

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri-Constantine
Faculté Des Sciences de la nature et de la vie
Département De Biologie Animale

N° d'ordre:

N° de série:

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en
Biologie cellulaire et moléculaire
Option : Toxicologie cellulaire et moléculaire

Thème

Effet de l'extrait méthanolique de
Zygophyllum cornutum coss contre le
stress oxydant associé au diabète sucré et
les organes en relation

Présenté par :
M^{elle} Boumaza Awatif

Soutenu le: 09/11/2009

Devant le jury :

Présidente : Dr.Khelifi Touhami Fatima MC

Université de Constantine

Rapporteur : Prof. Lezzar El-kassem

C.H.U de Constantine.

Examineurs : Prof. Saka. Saad

Université de Annaba

Dr. Abidli. Nacira MC

Université de Constantine.

Année Universitaire : 2008-2009

Remerciements

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon
DIEU qui m'a donné le courage et la
Volonté d'achever ce travail.*

Mes sincères remerciements vont à mon professeur Lezzar .K, CHU de Constantine, service d'endocrinologie, pour la confiance qu'il a voulu m'accorder en réalisant ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme Khelifi Fouhami. f, maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Mentouri-Constantine pour sa patience, ses précieux conseils, sa grande disponibilité pour l'aboutissement de ce travail et d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de ma thèse de magistère.

J'exprime mes profonds remerciements à Mme Abidli. N , maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Mentouri Constantine, pour nous avoir donnés l'occasion d'accéder à l'espace de la recherche scientifique et d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et de déférence.

Je remercie monsieur Saka. S , professeur à l'université de Annaba, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme Bellatrach. C, professeur au CHU de Constantine, pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des analyses biochimiques, et à Dr Ferdi S pour son aide concernant la réalisation des coupes histologiques.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents,
Qu'ils trouvent ici toute ma
Gratitude pour leur
Soutien tout
Au long de
Mes
Études.*

*À mes sœurs et mes frères, que
Dieu les bénisses*

*À tous mes collègues et
Mes amies.*

*À tous ceux que
J'aime*

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	10
Chapitre I: Synthèse bibliographique.....	13

Stress oxydant, oxydants et antioxydants

Introduction.....	14
I- Définition du stress oxydant.....	14
II- Origine du stress oxydatif.....	15
II-1-Les radicaux libres :.....	15
II-1-1-Définition :.....	15
II-1-2-Les radicaux libres dans les systèmes biologiques :.....	16
II-1-3- Origine des radicaux libres :	17
II-1-3-1- Sources exogènes :.....	18
II-1-3-2- Sources endogènes :.....	18
II-1-4-Rôle physiologique des ROS :.....	19
II-1-5-Cibles biologiques des ROS :.....	20
II-2-Les antioxydants :	21
II-2-1-définition :.....	21
II-2-2-caractéristique des antioxydants :.....	21
II-2-3-classification des systèmes antioxydants :.....	22
II-3- Pathologie liées au stress oxydant :.....	27
II-4- Evaluation du stress oxydant :.....	28

Stress oxydant et diabète sucré

Introduction :.....	30
I- Définition et prévalence du diabète sucré :.....	30
II- Classification du diabète sucré:.....	30
III- Diabète et stress oxydant :.....	32
III-1- Sources de radicaux libres au cours des états d'hyperglycémie :.....	32
III-2- Rôle du stress oxydant dans les complications associées au diabète :.....	36
IV- Traitement du diabète sucré :	38
IV-1- Médicaments antidiabétiques :.....	39
IV-2- Les antioxydants :.....	40
IV-3- La phytothérapie du diabète « l'avenir thérapie » :.....	40
IV-3-1-Etude de la plante sélectionnée :.....	42
Chapitre II: Matériels et méthodes.....	45

I-Matériels

I-1-Matériel végétal :.....	46
-----------------------------	----

I-2- Les animaux :	46
I- 3-Les produits chimiques	46
I-4-Les équipement	46

II-Méthodes

II-1-Préparation et étude du matériel végétal:	47
II-1-1-Préparation de l'extrait méthanolique de « Zygophyllum cornutum »:	47
II-1-2-Etude phytochimique :	47
II-1-2-1- Tests phytochimiques :	47
II-1-2-2-Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes :	48
II-1-3- Etude pharmacologique:	50
II-1-3- 1- Etude de la toxicité (Test d'innocuité):	50
II-1-3-2- L'activité antimicrobienne :	50
II-1-3-3- L'activité antioxydante :	51
II-1-3-4-L'effet scavenger :	52
II-2-Ivestigations expérimentales sur les animaux:	52
II-2-1- Test de l'activité hypoglycémiant sur des rats normo-glycémiques :	52
II-2-2-Test de l'activité anti-hyperglycémiant:	53
II-2-3-L'étude sur les rats diabétiques :	53
II-2-4-L'analyse des paramètres biochimiques :	55
II-2-4-1- Analyse des paramètres sériques.....	55
II-2-4-2- Analyse des paramètres tissulaires :	58
II-2-5-L'analyse histologique.....	61
II-3-L'étude statistique :	62

Chapitre III: Résultats	63
--------------------------------	----

Discussion :	91
---------------------	----

Conclusions et perspectives	106
------------------------------------	-----

Références bibliographiques	108
------------------------------------	-----

Résumés	121
----------------	-----

LIST DES ABREVIATIONS

AA	L'activité antioxydante.
ADA	L'Association Américaine du Diabète
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate.
AGE	Produits de glycation avancée
AlCl ₃	Trichlorure d'aluminium
AR	L'Aldose Réductase.
ATP	Adénosine triphosphate.
BHT	Butylhydroxytoluène
CAT	Catalase.
CYP450	Cytochrome p 450.
DO	Densité optique.
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EMZC	Extrait méthanolique de <i>Zygothymus cornutum</i> .
EP	Eau physiologique
FeCl ₃	chlorure de fer
GPx	Glutathion Peroxydase.
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion-s-transférase
HbA _{1c}	Hémoglobine glyquée
HDL	Lipoprotéines de haute densité
H.M.W	Composés à poids moléculaire élevé.
I %	Pourcentage d'inhibition
IC50	Concentration inhibitrice de 50 %
LDL	Lipoprotéine de basse densité
L.M.W	Antioxydants à faible poids moléculaire.
MDA	Malonyl di aldéhyde.

MeOH	Méthanol
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young.
NAD ⁺	Nicotineamide adenine dinucléotide
NADP ⁺	Nicotineamide adenine dinucléotide phosphate
NOS	Monoxyde d'azote synthase
¹ O ₂	L'oxygène singulet.
O ₂	L'Oxygène.
O ₂ ^{°-}	Le Radical Superoxyde.
OH•	Le Radical Hydroxyle.
OMS	L'Organisation Mondiale de la Santé.
ONOOH	Nitroperoxyde.
RL	Radicaux Libres.
ROS	Reactive oxygen species.
SDH	Sorbitol Déshydrogénase.
SOD	Superoxyde Dismutase.
STZ	Streptozotocine
TBA	Acide thiobarbiturique.
TBARS	Espèces réactives de l'acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloroacétique
TG	Triglycéride.
tpm	Tour par minute.
TRAP	Total Radical Trapping Parameter.
TRX	Thiorédoxine.
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité

LSTE DES FIGURES

Figure 01 ■ Déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les ROS in vivo	15
Figure 02 ■ Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	18
Figure 03 ■ Mécanisme de la peroxydation lipidique.....	20
Figure 04 ■ Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.....	23
Figure 05 ■ Les différentes classes des composés phénoliques.....	26
Figure 06 ■ Aperçu des méthodologies permettant d'évaluer l'état de stress oxydatif chez l'homme.....	29
Figure 07 ■ Voie des polyols induite par l'hyperglycémie.....	33
Figure 08 ■ Contribution de l'angiotensine II dans la production de radicaux libres.....	34
Figure 09 ■ Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.....	35
Figure 10 ■ Production des ROS par le complexe III de la mitochondrie.....	36
Figure 11 ■ <i>Zygothallium cornutum</i> Coss.....	42
Figure 12 ■ <i>Zygothallium cornutum</i> Coss selon Bailey Hortorium. L.H. 2008.....	43
Figure 13 ■ Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	49
Figure 14 ■ Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine.....	50
Figure 15 ■ Formation d'adduit MDA – TBA (1 :2).....	58
Figure 16 ■ Courbe d'étalonnage de Glutathion réduit GSH.....	61
Figure 17 ■ Photo montrant l'effet antibactérien de la poudre (P), de l'EMZC (EM) et du méthanol (M) contre <i>Staphylococcus aureus</i>	66
Figure 18 ■ Evolution de l'activité antioxydante de l'EMZC, du BHT, du MeOH et de H ₂ O pendant 48 heures par le test de β -carotène / acide linoléique.....	67
Figure 19 ■ Activité antioxydante des l'EMZC, du BHT, du MeOH et H ₂ O (à 24 h), par le test de β -carotène / acide linoléique.....	68
Figure 20 ■ Effet scavenger de l'EMZC sur le radical DPPH.....	68
Figure 21 ■ Evolution de la glycémie basale des rats normo-glycémiques traités par 700 mg/kg d'EMZC	70

Figure 22 ■ Les pourcentages de la diminution de la glycémie par rapport à la glycémie basale de rats normo-glycémiques traités par 700 mg/kg d'EMZC.....	70
Figure 23 ■ L'activité anti-hyperglycémiante de l'EMZC à différentes doses (100, 400 et 700 mg/kg per os).....	71
Figure 24 ■ Pourcentage de l'augmentation de la glycémie après l'administration du 4g/kg de glucose.....	71
Figure 25 ■ Evolution du poids des rats normaux et diabétiques contrôles et traités durant les six semaines de traitement.....	72
Figure 26 ■ Evolution de la glycémie des rats normaux et diabétiques contrôles et traités durant les six semaines de traitement.....	73
Figure 27 ■ Évaluation de l'hémoglobine glyquée des différents lots après six semaines de traitement.....	74
Figure 28 ■ Évaluation des protéines totales (A) et de la créatinine (B) des différents lots après six semaines de traitement	75
Figure 29 ■ Évaluation de l'urée (A) et de l'acide urique (B) des différents lots après six semaines de traitement.....	76
Figure 30 ■ Évaluation du CHL-T(A), TG(B), et les LDL-C (C) des différents lots après six semaines de traitement.....	78
Figure 31 ■ Évaluation du CHL-T(A), TG(B), et les LDL-C (C) des différents lots après six semaines de traitement	79
Figure 32 ■ Estimation du risque cardio-vasculaire des différents lots après six semaines de traitement	79
Figure 33 ■ Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) au niveau du foie (A), des reins (B) et du cœur(C).....	81
Figure 34 ■ Dosage de l'activité enzymatique du catalase au niveau du foie (A), des reins (B) et du cœur (C).....	83
Figure 35 ■ Dosage du GSH tissulaire au niveau du foie (A), des reins (B) et du cœur (C)...	84
Figure 36 ■ Histologie du pancréas des rats normaux et diabétiques contrôles et traités	86
Figure 37 ■ Histologie du foie des rats normaux et diabétiques contrôles et traités.....	87
Figure 37 ■ Histologie du foie des rats normaux et diabétiques contrôles et traités (suite)....	88
Figure 38 ■ Histologie du cortex rénal des rats normaux et diabétiques contrôles et traités...	89
Figure 39 ■ Histologie du myocarde des rats normaux et diabétiques.....	90

LIST DES TABLEAUX

Tableau 01 ■ Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant.....	11
Tableau 02 ■ Principales sources des RL (endogènes et exogène).....	11
Tableau 03 ■ Les antioxydants enzymatiques et leurs caractéristiques.....	17
Tableau 04 ■ Principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques.....	18
Tableau 05 ■ Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires.....	19
Tableau 06 ■ Quelques activités biologiques des polyphénols.....	21
Tableau 07 ■ Classification étiologique du diabète sucré.....	25
Tableau 08 ■ Agents antidiabétiques avec propriétés antioxydantes étudiées avec le diabète sucré.....	33
Tableau 09 ■ Plantes antidiabétiques avec effets positifs dus à leur propriété antioxydante.....	35
Tableau 10 ■ La gamme du glutathion réduit standard.....	55
Tableau 11 ■ Résultats des tests phytochimiques.....	58
Tableau 12 ■ Résultats du dosage des Polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	59
Tableau 13 ■ Sensibilité des différentes souches vis-à-vis de la poudre et de l'EMZC.....	60

.

INTRODUCTION

Introduction

La connaissance portant sur le «stress oxydant» évolue en sens inverse des connaissances des différentes disciplines scientifiques. Il est possible d'utiliser comme métaphore «la fission» et «la fusion» nucléaire pour comparer ces évolutions entre elles. En effet chaque discipline classique tend à évoluer plutôt dans le sens de la fission, car son bombardement par des données récentes la fragmente en une multitude de nouvelles disciplines. A l'inverse, l'évolution des connaissances portant sur le «stress oxydant» s'effectue plutôt dans le sens de la fusion. De multiples savoirs et des constatations éparses tendent à se compléter pour s'intégrer dans un ensemble cohérent d'événements biologiques.

La complexité de ce nouveau concept et son implication dans de nombreuses maladies explique au moins en partie l'accumulation des recherches portant sur ce phénomène et la recherche de nouvelles substances permettant de maîtriser fin à ses dégâts pathologiques ou leur prévention.

Le diabète, constitue un exemple des maladies associées au stress oxydant. Sa prévalence à travers le monde, et ses complications s'ajoutent à la nouvelle notion du stress oxydant et constituent un sujet d'actualité.

Il est maintenant admis que des concentrations élevées en glucose dans les milieux extra et intracellulaires induisent un stress oxydant défini comme un déséquilibre de la balance entre les pro oxydants et les antioxydants et qui est considéré comme le moteur mobilisant des différents facteurs pathologiques vers les complications du diabète.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités à la fois antidiabétiques et antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant.

La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet de certains antioxydants sur quelques paramètres du stress oxydant et les dommages qu'il peut provoquer au niveau du foie, des reins et du cœur pendant le diabète sucré. Nous avons utilisé comme source d'antioxydants, une plante utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement du diabète, c'est le *Zygophyllum cornutum* Coss, espèce endémique, répandue dans le Sahara algérien et connue sous le nom de «bougriba». Cette plante n'a été jamais étudiée en Algérie raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

- 1- Etudes phytochimique et pharmacologique de la plante pour avoir quelques informations concernant ses constituants et son activité biologique.
- 2- Des tests préliminaires concernant son activité antioxydante in vitro.
- 3- Etudes de son activité antidiabétique et antioxydante in vivo en utilisant un modèle animal rendu diabétique par la streptozotocine.
- 4- Evaluation des différents paramètres biochimiques concernant les perturbations métaboliques du diabète et quelques paramètres du stress oxydant selon les moyens disponibles au niveau du foie, des reins et du cœur.
- 5- Une étude histologique sur les organes déjà cités pour mettre en évidence d'une part l'effet du stress oxydant associé au diabète et d'une autre part l'efficacité de la plante utilisée comme source d'antioxydants contre les dommages du stress oxydant, et donc par conséquent contre le développement des complications associées au diabète sucré par le biais du stress oxydant.

Synthèse bibliographique

Stress oxydant, oxydants et antioxydants

Introduction :

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « Stress Oxydant », que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines. Qu'en est-il exactement ? Est-ce une mode ou une réalité, et dans ce cas, pouvons-nous trouver de nouvelles armes médicamenteuses pour lutter contre ce phénomène ?

I- Définition du stress oxydant :

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme [Durackova Z., 2008].

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant ». Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers » [Baskin S.I et al., 1994 ; Barouki R., 2006 ; Jenkins A.J et al., 2007]. Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus [Barouki R., 2006 ; Kehrer J.P., 1993]. D'autres chercheurs ont dit que le stress oxydant désigne un état caractérisé par une augmentation de la génération des ROS (reactive oxygen species) en ajoutant que ce terme est synonyme du dommage [Kehrer J.P., 1993].

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « ***un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels*** [Durackova., 2008] ***et à des dégâts cellulaires irréversibles*** [Abuja P.M et al., 2001 ; Pincemail J et al., 1999]» (Figure 01).

II- Origine du stress oxydant:

Les RL sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de RL, un état de « stress oxydant » est signalé [Favier A., 2003].

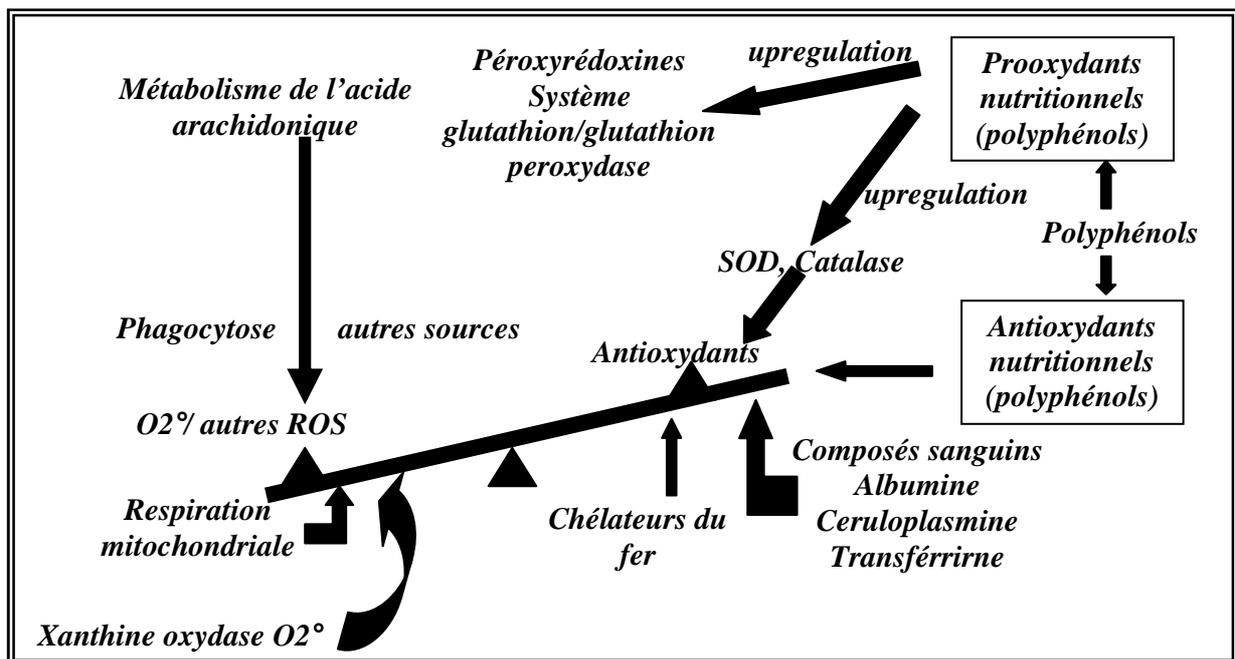


Figure 01 ■ Déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les ROS in vivo [Halliwell B., 2009]

II-1-Les radicaux libres :

II-1-1-Définition :

Les RL sont des espèces chimiques indépendantes [Kehrer J.P., 1993], atome, molécules ou leurs fragments [Durackova Z., 2008] possédant un ou plusieurs électrons célibataires [Kehrer J.P., 1993 ; Delattre J., 2005; Durackova Z., 2008]. En toxicologie, les RL sont ceux qui existent dans un état libre et capables d'interagir avec différents composés de tissus [Kehrer J.P., 1993].

Un groupe de termes est utilisé dans la littérature scientifique pour désigner les RL : oxyradicaux, radicaux libres de l'oxygène [Kehrer J.P., 1993] et oxydants en raison de leur haute réactivité qui leur permet de gagner un électron à partir d'autres composés en causant leur oxydation [Durackova Z., 2008], ainsi que d'autres nominations. L'existence des RL primaires qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron, et d'autres radicaux secondaires formés par la réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule, ainsi que des espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène et douées d'une réactivité semblable impose la notion des espèces réactives de l'oxygène **ROS** pour désigner l'ensemble des entités contenant un ou plus d'atomes d'oxygène qui leur confère un critère défini d'être chimiquement réactif [Baskin S.I., 1994],

II-1-2-Les radicaux libres dans les systèmes biologiques :

Dans les systèmes biologiques, les produits de la réduction à un, deux et trois électrons sont respectivement : Le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Ces trois ROS semblent participer à de nombreuses réactions essentielles pour les organismes aérobies [Kehrer J.P., 1993]. Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer trois groupes [Favier A., 2003] :

***Les radicaux primaires**, qui constituent un ensemble restreint de composés radicalaires et dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ et le radical hydroxyle $OH\bullet$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote $NO\bullet$. Ils jouent un rôle particulier en physiologie [Darley-Usmar V et al., 1995].

***Les radicaux secondaires**, se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

*** D'autres espèces dérivées de l'oxygène**, dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de certains radicaux [Delattre J., 2005]. Les principaux ROS rencontrés en biologie sont montrés dans le Tableau 1.

Tableau 01 ■ Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant [Delattre J., 2005].

<i>Radicaux libres primaires</i>	<i>Dérivés oxygénés non radicalaires</i>
$O_2^{\circ-}$ = Radical superoxyde.	$1/2O_2$ = Oxygène singulet
HO_2° = Radicale perhydroxyle	H_2O_2 = Peroxyde d'hydrogène.
$^{\circ}OH$ = Radical hydroxyle	ONOOH = Nitroperoxyde
RO_2° = Radical peroxyde	ONOO⁻ = Peroxynitrite
RO° = Radical alkoxyde.	
NO° = monoxyde d'azote	

II-1-3- Origine des radicaux libres :

Les RL sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes (Tableau2). Sans vouloir faire du finalisme, nous pouvons considérer que certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à des fins de défense ou d'envoi des signaux [Halliwell B., 2006]

Tableau 02 ■ Principales sources des RL (endogènes et exogène) [Halliwell B.,2006 ; Durackova Z., 2008 ; Rees M.D et al., 2008].

<i>Sources endogènes</i>	<i>Sources exogènes</i>
-NADPH oxydase.	-Toxiques environnementaux.
-Chaîne respiratoire mitochondriale.	-Radiations ionisantes.
-Péroxyosomes.	- Radiations UV.
-Cytochrome P ₄₅₀ .	-Champs électriques..
-Xanthine oxydase.	-Xénobiotiques prooxydants.
-Cyclo-oxygénases.	-Cytokines pro inflammatoires.
-Lipo-oxygénases.	-Tabagisme.
-Phagocytes.	-Chémothérapie.
-Réactions des ions de transition.	-Ozone
-Inflammation	
- Etat d' ischémie-reperfusion	
-Atherogénèse	
-Hémodialyses	
-exercices intensifs.	

II-1-3-1- Sources exogènes :

Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles [Priyadarsini K. I., 2005] (Figure2).

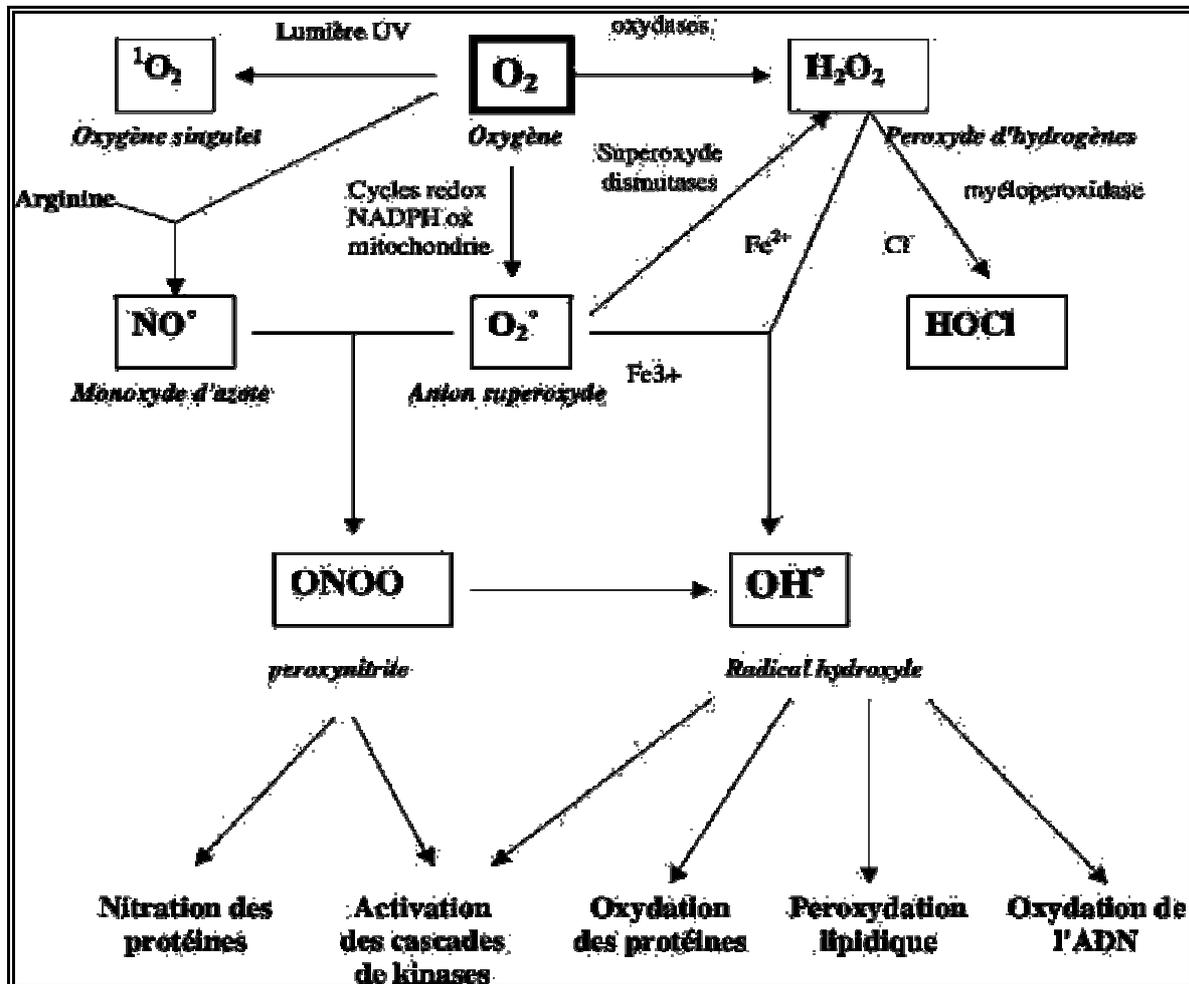


Figure 02 ■ Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie. [Favier A., 2003]

II-1-3-1- Sources endogènes :

Les systèmes biologiques les plus simples générant des ROS sont les constituants cellulaires solubles capables d'activer l'oxygène moléculaire lors des réactions d'autooxydation. Ce groupe comprend, parmi d'autres, des thiols, des hydroquinones, des flavines, des catécholamines, des tetrahydropterines, des hémoprotéines, et des métaux de transition [Maged Younes., 1999]. Mais la production des ROS dans les cellules mammifères

est essentiellement d'origine enzymatique et découle dans plusieurs sources possibles (Figure2). Il s'agit principalement de :

- NAD(P)H oxydase qui est une enzyme membranaire [Delattre J et al. 2005] utilisant NAD(P)H comme substrat et génère $O_2^{\circ-}$ [Salvayre A.N et al., 2005] selon la réaction suivante :



- La xanthine oxydase/déshydrogénase peut générer $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 en utilisant la xanthine ou l'hypoxanthine et NADH comme substrat [Salvayre A.N et al., 2005]



- Enzymes de la voie de l'acide arachidonique, les lipoxygénases synthétisant les leucotriènes et les Cyclo-oxygénases synthétisant les prostaglandines et les thromboxanes.
- Enzymes des organites cellulaires comme les enzymes mitochondriales constituant la source principale des ROS, la myéloperoxydase lysosomiale, les cytochromes P_{450} du réticulum endoplasmique lisse, les cytochromes oxydases et la chaîne de transport d'électron nucléaires, et les enzymes des peroxysomes comme la glycolate oxydase et D-aminoacides oxydases...etc.

II-1-4-Rôle physiologique des ROS :

Un paradoxe : les RL sont-ils indispensables à la vie ? En effet, Ils remplissent de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les RL participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes [Favier A., 2003]. Par exemple, le radicale monoxyde d'azote NO°

possède une fonction régulatrice, alors que le radical superoxyde $O_2^{\circ-}$ module la signalisation cellulaire et intervient dans les régulations métaboliques, en plus, lorsqu'il est produit par le réticulum endoplasmique lisse avec H_2O_2 , ils interviennent dans la régulation redox de certaines fonctions essentielles de ce compartiment cellulaire telles que l'adressage et la sécrétion des protéines [Valko M et al., 2007]. Ce paradoxe peut être, au moins en partie, expliqué par des effets dose-dépendants [Delattre J et al., 2005].

II-1-5-Cibles biologiques des ROS :

En plus des fonctions biologiques, la réactivité particulière des ROS ajoute des propriétés toxiques et diversifiées. En effet, toutes les macromolécules cellulaires sont des cibles potentielles des ROS [Barouki R., 2006 ; Valko M et al., 2007].

1. **Les lipides** : les acides gras polyinsaturés (RH) comme l'acide linoléique ou l'acide arachidonique sont les cibles privilégiées des ROS [Etsuo N et al., 2005 ; Pincemail J., 2006] qui conduisent à la formation des radicaux et des peroxydes lipidiques [Tratner I., 2003; Delattre J., 2005] (Figure 3).

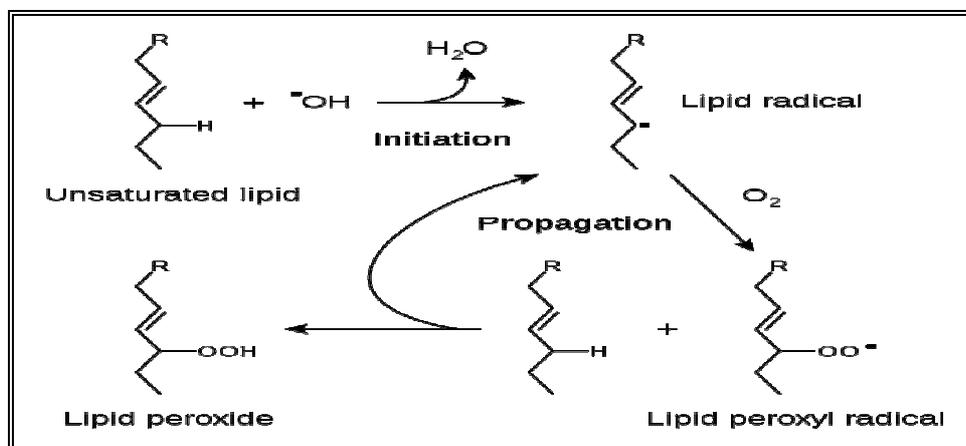


Figure 03 ■ Mécanisme de la peroxydation lipidique [Tim V., 2009].

2. **Les lipoprotéines** : Les lipoprotéines de faible densité sont susceptibles d'être oxydés par les ROS qui provoquent un changement dans leur structure conduisant à la formation des aldéhydes (MDA et HNE) [Nicolosis R.J., 1999 ; Pincemail J., 2006].
3. **Les protéines** : Les protéines sont aussi des cibles pour les ROS en particulier certains acides aminés comme la cystéine, la méthionine et la tyrosine [Tratner I., 2003].

La modification des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ROS est à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés [Pincemail J., 2006] et la perte de groupes sulfhydryl critiques [Kehrer J.P., 1993].

4. Les acides nucléiques : Les bases nucléiques sont susceptibles d'être directement oxydées par les ROS, conduisant à la formation de 8-oxo-guanine, à l'origine de mutations géniques [Barouki R., 2006] pouvant conduire au développement du cancer [Beckman K., 1997]. Encore, Les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique (4-HNE et l'MDA) sont des agents carcinogènes via la formation des adduits avec les bases nucléiques [Feng Z et al., 2004].

II-2-Les antioxydants :

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des RL. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «antioxydant».

II-2-1-définition :

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat [Abuja P.M and Albertini R., 2001], et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire [Durackova Z. 2008].

II-2-2-caractéristiques des antioxydants:

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requière les propriétés suivantes [Ursini F., 1999 ; Durackova Z., 2008.] :

- 1- il doit réagir avec les métabolites réactifs de l'oxygène qui sont biologiquement toxiques.
- 2- Le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être plus toxique pour l'organisme que le métabolite éliminé.
- 3- L'antioxydant potentiel doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante.
- 4- La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

Les antioxydants peuvent jouer leur rôle à différents niveaux du processus oxydatif [Baskin S.I et al 1994], en :

- 1- neutralisant les radicaux initiateurs ;
- 2- Liant les ions métalliques ;
- 3- Neutralisant les radicaux peroxydes ;
- 4- Eliminant les biomolécules endommagées par oxydation, ainsi que d'autres types de réactions.

II-2-3-Classification des systèmes antioxydants :

Les systèmes antioxydants sont de deux types, soit des molécules qui captent rapidement les ROS (antioxydants proprement dits), soit des systèmes enzymatiques catalysant la conversion des molécules prooxydantes [Salvayre A.N et al., 2005]. Selon leurs structures variées, et la taille de leurs molécules antioxydantes, ils peuvent être classés en : ***composés à poids moléculaire élevés (H.M.W)*** comme les enzymes antioxydants (SOD, CAT, GPx, ...), ou bien les antioxydants non enzymatiques (transferrine albumine), et en ***composés à faible poids moléculaire (L.M.W)*** incluant : la vitamine hydrophilyque C, le glutathion, l'acide urique, et les antioxydants lipophiles comme la vitamine E et le coenzyme Q. Une autre catégorie d'antioxydants, ce sont les antioxydants naturels qui incluent les flavonoïdes (catéchine et quercétine) ou autres phénols (l'acide ferrulique) ou les composés polyphénoliques (resveratrol). Ils sont requis par l'organisme à travers l'alimentation comme constituants naturels des fruits et des végétaux en exerçant une activité antioxydante significative [Ursini F., 1999].

II-2-3-1- Antioxydants à poids moléculaire élevés (H.M.W) :

Ce sont des antioxydants endogènes, classés à leur tour en deux catégories : des antioxydants enzymatiques et des antioxydants non enzymatiques [Pincemail J et al., 2002]

Les antioxydants enzymatiques : Les enzymes antioxydants (Tableau 03) ont une signification négligeable dans l'espace extracellulaire alors qu'ils jouent un rôle très significatif dans l'espace intracellulaire [Durackova Z., 2008]. On note principalement : (i) *les enzymes responsables de la dismutation de l'ion superoxyde*, ce sont les superoxyde dismutases, (ii) *les enzymes agissant sur les peroxydes*, c'est la catalase, et les glutathion peroxydases, ainsi que (iii) *les enzymes intervenant dans la protection des protéines à fonction thiol*, c'est la thiorédoxine [Goudable J.1et Favier A. (1997) (Figure 04).

Tableau 03 ■ Les antioxydants enzymatiques et leurs caractéristiques
[Beaudeau J et al., 200

Antioxydants enzymatiques	Caractéristiques et réaction catalysée.
<p><u>Superoxyde dismutase SOD :</u> - Cu, Zn SOD1 - Mn SOD2 - Cu, Zn SOD3</p>	<p>Appartient à la famille des métalloenzymes, possède trois isoenzymes : SOD1, SOD2 intracellulaires et SOD3 extracellulaire, catalyse la dismutation de l'ion superoxyde.</p> $\text{O}_2^{\circ-} + \text{O}_2^{\circ-} \xrightarrow{2\text{H}^+} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
<p><u>La catalase :</u></p>	<p>C'est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.</p> $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
<p><u>Les glutathion peroxydases :</u> -GPx sélénium- indépendant (GST) : -GPx sélénium-dépendant</p>	<p>- La GST catalyse les réactions de détoxification des xénobiotiques. - Présente sous forme de 5 isoenzymes tétramériques, agissant sur les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques par l'intermédiaire de GSH.</p>
<p><u>La thiorédoxine TRX</u></p>	<p>-Sélonoprotéine, à activité oxydoréductase, protectrice des protéine à fonction thiol :</p> $\text{Trx-S}_2 + \text{NADPH, H}^+ \xrightarrow{\text{TrxR}} \text{Trx-(SH)}_2 + \text{NADP}^+$ $\text{Protéine-S}_2 + \text{Trx-(SH)}_2 \longrightarrow \text{Protéine-SH}_2 + \text{Trx-S}$

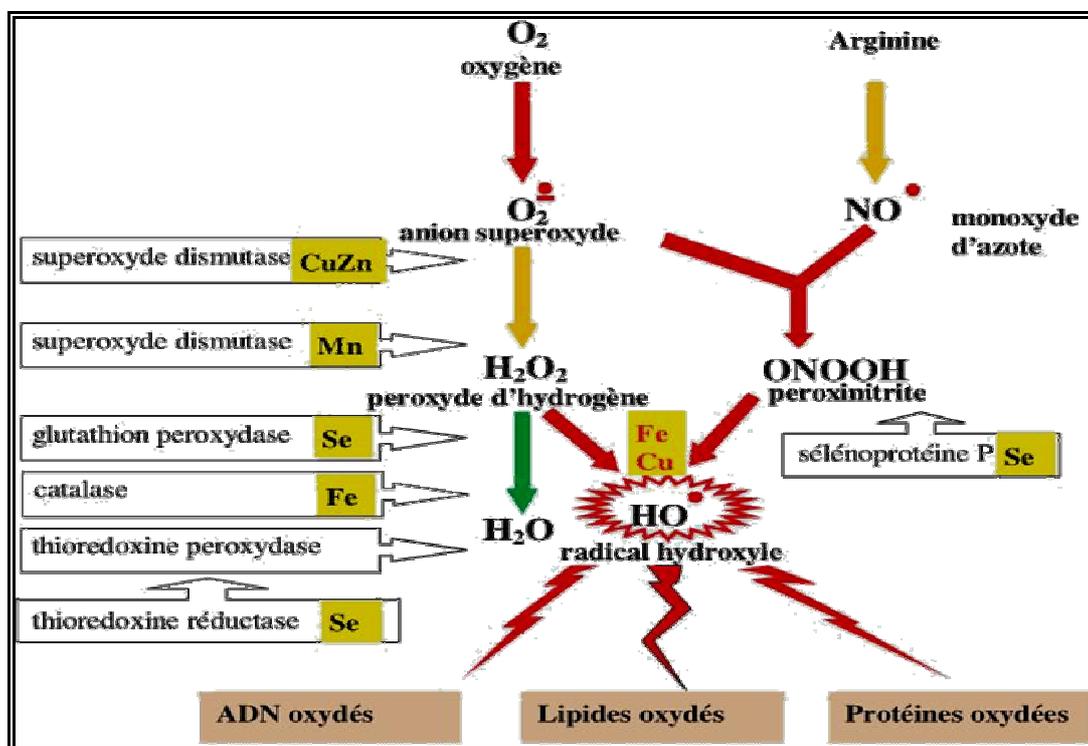


Figure 04 ■ Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques [Nicolosis R.J., 1999]

- **Les antioxydants non enzymatiques** : Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques présents dans l'organisme humain comprennent la transferrine, l'apotransferrine, la ceruloplasmine, et l'albumine (Tableau 04)

Tableau 04 ■ Principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques [Beaudeau J.L et al., Durackova Z. 2008].

<i>Antioxydants non enzymatiques</i>	<i>Rôle antioxydant</i>
<u>La transferrine :</u>	Capte les ions Fe ³⁺ et bloque les réactions de la peroxydation lipidique
<u>L'apotransferrine :</u>	Capte les ions Fe ³⁺ et inhibe la formation du radical HO° et les réactions de la peroxydation lipidique.
<u>La ceruloplasmine :</u>	Capte les ions Cu ²⁺ et prévient leur effet prooxydant.
<u>L'albumine :</u>	Intégration des ions Cu ²⁺ à l'hème en évitant les dommages oxydatifs des autres molécules de la matrice extracellulaire.

II-2-3-2- Antioxydants à faible poids moléculaires (L.M.W) :

Nous n'évoquerons dans cette partie que les propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires (micronutriments et dérivés métaboliques) (Tableau 5), cependant nous devons garder à l'esprit que ces composés ont d'autres rôles biochimiques qui s'étendent bien au-delà de leurs propriétés antioxydantes.

Tableau 05 ■ Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires.

Antioxydant :	Activité antioxydante :
La vitamine E :	prévention de l'oxydation des LDL [Nicolosis R.Jet., 1999] l'athérosclérose et d'autres maladies cardiovasculaires [Thomas S.R et al., 1999 ; Vivekananthan D.P., 2003]
La vitamine C :	recyclage de la vitamine E et le glutathion [Baskin S.I and Salem H.1994].
L'acide lipoïque	Inhibiteur de la glycooxydation [Cilard p et al., 2006], prévention de la lipodystrophie et la neuropathie mendiées par les ROS [Schmitt B et al., 2006].
L'acide urique :	Piégeur puissant des radiaux [Durackova Z., 2008]: $O_2^{\circ -}$, $^{\circ}OH$, RO_2°
Le sélénium	Nécessaire à l'activité de nombreuses sélénoenzymes antioxydantes : GPx, TRX...etc [Baskin S.I., 1994].
Co enzyme Q :	Piégeur puissant des radiaux superoxyde et inhibiteur de la peroxydation lipidique [Kehrer J.P.,1993].
Le glutathion :	Participant à l'activité des enzymes antioxydantes. Capture des espèces radicalaires [Durackova Z., 2008 ; Beaudeau J.L., 2005]. $GSH + R^{\circ} \rightarrow GS^{\circ} + RH$
Le zinc	La prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes [Baskin S.I., 1994].
La bilirubine :	Protection des acides gras libres et de l'albumine contre l'attaque radicalaire. [Beaudeau J.L., 2005].
B-carotènes	Contrôlent efficacement la génération de radicaux libres ⁽³⁰⁾ notamment en captant l'oxygène singulet. [Beaudeau J.L., 2005] : $O_2^1 + B\text{-carotènes} \rightarrow B\text{-carotènes} + O_2$

II-2-3-3-Les antioxydants naturels :

Les antioxydants extraits de plantes, utilisés tels quels ou après modifications chimiques, imitant les enzymes, chélatant le fer ou piégeant les radicaux. Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques, alcaloïdes, glucosides, dérivés

indoliques, mais celle des composés phénoliques a donné le plus de molécules en regroupant un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et, en plus d'autres constituants, un ou plusieurs groupes hydroxyle [Salunkhe, 1990] qui leur confèrent la propriété d'antioxydants [Ursini F et al.,1999]. Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins (Figure 05). En plus de leur activité antioxydante, ils sont doués de plusieurs autres activités biologiques importantes (Tableau6)

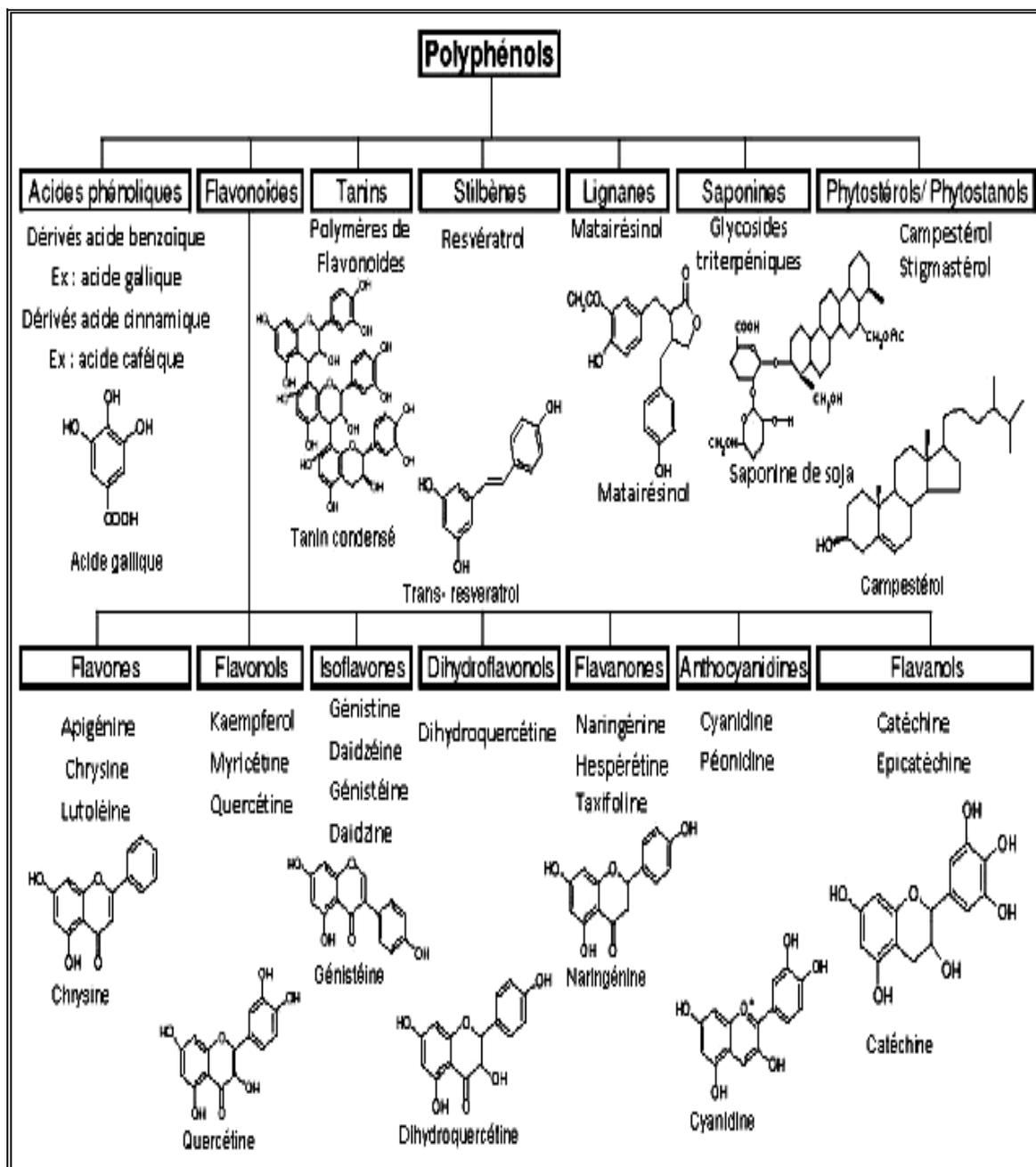


Figure 05 ■ Les différentes classes des composés phénoliques [Macheix J.J et al., 2005

Tableau06 ■ Quelques activités biologiques des polyphénols.

<i>Polyphénols</i>	<i>Activités</i>	<i>Auteurs</i>
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes	Didry et al., 1982 Ravn et al., 1984 Hayase et Kato., 1984
Coumarines	Protectrices vasculaires et Antioedémateuses	Mabry et Ulubelen., 1980
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes antivirales, anti-allergiques	Stavric et Matula., 1992 Das et al., 1994 Bidet et al., 1987 Bruneton ., 1993 Aruoma et al., 1995 Middleton et Kardasami., 1993.
Anthocyanes	Protectrices capillaro- veineux	Bruneton., 1993
Proanthocyanidines	Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	Bahorun., 1997 De Oliveira et al., 1972 Brownlee et al., 1992 Kreofsky et al., 1992
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes Antimicrobien	Okuda et al., 1983 Okamura et al., 1993 Milal et al., 1996.

II-3- Pathologies liées au stress oxydant :

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à l'évolution des complications. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu.

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux [Ferrari., 2001]. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs

maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, maladie d'Alzheimer [Favier A., 2006]. Le stress oxydant joue également un rôle dans l'apparition des facteurs athérogènes: augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs prooxydants (cytokine, superoxyde, NO...etc) [Montagnier et al., 1998]. De nombreuses affections humaines ou animales incluent donc un stress oxydant, local ou général, dans leur pathogenèse au même titre que l'inflammation à laquelle il est souvent associé. Dans plusieurs maladies graves, le stress oxydant est le facteur déclenchant originel.

II-4- Evaluation du stress oxydatif :

Comment mettre en évidence un stress oxydant chez un malade ? Un grand nombre de techniques actuellement utilisables pour évaluer le stress oxydant ont fait l'objet d'ouvrages ou de revues. Toutefois, ce domaine de la biologie n'a pas encore été étudié avec la rigueur et le souci de standardisation et d'optimisation des méthodes habituelles en biologie clinique.

Par ailleurs, il existe des difficultés inhérentes à cette exploration, liées à la rapide fugacité des espèces radicalaires, à l'oxydabilité des paramètres redox, ainsi qu'à la localisation de ce stress dans un type donné et d'un nombre réduit de cellules dans un tissu sain. La plupart des études mettant en évidence le stress oxydant comme l'un des facteurs étiologique de certaines pathologies ou d'exposition à un facteur environnemental (alcool, tabac, ...) ou évaluant l'efficacité de micronutriments dans la prévention de ce stress oxydant ont utilisé les marqueurs biologiques suivants [Pincemail J., 1999 ; Hininger-Favier I., 2002] :

- ✓ **Les Marqueurs du statut** : L'évaluation d'un état nutritionnel peut être faite par l'analyse du statut plasmatique, érythrocytaire, leucocytaire (plus délicat) pour les micronutriments antioxydants (vitamine E, C, caroténoïdes, Zn, Se). Etant donné que certains micronutriments sont des facteurs co-enzymatiques des enzymes appartenant aux systèmes de défense, l'activité enzymatique de la GPx, de la SOD Cu-Zn, peuvent renseigner sur le statut antioxydant. La mesure du rapport GSH/GSSG est un bon reflet de l'état redox. La mesure du pouvoir antioxydant total du plasma (TRAP : « total radical trapping parameter) peut se révéler un marqueur du stress oxydant. Cependant cet essai doit être interprété avec précaution car des augmentations des concentrations plasmatiques de l'albumine, de l'acide urique et de la bilirubine pourraient masquer le déficit en d'autres antioxydants.

- ✓ Les lésions dûes au stress oxydant peuvent être évaluées : tant au niveau des protéines par le dosage des groupements thiols (SH : marqueur d'une non oxydation) ou des groupements carbonyles (C=O ; marqueurs d'une oxydation) qu'au niveau des lipides par le dosage des produits de dégradation des lipides oxydés (HNE ; MDA ; TBARS, isoprostanes) ; qu'au niveau de l'ADN par le dosage des bases oxydées ou des cassures des brins (Figure 6)..

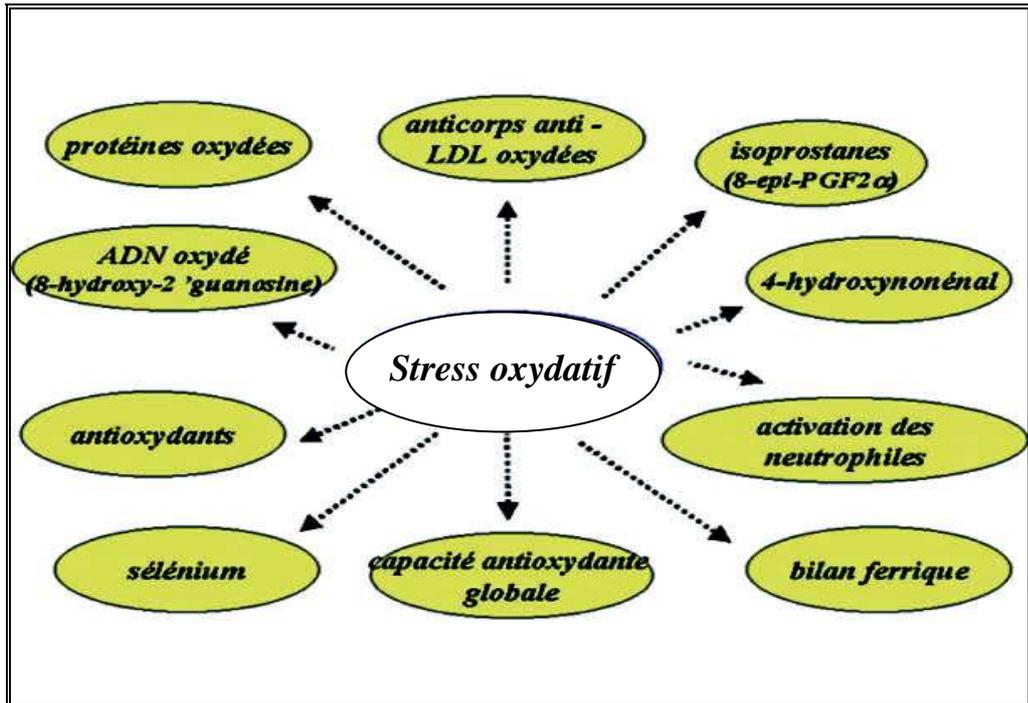


Figure 06 ■ Aperçu des méthodologies permettant d'évaluer l'état de stress oxydatif chez l'homme

[Pincemail J., 1999]

Stress oxydant et diabète sucré

Introduction :

Il est admis que le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la génération des 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 [Lorenzi M and Oates P.J., 1995; Willems D et al., 1998 ; Werstuck G.H.N 2006], ce qui conduit à des dommages affectant les composants cellulaires tels que les protéines, les lipides, les acides nucléiques ...etc.

I- Définition et prévalence du diabète sucré:

Le diabète sucré, condition caractérisée par une hyperglycémie, est un désordre métabolique chronique des carbohydrates, des lipides et des protéines, dû à un déficit relatif ou absolu de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline [Jenkins A.J., 2007 ; Rahimi R et al., 2005]. Donc, le diabète n'est pas une maladie unique mais c'est une constellation d'anomalies métaboliques et pathologiques avec une variété de causes [Lais V.R et al., 2008] environnementales et héréditaires [Beaudeau J.L., 2005].

La prévalence du diabète augmente d'environ 6% par an dans les pays industrialisés [Beaudeau J.L., 2005], il y avait une estimation de 124 millions d'individus diabétiques dans le monde, et 221 millions d'individus affectés sont prévus pour 2010 [Jenkins A.J., 2007 ; Peppia M., 2005], alors que les perspectives à l'horizon 2025 s'orientent vers une prévalence mondiale de 300 millions d'adultes atteints de diabète [Werstuck G.H., 2006]

II- Classification du diabète sucré :

Depuis 1997, une nouvelle classification du diabète sucré a été proposée par un groupe d'experts sous la responsabilité de l'Association Américaine du Diabète (ADA) remplace celle élaborée en 1979 par le "National Diabetes Data group" et entérinée en 1980 par l'OMS. [Rodier M., 2001]. Le tableau 07 représente une classification étiologique du diabète sucré selon ADA :

Tableau 07 ■ Classification étiologique du diabète sucré

[Rodier M., 2001]

1. Diabète sucré de type 1	a. auto-immun (trouble des cellules β) b. idiopathique (rare, sans élément pour facteur auto-immun)
2. Diabète sucré de type 2 :	a. Résistance à l'insuline. b. Défaut de sécrétion d'insuline
3. Types spécifiques de diabète :	a. Défaut génétique de la fonction des cellules β (Maturity Onset Diabetes of the Young: MODY). b. Défaut génétique dans l'action de l'insuline (résistance à l'insuline de type A, Le préchaunisme, syndrome de Rabson-Mendenhall: défaut des récepteurs à l'insuline et autres) c. Maladies du pancréas exocrine (pancréatite, néoplasie, fibrose kystique, hémochromatose, pancréatopathie fibro-calculuse, autres) d. Endocrinopathies (acromégalie, syndrome de Cushing, phéochromocytome, syndrome de Conn, autres) e. Induit par les médicaments (stéroïdes, pentamidine, acide nicotinique, diazoxyde, thiazides, inhibiteurs de la protéase, autres) f. Infections (rougeole congénitale, oreillons, virus Cocksackie, cytomégalovirus) g. Formes rares de diabète immunogène (syndrome de Stiff-Man, anticorps anti-insuline-récepteurs, autres) h. Autres syndromes génétiques associés au diabète (trisomie 21, syndrome de Klinefelter, syndrome de Turner, dystrophie myotonique, autres)
4. Diabète gestationnel	Le diabète gestationnel est un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse

- **le diabète de type 1** : l'hyperglycémie est due à une carence absolue en insuline. Cette forme de diabète comprend les cas attribuables à un processus auto-immun conduisant à la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans.
- **le diabète de type 2** : la carence en insuline est relative et l'hyperglycémie est liée à l'association, à des degrés divers, d'une insulino-résistance hépatique et périphérique et d'une insulino-pénie.
- **Les diabètes dits "spécifiques"** : secondaires à une maladie pancréatique, à une endocrinopathie, iatrogène ou encore liés à des anomalies génétiques.
- **Le diabète gestationnel** : correspond à un trouble ou à une intolérance au glucose apparaissant entre la 24^{ème} et la 28^{ème} semaine de grossesse et disparaissant après l'accouchement.
- **La classe "altération de l'homéostasie glucidique"** : correspond à des anomalies minimales de la régulation glycémique qui traduisent une augmentation du risque de diabète et de maladie cardiovasculaire [Djrolo F., 1998].

III- Diabète et stress oxydant :

L'exposition au stress oxydant est une partie de vie inévitable. Les ROS, des produits normaux l'hors de certaines réactions enzymatiques, sont continuellement formés in vivo et jouent un rôle vital dans la défense de l'hôte comme la phagocytose des substances et des organismes étrangers, la modulation des hormones et des facteurs de croissance ainsi que l'activité des cytokines [Jenkins A.J., 2007].

Récemment, docteur Brownlee et ses collègues ont proposé une hypothèse unifiant le stress oxydant, l'hyperglycémie et les complications liées au diabète [Jenkins A.J., 2007]. Alors, la question qui se pose concerne la source des ROS associées au diabète et les mécanismes par lesquels elles sont impliquées dans les complications qui en résultent.

III-1- Sources de radicaux libres au cours des états d'hyperglycémie :

Quatre hypothèses font toutes intervenir le déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants, sont maintenant avancées pour expliquer comment l'hyperglycémie conduit aux complications observées au cours du diabète.

- ✓ **1^{ère} hypothèse : Augmentation de la voie des polyols** : Dans un état d'hyperglycémie, les deux voies du métabolisme de glucose – la voie de la glycolyse et la voie des pentose-phosphates – fonctionnent moins bien. Cette perturbation est due à la saturation de l'héxokinase qui permet la phosphorylation du glucose en vu son

utilisation par ces deux voies, ce qui conduit à l'accumulation du glucose dans les tissus insulino-indépendants (reins, tissu rénal, microvaisseaux rétiens...etc.) et l'activation de la voie des polyols faisant intervenir une enzyme inductible : l'aldose réductase (AR) qui n'est active que pour des concentrations élevées en glucose, et une autre enzyme qui est : la sorbitol déshydrogénase (SDH) (Figure 07) .

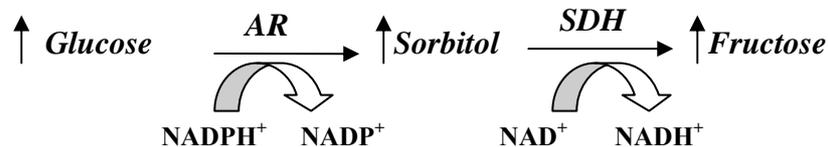


Figure 07 ■ Voie des polyols induite par l'hyperglycémie

[Beaudeau J.L., 2005]

L'activation de la voie des polyols conduit à :

- * L'accumulation du sorbitol (agent du stress osmotique très actif) [Lie et al., 1990].
- * L'accumulation du fructose (caractérisé par son grand pouvoir réducteur par rapport au glucose) qui stimule la glycosylation non enzymatique des protéines [Suarez et al., 1988].
- * La diminution du rapport $\text{NADPH}, \text{H}^+/\text{NADP}^+$ et $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$ (altération du potentiel redox) ce qui affecte la régénération du GSH en aboutissant à un stress oxydant [Bravi et al., 1997] et limite également certaines réactions enzymatiques, comme la formation du NO par la NO synthase [Calver et al., 1992].

Ces conséquences sont directement impliquées dans la production des ROS et l'inhibition de certains antioxydants.

- ✓ **2^{ème} hypothèse : Formation de protéines glyquées :** L'hyperglycémie est une cause essentielle de la glycosylation non enzymatique ou la glycation des protéines qui résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose et les groupements amines libres des protéines. Cette liaison donne naissance à des produits dits d'Amadori possédant un groupement Cétol qui forme, en présence de métaux de transition, de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$ [Thornalley et al., 1999].

Parmi les conséquences de la glycation des protéines :

- *Glycation des protéines extracellulaires comme le collagène qui abouti à une modification des propriétés élastiques de la matrice extracellulaire, et l'albumine en

diminuant sa capacité d'épuration des radicaux libres et de chélation des métaux de transition [Rees M D., 2008].

*Glycation des lipoprotéines notamment les LDL et les VLDL, ce qui augmente leur durée de vie plasmatique et par conséquent leur susceptibilité à l'oxydation qui se traduit par de fortes concentrations en TBARS [Gallou G et al., 1994 ; Willems D et al., 1998].

*Glycation des protéines intracellulaires notamment les enzymes ayant une activité antioxydante telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase [Atmaca M et al., 2008].

- ✓ **3^{ème} hypothèse : Activation de l'angiotensine :** L'angiotensine II est un vasoconstricteur dont son activité augmente systématiquement lors d'une hyperglycémie. Il est considéré l'un des plus importants stimuli endogène pour la génération de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ via la NAD(P)H oxydase endogène [Beaudeau J.L et al., 2005] (Figure 08).

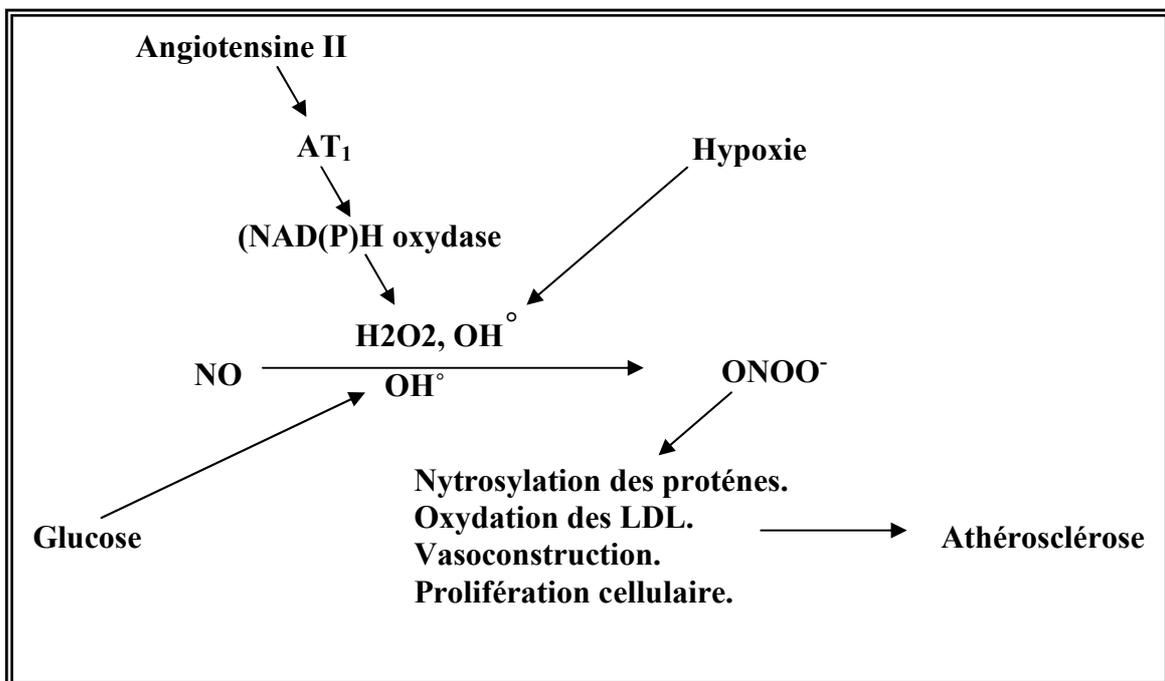


Figure 08 ■ Contribution de l'angiotensine II dans la production de radicaux libres
[Beaudeau J.L et al., 2005].

- ✓ **4^{ème} hypothèse : 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 [Beaudeau J.L et al., 2005 ; Derubertis F.R et al., 2005]. Elle produirait en effet 90 % des ROS cellulaires. Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III [Turrens., 1997 ; Cadenas et al., 2000 ; Andreyev A.Yu., 2005] (Figure 9).

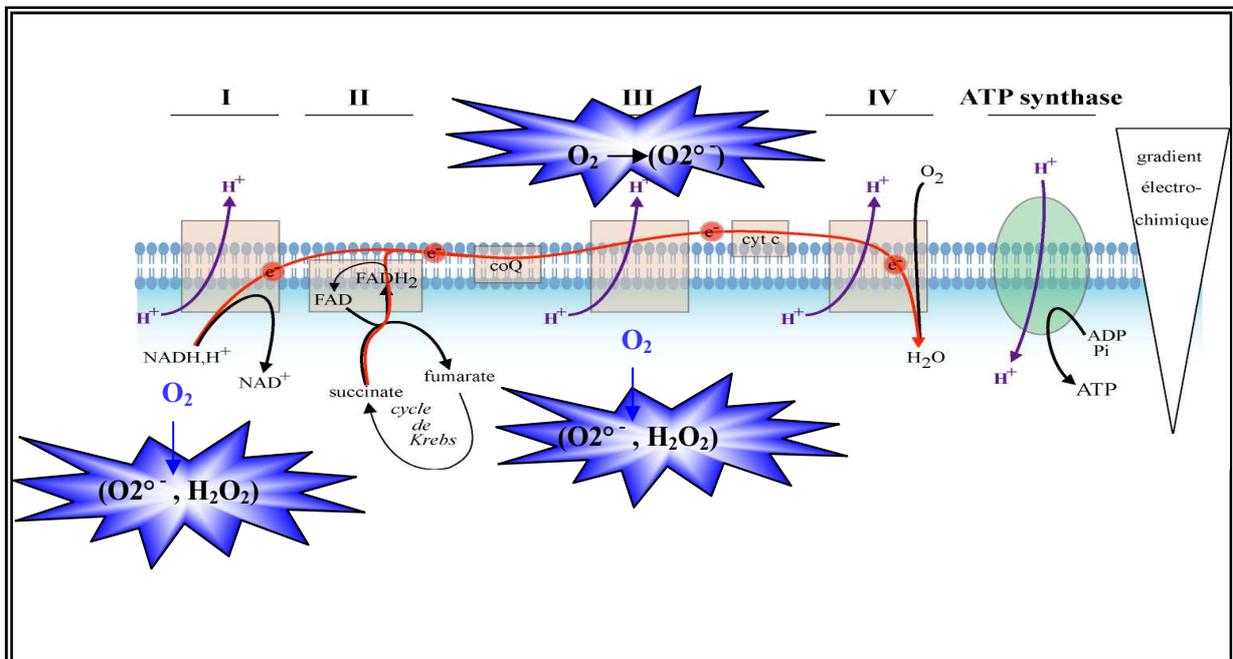


Figure 09 ■ Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire

[Turrens., 1997].

Dans le complexe III, la fuite d'électrons a lieu au cours du cycle du co-enzyme Q (Figure10). Au cours de ce transport, Une molécule Co-Q et une molécule Co-QH₂ se fixent au complexe III en 2 sites. Co-QH[•], instable, est capable de réagir avec les molécules d'oxygène, générant l'anion superoxyde. Dans ce cas, la demi-vie du radical ubisemiquinone (Co-QH[•]) est déterminante. Si la chaîne tourne lentement la demi-vie des intermédiaires augmente (comme celle de Co-QH[•]), favorisant la production de superoxyde.

A l'inverse, une vitesse plus élevée diminuera la demi-vie de Co-QH^\bullet et la probabilité de fuite d'électrons. [Chen et al., 2003].

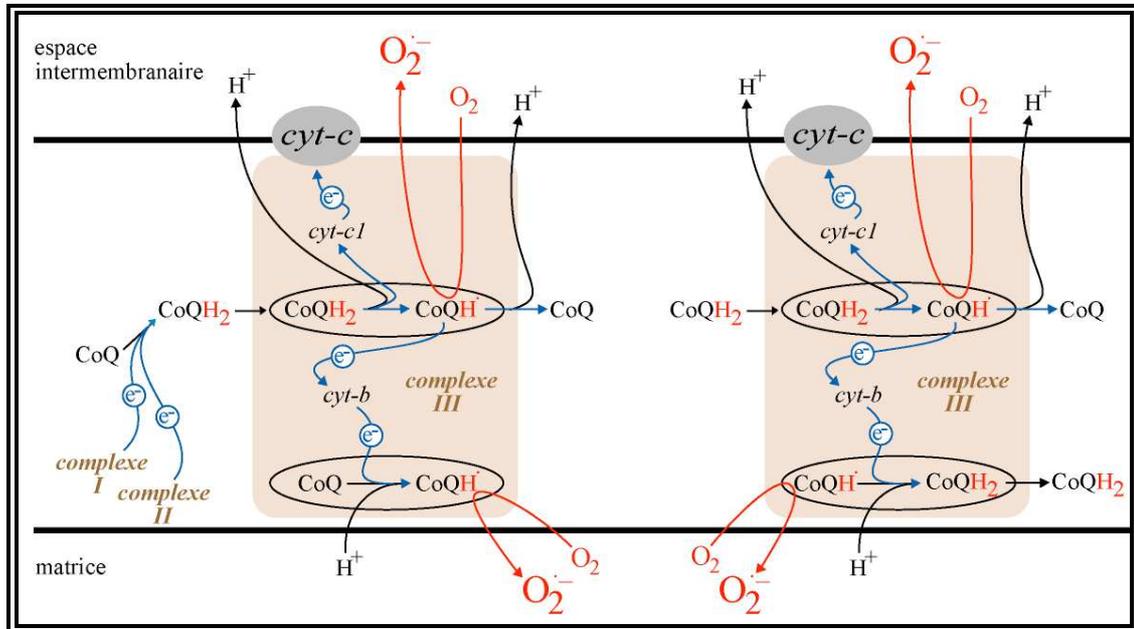


Figure 10 ■ Production des ROS par le complexe III de la mitochondrie.

[Chen et al., 2003].

III-2- Rôle du stress oxydant dans les complications associées au diabète :

Les complications chroniques associées au diabète sont le plus souvent vasculaires. Elles sont catégorisées en deux sortes : macrovasculaires et microvasculaires. Les maladies artéro-coronariennes ou l'athérosclérose, les maladies cérébrovasculaires et vasculaires périphériques représentent des exemples des complications macrovasculaires, alors que les complications microvasculaires regroupent la néphropathie, la rétinopathie et la neuropathie autonome et périphérique [Jenkins A.J., 2007] donc la plus part des organes sont susceptibles d'être touchés par les conséquences délétères du diabète et du stress oxydant que ce soit le foie, le pancréas, les reins, les rétines, le cœur et les artères.

III-2-1- L'athérosclérose :

L'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire inflammatoire chronique lentement évolutive de l'intima des grosses et moyennes artères [Beaudeau J.L et al., 2005 ; Werstuck G.H., 2005]. Cette maladie est associée à un dysfonctionnement endothéliale [Beaudeau J.L et al., 2005]. et à une accumulation des lipides dans les artères [Werstuck G.H., 2005].

Les progrès réalisés durant ces dernières années dans la compréhension des événements conduisant au développement de cette pathologie ont révélé le rôle essentiel joué par le stress oxydant [Beaudeau J.L et al., 2005] notamment celui engendré par le diabète sucré.

L'activation de certaines voies métaboliques par l'hyperglycémie (PKC, voies des polyols...etc.) augmente la production des ROS intervenant dans le processus d'endommagement de l'endothélium vasculaire qui aboutit à l'augmentation des protéines d'adhésion, des facteurs chimiotactique recrutant les monocytes et les lymphocytes T, ainsi que l'augmentation de l'infiltration des lipoprotéines (essentiellement les LDL) à l'intima favorisée par la modification de la perméabilité endothéliale. Tous ces facteurs qui s'ajoutent à la diminution du NO suite à l'inactivation du NOS (Monoxyde d'azote synthase) par la glycation non enzymatique s'unissent pour promouvoir l'athérosclérose suivant des mécanismes initiés par le stress oxydant induit par l'hyperglycémie [Meagher E et al., 2001 ; Johnstone et al., 2005 ; Beaudeau J.L et al., 2005 ; Werstuck G.H., 2005].

III-2-2- La néphropathie :

Des études expérimentales récentes ont mis en évidence le rôle de l'hyperglycémie dans le développement et la progression de la néphropathie associée au diabète par le biais du stress oxydant [Derubertis F.R et al., 2005 ; Solomon R.J et al., 2005]. Ces études ont révélé la déplétion des antioxydants endogènes comme le glutathion réduit au niveau des reins. Des biopsies réalisées sur des échantillons rénaux des patients diabétiques ont montré l'augmentation de la déposition des AGE (produits de glycation avancée) au niveau de leurs sites spécifiques à travers le cortex rénal ce qui prouve le rôle du stress glycooxydatif dans la pathogenèse des lésions rénales au cours du diabète. Ces résultats sont supportés par d'autres études faites sur un diabète expérimental induit par la STZ et visant à déterminer le rôle des inhibiteurs de la formation des AGE (tel que l'aminoguanidine, l'inhibiteur le plus étudié expérimentalement). Ces inhibiteurs semblent améliorer effectivement les lésions rénales [Derubertis F.R et al., 2005], alors qu'une thérapie utilisant des antioxydants exogènes chez

des rats diabétiques révèle leur effet réno-protectif avec une évidence de réduction du stress oxydant [Winiarska et al., 2008].

III-2-3- Rétinopathie :

La rétinopathie représente les complications oculaires les plus sévères du diabète [Lorenzi M et al., 2005], elle est détectée chez les trois quarts des patients diabétiques [Pepa M et al., 2005]. Comme pour les autres complications, le stress oxydant joue un rôle pertinent. Les AGE produits lors d'un état d'hyperglycémie sont quantifiés dans les tissus oculaires des patients et des rats diabétiques ; il s'est avéré que leur taux élevé induit des effets toxiques contre les cellules rétinienne aboutissant à la mort apoptotique via la déplétion de l'activité enzymatique du SOD [Alan W.S., 2005] et l'augmentation du stress oxydant qui inhibe les facteurs antiapoptotiques de survie [Salvayre A.N et al., 2005]. L'activation de la voie des polyols joue un rôle crucial dans la rétinopathie. Tous les types des cellules rétinales humaines et animales contiennent l'AR. Le métabolisme à travers cette enzyme est accéléré par des concentrations élevées en glucose conduisant ainsi au stress oxydant qui génère les précurseurs des AGE amenant à l'apoptose [Lorenzi M et al., 2005].

III-2-4-La neuropathie :

La neuropathie diabétique qui peut affecter le système nerveux centrale et autonome résulte de l'hyperglycémie chronique qui semble déterminer son apparition et progression [Pepa M et al., 2005]. L'un des mécanismes par les quels l'hyperglycémie provoque la dégénérescence neuronal est le stress oxydatif élevé accompagnant le diabète sucré. Les lésions métaboliques et oxydatives provoquent souvent des changements rapides des cellules gliales qui se traduisent par une synthèse excessive des marqueurs astrocytiques [Rahimi R et al., 2005].

IV- Traitement du diabète sucré :

Etant donné l'implication du stress oxydant dans la pathologie diabétique, il est intéressant de considérer l'apport potentiellement bénéfique des antioxydants, mais aussi des substances limitant l'action cellulaire des AGE jouant un rôle dans les complications du diabète.

IV-1- Médicaments antidiabétiques :

Il est d'ailleurs à noter que certains antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète possèdent, outre leurs effets normoglycémians, des propriétés antioxydantes et /ou anti AGE. Le tableau 8 donne quelques exemples de ces médicaments. Généralement, tous ces agents antidiabétiques provoquent différents effets secondaires qui varient selon la classe, ce qui complique le traitement et accroît la souffrance des malades. A cause de leurs effets secondaires très graves, certains médicaments ont été éliminés du marché. Pour diminuer la souffrance des diabétiques, de nouvelles solutions font l'objet de recherche comme la transplantation des îlots ou bien d'autres analogues d'insuline...etc [Gillard P., 2004], ainsi que la phytothérapie qui occupe actuellement l'amont des recherches.

Tableau 08 ■ Agents antidiabétiques avec propriétés antioxydantes étudiées avec le diabète sucré.

Médicaments	Mécanisme d'action :	Références :
Glibenclamide	Scavenger des radicaux libres.	
Allopurinol	Inhibition de la xanthine oxydase	
Metformine	↓ l'activité xanthine oxydase, Scavenger des radicaux libres, Inhibition de la formation des AGE, ↑ l'activité des GPx et SOD dans les érythrocytes.	[Rahimi R., 2005]
Carvedilol	Scavenger des radicaux libres, inhibiteur de la peroxydation lipidique, préservateur des système antioxydant naturels dans l'organisme.	
Pyridoxamine	Inhibition de la formation des AGE et des ALE , inhibiteur de la peroxydation lipidique et la glycation protéique.	
Troglitazone	Homéostasie du glucose, inhibe la peroxydation lipidique et l'oxydation des LDL.	
Gliclazide	↑ PAT du plasma ↑ activité du SOD la concentration des thiols, ↓les isoprostanes	[Beaudeau L., 2005]
Metformine :	↓AGE , ↓MDA, ↑ l'activité du Cu, Zn-SOD, du catalase et la concentration duGSH	
Aminoguanidine	Antagoniste des récepteurs des AGE, chélateurs des ions de transition.	

IV-2- Les antioxydants :

Des études variées ont montré que les vitamines et les suppléments antioxydants peuvent aider à diminuer les marqueurs indicatifs du stress oxydant et de la peroxydation lipidique chez les sujets et les animaux diabétiques [RahimR., 2005]. Parmi ces antioxydants étudiés avec le diabète on note la **vitamine E** qui baisse la glycosylation des protéines et l'insulino-résistance avec son effet préventif de l'athérosclérose [Thomas S.R and Stocker R., 1999], la **vitamine C** qui diminue le taux de l'hémoglobine glyquée et améliore l'action de l'insuline [Nicolosis R.J., 1999], le **vanadium** inhibant la peroxydation lipidique au niveau du pancréas [Krzystek-Korpacka M et al., 2007], le **zinc** et le **sélénium** qui font augmenter l'activité des enzymes antioxydantes et le taux de GSH dans le foie et le cerveau [Tessier D.M et al., 2008] et les β - carotènes qui diminuent la susceptibilité des LDL à l'oxydation, et améliore les taux de GSH et l'activité des GPx [Oranje W.A et al., 2000 ; Renard C and Obberghen E.V., 2006].

Du fait que les antioxydants agissent en synergie et de façon à éviter un éventuel déséquilibre de la balance antioxydants/prooxydants, il est souvent souhaitable de les administrer en association [Opara E.C., 2002].

IV-3- La phytothérapie du diabète « l'avenir thérapie » :

Travailler sur les plantes est la bonne voie par la quelle commencent les recherches scientifiques visant à trouver de nouvelles substances antidiabétiques naturelles avec effets antioxydant et pour remplacer celles synthétiques.

Depuis longtemps, la phytothérapie du diabète a pris sa part que ce soit dans la médecine traditionnelle ou la recherche scientifique. Citons à titre d'exemple quelques plantes médicinales traditionnellement utilisées et scientifiquement évaluées pour leur activité antidiabétique : *Zygophyllum cornutum* [Perez.C., 1958], *Centaurea corcubionensis* [Chucla M.T., 1987]¹, *Juniperus communis* [Sanchez de Medina F et al., 1993], *Trigonella foenum* [Shani F et al., 1974], *Acacia farnesiana* [Wassel et al., 1992] et plusieurs d'autres.

Actuellement, avec l'émergence de la notion du stress oxydant qui semble jouer un rôle primordial dans les complications et les lésions des organes associées au diabète [Srinivasan K.N., 1997 : Vinik A., 2002 : Gupta RK., 2008], les plantes antidiabétiques ont pris un grand intérêt comme source énorme d'antioxydant [Halliwell B. 2009]. Des études faites sur des plantes médicinales ont révélé leur effet antidiabétique accompagné de leur effet

antioxydant élevé, ce qui donne plus d'espoir pour prévenir et/ou guérir le diabète et ses complications. Le tableau 9 donne quelques exemples de ces études et leurs résultats.

Tableau 09 ■ Plantes antidiabétiques avec effets positifs dus à leur propriété antioxydante.

<i>Plante (nom scientifique)</i>	<i>Effets</i>	<i>Références</i>
<i>Anoectochilus formosanus.</i>	↓PL rénale, ↑GSH rénal et activité du catalase	Shih C.C et al., 2001.
<i>Allium sativum</i>	scavenger des radicaux libres, ↓PL, ↑GST, ↑SOD des rein et du foie.	Anwar M.M et al., 2003.
	Activité hypolipidémique et antidiabétique.	August K.T et al., 1996.
<i>Aloe vera</i>	↓PL, ↑GSH, SOD, CAT, GPx et GST du foie et des reins	Rajasekaran S et al., 2005.
<i>Vitis vinifera</i>	↓PL, ↑GSH pancréatique, scavenger des radicaux libres	Abdollahi M et al., 2004.
<i>Lupinus albus</i>	↑ l'albumine, et l'activité des LDH et AST	Thomson M., 2007
<i>Lycium barbarum</i>	↓PL, ↓lipides	Luo Q et al., 2004
<i>Cassia fustula</i>	↑l'activité du SOD, CAT, GSH-Px et GR dans les tissus cardiaques, ↓PL au niveau du cœur.	Manonmani G et al., 2005.
<i>Viburnim dilatatum</i>	Scavenger des radicaux libres des RL, ↓PL.	Iwaia K et al., 2004.
<i>Thé vert</i>	↓du stress oxydant au niveau du cœur et de l'aort, ↓lipides	Babu P.V.A et al., 2006.

IV-3-1-Etude de la plante sélectionnée « Zygophyllum cornutum Coss » :

En Algérie, plusieurs plantes sont traditionnellement utilisées pour traiter le diabète sucré, parmi lesquelles on note *Zygophyllum cornutum Coss*, objet de notre étude.

IV-3-1-1-Présentation et taxonomie : Zygophyllum cornutum Coss, connue sous le non de « *Bougriba* » est une espèce du genre *Zygophyllum* de la famille des *Zygophyllaceae* distribués dans les régions arides et semi arides de l’Afrique. *Z. cornutum* est répondu principalement en Algérie (Biskra, Elouad), au Maroc et en Tunisie. Nous présentons si dessous sa classification [Quezel P et al., 1962]

Règne : Plante

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Ordre: Zygophyllales

Famille: Zygophyllaceae

Genre: Zygophyllum

Espèce : *Zygophyllum cornutum*



Figure 11 ■ Zygophyllum cornutum Coss [Farid Baba Aissa., 1991]

IV-3-1-2-Description botanique :

C'est une plante vivace qui pousse en broussons ramifiés, à feuilles composées par deux folioles cylindriques et charnues de même couleur que les rameaux. A l'aisselle des feuilles naissent de très petites fleurs blanches à 5 pétales. Les fruits composés de cinq segments cornus au sommet, prennent une coloration ocre-violacé à maturation [Ozenda et al., 1963] Figure 12.

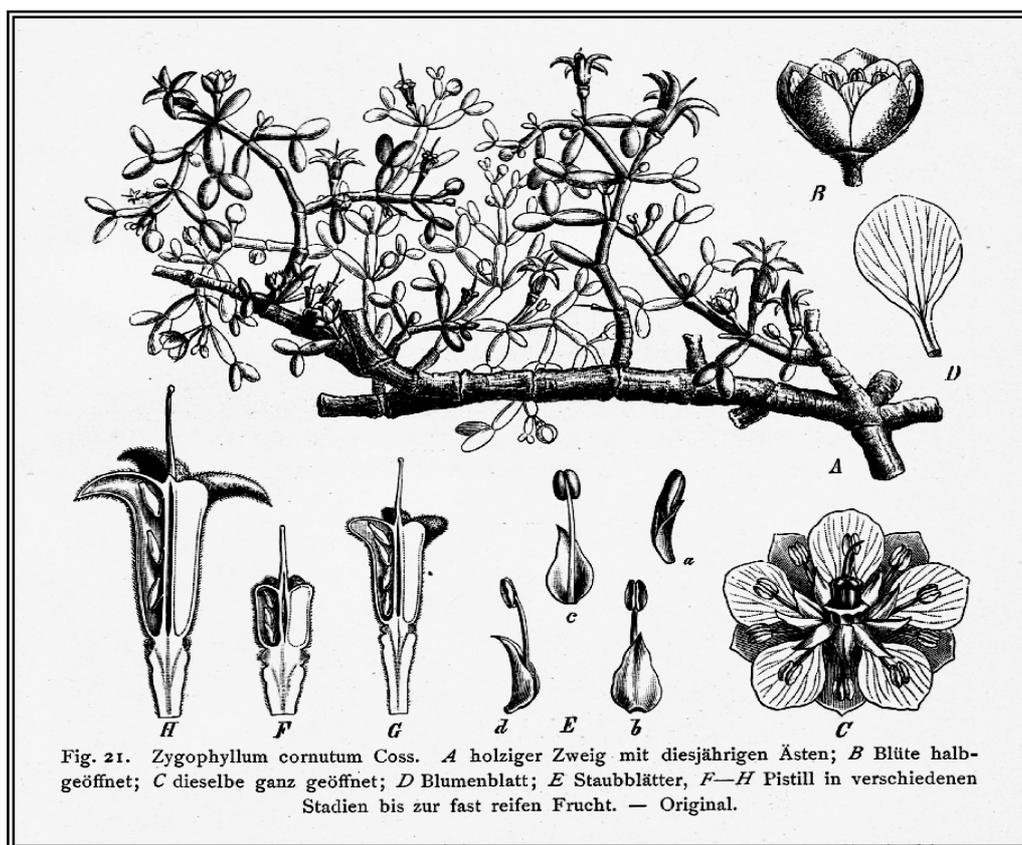


Fig. 21. *Zygophyllum cornutum* Coss. A holziger Zweig mit diesjährigen Ästen; B Blüte halbgeöffnet; C dieselbe ganz geöffnet; D Blumenblatt; E Staubblätter, F—H Pistill in verschiedenen Stadien bis zur fast reifen Frucht. — Original.

Figure 12 ■ *Zygophyllum cornutum* Coss selon Bailey Hortorium. L.H. 2008

IV-3-1-2-Usage thérapeutique : Le *zygophyllum cornutum* est une espèce très répandue dans le Sahara septentrional. Cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle comme remèdes de différentes affections. Elle est très utilisée contre le diabète sucré, les inflammations et les douleurs du tube digestif [Ozenda et al., 1963]. Comme hypoglycémiant, *Zygophyllum cornutum* est utilisée sous forme de poudre ou infusion de sommités fleuries dont le goût est amer et salé. On l’emploie aussi pour les soins corporels des nourrissons et comme cicatrisant externe. Ce mode d’utilisation est connu au Maroc [Farid Baba Aissa., 1991].

IV-3-1-3-Etudes ultérieurs et composition chimique :

Depuis que Perez C a effectué une étude de l’activité antidiabétique de *Zygophyllum cornutum*, Bougriba de Tunisie, en 1958, où son efficacité remarquable testé sur le lapin a été rapporté, cette plante qui fait l’objet de notre étude et selon nos meilleures connaissances n’a jamais été valorisée. Des études faites sur d’autres espèces du genre *Zygophyllum* ont montré leur activité antidiabétique et antihyperlipidémique. L’espèce « *Zygophyllum gaetulum* » étudiée par Jaouhari J.T sur des patients diabétique de type 2 en 1998 et sur des rats

hyperglycémiques en 1999 fait l'exemple. « *Zygophyllum coccineum* » testée sur des rats diabétiques par [Hamdy A et al., 2001] était considérablement hypoglycémique avec un effet amélioratif contre le dysfonctionnement rénal et inhibiteur des dommages du foie associés au diabète. Eddouks M en 2002 a rapporté l'effet de « *Zygophyllum album* » contre le diabète sucré, l'hypertension et les maladies cardiaques.

Concernant les constituants phytochimiques, le zygophylline, l'acide quinovique et les glycosides sont les majeurs composés décrits chez les espèces de *Zygophyllum* [Smati D et al., 2004]. D'autres études ont montré la présence des triterpènes saponines dans certaines espèces du genre « *Zygophyllum* » [Hani A.M et al., 1995 ; Ahmad V.U et al., 1992].

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1- Matériels :

1-1- Matériel végétal :

Nous présentons ci-dessous les informations relatives à la récolte de l'espèce médicinale étudiée dans cette étude, « *Zygophyllum cornutum Coss* ». L'espèce sélectionnée a été collectée dans son habitat naturel entre le mois de mars et avril 2008. La récolte est effectuée au Sahara algérien dans la région d'El-Bayad (wilaya d'El-oued) et identifiée par Mm Khalfallah.N professeur botaniste au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale à l'université Mentouri Constantine. La partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de la plante récoltée a ensuite été séchée à l'abri de la lumière du soleil pendant six semaines puis broyée en poudre pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

1-2- Les animaux :

Cette étude a été réalisée sur des rats males *Wistar albinos* âgés de 2.5 à 3 mois et dont le poids varie de 125 à 170g. Ces animaux sont élevés au sein de l'animalerie du département de la biologie animale à l'université Mentouri ; Constantine. Les rats sont logés dans des cages avec accès libre de nourriture et d'eau et à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité.

Des souris males albinos provenant de l'institut de pharmacie à l'université Mentouri ; Constantine sont utilisées pour des tests de toxicité de la plante.

1-3- Les produits chimiques et les réactifs:

- La streptozotocine, TBA, réactif d'Ellman (Sigma).
- TCA (Fluka química), Acide citrique, citrate de sodium, KCl(Panreact química SA, Espana)
- Le méthanol, la n-butanol (PROLAB MERK, Eurolab).
- kit pour le dosage de l'hémoglobine glyquée (biosystems), tout les autres kits (Abott clinical biochemistry).

1-4- Les équipements :

- Centrifugeuse (Sigma)
- Homogénéisateur (Sigma).
- pH mètre (Hanna)
- Spectrophotomètre de type Shimadzu, china.
- Autoanalyseur, Architect C systems.

II- Méthodes de travail :

II-1- Préparation et étude du matériel végétal:

II-1-1- Préparation de l'extrait méthanolique de « Zygophyllum cornutum Coss»:

L'extrait méthanolique de « *Zygophyllum cornutum* » (EMZC) est préparé par macération de 1200g de la poudre à température ambiante dans du méthanol 95° à raison de 25% (P/V) pendant 15 jours avec agitation de temps en temps. Après filtration sur de la mousseline et du coton, le filtrat est évaporé à 45°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporateur E100). Cette opération est répétée trois fois puis le résidu final obtenu des trois macérations de la même poudre est conservé à + 4°C dans un flacon hermétiquement fermé après qu'il soit pesé pour calculer le rendement de l'extraction.

II-1-2- Etude phytochimique :

II-1-2-1- Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques sont réalisés soit sur la plante fraîche, soit sur une solution de l'EMZC dissout dans du méthanol

➤ ***Mise en évidence des tanins :***

A 2 ml de la solution à tester, ajouter 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes) [Karumi et al., 2004].

➤ ***Mise en évidence des saponosides :***

Test 1 : 5 ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides [Karumi et al., 2004].

Test 2 : Evaporer 10 ml d'extrait méthanolique. Traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique. Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. L'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert confirme la présence des hétérosides stéroïdiques [Benmahdi., 2000].

Test 3 : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques [Edeaga., 2005].

➤ **Mise en évidence des flavonoïdes :**

Traiter 5 ml de l'extrait avec quelques gouttes d'HCl concentré. Ajouter une quantité de tournures de magnésium (laisser agir). La présence des flavones aglycone est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange [Karumi et al., 2004].

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

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani. A 1 ml de l'extrait ajouter 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 . La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) [Edeaga., 2005].

Parmi les composés réducteurs on note les ***coumarines***, la mise en évidence de ces dernières se fait selon la méthode décrite par [Benmehdi., 2000]. Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0,5 ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

➤ **Mise en évidence des alcaloïdes :**

Deux réactifs sont utilisés : réactif de Mayer et réactif de Wagner qui sont préparés comme suit :

Réactif de Mayer : 5g de KI et 1,358g de HgCl_2 solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

Réactif de Wagner : 2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée.

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. Evaporer 25 ml de l'EMZC à sec, ajouter 5 ml d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Mayer et/ ou de Wagner. La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels [Benmahdi., 2000].

II-1-2-2-Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes :

➤ **Dosage des polyphénols totaux :**

Le dosage des polyphénols totaux de l'EMZC a été effectué selon la méthode de bleu de Prusse [Price M.P et Butler L.G., 1977] modifiée par Graham [Graham H.D., 1992]. Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$) par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe^{2+}), ces derniers réagissent avec le chlorure de fer (FeCl_3) et donne le

complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de l'EMZC (dilués dans du méthanol) a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du $K_3Fe [CN]_6$ (0.016 M) puis 1 ml du $FeCl_3$ (0.02M, dans le HCl 0.1N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gomme Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 13) (0-200 $\mu g / ml$) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme du poids d'extrait (mg EAG / g E).

➤ Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes de l'EMZC ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium [Bahorun et al., 1996]; 1ml d'un échantillon de l'EMZC (préparés dans du méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1ml de la solution d' $AlCl_3$ (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (figure14). (0-40 $\mu g/ml$, chacune a été préparée dans le méthanol) et exprimée en milligrammes équivalents de quercétine ou de rutine par grammes du poids d'extrait (**mg EQ / g E**) et (**mg ER / g E**).

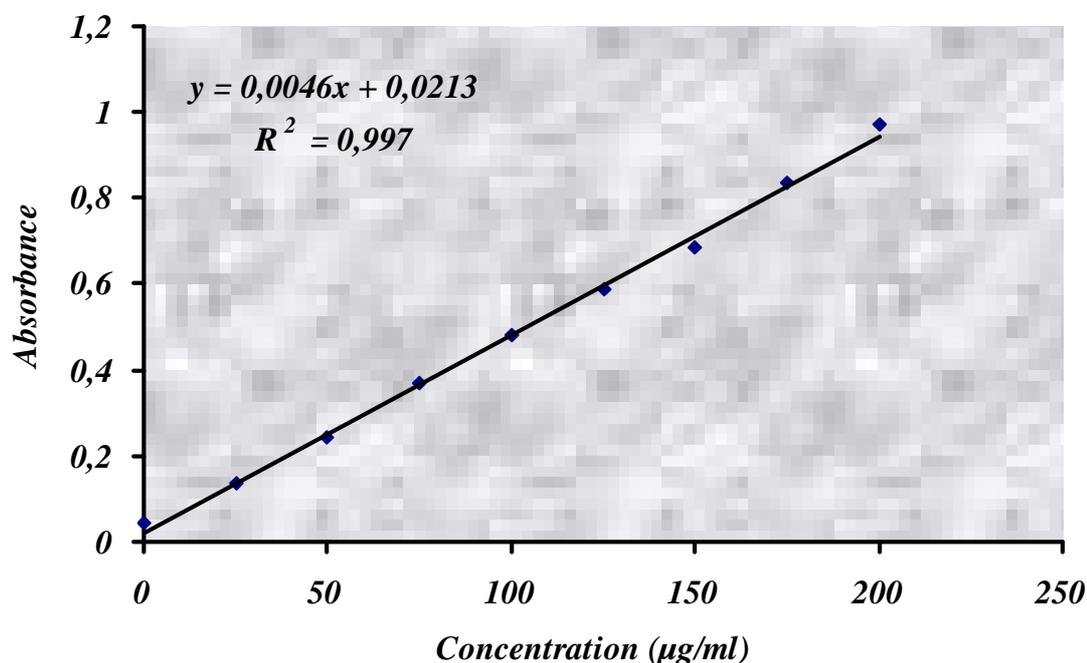


Figure 13 ■ Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point de la courbe représente la moyenne ($n = 3$).

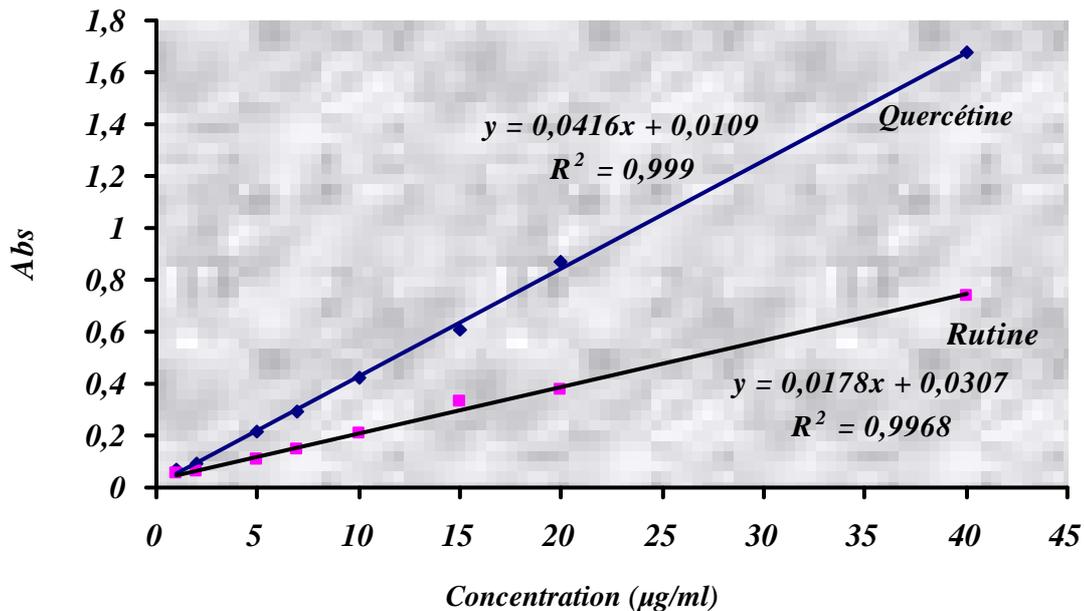


Figure 14 ■ Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine. Chaque point de la courbe représente la moyenne (n = 3).

II-1-3- Etude pharmacologique:

II-1-3- 1- Etude de la toxicité (Test d'innocuité):

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité. Pour cela, quatre doses de l'EMZC ont été testées sur des lots de huit souris albinos de poids homogène. Les doses de **700, 1500, 2500 et 5000mg/kg** sont administrées per os deux fois : le premier jour et le troisième jour du traitement. Les lots ont été mis en observation pendant une semaine en notant les différentes perturbations et les décès dès le premier jour du traitement. Les animaux sont maintenus à température ambiante à raison de huit souris par cage avec accès libre en eau et en nourriture.

II-1-3- 2- L'activité antimicrobienne :

❖ Les souches :

Afin de tester le potentiel antimicrobien de la poudre et de l'EMZC, quatre souches bactériennes une gram positive (*Staphylococcus aureus*) et trois gram négative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *klebsiella sp*), une souche fongique (*Aspergillus phoenicis*) et une levure (*Condida sp*) ont été utilisées. Ces souches utilisées sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme. Elles nous proviennent du laboratoire de microbiologie à l'université Mentouri, Constantine.

❖ *Préparation de l'antibiogramme :*

Dans le présent test, nous avons utilisé la technique de diffusion en milieux gélosés en boîtes de Pétri en adaptant la méthode des puits pour la poudre et la méthode des disques (méthode de Vincent) pour l'EMZC. Les milieux sontensemencés par quelques millilitres de l'inoculum [Cavallo J.D., 2006] de façon à recouvrir toute la surface gélosée. Les boîtes de Pétri sont ensuite mises à sécher 15 min à 37°C.

Dans chaque boîte correspondant à une souche testée, et à l'aide d'emporte-pièce stérile ont été effectués des puits de 6mm de diamètre, recevront chacun 1g de la poudre humidifiée à l'aide de l'eau distillée stérile. Des disques stériles de papier Whatman n °1 et de 6mm de diamètre imprégnés de l'EMZC (ou du méthanol à 95% comme contrôle négatif) sont posés sur la surface de la gélose de chaque boîte. Ces dernières sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

❖ *Lecture des résultats :*

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du puits contenant la poudre à tester et autour des disques imprégnée de l'EMZC ou du méthanol. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix. La souche ayant un diamètre $D < 8\text{mm}$, $9\text{mm} \geq D \leq 14\text{mm}$, $15\text{mm} \geq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (+ +), extrêmement sensible (+ + +) [Duraffourd C et al., 1990 ; Ponce et al., 2003]

II-1-3-3- L'activité antioxydante :

L'activité antioxydante de l'EMZC a été étudiée par le test au *β -carotène / acide linoléique*. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diène conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique [Aslan et al., 2006].

Une solution de β -carotène / acide linoléique a été préparée comme suit: premièrement, 0.5 mg de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 μl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40°C dans le rotavapor. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène (100 ml / min / 30 min) ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350 μl de l'EMZC (2 mg / ml, dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec le BHT (2 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol comme contrôle négatif. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA %) a été calculé ainsi:

$$\text{AA \%} = (\text{A}_E / \text{A}_C) \times 100$$

A_E : absorbance en présence de l'extrait

A_C : absorbance en présence du contrôle positif BHT

Remarque: les valeurs de AA % prises pour la comparaison sont ceux calculées à 24 h.

II-1-3-4- L'effet scavenger :

L'activité anti-radicalaire de l'EMZC a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine [Cuendet et al., 1997; Burits and Bucar., 2000]. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations de l'EMZC ont été incubés avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Les résultats obtenus pour l'EMZC ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par l'EMZC a été calculé comme suit:

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A_E: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC₅₀) de l'EMZC a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg / ml et comparée avec celle du BHT.

II-2-Investigations expérimentales sur les animaux:

II-2-1- Test de l'activité hypoglycémiant sur des rats normo-glycémiques :

Afin de tester l'activité hypoglycémiant de l'EMZC, une dose de 700mg/kg est administrée per os aux rats normo-glycémiques étaient à jeun depuis 16 heures. A l'aide d'un glucomètre, la glycémie est déterminée immédiatement après l'administration de l'extrait (t₀), puis après 2 et 4 heures. Le pourcentage de la variation de la glycémie par rapport à la glycémie initiale (t₀) est calculé à 2 et 4 heures. Des rats traités avec 10ml/kg d'eau physiologique à 0.9% sont utilisés comme contrôles.

II-2-2-Test de l'activité anti-hyperglycémiant:

Afin de tester l'activité anti-hyperglycémiant et de choisir une dose à effet remarquable de l'EMZC, on a évalué l'effet anti-hyperglycémiant de trois doses croissantes 100, 400, 700mg/kg pendant deux heures.

- ***Induction de l'hyperglycémie*** : L'hyperglycémie est provoquée par l'administration de glucose aux rats à raison de 4g/kg per os selon la méthode de [N'Diaye M et al 2008].
- ***Protocole du traitement des rats*** : Pour ce test, un total de 20 rats répartis en quatre lots à cinq rats est traité ainsi :

Lot1 : Représente le groupe contrôle qui reçoit 10 ml/kg d'eau physiologique (EP) per os + 4g/kg de glucose après 90 minutes.

Lot2 : Reçoit 100mg/10 ml/kg de EMZC per os + 4g/kg de glucose après 90 minutes.

Lot3 : Reçoit 400mg/10 ml/kg de EMZC per os + 4g/kg de glucose après 90 minutes.

Lot4 : Reçoit 700mg/10 ml/kg de EMZC per os + 4g/kg de glucose après 90 minutes.

La glycémie des quatre lots est évoluée à l'aide d'un glucomètre sur un intervalle de 30 minutes pendant deux heures.

II-2-3-L'étude sur les rats diabétiques :

II-2-2-1-Induction du diabète sucré chez les rats :

Le diabète sucré est induit chez des rats maintenus à jeun pendant une nuit par une injection intrapéritonéale unique d'une solution de streptozotocine à raison de 55mg/kg. La solution de la streptozotocine est fraîchement préparée dans une solution froide de tampon citrate 0.1M (pH 4.5).

La streptozotocine est capable d'induire une hypoglycémie fatale résulte d'une sécrétion pancréatique massive de l'insuline [Palsamy P et Subramanian S., 2008]. Après l'administration de la streptozotocine et pour prévenir son effet fatal, les rats reçoivent une solution glucosée à 5 % pendant 48 heures. Généralement, le diabète se stabilise chez les rats après trois jours de l'injection. Après 72 heures de l'administration de la STZ, la glycémie est mesurée à jeun à l'aide d'un glucomètre [Chandra A et al., 2007]. Les rats qui ont montré une glycémie supérieure à 200 mg/dl ont été sélectionnés [Singh N et al., 2005] et répartis en trois groupes représentant les groupes diabétiques.

II-2-3-2-Protocole du traitement des animaux :

Dans cette étude, 35 rats Wistar albinos (21 rats diabétiques et 14 rats normaux) sont utilisés. Les rats sont répartis en cinq groupes à sept :

1. Lot1 : Groupe normal control (NC), reçoit 10 ml/kg d'eau physiologique 0.9% per os, et une fois par jour pendant 6 semaines.
2. Lot2 : Groupe normal traité (NT), reçoit 700 mg /10ml/kg d'EMZC per os, et une fois par jour pendant 6 semaines.
3. Lot3 : Groupe diabétique control (DC), reçoit 10 ml/kg d'eau physiologique 0.9% per os, et une fois par jour pendant 6 semaines.
4. Lot4 : Groupe diabétique traité (DT), reçoit 700 mg /10ml/kg d'EMZC per os et une fois par jour pendant 6 semaines.
5. Lot5 : Groupe diabétique traité par l'insuline (DTI), reçoit 5unités/kg d'insuline par voie intrapéritonéale [Chandra A et al., 2007] une fois par jour pendant 6 semaines.

Les animaux sont maintenus à température ambiante à raison de 3 à 4 rats par cage avec accès libre en eau et en nourriture. L'évolution de la glycémie à jeun, ainsi le poids des rats des différents groupes est contrôlée dès le premier jour du traitement et hebdomadairement jusqu'à la fin du traitement. Il est impératif d'ajuster les doses de traitement pour les lots chaque semaine selon le changement du poids afin de maintenir la même dose par kilogramme du poids corporel. Un examen physique est réalisé quotidiennement pour noter les symptômes cliniques.

II-2-3-3- Le sacrifice des animaux :

A la fin de la période du traitement, les animaux sont mis à jeun pendant une nuit. La glycémie à jeun et le poids des rats après le dernier jour du traitement sont notés avant le sacrifice. Après le prélèvement sanguin, les rats sont sacrifiés par décapitation cervicale, puis on passe rapidement à la dissection et au prélèvement des organes.

➤ Préparation du sérum et de l'hémolysat :

Quatre millilitres du sang sont prélevés dans des tubes héparinés par ponction au niveau du sinus retro-orbital de l'œil à l'aide de tubes capillaires à hématocrite. Après centrifugation à 6000 tours / minute pendant 15 minutes, le sérum est séparé puis stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour l'analyse des paramètres biochimiques.

Les érythrocytes sont lavées trois fois par une solution froide de NaCl 0.9% selon la méthode de [Mahmet et al., 2000], puis elles sont utilisées pour la préparation de l'hémolysat en ajoutant de l'eau distillée et en agitant vigoureusement au vortex. Cet hémolysat est utilisé pour le dosage de l'hémoglobine glyquée.

➤ **Préparation des homogénats :**

Après la dissection, le foie, le cœur et les reins de chaque rat sont rapidement prélevés et bien rincés avec l'eau physiologique froide puis séchés sur le papier filtre. Ensuite, chaque organe est coupé en petits morceaux, pesé et enfin homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur de daoune dans une solution de KCl 1.15% à raison de 10% p/v.

L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant est récupéré dans des tubes secs est stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour les dosages tissulaires.

➤ **Préparation des échantillons des coupes histologiques :**

Pour l'étude histologique, des échantillons de foie, du cœur, des reins et du pancréas de tous les lots sont prélevés. Les organes doivent être rapidement prélevés notamment le pancréas pour éviter son autolyse qui s'effectue après quelques instants de la mort de l'animal. Après le rinçage des échantillons avec l'eau physiologique froide, ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 10%.

II-2-4-L'analyse des paramètres biochimiques :

II-2-4-1- Analyse des paramètres sériques : L'analyse des paramètres sériques est effectuée suivant des méthodes enzymatiques et/ou colorimétriques par un auto-analyseur de type (Technicon RA, Opera systems N° de ref. T01-2801-56), alors que l'hémoglobine glyquée est quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu-UV-120-02.

✓ **Dosage de l'hémoglobine glyquée :**

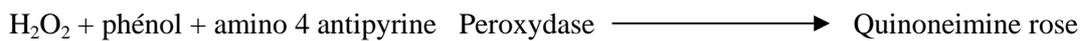
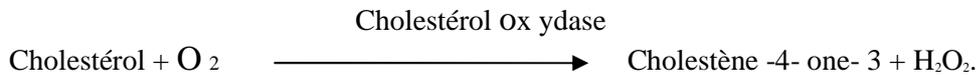
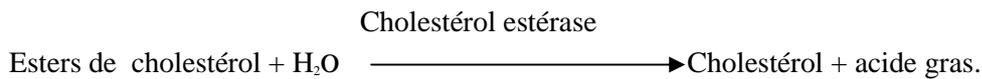
L'hémoglobine glyquée est dosée spectrophotométriquement selon la méthode de [Bissé E et al., 1985]. Après la préparation de l'hémolysat, les hémoglobines sont retenues sur une résine d'échange cationique puis l'hémoglobine glyquée est éluée de manière spécifique après être éliminée par lavage l'hémoglobine A_{1a+b}. L'estimation du pourcentage de la HbA_{1c} est obtenu par lecture de l'absorbance à 415 nm, alors que le calcul est fait à partir de la formule générale suivante :

$$\% \text{ HbA}_{1c} = \frac{A_{\text{HbA}_{1c}} \times V_{\text{HbA}_{1c}}}{A_{\text{Hb total}} \times V_{\text{HbA}_{1c}}} \times 100$$

✓ **Dosage du cholestérol total :**

Dans notre étude, le cholestérol a été déterminé suivant une méthode enzymatique colorimétrique décrite par [Trinder P., 1969]

- **Principe :** Après hydrolyse enzymatique puis oxydation, l'indicateur quinoneimine formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino 4 antipyrine en présence du phénol et de peroxydase permet la quantification du cholestérol selon la réaction suivante :

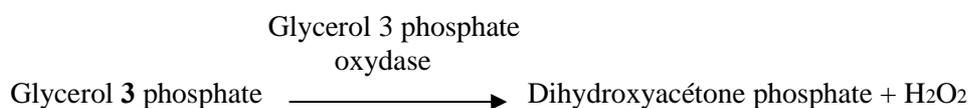
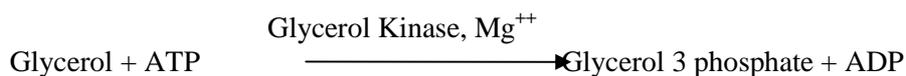
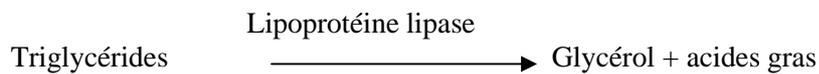


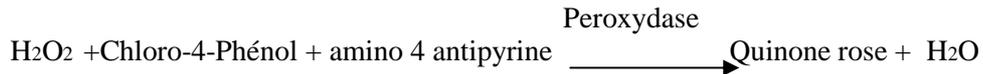
L'intensité de la coloration de la quinoneimine mesurée à 500 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon du sérum.

✓ **Dosage des triglycérides**

- **Principe :**

Le dosage des triglycérides a été effectué suivant une méthode enzymatique colorimétrique [Young D et pestaner L., 1975; Fossati P et Prencipe I., 1982] quantifiant le glycérol libéré après action de la lipase selon les réactions suivantes.





L'intensité de la coloration de la quinone imine mesurée à 500 nm est directement proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans l'échantillon du sérum.

✓ **Dosage du cholestérol HDL :**

- **Principe :** Le dosage du HDL cholestérol s'effectue après précipitation grâce au réactif phosphotungstique associé au chlorure de magnésium (ref.T01-2801-56, 6×5ml) qui consiste à précipiter les LDL et les VLDL. Le HDL cholestérol est alors dosé dans le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total [Grove T.H., 1979].

✓ **Evaluation du cholestérol LDL :**

La formule de Friedewald (1972) permet de calculer le LDL-C à condition que les TG soient inférieurs à 3,5 g/l (4 mmol/l).

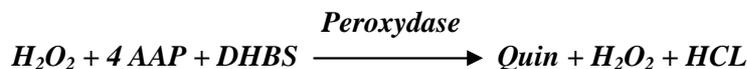
$$\text{LDL-C} = \text{CT} - [\text{HDL-C} + (\text{TG}/5)]$$

- ✓ **Dosage des protéines totales :** Le dosage des protéines totales se fait par la méthode au biuret selon [Henry et al., 1974].

- **Principe :** En solution alcaline, les protéines forment avec les ions cuivriques un complexe coloré dont l'absorbance est mesurée à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des protéines existante.

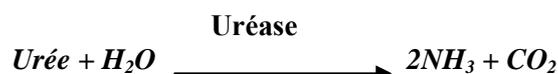
✓ **Dosage de l'acide urique :**

- **Principe :** L'acide urique est dosé par une méthode enzymatique colorimétrique [Fossati P et al., 1980] selon les réactions suivantes :



✓ **Dosage de l'urée :**

Principe : L'urée est dosée en cinétique par une méthode enzymatique [Berthelot M.P.E., 1959] selon la réaction suivante :



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

✓ **Dosage de la créatinine :**

Principe : La créatinine est dosée selon une méthode cinétique colorimétrique, elle forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine

II-2-4-2- Analyse des paramètres tissulaires :

✓ **Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) :**

La quantité des TBARS est exprimée en terme d'un équivalent biochimique qui est le « Malonyl di aldéhyde MDA», un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditée par les radicaux libres. La mesure de l' MDA à l'aide du TBA selon la méthode de [Okhawa et al., 1979] permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant.

- **Principe:** Le dosage de l'MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100°C), entre une molécule d' MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique d'un pigment coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

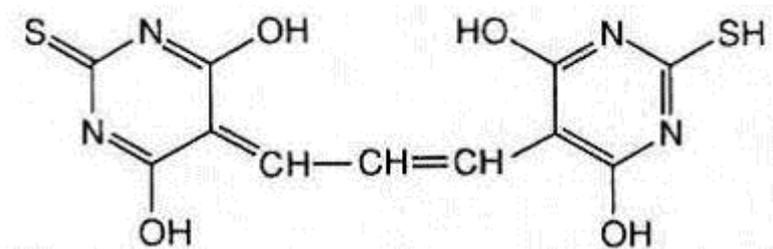


Figure 15 ■ Formation d'adduit MDA – TBA (1 :2)

- **Réactifs et solvants :**

- a- L'acide thiobarbiturique TBA 0.67 %.
- b- L'acide trichloroacétique TCA 20%.
- c- Le n-butanol.

- **Procédure :** La quantité de l'MDA est évaluée au niveau du foie, des reins et du cœur selon la méthode de [Okhawa et al., 1979]. A 0.5 ml de l'homogénat, nous avons ajouté 0.5ml de TCA 20% et 1ml de TBA 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15

minutes à 3000 tours /minutes, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm. Le MDA est exprimé en nmol/g de tissu de l'organe étudié et calculé à partir d'une gamme préparée sous les mêmes conditions avec une solution de « 1,1,3,3-tetraoxypropane » qui donne le MDA après son hydrolyse.

✓ **Dosage de l'activité enzymatique du catalase :**

L'activité enzymatique du catalase est déterminée dans les tissus du foie, des reins, du cœur selon la méthode de [Clairborne., 1985].

- **Principe:** Le dosage de l'activité enzymatique du catalase est basé sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la catalase.
- **Réactifs et solvants :**
 - a- Tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M).
 - b- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 19mmol/ml.
- **Procédure :** Dans une cuvette en quartz de 3 ml, 50µl de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H₂O₂ à 19mmol/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M). Le changement de l'absorbance est suivi pendant deux minutes en prenant les valeurs à t₀ et après chaque minute. L'activité enzymatique du catalase est exprimée en constante de vitesse de la réaction d'ordre 0 par gramme de tissu.
- **Méthode de calcul :** L'activité enzymatique du catalase est calculée selon la formule suivante :

$$K = \frac{2.303}{T} \times \log (A_1/A_2)$$

Dont :

K : Constante de vitesse de la réaction d'ordre 1.

T : Intervalle de temps en minute.

A₁ : Absorbance à t₀

A₂ : Absorbance à t₁

L'activité enzymatique du catalase = K/n (K/g) où n représente la quantité de tissu en gramme dans le volume utilisé de l'échantillon testé.

✓ **Dosage du glutathion tissulaire :**

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode de [Ellman G., 1959] au niveau du foie, des reins, et du cœur.

- **Principe :** La méthode du dosage de glutathion est basée sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5- mercaptobenzoïque ; ce dernier est caractérisé par une coloration jaune intense, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412 nm.

- **Réactifs et solvants :**

- a- L'acide trichloracétique 10%.
- b- Tampon phosphate de potassium pH8 (0.1M).
- c- Réactif d'Ellman ; 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) 0.396g/100ml de tampon.
- d- Glutathion réduit.

- **Procédure :** Le dosage du glutathion réduit dans les tissus s'effectue selon les étapes suivantes :

- a- 0.5 ml de TCA à 10% sont mélangés avec 0.5 ml d'échantillon. Le mélange est agité de temps en temps pendant 15 minutes.
- b- Après 15 minutes, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 2000 tpm.
- c- D'autres tubes sont préparés pour le mélange réactionnel : 100 µl de réactif d'Ellman sont ajoutés à 1.7 ml de tampon, ensuite, 200 µl de surnageant sont additionnés et la lecture se fait après 5 minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

Les concentrations du glutathion réduit sont exprimées en µmol par gramme de tissu. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

- **Préparation de la gamme étalon :**

Une série de 5 concentrations standards de glutathion est préparée à partir d'une solution mère à 10 mM. Pour la préparation de cette solution, on pèse 3.15 mg de glutathion réduit pour 10 ml d'eau distillée. Le système de dilution de ces standards est donné dans le tableau 10.

Tableau 10 ■ La gamme du glutathion réduit standard :

Numéro des standards	Concentration du glutathion réduit	Volume du glutathion standard	Volume de diluant (eau distillée)
4	10 mM	50 µl	0 µl
3	5 mM	50 µl	25 µl
2	2.5 mM	25 µl	25 µl
1	1.25 mM	12.5 µl	100 µl
0	0 mM	0 µl	50 µl

- **Méthode de calcul :** La quantité de glutathion est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Glutathion } (\mu\text{mol /g}) = \frac{\text{DO test} \times 2 \times F \times [\text{standard}] (\mu\text{mol})}{\text{DO standard} \times 0.2 \times n}$$

Dont :

2 : Volume total du milieu réactionnel

F : Facteur de dilution de l'échantillon testé..

0.2: Volume utilisé de l'échantillon testé.

n : La quantité estimée en gramme de tissu dans le volume utilisé de l'échantillon testé

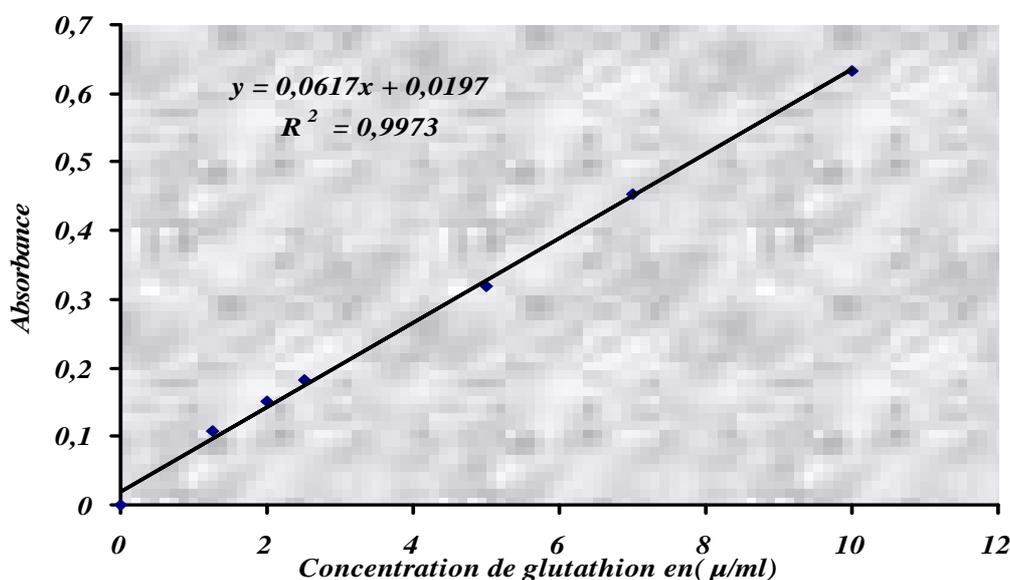


Figure 16 ■ Courbe d'étalonnage de Glutathion réduit GSH.

II-2-5-L'analyse histologique:

Les techniques histologiques passent par plusieurs opérations qui s'enchaînent. La méthode qu'on a utilisée, avec inclusion à la paraffine comporte sept étapes principales :

- **Prélèvement** des pièces dont les conditions sont déjà mentionnées.

- **La fixation** : réalisée dans le formol à 10 % qui se polymérise avec les polypeptides entraînant leur insolubilité.
- **Lavage, déshydratation** et **éclaircissement** : Le lavage est fait dans de l'eau courante, ensuite, on déshydrate les pièces en les amenant graduellement depuis le liquide de lavage jusqu'à l'alcool absolu par des bains successifs, puis on passe à l'éclaircissement en mettant les pièces dans un solvant de la paraffine qui est le xylène dans notre cas.
- **L'inclusion** : Les pièces sont incluses dans un bain de paraffine fondue pendant deux heures. La paraffine va peu à peu pénétrer les tissus en remplaçant le solvant
- **Construction des blocs** : Après la saturation des pièces par la paraffine fondue, on passe à l'inclusion définitive dans de petits moules à fond plat qui servent à donner la forme du bloc. Ce dernier peut se conserver pendant des années sans dommage.
- **Préparation des coupes, étalement sur lame**: Le bloc de paraffine est collé au porte-objet puis débité en tranches minces grâce à un microtome. Les coupes sont collées sur des lames de verre recouvertes d'un film de gélatine (liquide d'étalement). Ensuite, les lames sont séchées à l'étuve 37°C.
- **La coloration** : Les coupes sont colorées par la méthode d'éosine & ématoxiline.
Les coupes sont observées au microscope optique à différents grossissements

II-3-L'étude statistique :

L'étude statistique est réalisée à l'aide du système INSTAT2 MS-DOS en utilisant le test de variance univariée (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey.

Pour l'étude phytochimique, les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD (déviation standard ($n = 3$)). La comparaison est faite par rapport aux contrôles négatifs (en absence d'extrait)

Pour l'étude expérimentale sur les animaux, les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD et en comparant les différents groupes où :

- a : Comparaison des différents lots avec le lot NC
- b : Comparaison des lots DT et DIS avec le lot DC.
- c : Comparaison du lot DT avec le lot DIS.

Ce test nous donne le degré de signification P où on dit que la différence :

- N'est pas significative si $p > 0.05$ (NS).
- Est significative si $0.05 > p > 0.01$ (*).
- Est hautement significative si $0.05 > p > 0.01$ (**).
- Est très hautement significative si $p < 0.001$ (***)

RESULTATS

Les résultats

I- Préparation et étude du matériel végétal:

I-1- Préparation de l'extrait méthanolique de « Zygophyllum cornutum Coss »:

L'opération de l'extraction du matériel végétale à l'aide du méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute de 158g avec un rendement de 13.16 %.

I-2- Etude phytochimique :

I-2-1- Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques réalisés sur l'EMZC révèlent la présence de plusieurs familles de composés. Ces résultats montrent que la plante est très riche en saponosides ; les deux classes sont présentes : les saponosides à génines stéroïdiques et ceux à génines triterpéniques. On note aussi la présence des tanins, des flavonoïdes, des composés réducteurs (coumarines) et des alcaloïdes sels.

Tableau 11 ■ Résultats des tests phytochimiques

<i>Composés</i>	<i>Résultats obtenus</i>
<i>Tanins</i>	<i>(+) : Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3 minutes</i>
<i>Saponosides</i>	<i>Test de détection (+). Tests de caractérisation :</i> <ul style="list-style-type: none"><i>• Présence des hétérosides stéroïdiques (+)</i><i>• Présence des triterpènes hétérosidiques (+)</i>
<i>Flavonoïdes</i>	<i>(+) : Apparition d'une couleur rouge caractéristique des flavones aglycone</i>
<i>Composés réducteurs</i>	<i>(+) : Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert. Test caractéristique des coumarines (+).</i>
<i>Alcaloïdes sels</i>	<i>(+) : Résultat positif avec les deux réactifs (de Mayer et de Wagner)</i>

(+) : Résultat positif

(-) : Résultat négatif

I-2-2- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes :

Le dosage des polyphénols totaux effectué selon la méthode de bleu de Prusse modifiée par Graham (1992) montrent que la plante contient 29.91 ± 0.89 mgEAG/gE (mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait), tandis que la détermination du taux des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium révèle la présence de 7.46 ± 0.53 mgEQ/gE (mg équivalent quercétine par gramme d'extrait) de flavonoïdes soit 15.05 ± 0.29 mgER/gE (mg équivalent rutine par gramme d'extrait).

Tableau 12 ■ Résultats du dosage des Polyphénols totaux et des flavonoïdes

<i>Extrait</i>	<i>Rendement (%)</i>	<i>Polyphénols totaux (mgEAG/g E)</i>	<i>Flavonoïdes</i>	
			<i>mg EQ / g E</i>	<i>mg ER / g E</i>
<i>EMZC</i>	<i>13.16%</i>	<i>29.91 ± 0.89</i>	<i>7.46 ± 0.53</i>	<i>15.05 ± 0.29</i>

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

I-3-Etude pharmacologique:

I-3- 1- Etude de la toxicité (Test d'innocuité) :

Selon les résultats obtenus du test d'innocuité, aucune perturbation n'a été observée et aucun cas de décès n'a été compté pour toutes les doses testées pendant une semaine d'observation ce qui prouve qu'il n'existe aucune toxicité remarquable jusqu'à la dose de 5000mg/kg.

I-3- 2- L'activité antimicrobienne :

Les résultats du test de l'activité antimicrobienne de la poudre et de l'EMZC sur les souches : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *klebsiella sp*, *Aspergillus phoenicis* et *Condida sp* sont illustrés par le tableau 13 et la figure 17.

Tableau 13 ■ Sensibilité des différentes souches vis-à-vis de la poudre et de l'EMZC.

<i>Les souches</i>	<i>Effet de la poudre</i>	<i>Effet de l'EMZC</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+
<i>Escherichia coli.</i>	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-
<i>klebsiella sp.</i>	-	-
<i>Condida sp.</i>	-	-
<i>Aspergillus phoenicis</i>	-	-

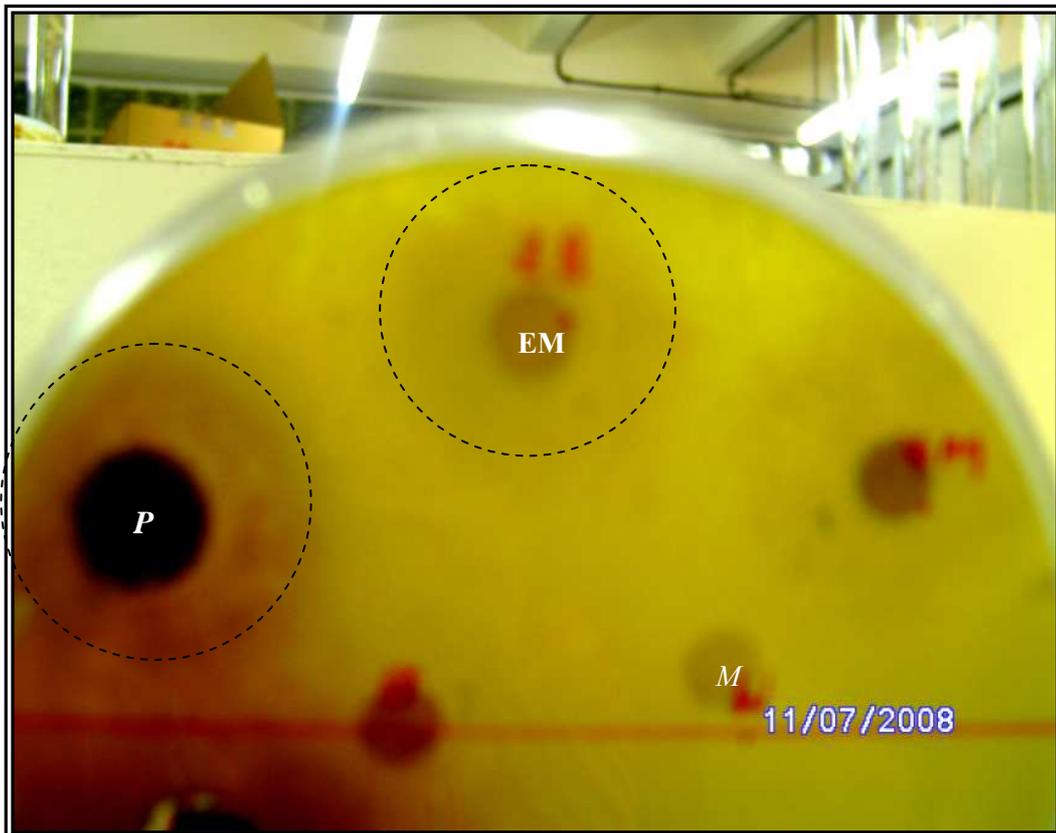


Figure 17 ■ Photo montrant l'effet antibactérien de la poudre (P), de l'EMZC (EM) et du méthanol (M) contre *Staphylococcus aureus*

I-3-3- L'activité antioxydante :

Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante réalisée par le test au β -carotène / acide linoléique qui consiste à évoluer les pourcentages de l'activité antioxydante en fonction du temps sont représentés par la figure18.

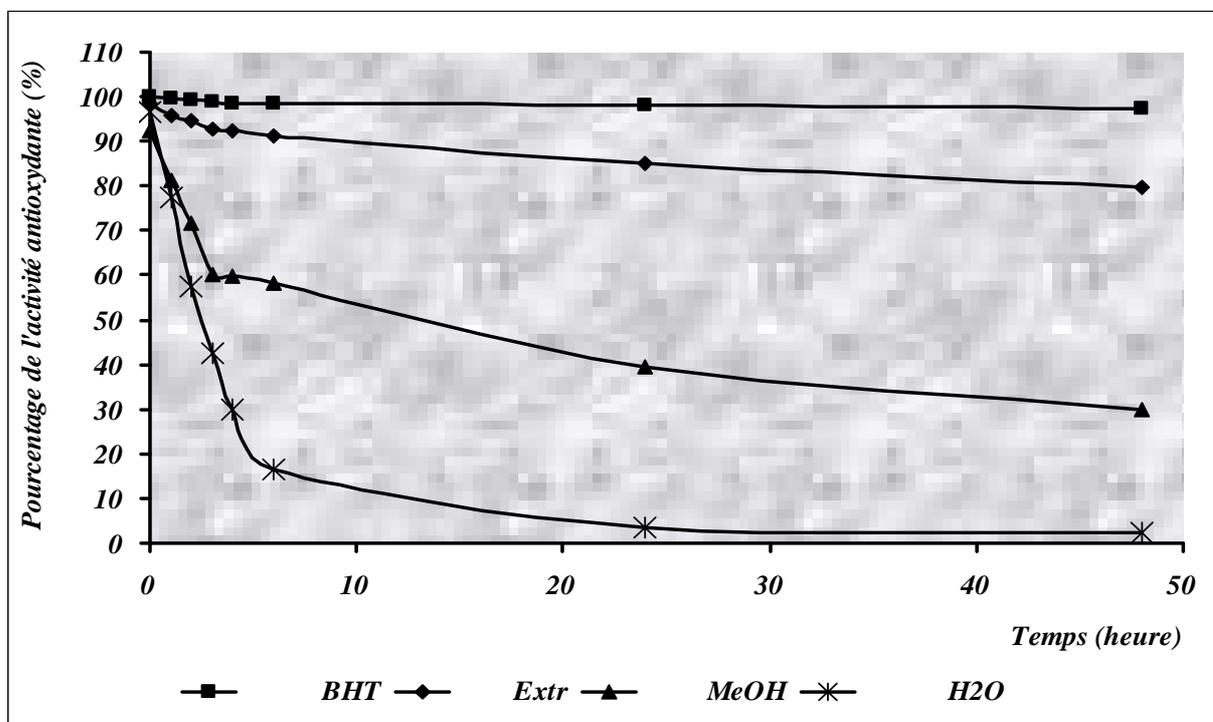


Figure 18 ■ Evolution de l'activité antioxydante de l'EMZC, du BHT, du MeOH et de H2O pendant 48 heures par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Ce test mesure la capacité de l'extrait à inhiber la formation des radicaux libres hydroperoxydes diene conjugués pendant l'oxydation de l'acide linoléique (Tepe et al., 2005). En absence des antioxydants, les radicaux libres formés conduisent à l'oxydation du β -carotène et donc sa décoloration. Par contre, la présence des antioxydants dans l'extrait limite l'oxydation du β -carotène qui garde sa couleur (Tepe et al., 2005).

Après 24 heures d'incubation, le pourcentage de l'activité antioxydante de l'EMZC était de 85.03 ± 0.15 %, résultat très hautement significatif ($p < 0.001$) comparant avec les contrôles négatifs, contre 97.98 ± 0.08 % pour le BHT utilisé comme molécule de référence présentant le contrôle positif (figure19).

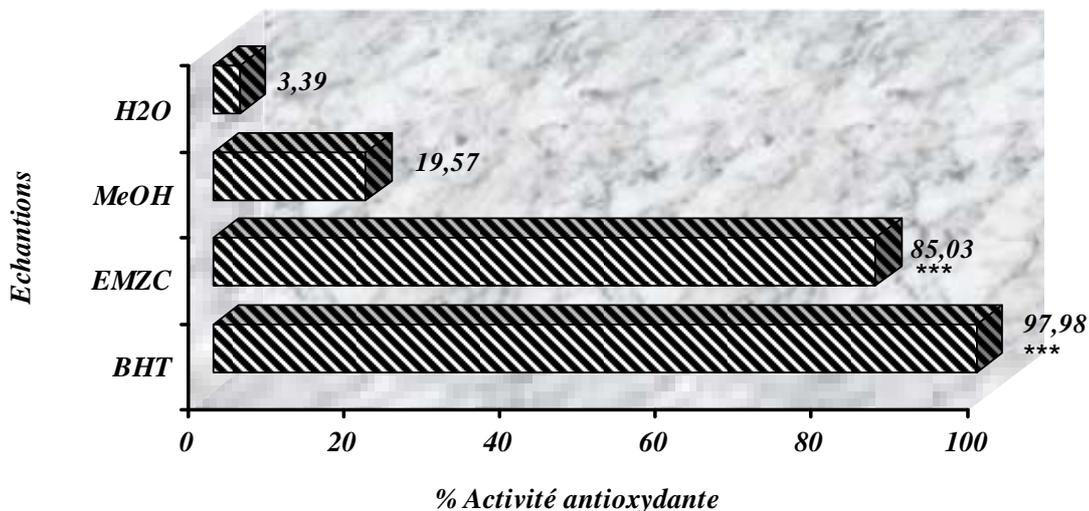


Figure 19 ■ Activité antioxydante des l'EMZC, du BHT, du MeOH et H2O (à 24 h), par le test de β -carotène / acide linoléique. *** $p < 0.001$ comparant avec le contrôle.

I-3-4- L'effet scavenger :

L'effet scavenger a été étudié par le test de DPPH où la cinétique de décoloration de ce radicale a été suivie à 517 nm après addition de 50 μ l de chacune des concentrations de l'EMZC. Le résultat était très hautement significatif ($p < 0.001$, comparant avec le contrôle) et d'une façon dose dépendante (figure 20). Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piègeant 50 % du radical DPPH (IC50) qui était de $870.05 \pm 7.26 \mu\text{g/ml}$ contre $32.92 \pm 0.62 \mu\text{g/ml}$ pour le BHT. On constate que l'effet scavenger de l'EMZC est 26 fois inférieur de celui du BHT.

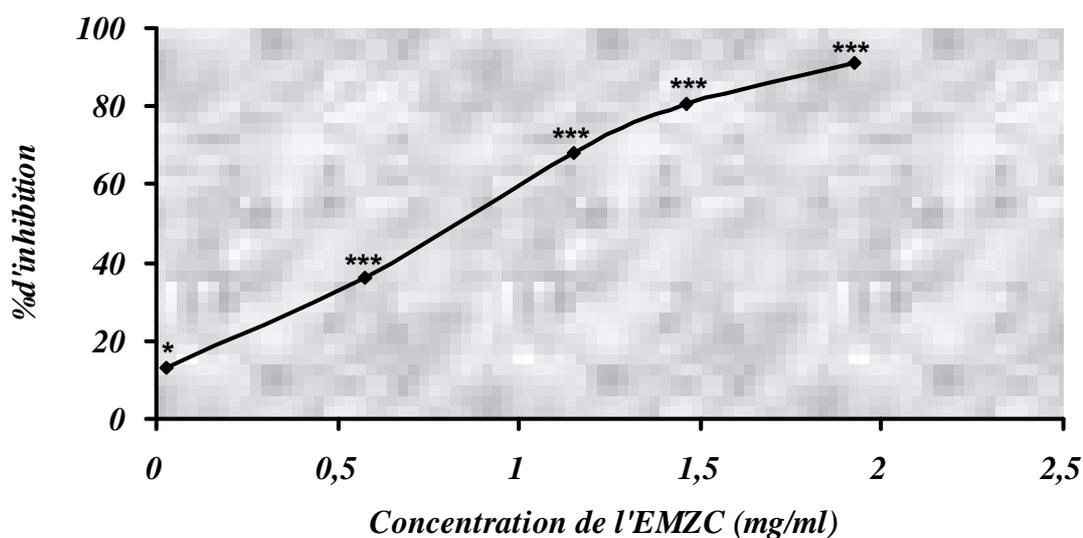


Figure 20 ■ Effet scavenger de l'EMZC sur le radical DPPH. Chaque point représente la moyenne ($n = 3$), $*0.05 > p > 0.01$, *** $p < 0.001$, comparant avec le contrôle.

II-2-Investigations expérimentales sur les animaux:

II-2-1-Test de l'activité hypoglycémiant sur des rats normoglycémiques :

L'administration de l'eau physiologique ne modifie pas la glycémie basale ($97.5 \pm 2.1 \text{ mg/dl}$) des rats au bout de quatre heures d'observation ($94.7 \pm 7.0 \text{ mg/dl}$) ($p > 0.05$), alors que la dose de 700mg/kg de l'EMZC induit une diminution significative ($0.05 > p > 0.01$) de la glycémie basale ($101 \pm 2 \text{ mg/dl}$) après deux heures d'observation ($86.96 \pm 4.3 \text{ mg/dl}$). Cette valeur continue à se diminuer jusqu'à ce qu'elle atteigne ($84.44 \pm 2.8 \text{ mg/dl}$) après quatre heures (figure 21). Les pourcentages de la diminution de la glycémie par rapport à la glycémie basale sont montrés sur la figure 22.

II-2-2-Test de l'activité anti-hyperglycémiant:

La figure 23 montre l'effet de trois doses croissantes de l'EMZC chez des rats rendus hyperglycémiques par gavage de 4g/kg de glucose. Puisque une diminution significative de la glycémie a été observée à la deuxième heure chez les rats normo-glycémiques traités par 700mg/kg de l'EMZC, ce dernier est administré oralement à différentes doses une heure et demi (***1h:30min***) avant l'administration du glucose de manière que l'effet significatif de la dose déjà testée coïncide avec la glycémie maximale des rats hyperglycémiques contrôles au même temps que les animaux testés. Les autres doses sont utilisées pour être comparées à la dose de 700mg/kg afin de choisir la moindre dose avec le meilleur effet.

Chez le groupe de rats contrôle, l'administration de glucose à la dose de 4g/kg per os entraîne une hyperglycémie significative avec un pic qui apparaît au bout de 30 minutes (Figure 23). La glycémie varie en effet de 1.02 ± 0.26 à $2.62 \pm 0.31 \text{ g/l}$ ($p < 0.001$). Chez des rats préalablement traités avec de l'EMZC à différentes doses, l'augmentation de la glycémie obtenue après administration du glucose est moins importante que celle du groupe contrôle pour la dose de 400 et 700 mg/kg, soit 0.9 ± 0.13 à 2.23 ± 0.22 ($0.05 > p > 0.01$) et 0.81 ± 0.18 à $1.68 \pm 0.45 \text{ g/l}$ ($p < 0.001$) respectivement (Figure 23), mais elle reste significative par rapport à l'état basale ($p < 0.001$), alors que l'effet de la dose **100 mg/kg** était non significatif ($p > 0.05$). Donc, on dit que la dose de 700 mg/kg de l'EMZC administrée per os est la plus efficace en prévenant l'hyperglycémie consécutive à l'administration de glucose (4g/kg per os) ($p < 0.001$). Considérant les résultats obtenus par le test de l'activité hypoglycémiant et le test de tolérance, on a choisie la dose de 700 mg/kg pour évaluer l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique de « *Zygodhylum Cornutum Coss* ».

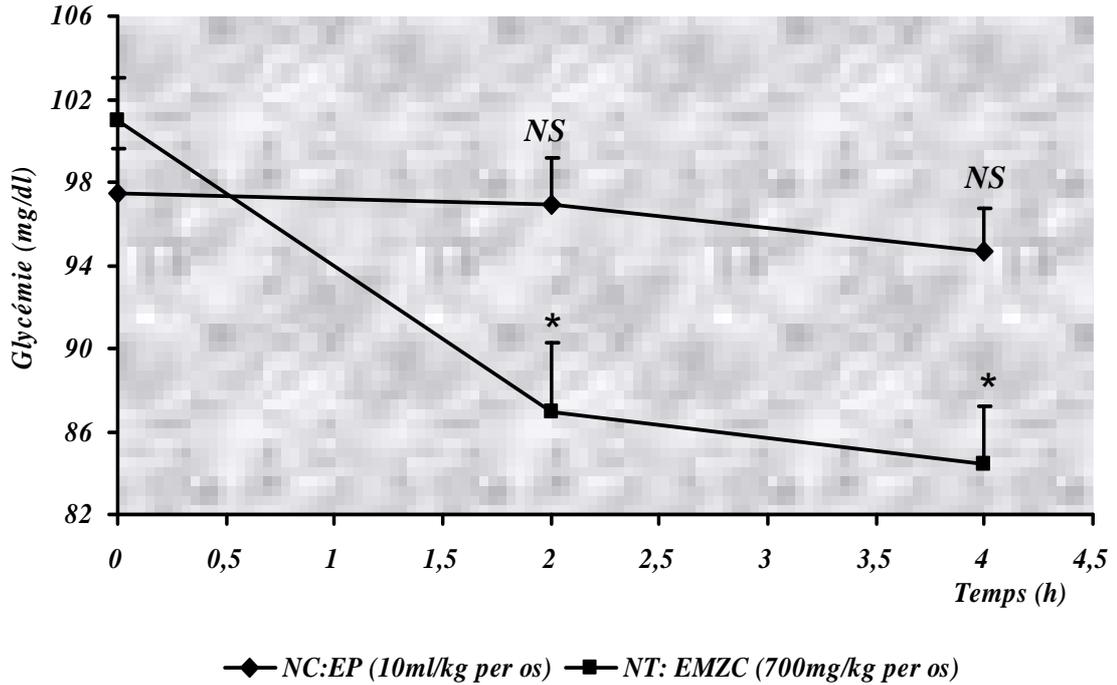


Figure 21 ■ Evolution de la glycémie basale des rats normo-glycémiques traités par 700 mg/kg d'EMZC. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n= 5), NS $p>0.05$, $*0.05>p>0.01$ par rapport à la glycémie basale

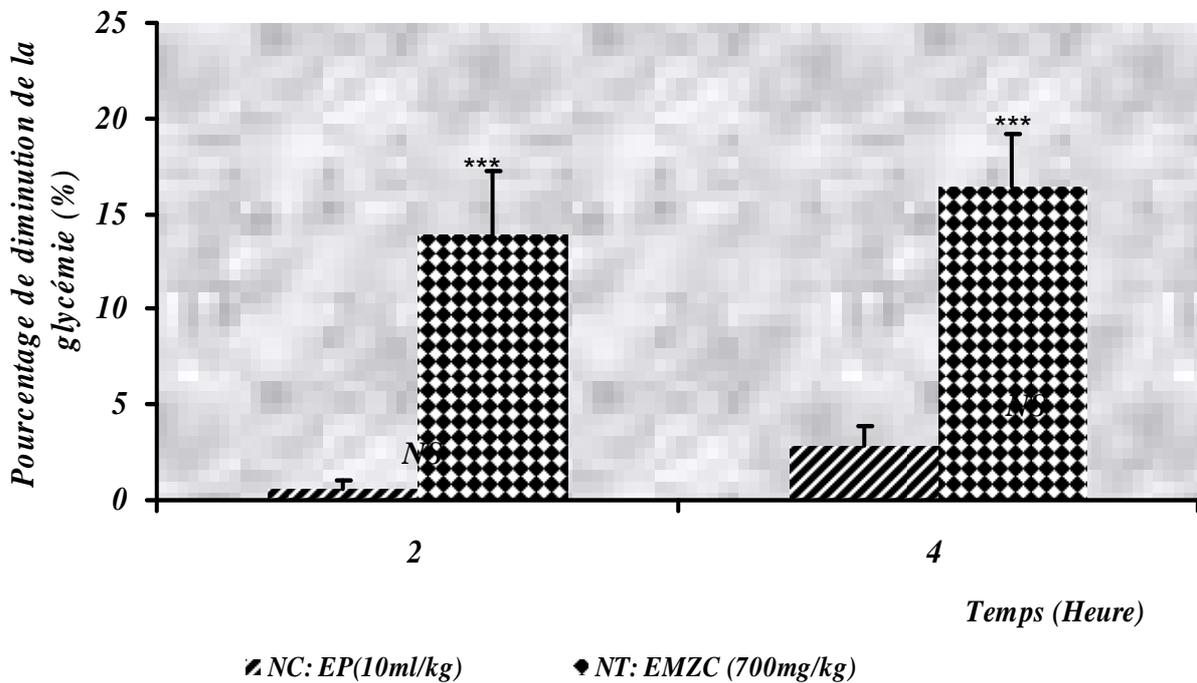


Figure 22 ■ Les pourcentages de la diminution de la glycémie par rapport à la glycémie basale des rats normo-glycémiques traités par 700 mg/kg d'EMZC. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n= 5). NS $p>0.05$, $***p<0.001$

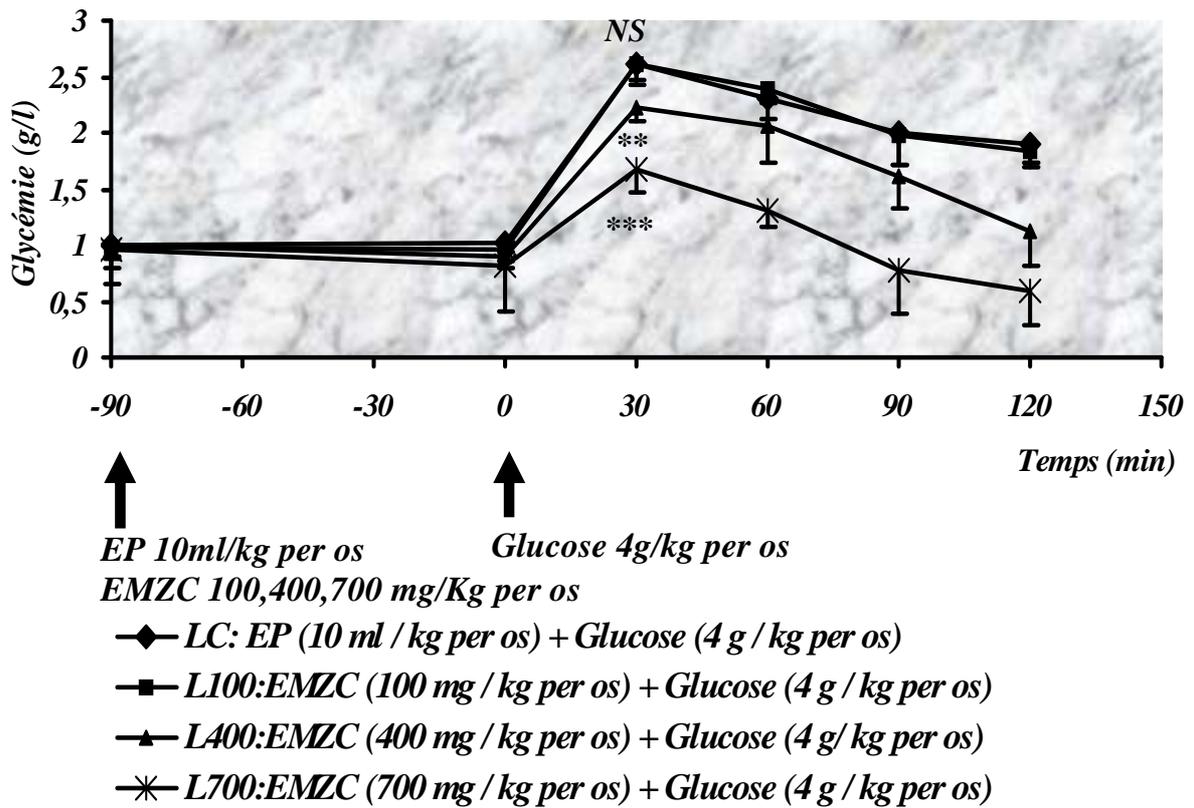


Figure 23 ■ L'activité anti-hyperglycémiant de l'EMZC à différentes doses (100, 400 et 700m g/kg per os). Chaque point représente la moyenne ± SD (n= 5). NS $p > 0.05$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$ comparant au contrôle

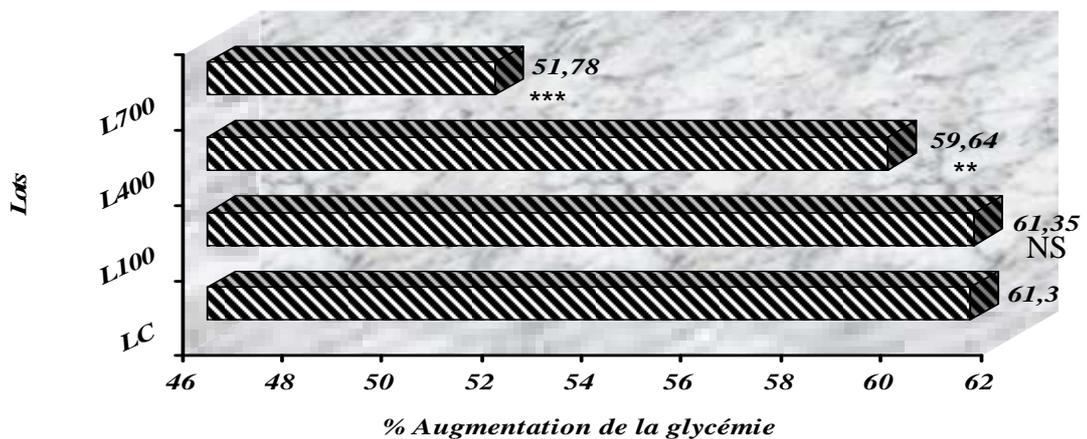


Figure 24 ■ Pourcentage de l'augmentation de la glycémie après l'administration du 4g/kg de glucose. (NS) $p > 0.05$ vs LC, (**) $0.05 > p > 0.01$ vs LC, (***) $p < 0.001$ vs LC

II-2-3- L'étude sur les rats diabétiques :

Après l'installation du diabète, on a commencé le traitement des différents lots selon le protocole précédemment décrit. Durant les premiers jours du traitement, on a noté un état de polyurie chez tous les rats diabétiques par rapport aux rats normaux avec augmentation de la consommation de l'eau et de la nourriture. Après trois semaines de traitement, ces symptômes tendent à se diminuer chez les rats diabétiques traités avec l'EMZC et l'insuline alors qu'il n'y a aucune amélioration chez les rats diabétiques contrôles. Les variations de la glycémie et du poids des rats des différents lots sont notées dès la première semaine, alors que les paramètres biochimiques sériques et tissulaires ainsi que les coupes histologiques sont analysés après le sacrifice des animaux.

II-2-3-1-L'évolution du poids des rats : La variation du poids des rats constitue un paramètre très important. Le suivi régulier des animaux nous a amenés à obtenir les valeurs relatives à la figure 25. Distinctement, une différence entre la croissance des rats diabétiques et celle des rats normaux a été notée dont il y avait une diminution significative du poids corporel des rats diabétiques, alors que cette perte est prévenue chez les rats diabétiques traités avec l'EMZC où on note une augmentation modérée du poids à partir de la deuxième semaine du traitement jusqu'à la fin. Pour l'insuline, l'évolution du poids était un peu perturbée mais la diminution reste non significative. Encore remarquable, c'est que l'EMZC n'a aucun impact sur la croissance des rats normaux.

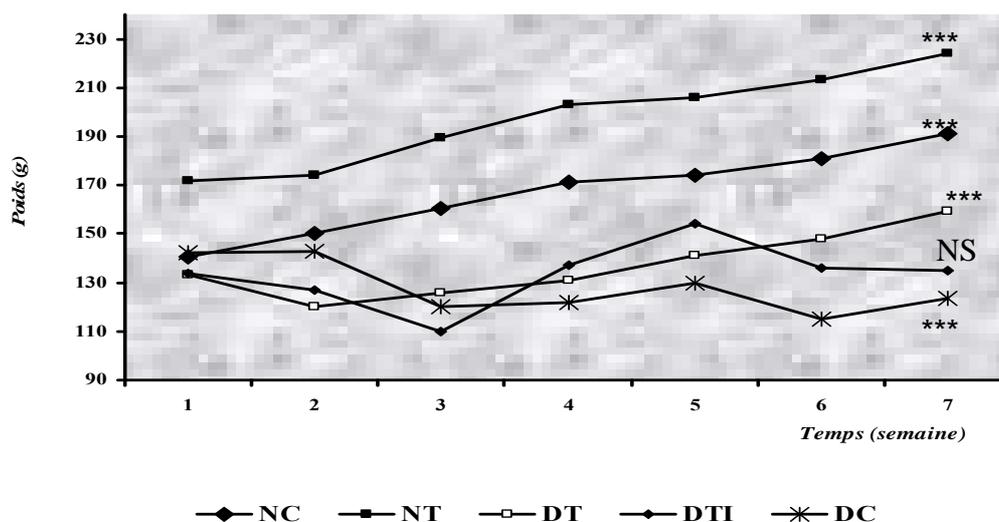


Figure 25 ■ Evolution du poids des rats normaux et diabétiques contrôles et traités durant les six semaines de traitement. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=7)
(NS) $p > 0.05$, * $0.05 > p > 0.01$, (***) $p < 0.001$ par rapport au poids initial.

II-2-3-2-L'évolution de la glycémie des rats :

L'effet de l'EMZC et de l'insuline sur la glycémie des groupes contrôles et expérimentaux sont montrés sur la figure 26. Dès la première semaine du traitement, le groupe des rats diabétiques a montré une glycémie significativement élevée ($p < 0.001$) par rapport aux rats normaux dont elle a dépassé 400 mg/dl jusqu'à la fin du traitement. Pour les lots diabétiques traités, on note une diminution significative ($p < 0.001$) de la glycémie chez les rats diabétiques traités avec l'insuline dès la première semaine et ça continua à se diminuer jusqu'à la sixième semaine où la glycémie est devenue normale. Pour le lot DT avec l'EMZC, la baisse de la glycémie était légèrement perçue, voire non significative ($p > 0.05$) jusqu'à la deuxième semaine, à partir de laquelle elle tend à se diminuer significativement ($p < 0.001$) par rapport au groupe DC jusqu'à la fin du traitement, mais une différence significative ($0.05 > p > 0.01$) par rapport au taux normale a été noté à la sixième semaine. D'une autre part, Il n'existe aucune différence significative ($p > 0.05$) entre les rats normaux contrôles et les rats normaux traités avec l'EMZC.

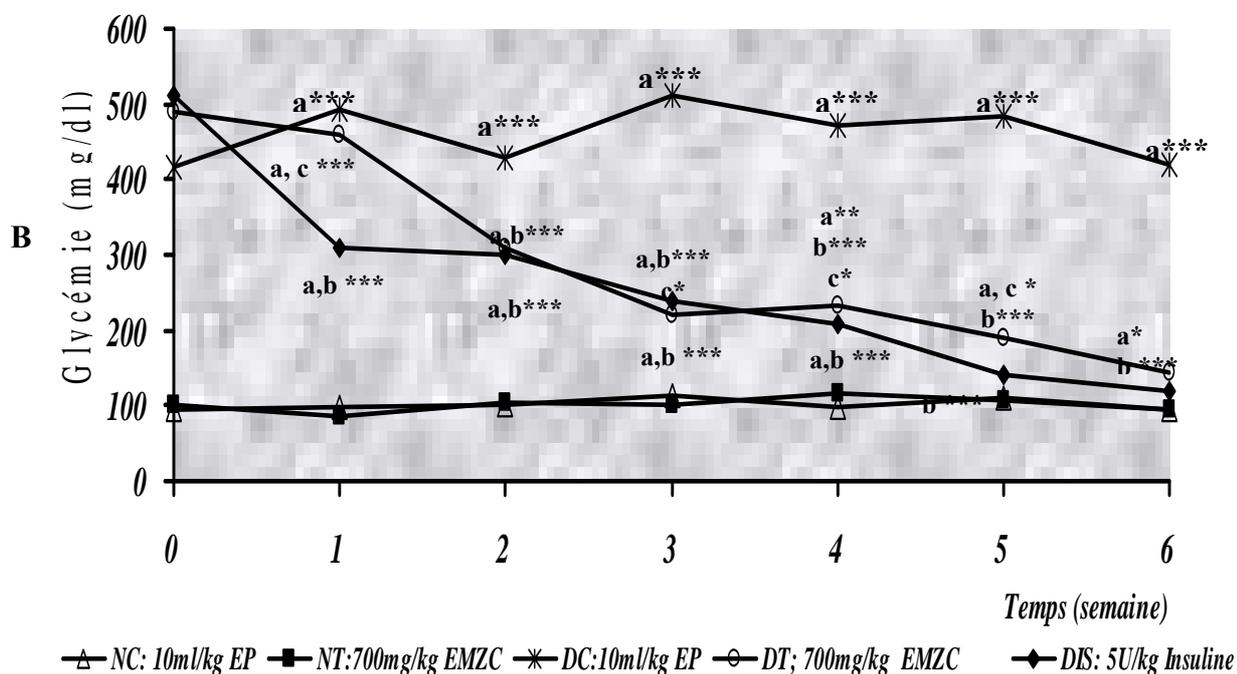


Figure 26 ■ Evolution de la glycémie des rats normaux et diabétiques contrôles et traités durant les six semaines de traitement. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $0.05 > p > 0.01$, (***) $p < 0.001$ (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b : DT et DIS vs DC ; c : DT vs DIS).

II-2-3-3-L'analyse des paramètres biochimiques :

- ✓ **Effet du traitement sur l'hémoglobine glyquée :** La figure 27 présente le pourcentage de l'hémoglobine glyquée chez les différents lots. On note une augmentation significative ($p < 0.001$) du taux de l'hémoglobine glyquée des rats diabétiques (+56.42%) par rapport au rat normaux, alors qu'il a significativement ($p < 0.001$) diminué chez les rats traités avec l'EMZC (-50.28%) et l'insuline (-51.48%), mais la différence reste aussi significative ($0.05 > p > 0.01$) par rapport aux rats normaux. La comparaison entre l'effet de l'EMZC et de l'insuline sur le taux de l'hémoglobine glyquée a montré qu'il n'existe aucune différence significative ($p > 0.05$).

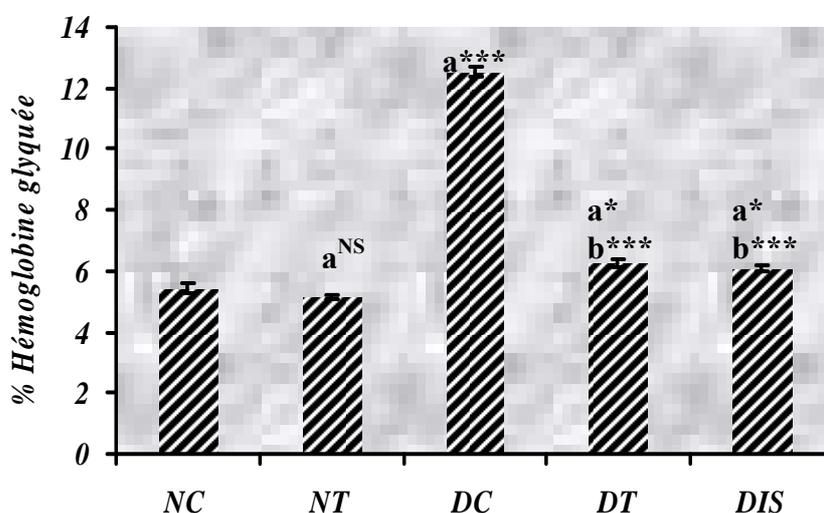


Figure 27 ■ Évaluation de l'hémoglobine glyquée des différents lots après six semaines du traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $0.05 > p > 0.01$, (***) $p < 0.001$ (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b : DT et DIS vs DC ; c : DT vs DIS).

- ✓ **Effet du traitement sur la protéinémie, la créatinine, l'urée et l'acide urique:** Les taux plasmatiques des protéines totales, de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique sont significativement ($p < 0.001$) altérés chez le groupe diabétique par rapport au groupe normale contrôle (-14.5%, +43.4%, +38.36% et +66.67% respectivement). Chez les lots diabétiques traités avec l'EMZC et l'insuline, on note que ces paramètres gardent leurs taux presque normaux avec une différence non significative entre ces deux lots. D'une autre part, le traitement des rats normaux avec l'EMZC n'abouti à aucun changement significatif par rapport au groupe normale contrôle (Figure 28, 29).

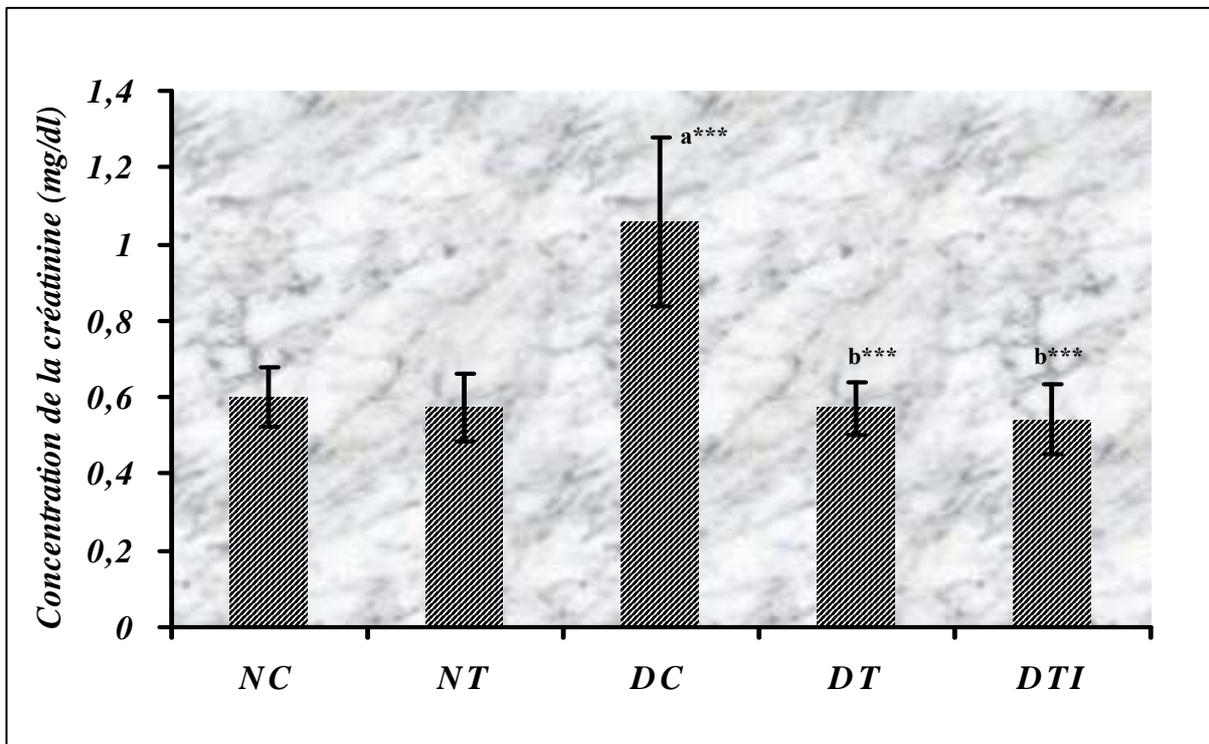
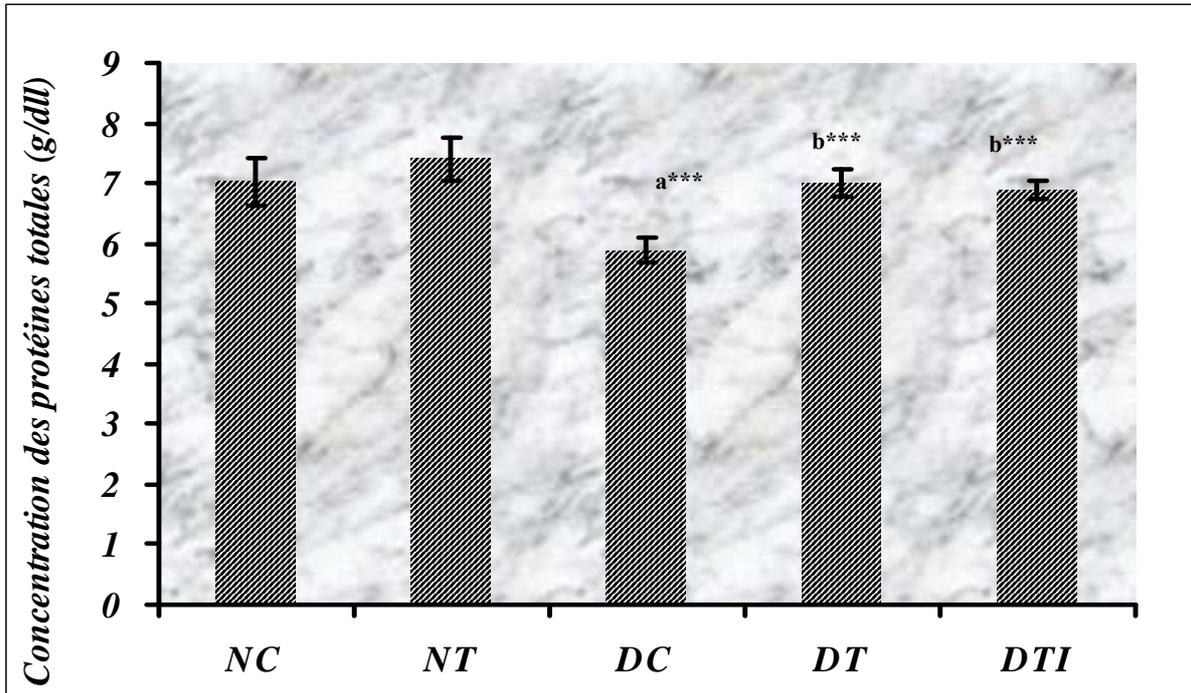


Figure 28 ■ Dosage des protéines totales et de la créatinine des différents lots après six semaines de traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7)
 (***) $p < 0.001$ (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b :DT et DIS vs DC).

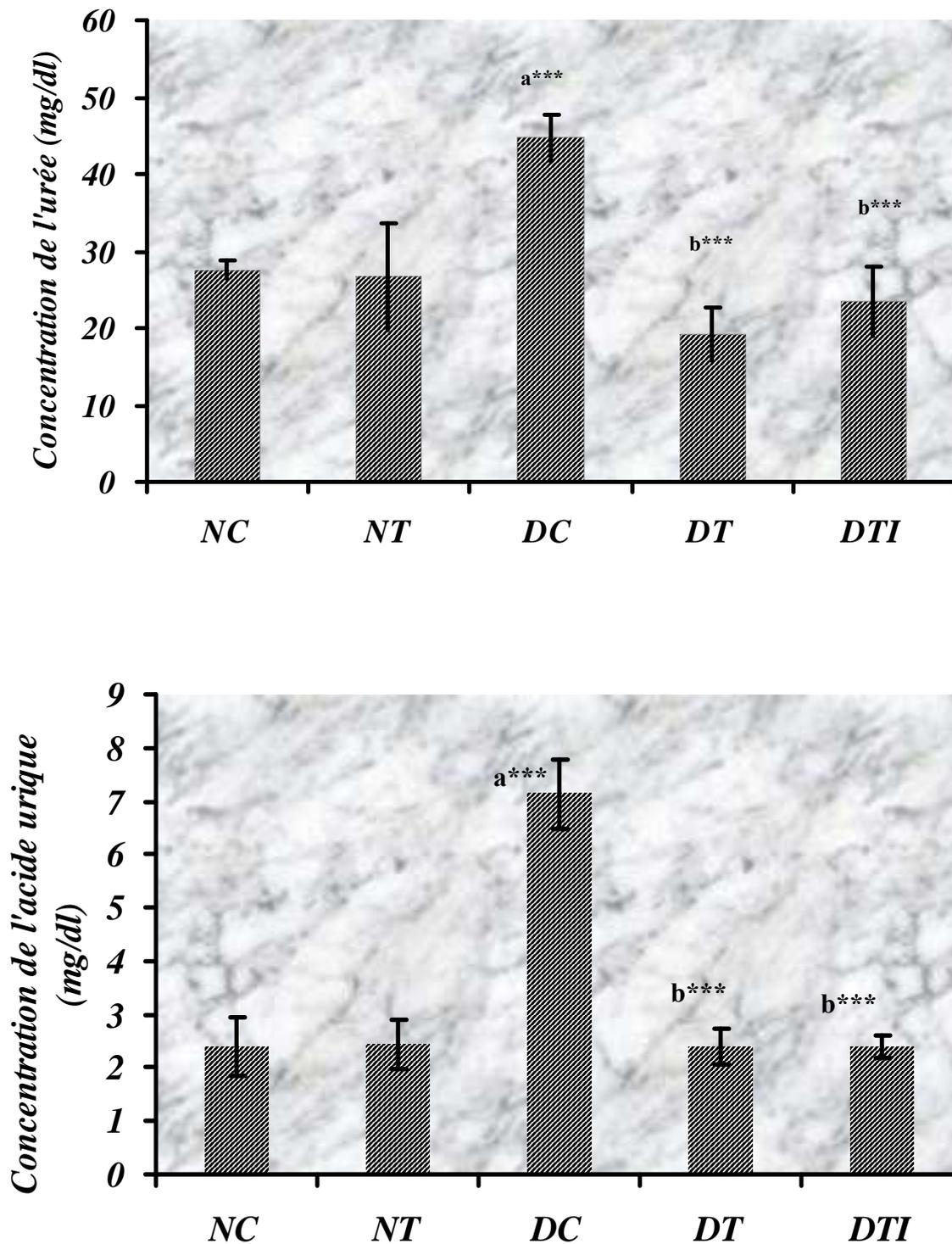


Figure 29 ■ Dosage de l'urée et de l'acide urique des différents lots après six semaines de traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7)
 (***) $p < 0.001$ (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b :DT et DIS vs DC).

- ✓ **Effet du traitement sur le profil lipidique** : Généralement, le diabète sucré est associé à une hyperlipoprotéïnémie [Qi X.Y et al., 2008]. Pour cette raison, quatre paramètres lipidiques ont été évalués, le **CHL-T**, **TG**, **HDL-C** et les **LDL-C**. Les résultats présentés sur les **figures** 30 et 31 montrent que les concentrations plasmatiques du **CHL-T**, **TG** et les **LDL-C** sont significativement élevés chez le lot diabétique contrôle avec des pourcentages allant jusqu'à (+ 36.4%, +44.9% et +53.37%) respectivement ; alors que le taux des **HDL-C** était plus bas (-15.16%) par rapport au lot normal contrôle. Le traitement avec l'extrait et l'insuline a significativement amélioré ces paramètres en diminuant les concentrations des **CHL-T**, **TG** et des **LDL-C** (-25.21%, -49.376% et -41.03%) respectivement pour l'EMZC et (-25.33%, 42.34-% et -45.65%) respectivement pour l'insuline, contre une élévation du taux des **HDL-C** (+26.98%) pour l'EMZC et (+31.16%) pour l'insuline par rapport aux rats diabétiques. On constate qu'il y'a une légère différence des résultats entre le lot traité avec l'EMZC et l'autre traité avec l'insuline, mais cette différence reste non significative. Pour le lot normal traité avec l'EMZC, on observe une baisse significative des TG par rapport au lot normal contrôle.

Le lien entre dyslipidémies – maladies cardio-vasculaires est particulièrement bien établi. L'élévation du Cholestérol Total et du LDL Cholestérol est associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire de façon curvi-linéaire. Une faible concentration de HDL-C peut être considérée comme un facteur de risque supplémentaire, alors qu'une concentration élevée de HDL-C est un facteur de protection. (HAS 2005).

Du fait de cette relation inverse entre le risque cardio-vasculaire et le LDL-C d'une part, le HDL-C d'autre part, il a été proposé d'utiliser les ratios [**cholestérol total / HDL-C**] ou [**LDL-C/HDL-C**] en tant que prédicateurs de risque cardio-vasculaire. L'étude de Framingham a particulièrement popularisé le ratio [**C Total / HDL-C**]: le risque cardio-vasculaire augmente particulièrement lorsque ce ratio dépasse 5. La figure 32 montre une estimation du risque cardio-vasculaire des différents lots.

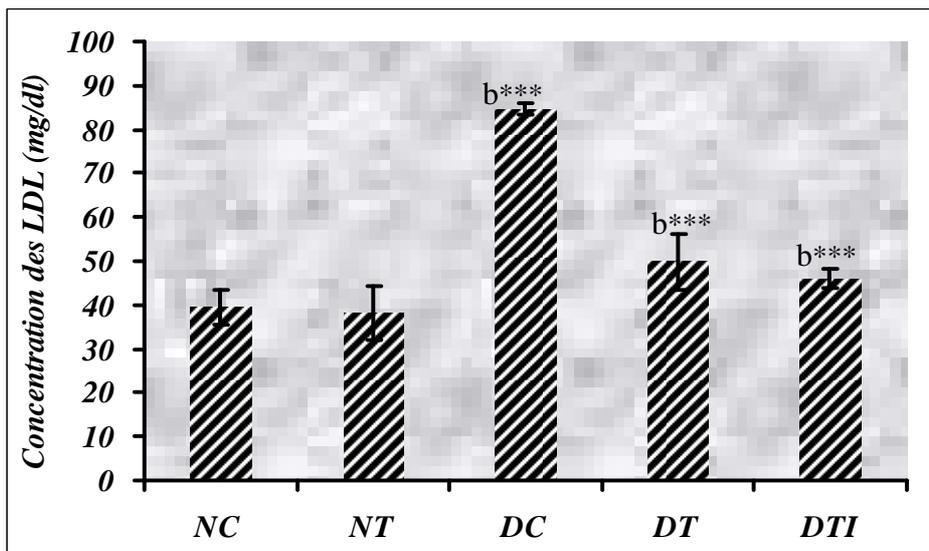
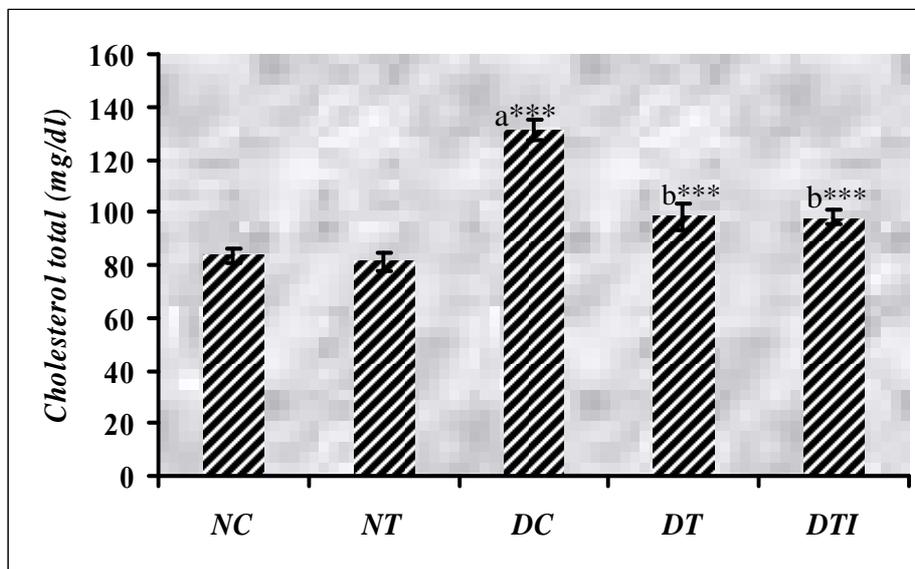
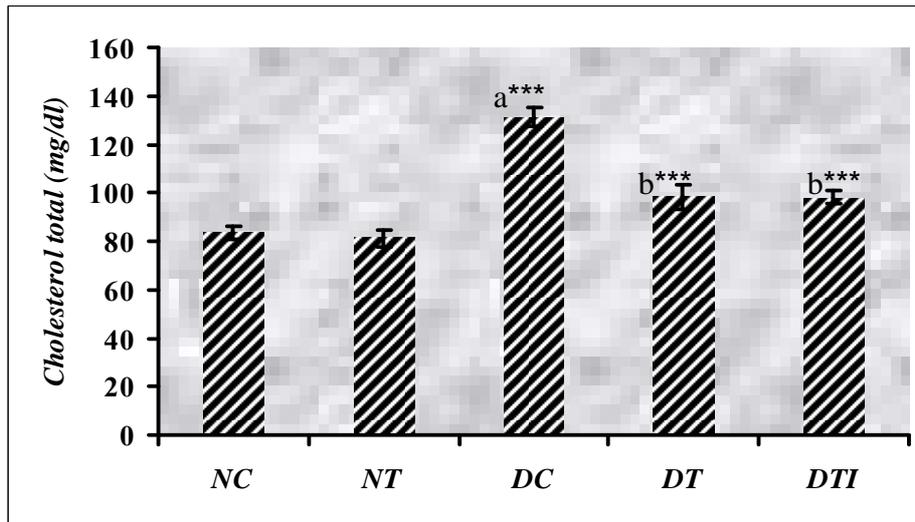


Figure 30 ■ Évaluation du CHL-T, TG, et les LDL-C des différents lots après six semaines de traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7)
 (***) $p < 0.001$ (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b :DT et DIS vs DC)

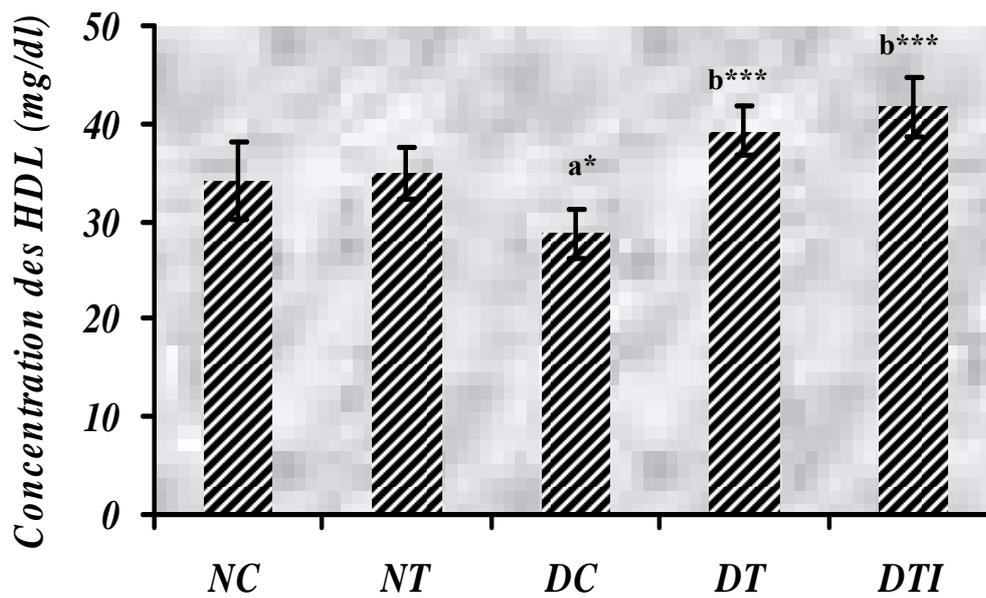


Figure 31 ■ Évaluation du taux des HDL-C des différents lots après six semaines de traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) * 0.05 > p > 0.01, (***) p < 0.001 (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b : DT et DIS vs DC).

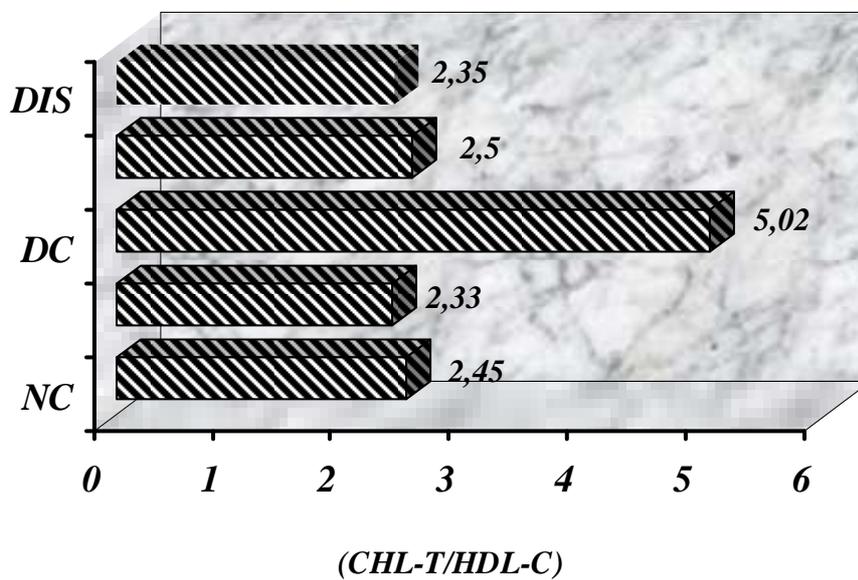


Figure 32 ■ Estimation du risque cardio-vasculaire des différents lots après six semaines de traitement

II-2-3--L'analyse des paramètres du stress oxydant:

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

✓ Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) :

Le traitement des rats normaux avec l'EMZC à raison de 700mg /kg a significativement baissé le taux de l'MDA (-9.61%) ($0.05 > p > 0.01$) au niveau du foie alors qu'il n'a pas d'effet significatif au niveau des reins et du cœur où les taux de l'MDA étaient comparables à ceux du groupe normale contrôle ($p > 0.05$). Cependant, une augmentation remarquable de la peroxydation lipidique était évidente dans le foie (+42.76%), les reins (+52.3%) et le cœur (+53.23%) chez les rats diabétiques ($p < 0.001$). Le taux de l'MDA était significativement diminué au niveau du foie (-34.47%) ($p < 0.001$), des reins (-7.3%) ($0.05 > p > 0.01$) et du cœur (-41.81%) ($p < 0.001$) suite du traitement des rats diabétiques par l'EMZC. Le traitement des rats diabétiques avec l'insuline n'a pas d'effet significatif contre la peroxydation lipidique au niveau des reins ($p > 0.05$), alors qu'il l'a significativement modifiée au niveau du foie (-26.63%) et du cœur (-41%) ($p < 0.001$).

Comparons l'effet de l'EMZC à celui de l'insuline contre la peroxydation lipidique, on constate que l'EMZC était plus efficace que l'insuline au niveau du foie avec une différence de 7.84%, et au niveau des reins où l'insuline était sans effet significatif. D'une manière générale, malgré les résultats positifs et significatifs obtenus par le traitement avec l'EMZC et l'insuline, les taux de l'MDA restent élevés au niveau des reins ($p < 0.001$) et du cœur ($0.05 > p > 0.01$) chez les lots diabétiques traités par rapport au lot normale contrôle. (figure 33).

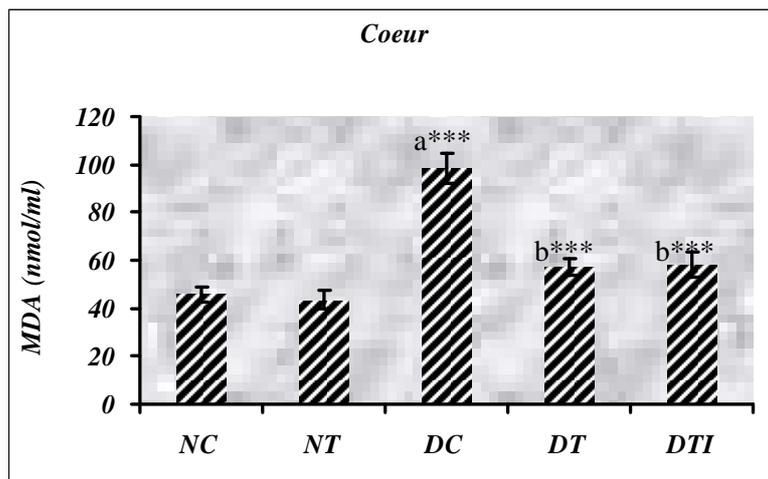
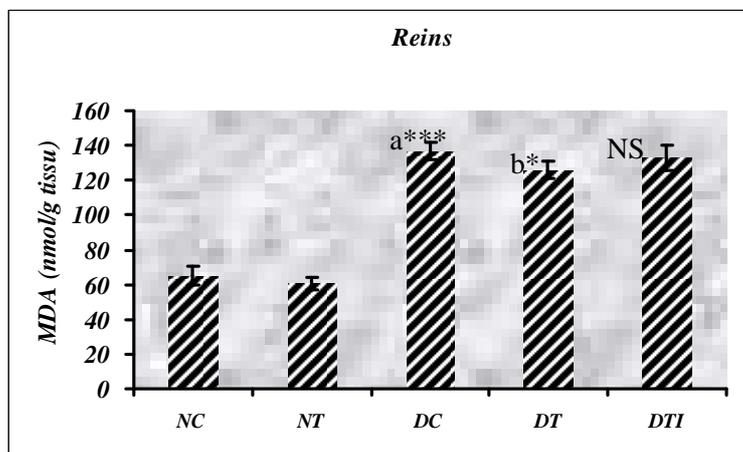
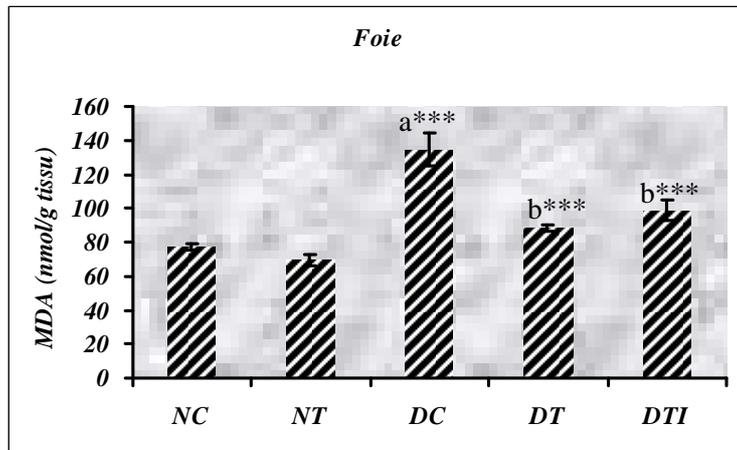
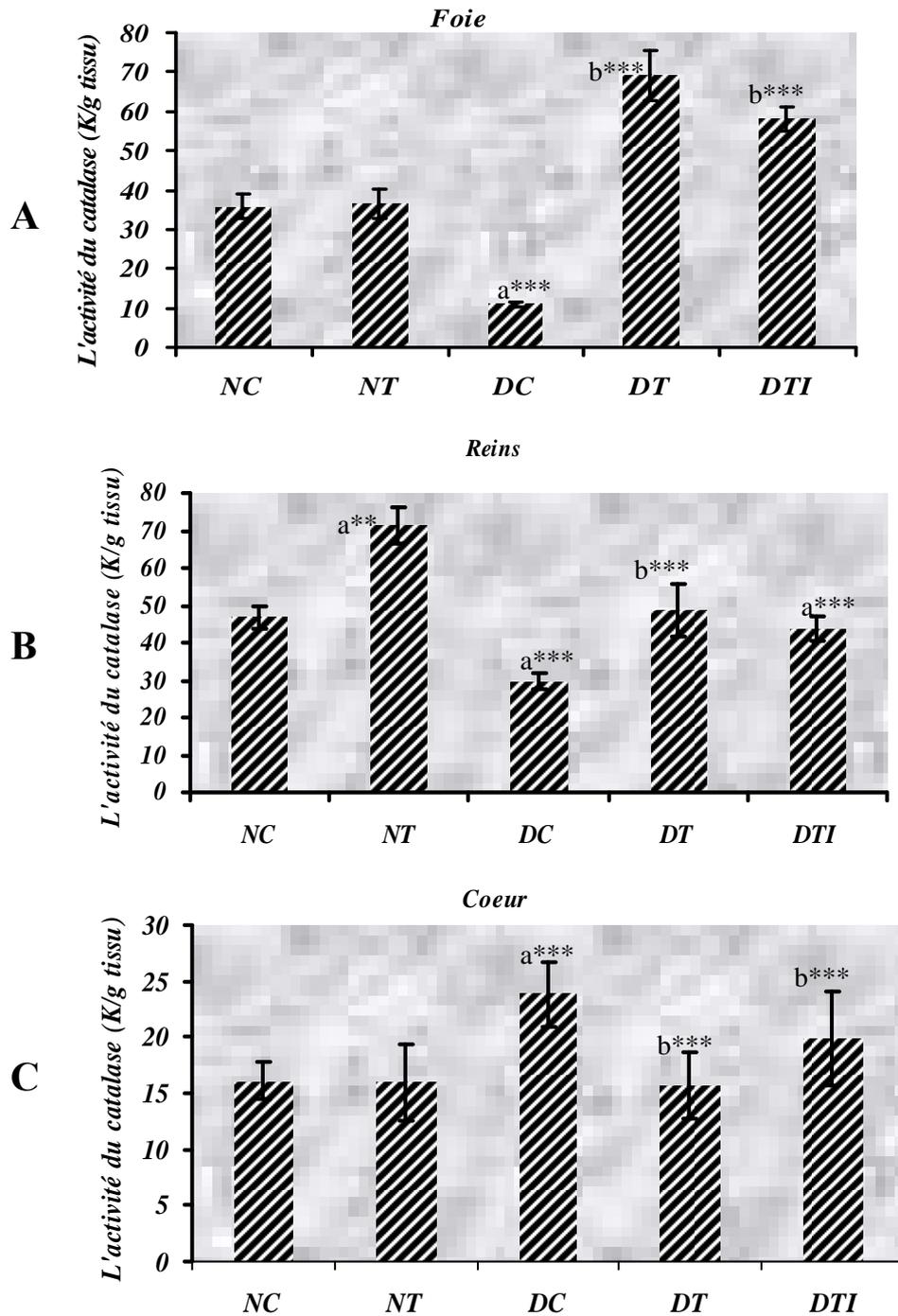


Figure 33 ■ Dosage de l'MDA tissulaire au niveau du foie, des reins et du cœur.
 Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, (***) $p < 0.001$ (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b : DT et DIS vs DC ; c : DT vs DIS)

- ✓ **Dosage de l'activité enzymatique du catalase :** la *figure 34* montre l'activité enzymatique du catalase, en temps qu'une enzyme antioxydante, au niveau du foie, des reins et du cœur des rats des différents lots.
 - L'activité du catalase hépatique a significativement ($p < 0.001$) réduit (-69.58%) chez les rats diabétiques par rapport aux rats du groupe normale contrôle. Cette diminution apparaît qu'elle soit contractée par la supplémentation en EMZC (+84.24%) et en insuline (+81.25%) par rapport au lot diabétique ($p < 0.001$).
 - Au niveau des reins, on note une augmentation significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique du catalase chez les rats NT avec l'EMZC (+33.34%) par rapport aux rats du lot NC. D'une autre part, une baisse significative ($p < 0.001$) de l'activité du catalase a été notée chez les rats diabétiques (-36.72%) par comparaison au groupe normale contrôle. Le traitement des rats diabétiques a significativement ($p < 0.001$) restauré l'activité catalytique du catalase (+39.22%) pour l'EMZC contre (+32%) pour l'insuline.
 - Au niveau du coeur, une augmentation significative ($p < 0.001$) de l'activité du catalase a été notée chez les rats diabétiques (+35.55%) en comparant au groupe normale contrôle. Le traitement des rats diabétiques par l'EMZC a significativement ($p < 0.001$) diminué l'activité enzymatique du catalase (-34%), alors que l'insuline était sans effet significatif ($p > 0.05$).
- ✓ **Dosage du glutathion réduit :** Le dosage de la forme réduite du glutathion tissulaire a montré qu'il a subi une baisse significative ($p < 0.001$) au niveau du foie (-65.52%), des reins (-46%) et du cœur (-47.94%) chez les rats diabétiques par rapport au rats normaux contrôles (figure35). Comparant le lot des rats diabétiques non traités avec les lots des rats diabétiques traités, le traitement avec l'EMZC et l'insuline semble avoir un effet significatif dont on a noté une augmentation remarquable du taux du glutathion réduit chez les lots des rats diabétiques traités au niveau du foie (+61.88%), des reins (+38%) et du cœur (+51.76%) pour l'EMZC, alors que pour l'insuline on a noté une augmentation de (+49.72%) au niveau du foie, de (+34%) au niveau des reins et de (+36.43%) au niveau du cœur. D'après ces données, on constate que l'EMZC était plus efficace que l'insuline au niveau du foie et du coeur avec une différence significative de 21% et de 24% respectivement, alors qu'il n'existe aucune différence significative pour les reins. Le traitement des rats normaux avec l'EMZC a significativement augmenté le taux de GSH au niveau des reins par rapport au lot normale contrôle au moment où il n'a pas été affecté au niveau du foie et du cœur.



00

0

Figure 34 ■ Dosage de l'activité enzymatique du catalase tissulaire au niveau du foie (A), des reins (B) et du cœur (C). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7)* 0.05>p>0.01, ** 0.01>p>0.001, (*) p < 0.001 (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b :DT et DIS vs DC ; c :DT vs DIS).**

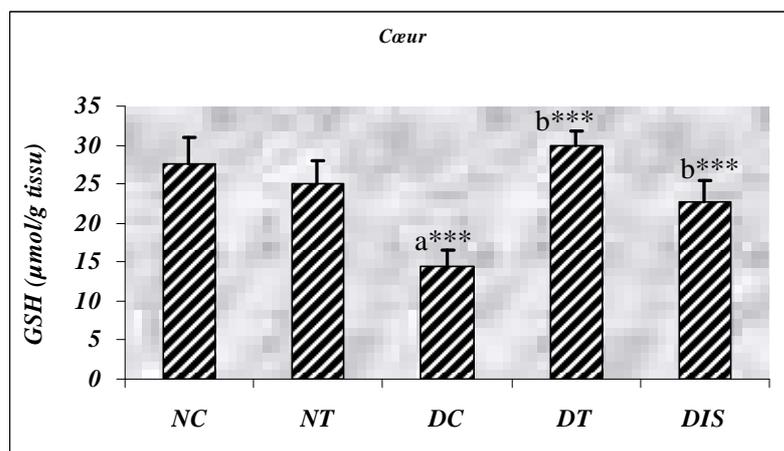
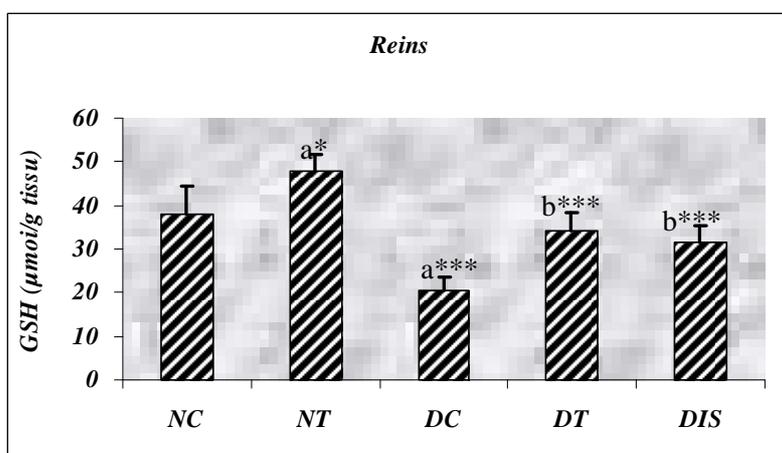
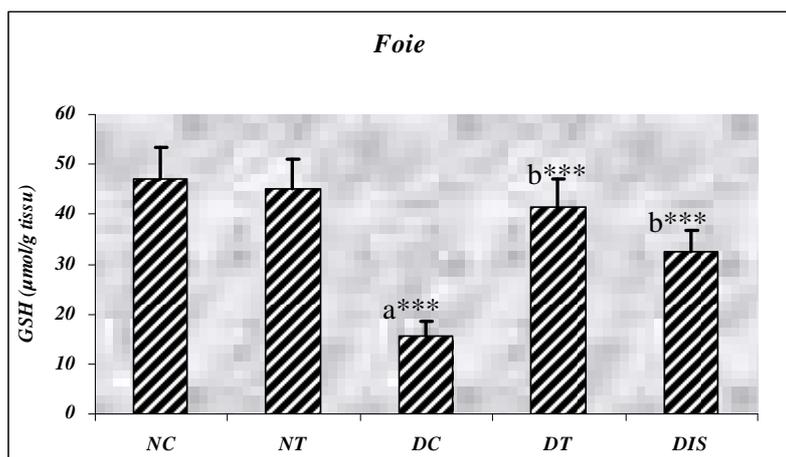


Figure 35 ■ Dosage du GSH tissulaire au niveau du foie , des reins et du cœur. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7)
 * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, (***) $p < 0.001$ (a : NT, DC, DT et DIS vs NC ; b : DT et DIS vs DC ; c : DT vs DIS).

II-2-4-Analyse des coupes histologiques :

- ***An niveau du pancréas :*** On note la présence des îlots de langerhance uniquement sur les coupes A, B , D et E qui correspondent respectivement à l'histologie du pancréas d'un rat du groupe normale contrôle, normale traité par l'EMZC, diabétique traité par l'EMZC et le lots diabétique traité par l'insuline (E), alors qu'ils sont complètement absents chez le lot diabétique contrôle (C). Comparons la coupe D à la coupe A, on constate que les îlots sont un peu endommagés avec une zone nécrosée très claire mais ils sont plus intacts que ceux montrés par la coupe E où ils sont fortement endommagés (Figure 36).
- ***Au niveau du foie :*** L'histologie du foie d'un rat du lot normal contrôle et du lot normal traité avec l'EMZC montre des cellules hépatiques normales, un cytoplasme granuleux et préservé avec veine centrale clairement visible. Chez le lot des rats diabétiques on note une altération sévère de l'architecture du foie avec veine centrolobulaire dilatée, hépatocytes irrégulières ballonnées, inflammation et nécrose (figure37). . Pour le lot diabétique traité avec l'EMZC, l'histologie du foie montre qu'il a une structure presque normale, alors que pour le lot traité par l'insuline, des congestions vasculaires avec veine centrolobulaire dilatée ont été notées mais en générale l'architecture semble intacte (La suite de la figure37).
- ***Au niveau des reins :*** L'histologie du cortex rénal d'un rat du lot normal contrôle et normal traité avec l'EMZC a montré la présence de glomérules uniformes avec membrane bien définie. L'architecture du cortex rénal chez le rat du lot diabétique était sévèrement altérée où la plus part des glomérules sont nécrosés. Pour le rat du lot traité avec l'EMZC les glomérules paraient plus grands et non arrondis (dilatés), la même observation a été noté pour le rat du lot diabétique traité par l'insuline mais avec la présence de glomérules nécrosés. Malgré ces altérations notées chez les deux derniers lots, l'architecture du cortex rénale reste plus intacte qu celle observée chez le lot diabétique contrôle (Figure 38).
- ***An niveau du coeur :*** chez le rat du lot diabétique contrôle, la coupe histologique du myocarde montre des remaniement oedémateux (O) plus suffissions hémorragiques et congestions vasculaires (c1, c2 et c3). Le tissu du myocarde apparaît vraiment lâche par comparaison à l'histologie du myocarde du lot normale contrôle. Aucune différence n'a été observée chez le lot normal traité avec l'EMZC alors l'histologie du

myocarde des lots diabétiques traités avec l'EMZC et l'insuline était presque normale (Figure 39).

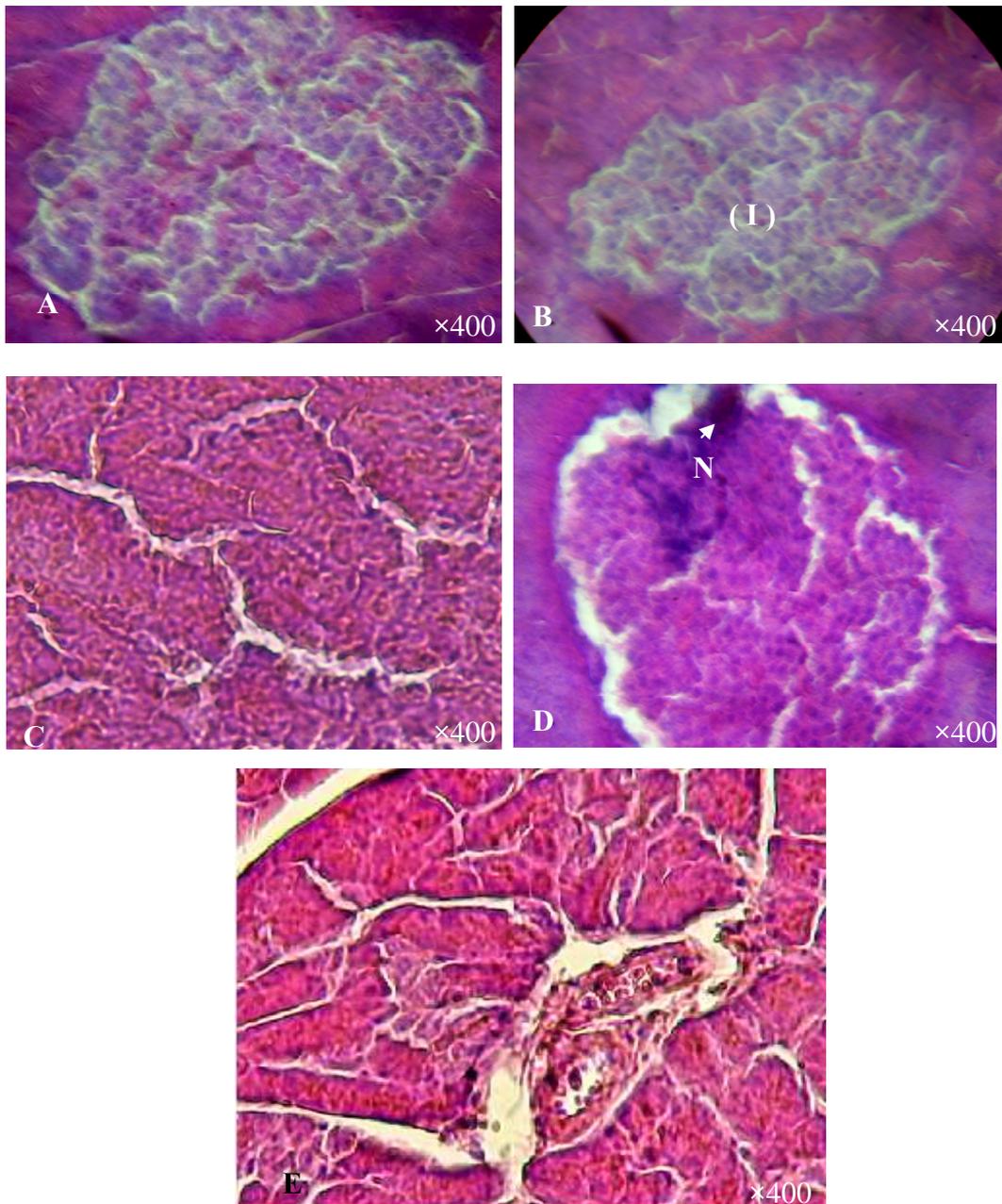


Figure 36 ■ *Histologie du pancréas (coloration par Hématoxyline &Eosine) des rats normaux et diabétiques, contrôles et traités : A (Normal contrôle), B (Normale traité par l'EMZC), C (Diabétiques contrôle), D(Diabétique traité par l'EMZCT), E (Diabétique traité par l'insuline).*

(I) : Ilôts

N : Nécrose

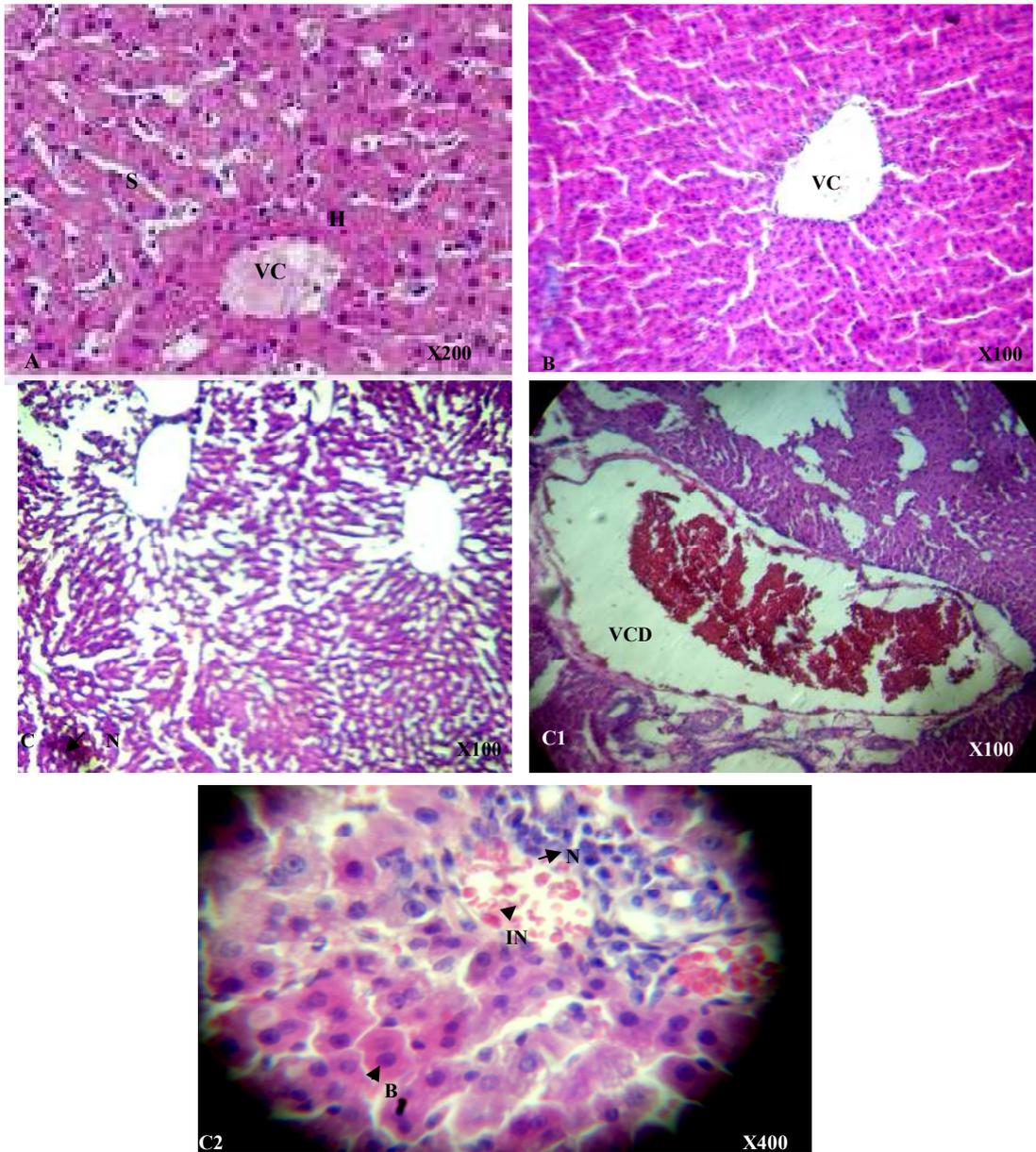


Figure 37 ■ *Histologie du foie (coloration par Hématoxyline &Eosine) des rats normaux et diabétiques, contrôles et traités : A (Lot normal contrôle), B (Lot normale traité par l'EMZC), C, C1, C2 (Lot diabétique contrôle)*

B:Ballonnement
H: hépatocytes
IN : Inflammation
VCD: vaine centro-lobulare dilatée

S: sinusoides
VC: vaine centro-lobulare
N : Nécrose

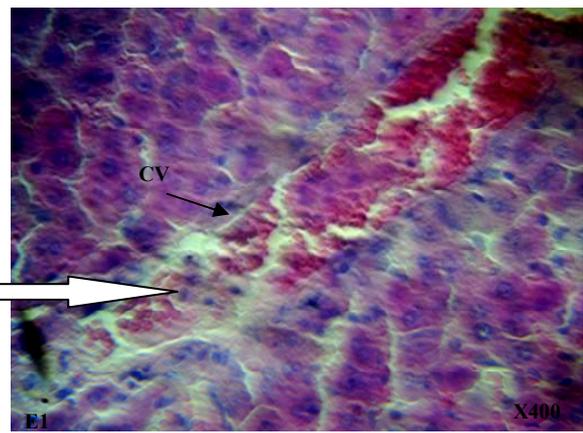
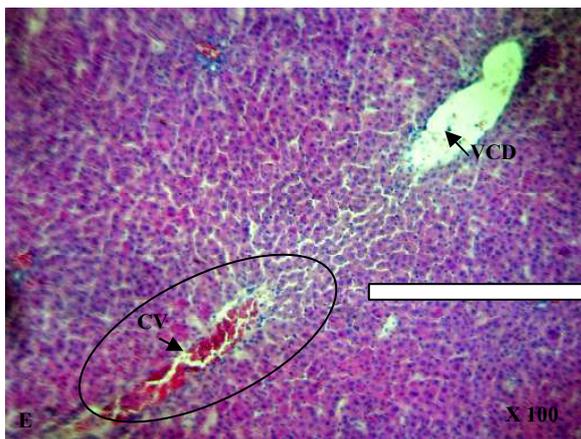
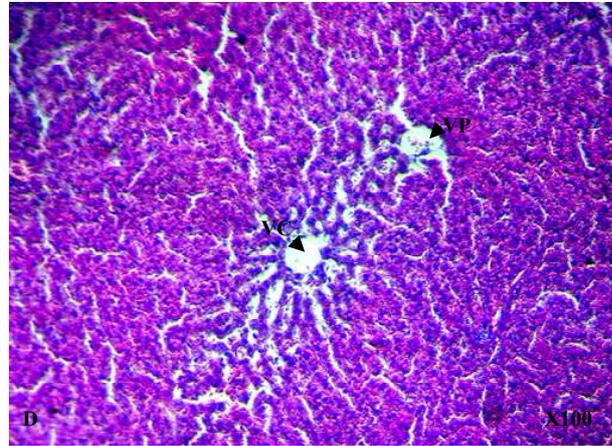


Figure 37 (la suite) ■ Histologie du foie (coloration par Hématoxyline &Eosine) des rats normaux et diabétiques, contrôles et traités : D (Lot diabétique traité par l'EMZC), E, E1(Lot diabétique traité par l'insuline).

VC : Veine centrolobulaire
CV : congestion vasculaire.

VC D: Veine centrolobulaire dilatée
CVP : veine porte

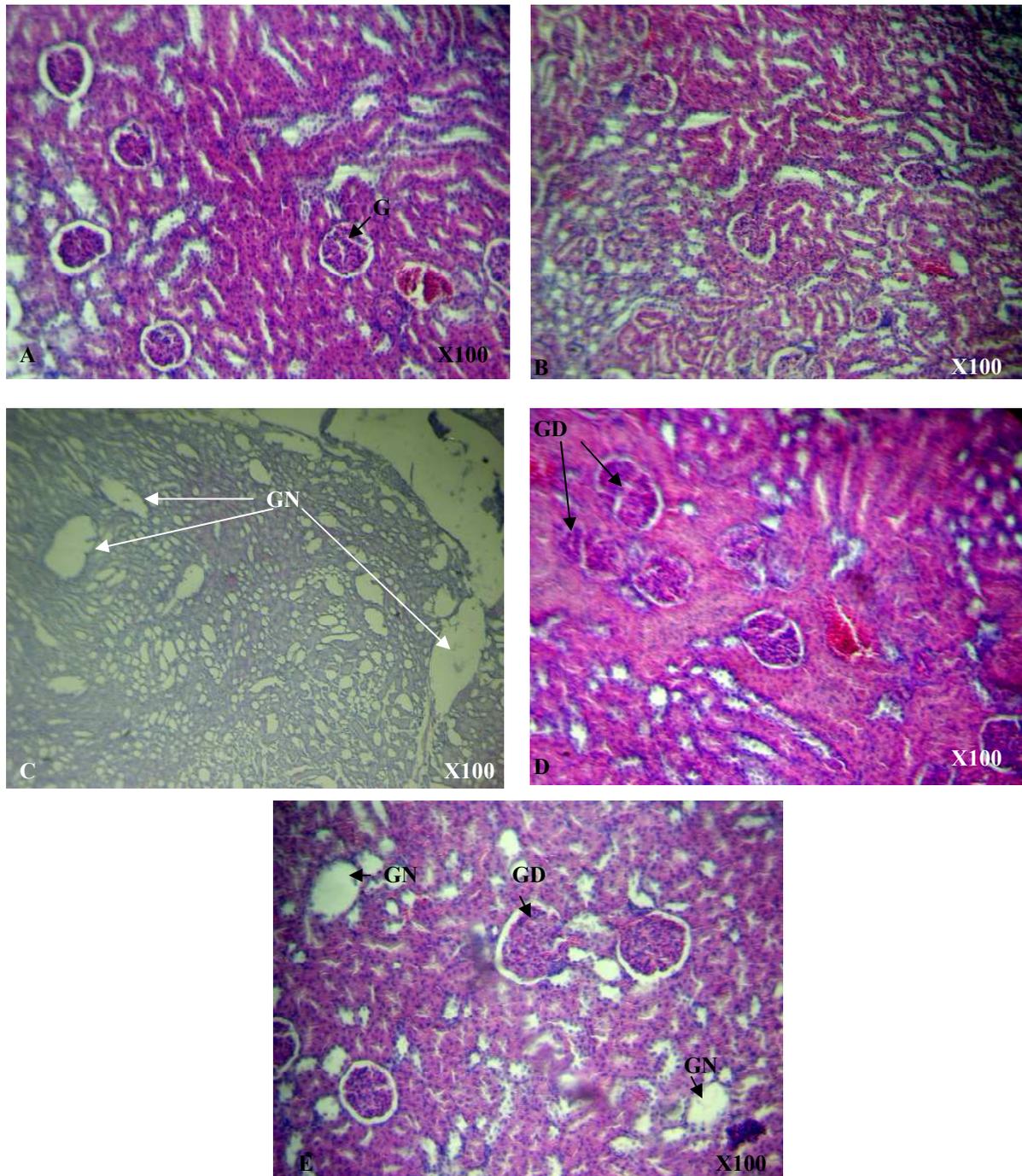


Figure 38 ■ Histologie du cortex rénal (coloration par Hématoxyline & Eosine) des rats normaux et diabétiques, contrôles et traités : A (Lot normal contrôle), B (Lot normale traité par l'EMZC), C (Lot diabétique contrôle) D (Lot diabétique traité par l'EMZC), E, E1 (Lot diabétique traité par l'insuline).

G : Glomérule normal

GD : Glomérule dilaté

GN : Glomérule nécrosé

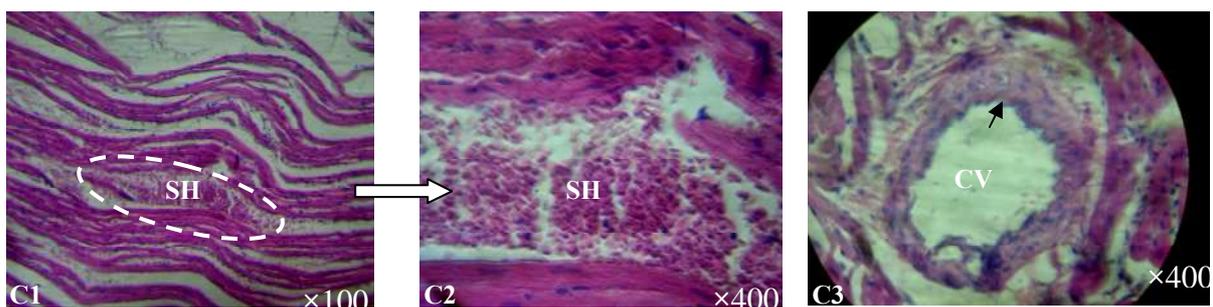
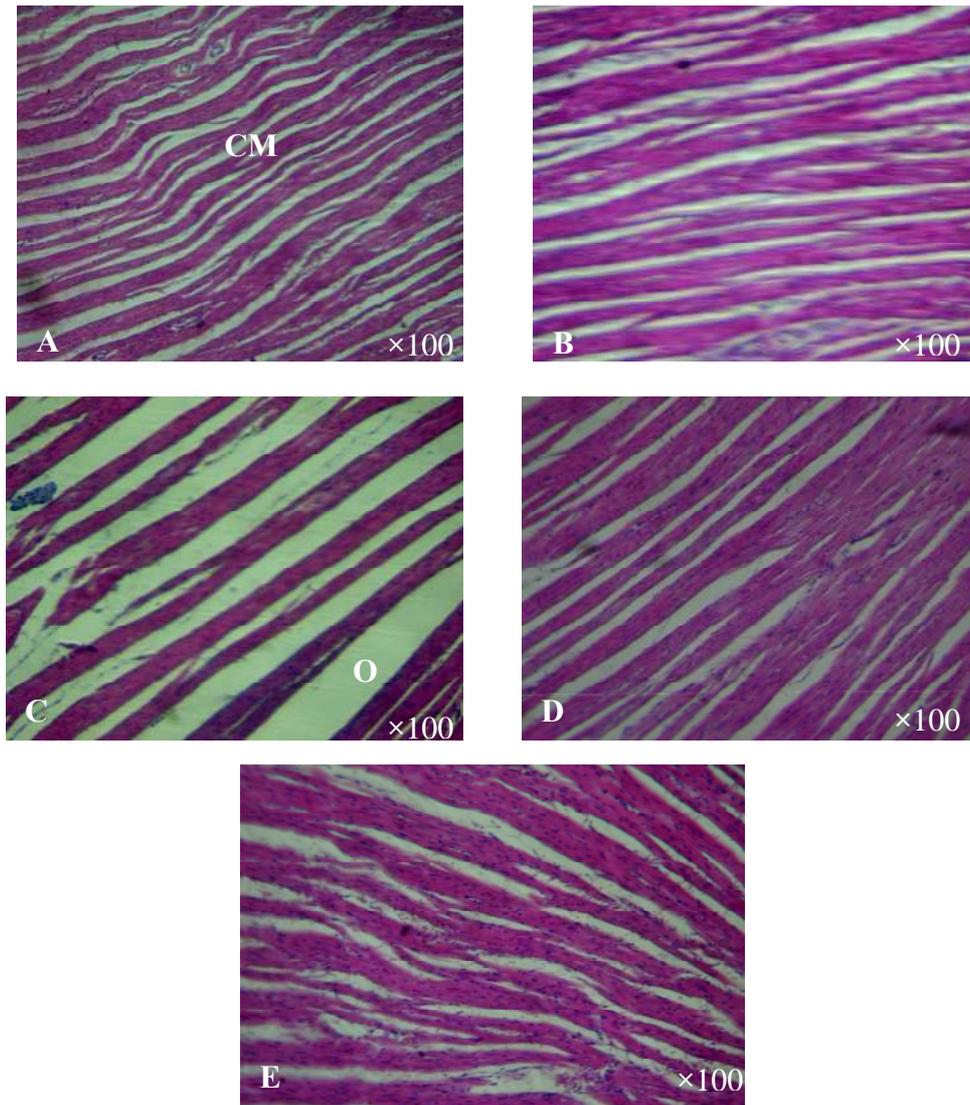


Figure 39 ■ *Histologie du myocarde (coloration par H&E) des rats normaux et diabétiques, contrôles et traités : A (Normal contrôle), B (Normale traité par l'EMZC), C[1,2,3](Diabétiques contrôle), D(Diabétique traité par l'EMZCT), E(Diabetique traité par l'insuline).*

CM: Cellules myocardiques normales.

O: Oedèm

CV: Congestion vasculaire

SH: Suffusions hémorragiques

DISCUSSION

Discussion

L'intérêt pour les radicaux libres et le stress oxydant en biologie et en pathologie a vu le jour, il y a à peine une cinquantaine d'années [Delattre J et al., 2005], après l'émission de l'hypothèse que le vieillissement serait en partie dû à une accumulation des dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les ROS. Le rôle délétère de ces derniers a par la suite été impliqué dans de nombreux syndromes pathologiques comme le diabète sucré.

Le diabète sucré est un désordre/syndrome métabolique chronique résultant d'une variété d'interactions entre des facteurs héréditaires et environnementaux. Il est caractérisé par une perturbation de la sécrétion de l'insuline ou de l'action des récepteurs ou des postrécepteurs de l'insuline ce qui affecte, par conséquent, le métabolisme des carbohydrates, des protéines et des lipides. En plus, il engendre des lésions au niveau du foie, des reins et des cellules β pancréatiques [Baynes J. W., 1991 ; Singh N et al., 2005]. Il existe une évidence croissante que les complications reliées au diabète sont associées au stress oxydant, et que la production des radicaux libres augmente pendant le diabète [Baynes J. W., 1991 ; Armstrong D et al., 1991]. L'activité des ROS peut induire la peroxydation lipidique qui, par la suite, stimule la glycation des protéines, l'inactivation des enzymes et l'altération de la structure et la fonction des biomembranes, jouant ainsi un rôle crucial dans les complications à long terme du diabète [Baynes J. W., 1991]. Dans ce cas de syndrome, le stress oxydant coexiste avec la réduction du statut antioxydant ce qui peut, par la suite, augmenter l'effet délétère des radicaux libres [Collier A et al., 1990].

Le model animal diabétique expérimental a montré un niveau tellement élevé de stress oxydant dû à l'état chronique et persistant de l'hyperglycémie. Cette dernière, symptôme caractéristique du diabète, non seulement fait augmenter la production des espèces réactives de l'oxygène mais aussi affecte les réactions antioxydantes catalysées par les enzymes scavengers des ROS [Uchimura K et al., 1999]

Certains métabolites secondaires des plantes sont reportés d'avoir un effet bénéfique en diminuant le taux du glucose plasmatique. Des études ont montré que le traitement par les antioxydants prévient et diminue les risques des complications du diabète. Dans ce contexte, un intérêt récent a été envisagé envers l'usage des matières extraites des plantes comme des outils pour le ménagement du diabète et ses complications.

Il existe plusieurs plantes utilisées dans le traitement traditionnel du diabète, mais seulement quelques peu d'entre eux ont eu une évaluation scientifique ou médicale.

Zygophyllum cornutum Coss, une plante saharienne du sud algérien qui, selon nos meilleurs connaissances, n'a jamais été étudiée en Algérie, l'une des trésors de notre patrimoine végétale utilisée traditionnellement dans le sud algérien comme plante principalement antidiabétique, bien qu'il existe d'autres usages. L'étude bibliographique préalable réalisée a montré que l'on disposait de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique concernant d'autres espèces du même genre, alors qu'il n'existe aucune étude propre à l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss sauf celle du Perez C en 1958-1961 faite sur la même espèce récoltée en Tunisie où il a prouvé son effet antidiabétique.

Tenant compte de ces données, notre étude a porté sur l'étude phytochimique et pharmacologique préliminaire de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss, ainsi que sur l'évaluation de l'activité antidiabétique et antioxydante sur, d'une part, le diabète et ses perturbations métaboliques et d'autre part, sur les biomarqueurs du stress oxydant associé au diabète au niveau de certains organes.

I- Etude du matériel végétal:

L'extrait méthanolique de la partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de *Zygophyllum cornutum* Coss (avec un rendement de 13.16 %) a subi un screening phytochimique qualitatif et quantitatif. Celui qualitatif a révélé la présence de certains isoprénoides: les alcaloïdes sels et les saponosides à génines stéroïdiques et triterpéniques, en plus d'autres composés phénoliques : flavonoïdes, tanins et coumarines. Selon [Newman et al., 1974 ; Markham et al., 1982] les composés que pourraient contenir un extrait brut sont des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins. Nos résultats sont en partie comparables à ceux obtenus par [Pöllmann K et al., 1997] qui ont pu isoler certains saponosides stéroïdiques et triterpéniques à partir de certaines espèces de *Zygophyllum*, [Aquino R et al., 2001] à partir de *Zygophyllum gaetulum* et [Hassanean HA et al., 2002] à partir de *Zygophyllum album*. La présence des flavonoïdes, des saponines, tanins et alcaloïdes est mise en évidence par [Smati D et al., 2007] chez *Zygophyllum geslini* Coss récoltée en Algérie. Le screening phytochimique quantitatif a montré que la plante contient $29.91 \pm 0.89 \text{ mgEAG/gE}$ polyphénols totaux parmi lesquels $7.46 \pm 0.53 \text{ mgEQ/gE}$ flavonoïdes. Ces résultats nous

donnent une bonne prévision concernant l'activité biologique de la plante, malgré qu'elle soit générale et imprécise, elle reste encourageante surtout que ces composés phytochimiques dont on a prouvés la présence sont connus par leurs effets pharmacologiques et d'être impliqués dans de nombreuses activités biologiques (**Tableau 06**).

D'après les résultats obtenus par le screening phytochimique, il était utile de réaliser certains tests pharmacologiques. Commenant par le test de toxicité de la plante : le test d'innocuité. Ce test est appelé aussi essai de toxicité anormale. Il est surtout utilisé pour tester les produits nouveaux en industrie pharmaceutique. Il consiste à administrer à des souris une dose unique de la substance par la voie appropriée et la durée d'observation est de 72 heures. Les produits dont DL50 est inconnue, la plus grande quantité de produit est administrée afin que le rapport dose souris/dose humain soit le plus grand possible, et c'est le cas de notre extrait où aucune éventuelle toxicité n'a été observée avec les différentes doses testées jusqu'à 5g/kg d'EMZC. Dans notre étude la période d'observation était d'une semaine après administration unique pour le premier et le troisième jour, c'était juste pour s'assurer s'il y aura une toxicité après le métabolisme des constituants de l'EMZC. L'absence d'éventuelle toxicité peut nous conduire à penser à la faible teneur en alcaloïdes connus par leur toxicité à fortes doses.

Pour le test de l'activité antimicrobienne, un effet positif de la poudre (+) et de l'EMZC (+) est observé uniquement contre l'espèce *Staphylococcus aureus* (Tableau 13, Figure 17). Cette activité peut être dûe à la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes et des tanins [Brantner et al., 1996]. Les composés phénoliques et les quinones qui en dérivent par oxydation participent à la défense de la plante contre les agressions comme antibactériens ou antifongiques en se liant aux protéines et en inactivant les activités enzymatiques des microorganismes [Harborne J.B et al., 1992]. Citons à titre d'exemple l'action des tanins qui peuvent inhiber la machinerie enzymatique des microorganismes, ont une action lytique par effet direct sur leur membrane ou complexation de certains ions métalliques indispensables pour leur survie, en particulier le Fer [Milal et al., 1996]. Ce test était non significatif ou complètement négatif pour les autres espèces bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *klebsiella sp*) et fongiques (*Aspergillus phoenicis*, *Condida sp*). Certains microorganismes, en particulier les champignons, peuvent d'ailleurs dégrader les composés phénoliques qui leur servent alors de substrats carbonés et favorisent ainsi leur croissance [Straney D et al., 2002].

Une étude de l'activité antimicrobienne réalisée par Smati D et ces collaborateurs en 2004 sur une espèce du même genre : *Zygophyllum geslini* Coss a montré qu'il n'existe aucune activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Condida tropicalis* [Smati D et al., 2004].

L'évaluation de l'effet de *Zygophyllum cornutum* contre le stress oxydant est un objectif principal dans notre étude, raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier in vitro avant de passer à l'étude in vivo. Pour cela deux tests sont réalisés : L'activité antioxydante par le test au β -carotène / acide linoléique [Aslan et al., 2006], et L'effet scavenger par le test de DPPH [Cuendet et al., 1997; Burits and Bucar., 2000].

Le test de β -carotène / acide linoléique a montré que le pourcentage de l'activité antioxydante de l'EMZC était de 85.03 ± 0.15 % contre 97.98 ± 0.08 % pour le BHT (composé antioxydant synthétique). La capacité antioxydante des plantes est principalement due à leur richesse en composés phénoliques, qui sont capables à donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique [Amić et al., 2003]. La présence et le nombre de groupements OH libres sont des facteurs déterminants de l'activité antioxydante des polyphénols [Sharififar et al., 2008]. Sharififar et al (2008) ont montré que l'extrait méthanolique de *Pelargonium endlicherianum* inhibe l'oxydation de l'acide linoléique à 72.6 ± 2.96 %, suivi par *Hieracium cappadocicum* (55.1 ± 2.33 %) et *Verbascum viedemannianum* (52.5 ± 3.11 %) contre 96.6 ± 1.29 % pour le BHT. Selon cette étude, ces plantes sont jugées très efficaces. Comparant à notre étude, on peut dire que l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* Coss est plus efficace surtout que son pouvoir antioxydant est plus puissant que celui des extraits méthanoliques des plantes testées par cette étude.

Le test de DPPH effectué sur l'EMZC pour évaluer son effet scavenger a montré qu'il a une IC_{50} de 870.05 ± 7.26 $\mu\text{g/ml}$ contre 32.92 ± 0.62 $\mu\text{g/ml}$ pour le BHT. Une étude pareille réalisée sur l'extrait méthanolique des feuilles de *Ginkgo biloba* a jugé qu'il possède un effet scavenger très élevé avec une IC_{50} de 930 $\mu\text{g/ml}$ [Mazza et Oomah., 2000]. Par comparaison à cette étude, on peut dire que l'effet scavenger de l'EMZC est aussi très élevé.

Les résultats obtenus par l'étude phytochimique et pharmacologique de l'EMZC nous ont permis de conclure que cette plante est riche en composés phénoliques doués d'activités biologiques et pharmacologiques très importantes. En plus, la capacité puissante de la plante

vis à vis les radicaux libres et l'oxydation donne un grand espoir concernant son effet contre le stress oxydant in vivo.

II- Investigations expérimentales sur les animaux:

Zygodhylum cornutum Coss, espèce végétale connue par son effet antidiabétique dans la médecine traditionnelle [Farid Baba Aissa., 1991], mais elle n'a été jamais valorisée en Algérie en tant qu'une plante endémique. Donc, notre étude constitue une nouvelle approche non seulement pour l'évaluation in vivo de son effet antidiabétique mais aussi pour la révélation de son effet contre le stress oxydant associé au diabète et les complications qui en résultent.

Afin de tester l'activité hypoglycémisante de l'EMZC sur des rats normoglycémiques, une dose de 700mg/kg a été choisie en se basant sur une étude faite pour l'infusé d'une espèce du même genre (*Zygodhylum gaetulum*) avec cette dose [Skim F et al., 1993]. Pour l'EMZC, l'administration de 700mg/kg à des rats normoglycémiques provoque une diminution significative de leur glycémie (14%) après deux heures par rapport à l'état basal. Après quatre heures on a noté que la diminution était modérée voire non significative (figure 21). Un test pareil utilisant l'extrait éthanolique des feuilles d'*Icacina senegalensis* sur des rats normoglycémiques a montré une diminution significative après deux heures mais elle reste toutefois transitoire, avec un retour à l'état basal au bout de quatre heures [N'Diaye M et al 2008]. Cela nous a conduit à suggérer que la phase entre deux et quatre heures dans notre étude peut être considérée comme phase préparative au retour à l'état basale. Skim F et ses collaborateurs (1993) ont reporté un effet hypoglycémique significatif de l'infusion de *Zygodhylum gaetulum* administrée par voie orale à des rats normoglycémiques avec augmentation significative du taux d'insuline au niveau du plasma. Cette étude nous a permis de penser que l'effet hypoglycémisant de *Zygodhylum cornutum* peut être induit par l'augmentation du métabolisme périphérique du glucose et l'augmentation de la sécrétion de l'insuline. Ces résultats nous ont amenés à tester l'activité antihyperglycémisante et antidiabétiques respectivement sur le modèle d'hyperglycémie provoquée par voie orale et le modèle du diabète induit par la streptozotocine.

Le test de l'activité antihyperglycémisante de trois doses de l'EMZC sur des rats rendus hyperglycémiques a montré que la dose de 700mg/kg était la plus efficace, où un prétraitement par l'extrait à cette dose prévient significativement le pic hyperglycémique

observé dans le modèle de diabète transitoire consécutive à l'administration de 4g/kg de glucose. En résumé, l'EMZC semble présenter un profil pharmacologique intéressant puisque son activité hypoglycémiante est estimée transitoire chez les rats normoglycémiques, alors que dans les mêmes conditions, il s'oppose à l'hyperglycémie induite par l'administration du glucose.

La partie principale de notre étude était consacrée à l'évaluation de l'activité antidiabétique et antioxydante *in vivo* en utilisant des rats wistar albinos. Les rats sont rendus diabétiques à l'aide de la streptozotocine ; un antibiotique isolé à partir de *Streptomyces achromogenes* (Vavra et al., 1959). C'est une glucosamine-nitrosourée possédant une forte activité anti-néoplasique. La STZ est un analogue du glucose pour le récepteur GLUT2 qui est abondamment exprimé dans les cellules β pancréatiques des rongeurs. Elle pénètre ainsi spécifiquement dans les cellules β où son pouvoir alkylant induit de nombreux dommages. Elle est ainsi utilisée dans le traitement des insulinomes (Brentjens et Saltz, 2001). L'injection d'une forte et unique dose de STZ est suffisante pour induire une destruction des cellules β et donc un diabète insulino-dépendant, résultant d'effets toxiques directs associés à une formation accrue des radicaux libres [Bedoya et al., 1996], et à une fragmentation de l'ADN conduisant à l'activation de poly ADP-ribose synthétase avec déplétion du taux du NAD⁺ cellulaire [Yamamoto et al., 1988]. D'après ces données, on peut dire qu'on obtient un diabète associé au stress oxydant qui nous servira par la suite à l'étude de l'effet antioxydant des biomolécules et ses conséquences contre les complications diabétiques méditées par les radicaux libres.

Dans notre étude, une seule injection par voie intrapéritoneale à raison de 55mg /kg pc (poids corporel) a induit un diabète au bout de 3 jours où une hyperglycémie sévère comprise entre 400 et 545 mg/dl a été notée. Après six semaines de traitement, la glycémie et la perte du poids corporel chez les rats diabétiques contrôles est également observée avec un taux de 420 ± 81.05 mg/dl et 21.53 ± 17.22 % par rapport au poids initiale respectivement. Nos résultats sont en accord avec ceux apportés par [Ouali k et al., 2007] où ils ont constaté que chez des rats *Wistar albinos*, l'injection de la STZ provoque en six semaines une hyperglycémie sévère allant jusqu'à 541.8 ± 72 mg/dl, et une perte significative du poids était de 30.34 ± 20.16 % . [Taleb S et al., 2009] suggèrent que la perte du poids corporel chez les rats diabétiques peut être expliquée par l'augmentation du catabolisme des lipides et des protéines dûe au manque des carbohydrates utilisées comme source d'énergie.

On note chez les rats diabétiques traités avec l'EMZC une baisse significative de la glycémie à partir de la deuxième semaine où la valeur enregistrée après six semaines était 145 ± 12.3 mg/dl. L'amélioration du poids des rats diabétiques traités par l'extrait est aussi constatée. L'effet hypoglycémiant de l'EMZC peut être dû aux substances à groupements polaires comme le suggèrent [N'diyae M et al., 2008] dans une étude réalisée sur différents extraits des feuilles d'*Icacina senegalensis* où ils ont prouvé l'absence d'effet hypoglycémiant pour la fraction contenant les substances apolaires. Notre plante est très riche en saponines, pour lesquels une forte activité antidiabétique est attribuée selon l'étude de [Kambouche N., 2009], donc ils peuvent être responsables de l'activité antidiabétique de *Zygophyllum cornutum* Coss.

Le traitement des rats diabétiques par l'insuline a montré une diminution significative de la glycémie dès la première semaine jusqu'à la fin du traitement où la glycémie est devenue normale, mais l'évolution du poids était perturbée. Tastekin et al (2006) ont constaté une augmentation de 15.35% du poids après quinze jours du traitement alors que dans notre étude on a noté une diminution de 12.08% pour cette même période, après laquelle une augmentation puis une rediminution ont été enregistrées. On peut conclure que le mécanisme d'action de l'EMZC contre le diabète peut être semblable à celui de l'insuline c'est-à-dire par régulation de l'homéostasie du glucose ou par action extra-pancréatique en augmentant son catabolisme par les tissus [Saravanan et al., 2005 ; Tastekin et al., 2006]. D'autres mécanismes antidiabétiques sont aussi possibles pour l'action de l'EMZC mettant en jeu le rôle de ses composés phénoliques notamment les flavonoïdes. Selon [Sarkhail et al., 2007], les flavonoïdes influencent les cellule β pancréatiques et stimulent la sécrétion de l'insuline, alors que [Shimizu et al., 2000 ; Waltner-law et al., 2002] ont noté que les flavonoïdes (comme les catéchines et épicatechines) exercent leur effet antidiabétique à travers le foie en influençant la gluconéogenèse, la glycogénogenèse et la glycogénolyse.

La prévention de la perte du poids chez les rats diabétiques traités avec l'EMZC peut être due à la régulation de l'homéostasie du glucose, à l'effet hypoglycémique ou à la réduction des lipides [Tastekin et al., 2006]. La capacité de renverser la néoglucogenèse et la prévention de la perte protéique peuvent être aussi à l'origine de la prévention de la perte du poids [Rajagopal & Sasikala., 2008].

Revenons aux paramètres biochimiques reflétant les perturbations métaboliques associées au diabète. Une hyperglycémie persistante conduit à la formation de l'hémoglobine glyquée [Yabe-Nishimura C., 1998] qui est un agent biochimique facilement mesurable et

fortement corrélé à la glycémie ambiante pendant une période de deux à trois mois [Goldstein D.E et al., 2004]. Sa concentration constitue un bon prédicteur des complications liées au diabète [Hawlett J et al., 2008].

Dans notre étude, le groupe contrôle des rats diabétiques a montré un taux significativement élevé ($p < 0.001$) de l'hémoglobine glyquée (12.22%) par rapport au groupe contrôle des rats normaux. Nos résultats sont en accord avec ceux montrés par [Palsamy P & Subramanian S., 2008] où ils ont enregistré un taux de 13.58 % chez les rats diabétiques. Ils suggèrent que cette augmentation implique l'oxydation des glucides, l'endommagement des protéines et des sucres dans la circulation, et des parois vasculaires ainsi que leurs protéines. Le traitement par l'EMZC et l'insuline a significativement ($p < 0.001$) baissé le pourcentage de l'hémoglobine glyquée mais il reste encore élevé ($0.05 > p > 0.01$) par rapport au groupe contrôle des rats normaux ce qui peut être dû à la sévérité de l'hyperglycémie. L'EMZC peut prévenir l'augmentation de l'hémoglobine glyquée en inhibant les dommages oxydatifs causés par les réactions de glycation.

L'absence d'insuline pendant le diabète provoque une augmentation profonde du catabolisme protéique, spécialement dans les muscles squelettiques. De plus, ce catabolisme des protéines totales squelettiques est dû à l'augmentation remarquable de la dégradation des protéines que du déclin de leur synthèse [Moller N & Nair K.S., 2008]. Ces données peuvent nous servir à expliquer la diminution significative ($p < 0.001$) de la protéinémie chez les rats diabétiques dans notre étude. Cette altération peut être à l'origine de plusieurs complications chroniques du diabète, surtout qu'elle touche les protéines structurales et fonctionnelles [Palsamy P & Subramanian S., 2008]. L'EMZC a augmenté significativement ($p < 0.001$) le taux des protéines totales par rapport au groupe contrôle des rats diabétiques. Cet effet peut être dû à l'activité hypoglycémisante ou à la régulation de l'homéostasie du glucose et son utilisation par les tissus périphériques. L'existence des flavonoïdes dans l'EMZC semble être un facteur contribuant à l'amélioration du taux protéique chez les rats diabétiques. Cette suggestion est supportée par [Palsamy P & Subramanian S., 2008] qui ont montré le même effet chez des rats diabétiques traités par un flavonoïde qui est le resvératrole.

Les constituants azotés ou non protéiques sont au nombre d'une quinzaine environ dans le sérum, mais en pratique courante, seul quatre d'entre eux sont d'une importance capitale en néphrologie : l'urée, l'acide urique, la créatinine et l'ammoniaque [Boubchir M.A., 2002]. Pour la présente étude, nous sommes intéressés aux trois premiers paramètres.

L'urée est le produit final ultime du catabolisme des protéines dans le corps [Boubchir M.A., 2002]. Pour la présente étude, une accumulation remarquable de l'urée a été notée dans le diabète expérimental, ça peut être expliqué par la dégradation accélérée des protéines hépatiques et plasmatiques [Sugden P.H et al., 1991] ou par l'altération de l'homéostasie du nitrogène qui conduit à l'augmentation de l'élimination hépatique du nitrogène sous forme d'urée. Donc, la balance négative observée du nitrogène peut être partiellement causée par les changements qu'ont subis les hépatocytes [Almdal T.P et al., 1986]. D'une autre part, l'augmentation de l'urée sanguine à jeun peut refléter un dysfonctionnement des reins, surtout qu'elle a été utilisée pendant longtemps pour apprécier l'intensité d'une insuffisance rénale [Boubchir M.A., 2002]. L'administration de l'extrait aux rats diabétiques a significativement diminué les taux de l'urée sanguine. Ce résultat nous a permis de suggérer le rôle prophylactique de la plante sur le métabolisme des protéines et son effet préventif contre les dommages hépatiques et le dysfonctionnement rénal.

L'acide urique, produit ultime du catabolisme des bases puriques [Boubchir M.A., 2002], et l'un des antioxydants hydrosolubles endogènes majeurs de l'organisme [Delattre J et al., 2005]. Dans notre étude, nous avons constaté l'augmentation significative ($p < 0.001$) du taux de l'acide urique. Modan M et ses collaborateurs ont expliqué cette augmentation soit par la production accélérée de l'acide urique, soit par la diminution de sa sécrétion [Modan M et al., 1987]. Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres, dont il augmente la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique qui prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à médier des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant [Becker B.F et al., 1993]. Dans la biologie clinique, une concentration sanguine élevée de l'acide urique est considérée comme indicateur pathologique reflétant une insuffisance rénale [Boubchir Ma et al., 2002]. Le traitement des rats diabétiques avec l'EMZC a significativement ($p < 0.001$) restauré la concentration de l'acide urique à un état presque normal. Ce résultat peut être dû soit à l'activité antioxydante remarquable de l'EMZC et qui a été révélée *in vitro*, soit à son action bénéfique au niveau des reins qui sera discutée dans une section suivante des coupes histologique.

La créatinine est un dérivé de la dégradation de la créatine et du phosphocréatine qui sont considérées comme des composés de stockage de l'énergie dans les muscles. La concentration de la créatinine dans le sérum peut se varier selon un certain nombre de facteurs

incluant le régime alimentaire, la masse musculaire et le sexe. Elle dépend aussi de la capacité des reins à éliminer la créatinine d'où son utilisation aussi comme indicateur de l'insuffisance rénale [Boubchir M.A et al., 2002]. Généralement une augmentation de créatinine apparaît simultanément avec l'augmentation de l'azote uréique sanguin. La concentration de la créatinine est considérée souvent comme un paramètre clinique pour détecter les effets toxiques reliés au traitement par des composés sur les reins chez les animaux expérimentaux [Travlos G.S et al., 1996]. Ces données peuvent expliquer l'augmentation de la créatinine chez les rats diabétiques dans notre étude. Une réduction significative de ce taux en créatinine chez les rats diabétiques traités oralement par l'EMZC pendant les six semaines nous a conduit à penser soit à l'amélioration des changements rénaux chez les rats diabétiques, soit à la diminution du catabolisme de la créatine et la phosphocréatine au niveau des muscles par le biais des flavonoïdes. Nos résultats sont en accord avec ceux de [Palsamy P & Subramanian S., 2008] où ils ont noté un effet semblable avec le resvératrol en tant que flavonoïde.

Revenons maintenant au profil lipidique. Ce bilan est devenu d'une importance cruciale via son utilisation dans le traitement de plusieurs maladies cardiovasculaires et le contrôle des patients diabétiques [Akuyam S.A., 2007]. Plusieurs études ont rapporté que les complications cardiovasculaires associées au diabète sont dues aux perturbations du métabolisme lipidique [Shamaony et al., 1994 ; El-hilaly J et al., 2006 ; Akuyam S.A et al., 2007 ; Gupta R.K et al., 2008 ; Qi X.Y et al., 2008].

Les résultats de notre étude ont montré une augmentation significative du CHL-T (+ 36.4%), des TG (+44.9%) et des LDL-C (+53.37%) associée à une diminution remarquable des HDL-C (-15.16%). Nos résultats sont en accord avec ceux montrés par [Eidi A et al., 2006 ; Sharma et al., 2008] chez des rats rendus diabétiques par la STZ, alors que Coopersitin et ses collaborateurs ont déjà mentionné que le diabète est souvent associé à une hyperlipidémie [Coopersitin et al., 1981]. L'hyperlipidémie observée peut être expliquée par la carence en insuline qui inhibe la 3-hydroxy-3-méthyl glutamyl coenzyme A réductase (HMG-coA réductase) impliquée dans la biosynthèse du cholestérol [Bettersidge et al., 2002]. L'EMZC conduit à une amélioration significative du profil lipidique semblable à celle observée chez les rats diabétiques traités par l'insuline. On note principalement l'augmentation du taux des HDL-C connus sous le nom de bon cholestérol [Masson O., 2007] à cause de leur rôle bénéfique contre les complications cardiovasculaires principalement l'athérosclérose [Delattre et al., 2005]. De plus, on note la diminution du taux de CHL-T, des TG et des LDL-C dites mauvais cholestérol [Masson O., 2007] parce que leur taux élevé et persistant au niveau du

sang augmente leur susceptibilité à l'oxydation par les radicaux libres [Delattre et al., 2005] en produisant ainsi des LDL oxydées doués de propriétés proathérogéniques très élevées [Peter M et al., 2001]. La diminution du cholestérol peut résulter de la modification du métabolisme des lipoprotéines en augmentant l'activité de la Lécithin Cholestérol Acyl Transférase [Khanna et al., 2002] ou en augmentant l'absorption des LDL par augmentation de leurs récepteurs [Slater., 1980]. Cette dernière interprétation semble être la plus proche surtout qu'on a noté une diminution significative des LDL-C. Le mécanisme par lequel *Zygodhylum cornutum* Coss exerce son effet hypolipidémique n'est pas clair mais il peut impliquer l'action de l'insuline pour lequel elle a montré un effet semblable. Cette suggestion est supportée par [El-hilaly J et al., 2006] qu'il la proposée pour interpréter l'effet antihyperlipidémique d'*Ajuga iva*, [Ahmed et al., 2001 ; Pepato et al., 2005] qui ont noté l'effet hypolipidémique et normalisant de l'insuline sur le taux lipidique chez des rats rendus diabétiques par la STZ. Kritchevesky pense que la diminution des lipides plasmatiques est la conséquence de la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol qui se lie avec les acides biliaires et l'augmentation de la sécrétion biliaire [Kritchevesky., 1978]. La diminution des triglycérides par l'EMZC peut être due à la diminution de la synthèse des acides gras [Bopanna., 1997] ou l'augmentation du catabolisme des LDL, activation de la LCAT et des lipases tissulaires [Khanna et al.2002]. Des études ont montré que la baisse du taux des lipides pendant le diabète diminue par conséquence le risque des complications cardiovasculaire [Eddouks., 2007]. Donc on peut conclure que *Zygodhylum cornutum* Coss prévient aussi ces complications.

Le lien entre dyslipidémie – maladies cardio-vasculaires est particulièrement bien établi. L'élévation du Cholestérol Total et du LDL Cholestérol est associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire de façon curvi-linéaire. Une faible concentration de HDL-C peut être considérée comme un facteur de risque supplémentaire, alors qu'une concentration élevée de HDL-C est un facteur de protection. Du fait de cette relation inverse entre le risque cardio-vasculaire et les LDL-C et les HDL-C, il a été proposé d'utiliser les ratios [cholestérol total / HDL-C] ou [LDL-C/HDL-C] en tant que prédicateurs de risque cardio-vasculaire. L'étude de Framingham a particulièrement popularisé le ratio [C Total / HDL-C]: le risque cardio-vasculaire augmente particulièrement lorsque ce ratio dépasse 5. Dans notre étude on a enregistré un ratio de [C Total / HDL-C] = 5.02 chez les rats diabétiques, donc il sont à la limite du danger. les rats diabétiques traités par l'EMZC ont montré une valeur voisine à celle des rats normaux et diabétiques traités par l'insuline. Ce résultat vient confirmer nos conclusions précédentes concernant le rôle préventif de

Zygophyllum cornutum Coss contre les complications cardiovasculaires associées au diabète.

Le but principale de notre étude c'est d'évaluer l'effet de l'EMZC sur la peroxydation lipidique et le statut antioxydant (Le taux du GSH réduit et l'activité enzymatique du catalase) affectés par le stress oxydant associé au diabète sur des rats rendus diabétiques par la STZ et qui sont utilisés comme modèles pour le diabète de type 1 [Tenner et al., 2003]. Dans la présente étude, nous avons évalué ces paramètres du stress oxydant au niveau de certains organes (foie, rein et cœur) représentant certains sites de complications associées au diabète et dans lesquelles le stress oxydant semble jouer un rôle crucial [Girona J et al., 2008]. La production des ROS et la peroxydation lipidiques sont rapportées d'être augmentées chez les patients diabétiques, en suggérant que le stress oxydant est responsable de la pathophysiologie du diabète [Kassab A et al., 2003], surtout qu'un traitement associé aux antioxydants (la vitamine E et la vitamine C) a montré une amélioration significative et une prévention contre les complications cardiovasculaires [Nicolosis R.J., 1999]. L'hyperglycémie provoque la glycation non enzymatique des protéines suivant la réaction de Maillard et altère le métabolisme énergétique, ça peut conduire aux taux élevés de ROS et au développement des complications du diabète [Vinik A & Flemmer M., 2002]. Le stress oxydant pendant le diabète inclut aussi le déséquilibre de la balance redox provenant de l'altération du métabolisme des lipides et des carbohydrates, de l'augmentation de la production des ROS par la glycation et la peroxydation lipidique, de la diminution de la défense des antioxydants. Tous ces facteurs nous ont conduits à suggérer que les antioxydants, en piégeant les ROS, peuvent améliorer l'hyperglycémie et prévenir le développement des complications associées au diabète.

La présente étude a révélé une augmentation significative des TBARS au niveau du foie et des reins chez les rats diabétiques avec réduction importante de l'activité enzymatique du catalase et du taux de glutathion hépatique et rénal. Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par [Kakkar R et al., 1998 ; Singh N et al., 2005 ; Hamden K., 2008] chez des rats rendus diabétiques par la STZ ou l'alloxan. L'augmentation du taux des TBARS indique l'augmentation de la peroxydation lipidique et le degré des dommages au niveau de ces organes [Hamden K., 2008]. La diminution de l'activité enzymatique du catalase peut être due à son inhibition par les réactions de la glycation non enzymatique, alors que la déplétion en GSH réduit peut signifier son oxydation par les radicaux libres en GSSG oxydé. Ces données supportent l'idée que l'hyperglycémie induit le stress oxydant chez les modèles animaux

comme il était montré précédemment [Saxena A.K., 1993]. Le traitement des rats diabétiques par l'extrait méthanolique de *Zygodphyllum cornutum* a non seulement diminué la formation des TBARS au niveau du foie et des reins mais aussi il a modifié positivement le statut en GSH et de même l'activité enzymatique du catalase. Ces résultats sont clairement indicatifs de l'effet modulateur de *Z. cornutum* sur le stress oxydant. Initialement, nous avons démontré l'effet scavenger, l'activité antioxydante et anti-péroxydation lipidique de l'extrait méthanolique in vitro. L'étude phytochimique de la plante nous a permis de détecter la présence de certains types de composés qui semblent avoir, en plus l'activité antihyperglycémiant, une activité antioxydante comme les polyphénols, les β carotènes, les saponines, les tanins et les flavonoïdes. Il est admis que ces composés notamment les flavonoïdes présentent une activité antioxydante importante.

Au niveau du cœur, notre étude a montré une augmentation significative de TBARS après 6 semaines chez les rats diabétiques ce qui n'est pas le cas pour une étude réalisée par [Parinandi et al., 1990 ; Ouali K et al en 2007] où ils ont mentionné qu'aucune augmentation de TBARS n'est observée chez les rats diabétiques au bout de 6 semaines, tandis qu'une autre étude supporte nos résultats [Manonmani G et al., 2005]. Une augmentation significative de l'activité du catalase est aussi notée avec déplétion remarquable en glutathion réduit. Le même résultat que le notre a été mentionné par Ouali K et al (2007) où ils ont considéré que cette augmentation est un effet compensatoire en réponse contre le stress oxydant résultant de l'accumulation de H_2O_2 endogène et l'épuisement du GSH. Au contraire, Manonmani et ses collaborateurs (2005) ont enregistré une diminution significative de l'activité du catalase au niveau du cœur. Ils l'ont expliquée comme étant le résultat de la glycation non enzymatique. Ces paramètres ont été positivement améliorés chez les rats traités par l'EMZC où on a noté une diminution discutable en TBARS avec restauration de l'activité enzymatique du catalase et du taux de glutathion.

Une étude histologique du foie, du cœur et des reins réalisée en utilisant la coloration par l'hématoxyline&éosine selon la méthode de Conn [Atangwho I.J et al., 2007] a montré différents aspects de dommages et à différents degrés.

Au niveau du foie et du cœur, une prévention significative des dommages oxydatifs a été notée pour les lots diabétiques traités par l'EMZC et l'insuline avec plus d'efficacité pour l'extrait. Ces résultats peuvent être dus à l'effet hypoglycémiant et antioxydant accomplis par la plante. Atangwho et ses collaborateurs ont mentionné que les flavonoïdes des plantes

peuvent exercer un effet protecteur contre les dommages du stress oxydant au niveau des organes [Atangwho I.J et al., 2007].

Pour les reins, des dommages sévères ont été notés chez le lot diabétique contrôle. Une protection des reins par l'EMZC était remarquable dont on a noté une préservation de la structure du cortex mais avec quelques altérations relativement moins importante par rapport au lot diabétique. Donc on peut dire que la plante possède un effet protecteur mais non suffisant au niveau des reins. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus du dosage des TBARS où on a noté leur diminution mais qui restait significativement élevée par rapport au lot diabétique contrôle.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

En conclusion, il existe une évidence considérable à partir de cette étude, c'est qu'une hyperglycémie continue semble augmenter non seulement les perturbations métaboliques, mais aussi la production des radicaux libres et par conséquent l'apparition du stress oxydant chez les diabétiques. En absence d'une réponse compensatoire appropriée par les antioxydants endogènes cellulaires, le système devient plus faible. Le stress oxydant résultant de l'hyperglycémie est ultimement responsable de l'occurrence des changements de l'effet d'insuline et le développement des complications diabétiques comme la néphropathie et les maladies cardiovasculaires. La présente étude est réalisée pour visualiser l'effet de *Zygophyllum. cornutum* Coss; plante saharienne endémique utilisée contre le diabète on a révélé effet positif non seulement sur l'hyperglycémie mais aussi sur les perturbations métaboliques associées et principalement sur le stress oxydant qui résulte de cet état pathologique.

Les résultats obtenus ont montré l'effet bénéfiques de cette plante trésor non seulement contre le diabète et les perturbations métaboliques y associées, mais aussi son effet remarquable contre le stress oxydant résultant avec une probabilité émergente concernant la prévention des complications cardiovasculaires et rénales.

De plus, on arrive à conclure que le traitement par les agents antidiabétiques uniquement n'est pas suffisant pour limiter les complications du diabète et il faut qu'il soit accompagné a un apport en antioxydant qui ont montré leur efficacité pour ces fins.

Cette étude reste préliminaire et plus superficielle, donc, elle nécessite d'autres études approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. Même des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer, d'une part les composés du *Z.cornutum* qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composés accomplissent leurs rôles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaiee A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*;10(6):RA144-RA147.

Abuja P.M and Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 306 (1-17).

Ahmad V.U., Shafi U.G and Shaiq A.M. (1992). Saponins from zygophyllum propinquum. *Phytichemistry* 33(2):453-455.

Akuyam S.A., Isah H.S and Ogala W.N. (2007). Evaluation of serum lipid profile of under-five Nigerian Children. *Annals of African medicine* vol 6,(3):119-123.

Alan W.S. (2005). The role of advanced glycation in diabétic retinopathy. Ed:E.Duch.Humana Press TtotowaN.J 187-206.

Almdal T.P., Petersen K.F., Hanses B.A., Vilstrup H. (1986). Increased capacity of urea synthesis in STZ diabetes in rats. *Diabetologia*.29:812-6.

Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. and Trinajstić N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatica Chemica Acta* 76, 55-61.

Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A.. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 70, 200-14.7

Anwar M.M., Moustafa M.A. (2001). The effect of melatonin on eye lens of rats exposed to ultraviolet radiation. *Comp. Biochem. Physiol.* 129, 57-63.

Armsrong A.M., Young I.S. (1996). The effect of dietary treatment on lipides peroxidation and antioxidants status in newly diagnosed non insulin dependants diabetes, *Free radical boil med*:21-719-735.

Aruoma OI., Spencer J.P. E., Butler J et Halliwell B, (1995). commùentary reaction of plant derived and syntetic antioxidants whith trichloromethylperoxyl radicals. *Free rad. Res.* 22, 187-190.

Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F. and Özkan H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharm. Biol.* 44, 247-252.

Atangwho I.J., Ebang P.E., Eteng M.U., Eyoung E.U and Obi A.U. (2007). Effects of *Vernonia amygdolina Del* Leaf on Kidney function of diabetic rats. *International journal of pharmacology* 3(2):193-48.

Atmaca M., Kuloglu M., Tezcan E and Ustundag B. (2008). Antioxidant enzyme and MDA levels in patient social phobia. *Psychatry research* 05678, (1-6).

Baba Aïssa F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. *Ed. Librairie Moderne-Rouiba* Alger.

Babu P.V.A., Sabitho K.E.K and Shyamaladeoi. (2006). Therapeutic effects of green tea extract on oxidative stress in aorta and hearts of STZ diabetic rats. *CHEMICO-Biological Interactions*.162:114-120.

Bahorun T, 1997. substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and agricultural research council. Reduit. Mauritius.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. and Gazin M. (1996). Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res.* 1-6.

Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* n°3, vol.22, 266-72.

Baskin S.I and Salem H.(1994). Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. *Academic press Inc.* 363 (25-62).

Beaudeau J.L and Dominique B.R. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. *Edition médicales. internationales* p : 550.

Becker BF. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic biol Med*;14:615-13.

Beckman K and Ames B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, , 272 : 19633-19636.

Bedoya F.J. Solano F. Luas M (1996). N-monomethyl argenin and nicotinamid prevent STZ induced double strand DNA break formation in pancreatic rats islets *Experiantus* ,52-344.

Benmahdi A. (2001). Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie* 6: 11-27.

Berthelot M.P.E. (1998). Antioxidant status in diabetic rat liver. Effects of vanadate. *Biochem Pharmacol*;45(3):539-42.*la port chem. APPL* 284.

Beterridge J (2002). Lipide disorder in diabetes mellitus In: pickup J .and Williams. (edds). *Textbook of diabetes Blackwell science.* London 551-553.

Bidet D., Gagnault J., Girard P et Trotin F. (1987). Inflammation, allergie douleurs et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: les flavonoides. *L'actualité chimique.* 89-97.

Bissé E., Abraham E.C. (1985). New Less Temperature sensitive microchronotographic method for the separation and quantitation of glycosylated himoglobins using a non-cyanide buffer system. *J Chromatog* 344:(81-91).

Bopanna KN., Kannan J Gadjils., Boloraman E.R., Rathore, SP(1997) antidiabetic and antihyperlipidemic effect of neem seed kernel puder on alloxan diabetic rabbits Indian journal of pharmacology: 29: 162-167

Boubchir M.A. (2002). Biochimie de nephrologie. 2^{ème} ed. ISBN-00-789-23:320.

Boynes J.W. (1991). Perspectives in diabetes: role of oxidative stress on development of complication in diabetes Diabets40:405-412.

Brantner A., Males Z., Pepeljak S., Antolic A.(1996). Antibacterial activity of paliurus spina-christi Mill (Christ's thorn). Journal of Ethnopharmacology 52,119-122.

Brownlee H., Hedjer J et Scott I. (1992). Effects of a ranges of procianidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. Phys. Mol. Plant pathol. 40, 227-232.

Bruneton J., (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier. 278-279.

Burits M and Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research 14, 323-328.

Cadenas E and Davies J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222-230.

Chandra A, Mahdi A.A, ahmed S and Singh R.K(2007). Indian herbs result in hypoglycemic responses in STZ induced diabetic rats. Nutrition research 27:161-168.

Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278, 36027-31.

Cillard J and Cillard P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydatons. OCL Vol 13n°1 : 24-29.

Chucla M.T., Lamela M., Gato A and Cadavid I. (1987). *Centourea corcubionensis*. A study of its hypoglycaemic activity in rats. *planta medica.*(107-109).

Clairborne A. (1985). Catalase activity. In handbook of method for oxygen radical Research. Green world, R.A.ed: boca Raton .Fla CRC press,283-284.

Collier A., Wilson R., Bredley H., Thomson J.A., Small M. (1992). Free radical activity in type 2 diabetes. *Diabet Med*;7:27-30.

Coopersitin S.J and watk in D (1981). Action of toxic drugs on islet cells in the islet of langerhans. Academic press New York :387-425.

Cuendet M., Hostettmann K. and Potterat O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.

Darley-Usmar V., Wiseman H and Halliwell B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Letters 369: 131-135.

Das H., Wong J et Lien E.(1994). Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity-relationship (SSAR) analysis.

De Oliveira M., Sampaio M., Simon F., Gibert B et Mors W. (1972). Antitumor activity of condensed flavonols. An. Acad. Brazil. 41-44.

Delattre J. (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris -new york.p :620.

Derubertis F.R and Craven Patricia A. (2005). Oxidative and glycoxidative stress in diabetic nephropathy. Ed: P.Cortes and C.E Magensen. Humana press Inc, Totawa N.J.

Didry N., Pinkas M et Torck M. (1982). La composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de **gaidelia**. PI med. Phytother. XVI :7-15.

Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M., (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (ed). P :19-43.

Eddouks: M, oualridi ML, farid O Moufid a, khalidi A, lem hadri A (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc phylolérapie 5-194-203.

Edeaga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African journal of biotechnology. 4 (7):685-688.

Eidi A., Eidi M and Esmaeili E(2006). Antidiabetic effects of garlic (*Allium sativum* L) in normal and STZ induced diabetic rats. Phytomedicine 13:624-629.

Elhilaly J., Tahraoui A., Israili Z.H and Lyoussi B. (2006). Hypolipidemic effects of acute and subchronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. Whole plant in normal and diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 105:441-448.

Ellman G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Arch biochem biophys. 82.70.77.

Etsuo N., Yasukazu Y., Yashiro S and Noriko N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects.4

Fassati P., Priicpe L and Berti G, (1980). Use of 3,5 -di- chloro 2 hydroxy Benzen sulfonic acid/ 4- aminophenozone chromogenic system indirect enzymatic assay of uric acid in serum and urine. Clin chem., 26:227-231.

Fassati P., Principe I. (1982). Clin chem.28.2077.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique : 108-115.

Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Vol 64, N° 6 : 390-396.

Feng Z ., Hu W and Tang M-s. (2004). Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: A possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. 8598–8602 _ PNAS . vol. 101 _ no. 23: 8598-860

Ferrari C.K.B., (2001). Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal* **8**, 175-184.

Friedman and young. (1997). Effects of disease on clinical laboratory test. 3th ed. AACC. Press.

Gallou G., Ruellarid A., Campion L., Allaniric H., Legras B et Cloarec L. (1994). Susceptibilité des LDL a la peroxidation lipidique dans le diabete non insulino dépendant avec ou sans macroarigiopathie *Ann. Biol clin*52 :695-699.

Gillard P., Lannoo M., Keymeulen B et Mathieu C. (2004). Traitement du diabète par la greffe d'îlots. *Flammarion Médecine-Sciences — Actualités Néphrologiques* : 159-165

Girona J., Manzanares J.M., Marimon F., Cabré A., Heras M and Guardiola M. (2008). Oxidized to non oxidized lipoprotein ratios are associated with arteriosclerosis and the metabolic syndrom in diabetic patients. *Nutrition, Metabolism and cardiovascular diseases*.18:380-387.

Goudable J.1., Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*. Vol 11: 115-20.

Graham H.D. (1992). Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 801-805.

Grove T.H. (1979). Effects of reagent PH on determination of HDL cholesterol precipitation with sadium phosphotungstate magnesium. *Clin. chem.* 25:560,1979.

Grove J., Daly A.K., Bassendine M.F., Day CP. (1997). Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*;26:143-6.

Gupta R.K., Kesari A.N., Diwakar S., Tyagi A., Tandon V., Chandra R and watal G.(2008). Invivo evaluation of ant-oxidant and anti-lipidimic potential of annona scanosa a queus extract in type 2 diabetic models. *Journal of ethnopharmacology* 118:21-25.

Halliwell B. (2002). Effect of diabet on cancer development : is oxidative DNA damage a biomarker? *Free radical biology and Medicine* vol10: 968-974

Halliwell B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide. *TRENDS in biochemical sciencs*. Vol 31. n°9: 509-15.

Halliwell B. (2009). The wanderings of a free radcal. *Free radial biology & Medicine* 46: 531-542.

- Handy A.M., Newairy A.A., Yousef M.I and Sheweita S.A. (2002).** Biochemical study on the effects of some Egyptian herbes in alloxan-induced diabetic rats toxicology.170:221-228.
- Hani A.M.E., Shaker K.H., Pollmann k and Seifert K. (1995).** Triterpenoid saponins from *Zygophyllum* species. *Phytochemistry* Volvo n 4 pp:1233-1236
- Hayase F et Kato M. (1984).** Antioxydant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. vetaminol.* 30: 37-46.
- Howlett J., Ashwell M. (2008).** Glycemic response and health summary of a work shop. *AMJ Clin Nutr.*87:2125-65.
- Henry J.B, (1984).** Clinical diagnosis and management 17th edition sanders publisher.
- Hininger-Favier I., (2002).** Le Stress oxydant. INRA SO Press (270): 18-23
- Ichai C., Levraut J., Samat-Long C and Grimaud D. (2003).** Acidose lactique et biguanides : coïncidence ou négligence des règles de prescription ?Lactic acidosis and biguanides: coincidence or negligence of prescribing guidelines. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* Volume 22, Issue 5 : 399-401
- Jaouhari J.T., lazrek H.B., Seddik A and Jana M. (1998).** Hypoglycaemic response to zygophyllum gatulum extracts in patients with non insuln dependent diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*64:211-217.
- Jenkins A.J., Hill M.A. and Rowley K.G. (2007).** Diabetes and Oxidant Stress. *Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective.* Holtzman J.L (ed).p123-160.
- Jhonstone M.T and Gelfand E.N. (2005).** Nitric oxide and its role in diabetes mellitus. Ed:M.T, Johnstone. Humana.Press. Inc Totowa NJ.
- Kakkar R., Mantha S.V., Radhi J., Prasad k., Kalra J. (1993).** Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *J Clin Sci*;94623-32.
- Karumi Y, Onyeyili PA, Ogugbuaja VO. (2004).** Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci.*; 4(3):179-182.
- Kassab A., laradi S., Ferchichi S., Omezzine A., Chafeddine B., Amar H., Chaieb L et miled A. (2003).** Paramètres du stress oxydant dans le diabète de type 2. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.*18 :79-85.
- Kehrer J.P. (1993).** Free radcals as mediators of tissue injury and disease. *Critical review in toxicology*, 23 (1): 21-48.
- Kreofsky T., Scalager G., Vuk-Pavlovic Z., Abraham R et Rohrabach M. (1992).** Condensed tannins promotes the release of arachidonic acid from rabbit residents alveolar macrophages. *Am J. Resir. Cell. Mol. Boil.* 7. 172-181.
- Kritchevsky D (1978)** Fiber, lipides and theroscleriosis, c *American journal of clinical Nutrition* 315:65-74.

Lavis V.R., Picolos M.K and willerson J.T. (2008). Endocrino disorders and the heart.ISC 2295-2315.

Lorenzy M and Oates P.J. (2005). The polyol pathway and diabetic Ritinopathy. Ed: Johnstone. Humana. Press. Inc Totawa.N.J

Mabry T et Ulubelen A. (1980). Chemistry and utilization of phenilpropanoides including flavonoids, coumarins and lignans. J. Agric. Food Chem. 28, 188-196.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay Allemand C. (2005). les composés phénoliques des végétaux ISBN2 -88074-625-6.

Maged Younes. (1999). Free Radicals and Reactive Oxygen Species.International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Academic Press. p 111-117.

Manonmani G., Bhavapriya V., Kalpana S., Govindasamy S and Apparamantham T. (2005). Antioxidant activity of Cassia fistula (liun) flflowers in aloxan induced diabetic rats: Journal of Ethnopharmacology97:39-42.

Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.

Masson O. (2007). Biochimie: Bases biochimique de la diététique. 2^{dème} ed:TEC & DOC. ISBN. (330).

Mazza G. and Oomah B.D. (2000). Chemistry, pharmacology and clinical applications of St. John's wort and Ginkgo biloba. In "Herbs, Botanicals and Teas". Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, PA, U.S.A. pp: 131-176.

Meddleton E., Kardasami J C. (1993). The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London, 617-652.

Milal., Scalbert A and Expert D. (1996). Iron wth-holding by plant polyphénols and resistance to pathogens and rots. Phytochemistry 42: 1551-1555.

Meagher Eand rader D.J. (2001). Antioxidant therapy and Atherosclerosis: animal and human studies.TCM vol 9,N 314.162-165.

Mehmet R.S., Sahin H., Dulger Hand Algom E. (2000). The effects of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, SOD, GPx and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. Clinical biochemistry.33(8):669-674.

Modan M., Halkin H., Karasik A., Lusky A. (1987). Elevated serum uric acid-a facet of hyperinsulinaemia. Diabetologia;30:713-8.

Moller N., Nair KS. (2008). Diabetes and protein metabolism. Diabetes;57:3-4.

Montagnier L., Olivier R. and Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases. *Marcel Dekker, New-York.*

Monteiro B., Zohoun T.H et Hountondji a. (1998). le diabète lié a la malnutrition (diabète tropical) a propos d'un cas observé en Médecine Interne à Cotonou. *Médecine d'Afrique Noire* 45: 538-542.

Mudassir A.Z, Sdney A and crow J.R(2005). Biologically active traditional medicinal herbes from balochistan, Pakistan. *Journal of ethnopharmacology* 96:331-334.

N'Diaye M., Diatta W., Syg Y., Falla D., Faye B et Bassene E. (2008). Activité antihyperglycémiant de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Icacina senegalensis* juss (Icacinaceae).

Newman P.R., Timmerman B.N. and Marby T.J. (1974). Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids. *Médecine d'Afrique Noire*.55: 8-9.

Nicolosi R.J., Lawton C.W and wilson T.A(1999). Vitamin E reduced plasma LDL-C, LDL oxidation, and early aortic atherosclerosis compared with black tea in hypercholesterolemic Hamsters. *Nutrition research* vol 19 n 8:1201-1214.

Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M et Takahara Y. (1993). Antioxydant activity of tannins and flavonoids in eucalyptus rostrata. *Phytochimie*. 33, 557-561.

Okhawa H., Ohishi N., Yagi K., (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal biochem*;95:351-8.

Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H et Arichi S. (1983). Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal and drugs. Inhibitory effects of lipid peroxydation in mitochondria and microsome of liver. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 1625-1631.

Okwu DE. (2005)Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int J Mol Adv Sci.*; 1(4): 375-381.

Opara E.C. (2002). Oxidative stress, micronutrient, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Health* 122 : 28-34.

Orange W.A., Sels J.P-J.E., Gabrielle J.W.M., Paul J.M.R., Bruce H.R. (2001). Effects of atorvastation on LDL oxidation and antioxidant in normocholestérolémic type2 diabetic patients. *Clinica- chemical Acta*; 311:91-94.

Ouali k, Trea F, Toumi M.L, Bairi M, Siaud P and Guellati M.(2007). Oxidative stress in STZ induced experimental diabetes in rats is associated with changes of antioxidant status of heart tissue. *Science & Technollogie C-N25/18-23.*

Ozenda P. (1977). Flore du Sahara. 2ème édition (Ed du Centre National de la Recherche scientifique). Paris. 318-320.

Palsamy P and Subramanian S. (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in STZ-nicotinamide induced experimental diabetic rats *biomedicine pharmacotherapy*.62:598-605.

Parinondi N.L., Thompson E., Schmid H.H.O. (1990). Diabetic heart and kidney exhibit increased resistance to lipid peroxidation *Biochim- Biophys. Acta*1047;63-9.

Peppa M., Uribarri J and Vlassara H.(2005). Diabets and advanced glycooxidation End products. Ed:M.T Jhonstone. Humana press Inc. Totowa N.J.

Perez CMM, Paris R. Sur une nouvelle plante hypoglycémiant, le *Zygodphyllum cornutum* Cosson. Mémoire présenté à l'Académie de Pharmacie. Paris ; 1958.
Peter M et al., 2001

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K and Defraigne J.O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition clinique et métabolisme 16: 233–239.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.*; 4(5)

Price M.P. and Butler L.G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemisty 25, 1268-1273.

Priyadarsini K. I. (2005). Molecular Mechanisms Involving Free Radical Reactions of Antioxidants and Radioprotectors. Founder's Day Special Issue : 1-6.

Qi x-y., Chen w-j., Zhang l-q and Xie B.J. (2008). Magrocides extract from *Siratia grosveuori* scavenges free radicals in vitro acid lowers oxidative stress serum glucose and lipid levels in aloxan induced diabetic mice. Nutrition research 28:278-284.

Rahimi R, Nikfar S, Larijani B and Abdollahi M (2005). A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. Biomedicine and pharmacotherapy 59:365-373.

Rajagopal K, Sasi kala K (2008). Antihypoglyamic and antihyperlipidemic effects of *Nymphraea stellata* in alloxan induced diabetic rats. Singapore Med J, 49(2):137-142.

Rajasekaran S., Sivagnanam K., Subramanian S. (2005). Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. Pharm Rep;57(1):90-6.

Ravi K, rojasekaran S, Subramanian S (2005). Antihyperlipidemic effect of *Eugenia Jambolana* seed Keinel on STZ induced diabetic rats. Food chemical Toxicologie43:1433-1439.

Ravr H., Andary C., Kovacs G et Molgaard P. (1984). cafféic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. Biochimie. Syst. Ecol. 17, 175-184.

Rees M.D., Kennett E.C., Whitelock J.M and Davies M.J. (2008). Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. Free radical biology & Medicine 44: 1973-2001

Renard C and ObbergheE.V.(2006). Role of diabetes in atherosclerotic pathogenesis: what have we learned from animal models. Diabetes metab 32:15-29.

Rodier M., 2001. Définition et classification du diabète. Médecine Nucléaire vol.25 - n°2 : 91-93.

Salunkhe D.K. (1990). Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press.

Salvayre A.N et Salvayre R. (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. OCL. Vol 12 n° 5 : 433-438.

Sanchez de Madina F, Gamez M.J, Jiménez I, Jiménez J, Osuna J.I and zarzuelo A.(1994). Hypoglycemic activity of juniper «Berries ». planta Med.06 :197-200.

SaravananR., Rantl (2005). Anthyperlipidemic and antiperoxidative effects of insulin, a polyherbal formulation in alloxan induced hyperglycaemic rats, BMC Complement Altern. Med, 5:14-21.

Schmitt B., Ferry C., Daniel N., Weill P., Kerhoas N et Legand P. (2006). Effet d'un régime riche en acides gras ω 3 et en CLA9-cis, 11 trans sur l'insulinorésistance et les paramètres du diabète de type 2. OCL Vol 13n°1 : 70-75.

Sekeroglu M.R, salim H, Dulger H and Algun E (2000). The effect of dietary treatment on E rethrocute lipid paroxidation SOD, GP, and serium lipid. Peroxidation in patients with type 2 diabets Mellitus. Clinical chemistry vol 33 n 8: 669-674.

Shani J (Mishkinsky), Aharonson Z, Sulman FG. Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a Feeding source of the sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetologia*. 1969; 5: 379-383.

Sharififar F., Dehghan-Nudeh G. and Mirtajaldini M. (2008). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. Food Chemistry, 1-19.

Sharma SB., balomayunder C., Rouy P (2008) hypoglyomie and hypolipdemiec effects of flavonord rish extract from *Eugeria Jam bolona* seeds on STZ induced diabetic rate. Food and chemical toxicology:46:23-76-2383.

Shih C.C., Wu YW., Lin WC. (2002). Antihyperglycemic and antioxidant properties of *Anoectochilus Formosanus* in diabetic rats. CLIN Exp pharmacol;29:684-8.

Singh N, Kamath V and Rajini P.S(2005). A H enuation of hyperglycemia and associated biochemical parameter in STZ induced diabetic rats by detary supplementation of potato peel powder. Clinca chemical Acta353:165-175.

Skim F., Jaouhari J.T., Lazrek H.B., Kayaa A., Elamri H., Jana M. (1998). *Zygophyllum gaetulum*: A study of its hypoglycaemic activity in rats, Annales. Pharmaceutique Françaises 56,(in press).

Slatter DA., Bolton CH., Bailey AJ., (2000). The importance of lipid-driven malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*; 550-7.

Sloter H.R., pockard CJ., Bichers., SHE phered (1980). Effects of cholestyramine on receptor mediated plasma clearance and tissue uptake of human LSC n the rabbit, journal of biological chemistry.255:102-10-10213.

Smati D., Longeon A and Guyot M. (2004). 3 β (3,4-Dihydroxyeinnamoyl) erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian sahara. *Journal of Ethnopharmacology* 95:405-407.

Srinivasan K.N., Pugaloudi K.V., Sambandam G., Ramakrishna M and Menon P.V. (1997). Diabetes mellitus, lipid Peroxidation and antioxidant status in rural patients. *Clinica chemical Acta* 259:183-186.

Stavric B et Matula T. (1992). Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. 274-294.

Sugdan P.H., Fuller S.J. (1991). Regulation of protein turn over in skeletal and cordiac muscle. *Biochem J.*273:21-37.

Taleb-senoucia D., Ghamaria H., kraifa D., Bouderbela S., Prost J., Locaille-Duboise M.A., BouhnakaM (2009). Antioxidant effet of ajugo iva aqueous astract in STZ induced diabetic rats phitomedicine, 25:221-235.

Tenner J.R., Zhang, X.J., Lombardini J.B. (2003). Hypoglycemic effects of taurine in the alloxan-treated rabbits, a model for type 1 diabetes. *Adv. Exp.Med. Biol.* 526, 97-104.

Thomas S.R and Stocker R. (1999). Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implication for atherosclerosis. *Free radical biology & medicine.* Vol 28:1795-1805.

Tim V. (2009). Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation. *J Am Med Inform Assoc.* 16(4):471-9.
Thomson M., 2007

Tratner I. (2003). Chacun souhaite vivre longtemps, mais personne ne veut être vieux. *Médecine/Sciences* n°12. Vol 19 :1291-1292.

Travlos G.S., Morris R.W., Elwell M.R. Duke A., Rosenblum S., Thompson M.B. (1996). Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology*;107:17-29.

Trinder P. (1969). *Ann Clin biochem* 6,24.

Turrens J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17, 3-8.

Uchimura K., Nagasaka A., Hayachi R., Makino M., Nagata M., Kakisawa H. (1999). Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. *Diabetes, its Complicat*;13:264-70.

Ursini F., Tubaro F., Rong J and Sevanian A. (1999). Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. *Nutrition reiews.* Vol 57, n°8: 241-249.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M and Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 : 44–84

Vazquez-Freire M.J., lamella M and calleja J.M(1996). A preliminary study of hypoglycemic activity of several polysaccharide extract from brown algae: *Fucus vesiculosus*, *Sargassum polyceroides* and *Laminaria ochroleuca*. *Phytotherapy research*, vol 10:5184-5185.

Vinik and Flemmer M. (2002). Diabetes and macrovascular disease. *Journal of diabetes and its complications* 16:235-245.

Vivekananthan D.P., Penn M.S., Sapp S.K., Hsu A and Topol E.J. (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*. Vol 36: 2017-2023

Werstuck G.H. (2006). Molecular and cellular mechanisms by which diabetes Mellitus promotes the development of atherosclerosis. *Biochemistry of atherosclerosis* ed: S.K Choma. Springer, New York 284-297.

Willems D., Dorchy H and Dufrasne D. (1998). Serum antioxidant status and oxidized LDL in well controlled young type 1 diabetic patients with and without subclinical complications. *Atherosclerosis* 137 suppl:561-564.

Winiarska K.S. Zymanski K., Gorniak P., Dudziak M and Bryla J. (2008). Hypoglycemic antioxidant and nephroprotective effects of Taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochemie* 91:261-270.

Yamamoto Y., E Niki., Kamiya Y.(1992). Oxidation of lipids: 3. Oxidation of methyl-linoleate in solution, *lipids* 17 870-877

Young D et Destaner L. (1975). *Clin chem.* 21-5.

RESUMES

Résumé :

Effet de certains antioxydants sur quelques paramètres du stress oxydant et les organes en relation.

Zygophyllum cornutum Coss est l'un des plusieurs remèdes traditionnels utilisés pour le traitement du diabète en Algérie. Le diabète est souvent accompagné par des anomalies métaboliques et connu d'être associé au stress oxydatif, un facteur de risque majeur pour la pathogenèse des complications diabétiques qui peuvent être gérées par des antioxydants naturels

La présente étude visait à évaluer l'effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* Coss contre le diabète expérimental de type 1 et le stress oxydant qui en résulte. Pour cette raison, un screening de composés phytochimiques et des tests de l'activité antioxydante in vitro ont été réalisés pour estimer ses effets attendus. Les résultats ont montré la présence de différents composés: les polyphénols, les flavonoïdes, tanins, saponines, des coumarines et des alcaloïdes. Un effet scavenger significatif et une activité antioxydante élevée sont également signalés.

Le diabète a été induit expérimentalement chez des rats Wistar albinos par une injection unique de la streptozotocine à raison de 55 mg / kg. La glycémie, l'urée, l'acide urique, la créatinine, les protéines totales, et le profil lipidique ont été mesurés. Le Glutathion (GSH), la catalase (CAT) et les espèces réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) ont également été évalués dans le foie, les tissus rénaux et cardiaques. Les résultats ont montré l'augmentation de la glycémie, l'urée, l'acide urique, créatinine, LDL-C, le cholestérol et les triglycérides avec diminution des (HDL-C) et des protéines totales chez les rats diabétiques. En outre, les TBARS dans les tissus des différents organes ont été sensiblement augmentées, tandis que le GSH et CAT ont été significativement modifiés par rapport aux rats témoins normaux. L'administration par voie orale de EMZC à la dose de 700mg/kg a baissé la glycémie et a amélioré le profil lipidique et les paramètres de la fonction rénale. Les TBARS sont significativement diminuées dans tous les organes, tandis que l'activité du catalase et le taux du GSH ont été sensiblement rétablies.

Ces résultats suggèrent un effet important antihyperglycémiant et antioxydant de *Zygophyllum cornutum* Coss qui peut atténuer le stress oxydatif et retarder l'apparition des complications du diabète.

Keywords : *Zygophyllum cornutum* Coss, diabete, stress oxidative, antioxydants.

Abstract:

Effect of some antioxidant on oxidative stress parameters an the related organs

Zygophyllum cornutum is one of several traditional remedies used for diabetes treatment in Algerian Sahara. Diabetes is often accompanied by metabolic abnormalities and known to involve oxidative stress, a major risk factor for the pathogenesis of diabetic complications, which may be managed by natural antioxidant products. The present study was aimed to evaluate the effect of *Zygophyllum cornutum* methanolic extract against experimental type 1 diabetes mellitus-associated oxidative stress. For this reason, phytochemical screening and antioxidant activity in vitro were queried out to evaluate its expected effects. Results showed the presence of different compounds: polyphénols, flavonoids, tannins, saponins, coumarins and alkaloids. A significant scavenger effect and high antioxidant activity are also reported. Diabetes was induced experimentally in rats by i.p single injection of streptozotocin in a dose of 55mg/ kg bwt. Serum glucose, urea, uric acid, creatinin, total proteins, and lipid profile were measured. Glutathione (GSH), catalase (CAT) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were also evaluated in the liver, kidney and heart tissues. The results showed increased blood glucose, urea, uric acid, creatinin, low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), cholesterol and triglycerids with decreased level of high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) and total proteins in diabetic rats. Moreover, TBARS in the different organ's tissues were markedly increased while GSH and CAT were significantly modified compared to control normal rats. Oral administration of ZCME in a dose of 700mg/kg bwt improved serum glucose, lipid profile and renal function tests. TBARS were significantly reduced in all organ's tissues, while CAT and GSH were markedly restored.

These results suggest a strong antihyperglycemic and antioxidant effect of *Zygophyllum cornutum* Coss which can ameliorate oxidative stress and delay the occurrence of diabetic complications in type 1 diabetes mellitus.

Keywords : *Zygophyllum cornutum*, diabetes mellitus, oxidative stress, antioxidants

الملخص

تأثير بعض مضادات التأكسد على بعض مؤشرات الإجهاد التأكسدي و الأعضاء ذات العلاقة.

تعد *zygophyllum cornutum* من بين العديد من الأعشاب الطبية المستعملة في علاج داء السكري في الصحراء الجزائرية. غالباً ما يكون داء السكري مصحوباً باضطرابات أيضية ينتج عنها الإجهاد التأكسدي الذي يعد من أكثر العوامل المحفزة المرضية الناجمة عنه و التي يعتقد أنه يمكن السيطرة عليها عن طريق استعمال مضادات للأكسدة الطبيعية.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير المستخلص الميثيلي لنبات *zygophyllum cornutum* على داء السكري المرتبط بالأنسولين و الإجهاد التأكسدي الناتج عنه.

في هذا الإطار تم إجراء دراسة مخبرية أولية حول نوعية المكونات الكيميائية للنبته و نشاطها المضاد للتأكسد. أظهرت النتائج وجود مكونات متنوعة منها متعددات الفينول، الفلافونويدات – التينينات-، الكومارينات و القلويدات. من جهة أخرى أظهرت هذه الدراسة امخبرية نشاط كانس معتبر للنبته إضافة إلى قدرتها العالية المضادة للتأكسد. بالنسبة للدراسة المجرات على الحيوانات، تم إحداث أو تحريض داء السكري عند جرذان بيضاء عن طريق حقن تحت جلدي لجرعة قدرها 55مغ/كغ من مادة ستراتوزوتوسين بعدها تم تقدير مختلف العوامل الكيميائية المتعلقة بالايض. بالنسبة لمؤشرات الإجهاد التأكسدي تم قياس كمية الأكسدة الليبيدية (TBARS)، إنزيم الكاتالاز و كمية GSH المرجع على مستوى أنسجة كل من الكبد، الكلية و القلب.

أظهرت النتائج إرتفاع محسوس في جميع تراكيز مؤشرات الأيض مع إنخفاض في نسبة HDL-C عند الحيوانات المريضة بداء السكري. أما مؤشرات الإجهاد التأكسدي فقد لوحظ إرتفاع في كمية TBARS على مستوى أنسجة جميع الأعضاء المدروسة إلى جانب اضطراب في كل من نشاط الكاتالاز و كمية GSH المرجع عند الحيوانات المريضة. أظهرت المعالجة بجرعة 700مغ/كغ من المستخلص الميثيلي لنبات *zygophyllum cornutum* تحسن ملحوظ في جميع المؤشرات إلى جانب إنخفاض تركيز السكر في الدم.

من خلال هذه النتائج يمكننا أن نستنتج أنه إضافة إلى نشاطها المضاد للسكري، يمكن لنبته *zygophyllum cornutum* أن تلعب دوراً مهماً في تعديل ميزان الإجهاد التأكسدي و الوقاية أو التأخير في تطور مضاعفات داء السكري.

الكلمات المفتاحية: *Zygophyllum cornutum* Coss. - داء السكري - الإجهاد التأكسدي- مضادات التأكسد.

Nom: BOUMAZA
Prénom Awatif

Date de soutenance: 09/11/2009

Thème : *Effet de certains antioxydants sur quelques paramètres du stress oxydant et les organes en relation*

Résumé :

Zygophyllum cornutum est l'un des plusieurs remèdes traditionnels utilisés pour le traitement du diabète en Algérie. Le diabète est souvent accompagné par des anomalies métaboliques et connu d'être associé au stress oxydatif, un facteur de risque majeur pour la pathogenèse des complications diabétiques qui peuvent être gérés par des antioxydants naturels

La présente étude visait à évaluer l'effet de l'extrait méthanolique de Zygophyllum cornutum Coss contre le diabète expérimental de type 1 et le stress oxydant qui en résulte. Pour cette raison, un screening de composés phytochimiques et des tests de l'activité antioxydante in vitro ont été réalisés pour estimer ses effets attendus. Les résultats ont montré la présence de différents composés: les polyphénols, les flavonoïdes, tanins, saponines, des coumarines et des alcaloïdes. Un effet scavenger significatif et une activité antioxydante élevée sont également signalés.

Le diabète a été induit expérimentalement chez des rats Wistar albinos par une injection unique de la streptozotocine à raison de 55 mg / kg. La glycémie, l'urée, l'acide urique, la créatinine, les protéines totales, et le profil lipidique ont été mesurés. Le Glutathion (GSH), la catalase (CAT) et les espèces réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) ont également été évaluées dans le foie, les tissus rénaux et cardiaques. Les résultats ont montré l'augmentation de la glycémie, l'urée, l'acide urique, créatinine, LDL-C, le cholestérol et les triglycérides avec diminution des (HDL-C) et des protéines totales chez les rats diabétiques. En outre, les TBARS dans les tissus des différents organes ont été sensiblement augmenté, tandis que le GSH et CAT ont été significativement modifiés par rapport aux rats témoins normaux. L'administration par voie orale de EMZC à la dose de 700mg/kg a baissé la glycémie et amélioré le profil lipidique et les paramètres de la fonction rénale. Les TBARS sont significativement diminué dans tous les organes, tandis que l'activité du catalase et le taux du GSH ont été sensiblement rétablies.

Ces résultats suggèrent un effet important antihyperglycémiant et antioxydant de Zygophyllum cornutum Coss qui peut atténuer le stress oxydatif et retarder l'apparition des complications du diabète.

Keywords : *Zygophyllum cornutum Coss, diabete, stress oxydative, antioxydants*

Laboratoire de biologie animale, Département de Biologie animale, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université Mentouri Constantine

Membres du Jury:

Président :	Dr.Khelifi Touhami F MC	Université de Constantine :
Rapporteur :	Prof. Lezzar k	C.H.U de Constantine.
Examineurs :	Prof. Saka. S	Université de Annaba
	Dr. Abidli. N MC	Université de Constantine.