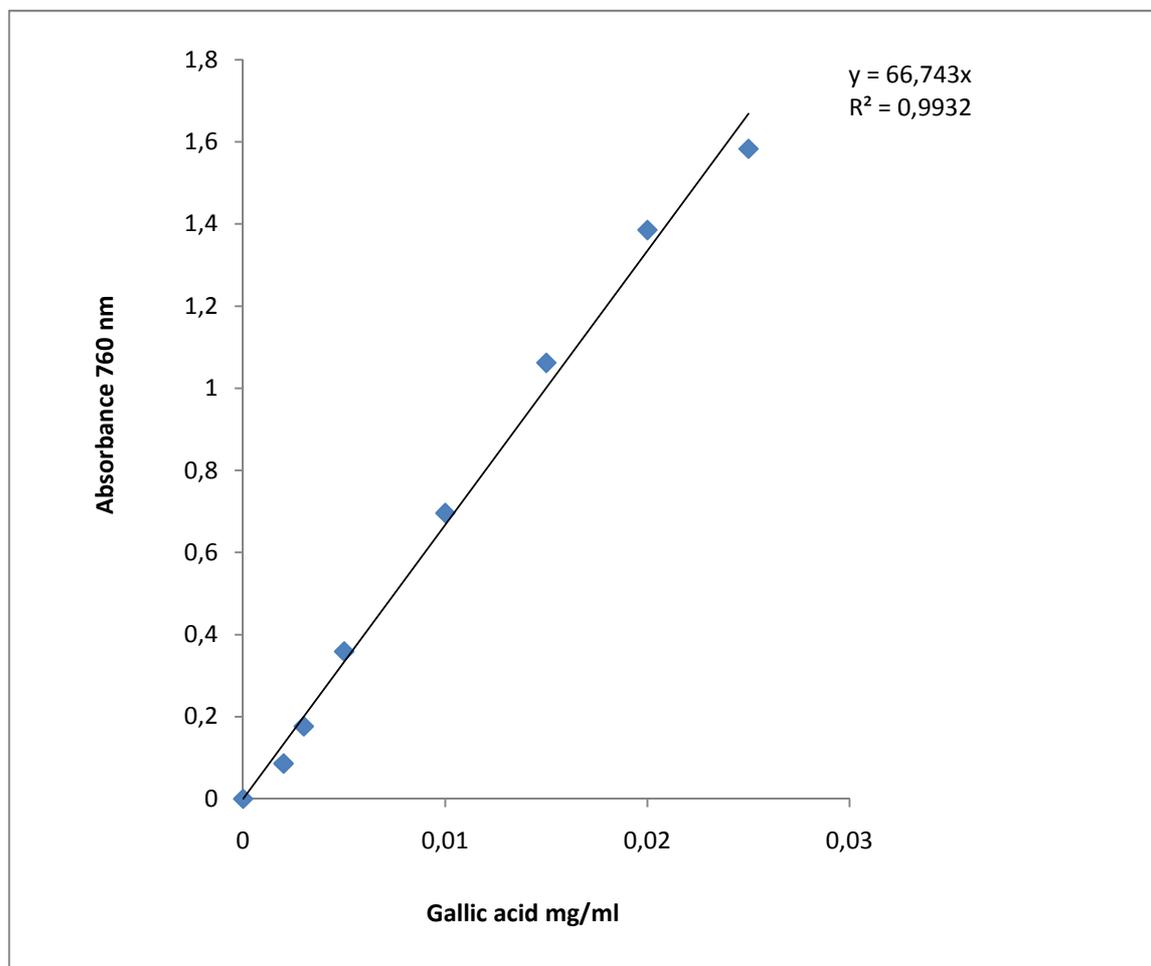
Yoshida K., Hirokawa J., Tagami S., Kawakami Y., Urata Y., & Kondo T. (1995) Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 38: 201-210.

Zamaraeva M. V., Sabirov R. Z., Maeno E., Ando-Akatsuka Y., Bessonova S. V., & Okada Y. (2005) Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death.Differ.* 12: 1390-1397.

Zhao H., Fan W., Dong J., Lu J., Chen J., Shan L., Lin Y., & Kong W. (2008) Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.* 107: 296-304.

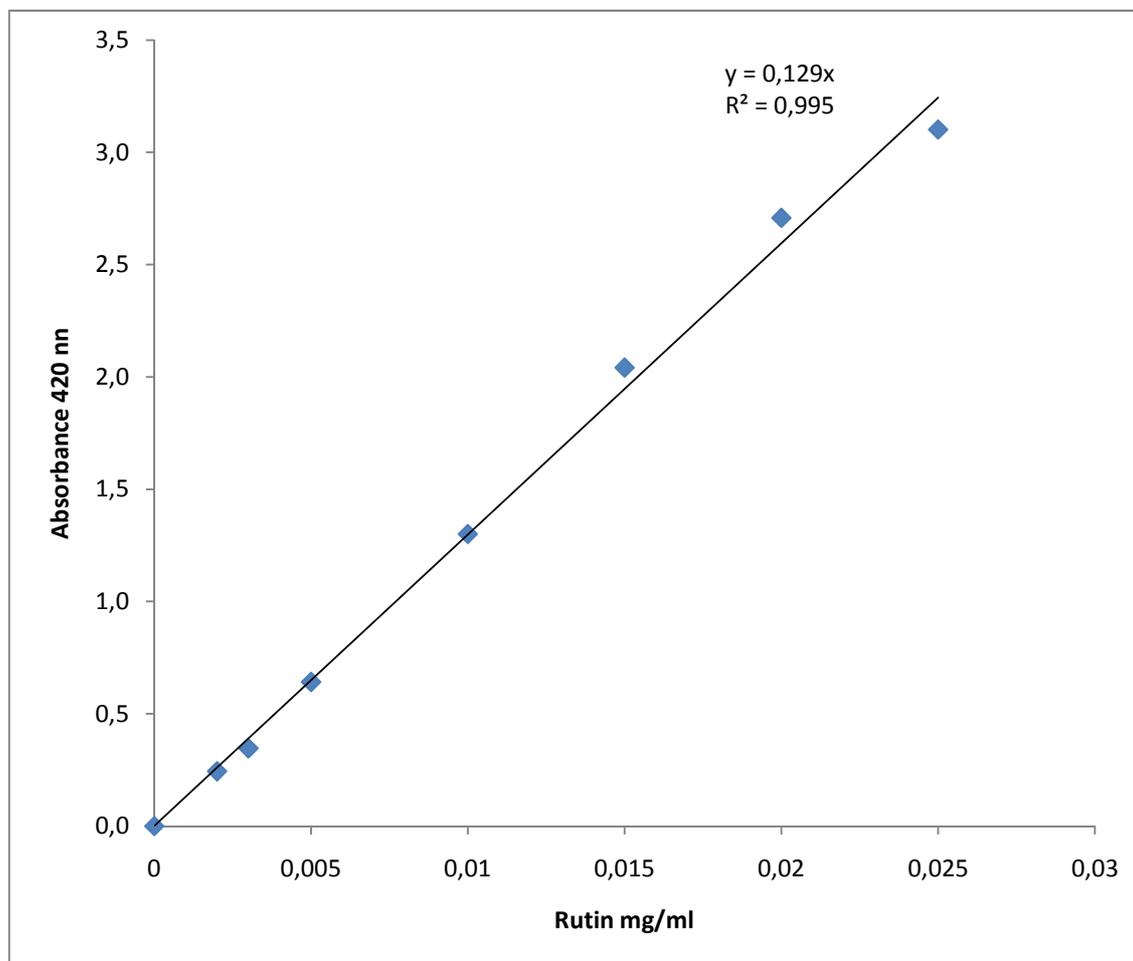
Zhao H. L., Sui Y., Qiao C. F., Yip K. Y., Leung R. K., Tsui S. K., Lee H. M., Wong H. K., Zhu X., Siu J. J., He L., Guan J., Liu L. Z., Xu H. X., Tong P. C., & Chan J. C. (2012) Sustained antidiabetic effects of a berberine-containing Chinese herbal medicine through regulation of hepatic gene expression. *Diabetes* 61: 933-943.

ANNEXES

Annexe 1.**Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

Annexe 2.

Courbe d'étalonnage de Rutine



Annexe 3.

Productions Scientifiques

1. Publications

Article 1. C. Kandouli, M. Cassien, A. Mercier, C. Delehedde, E. Ricquebourg, P. Stocker, M. Mekaouche, Z. Leulmi, A. Mechakra, S. Thétiot-Laurent, M. Culcasi, S. Pietri. **Antidiabetic, antioxidant and anti inflammatory properties of water and n-butanol soluble extracts from Saharian Anvillea radiata in high-fat-diet fed mice.** Journal of Ethnopharmacology 207 (2017) 251–267.

Article 2. M. Cassien, C. Petrocchi, S. Thetiot-Laurent, M. Robin, E. Ricquebourg, C. Kandouli, A. Asteian, A. Rockenbauer, A. Mercier, M. Culcasi, S. Pietri. **On the vasoprotective mechanisms underlying novel β -phosphorylated nitrones: Focus on free radical characterization, scavenging and NO-donation in a biological model of oxidative stress.** Eur. J. Med. Chem. 2016, 25, 197–217.

2. Communications

1. C. Kandouli, M. Cassien, E. Ricquebourg, A. Mercier, P. Stocker, Z. Leulmi , A. Mechakra , M. Culcasi, S. Pietri. **New antioxidant and antidiabetic natural sources: investigation of the properties of the aerial parts of *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (*Asteraceae*).** BCP 11th Edition (Biologie, Chimie, Physique). 2015.

2. C. Kandouli, E. Ricquebourg, M. Cassien, A. Mercier, P. Stocker, Z. Leulmi, A. Mechakra , M. Culcasi . S. Pietri. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant, antidiabetic and cardioprotective activities of the aerial parts of *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (*Asteraceae*).**15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants, 2015.

RESUMES

Résumé

Pertinence ethnopharmacologique: Selon la médecine traditionnelle saharienne, *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) a été évalué pour le traitement d'une variété de maladies telles que les maladies gastro-intestinales, hépatiques et pulmonaires, et a pris conscience de son effet bénéfique sur l'hyperglycémie postprandiale. Cependant, à notre connaissance, aucune étude détaillée des effets curatifs antidiabétiques de cette plante n'a encore été réalisée.

Objectif de l'étude: Pour déterminer l'effet hypoglycémique et antidiabétique de la supplémentation alimentaire en extraits d'*Anvillea radiata* sur l'obésité et l'insulinorésistance induites par HFD chez des souris C57BL/6J en relation avec les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, la protection des cellules β pancréatiques et des muscles squelettiques, et les activités inhibitrices des enzymes digestives.

Matériel et méthodes: Six extraits (hydrosolubles et organiques) des parties aériennes de la plante ont été analysés phytochimiquement (TPC et TFC) et criblés *in vitro* pour le piégeage du superoxyde (par chimiluminescence) et du radical hydroxyle (piégeage par résonance paramagnétique électronique), antioxydant (tests DPPH, TRAP et ORAC), xanthine oxydase, chélatant les métaux, inhibiteur de α -amylase et α -glucosidase, et effets protecteurs de l'oxydation des lipoprotéines induite par le cuivre. On a ensuite évalué la toxicité de certains extraits hydroalcooliques et aqueux sur des *fibroblastes humains pulmonaires normaux* (NHLF) et des cellules cancéreuses A549 en utilisant des dosages FMCA et MTT. Deux extraits hydrosolubles ayant les meilleures propriétés globales ont été évalués pour leur (i) effet protecteur à 1-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur l'activité métabolique de cellules INS-1 dérivées d'insulinome de rat exposées à un milieu hyperglycémique, et (ii) effet hypoglycémique aigu chez des souris diabétiques induit par HFD de 16 semaines. Ensuite, des souris diabétiques ont reçu de HFD complétée par des extraits (jusqu'à 150 mg/ kg/ jour) pendant 12 semaines supplémentaires en utilisant un régime standard comme témoin et le médicament antidiabétique, la metformine (150 mg / kg) comme contrôle positif. Ensuite, l'activité antidiabétique, anti-inflammatoire et antioxydante des extraits a été déterminée.

Résultats: Parmi les extraits hydroalcooliques et d'acétate d'éthyle enrichis en polyphénols, l'extrait aqueux lyophilisés (AQL) et butanol ne sont pas toxiques pour les

cellules en culture (400 µg/mL) ou lorsqu'ils sont administré par voie orale chez des souris normales (≤ 2000 mg/kg), ont exercé une action hypoglycémiant dose-dépendante chez les souris diabétiques, qui est maximale à la dose de 150 mg / kg. Après l'administration de cette dose pendant 12 semaines, les deux extraits ont significativement amélioré la capacité de contrôle du poids corporel, amélioré les taux plasmatiques de glucose et d'insuline, réduit le stress oxydatif dans le sang, dans le myocarde et dans les muscles squelettiques et l'amélioration du statut hyperlipidémique et inflammatoire. De plus, les complications liées au diabète ont été améliorées de manière optimale par une thérapie orale basée sur des doses divisées en deux (75 mg/kg) d'un mélange d'AQL et de metformine.

Conclusions: L'enquête actuelle soutient l'utilisation médicinale traditionnelle d'*Anvillea radiata* et suggère que les deux bio-extraits facilement accessibles et à faible coût ont la capacité de développer un agent antihyperglycémique, antihyperlipidémique et protecteur contre la dysfonction des cellules bêta et musculaire à des doses compatibles avec les pratiques courantes de peuples autochtones pour la gestion des troubles métaboliques.

Mots clés : *Anvillea radiata*, plantes médicinales, phénoliques totaux, cellules bêta-pancréatiques, souris C57 / BL6J, diabète de type 2

Abstract

Ethnopharmacological relevance: According to Saharian traditional medicine, *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) has been valued for treating a variety of ailments such as gastro-intestinal, liver and pulmonary diseases, and has gained awareness for its beneficial effect on postprandial hyperglycemia. However, to best of our knowledge, no detailed study of the antidiabetic curative effects of this plant has been conducted yet.

Aim of the study: To determine the hypoglycemic and antidiabetic effect of dietary supplementation with *Anvillea radiata* extracts on high-fat-diet (HFD)-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6 J mice in relation with antioxidant, anti-inflammatory, pancreatic beta-cells and skeletal muscle protection, and digestive enzyme inhibiting properties.

Materials and methods: Six extracts (water soluble and organic) from aerial parts of the plant were analyzed phytochemically (total phenolic and flavonoid content) and screened for in vitro superoxide (by chemiluminescence) and hydroxyl radical (by electron paramagnetic resonance spin-trapping) scavenging, antioxidant (DPPH, TRAP and ORAC assays), xanthine oxidase, metal chelating, α -amylase and α -glucosidase inhibitory property, and protective effects on copper-induced lipoprotein oxidation. Then selected hydroalcoholic and aqueous extracts were assessed for toxicity in normal human lung fibroblasts and A549 cancer cells using FMCA and MTT assays. Two water-soluble extracts having the best overall properties were assessed for their (i) protective effect at 1–15 $\mu\text{g/mL}$ on metabolic activity of rat insulinoma-derived INS-1 cells exposed to hyperglycemic medium, and (ii) acute hypoglycemic effect on 16-weeks HFD-induced diabetic mice. Then diabetic mice were administered HFD supplemented by extracts (up to 150 mg/kg/day) for 12 additional weeks using standard diet as control and the antidiabetic drug, metformin (150 mg/kg), as positive control. Then the antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant activity of extracts were determined.

Results: Of the highly efficient polyphenolics-enriched hydroalcoholic and ethyl acetate extracts, the lyophilized aqueous (AQL) and butanol extracts were not toxic in cells ($\leq 400 \mu\text{g/mL}$) or when given orally in normal mice ($\leq 2000 \text{ mg/kg}$), exerted a dose-dependent hypoglycemic action in diabetic mice, which was maximal at the dose of 150 mg/kg. Upon administering this dose for 12 weeks, both extracts significantly ameliorated

body weight control capacity, recovery of plasma glucose and insulin level, reduced oxidative stress in blood, myocardial and skeletal muscles, and improved hyperlipidemic and inflammatory status. Moreover, diabetes-related complications were optimally ameliorated by oral therapy based on halved doses (75 mg/kg) of a mixture of AQL and metformin.

Keywords: *Anvillea radiata*, Medicinal plants, Total phenolics, Pancreatic beta-cells, C57/BL6J mice, Type 2 diabetes

الملخص

المقدمة: تستعمل *Anvillea radiata* Coss. & Dur. وفقا للطب التقليدي لعلاج مجموعة متنوعة من الأمراض مثل الأمراض المعدية المعوية، الكبد والرئة، كما تعرف بتأثيرها المفيد على ارتفاع سكر الدم بعد الأكل. ومع ذلك، وعلى حد علمنا، لم يتم إجراء دراسة مفصلة للآثار العلاجية المضادة للسكري من طرف هذه النبتة حتى الآن.

الهدف من هذه الدراسة: دراسة التأثير الخفض لسكر الدم والمضاد للسكري لمستخلصات *Anvillea radiata* Coss. & Dur على مقاومة الأنسولين والسمنة المحرصة بحمية عالية من الدهون (HDF) في فئران C57B / 6J، وارتباطها بالخصائص المضادة للتأكسد، المضادة للالتهاب، حماية الخلايا β البنكرياسية و العضلات المخططة، و تثبيط أنزيمات الجهاز الهضمي.

المواد والأساليب: قمنا بتحليل ستة مقتطفات (مائية وعضوية) للأجزاء الهوائية للنبتة من الناحية الكيميائية النباتية (تقدير محتوى الفينولات TFC والفلافونويدات TFC) وتقدير *in vitro*: كسح أيون فوق الأوكسيد (عن طريق التوهج الكيميائي) و جدر الهيدروكسيل (بواسطة RPE spin-trapping)، وكذا اختبار: الخصائص المضادة للأوكسدة (ORAC، TRAP و DPPH) و xanthine oxidase، استخلاص المعادن (metal chelating)، و تثبيط كل من إنزيم α -amylase وإنزيم α -glucosidase، ودراسة التأثيرات الوقائية لأوكسدة الليبوبروتينات المحرصة بالنحاس. ثم قمنا بتقييم سمية المستخلصات المائية والكحولية على خلايا NHLF و A549 باستخدام اختبار MTT و FMCA. تم اختيار اثنين من المستخلصات القابلة الذوبان في الماء والتي تمتلك أفضل الخصائص البيولوجية لدراسة (1) تأثيرها الوقائي لجرعة مقدرة من 1-15 ميكروغرام/مل على النشاط الميتابوليزمي لخلايا INS-1 المستمدة من سرطان البنكرياس للجرذ والمعرضة لوسط مفرط للسكر، (2) تأثيرها الخفض لسكر الدم الحاد على داء السكري المحرض في الفئران بسب حمية عالية من الدهون لمدة 16 أسبوع. ثم تم إعطاء الفئران المصابة بالسكري بسبب HDF، جرعات من هذين المستخلصين (تصل إلى 150 ملغ/كغ/يوم) لمدة 12 أسبوعا إضافيا، اين تم استخدام النظام الغذائي العادي في المجموعة الشاهدة وكذا استخدام دواء metformin (150 ملغ / كغ)، للمجموعة الشاهدة الإيجابية. ثم تم تحديد النشاط المضاد للسكري، المضاد للالتهاب والمضاد للأوكسدة لهذين المستخلصين.

النتائج: من بين المستخلصات الغنية بالفينولات المتعددة وذات الكفاءة العالية، مستخلص EtOAc، لم تكن المستخلصات AQL و *n*-BuOH سامة على الخلايا (≥ 400 ميكروغرام / مل) أو عندما تعطى عبر الفم في الفئران العادية (≥ 2000 ملغ / كغ)، كما عملت المستخلصات AQL و *n*-BuOH على خفض سكر الدم في الفئران المصابة بالسكري، حيث كان أقصى قدر للجرعة 150 ملغ/كغ. تم إعطاء هذه الجرعة لمدة 12 أسبوعا، في كلتا المستخلصين وعلى حد سواء تحسنت بشكل ملحوظ قدرة الجسم على السيطرة على الوزن، واستعادة مستوى جلوكوز البلازما و الأنسولين، وانخفاض الإجهاد التأكسدي في الدم، عضلة القلب وفي العضلات المخططة، وتحسين مستوى الدهون المفرط في الدم وكذا تحسين حالة الالتهابات. وعلاوة على ذلك، تم تحسين المضاعفات المرتبطة بالسكري على النحو الأمثل بواسطة العلاج عن طريق الفم بإعطاء خليط من AQL و metformin بجرعات مقدرة بـ (75 ملغ/كغ).

الاستنتاج: البحث الحالي يدعم الاستخدام الطبي التقليدي لـ *Anvillea radiata*، ويشير إلى أن المستخلصات البيولوجية سهلة الاستخلاص ومنخفضة التكلفة لديها القدرة على خفض ارتفاع سكر وشحوم الدم، وكذا وقاية ضد الخلايا β والعضلات من الاختلال الوظيفي عند جرعات متوافقة مع الممارسات الشائعة للسكان الأصليين لإدارة هذه الاضطرابات الميتابوليزمية.

الكلمات المفتاحية:

Anvillea radiata ، النباتات الطبية ، محتوى الفينولات ، السكري نوع 2 ، الخلايا β البنكرياسية ، فئران C57B /6J



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Antidiabetic, antioxidant and anti-inflammatory properties of water and *n*-butanol soluble extracts from Saharian *Anvillea radiata* in high-fat-diet fed mice



Chouaib Kandouli^{a,b}, Mathieu Cassien^a, Anne Mercier^a, Caroline Delehedde^a,
Emilie Ricquebourg^a, Pierre Stocker^a, Mourad Mekaouche^c, Zineb Leulmi^b, Aicha Mechakra^b,
Sophie Théliot-Laurent^a, Marcel Culcasi^a, Sylvia Pietri^{a,*}

^a Aix Marseille Univ, CNRS, ICR, SMBSO, Marseille, France

^b Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri, BP 325, Route Ain El Bey, 25017 Constantine, Algeria

^c Aix Marseille Univ, CNRS, CRN2M, Hôpital Nord, Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Anvillea radiata
Medicinal plants
Total phenolics
Pancreatic beta-cells
C57/BL6J mice
Type 2 diabetes

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: According to Saharian traditional medicine, *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) has been valued for treating a variety of ailments such as gastro-intestinal, liver and pulmonary diseases, and has gained awareness for its beneficial effect on postprandial hyperglycemia. However, to best of our knowledge, no detailed study of the antidiabetic curative effects of this plant has been conducted yet.

Aim of the study: To determine the hypoglycemic and antidiabetic effect of dietary supplementation with *Anvillea radiata* extracts on high-fat-diet (HFD)-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice in relation with antioxidant, anti-inflammatory, pancreatic beta-cells and skeletal muscle protection, and digestive enzyme inhibiting properties.

Materials and methods: Six extracts (water soluble and organic) from aerial parts of the plant were analyzed phytochemically (total phenolic and flavonoid content) and screened for *in vitro* superoxide (by chemiluminescence) and hydroxyl radical (by electron paramagnetic resonance spin-trapping) scavenging, antioxidant (DPPH, TRAP and ORAC assays), xanthine oxidase, metal chelating, α -amylase and α -glucosidase inhibitory property, and protective effects on copper-induced lipoprotein oxidation. Then selected hydroalcoholic and aqueous extracts were assessed for toxicity in normal human lung fibroblasts and A549 cancer cells using FMCA and MTT assays. Two water-soluble extracts having the best overall properties were assessed for their (i) protective effect at 1–15 μ g/mL on metabolic activity of rat insulinoma-derived INS-1 cells exposed to hyperglycemic medium, and (ii) acute hypoglycemic effect on 16-weeks HFD-induced diabetic mice. Then diabetic mice were administered HFD supplemented by extracts (up to 150 mg/kg/day) for 12 additional weeks using standard diet as control and the antidiabetic drug, metformin (150 mg/kg), as positive control. Then the antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant activity of extracts were determined.

Results: Of the highly efficient polyphenolics-enriched hydroalcoholic and ethyl acetate extracts, the lyophilized aqueous (AQL) and butanol extracts were not toxic in cells ($\leq 400 \mu$ g/mL) or when given orally in normal mice ($< 2000 \text{ mg/kg}$), exerted a dose-dependent hypoglycemic action in diabetic mice, which was maximal at the dose of 150 mg/kg. Upon administering this dose for 12 weeks, both extracts significantly ameliorated body weight control capacity, recovery of plasma glucose and insulin level, reduced oxidative stress in blood, myocardial and skeletal muscles, and improved hyperlipidemic and inflammatory status. Moreover, diabetes-related complications were optimally ameliorated by oral therapy based on halved doses (75 mg/kg) of a mixture of AQL and metformin.

Conclusions: Current investigation supports the traditional medicinal usage of *Anvillea radiata* and suggests that both readily accessible and low-cost bio-extracts have the potency to develop an antihyperglycemic, antihyperlipidemic and protective agent against beta-cells and muscle dysfunction at doses compatible with the

* Correspondence to: Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Institut de Chimie Radicalaire, Sondes Moléculaires en Biologie et Stress Oxydant, Service 522, Faculté des Sciences de Saint-Jérôme, Avenue Escaadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France.
E-mail address: sylvia.pietri@univ-amu.fr (S. Pietri).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.042>

Received 1 March 2017; Received in revised form 23 May 2017; Accepted 26 June 2017

Available online 30 June 2017

0378-8741/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

common practices of indigenous people for the management of metabolic disorders.

1. Introduction

For centuries, plants have been exploited as remedies, the knowledge on their pharmacological activities being primarily based on empirical findings. Over the recent past, interest in identifying druggable metabolites from plants has also inspired the design of modern synthetic lead drugs for the treatment of non-communicable diseases, including cancer, cardiovascular disease and diabetes mellitus (Bailey and Day, 1989; Gurib-Fakim, 2006). For instance, it is estimated that more than 70% of the population in developed or developing countries currently use medicinal plants alone or in combination with allopathic drugs (Gurib-Fakim, 2006; Lesgards et al., 2014) and that almost 80% of diabetics worldwide still depend exclusively on herbal folk medicine (Rios et al., 2015).

Surveys of traditional Saharian medicines have been conducted with the help of local populations, leading to inventories of dozens of indigenous medicinal plants and their therapeutic indications (Hammiche and Maïza, 2006; Boudjelal et al., 2013; Fakchich and Elachouri, 2014). Notably, *Anvillea radiata* Coss. & Dur (Asteraceae), which is mainly distributed in northern Africa, is used by populations and traditional healers in infusions or decoctions of the leaves and flowers to treat a variety of ailments such as chest cold, gastrointestinal, liver and pulmonary disorders, and postprandial hyperglycemia (Hammiche and Maïza, 2006; Ghourri et al., 2013; Fakchich and Elachouri, 2014). Previous phytochemical reports identified two main families in *A. radiata* aerial parts, i.e., germacranolides such as 9 α -hydroxyparthenolide and 8 α , 9 α -epoxyparthenolide isolated in chloroform extracts, and a less abundant fraction of phenolics (e.g., derivatives of dicaffeoylquinic acid), including flavonoids (both glycosides and aglycones) in aqueous/alcoholic extracts (Dendougui et al., 2006; Moumou et al., 2014; Destandau et al., 2015; Boukhris et al., 2016). Aside from these active compounds, saponins, tannins, fatty acids, and various types of secondary metabolites, including sterols, terpenoids, etc. were found in *A. radiata* extracts using polar solvents (Lakhdar et al., 2013; Hamada and Ladjel, 2015), many of them having potential biological and antioxidant activities. Germacranolides from *A. radiata* demonstrated antitumoral, anti-inflammatory and antibacterial properties (Moumou et al., 2014) and up to now laboratory investigation of the biological activities of whole material preparations of the plant has focused on the antimicrobial (Bammou et al., 2015; Hamada and Ladjel, 2015) and antifungal (Lakhdar et al., 2013) properties of aqueous and organic extracts.

Plant-derived phenolics and terpenoids such as those prevailing in *A. radiata* polar extracts are known antioxidants acting by terminating free radical chains and/or inactivating metal ion catalysis of lipid peroxidation, and their presence is of great pharmacological and therapeutic interest in several pathologies where overproduction of reactive oxygen species (ROS) has been implicated (Pietri et al., 1997; Del Rio et al., 2013). In this regard, *A. radiata* decoctions or as dried powder are commonly ingested in Saharian traditional medicine against diabetes (Hammiche and Maïza, 2006; Ghourri et al., 2013; Fakchich and Elachouri, 2014), a pathology associated with the setting of sustained oxidative stress and altered antioxidant levels (Giacco and Brownlee, 2010). This role of ROS formation in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus complications such as cardiovascular and renal dysfunction, and neurological damage is well established (Meigs, 2010). Antioxidant and antihyperglycemic therapeutic strategies based on natural compounds are emerging which can provide long-lasting control of glycemia with minimal side effects (Giacco and Brownlee, 2010; Rios et al., 2015). In connection, studies on experimental diabetes in animals have reported the hypoglycemic action of extracts

or isolated flavone constituents in other species belonging to the Asteraceae family, the efficiency being however strongly depending on the choice of the model and administration procedure (Bououam et al., 2006).

To set up *Anvillea radiata* extraction procedures allowing for an improved standardization of active compounds, the objectives of this study were thus: (i) to determine the phenolic profiles in nonpolar vs polar extracts and their associated inhibition properties towards a series of determinants of ROS and cytotoxicities in normal and cancer cultured cells; (ii) to assess for the first time the in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of the extracts; (iii) to evaluate their protective effect on cultured rat beta-cells exposed to hyperglycemic conditions, and (iv) to evaluate the effect of oral administration of two potentially druggable extracts on hyperglycemia, oxidative stress, metabolic and inflammatory biomarkers of type 2 diabetes and obesity in a model of high-fat fed C57/BL6J mice.

2. Materials and methods

2.1. Standards, reagents and cell culture media

HPLC grade solvents were used throughout, including methanol and ethyl acetate which were from Acros Organics (Fisher Scientific, Illkirch, France) and *n*-butanol and petroleum ether (40–60 °C) which were from VWR Chemicals (Fontenay sous Bois, France). Deionized water obtained from a Purelab station (Elga, France) was used throughout. Normal and extract-containing cell culture media were passed through a 2- μ m Millipore filter before use. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), allopurinol and phenolic standards (Trolox, quercetin, naringenin, gallic, caffeic, ferulic and sinapic acids) were purchased from Acros. Phosphate-buffered saline (PBS) and other buffers, xanthine, xanthine oxidase (XO; from buttermilk), 2-thiobarbituric acid (TBA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTI), hydrogen peroxide (H₂O₂), adenosine triphosphate (ATP), 2-deoxy-D-ribose (deoxyribose), the spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Media for cell culture were from Gibco Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), including Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) and GlutaMax, or Louza (Arch Water Products, Amboise, France), including fibroblast basal medium (FBM) and growth factors (FGM; Clonetics). Hypoglycemic drugs metformin hydrochloride (Met; 99.9%, pharmagide; from UniPex Pharmaceuticals, France) and glibenclamide (from TCI Europe, Belgium) were used as positive controls in antidiabetic studies.

2.2. Plant material

The aerial parts (flowers and leaves) of *Anvillea radiata* were collected in april 2013 in the area of El Oued, in the Algerian part of Sahara (altitude, 69 m). The main information (local name, collected parts of plant, traditional methods of preparation and usual medicinal uses and administration) were obtained from local inhabitants having ancestral knowledge of the curative properties of the plant. The sample was identified by Prof. N. Khalfallah (Laboratoire de Génétique, Biochimie, et Biotechnologies Végétales, Université Frères Mentouri (UFM), Constantine, Algeria). A voucher specimen (LBE13/01) has been deposited in the herbarium of the Faculty of Natural and Life Sciences at UFM. The plant material was dried at ambient temperature in the dark for 30 days and stored in a dry place prior to use.

2.3. Plant material preparation

2.3.1. Lyophilized aqueous extract

The dried plant material (10 g) was suspended in 200 mL of hot water and stirred for 30 min. The resulting extract was filtered, frozen with liquid N₂ and lyophilized (Cryotec lyophilizer model Cosmos, Saint Gély du Fesc, France) at 80 °C. This lyophilized aqueous extract (AQL) was obtained in ~15% w/w yield and was stored at -20 °C until analysis.

2.3.2. Organic extracts

A schematic diagram for the preparation of organic extracts of *A. radiata* is shown in Fig. 1. The dried plant material (200 g) was extracted with 1.2 L of methanol for 24 h at room temperature. After filtration of the residue the above procedure was repeated twice and the combined extracts were evaporated at 37 °C until dryness using a rotary evaporator to give the methanol-soluble extract (25.8 g, 12.8% w/w). Then the methanol extract was treated with 300 mL of hot water to dissolve polyphenols, filtered and the resulting aqueous solution was first treated with petroleum ether (PE; 4 × 100 mL) to remove lipids and then successively partitioned with ethyl acetate (4 × 100 mL), and *n*-butanol (4 × 100 mL) according to previous procedures (Koleva et al., 2002; Bammou et al., 2015). After rotary evaporation under vacuum the following fractions were obtained: PE-soluble extract (1.9 g, 0.95% w/w), ethyl acetate-soluble extract (2.8 g, 1.4% w/w), and *n*-butanol-soluble extract (2.9 g, 1.4% w/w). The residual aqueous layer was frozen with liquid N₂ and lyophilized to yield the aqueous residual (AR) fraction (12 g, 6% w/w). All these extracts were stored at -20 °C until analysis.

2.4. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of extracts

The TPC of each extract were determined using a reported procedure (Singleton et al., 1999) with minor modification. Samples (20 µL) dissolved in methanol at 0.1 mg/mL were mixed with 100 µL of a solution of the Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich; 0.2 N in distilled water), the mixtures were vortexed for 5 min and 80 µL of an aqueous sodium carbonate solution (75 g/L) was added. After 2 h incubation at room temperature the absorbance of the supernatant was read at 760 nm using a UV-visible spectrophotometer. The TPC was evaluated using a gallic acid calibration curve in methanol and the results are expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of extract weight.

The TFC of each extract was determined according to a reported procedure (Ordonez et al., 2006). Samples (100 µL) dissolved in ethanol at 0.5 mg/mL were mixed with 100 µL of ethanol containing 2% aluminium chloride. After 1 h incubation at room temperature the absorbance was read at 420 nm. The TFC was evaluated using a rutin calibration curve in ethanol and the results are expressed as milligrams of rutin equivalents (RUE) per gram of extract weight.

2.5. HPLC analysis of phenolic compounds

To separate phenolic compounds a Merck Hitachi system consisting of a LaChrom L-7000 interface module and a L-7455 photodiode array detector controlled by the EZ Chrom chromatography manager software was used. For each fraction (2 mg/mL in methanol), the average amounts of phenolic compounds were calculated from standard calibration curves obtained at the maximum UV absorbances of flavonoids, hydroxybenzoic and hydroxycinnamic compounds and were quantified as GAE, caffeic acid equivalents (CAE) and RUE per gram of extract weight, respectively.

Reverse phase HPLC was carried out at room temperature on a Htec RP-18 column (250 mm × 4 mm; 5 µm; Macherey-Nagel, France) using a gradient with a flow rate of 0.8 mL/min. Gradient: solvent A

(0.05% phosphoric acid in water, pH 2.6), solvent B (methanol): 0–45 min, 30–60% B; 45–50 min, 60% B; 50–51 min, 30% B; 51–57 min, 30% B.

2.6. Antioxidant assays

2.6.1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

For each extract a DPPH assay was carried out using a reported procedure (Alencar et al., 2008). Aliquots of each extract dissolved in methanol (20–660 µg/mL, final concentration) were mixed with 200 µL of a fresh DPPH solution (Sigma-Aldrich; 0.126 mM) in methanol and the final volume was adjusted to 300 µL. After stirring the mixtures for 3–90 min at room temperature in the dark the absorbance was monitored at 517 nm on a microplate reader (TECAN infinite M200, Switzerland) until a plateau was reached. Percent DPPH scavenged was calculated using Eq. (1)

$$\text{Inhibition(\%)} = [100 \times (A_0 - A) / A_0] \quad (1)$$

where A_0 is the baseline value for neat DPPH in methanol and A is the absorbance in the presence of a given concentration of the tested extract. IC₅₀ values (the concentration resulting in 50% DPPH scavenging) were calculated (in µg/mL) by non-linear fitting of dose-response curves and TIC₅₀ values were derived as the time (in min) required to reach the steady state for a concentration equal to IC₅₀.

2.6.2. Total reactive antioxidant potential (TRAP)

TRAP was determined in Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.4) as described (Cassien et al., 2016) using fresh stock luminol solutions kept in the dark at 4 °C until use. Peroxyl radicals were generated by heating AAPH (150 mM in 10 mL Tris-HCl) at 37 °C for 30 min. Once cooled at room temperature, this solution can be used for up to 20 min. In this order, 2 mL of AAPH solution, 0.5 mL of luminol solution (13 µM), and 0.5 mL of a Tris-HCl: DMSO (100:1 v/v) solution of each extract (0.4–25 µg/mL, final concentration) were added and the mixture was stirred for 20 s at room temperature. Luminescence was recorded at room temperature (Tiertek-Berthold Sirius luminometer, Pforzheim, Germany). In the assay Trolox was the reference and the TRAP was obtained by integrating the area under curve (AUC) for sample and blank solutions (all reactants except test fraction) and the results are expressed as µmole Trolox equivalents (TE) per gram of extract weight or TE (standards).

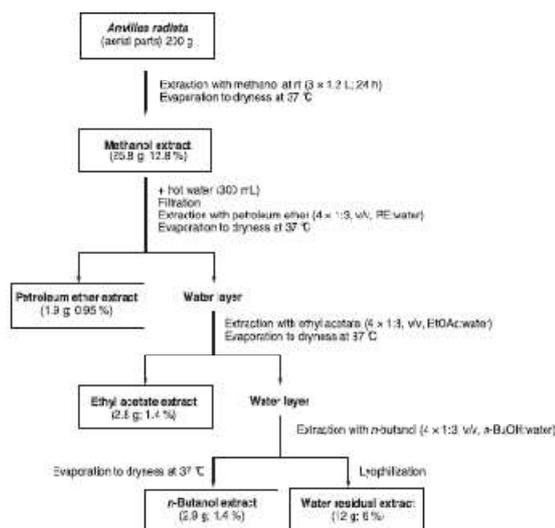


Fig. 1. Preparation of organic extracts of *Anvillea radiata*.

2.6.3. Oxygen radical absorbing capacity (ORAC) assay

The assay was performed in microplates according to modifications of previous methods (Dávalos et al., 2004). A fluorescein stock solution (0.821 mM) was prepared in PBS 1X and stored at 4 °C. Solutions of AAPH (153 mM) and fluorescein (82.1 nM) in KH_2PO_4 buffer (100 mM, pH 7.4) were prepared daily. Samples (25 μL /well) of tested extracts dissolved in buffer containing 0.05% v/v DMSO (0.94–7.5 μg /mL, final concentration) were mixed with 150 μL /well of fluorescein solution and the mixture was incubated for 10 min at 37 °C. Aliquots of AAPH solution (25 μL /well, 19.12 mM, final concentration) were added and the fluorescence was recorded at 2-min intervals for 70 min at wavelengths of 485 nm for excitation and 530 nm for emission. Blank was made using PBS instead of test fraction. In each assay a calibration curve was performed with Trolox (0.4–12.5 μM) as standard. The ORAC values were calculated using the neat AUCs and expressed either as $\mu\text{mole TE}$ per gram of extract weight or TE (standards).

2.6.4. Xanthine oxidase inhibition assay

Inhibition of XO by the extracts was evaluated in microplates by measuring the inhibition of XO-catalyzed formation of uric acid from xanthine as described previously (Cos et al., 1998). Samples (150 μL /well) dissolved in DMSO (18.5–600 μg /mL, final concentration) were added to 250 μL /well of a reaction mixture consisting of 25 μL xanthine solution at 50 μM and 25 μL EDTA solution at 10 μM , both in PBS (0.2 M, pH 7.5) containing 0.31% v/v DMSO. The reaction was started by adding to the mixtures 25 μL /well of XO solution (23.3 mU) in PBS. After 30 min incubation at 37 °C uric acid formation was measured at 290 nm. Enzyme was omitted in the blank controls and EC_{50} values (in $\mu\text{g}/\text{mL}$) were determined as the concentration that halved uric acid formation in the control. Allopurinol and quercetin were used as standards.

2.6.5. Superoxide radical scavenging ($\text{O}_2^{\cdot-}$) capacity

The $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging capacities were assayed in glycine buffer (6.25 mM, pH 10.1) at 25 °C according to previous procedures (Cassien et al., 2016). The assay measures inhibition by the extracts of lucigenin-derived chemiluminescence produced by the allopurinol/XO $\text{O}_2^{\cdot-}$ generating system. Samples (2.4–48 μL) dissolved in glycine buffer: DMSO (1000:1 v/v) at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were diluted in glycine buffer as to reach a final volume of 1.7 mL. To these solutions were added 300 μL of allopurinol solution (12.5 μM) and 100 μL of XO solution (0.458 mU/mL), both in glycine buffer. The test tube was shaken, inserted in a luminometer, 300 μL of lucigenin solution in glycine buffer (2.5 μM) was added and luminescence of the sample was monitored at 1.2-s intervals for a total period of 4.12 min following lucigenin addition. The $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging activity was calculated against controls (in the absence of extract) from AUCs. The results are expressed as IC_{50} values (in $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.6.6. Metal chelating capacity (MCC)

The MCC of the extracts was measured in microplates according to a published method (Ambigaipalan et al., 2016) with some modification. Samples (200 μL /well) dissolved in methanol at 0.3–2.4 mg/mL were mixed with 10 μL /well of aqueous ferrous chloride (2 mM). The mixture was then reacted with 40 μL /well of 5 mM aqueous 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine; Sigma–Aldrich) for 10 min at room temperature under vigorous stirring. The absorbance was read at 562 nm and a calibration curve was constructed using EDTA as standard. Percent inhibition of Fe^{2+} –ferrozine complex was calculated using Eq. (1) where A_0 is the absorbance of the control (water instead of extract). The results are expressed as micromoles of EDTA equivalents (EDTAE) per gram of extract weight.

2.6.7. Inhibition of deoxyribose degradation

The ability of AQL, butanol extract and AR fraction to inhibit the formation of TBA reactive substances resulting from the degradation of deoxyribose by Fenton-derived hydroxyl radical (HO^{\cdot}) was evaluated in a colorimetric assay according to a reported method (Bailey et al., 2014). When ferrous ions (formed by reducing Fe^{3+} by ascorbate) are used in the Fenton reagent, adding an excess EDTA in the system allows determining the direct HO^{\cdot} scavenging effect of the extract (radiomimetic assay) while omitting EDTA in the mixture will measure the capacity of the fraction to interact with site-specific HO^{\cdot} -induced damage to deoxyribose (Arnoma et al., 1987; Halliwell et al., 1987). The reaction mixture (1 mL, final volume) contained the tested compound (500 μL) dissolved in water at 0.025–0.25 mg/mL and aliquots (100 μL) of the following reagents dissolved in KH_2PO_4 buffer (20 mM, final concentration; pH 7.4): deoxyribose (2.8 mM), FeCl_3 (100 μM), EDTA (100 μM) or buffer, H_2O_2 (1 mM) and ascorbate (100 μM). After incubating the mixtures for 1 h at 37 °C TBA (0.5 mL, 1% v/v in 50 mM NaOH) and acetic acid (0.5 mL) were added and the mixture was heated at 100 °C for 15 min. After cooling, absorbance was read at 532 nm (A_{532}) against a corresponding blank not containing FeCl_3 . Mannitol (1–10 mM) was used as the reference. Percent inhibition of deoxyribose degradation by the extract in the presence or absence of EDTA was calculated using Eq. (1) where A_0 is the absorbance of the control (buffer instead of fraction) and A is the absorbance in the presence of a given concentration of the compound. Control assays in which deoxyribose or Fenton reagents were omitted, or test extracts were added after incubating deoxyribose with the Fenton reagents, but before addition TBA showed no interference with the assay.

2.6.8. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin-trapping analysis

Using EPR spectrometry following reported procedures (Alencar et al., 2009; Bailey et al., 2014), HO^{\cdot} scavenging activity of selected extracts was determined by measuring the dose-dependent inhibition of its DMPO spin adduct at room temperature. Aliquots of tested extracts (0.01–10 mg/mL, final concentration) dissolved in KH_2PO_4 buffer (20 mM; pH 7.4) containing DTPA (1 mM) and DMPO (5 mM) were incubated for 80 s with a mixture of H_2O_2 (0.5 mM) and FeSO_4 (0.5 mM). Samples were immediately placed into glass capillaries and X-band (9.81 GHz) EPR spectra were recorded on a Bruker ESP 300 instrument (Karlsruhe, Germany) using the following parameters: modulation frequency, 100 kHz; micro-wave power, 10 mW; sweep width, 0.07 mT; field axis resolution, 2048 points; receiver gain, 8×10^5 ; modulation amplitude, 0.05 mT; time constant, 5.12 ms and scan rate, 0.33 mT/s. The EPR signal intensities I and I_0 (buffer instead of test fraction) were quantitated by double integration of the simulated spectra as described (Bailey et al., 2014). Additionally, the relative scavenging rate constants were estimated by comparing the slopes of I_0/I against concentration linear regression curves according to a previous method (Finkelstein et al., 1980).

2.7. Inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes

All assays described below were carried out starting from stock solutions at 200 mg/mL dissolved in pure distilled water (AQL and AR fraction) or in the presence of 4% v/v DMSO (other extracts). In the latter case the final DMSO concentration in the tested samples was < 1% and did not interfere with the assay (not shown). Porcine pancreatic α -amylase (EC 3.2.1.1, type VI-B), α -glucosidases from *Saccharomyces cerevisiae* (SC; EC 3.2.1.20, type I), rat intestinal acetone powder (RIP), 2-chloro-4-nitrophenol- α -D-maltotriose (CNP3) and *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) were purchased from Sigma–Aldrich. Porcine pancreatic α -amylase assay was performed in microplates using CNP3 as substrate as described (Gella et al., 1997) and the two α -glucosidases assays were performed in using pNPG as

substrate according to Oki et al. (1999) with slight modifications (Supplementary Methods).

2.8. Inhibition of Cu²⁺-induced LDL oxidation

Fresh plasma was derived from normolipidic healthy volunteers after informed consent and LDL was isolated within 1 h after sample collection to obtain an albumin-free LDL preparation according to Miranda et al. (2000). Inhibition of LDL oxidation by extracts was then assayed in microplates by incubating at 37 °C LDL solutions (50 µg protein per mL) in PBS in the presence of CuSO₄ (2 µM) and extracts dissolved in ethanol as to reach a final concentration ranging 5–50 µg/mL and a final volume of 0.2 mL/well. LDL oxidation was measured by continuously monitoring for 6 h conjugated diene hydroperoxide formation at 234 nm against appropriate blanks (PBS instead of LDL and cupric sulfate) for background correction. After 6 h incubation, the content of each well was added to a mixture of trichloroacetic acid and TBA (1% in 0.5% NaOH), the samples were heated at 90 °C for 20 min, then centrifuged and the amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) was measured at 534 nm with a microplate reader.

2.9. Cell culture and cytotoxicity assays

The human lung cancer cell line A549 (CCL-185, from ATCC, LGC Standards) and normal human lung fibroblasts (NHLF, from Lonza) were routinely maintained in (DMEM + GlutaMax) and (FBM + FGM), respectively as described (Cassien et al., 2016). After reaching 90% confluence cells were harvested for subculturing. The cells were trypsinized, seeded in 96-well microplates (density, 2.5 × 10⁴ cells/well) and incubated in humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C to reach around 80% confluence in appropriate medium. The medium was renewed and cells were exposed for 48 h in the presence of extracts (5–500 µg/mL) or 0.2% DMSO in medium. After 48 h cells were washed two times with PBS 1X (+/+) for cytotoxicity analysis.

Rat pancreatic INS-1E beta-cells were cultivated at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium containing glucose (11 mM), fetal bovine serum (10%), glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), HEPES (10 mM), β-mercaptoethanol (0.05 mM), penicillin and streptomycin according to procedures previously established (Merglen et al., 2004). Cells were then exposed to medium containing high (25 mM) or normal (5 mM) glucose concentration for 84 h in 96-well plates in the presence of extracts (1–200 µg/mL) or 0.1% DMSO in medium. Medium was renewed every day until analysis of viability, metabolic activity and apoptosis (see below).

Cytotoxicity was evaluated by two complementary assays performed according to described procedures, i.e., a fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA; see Cassien et al., 2016), and the MTT assay (Culcasi et al., 2012). Intracellular ATP content, an index of metabolic activity, was assayed using a luciferin-luciferase reagent (Biofax A⁺; Yelen, Ensuès la Redonne, France; <http://www.yelen-analytcs.com>). Apoptosis was evaluated by assaying caspase-3 activity of cell lysates using a commercial fluorescence microplate kit assay (Fischer Scientific, France). These procedures are detailed in the Supplementary Methods section.

2.10. Animals and study design

Standard diet (SD; 11% energy by fat) and high-fat diet (HFD, 60% energy by fat) were purchased from Safe (Augy, France). All diets contained 20% proteins. Animal care and experimental procedures were performed according to the rules of the European Union Council (Revised Directives 2010/63/EU). This protocol was subjected to the scrutiny of the local Animal Research Ethics Committee and was approved for the project FEDER-AdiabaOx (2008, N° 13851). Aix Marseille University and the CNRS have a license for animal housing and experimentation (agreement C13-055-06) and the study was under

the supervision of a vet at the CNRS. One hundred and twenty-eight 4 weeks-old female C57BL/6 J mice were purchased from CERJ (Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) and maintained under conventional conditions with controlled temperature (22 ± 3 °C) and a 12 h light/dark cycle and access to food and water ad libitum. An enriched environment, by using wheels, tunnels and toys, was given to promote physical and social activity.

After one week acclimatization mice were randomly assigned to three experimental protocols described in the following. A first protocol examined the acute oral toxicity of AQL and butanol extract at 2000 mg/kg on 16-weeks SD animals (*n* = 4/group) according to the procedure of Yamanaka et al. (1990). Extracts, dissolved in a suspension of 0.5% aqueous carboxymethyl cellulose (as vehicle), were given orally in the limit of 0.1 mL/10 g body weight. A second protocol consisted of a dose-response study of the acute hypoglycemic activity of the extracts on 16-weeks HFD animals in comparison with glibenclamide (*n* = 6/group) as detailed below. In a third series of studies the long-term antidiabetic and antihyperglycemic effects of extracts were evaluated on the remaining 84 mice which were randomly divided into seven experimental groups (*n* = 12): controls given SD for 28 weeks, HFD group (given HFD for 28 weeks), [HFD+AQL] group, given HFD for 16 weeks, followed by HFD supplemented with AQL (150 mg/kg) for 12 weeks; [HFD+AQL₇₅] group, given HFD for 16 weeks, followed by HFD supplemented with AQL (75 mg/kg) for 12 weeks; [HFD+n-BuOH] group, given HFD for 16 weeks, followed by HFD supplemented with butanol extract (150 mg/kg) for 12 weeks; [HFD+ Met] group, given HFD for 16 weeks, followed by HFD supplemented with metformin (150 mg/kg) for 12 weeks and [HFD+Met₇₅+AQL₇₅] group, given HFD for 16 weeks, followed by HFD supplemented with a mixture of metformin and AQL (both at 75 mg/kg) for 12 weeks. Weekly weights measurements and daily estimates of food intake and clinical signs of suffering, weight loss and moribundity were recorded. At weeks 16 (before incorporation of extracts in the food) and 28, blood samples were collected from tail vein under local anaesthesia induced by 0.25% lidocaine application in ointment. Blood glucose concentration was measured using a commercial whole-blood glucose auto analyzer (Freestyle Optium Neo, Abbott).

2.11. Acute hypoglycemic activity of extracts

In this series of experiments single doses of AQL or butanol extract (25, 75, 150 and 250 mg/kg), or glibenclamide (15 mg/kg) dissolved in vehicle (see above) were given orally through a thin flexible cannula. Glucose concentration was monitored in blood samples (5 µL) collected from tail vein at 0, 0.5, 1, 3 and 4 h after administration. Blood glucose concentration was measured by a commercial whole-blood glucose auto-analyzer.

2.12. Oral glucose tolerance test (OGTT) in long term-treated mice

At the end of 28 weeks treatments, the OGTT was performed on *n* = 6 animals/group fasted for 8 h beforehand. A thin cannula was inserted orally and allowed the administration to each animal of 3 g/kg glucose solution (20% w/v in normal saline solution, Laboratoire Lavoisier, France) in the limit of 0.1 mL/10 g body weight. Tail blood (6 µL) was collected at 0, 20, 40, 60, 90 and 120 min after 0.25% lidocaine application in ointment. Blood glucose concentration was measured, a curve over time was generated and the AUC was calculated.

Following the OGTT study, mice were maintained on their respective diets for five additional days, then fasted overnight and deeply anesthetized using sevoflurane (2–4%) delivered with a mixture O₂/air in an anaesthetic chamber (Abbott, Rungis, France) prior to sacrifice by cervical dislocation.

Blood was withdrawn by orbital cardiac puncture and immediately assayed for reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels using a commercial glutathione assay kit (Cayman

Chemical, Bertin Pharma, France). Samples of blood hemolyzates were used for hemoglobin (Hb) and glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}, expressed as percentage of total Hb content) determination as described (Dey et al., 2015). Plasma samples were isolated by centrifugation (1650g for 15 min at 3 °C) and stored at -80 °C for further analysis of glucose and insulin levels, and for assaying protein carbonyls and inflammatory markers (see below). Tissues and organs were rapidly dissected out, washed with saline and stored at -80 °C for further analysis.

2.13. Plasma glucose, insulin and lipid metabolism, and protein carbonyls assay

Plasma concentrations of total proteins, triglycerides, total cholesterol and glucose were assayed using commercially available assay kits (Biobio Reagents, Maisy, France). Plasma insulin concentrations were measured in blood collected on EDTA using a mouse insulin enzyme immunoassay kit (SPI bio, Bertin Pharma, France). Glycogen and triglyceride contents were assayed in liver tissues using commercial assay kits (Caymann Chemical). Plasma protein carbonyls were assayed using a fluorimetric method based on derivatization with 7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole (NBDH; Sigma-Aldrich) according to Stocker et al. (2015). For details see the Supplementary Methods section.

2.14. Inflammatory biomarkers

The plasma levels of leptin, and cytokines interleukin-6 (IL-6), monocyte-chemoattractant protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by commercial multiplex assay kit (RECYTMAG-65K; Milliplex Map, Merck, France) on a Magpix unit coupled to a xPONENT 4 software (Luminex Corporation) at the CIPHE (Centre de Laminy, Marseille). Plasma samples on EDTA were diluted with the kit solution after two freeze/thaw cycles (1:1 v/v). Determination of biomarkers concentrations ($\mu\text{g/mL}$) were drawn from experimental curves reporting mean fluorescence intensity (MFI) as a function of concentration.

2.15. NADPH oxidase activity in heart ventricular and skeletal muscle

NADPH oxidase-triggered O₂⁻ production in heart ventricular and skeletal muscle tissue was monitored by chemiluminescence in presence of NADPH according to Yokota et al. (2009). Briefly, freshly excised heart and hindlimb muscle tissue were snap-frozen with liquid N₂ and homogenized in buffer containing 250 mM sucrose and 10 mM HEPES. After centrifugation (12,000g, 10 min at 3 °C), 5 μL of the lysate was mixed in each well with 200 μL buffer containing (in mM):

NaCl (98), NaHCO₃ (25), KCl (4.7), KH₂PO₄ (1.5), MgSO₄ (1.2), glucose (11) and HEPES-Na (20). Chemiluminescence was monitored after addition of 5 μM lucigenin and 100 μM NADPH for starting the reaction. In all groups, control experiments were performed in the presence of the cell permeable O₂⁻ scavenger 4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid (Tiron, 20 mM) or the flavoprotein inhibitor diphenylethiodonium (DPI, 10 μM).

2.16. Statistical analysis

Statistical analyses of the data were performed using GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA). The results are presented as mean \pm SD or SEM for the indicated number of independent experiments. Correlations among data from antioxidant assays were calculated using Pearson's correlation (r^2) coefficients. In biological experiments evaluation of statistical significance was conducted by Mann-Whitney test when appropriate, or one-way analysis of variance (ANOVA) followed, if significant ($P < 0.05$), by a posteriori Newman-Keuls or Tukey's tests. Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. TPC, TFC and HPLC analysis

Phenolic compounds are antioxidant phytochemicals with well-documented beneficial health effects (Del Rio et al., 2013) and in desert/steppic plants such as *A. radiata* they are thought to provide enhanced protection against harsh environmental oxidative stress conditions. To increase the TPC of AQL obtained by lyophilization of a hot water extract of aerial parts of the plant similar to traditional infusion/decoction, a multistep organic extraction procedure first using methanol, followed by a three-step partitioning of aqueous phase with PE, ethyl acetate and *n*-butanol was carried out (Fig. 1). The TPC, TFC and TFC/TPC ratio of AQL, methanol extract and its derived fractions are summarized in Table 1 (left panel). The data demonstrated a high content of phenolics and flavonoids for AQL and methanol extract that fell in the middle range of values reported for hydroalcoholic extracts of *A. radiata* (e.g., 57 mg GAE/g in Hamada and Ladjel, 2015 or 100–200 mg GAE/g in Bammou et al., 2015), possibly reflecting geographical or seasonal variability, or differences in plant drying procedures. The marginal differences found between aqueous and methanol extracts regarding TPC and TFC are not surprising because these solvents can dissolve almost equally a large portion of polar phenolic compounds (Daneshfar et al., 2008). However using methanol extract as starting material for further fractionation was considered more pertinent since it significantly favoured the recovery of flavonoids, i.e., a 40–75% increase in the TFC/TPC ratio across extracts was

Table 1
Total phenolic (TPC), total flavonoid (TFC) contents and concentrations of phenolic compounds^a in *A. radiata* extracts detected by HPLC-DAD.

Extract ^b	Major phenolic compounds			Major phenolic compounds		
	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg RUE/g)	TFC/TPC	Hydroxycinnamic derivatives (mg CAE/g)	Flavonoids (mg RUE/g)	Hydroxybenzoic derivatives (mg GAE/g)
AQL	77.4 \pm 3.5 [*]	32.5 \pm 0.3 [*]	0.42 \pm 0.03	17.89 \pm 1.07 [*]	13.28 \pm 1.23 [*]	1.41 \pm 0.09 [*]
methanol	65.8 \pm 1.8 [*]	48.4 \pm 0.9 [*]	0.74 \pm 0.04 ^{**}	24.10 \pm 1.44 [*]	29.01 \pm 2.63 ^{**}	3.06 \pm 0.20 ^{**}
petroleum ether	29.9 \pm 1.2 [‡]	15.5 \pm 0.6 [‡]	0.51 \pm 0.04	4.05 \pm 0.38 [‡]	1.73 \pm 0.10 [‡]	0.47 \pm 0.03 [‡]
ethyl acetate	158.9 \pm 5.3 [‡]	63.1 \pm 1.8 [*]	0.40 \pm 0.05	90.91 \pm 5.16 [‡]	66.82 \pm 13.81 [‡]	nd ^d
<i>n</i> -butanol	122.5 \pm 3.2 ^{**}	59.6 \pm 1.1 [*]	0.48 \pm 0.02	56.38 \pm 3.20 ^{**}	39.65 \pm 2.85 ^{**}	3.6 \pm 0.23 [*]
AR fraction	36.9 \pm 1.3 [‡]	8.3 \pm 0.1 [‡]	0.22 \pm 0.01 [‡]	6.68 \pm 0.40 [‡]	nd	nd

Statistics: The same symbols ^{*}, [‡], ^{**} or [‡] indicate that values are significantly different ($P < 0.02$) from others by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test.

^a Values are expressed per gram of extract and represent the mean \pm SEM of 3–6 independent experiments made in triplicate.

^b AQL, lyophilized aqueous extract; AR, aqueous residual.

^c GAE, gallic acid equivalents; RUE, rutin equivalents; CAE, caffeic acid equivalents.

^d nd: not detected.

recorded (Table 1, left panel). As expected, the ethyl acetate and butanol extracts showed the highest TPC and TFC compared to the methanol extract. Recently, using a similar water partition procedure with ethyl acetate and *n*-butanol led to optimized TPC from hexane extracts of *Rhododendron anthopogonoides* (Jing et al., 2015). Owing to the weakest TPC and TFC recovered in the PE and AR fractions, the results indicated that the total phenolics of the aerial parts of *A. radiata* could be enriched in the hydroalcoholic and ethyl acetate fractions.

As the TPC and TFC were determined further, identification and quantitation of the phenolics profile in the six *A. radiata* extracts was carried out by HPLC using a diode array detector (DAD). Representative chromatograms are displayed in Fig. 2. The qualitative–quantitative analysis of each extract is presented in Table 1 (right panel). Hydroxycinnamic derivatives and flavonoids, which were present in significant amounts in ethyl acetate and butanol extracts with yet a quite different range of compounds (Fig. 2), were still found in good yields in the starting AQL and methanol extract, while they were recovered in weak amounts or even traces in the PE and residual AR fractions. According to their higher polarity, hydroxybenzoic derivatives appeared as minor constituents in hydroalcoholic extracts. These classes of phenolics were readily identified by comparison with the retention times (t_R) and UV spectra of authentic standard samples of gallic ($t_R = 4.2$ min) and caffeic ($t_R = 13.4$ min) acids, and rutin ($t_R = 28.2$ min) at maximal absorption wavelengths of 280, 320 and 350 nm, respectively.

AQL and methanol extract showed close HPLC-DAD profiles, only differing by some extra flavonoids. The efficiency of the fractionation

scheme of *A. radiata* (Fig. 1) is illustrated by the fact that the AR fraction contained only traces of hydroxycinnamic derivatives (Fig. 2). Moreover, the butanol fraction retained a flavonoids content of ~40 mg RUE/g, corresponding to that reported by Dendougui et al. (2006) who extracted similar quantity of *A. radiata* dried material using methanol. Among the phytochemicals contents, strong correlations were obtained between the TPC and hydroxycinnamic derivatives ($r^2 = 0.956$, $P < 0.001$) or flavonoids ($r^2 = 0.892$, $P < 0.01$), whereas hydroxybenzoic compounds did not correlate ($P > 0.05$).

3.2. In vitro antioxidant properties

Antioxidant activity of extracts was evaluated by a series of assays that differ in their endpoints, i.e., the mechanisms implicated and/or targets.

3.2.1. DPPH, ORAC and TRAP

The results of the DPPH (performed in methanol and globally measuring free radical reducing activity (Ambigaipalan et al., 2016; Foti, 2015) ORAC and TRAP (both performed in buffer and measuring scavenging of peroxy radicals) assays are shown in Table 2. In the DPPH assay, where a lower IC_{50} value indicates increased activity, ethyl acetate and butanol extracts exhibited the highest activity ($IC_{50} \sim 45 \mu\text{g/mL}$). The AR fraction and PE extract were 5–10 times less potent and the standard antidiabetic drug metformin was found inactive ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$). Such a higher DPPH scavenging effect for ethyl acetate and butanol vs methanol extracts has been already observed (Benhammou et al., 2009; Jing et al., 2015). In comparison

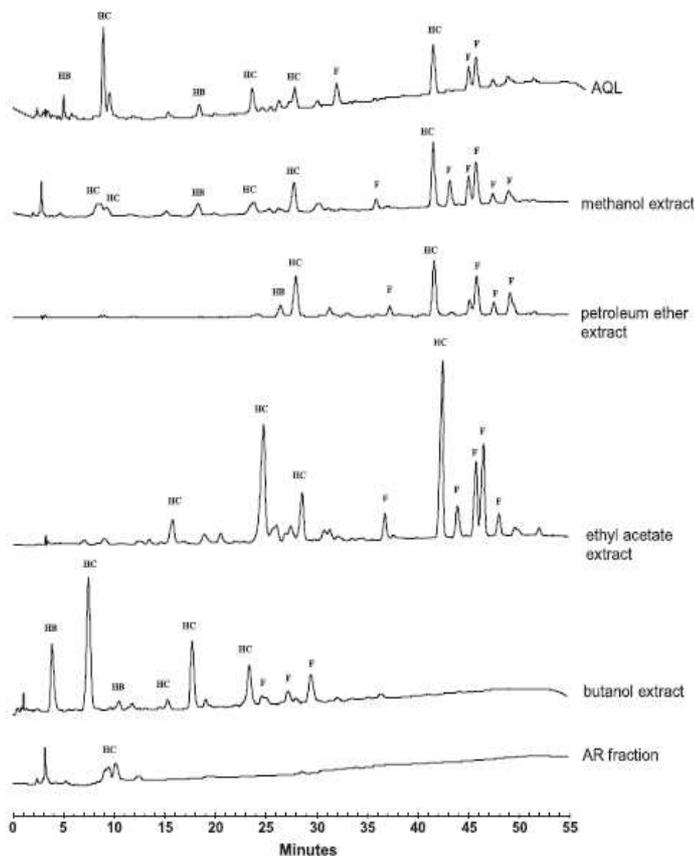


Fig. 2. HPLC-DAD chromatograms of *A. radiata* phenolic compounds detected at 280 nm in various extracts: AQL, lyophilized aqueous extract; AR, aqueous residual. Peak labels: HB, benzoic acid derivatives; HC, hydroxycinnamic acid derivatives; F, flavonoids derivatives.

Table 2
Antioxidant capacities^a in the DPPH, ORAC and TRAP assays.

Extract or compound	DPPH		ORAC	TRAP
	IC ₅₀ (µg/mL)	TTC ₅₀ (min) ^b	(µmole TE ^c /g)	(µmole TE/g)
AQL	130.3 ± 4.3*	23.7 [†]	1390 ± 50*	512.4 ± 21.2*
methanol	140.3 ± 5.2*	46.1	1475 ± 95*	498.5 ± 19.9*
petroleum ether	518.7 ± 35.7 [‡]	42.7	363 ± 11 [§]	15.3 ± 4.2 [§]
ethyl acetate	43.5 ± 0.1*	22.6*	3900 ± 20 [†]	935.0 ± 44.0*
n-butanol	47.9 ± 2.6*	24.6*	3315 ± 98*	787.7 ± 45.2*
AR fraction	283.3 ± 25.1 [‡]	59.3	503 ± 69 [§]	32.9 ± 6.8 [§]
metformin	> 500	—	-0.02	-0.02

Statistics: The same symbols *, [‡], * or [†] indicate that values are significantly different ($P < 0.02$) from others by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test.

^a Values represent the mean ± SEM of 3–6 independent experiments made in triplicate.

^b Time to reach the steady state at IC₅₀.

^c Trolox equivalent.

with the literature (Bammou et al., 2015), the method developed in the present study for preparing AQL, methanol and ethyl acetate extracts of *A. radiata* significantly improved DPPH scavenging activity. An analysis of the relationship between TPC, TFC and DPPH data indicated good correlations ($P < 0.05$) between these parameters, with Pearson's coefficients $r^2 = 0.672$ for TPC and $r^2 = 0.678$ for TFC. The phenolic compounds caffeic acid, quercetin and gallic acid exhibited much stronger activities in the DPPH assay, with IC₅₀ values of 4.71 ± 0.05 , 1.71 ± 0.39 and 1.26 ± 0.01 µg/mL, respectively. Being a single electron-based reaction with phenoxyl radical intermediates, DPPH quenching is favoured in phenolics featuring catechol (as in caffeic acid and quercetin) or pyrogallol (as in gallic acid) moieties (Alov et al., 2015; Foti, 2015). This could explain the higher activities seen in the ethyl acetate and butanol extracts which are enriched in structurally-related hydroxycinnamic constituents (Table 1 and Fig. 2) having known antioxidant properties (Shahidi and Chandrasekara, 2010). Consistent, a good correlation was found between DPPH data and hydroxycinnamic contents ($r^2 = 0.534$, $P < 0.05$). Finally, TTC₅₀ values were determined to characterize the kinetic behavior of the extracts in DPPH scavenging. According to a previous ranking (Sanchez-Moreno et al., 1998), caffeic acid is a rapid scavenger (TTC₅₀ = 8.8 min), the AQL, ethyl acetate and butanol extracts showed intermediate kinetic properties similar to that of gallic acid (TTC₅₀ = 29.8 min), while methanol and PE extracts, and AR fraction were the slowest scavengers, comparable to quercetin (TTC₅₀ > 60 min).

Antioxidant capacity determined by ORAC and TRAP consistently showed significant increase for the ethyl acetate and butanol extracts compared to the initial AQL and methanol extract (Table 2). Highly significant correlations were found between ORAC ($r^2 = 0.950$; $P < 0.001$) or TRAP ($r^2 = 0.821$; $P < 0.01$) and the hydroxycinnamic derivatives contents. The correlations remained strong concerning the flavonoids contents, with Pearson's coefficients $r^2 = 0.893$, $P < 0.01$ for ORAC and $r^2 = 0.832$, $P < 0.05$ for TRAP. Again, metformin was found not effective in both TRAP and ORAC assays.

3.2.2. Superoxide radical scavenging and inhibitory effects on prooxidants

To limit oxidative stress, inhibiting O₂^{•-} and/or some biological sources and conditions of production could be of relevance for the medicinal usage of *A. radiata*. The results of XO inhibition (by measuring uric acid production according to Cos et al., 1998), O₂^{•-} scavenging (by a fluorescence method (Cassien et al., 2016)) and MCC determination (by the ferrozine assay (Ambigaipalan et al., 2016) performed in methanol) are shown in Table 3. Only AQL, methanol, ethyl acetate and butanol extracts demonstrated weak XO inhibitory

Table 3
Xanthine oxidase (XO) inhibition, superoxide quenching, and metal chelating capacity (MCC)^a.

Extract or compound	XO inhibition	Superoxide quenching	MCC
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	(µmole EDTAE/g) ^b
AQL	531.0 ± 6.1*	0.222 ± 0.005*	40.1 ± 4.3*
methanol	309.3 ± 8.7 [†]	0.267 ± 0.007*	35.4 ± 4.7*
petroleum ether	> 2400 [‡]	0.694 ± 0.018 [§]	70.9 ± 9.2*
ethyl acetate	120.3 ± 8.2*	0.145 ± 0.005*	15.2 ± 0.9*
n-butanol	352.0 ± 8.7 [†]	0.186 ± 0.009*	10.0 ± 1.4*
AR fraction	> 2400 [‡]	0.554 ± 0.005 [§]	19.0 ± 0.7*
caffeic acid	19.5 ± 2.1 [†]	0.013 ± 0.000 [†]	123.4 ± 1.9 [†]
quercetin	4.2 ± 0.2 [†]	0.083 ± 0.006 [†]	102.1 ± 1.2 [†]
gallic acid	41.1 ± 1 [†]	0.002 ± 0.000 [†]	88.2 ± 1.8 [†]
allopurinol	1.1 ± 0.1	—	—
metformin	> 1000	> 100	—

Statistics: The same symbols *, [‡], * or [†] indicate that values are significantly different ($P < 0.05$) from others by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test.

^a Values represent the mean ± SEM of 3–6 independent experiments made in triplicate.

^b EDTA equivalent.

activities (IC₅₀ > 100 µg/mL) compared to fairly strong (allopurinol and quercetin) or moderate (caffeic and gallic acids) inhibitors (see Cassien et al., 2016 for the two latter compounds). Table 3 shows that the same extracts demonstrating appreciable inhibition against XO possessed much stronger O₂^{•-} scavenging activities (i.e., ~1000-fold), as indicated by considerably lower IC₅₀ values < 0.3 µg/mL. Strong positive correlations ($P < 0.05$) were obtained between O₂^{•-} quenching and TPC ($r^2 = 0.711$), TFC ($r^2 = 0.776$) and hydroxycinnamic derivatives contents ($r^2 = 0.556$), but not with hydroxybenzoic derivatives, suggesting the participation of phenolics constitutes of the extracts (and particularly hydroxycinnamates). The MCC value, an index of the capacity of compounds to inhibit iron-induced lipid peroxidation by forming complexes with Fe²⁺, exhibited strong variations among extracts, decreasing in the order: PE > AQL ≈ methanol > ethyl acetate ≈ AR fraction ≈ butanol (Table 3). Globally, the activities were weak to moderate as compared to reference compounds and negative, but not significant correlations were found between the MCC of extracts and TPC, TFC, or any of the peroxyl (TRAP, ORAC) and O₂^{•-} radicals scavenging activity indices tested above ($r^2 = 0.294$ – 0.464). Of interest, an inverse correlation was observed between MCC and DPPH reducing activity ($r^2 = 0.657$, $P < 0.05$), in agreement with previous observations (Zhao et al., 2008), suggesting that extracts with higher MCC capacity might have lower scavenging activity. Notably, a negative correlation was found between MCC and HPLC-determined flavonoid content ($r = -0.853$, $P < 0.05$) suggesting that in most of the extracts, flavonoids could be predominantly in a metal-flavonoid complex form, with consequently a poor chelating capacity but increased antioxidant and scavenging properties (Liu and Guo, 2015), rather as glycoside conjugates.

3.2.3. Hydroxyl radical scavenging activity of water soluble extracts

The HO[•] inhibitory activity was first determined using a radiomimetic (with EDTA) and site-specific (without EDTA) deoxyribose assay in phosphate buffer, pH 7.4. All the three water soluble extracts showed concentration-dependent inhibition of deoxyribose oxidative degradation in both conditions, with a peak at ~0.25 mg/mL and a greater activity observed in the radiomimetic assay (Fig. 3A). The 'free' HO[•] scavenging potencies, as can be estimated by radiomimetic assay (Halliwell et al., 1987), decreased among extracts in the following order: butanol ≈ AQL > AR fraction. The iron chelation potencies, as can be estimated by the site-specific assay (Aruoma et al., 1987), decreased among extracts in the following order: butanol > AQL ≈ AR fraction, a discrepancy with the MCC data (Table 3) that could originate from differences in solvent and pH. At a concentration of

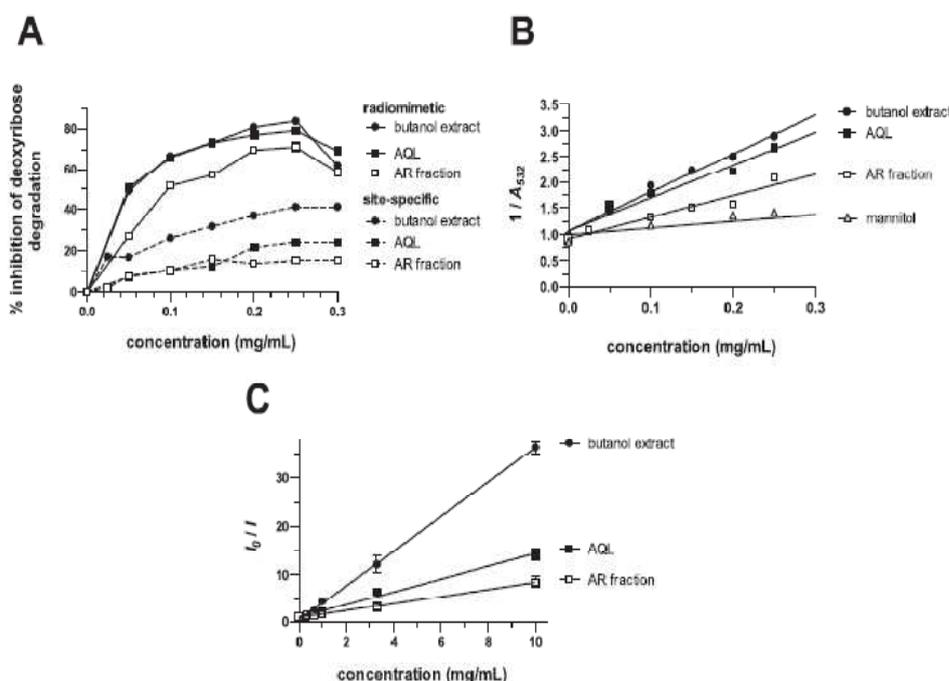


Fig. 3. Hydroxyl radical scavenging by *A. radiata* water soluble extracts. Values represent means \pm SEM ($n = 3-6$). (A) Concentration-dependent effect of extracts on $[\text{Fe}^{2+}\text{-ascorbate-H}_2\text{O}_2]$ deoxyribose degradation in the presence (radiomimetic) or absence (site-specific) of EDTA. (B) Determination of rate constants for HO^\bullet scavenging. Absorbances at 532 nm (A_{532}) were that measured in the radiomimetic deoxyribose assay. (C) Kinetic competition plots for the trapping on DMPO of $[\text{Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2]$ -generated HO^\bullet in the presence of extracts. I_0 and I represent EPR signal intensities in the extract-free control and sample, respectively.

0.3 mg/mL all samples exhibited a marked reincrease of absorbance, especially under radiomimetic conditions (Fig. 3A). Such pro-oxidant effect in the deoxyribose assay is common to several plant-derived polyphenols and flavonoids such as quercetin (Puppo, 1992), and the strong potency seen in the butanol extract may be related to its high TPC and TFC contents (Table 1).

In addition, the relative rate constants for the HO^\bullet scavenging by extracts were estimated by determining the slopes of plots of $1/A_{532}$ against concentration in the radiomimetic assay (Fig. 3B). Using that method, a rate constant of $1.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was obtained for mannitol, in agreement with literature data (Halliwell et al., 1987). Thus, the calculated apparent rate constants for butanol extract, AQL and AR fraction were of 11.2×10^9 , 9.5×10^9 and $6.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively.

In a second set of experiments EPR spin-trapping was used as an alternative method to measure HO^\bullet inhibitory activity. Hydroxyl radicals generated in a $\text{Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ system were trapped by the spin trap DMPO to form adducts which can be detected by EPR. The signal is inhibited by HO^\bullet scavengers which compete with DMPO for HO^\bullet . The results confirmed the strong HO^\bullet scavenging activities seen in the deoxyribose radiomimetic assay, with concentration-dependent inhibition of the EPR signals obtained up to 10 mg/mL for each extract. It must be pointed out that in all experiments with the butanol extract no additional signals were detected, e.g., secondary carbon centered adducts arising from the reaction of HO^\bullet with residual *n*-butanol. Using an established methodology (Finkelstein et al., 1980), the apparent rate constants for HO^\bullet scavenging were estimated from the

Table 4

Inhibitory activities against porcine pancreatic α -amylase (PPA) and α -glucosidases from *S. cerevisiae* (SC) and rat intestinal acetone powder (RIP)^a.

Extract or compound	α -amylase (PPA)		α -glucosidase (SC)		α -glucosidase (RIP)	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%) ^b	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%) ^c	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%) ^d
AQL	nm ^e	27.7 \pm 2.4 [*]	nm	34.6 \pm 1.7 [*]	992 \pm 40 [*]	50.5 \pm 1.0 [*]
methanol	nm	35.9 \pm 2.9 [*]	nm	17.7 \pm 3.1 [§]	nm	18.3 \pm 0.1 [§]
ethyl acetate	135.7 \pm 12.4 [§]	89.3 \pm 3.2 [§]	nm	38.3 \pm 6.1 [*]	837 \pm 25 [§]	73.2 \pm 7.8 [*]
<i>n</i> -butanol	254.7 \pm 5.2 [*]	55.2 \pm 1.2 [*]	nm	24.8 \pm 3.1 [*]	561 \pm 53 [*]	64.5 \pm 2.1
acarbose	0.57 \pm 0.03	> 99	114.4 \pm 3.9	63.7 \pm 2.2	18.9 \pm 0.1	62.4 \pm 2.6
luteolin	4.58 \pm 0.52	> 99	8.8 \pm 0.4	84.6 \pm 0.8	nm	17.1 \pm 1.9
myricetin	7.31 \pm 0.54	61.2 \pm 2.8	5.2 \pm 0.4	89.5 \pm 1.6	nm	25.3 \pm 1.1
miglitol	nm	24.9 \pm 4.6	nm	20.6 \pm 2.2	19.6 \pm 0.1	67.3 \pm 1.8
voglibose	nm	23.5 \pm 2.9	nm	12.5 \pm 3.0	0.35 \pm 0.05	70.9 \pm 1.1
metformin	nm	12.8 \pm 1.7	nm	14.3 \pm 2.0	nm	11.2 \pm 0.9

Statistics: The same symbols *, § or ^e indicate that values are significantly different ($P < 0.05$) from others by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test.

^a Values represent the mean \pm SEM of 3-5 independent experiments made in triplicate.

^b Concentrations giving maximal inhibition: extracts, 286 $\mu\text{g/mL}$; acarbose, 6.2 $\mu\text{g/mL}$; luteolin and myricetin, 42 $\mu\text{g/mL}$; miglitol, voglibose and metformin, 62 $\mu\text{g/mL}$.

^c Concentrations giving maximal inhibition: extracts, 1.4 mg/mL; acarbose, 274 $\mu\text{g/mL}$; luteolin and myricetin, 20 $\mu\text{g/mL}$; miglitol, voglibose and metformin, 42 $\mu\text{g/mL}$.

^d Concentrations giving maximal inhibition: extracts, 1.0 mg/mL; acarbose, 93 $\mu\text{g/mL}$; miglitol and voglibose, 3 $\mu\text{g/mL}$; metformin, 42 $\mu\text{g/mL}$.

^e not measurable.

Table 5
Cytotoxicity against human lung cancer cells (A549) and normal fibroblasts (NHFLF).

Extract or compound	MTT		FMCA	
	IC ₅₀ (μg/mL) ^b		IC ₅₀ (μg/mL)	
	A549	NHFLF	A549	NHFLF
AQL	360 ± 12*	270 ± 13*	365 ± 21*	252 ± 6*
methanol	143 ± 2 [§]	35 ± 3 [§]	123 ± 2 [§]	23 ± 1 [§]
ethyl acetate	118 ± 2*	24 ± 1*	108 ± 2*	17 ± 2*
n-butanol	> 400	> 400	> 400	> 400
metformin	> 400	> 400	> 400	> 400

Statistics: The same symbols *, [§] or * indicate that values are significantly different ($P < 0.05$) from others by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test.

^a Values represent the mean ± SEM of 4–8 independent experiments made in triplicate.

^b IC₅₀ is defined as the concentration of sample resulting in 50% cell viability after 48 h and calculated from concentration-response curves.

slopes of the competitive kinetic plots shown in Fig. 3C. Compared to the scavenging potency of the butanol extract, other extracts appeared less efficient in the EPR assay (−62% for AQL and −79% for AR fraction) vs the radiomimetic deoxyribose assay (−15% for AQL and −44% for AR fraction).

3.3. Inhibitory activities against digestive enzymes

The management of postprandial blood glucose levels using carbohydrate-hydrolyzing enzymes inhibitors from natural sources is considered an economically attractive therapeutic approach in the treatment of type 2 diabetes since the use of synthetic drugs is often associated with gastrointestinal adverse effects. Most studies on plant extracts or phytoconstituents that may contribute to diabetes treatment have focused on the inhibition of α -amylase and α -glucosidase, which catalyze carbohydrate digestion into glucose (De Sales et al., 2012; Etxeberria et al., 2012). Several members belonging to the Asteraceae family were proposed as functional antidiabetic agents (Sidhu and Sharma, 2013; Silva et al., 2016), a property associated with the enzyme inhibitory potential of their polyphenolic constituents, particularly flavonoids (Silva et al., 2016).

The inhibitory activities of *A. radiata* extracts against pancreatic α -amylase and two sources of α -glucosidase (SC and RIP) were evaluated. The inhibitors, voglibose, miglitol and acarbose, and the flavonoids of similar structure, luteolin and myricetin, were used as positive controls. Two assays for α -glucosidases were carried out because enzymes from different origins are known to strongly differ in inhibition assays due to their different structure (Oki et al., 1999). Table 4 shows IC₅₀ values and the concentrations of samples associated with the maximum inhibition reached. The α -amylase inhibitory activities decreased among extracts in the following order: ethyl acetate > butanol > methanol = AQL, while the PE extract and AR fraction were inactive (not shown). Interestingly, a stronger inhibition of α -amylase activity was reported for ethyl acetate and butanol vs PE extracts of *Phyllostachys edulis* leaves and the authors concluded that high flavonoids levels contained in polar fractions could act by retarding the enzyme carbohydrate digestion and directly interacting with starch (Yang et al., 2014). The pronounced effects of acarbose and both flavonoids shown in Table 4 were in agreement with previous determinations under similar conditions (Oki et al., 1999; Olaokun et al., 2013; Tadera et al., 2006), and, in connection with the flavonoids constituents of the four active extracts, a good correlation was found between their α -amylase inhibitory capacity and their respective TPC ($r^2 = 0.912$, $P < 0.05$), TFC ($r^2 = 0.973$, $P < 0.01$) and hydroxycinnamic contents ($r^2 = 0.988$, $P < 0.01$).

The SC and RIP α -glucosidase inhibitory activities decreased among extracts in the following order: ethyl acetate = AQL > butanol > methanol, and butanol > ethyl acetate > AQL >> methanol, respectively (Table 4). In both assays the PE extract and AR fraction were again inactive (not shown). In the SC assay, no IC₅₀ was found for either active extract, while acarbose and both flavonoids, but not miglitol and voglibose, showed at least two-fold better efficiencies. In the RIP assay, both flavonoids were low α -glucosidase inhibitors whereas voglibose, miglitol and acarbose showed stronger properties in line with earlier measurements (Oki et al., 1999). Using a SC assay, Silva et al. (2016) reported a strong α -glucosidase SC inhibitory activity for the ethyl acetate extracts of *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae) and identified several active polyphenolic constituents such as quercetin, quercetin-3-methyl ether, luteolin, and caffeoylquinic acid *n*-butyl ester derivatives. However in both α -glucosidase assays performed in the present study, no correlation was found between the inhibition potency and the TPC and TFC of the extracts.

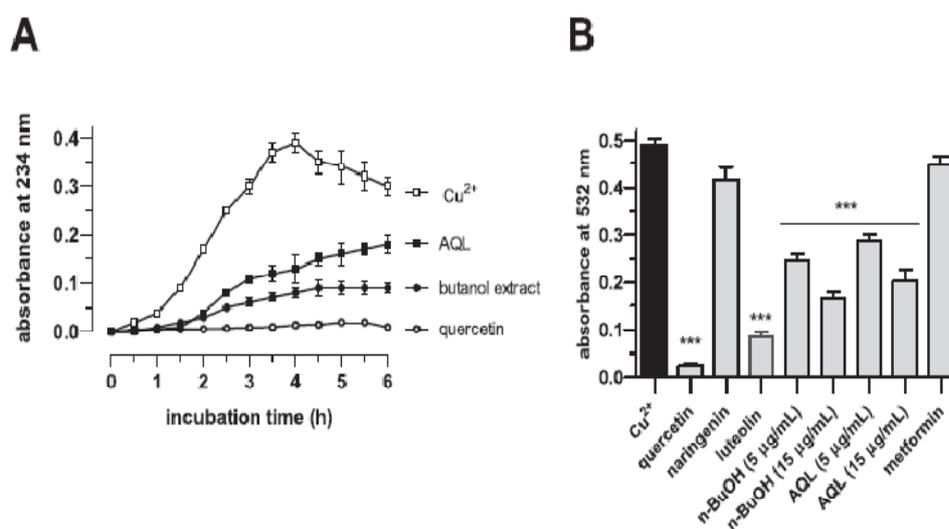


Fig. 4. Oxidation of human LDL (50 μg proteins/mL) upon incubation with CuSO₄ (2 mM) in PBS. (A) Time course of the formation of conjugated dienes in the absence or presence of test compounds (5 μg/mL). (B) TBARS levels after 6 h incubation in the absence or presence of test compounds: quercetin and luteolin (2 μg/mL), naringenin (25 μg/mL), metformin (25 μg/mL) or *A. radiata* extracts (5 or 15 μg/mL). Values represent means ± SEM ($n = 3–6$). Statistics: *** $P < 0.001$ vs Cu²⁺ (control) by one-way ANOVA followed by multiple comparisons tests.

3.4. Cytotoxicity studies

The cytotoxic properties of the four extracts exhibiting the highest activities in antioxidant and enzyme inhibition assays were screened against A549 and NHLF cells by running FMCA and MTT cell viability, and metabolic activity assays. Cells were incubated in DMEM containing 0.2% DMSO as vehicle for 48 h. Prior to experiments it was checked that addition of 0.2% DMSO in culture medium did not induce any loss of viability of confluent cells after incubation for 48 h (not shown). Results showed very low cytotoxic effects from AQL and butanol extract, with IC_{50} values > 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in both cell lines, NHLF being understandably more sensitive (Table 5). Much lesser cell viability was observed for the methanol and ethyl acetate extracts and, for this latter fraction, it can be proposed that cytotoxicity may be related to the

presence of low polar constituents such as flavonoid conjugates, alkaloids, saponins or tannins that can interfere with cell membranes at high concentrations.

Altogether, the more soluble AQL and butanol extract, which demonstrated optimized antioxidant, enzyme inhibitory and low cytotoxic properties comparable with metformin (Table 5), were considered suitable for further in vivo testing.

3.5. Protective effect on LDL oxidation

Oxidative damage of lipid molecules is one of the initial steps in the development of atherosclerosis and cardiovascular diseases caused by hyperlipidemia and its prevention by antioxidants could be an efficient therapeutic approach. Human LDL was oxidized in vitro by copper ions

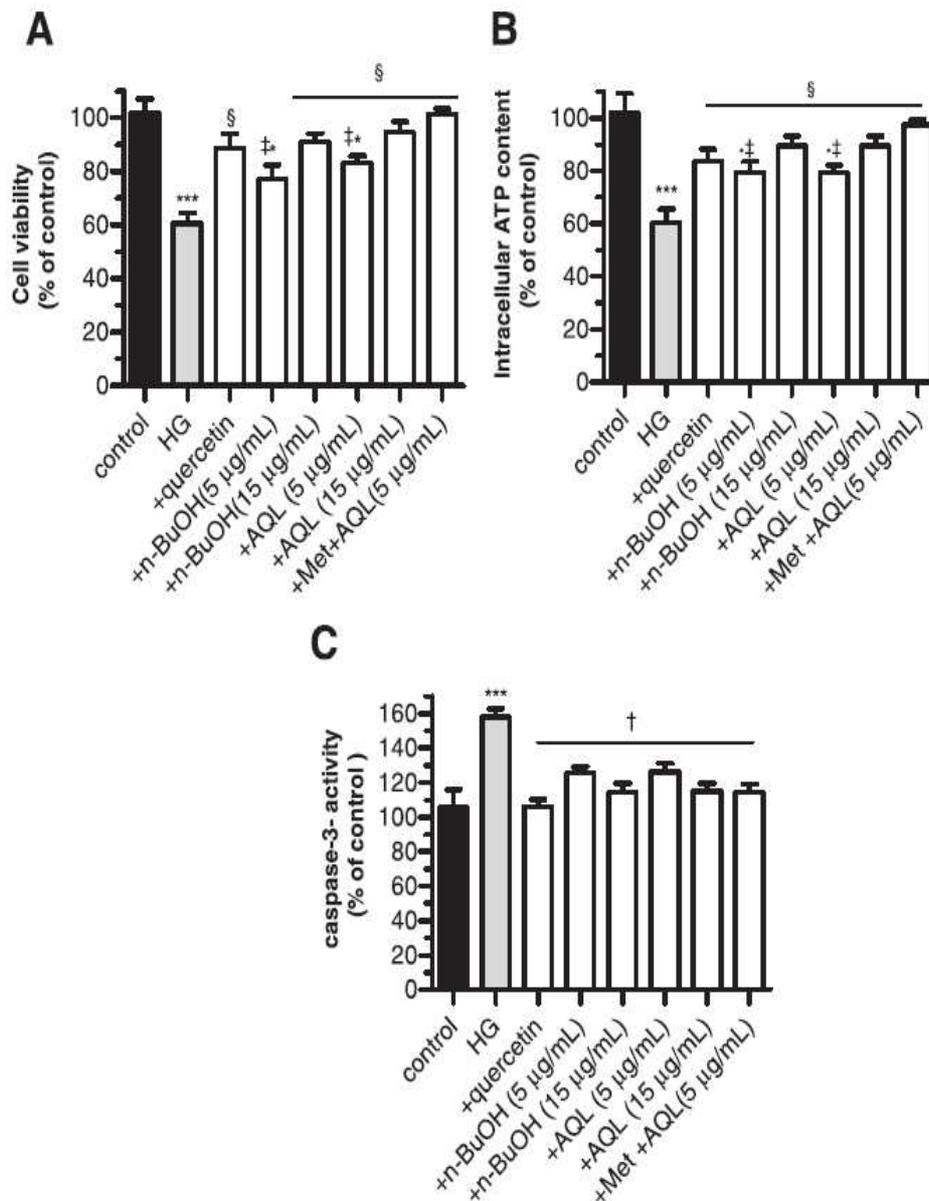


Fig. 5. Protective effect of *A. radiata* extracts against high-glucose induced toxicity in beta-cells. Cell viability and apoptosis were assessed by (A) MTT-based metabolic activity, (B) intracellular ATP content, (C) cytosolic caspase-3 activity. INS-1E cells were incubated in RPMI 1640 medium containing normal glucose (control, 5 mM) or high-glucose (HG, 25 mM) concentration for 84 h in the absence or presence of test compounds: quercetin (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AQL and butanol extract (5 or 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or [Met+AQL] (at 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). Statistics: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ vs control, $^{\ddagger}P < 0.01$ and $^{\ddagger\ddagger}P < 0.001$ vs HG and $^{\dagger}P < 0.05$ vs [Met+AQL], by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons tests.

in the presence of 5–30 $\mu\text{g/mL}$ of AQL, butanol extract or metformin, and the degree of LDL oxidation was assessed by monitoring the production of conjugated dienes (at 234 nm) for 6 h at 37 °C and TBARS formation (at 532 nm) immediately after incubation. Both extracts, at 5 $\mu\text{g/mL}$, but not metformin, significantly inhibited conjugated diene formation relative to LDL oxidized without extract ($P < 0.05$ by two-way ANOVA), and the kinetic profiles indicated a delayed lag time (> 4 h) for maximal diene formation that peaked at 4 h in the control (Fig. 4A). Relative to the control LDL oxidation TBARS levels were significantly decreased by AQL and butanol extract in a concentration-dependent manner (Fig. 4B), with IC_{50} values of 7.1 $\mu\text{g/mL}$ and 4.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In these experiments the flavonoids quercetin ($\text{IC}_{50} = 0.32$ $\mu\text{g/mL}$) and luteolin ($\text{IC}_{50} = 0.98$ $\mu\text{g/mL}$), but not naringenin were more potent inhibitors, in line with literature data (Miranda et al., 2000). Again, metformin was ineffective as antioxidant in reducing LDL oxidation as compared to extracts.

3.6. Protective effect on cultured rat pancreatic beta-cells in high-glucose conditions

It was evaluated whether AQL and butanol extract may promote

viability and metabolic activity of rat INS-1E beta-cells exposed to hyperglycemic medium mimicking diabetes conditions. As expected, both cell viability and metabolic activity were significantly reduced to ~50% of control values when beta-cells were exposed for 84 h to high glucose (Fig. 5A and B). Cells exposed to the highest glucose concentration of 25 mM were apoptotic as evidenced by a ~1.5-fold enhancement of caspase-3 activity vs normal conditions (Fig. 5C). Hyperglycemia-induced cell damage was dose-dependently prevented by application of 1–15 $\mu\text{g/mL}$ of each extract (Fig. 5) suggesting that they can be effective as anti-apoptotic and protective agents at doses compatible with plasma concentrations as low as 5 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, these effects of extracts were comparable to that of 3 $\mu\text{g/mL}$ quercetin, suggesting that the phenolic fraction of the extract could be central to the protective activity.

Although data in Tables 2 and 3 are compatible with a poor antioxidative and scavenging property for metformin it yet exerted protective effect on beta cells at 2 $\mu\text{g/mL}$, possibly by correcting abnormalities of intracellular calcium metabolism in insulin-sensitive tissues (Violet et al., 2012). Interestingly, adding 5 $\mu\text{g/mL}$ of AQL strongly enhanced this protective effect of metformin on beta-cell survival (Fig. 5).

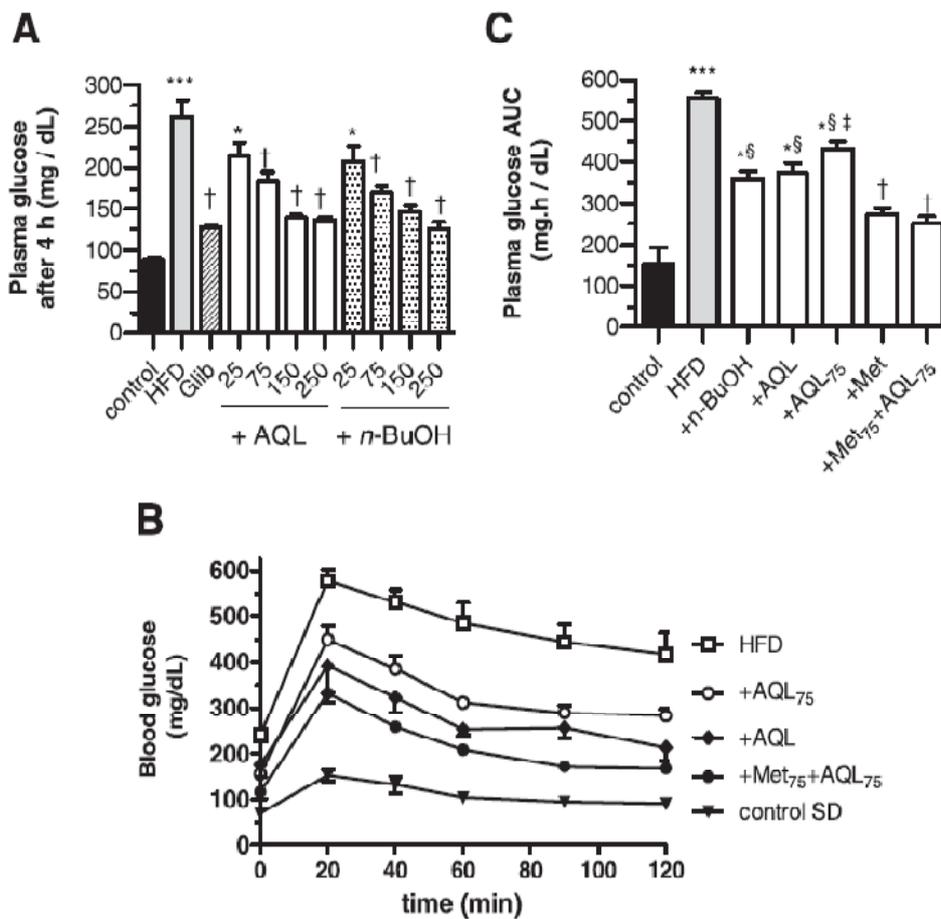


Fig. 6. Acute hypoglycemic effect and oral glucose tolerance test (OGTT) in mice given *A. radiata* extracts. (A) Blood glucose levels after dose-response acute oral treatment (B) Blood glucose levels during OGTT. (C) Area under the curve of blood glucose levels during OGTT. Treatments: control, mice fed with standard diet; HFD, mice on high-fat-diet for 28 weeks; +n-BuOH, mice on HFD for 16 weeks, followed by HFD + butanol extract (150 mg/kg) for 12 weeks; +AQL, mice on HFD for 16 weeks, followed by HFD + AQL (150 mg/kg) for 12 weeks; +AQL₇₅, mice on HFD for 16 weeks, followed by HFD + AQL (75 mg/kg) for 12 weeks; +Met, mice on HFD for 16 weeks, followed by HFD + metformin (150 mg/kg) for 12 weeks; +Met₇₅+AQL₇₅, mice on HFD for 16 weeks, followed by HFD + [metformin + AQL] (both at 75 mg/kg) for 12 weeks. Statistics: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs control; [§] $P < 0.01$ and [‡] $P < 0.001$ vs HFD and [†] $P < 0.05$ vs [Met₇₅+AQL₇₅] group, by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons tests.

3.7. Acute oral toxicity of extracts on C57BL/6 J mice

Since none of the animals receiving orally 2000 mg/kg of AQL or butanol extract died up to 10 days, and did not show any signs of pain, distress and suffering, it was considered that the LD₅₀ is ≥ 4000 mg/kg in both cases. According to Yamanaka et al. (2010), extracts with such low toxicity would not require further testing for lethal effects. Therefore, next pharmacological investigations were carried out using the non toxic dose window of 25–250 mg/kg of body weight, which is relevant to the use of the plant in traditional medicine (Ghourri et al., 2013).

3.8. Antidiabetic effect on high-fat-fed C57BL/6 J mice

The potential of plants exerting hypoglycemic and/or insulin mimetic activities to be developed as natural antidiabetics is increasingly exploited. Their biological activity relies on different mechanisms, including inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes, inhibition of renal glucose reabsorption, insulin secretion stimulation or insulin resistance reduction, increase of the number and the size of cells in the islets of Langerhans, inhibition of glucose production and upregulation of glucose transporters or antioxidant activity (Rios et al., 2015). Although *A. radiata* has been part for a long time of Saharian traditional medicine to treat hyperglycemic related diseases (Bnouham et al., 2006; Hammiche and Maiza, 2006; Ghourri et al., 2013), little is known so far about the usefulness of the plant in treating experimental diabetes. Given the strong antioxidant, radical scavenging, enzyme inhibitory properties and protective activity on lipoproteins and pancreatic cells of AQL and butanol extract established above, their in vivo potential was investigated in HFD-fed C57BL/6 J mice to determine (i) their dose-response acute hypoglycemic activity in blood within 4 h, and (ii) their anti-hyperglycemic and antidiabetic activity after long-term oral treatment, with the purpose to delineate the underlying mechanisms.

3.8.1. Acute hypoglycemic activity of extracts: dose determination study

Mice on HFD for 16 weeks were given the extracts orally at 25, 75, 150 and 250 mg/kg or 15 mg/kg glibenclamide and blood glucose levels were monitored up to 4 h post treatment. The two extracts showed a potent hypoglycemic property reaching a maximum at 150 mg/kg, with an effect comparable to that of glibenclamide at the dose of 15 mg/kg (Fig. 6A). Therefore, 150 mg/kg was selected for the long term in vivo studies on *A. radiata* extracts.

3.8.2. Long-term study on diabetic mice: food intake, body weight and body fat pad weight

At the onset of treatments the mean body weight was of 17.1 ± 1.1 g ($n = 84$). Table 6 shows that, after 28 weeks, the animals from the HFD group showed significant higher weight gain (+242%, corresponding to 0.85 g/week) compared to the control SD group (+175%, corresponding to 0.45 g/week). Once the obesity induction was characterized at 16 weeks, i.e., the mean weights were 30.7 ± 0.2 g in the HFD group and 22.5 ± 0.1 g in the SD group, five sub-groups of animals from the HFD group were distributed into the [HFD+AQL], [HFD+AQL₇₅], [HFD+n-BuOH], [HFD+Met] and [HFD+Met₇₅+AQL₇₅] groups and were additionally fed 150 mg/kg body weight of the corresponding test compound for the remaining 12 weeks with the exception of [HFD+AQL₇₅] and [HFD+Met₇₅+AQL₇₅] groups where the doses of AQL and Met were of 75 mg/kg. While in this period the HFD group continued showing higher body weight compared to SD group, the trend was significantly prevented in 150 mg/kg-treated groups, with comparable final weight gains of +200%, +198% and +199% in the [HFD+AQL], [HFD+n-BuOH] and [HFD+Met] groups, respectively (corresponding to -0.65 g/week in both groups; Table 6). At the lowest dose of 75 mg/kg, AQL still prevented the development of obesity (+206%) and adding metformin even improved the weight reduction (+191% in the [Met₇₅+AQL₇₅] group). At the end of treatment, the body fat mass percentage was of 10% in SD group, which strongly increased to 22% in HFD group, significantly decreased to only 12% in the [HFD+n-BuOH] and [HFD+Met₇₅+AQL₇₅] groups and remained within 14–16% in the other treated groups. As no

Table 6
Antidiabetic, antioxidant and anti-inflammatory effects of treatments in C57BL/6 J mice^a.

Parameters	Experimental groups ^b						
	Control SD	HFD	[HFD+AQL]	[HFD+AQL ₇₅]	[HFD+n-BuOH]	[HFD+Met]	[HFD+Met ₇₅ +AQL ₇₅]
Body weight (g)	29.8 ± 0.8	41.9 ± 1.0**	34.8 ± 0.9*	35.8 ± 1.0**	33.6 ± 0.9*	33.9 ± 0.4*	31.7 ± 0.7 [†]
Food intake (g) ^c	286 ± 6	279 ± 12	281 ± 9	282 ± 4	285 ± 8	283 ± 1	285 ± 3
Total fat mass (g)	2.91 ± 0.03	8.99 ± 0.12*	4.87 ± 0.04* [‡]	5.31 ± 0.08* [‡]	4.07 ± 0.18* [†]	4.61 ± 0.07* [‡]	3.71 ± 0.06 [†]
Glucose (mg/dL)	85.9 ± 1.3	260.4 ± 7.4***	135.7 ± 4.4** [†]	143.5 ± 3.8**	137.0 ± 19.8* [†]	124.2 ± 2.5* [†]	107.5 ± 2.3 [†]
Insulin (ng/mL)	1.8 ± 0.2	4.8 ± 0.5***	3.1 ± 0.4 [†]	3.3 ± 0.3* [†]	2.7 ± 0.2 [†]	2.5 ± 0.3 [†]	2.2 ± 0.2 [†]
HbA _{1c} (%) ^d	5.1 ± 0.1	8.6 ± 0.3***	5.9 ± 0.3 [†]	6.3 ± 0.2* [†]	5.8 ± 0.1 [†]	5.8 ± 0.2 [†]	5.3 ± 0.2 [†]
Leptin (ng/mL)	7.1 ± 1.2	36.8 ± 2.3***	15.8 ± 1.3* [†]	18.7 ± 1.7* [†]	15.3 ± 2.2 [†]	24.0 ± 1.9* [†]	14.3 ± 1.1 [†]
T-cholesterol (mg/dL)	53.8 ± 5.8	115.8 ± 6.5***	76.8 ± 1.2* [†]	88.0 ± 3.8* [‡]	67.8 ± 2.3 [†]	85.4 ± 3.7* [†]	80.1 ± 3.9* [†]
Triglycerides (mg/dL)	64.9 ± 2.1	111.7 ± 9.5***	82.1 ± 5.1 [†]	89.8 ± 3.9* [‡]	69.8 ± 3.6 [†]	78.3 ± 2.2 [†]	72.7 ± 3.9 [†]
Triglycerides in liver tissue (mg/g)	0.69 ± 0.04	6.96 ± 1.00***	2.59 ± 0.45 [†]	2.93 ± 0.31* [‡]	1.99 ± 0.29 [†]	2.09 ± 0.23 [†]	1.71 ± 0.24 [†]
Glycogen in liver tissue (mg/100 g)	49.2 ± 2.9	19.1 ± 2.9**	38.3 ± 3.5 [†]	35.4 ± 6.1* [‡]	31.4 ± 6.1* [‡]	40.3 ± 3.5 [‡]	45.3 ± 4.1 [†]
GSH/GSSG	3.01 ± 0.07	2.08 ± 0.16***	2.99 ± 0.05 [†]	2.68 ± 0.09 [‡]	2.65 ± 0.16 [‡]	2.19 ± 0.11* [†]	3.12 ± 0.08 [†]
PC (nmol/mg proteins)	0.99 ± 0.11	1.67 ± 0.12***	1.18 ± 0.12 [‡]	1.26 ± 0.11 [‡]	1.23 ± 0.10 [‡]	1.48 ± 0.05 [†]	1.09 ± 0.03 [†]
IL-6 (pg/mL)	9.9 ± 1.0	23.1 ± 0.9**	14.0 ± 1.9 [†]	16.6 ± 2.1* [†]	14.6 ± 2.0 [†]	16.9 ± 1.3* [†]	12.1 ± 1.0 [†]
MCP-1 (pg/mL)	48.2 ± 5.3	55.7 ± 4.4	45.3 ± 7.2	51.0 ± 5.1	56.0 ± 8.1	48.3 ± 2.2	50.0 ± 4.1
TNF-α (pg/mL)	43.5 ± 1.9	87.3 ± 4.9**	56.3 ± 3.5 [†]	61.4 ± 6.1* [‡]	65.4 ± 6.1* [‡]	59.9 ± 6.3 [†]	51.4 ± 6.1 [‡]

Statistics: Values are significantly different from controls (*P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001), HFD ([‡]P < 0.05 and [†]P < 0.001) and [†]P < 0.05 vs [Met₇₅+AQL₇₅], by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

^a Values represent the mean ± SEM of 6–12 independent experiments made in triplicate. Assays were performed in blood plasma unless otherwise noted.

^b Groups and treatments: SD, control mice fed a standard diet; HFD, mice fed a high-fat diet (60% fat); AQL, lyophilized aqueous extract; n-BuOH, butanol extract; Met, metformin. Extracts and metformin were administered at 150 mg/kg/day for 12 weeks consecutive to an HFD induction of 16 weeks, except for groups with AQL₇₅ and Met₇₅ for which the doses were 75 mg/kg/day.

^c Average food consumed per mouse pooled over 12 weeks.

^d Abbreviations: HbA_{1c}, glycosylated hemoglobin; T-cholesterol, total cholesterol; GSH/GSSG, ratio of reduced-to-oxidized glutathione; PC, protein carbonyls; IL-6, interleukin-6; MCP-1, monocyte-chemoattractant protein 1; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

changes among groups were seen concerning food intake (Table 6), the difference in caloric intake in the HFD group (i.e., -1.5-fold vs SD group) is likely responsible for the observed gain in body and fat mass. Results in the HFD group were in accordance with previous reports on the susceptibility of the C57BL/6 J strain to develop hyperglycemia, hyperinsulinemia and obesity when administered HFD containing 30–60% fat. These characteristics have been reported appropriate to investigations of curative action of traditional medicines in type 2, insulin resistant diabetes (Gallou-Kabani et al., 2007; Yokota et al., 2009; Hamza et al., 2012). Thus, it was concluded that the two tested extracts could significantly lower HFD-induced increase in body weight and adiposity without affecting the caloric intake.

3.8.3. Effect on blood glucose and insulin, glucose tolerance, hemoglobin glycation, hyperleptinemia and hyperlipidemia

At the onset of treatments the baseline levels of fasting glucose and insulin were of 80.4–82.6 mg/dL and 1.2–1.6 ng/mL, respectively, increasing by ~300% and ~270%, respectively at week 28 in HFD mice. Treatment with AQL or butanol extract at the dose of 150 mg/kg and, to a lesser extent with 75 mg/kg of AQL, significantly reduced blood glucose and moderated hyperinsulinemia as compared to the HFD group. Expectedly, the insulin-sensitizing agent metformin showed potent antihyperglycemic properties at 150 mg/kg, with a slightly better, yet not significant hypoglycemic effect vs AQL and butanol extract at the same dose (Table 6). Compared to SD mice, animals on HFD developed type 2 diabetes with characteristics of insulin resistance as indicated by the OGTT assay. The sustained blood glucose level seen at 90 min was significantly reduced by treatment with either AQL alone (150 mg/kg) or a mixture of metformin and AQL (both at 75 mg/kg) in a dose-dependent manner (Fig. 6B). Improvement of the overall glucose exposure in groups supplemented by AQL and butanol extract was evaluated by calculating the AUC which decreased by 34%, 33%, 22%, 48% and 55% in the AQL, butanol (both at 150 mg/kg), AQL₇₅, Met (at 150 mg/kg) and [Met₇₅+AQL₇₅] groups, respectively (Fig. 6C).

As shown in Table 6, the HbA_{1c} content of the HFD group is significantly ($P < 0.001$) increased compared to the SD group, as a consequence of long-term high levels of circulating glucose that reacts with hemoglobin and other proteins. All treatments significantly decreased the HbA_{1c} level towards control value, with a better efficacy

exhibited by the combination of AQL and metformin (both at 75 mg/kg), an effect consistent with the improved property of this mixture in blood glucose and hyperinsulinemia normalization (Fig. 6B and C).

Further, data in Table 6 also revealed that treatments significantly improved lipid metabolism and accumulation in diabetic mice. Hyperleptinemia was reduced by 34.8–61.1%, circulating levels of cholesterol and triglycerides decreased by 24.0–41.5% and 19.6–37.5%, respectively, and triglycerides accumulation in liver tissue were dramatically reduced by 57.9–75.4%. It is noteworthy that treatments based on AQL or butanol extract both strongly decreased adipose tissue mass and brought cholesterol and triglycerides levels close to normal values, suggesting that they may exert a lipolytic and/or antiadipogenic activity. In medicinal plants, improved anti-obesity and anti-dyslipidemia efficacy has been linked to a high content of hydroxycinnamic acid derivatives (Alam et al., 2016), a feature of the butanol extract developed here (Table 1).

Last, the liver glycogen content of HFD mice was significantly ($P < 0.01$) depleted compared to the SD group (Table 6), revealing an increase in gluconeogenic enzymes activities due to the altered action of insulin. All treatments and metformin strongly protected liver glycogen loss, a result that could be related to the ability of the antidiabetic drug to reduce hepatic gluconeogenesis, and improve glucose uptake and pancreatic islet cells protection (Violet et al., 2012). This hypothesis appears confirmed for AQL and butanol extract owing to the results of the study on beta-cells (Fig. 5).

3.8.4. Oxidative stress markers and inflammatory cytokines levels

There is a consensus that chronic hyperglycemia in type 2 diabetic subjects induces a cascade of pathological events, including ROS formation, antioxidant consumption, increased lipid peroxidation, protein oxidation and beta-cells dysfunction (Giacco and Brownlee, 2010; Meigs, 2010). Such increased oxidative stress status was detected in the HFD group which demonstrated ~30% lowered blood GSH/GSSG levels and ~70% increased formation of plasma protein carbonyls when compared to the SD group. Both *A. radiata* treatments quite completely (for the ratio of reduced to oxidized glutathione) or partly (protein oxidation) restored the normal levels (Table 6), suggesting the involvement of antioxidant mechanisms such as those found in vitro (Tables 2 and 3). Clinical studies reported a good correlation between elevated protein carbonyls levels and poor glycemic control (i.e., when

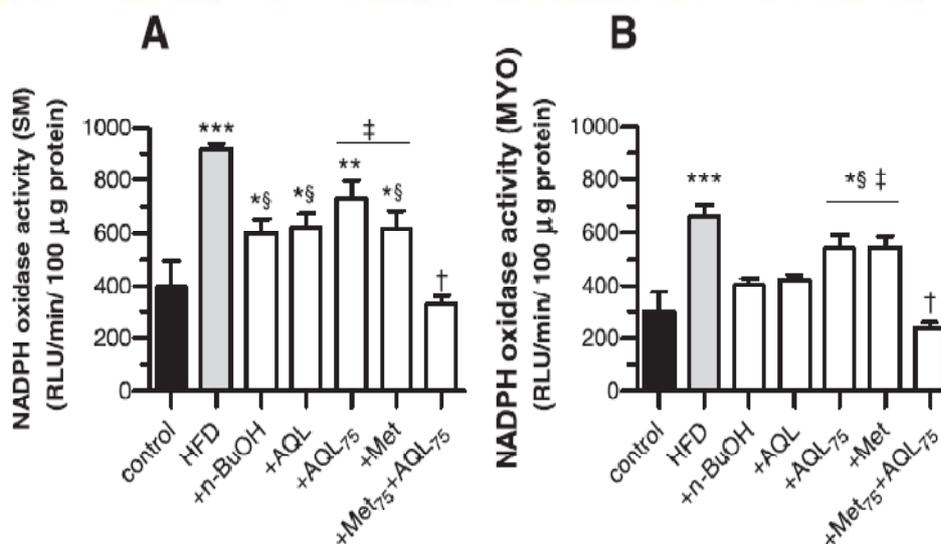


Fig. 7. NADPH oxidase activity in (A) hindlimb skeletal muscle and (B) myocardial homogenates of mice on HFD diet treated with *A. radiata* extracts. Treatments: see legend of Fig. 6. Statistics: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs control; † $P < 0.01$ and ‡ $P < 0.001$ vs HFD and § $P < 0.05$ vs [Met₇₅+AQL₇₅] group, by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons tests.

Hb_{AC1} > 7), GSH depletion, impaired trace elements status and lipid peroxidation (Whiting et al., 2008). Although 150 mg/kg of metformin produced substantial reduction in hyperglycemia and Hb_{AC1c}, it did not significantly affect oxidative stress markers as provided by *A. radiata* extracts at the same dose (Table 6). As in the cell study, a synergistic effect of metformin with 75 mg/kg of AQL led to a normalization of blood GSH/GSSG ratio and protein carbonyls level.

Diabetes-associated oxidative stress adversely affects (i) myocardial function and structure, leading to diabetic cardiomyopathy and heart failure, and (ii) skeletal muscle mitochondrial respiration, causing impaired tolerance to exercise (Yokota et al., 2009; Meigs, 2010). In particular, O₂^{•-} release consecutive to NADPH oxidase activation has been incriminated as a trigger of diabetes-induced cardiovascular and skeletal muscle pathophysiology because high levels of glucose, fatty acids or insulin are responsible for mitochondrial damage and impaired contractile capacity in muscle cells (Yokota et al., 2009; Meigs, 2010).

In accordance, the myocardium and hindlimb muscle of mice on HFD for 28 weeks exhibited a strong increase in NADPH oxidase activity as detected by lucigenin luminescence (Fig. 7), which was abolished when tissue was treated with the NADPH inhibitor DPI or O₂^{•-} scavenger Tiron (data not shown). This NADPH-dependent O₂^{•-} production in both types of tissues of diabetic animals was strongly limited by treatment with 150 mg/kg of each extract or metformin, the latter being significantly less active in the myocardium (Fig. 7B). A dose-dependent effect was found when the AQL dose was lowered to 75 mg/kg and again a better overall response was obtained in the [Met₇₅+AQL₇₅] vs AQL₇₅ groups.

Another feature of metabolic syndrome associated with obesity is the establishment of a chronic, mild inflammatory state, with the release of inflammatory mediators that could play a crucial role in insulin resistance (Akash et al., 2013). Table 6 shows that both levels of cytokines IL-6 and TNF- α , but not MCP-1, were strongly altered in 28 weeks-HFD group mice. Of the tested extracts AQL demonstrated a slightly higher anti-inflammatory activity characterized by a better action on TNF- α . Recent studies have reported that plant extracts may serve as dual hypoglycemic and anti-inflammatory material (Heyman et al., 2014), or could be used as hypolipidemic treatments possibly acting on cellular pathways involved in adipogenesis expression (Lee et al., 2014).

4. Conclusion

In summary, this is the first study to rationalize the traditional use of *Anvillea radiata* for the treatment of hyperglycemia and diabetic complications. Lyophilized aqueous and butanol extracts of the aerial parts of the plant demonstrated strong antihyperglycemic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory activity, and delayed oxidative stress induced-myocardial and muscle damage C57BL/6J mice selected because they undergo type 2 diabetes similar to humans upon high-fat diet (Fröde and Medeiros, 2008). Since this genetically modified animal model has some limitations, additional in vitro studies were performed to investigate complementary potential molecular mechanisms of action that may support the effectiveness of the plant in humans. Among them, inhibition of α -amylase and α -glucosidase, antioxidant and free radical scavenging, and protection of pancreatic beta-cells were identified. The two extracts also exhibited strong insulin sensitizing effects comparable to that of metformin. The current results will be useful for assessing the benefit of *A. radiata* extracts in the treatment of diabetic neuropathy, a major complication associated with mitochondrial dysfunction, oxidative stress and inflammatory mediated damage in neurons and glial cells (Sandireddy et al., 2014; Singh et al., 2013). To this purpose, more specific protocols allowing the monitoring of peripheral nerve conduction velocity and injury are available (Yadav et al., 2014; Yang et al., 2015). More generally, it is believed that *A. radiata*-derived material is particularly suitable for

developing a nutraceutical for the management of type 2 diabetes and obesity or for add-on therapy with metformin.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgments

The study was supported by grants from the CNRS (UMR7273) and Aix Marseille University. The in vivo part of the study was supported by grants from the FEDER project AdiaBaOx (Région PACA, 2008–2012). C.K. gratefully acknowledges the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (Algérie) for grants (P.N.E. 2014–2016). The authors acknowledge N. Vidal and C. Arzouyan for their valuable assistance.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jep.2017.06.042.

References

- Akash, M.S., Rehman, K., Chen, S., 2013. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Cell. Biochem.* 114, 525–531.
- Alam, A., Subhan, N., Hossain, M., Reza, H.M., Rahman, M., Ullah, O., 2016. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr. Metab.* 19, 209–215.
- Alencar, J., Gosset, G., Rahmouni, H., Culcasi, M., Robin, M., Reynier, J.P., Piccerelle, P., Pietri, S., 2008. Development of spray- and freeze-dried high-concentration sesamol emulsions and antioxidant evaluation in fibroblasts and UV-exposed rat skin slices. *Drug Dev. Res.* 69, 251–266.
- Alencar, J., Gosset, G., Robin, M., Pique, V., Culcasi, M., Mercier, A., Pietri, S., 2009. Improving the stability and antioxidant properties of sesame oil: water-soluble spray-dried emulsions from new transesterified phenolic derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7311–7323.
- Alav, P., Taskovska, I., Pajeva, I., 2015. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 85–104.
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A.C., Shahidi, F., 2016. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.* 64, 6584–6604.
- Aruoma, O.I., Grootveld, M., Halliwell, B., 1987. The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with a site-specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule. *J. Inorg. Biochem.* 29, 289–299.
- Bailey, C.J., Day, C., 1989. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 12, 553–564.
- Bailey, D.M., Lundy, C., Berg, R.M.G., Taudorf, S., Rahmouni, H., Gutowski, M., Mulholland, C.W., Sullivan, J.L., Swenson, E.R., McEnery, J., Young, L.S., Pedersen, B.K., Moller, K., Pietri, S., Culcasi, M., 2014. On the antioxidant properties of erythropoietin and its association with the oxidative-nitrosative stress response to hypoxia in humans. *Acta Physiol.* 212, 175–187.
- Bammou, M., Sellam, K., El Rhaffari, L., 2015. Bioactivity of *Anvillea radiata* Coss & Dur. collected from the southeast of Morocco. *Eur. Sci. J.* 11 (21), 233–244.
- Benhamou, N., Belkara, F.A., Panovska, T.K., 2009. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chim.* 12, 1259–1266.
- Bnouham, M., Ziyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A., 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity. A review of ten years of herbal medicine research (1990–2000). *Int. J. Diabetes Metabol.* 14, 1–25.
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., 2013. Herbalist and wild medicinal plants in MSila (North Algeria): an ethnopharmacology survey. *J. Ethnopharmacol.* 148, 395–402.
- Boukhris, M.A., Destandau, E., El Hakmaoui, A., El Rhaffari, L., Elfakir, C.A., 2016. Dereplication strategy for the identification of new phenolic compounds from *Anvillea radiata* (Coss. & Durieu). *C. R. Chim.* 19, 1124–1132.
- Cassien, M., Petrocchi, C., Thétot-Laurent, S., Robin, M., Riquebourg, E., Kandouli, C., Asteian, A., Rockenbauer, A., Mercier, A., Culcasi, M., Pietri, S., 2016. On the vasoprotective mechanisms underlying novel β -phosphorylated nitrones: focus on free radical characterization, scavenging and NO-donation in a biological model of oxidative stress. *Eur. J. Med. Chem.* 25, 197–217.
- Cos, P., Ying, L., Colomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61, 71–76.
- Culcasi, M., Benameur, L., Mercier, A., Lucchesi, C., Rahmouni, H., Asteian, A., Casano, G., Botta, A., Kovacic, H., Pietri, S., 2012. ESR spin trapping evaluation of ROS

- production in human fibroblasts exposed to cerium oxide nanoparticles: evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation. *Chem. Biol. Interact.* 199, 161–176.
- Daneshfar, A., Ghaziaskar, H.S., Homayoun, N., 2008. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *J. Chem. Eng. Data* 53, 776–778.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 52, 48–54.
- Del Rio, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1818–1892.
- Dendougui, H., Jay, M., Benayache, F., Benayache, S., 2006. Flavonoids from *Anuileia radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 718–720.
- De Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Silveira, D., 2012. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 15, 141–183.
- Destandau, E., Boukhris, M.A., Zabrzycy, S., Akssira, M., El Rhaflari, L., Efkir, C., 2015. Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactone and flavonoids from *Anuileia radiata*. *J. Chromatogr. B* 985, 29–37.
- Dey, P., Saha, M.R., Chowdhuri, S.R., Sen, A., Sarkar, M.P., Haldar, B., Chaudhuri, T.K., 2015. Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant *Nerium oleander* through alloxan induced diabetes in mice. *J. Ethnopharmacol.* 161, 128–137.
- Etxeberria, U., de la Garza, A.L., Campión, J., Martínez, J.A., Milagro, F.I., 2012. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic α amylase. *Exp. Opin. Ther. Targets* 16, 269–297.
- Fakchich, J., Elachouri, M., 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmacol.* 154, 76–87.
- Finkelstein, E., Rosen, G.M., Rauckman, E.J., 1980. Spin trapping. kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4994–4999.
- Foti, M.C., 2015. Use and abuse of the DPPH• radical. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8765–8776.
- Fröde, T.S., Medeiros, Y.S., 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J. Ethnopharmacol.* 115, 173–183.
- Gallou-Kabani, C., Vigé, A., Gross, M.S., Rabès, J.P., Boileau, C., Larue-Achagiotis, C., Tomé, D., Jaïs, J.P., Junien, C., 2007. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity* 15, 1996–2005.
- Gella, F.J., Gubern, G., Vidal, R., Canalias, F., 1997. Determination of total and pancreatic α -amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriose as substrate. *Clin. Chim. Acta* 259, 147–160.
- Ghourri, M., Zidane, L., Douira, A., 2013. Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Sahara marocain (Tan-Tan). *J. Anim. Plant Sci.* 17, 2388–2411.
- Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107, 1058–1070.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Asp. Med.* 27, 1–93.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C., Aruoma, O.I., 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165, 215–219.
- Hamada, D., Ladjel, S., 2015. Chemical composition, in-vitro anti-microbial and antioxidant activities of the methanolic extract of *Anuileia radiata* Asteraceae. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 6, 1367–1373.
- Hammiche, V., Maiza, K., 2006. Traditional medicine in central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 105, 358–367.
- Hamza, N., Berke, B., Cheze, C., Le Garrec, R., Umar, A., Agü, A.N., Lassalle, R., Jové, J., Gin, H., Moore, N., 2012. Preventive and curative effect of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds in C57BL/6J models of type 2 diabetes induced by high-fat diet. *J. Ethnopharmacol.* 142, 516–522.
- Heyman, L., Axling, U., Blanco, N., Sterner, O., Holm, C., Berger, K., 2014. Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice. *J. Nutr. Metab.* 1–12.
- Jing, L., Ma, H., Fan, P., Gao, R., Jia, Z., 2015. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 15 (287), 1–12.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linsen, J.P., de Groot, A., Evtatieva, L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 13, 8–17.
- Lakhdar, M., Kaid Harche, M., Larbi, B., Sarhani, A., 2013. Phytochemical analysis and antifungal activity of *Anuileia radiata*. *World Appl. Sci. J.* 26, 165–171.
- Lee, I.S., Kim, D.Y., Choi, B.Y., 2014. Antioxidative activity of blueberry leaf extract prevents high-fat induced obesity in C57BL/6 mice. *J. Cancer Prev.* 19, 209–215.
- Lesgards, J.F., Baldovini, N., Vidal, N., Pietri, S., 2014. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother. Res.* 28, 1423–1446.
- Liu, Y., Guo, M., 2015. Studies on transition metal-querceetin complexes using electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Molecules* 20, 8582–8594.
- Meigs, J.B., 2010. Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention. *Diabetes Care* 33, 1865–1871.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C.B., Maechler, P., 2004. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-years continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 48, 3876–3884.
- Miranda, C.L., Stevens, J.F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M.L., Buhler, D.R., 2000. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3876–3884.
- Moumou, M., El Bouakher, A., Allouchi, H., El Halkmaoui, A., Benharref, A., Mathieu, V., Guillaumet, G., Akssira, M., 2014. Synthesis and biological evaluation of 9 α - and 9 β -hydroxyamino-parthenolides as novel anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 4014–4018.
- Okii, T., Matsui, T., Osajima, Y., 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 550–553.
- Olankau, O.O., McGaw, L.J., Eloff, J.N., Naidoo, V., 2013. Evaluation of the inhibition of carbohydrate hydrolysing enzymes, antioxidant activity and polyphenolic content of extracts of ten African *Ficus* species (Moraceae) used traditionally to treat diabetes. *BMC Complement. Altern. Med.* 13 (94), 1–10.
- Ordonez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A., Isla, M.I., 2006. Antioxidant activities of *Sachium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem.* 97, 452–458.
- Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K., Culcasi, M., 1997. Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extracts (Egb 761). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 733–742.
- Puppo, A., 1992. Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry* 31, 85–88.
- Rios, J.L., Francini, F., Schinella, G.R., 2015. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Planta Med.* 81, 975–994.
- Sanchez-Moreno, C., Larruri, J.A., Saura-Calixto, F.A., 1998. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270–276.
- Sandireddy, R., Yerra, V.G., Areti, A., Komiribetty, P., Kumar, A., 2014. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *Int. J. Endocrinol.* 2014, 1–10.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A., 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* 9, 147–170.
- Sikhu, M.C., Sharma, T., 2013. A database of antidiabetic plant species of family Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae and Moraceae. *Int. J. Herb. Med.* 2, 187–199.
- Silva, E.L., Reveredo Lobo, J.F., Vinther, J.M., Borges, R.M., Staerk, D., 2016. High-resolution α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE NMR for identification of antidiabetic compounds in *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae). *Molecules* 21, 782–793.
- Singh, R., Kaur, R., Kishore, L., Gupta, G.K., 2013. Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. *J. Ethnopharmacol.* 150, 51–70.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.
- Stocker, P., Riequebourg, E., Vidal, N., Villard, C., Lafitte, D., Sellami, L., Pietri, S., 2015. Fluorimetric screening assay for protein carbonyl evaluation in biological samples. *Anal. Biochem.* 482, 55–61.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T., 2006. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52, 149–153.
- Violet, B., Guigas, B., Garcia, N.S., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. (Lond.)* 122, 253–270.
- Whiting, P.H., Kalanooriya, A., Holbrook, L., Haddad, F., Jennings, P.E., 2008. The relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Br. J. Biomed. Sci.* 65, 71–74.
- Yadav, S.P., Nagori, B.P., Desai, P.K., 2014. Pharmacological characterization of different fractions of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in streptozotocin induced experimental model of diabetic neuropathy. *J. Ethnopharmacol.* 152, 349–357.
- Yamanaka, S., Hashimoto, M., Tobe, M., Kobayashi, K., Sekizawa, J., Nishimura, M., 1990. A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. *Arch. Toxicol.* 64, 262–268.
- Yang, J.P., He, H., Lu, Y.H., 2014. Four flavonoid compounds from *Phyllanthus edulis* leaf extract retard the digestion of starch and its working mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7760–7770.
- Yang, X., Yao, W., Li, Q., Liu, H., Shi, H., Gao, Y., Xu, L., 2015. Mechanisms of Tang Luo Ning effect on attenuating oxidative stress in sciatic nerve of STZ-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 174, 1–10.
- Yokota, T., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Matsushima, S., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., Sobirin, M.A., Ono, T., Suga, T., Kuroda, S., Tanaka, S., Terasaki, F., Okita, K., Tsutsui, H., 2009. Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1069–H1077.
- Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., Kong, W., 2008. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.* 107, 296–304.

Glossary

- AAPH: azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
 AQL: lyophilized aqueous extract
 AR: aqueous residual
 CNPG3: 2-chloro-4-nitrophenol- α -D-maltotriose
 DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
 DMPO: 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide
 DPI: diphenylenedionium
 DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DTPA: diethylenetriaminepentaacetic acid
EPR: electron paramagnetic resonance
FBM: fibroblast basal medium
FGM: fibroblast growth medium
FMCA: fluorometric microculture cytotoxicity assay
GSH: reduced glutathione
GSSG: oxidized glutathione
Hb: hemoglobin
HbA_{1c}: glycosylated hemoglobin
HFD: high-fat diet
IL-6: interleukin-6
MCC: metal chelating capacity
MCP-1: monocyte-chemoattractant protein 1
Met: metformin
MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NBDH: 7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole
NHLEF: human normal lung fibroblasts
OGTT: oral glucose tolerance test
ORAC: oxygen radical absorbing capacity
PE: petroleum ether
pNPG: p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside
PPA: porcine pancreatic α -amylase
RIP: rat intestinal acetone powder
ROS: reactive oxygen species
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
SD: standard diet
TRA: 7-thioibarbituric acid
TBARS: thioibarbituric acid-reactive substances
TFC: total flavonoid content
TNF- α : tumor necrosis factor- α
TPC: total phenolic content
TRAP: total radical antioxidant potential
XO: xanthine oxidase

Thème : Etude des propriétés antidiabétiques, antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits hydrosolubles d'*Anvillea radiata* Coss. & Dur. sur le diabète de type 2 expérimental induit par le régime (high fat) chez la souris C57 / BL6J.

Nature du diplôme : Doctorat en Sciences

Domaine: Sciences de la vie

Mention : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Option : Pharmacotoxicologie Cellulaire et Moléculaire

Résumé : Pertinence ethnopharmacologique: Selon la médecine traditionnelle saharienne, *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) a été évalué pour le traitement d'une variété de maladies telles que les maladies gastro-intestinales, hépatiques et pulmonaires, et a pris conscience de son effet bénéfique sur l'hyperglycémie postprandiale. Cependant, à notre connaissance, aucune étude détaillée des effets curatifs antidiabétiques de cette plante n'a encore été réalisée.

Objectif de l'étude: Pour déterminer l'effet hypoglycémique et antidiabétique de la supplémentation alimentaire en extraits d'*Anvillea radiata* sur l'obésité et l'insulinorésistance induites par HFD chez des souris C57BL/6J en relation avec les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, la protection des cellules β pancréatiques et des muscles squelettiques, et les activités inhibitrices des enzymes digestives.

Matériel et méthodes: Six extraits (hydrosolubles et organiques) des parties aériennes de la plante ont été analysés phytochimiquement (TPC et TFC) et criblés *in vitro* pour le piégeage du superoxyde (par chimiluminescence) et du radical hydroxyle (piégeage par résonance paramagnétique électronique), antioxydant (tests DPPH, TRAP et ORAC), xanthine oxydase, chélatant les métaux, inhibiteur de α -amylase et α -glucosidase, et effets protecteurs de l'oxydation des lipoprotéines induite par le cuivre. On a ensuite évalué la toxicité de certains extraits hydroalcooliques et aqueux sur des *fibroblastes humains pulmonaires normaux* (NHLF) et des cellules cancéreuses A549 en utilisant des dosages FMCA et MTT. Deux extraits hydrosolubles ayant les meilleures propriétés globales ont été évalués pour leur (i) effet protecteur à 1-15 $\mu\text{g} / \text{mL}$ sur l'activité métabolique de cellules INS-1 dérivées d'insulinome de rat exposées à un milieu hyperglycémique, et (ii) effet hypoglycémique aigu chez des souris diabétiques induit par HFD de 16 semaines. Ensuite, des souris diabétiques ont reçu de HFD complétée par des extraits (jusqu'à 150 mg/ kg/ jour) pendant 12 semaines supplémentaires en utilisant un régime standard comme témoin et le médicament antidiabétique, la metformine (150 mg / kg) comme contrôle positif. Ensuite, l'activité antidiabétique, anti-inflammatoire et antioxydante des extraits a été déterminée.

Résultats: Parmi les extraits hydroalcooliques et d'acétate d'éthyle enrichis en polyphénols, l'extrait aqueux lyophilisés (AQL) et butanol ne sont pas toxiques pour les cellules en culture ($\leq 400 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou lorsqu'ils sont administrés par voie orale chez des souris normales ($\leq 2000 \text{ mg}/\text{kg}$), ont exercé une action hypoglycémisante dose-dépendante chez les souris diabétiques, qui est maximale à la dose de 150 mg / kg. Après l'administration de cette dose pendant 12 semaines, les deux extraits ont significativement amélioré la capacité de contrôle du poids corporel, amélioré les taux plasmatiques de glucose et d'insuline, réduit le stress oxydatif dans le sang, dans le myocarde et dans les muscles squelettiques et l'amélioration du statut hyperlipidémique et inflammatoire. De plus, les complications liées au diabète ont été améliorées de manière optimale par une thérapie orale basée sur des doses divisées en deux (75 mg/kg) d'un mélange d'AQL et de metformine.

Conclusions: L'enquête actuelle soutient l'utilisation médicinale traditionnelle d'*Anvillea radiata* et suggère que les deux bio-extraits facilement accessibles et à faible coût ont la capacité de développer un agent antihyperglycémique, antihyperlipidémique et protecteur contre la dysfonction des cellules bêta et musculaire à des doses compatibles avec les pratiques courantes de peuples autochtones pour la gestion des troubles métaboliques.

Mots clés : *Anvillea radiata*, plantes médicinales, phénoliques totaux, cellules bêta-pancréatiques, souris C57 / BL6J, diabète de type 2

Laboratoire de recherche : Biologie et Environnement, UFMC ; SMBSO U. AIX MARSEILLE, FRANCE

Président :	Mme AMEDDAH S.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Directrice:	Mme MECHAKRA A.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Co- directrice:	Mme PIETRI S.	Directrice de Recherche au CNRS, Univ. Aix Marseille. France.
Examineurs :	Mr ARAR L.	Professeur Univ. Sétif 1
	Mme BENDJEDDOU D.	Professeur Univ. 8 Mai Guelma