



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi -Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Appliquée  
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie



## Thèse

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

En : TOXICOLOGIE CELLULAIRE

Option : TOXICOLOGIE

Par : **Mr. Benkhedir Abdelkarim**

**Intitulée :**

**Contribution à l'évaluation de l'effet de *Thymus numidicus* et de *Rosmarinus officinalis* sur le diabète alloxanique chez les rats**

**Devant le jury :**

<b>Mr. Djabri B</b>	Pr	Université de Tébessa	Président
<b>Mm. Boussekine S</b>	Pr	Université de Tébessa	Rapporteur
<b>Mr. Gasmi S</b>	MCA	Université de Tébessa	Examineur
<b>Mr. Goudjil T</b>	MCA	Université de Tébessa	Examineur
<b>Mr. Khiari M</b>	MCA	Université de Souk Ahras	Examineur

**Date de soutenance : 16 / 07 / 2023**

## Résumé

---

Le diabète sucré est une maladie métabolique devenue un problème de santé publique. Il est caractérisé par une hyperglycémie. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets antihyperglycémiant, antioxydant, antialzheimer et cytoprotecteur des extraits des deux plantes du Nord-Est de l'Algérie ; le *Rosmarinus officinalis* (RO) et le *Thymus numidicus* (TN). Dans un premier temps, une investigation phytochimique des extraits de plusieurs fractions des deux plantes permettant la mise en évidence de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, de l'activité antioxydante, du pouvoir antiglycation, de la capacité des extraits à inhiber les enzymes  $\alpha$ -amylase et Acétyl choline estérase, d'élucider la fraction la plus efficace des deux plantes sur l'activité des enzymes du métabolisme glucidique.

Dans un deuxième temps, deux expériences in vivo ont été réalisées ; la première sert à évaluer les effets hypoglycémiant et anti-hyperglycémiant sur des rats normaux et chargés en glucose, la deuxième expérience vise à étudier l'effet dose-dépendante de l'extrait des deux plantes sur le métabolisme des glucides chez des rats rendus diabétiques par injection intrapéritonéale d'Alloxan (150mg/kg). Le processus a duré 21 jours, puis nous avons procédé aux dosages biochimiques. L'étude in vitro a montré que l'extrait acétate d'éthyle de RO (RO-AE), a présenté une teneur en polyphénols et flavonoïdes moyenne mais avec un pouvoir d'activité biologique le plus important parmi les fractions (pouvoir antioxydant, inhibition de l' $\alpha$ -amylase et Acétyl choline esterase, le potentiel antiglycation). L'étude in vivo a montré une réduction dose-dépendante de la glycémie pour les tests anti-hyperglycémiques et hypoglycémiques de l'extrait acétate d'éthyle du RO avec la dose de 150 et 300 mg/kg du PC. L'extrait de RO a montré une augmentation significative de l'insuline, de l'hémoglobine et de l'activité des enzymes hexokinase et glucose-6-phosphate déshydrogénase. En plus une diminution des taux plasmatiques de l'HbA1c, de l'activité enzymatique de la glucose-6-phosphatase et de la fructose-1,6-bisphosphatase chez les rats diabétiques, l'administration de cette fraction prévient la perte du poids corporel et conduit à une amélioration de l'activité enzymatique de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase. L'étude histologique a montré une atténuation des effets secondaires très importants avec la fraction de l'extrait acétate d'éthyle du RO chez les rats diabétiques.

En conclusion, la présente étude suggère que la fraction acétate d'éthyle de *Rosmarinus officinalis* a un effet bénéfique sur l'homéostasie du glucose au cours du diabète avec réparation des dommages oxydatifs et rétablissement des marqueurs biologiques et histologiques étudiés. Ces résultats semblent en faveur de l'exploitation de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* en tant qu'agent pharmacologique ou complément alimentaire pour le contrôle du diabète et la prévention de ses complications.

**Mots clés :** Alloxane, Antioxydant, Enzymes métaboliques glucidiques, Diabète sucré, Glycogène, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus numidicus*.

## Abstract

---

Diabetes mellitus is a metabolic disease that has become a public health problem. It is characterized by hyperglycemia. The objective of this study is to evaluate the antihyperglycemic, antioxidant, antialzheimer and cytoprotective effects of the extracts of the two plants from the North-East of Algeria; *Rosmarinus officinalis* (RO) and *Thymus numidicus* (TN). Initially, a phytochemical investigation of the extracts of several fractions of the two plants allowing the demonstration of the content of polyphenols and flavonoids, the antioxidant activity, the antiglycation power, the capacity of the extracts to inhibit  $\alpha$  enzymes -amylase and Acetyl choline esterase, to elucidate the most effective fraction of the two plants on the activity of carbohydrate metabolism enzymes.

Secondly, two experiments in vivo were carried out; the first is used to evaluate hypoglycemic and anti-hyperglycemic effects in normal and glucose-loaded rats, the second experiment aims to study the dose-dependent effect of the extract of the two plants on carbohydrate metabolism in rats rendered diabetic by intraperitoneal injection of Alloxan (150mg/kg). The process lasted 21 days, then we proceeded to the biochemical assays. The in vitro study showed that the ethyl acetate extract of RO (RO-AE), presented an average content of polyphenols and flavonoids but with the highest biological activity power among the fractions (antioxidant power, inhibition of  $\alpha$ -amylase and Acetyl choline esterase, the antiglycation potential). The in vivo study showed a dose-dependent reduction in blood glucose for the anti-hyperglycemic and hypoglycemic tests of the ethyl acetate extract of RO with the dose of 150 and 300 mg/kg of PC. RO extract showed a significant increase in insulin, hemoglobin, hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity. In addition, a decrease in plasma levels of HbA1c, enzymatic activity of glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase in diabetic rats, the administration of this fraction prevents the loss of body weight and leads to an improvement in the enzymatic activity of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. The histological study showed a very important attenuation of side effects with the fraction of the ethyl acetate extract of the RO in diabetic rats.

In conclusion, the present study suggests that the ethyl acetate fraction of *Rosmarinus officinalis* has a beneficial effect on glucose homeostasis in diabetes, with repair of oxidative damage and restoration of the biological and histological markers studied. These results seem in favor of the exploitation of *Rosmarinus officinalis* extract as a pharmacological agent or dietary supplement for the control of diabetes and the prevention of its complications.

**Keywords** : Alloxan Antioxydant, Carbohydrate metabolic enzymes, Diabetes mellitus, Glycogen, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus numidicus*.

## ملخص

في الحاجة إلى تطوير علاج لطيف في مواجهة المضاعفات الثانوية لمرض السكري من النوع 2 ومشكلة الخرف المتعلق بالسكري يوجد نباتات في المنطقة الشمالية الشرقية الجزائرية حيث قمنا بالتحري عنها لإثبات إمكاناتها العلاجية، حيث قمنا بتحضير مستخلص من عدة مذيبات لنبات *Rosmarinus officinalis* (RO) و *Thymus numidicus* وهذا لتبيان كمية محتوى البوليفينول والفلافونويد إثبات نشاطها ضد اجهاد التأكسدي، والتي تم تحديدها عن طريق قياس إمكانات المستخلص في إزالة الجذور الحرة باستخدام طرق مختلفة (DPPH، ABTS، GOR، SP)، لإثبات قوة مضادة للجليكيشن و لإثبات قدرة المستخلص على تثبيط الإنزيمات (Ache،  $\alpha$ -amylase). علاوة على ذلك، فإن الغرض من هذه الدراسة هو تقييم وإتقان التأثير الوقائي للجزء الذي يبدو الأكثر فعالية على نباتات *Rosmarinus officinalis* و *Thymus numidicus* على إنزيمات استقلاب الكربوهيدرات أثناء مرض السكري. لتحقيق هذا الهدف، تم إجراء تجربتين؛ الأول كان تقييم تأثيرات سكر الدم ومضادات ارتفاع السكر في الدم على الجرذان العادية والمحملة بالجلوكوز، تهدف التجربة الثانية إلى دراسة التأثير المعتمد على الجرعة لمستخلص النباتان اللذان يعملان على استقلاب الكربوهيدرات في جرذان *Wistar* المصابة بداء السكري عن طريق الحقن داخل الصفاق Alloxan؛ استغرقت العملية 21 يومًا، ثم انتقلنا إلى الفحوصات. تبين أن مستخلص أسيتات الإيثيل في RO يتمتع بأكبر قدر من مضادات الأكسدة بطرق مختلفة وأحيانًا أكثر من المعيار المستخدم، تبين أن مستخلصي أسيتات الإيثيل من R.O و T.N لقدرة كبيرة على تثبيط الأميليز أقوى من المعيار الذي تم استخدامه وقدرة Antiglycation كبيرة، علاوة على ذلك، أظهر تحليل النتائج في الجسم الحي انخفاضًا يعتمد على الجرعة في جلوكوز الدم لاختبارات مكافحة ارتفاع السكر في الدم ونقص السكر في الدم لـ RO-AE بجرعة 150 و 300 مغم / كغم من وزن الجسم، وأظهر الأخير زيادة كبيرة في الأنسولين والهيموجلوبين و hexokinase، نشاط إنزيم نازعة هيدروجين الجلوكوز 6 فوسفات وتأثير تعديل مصاحب على مستويات الجلوكوز في البلازما. بالإضافة إلى انخفاض مستويات HbA1c في البلازما، ونشاط إنزيم الجلوكوز 6-فوسفاتاز والفركتوز 1،6-بيسوفوسفاتاز في الفئران المصابة بداء السكري، فإن إعطاء هذا الجزء يمنع فقدان وزن الجسم ويؤدي إلى تحسين نشاط الجليكوجين سينثاز وفوسفوريلاز الجليكوجين.

من هذه النتائج يمكن القول إن جزء أسيتات الإيثيل من نبات *Rosmarinus officinalis* هو مصدر لمركب طبيعي واعد في علاج المضاعفات المرتبطة بمرض السكري من النوع 2، وأن جزء RO -AE في جرعة (300 ملغم / كغم من وزن الجسم) لها تأثير مضاد لفرط سكر الدم في الفئران المصابة بداء السكري، وقد تم تأكيد هذه النتائج من خلال الفحص النسيجي للكبد.

**الكلمات المفتاحية:** ألوكسان، مضادات الأكسدة، إنزيمات التمثيل الغذائي للكربوهيدرات، داء السكري، الجليكوجين،

*Thymus numidicus*، *Rosmarinus officinalis*

## Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie, Département de biologie, Université de Tébessa.

Je remercie en premier lieu mon dieu **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse, il a été et sera toujours à côté de moi pour réussir à terminer n'importe quel travail.

Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à mon encadreur **Mme. Boussekine S**, professeur à l'université de Tébessa, qui m'a fait l'honneur d'assurer la direction de ce travail, et qui a su faire preuve de patience, d'indulgence et de compréhension tout au long de ces années, me permettant ainsi de mener à bien cette étude. Je tiens à remercier Madame pour sa présence, pour sa patience, pour ses précieux conseils pour sa confiance. Elle m'avait encadré tout au long de ces années de recherche. Elle avait pris une part prépondérante dans ma formation de jeune chercheur et m'avait donné l'envie d'aller plus loin. L'excellence est assez rare pour que l'on puisse la souligner. Elle demeurera à jamais un exemple pour moi. Je la prie de croire en ma profonde reconnaissance et l'expression de mon profond respect.

Je profite aussi cette occasion pour adresser mes remerciements à mon enseignant monsieur le doyen de la faculté des sciences : le professeur **M. Djabri B** de l'université de Tébessa, pour son aisance et son souci constant afin que cette thèse se réalise et se termine dans les plus brefs délais, avec enthousiasme, disponibilité, efficacité et sympathie.

J'adresse mes sincères remerciements au **Monsieur Benkhedir Mohamed Lotfi** (Professeur à l'université de Tébessa) pour sa disponibilité, j'apprécie beaucoup le travail acharné qu'il avait accompli pour m'aider.

Je tiens à remercier vivement le jury composé de : Mr Jabri Belgacem, (professeur à l'université de Tébessa) Qui, malgré ses nombreuses obligations a bien voulu faire partie de ce jury. Qu'il reçoive toute ma gratitude et mon respect. J'exprime aussi toute ma reconnaissance à Monsieur Gasmi Salim (Enseignant à l'université de Tébessa) pour l'intérêt et l'attention qu'il a accordés à ce travail de thèse, et pour avoir accepté de faire partie de la composante de ce jury, je remercie Mr Goudjil Taher (enseignant à l'université de Tébessa) à faire partie de jury et mes remerciements chaleureux à Mr Khiari Mohamed (enseignant à l'université de Souk Ahras) d'avoir accepté l'invitation d'être membre de ce jury.

Je saisis également cette opportunité pour adresser un grand remerciement très chaleureux à la technicienne Mme. Soad qui m'a soutenu toute cette longue période de recherche et qui m'a toujours accueilli avec chaleur dans le laboratoire merci.

Mes remerciements s'adressent aussi à M. Machai A, pour ses encouragements et ses nombreux conseils. Je tiens à remercier les enseignants de biologie, en particulier : A Monsieur : Salami S., Soltani N., Goudjil T., Mme. Bouguessa., Tine S.

Mes vifs remerciements à mon équipe : Saker H., Gasmi S., Nasri A, je suis très reconnaissant pour vos efforts déployés pour m'aider pour vos écoute merci d'avoir consacré vos temps pour achever ce travail et merci pour vos patientes.

Un grand remerciement pour mes voisins Islem A., Nourdine K. d'être offert une ambiance géniale.

Mes vifs remerciements à tous mes collègues et enseignants de m'avoir apporté leur aide quant à l'utilisation des laboratoires de l'Université de Tlemcen, d'Annaba, de Constantine, de l'institut Pasteur, centre de recherche CRBT je les remercie pour l'ambiance chaleureuse et conviviale et pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans le cadre de ce travail, un grand merci aux agents de sécurité, de ménage et l'équipe administrative de l'Université de Tébessa, nos sentiments de reconnaissance et de remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Merci

## بإسم الله الرحمان الرحيم

تم إنجاز هذا العمل بتوفيق من الله عز وجل له احمد على كل شيء، أنار لي دربي للنجاح وهو الذي يبعث في الأمل للمواصلة نحوي الأفق كما أنه ازاح عني الصعاب كلما طغت ومنحني القوة والعزيمة وحب الإسرار للنهاية.

خلال فترة التأطير كانت الأستاذة بوسكين سميرة من أقرب الأساتذة لي كانت مختلفة عن البقية في أسلوبها في توجيهها المستمر حيث أنها شاركتني كل خبرتها ورؤاها العلمية والمعرفية الثرية وفي جميع الشؤون كما أنه كان لها العديد من المواقف التي أشيد بها حيث أنها كانت دائمة الثقة في حيث أنها دافعت عني في العديد من المواقف دون أن تهتز أعتز كثيرا بهذا كما أنها كانت دائمة النصح و الإرشاد كما أنها كانت دائمة التشجيع واضعة ثقته بي في رفع التحدي للوصول إلى نتائج جد مرضية رغم الصعاب ما عساي سوى أن أشكرك جزيل الشكر أيتها الأستاذة الفاضلة.

أعنتم أيضا ذكر الأستاذ جابري بلقاسم بجزيل الشكر على دعمه المتواصل وثقته حيث أتاح لنا العمل في المخبر دون أي شروط وفي أي وقت أشكرك جزيل الشكر أيها الأستاذ الفاضل كما أخصص الذكر لشكر أستاذ حركاتي على المساندة والخبرات الثمينة المقدمة من طرفه والسهر بقلق على تجسيدها هذا لطف وكرم منكم جد مميز أستاذاي الكرام شكرا وجزيل الشكر لكما.

أشكر سيدات والسادة مخبر البحث لمعهد لويس باستور وأخص بالذكر ياسمين بن علي وشفا إيمان وكل طاقم التابع لها. في الجامعة ومحيطها كانت أوقات ممتعة مع أصدقائي المميزين أصدقائي الذين أكون معهم على طبيعتي شكرا لكم جميعا. بعد كل أمسية كنت أعود إلى البيت لرؤية والدي وإخوتي حيث كنت أسترجع معهم أنفاسي وأجدد عزيمتي بدعمهم المتواصل لي.

إلى تلك الوردة الجميلة التي ترسخ مبادئ..... إلى أمي العزيزة.

إلى ذلك الجبل الذي يحيا من أجل أن أبقى شامخا..... إلى أبي العزيز

إلى تلك الزهرتان أختاي الغاليتان.

اهدي هذا العمل

## Liste des Abréviations

<b>ATP</b>	Adénosine-triphosphate
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>AKT</b>	Protéine kinase B
<b>ADP</b>	Adénosine-diphosphate
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ABTS</b>	L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<b>CK2</b>	Casein kinase
<b>DT2</b>	Diabète type 2
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>EGP</b>	Production endogène de glucose
<b>F2,6P2</b>	Fructose-2,6-bisphosphate
<b>FBPase</b>	Fructose-1,6-bisphosphatase
<b>Fox</b>	Forkhead box
<b>GLUT</b>	Glucose transporter
<b>GSSG</b>	Glutathion forme oxydé
<b>GSH</b>	Glutathion forme réduit
<b>G6Pase</b>	Glucose-6-phosphatase
<b>GC</b>	Glucocorticoïdes
<b>GS</b>	Glycogène synthase
<b>Glc-1-P</b>	Glucose-1-phosphate
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>GOR</b>	radical Galvinoxyl
<b>HK</b>	Hexokinase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme oxydé
<b>PP1</b>	Protein phosphatase 1
<b>PFK1</b>	Phosphofructokinase 1
<b>PK</b>	Protéine kinase
<b>PEP</b>	Phosphoénolpyruvate
<b>PDK1</b>	Phosphoinositides 1
<b>Pi</b>	Phosphate
<b>SGLT</b>	Sodium glucose transporters
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>TCA</b>	Cycle de l'acide tricarboxylique
<b>TPC</b>	Contenu phénolique total
<b>TFC</b>	Contenu flavonoïde total
<b>5R5P</b>	5 molécules de ribose-5-phosphate
<b>6PFK1</b>	6 phosphofructo-1-kinase
<b>6PFK2/FBPase2</b>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose2,6-bisphosphatase

## Liste des figures

Figure N°	Titre de figure	Page N°
<b>01</b>	Voie de signalisation des récepteurs de l'insuline, y compris l'influence des ROS, la voie normale commence par le récepteur de l'insuline tyrosine kinase qui se lie à l'insuline	<b>08</b>
<b>02</b>	Interactions entre l'oxygène et l'acide dialurique	<b>12</b>
<b>03</b>	Régulation nutritionnelle et hormonale de la 6-phosphofructo-2 kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	<b>16</b>
<b>04</b>	Mécanisme de sécrétion d'insuline	<b>19</b>
<b>05</b>	Mécanismes des catécholamines induite des incréments sur concentrations de glucose plasmatique	<b>20</b>
<b>06</b>	Les nerfs périphériques modulent la sécrétion et le développement des hormones des îlots	<b>22</b>
<b>07</b>	Répartition géographique de <i>Rosmarinus officinalis</i> selon le Global Biodiversity	<b>26</b>
<b>08</b>	Feuilles, et des fleurs du de <i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>27</b>
<b>09</b>	Structure des polyphénols majeurs de <i>Rosmarinus officinalis</i> : acide carnosique, acide rosmarinique et carnosol	<b>28</b>
<b>10</b>	Feuilles, et des fleurs du de <i>Thymus numidicus</i>	<b>22</b>
<b>11</b>	Illustration d'une voie flavonoïde dans le corps humain	<b>34</b>
<b>12</b>	Protocole de fractionnement des flavonoïdes de RO et TN	<b>41</b>
<b>13</b>	Test d'inhibition d'activité $\alpha$ -Amylase des différentes fractions des plantes RO et TN	<b>67</b>
<b>14</b>	Effet des différentes fractions de la plante R.O et T.N sur la glycation de protéine	<b>68</b>
<b>15</b>	Effet dose-dépendant de l'extrait RO-AE et TN-AE sur le taux plasmatique de glucose et d'insuline chez les rats diabétiques	<b>71</b>
<b>16</b>	Effet de RO-EA sur la prise alimentaire chez les rats témoins et expérimentaux	<b>72</b>
<b>17</b>	Effet de RO-AE sur la consommation d'eau chez les rats témoins et expérimentaux	<b>72</b>
<b>18</b>	Effet de RO-AE sur le poids corporel chez les rats témoins et expérimentaux	<b>73</b>
<b>19</b>	Coupe histologique du foie de différents groupes après 21 jours de traitement (40 $\times$ )	<b>76</b>
<b>A</b>	Annexe : Courbe d'étalonnage pour dosage des polyphénole	<b>104</b>
<b>B</b>	Annexe : Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes	<b>104</b>
<b>C</b>	Annexe : Courbe d'étalonnage des protéines tissulaires	<b>105</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre des tableaux</b>	<b>Page N°</b>
<b>01</b>	Classification des différents transporteurs des hexoses appartenant à la famille GLUT	<b>15</b>
<b>02</b>	Effets antidiabétiques de l'extrait de romarin et de ses principaux constituants polyphénoliques : études in vitro	<b>29</b>
<b>03</b>	Evaluation du rendement d'extraction, et de la teneur des différentes fractions des extraits du RO et du TN en polyphénols et en flavonoïdes	<b>64</b>
<b>04</b>	Activité des différentes fractions des extraits du RO et du TN avec différentes méthodes	<b>65</b>
<b>05</b>	Activité anti-Acétylcholinestérase des différentes fractions de la plante R.O et T.N	<b>69</b>
<b>06</b>	Activité anti-hyperglycémique de RO-EA et TN-EA chez des animaux normaux chargés de glucose	<b>69</b>
<b>07</b>	Activité hypoglycémiant de RO-EA et TN-EA chez des animaux normaux à jeun	<b>70</b>
<b>08</b>	Effet de la fraction RO-AE sur le taux d'Hb et d'HbA1c	<b>73</b>
<b>09</b>	Effet de l'extrait de fraction RO-EA sur les activités de l'hexokinase, de la glucose-6 phosphate déshydrogénase, de la glucose-6-phosphatase, du fructose-1, 6-bisphosphatase, dans le foie des animaux témoins et expérimentaux	<b>74</b>
<b>10</b>	Effet de l'extrait de fraction RO-EA sur la teneur en glycogène, la glycogène synthase, la glycogène phosphorylase et le poids du foie	<b>75</b>

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	01
---------------------------	----

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Diabète et régulation métabolique

1. Diabète sucré.....	06
1.1. Définition.....	06
1.2. Classification du diabète.....	06
1.2.1. Diabète de type 1.....	06
1.2.2. Diabète de type 2.....	06
1.2.3. Diabète gestationnel.....	08
1.3. Etiologie du diabète de type 2.....	08
1.4. Physiopathologie du diabète type 2.....	08
1.4.1. Rôle de stress oxydant à l'insulino-résistance.....	08
1.5. Complications du diabète.....	09
1.5.1. Complications aiguës.....	09
1.5.2. Complications chroniques.....	10
1.6. Diabète expériment.....	11
2. Régulation métabolique.....	13
2.1. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition postprandiale.....	13
2.1.1. Captation de glucose.....	13
2.1.1.1. Transporteurs liés au sodium-glucose (SGLT).....	13
2.1.1.2. Transporteurs de glucose facilitateurs (GLUT).....	14
2.1.2. Devenir du glucose.....	16
2.2. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition de jeûne.....	17
2.3. Régulations hormonales et nerveuses de l'homéostasie glucidique	18
2.3.1. Importance des hormones dans le contrôle du métabolisme glucidique.....	18
2.3.1.1. L'insuline.....	18
2.3.1.2. Glucagon.....	19
2.3.1.3. Catécholamines.....	20
2.3.1.4. Glucocorticoïdes.....	20
2.3.2. Régulation de l'homéostasie glucidique par le système nerveux	21

### Chapitre II : Plante médicinale

1. <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	25
1.1. Taxonomie botanique.....	26
1.2. Bioactivité.....	28
2. <i>Thymus numidicus</i> .....	29
2.1. Taxonomie botanique.....	29
2.2. Bioactivité.....	30
3. Flavonoïdes.....	31
3.1. Flavonoïdes alimentaires.....	31
3.2. Métabolisme des flavonoïdes.....	32
3.3. Effets antidiabétiques de flavonoïdes sélectionnés.....	32
3.3.1. Flavonol.....	32
3.3.2. Quercétine.....	32
3.3.3. Rutine.....	33

## Sommaire

3.3.4.	Morin.....	33
3.3.5.	Isoflavone.....	35
3.3.6.	Naringenin.....	35
3.4.	Défis liés à l'utilisation des flavonoïdes.....	35
3.4.1.	Estimation du niveau de consommation de flavonoïdes.....	35
3.4.2.	Effets secondaires possibles de la consommation de flavonoïdes.....	36
3.4.3.	Combinaisons de flavonoïdes pourraient-elles avoir des effets synergiques.....	36
3.4.4.	Flavonoïdes et metformine.....	37

## Partie pratique

<b>III. Matériel et méthode.....</b>	<b>39</b>
1. Expérimentation phytochimique.....	40
1.1. Matérielle végétale.....	40
1.2. Préparation de l'extrait.....	40
1.3. Contenu phénolique total (TPC).....	41
1.4. Contenu flavonoïde total (TFC).....	42
1.5. Détermination de capacité antioxydant.....	42
1.5.1. Test scavenger-radical libre DPPH.....	42
1.5.2. Test de cation radical ABTS.....	43
1.5.3. Test de radical Galvinoxyl (GOR).....	44
1.5.4. Radical superoxyde scavenging (pyrogallol).....	45
1.6. Test anti-glycation.....	45
1.6.1. Test anti-glycation.....	45
1.6.2. Test d'inhibition $\alpha$ -amylase.....	46
1.7. Test inhibition Acetylcholinesterase (test anti-Alzheimer).....	47
1.8. Facteur d'inhibition.....	48
2. Expérimentation animale.....	48
2.1. Études de toxicité aiguë.....	49
2.2. Activité anti-hyperglycémique de R.O-EA et T.N-EA chez des animaux normaux chargés en glucose.....	49
2.3. Activité hypoglycémiant de R.O-EA et T.N-EA chez des animaux normaux à jeun.....	49
2.4. Effet dose-dépendant de l'extrait RO-EA et TN-EA sur le taux plasmatique de glucose et d'insuline chez les rats diabétiques.....	50
2.4.1. Glycogène synthase.....	51
2.4.2. Glucose-6-phosphatase.....	52
2.4.3. Glycogène.....	53
2.4.4. Hexokinase.....	55
2.4.5. Glucose-6-phosphate Déshydrogénase.....	57
2.4.6. Fructose-1,6-bisphosphatase.....	58
2.4.7. Glycogène phosphorylase.....	59
2.4.8. Détermination quantitative du glucose.....	60
2.4.9. Détermination quantitative d'hémoglobine.....	60
2.4.10. Détermination quantitative de l'hémoglobine glyquée (HbA1c).....	60
2.4.11. Détermination taux d'insuline.....	61
2.4.12. Histologie.....	61
2.4.13. Dosage des protéines.....	61
3. Analyses statistiques.....	62

## Sommaire

<b>IV. Résultats</b> .....	63
1. Partie phytochimique.....	64
1.1. Rendement d'extraction et la teneur en composés phénoliques.....	64
1.1.1 Teneur en polyphénols totaux.....	64
1.1.2 Teneur en flavonoïdes totaux.....	64
1.2. Propriété antioxydant.....	65
1.3. Activité antidiabétique.....	67
1.3.1. Test d'inhibition $\alpha$ -Amylase.....	67
1.3.2. Test anti-glycation.....	68
1.4. Test anti-Alzheimer.....	68
2. Etude in vivo.....	69
2.1. Activité anti-hyperglycémique de R.O-EA et T.N-EA chez des animaux normaux chargés en glucose.....	69
2.2. Activité hypoglycémiant de RO-EA et TEA chez des animaux normaux à jeun.....	70
2.3. Effet dose-dépendant des extraits RO-AE et TN-AE sur la glycémie et le taux d'insuline chez le rat diabétique.....	71
2.4. Effets de l'extrait de la fraction R.O-EA sur le changement du poids corporel, et la consommation d'eau et de nourriture.....	71
2.5. Effet de la fraction RO-EA sur le taux d'Hb et d'HbA1c.....	73
2.6. Effet de l'extrait de fraction RO-EA sur les activités des enzymes de métabolisme glucidiques.....	74
2.7. Effet de l'extrait de fraction RO-AE sur la teneur en glycogène, la glycogène synthase, la glycogène phosphorylase et le poids du foie.....	75
2.8. Etude histomorphométrique du foie.....	76
<b>V. Discussion</b> .....	78
<b>Conclusion</b> .....	84
<b>Références</b> .....	86
<b>Annexes</b> .....	101

# Introduction

## INTRODUCTION

le diabète sucré est un problème majeur de santé publique dans le monde, dont la prévalence a considérablement augmenté au cours des deux dernières décennies et qui devrait toucher 592 millions d'adultes d'ici 2035 (**Paneni et Cosentino, 2015 ; El Gayar et al., 2019**), le diabète sucré est un syndrome métabolique caractérisé par la présence d'une hyperglycémie liée à un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline ou de l'action de l'insuline sur leur récepteur ou sur le signal post-récepteur (**Vieira et al., 2019 ; Yong et al., 2021**), associé à des troubles du métabolisme des glucides (au niveau du foie sur des enzymes clés), des protéines et des lipides qui vont générer un état d'hyperglycémie chronique, associés à des complications secondaires (**Kalra et al., 2021**), ces dernières sont attachées au patient diabétique à longue durée, peuvent être : microvasculaires (affectant les yeux, les reins...) ou cardiovasculaires (athérosclérose) et neurodégénératives (Alzheimer) (**Schalkwijk et Stehouwer, 2020**).

Bien que la prévalence du diabète soit en véritable croissance, il manque encore un traitement efficace, les hypoglycémifiants du marché dont l'insuline et les médicaments oraux (biguanides, sulfonylurées, inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase) (**Iid et al., 2020**), leur administration régulière génère des effets indésirables ou une diminution de la réponse après une longue période de traitement (**Kumar et al., 2017**), ce qui a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à recourir à l'utilisation de la médecine traditionnelle pour le traitement du diabète, en usant de thérapies douces et encore plus pour les pays en voie de développement le traitement conventionnel est très coûteux (**Bishu et al., 2019**), l'utilisation de ces plantes est donc abordable et constitue également un réservoir naturel de composés bioactifs (**Widayanti et al., 2020**).

Les plantes ont été employées depuis l'antiquité à des fins médicinales, aujourd'hui les chercheurs emploient tous ses progrès technologiques dans le domaine bio médicamenteux pour solliciter une phytothérapie plus douce (**Calixto, 2005**), et pour mettre en évidence les caractéristiques et les propriétés de ces composés comme les flavonoïdes, qui semblent efficaces pour réduire les complications liées au diabète sucré, les flavonoïdes ont été retrouvés dans plusieurs plantes d'espèces différentes. Il faut noter que la plante entière (feuille, racine, tige...etc.) porte une grande variété des composés bioactifs (**Habtemariam, 2016**) que l'on peut utiliser comme un remède pour guérir plusieurs maladies (**Bourhia et al., 2019**).

A l'instar du monde entier, l'Algérie donne une grande importance à ces types de plantes (**Ramchoun et al., 2020**) d'une part grâce à leur richesse en qualité et quantité

(**Santhakumar. A et al., 2018**) et d'autre part porte un cout abordable (**Touiss et al., 2017 ; Khouya et al., 2020**) ce qui les rend en un soin primaire, et pour améliorer l'accès de ces types de soins (**Hmidani et al., 2019**) il faut mettre en évidence les caractéristiques et les propriétés de ces composés phytochimiques (polyphénol, flavonoïde, alcaloïde) celle-ci controle la bio activité ce qui va se traduire sur le choix de la plante adéquate pour une maladie (**Bistgani. Z et al., 2019 ; Kuete. 2017**).

Les enquêtes ethnobotaniques en Algérie conduisent à deux espèces de plantes très répandues portant un rayon curatif très large qui est *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Numidicus* elles ont attiré notre attention grâce à leurs effet à guérir les maladies liées au stress oxydant elles sont aussi hypoglycémiantes, anti-inflammatoires, antihistaminiques et antibactérienne (**Hennebelle et al., 2004 ; Issabeagloo et al., 2012 ; Dangles, 2020**) ces pouvoirs pharmacologiques sont attribués à leur composition en polyphénol, qui sont mentionnés dans plusieurs travaux indiquant leur potentiel à diminuer la survenue de plusieurs maladies celles ont une pertinence avec le vieillissement et les lésions oxydatives (maladie cardiovasculaires, neurodégénératives) (**Finley et al., 2011 ; Aune et al., 2017**), ils sont aussi antiglycation plusieurs littératures sont mentionnées sans pouvoir inhiber la formation des produits de glycation avancée (AGE), ces produits ont une corrélation avec la sévérité des complications diabétiques comme la néphropathie et la neuropathie, il a été montré que les polyphénols avec ces différents composés et surtout avec des chélateurs d'ions peuvent inhiber la formation des AGEs chez les sujets diabétiques hypertendus l' $\alpha$ -amylase est une enzyme gastro-intestinale qui hydrolyse les polysaccharides donc elle joue un rôle clef à la réduction de glucose sanguin donc l'inhibition de cette enzyme par les composés phénoliques va contrôler le glucose sanguin chez les sujets atteints de diabète de type 2 donc les polyphénols sont hypoglycémiant (**Kim, H. Y et al., 2011 ; Da Costa Silva et al., 2019 ; Magaji et al., 2020**), ils sont incorporés dans le régime alimentaire méditerranéen ce qui va protéger des maladies associées au mode de vie sédentaire d'une manière générale vivre plus sain et plus vieux en pleine santé (**Jarić et al., 2015 ; Messara et al., 2018**).

Partant de ce constat notre étude vise à évaluer les activités biologiques des extraits des deux plantes ; le *Rosmarinus Officinalis* et le *Thymus Numidicus*, ainsi que leurs actions sur l'homéostasie du glucose (sur les enzymes clés du métabolisme glucidique), dans le contexte du diabète sucré.

L'objectif de cette recherche scientifique est d'évaluer d'une part de l'effet de ces deux plantes sur le développement d'une stratégie thérapeutique pour un bon contrôle glycémique de diabète de type 2 en élucidant le potentiel antioxydant et antidiabétique. D'autre part, nous avons mis

en évidence le pouvoir thérapeutique antidiabétique (activité anti-hyperglycémiant, hypoglycémiant, cytoprotecteur et l'action sur les enzymes clé de métabolisme glucidique) des extraits des deux plantes ; le *Rosmarinus Officinalis* et le *Thymus Numidicus*. Cette élucidation a été basée sur la réalisation des différentes analyses phytochimiques, biochimiques et histologiques. Notre but est de motiver d'une part les gens surtout les diabétiques à introduire ces plantes dans leur alimentation en tant que complément alimentaire. D'autre part d'encourager les partenaires socioéconomiques à produire ces compléments alimentaires à base de leur extrait pour assurer leur disponibilité. Nous avons structuré notre travail en deux grandes parties, l'une théorique et l'autre pratique. Dans la première partie théorique, nous avons présenté une analyse bibliographique décrivant les notions essentielles liées au contexte global de notre travail (régulation de l'homéostasie glucidique, diabète, physiopathologie du diabète type 2 et description de ces deux plantes). Dans la deuxième partie pratique, nous avons développé dans la première section le matériel utilisé et les méthodes réalisées pour l'étude phytochimique, anti-diabétique et histologique avec dosage des paramètres biochimiques, hormonaux et des enzymes clés au métabolisme glucidique. Dans les deux dernières sections nous avons exposé et discuté les résultats obtenus dans cette étude.

**Partie**

**Bibliographique**

# Chapitre I : Diabète et régulation métabolique

## 1. Diabète sucré

### 1.1. Définition

Le diabète sucré est une maladie métabolique caractérisée par une glycémie à jeun supérieure à 1,20 g/l (Wild et al., 2004). Sa prévalence augmente considérablement, et a été estimée mondialement à plus de 50 % entre les années 2000 et 2030 (Rolla, 2009).

### 1.2. Classification du diabète

La grande majorité des patients diabétiques sont classés dans l'une des deux grandes catégories suivantes : le diabète sucré de type 1, qui est causé par une carence absolue ou quasi absolue en insuline, ou le diabète sucré de type 2, qui se caractérise par une résistance à l'insuline avec une augmentation compensatoire inadéquate de la sécrétion d'insuline (Fève et Sauvanet, 2021). En outre, les femmes qui développent un diabète pendant leur grossesse sont classées comme ayant un diabète gestationnel. Enfin, il existe une variété de types de diabète rares et divers, qui sont causés par des infections, des médicaments, des endocrinopathies, une destruction pancréatique et des anomalies génétiques. Ces formes de diabète non apparentées sont classées séparément (Monnier et al., 2021).

#### 1.2.1. Diabète de type 1

Cette affection se caractérise par une insulino-pénie sévère et une dépendance à l'insuline exogène pour prévenir la cétose et préserver la vie. Ainsi, il a été appelé diabète insulino-dépendant (DID), ou diabète juvénile. Quand on a une réponse au antigènes du soi par un anticorps circulant dirigé contre les composants cytoplasmiques des cellules des îlots pancréatiques on l'appelle "diabète de type 1 auto-immun". Et quand on a une insulino-pénie sans marqueur de l'auto-immunité ni altération mitochondriale ou bien génétique dans ce cas on l'appelle "diabète de type 1 idiopathique" (Monnier et al., 2022).

#### 1.2.2. Diabète de type 2

Les personnes atteintes de cette sous-classe de diabète anciennement appelée ; diabète de l'adulte ou bien, diabète de la maturité ou diabète stable, ensuite devient diabète sucré non insulino-dépendant (DNID) ou bien diabète de type 2.

Le diabète de type 2 (DT2) n'est pas une entité unique, le DT2 peut être un trouble primaire, avec une sécrétion d'insuline inadéquate causée par des mutations dans l'un des

nombreux gènes codant des enzymes ou des facteurs de transcription importants pour le développement des cellules des îlots et la sécrétion d'insuline (**Lohourignon, 2021**).

On peut avoir des défauts primaires sur le gène qui régulant le transport du glucose au cellule bêta pancréatique, des défauts de la glycogène synthase ont également été impliqués. Un défaut primaire des récepteurs de l'insuline, des défauts post-récepteurs (y compris la molécule Ras) et des défauts des gènes mitochondriaux plus légers peut également entraîner un diabète de type 2. Les causes secondaires du diabète sucré de type 2 comprennent des hormones contre-régulatrices excessives, en particulier des doses pharmacologiques de glucocorticoïdes, des anticorps dirigés contre le récepteur de l'insuline et l'obésité avec sécrétion d'insuline altérée (**Diop et al., 2019**).

### 1.2.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel, se définit comme une intolérance au glucose qui se manifeste pour la première fois au troisième trimestre de la grossesse. L'hyperglycémie est attribuable à la sécrétion d'énormes quantités de l'hormone antagoniste de l'insuline, la somatotropine chorionique humaine (lactogène placentaire humain), augmentée par les effets des taux plasmatiques élevés de cortisol libre et de la combinaison d'œstrogènes et de progestérone, la femme doit subir un test de tolérance au glucose par voie orale et être reclassée comme ayant un diabète (**Kattini et al., 2020**).

### 1.3. Etiologie du diabète de type 2

Les facteurs de risque de DT2 comprennent une combinaison complexe de facteurs génétiques, métaboliques et environnementaux qui interagissent les uns avec les autres contribuant à sa prévalence. Bien que la prédisposition individuelle au DT2 due à des facteurs de risque non modifiables (origine ethnique et antécédents familiaux/prédisposition génétique) ait une base génétique solide, les preuves issues d'études épidémiologiques suggèrent que de nombreux cas de DT2 peuvent être évités en améliorant les principaux facteurs de risque modifiables (obésité, faible activité physique et alimentation malsaine) (**Hu et al., 2001 ; Schellenberg et al., 2013**).

### 1.4. Physiopathologie du diabète type 2

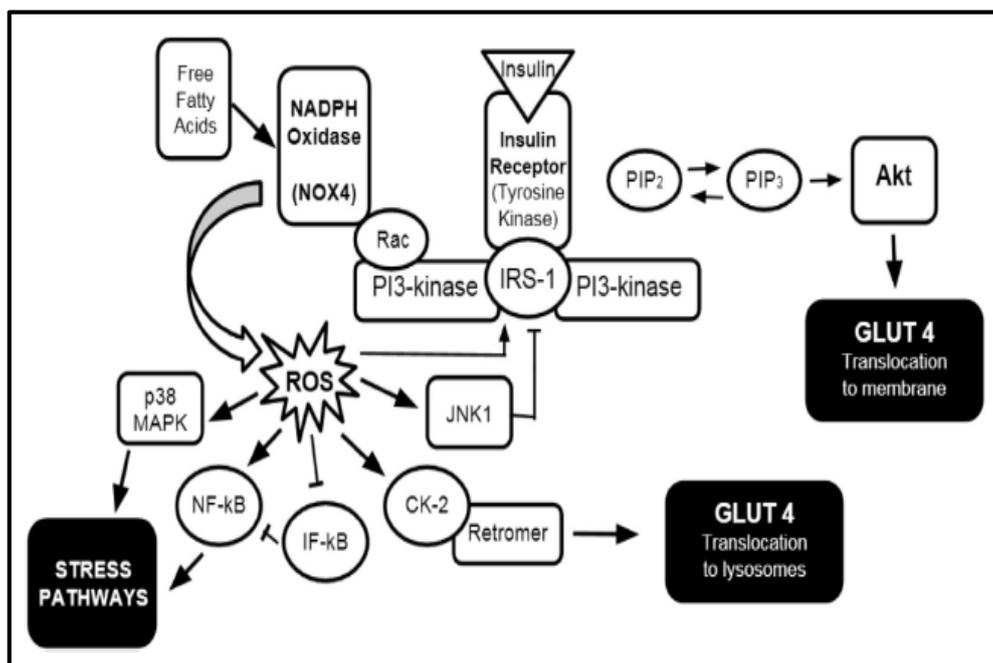
Concernant la physiopathologie de la maladie, un dysfonctionnement des boucles de rétroaction entre l'action de l'insuline et la sécrétion d'insuline se traduit par des taux anormalement élevés de glucose dans le sang. En cas de dysfonctionnement des cellules  $\beta$ , la

sécrétion d'insuline est réduite, ce qui limite la capacité de l'organisme à maintenir des niveaux de glucose physiologiques. D'autre part, l'insulino-résistance (IR) contribue à augmenter la production de glucose dans le foie et à diminuer l'absorption de glucose à la fois dans les muscles, le foie et le tissu adipeux (Cerf, 2013 ; Zheng et al., 2018).

#### 1.4.1. Rôle de stress oxydant à l'insulino-résistance

Des études récentes ont conclu que les dommages causés par les ROS ont un rôle direct dans le développement et la progression de nombreuses maladies chroniques, y compris la pathogénèse de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Gao et al., 2010).

Il est important de décrire la voie de signalisation des récepteurs de l'insuline lors de l'examen de la résistance à l'insuline. La transduction du signal des récepteurs de l'insuline implique de nombreuses protéines il est transectée par plusieurs autres voies. Un schéma de cette voie ainsi que la voie pathogène et oxydative sont présentés par la (figure 01).



**Figure 01** : Voie de signalisation des récepteurs de l'insuline, y compris l'influence des ROS, la voie normale commence par le récepteur de l'insuline tyrosine kinase qui se lie à l'insuline (Blanco et al., 2015). Abréviations utilisées : PIP2 et PIP3 : espèce phosphatidylinositol ; Rac : Rac GTPase ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; JNK1 : kinase 1 c-Jun N-terminale ; CK-2 : caséine kinase 2 ; NF-kB : facteur nucléaire kB ; IF-kB : Facteur inhibiteur kB ; p38 MAPK : protéine kinase activée par un mitogene p38 ; Akt : protéine kinase B.

Le GLUT4 est le principal transporteur de glucose dans les tissus périphériques sensibles à l'insuline, à savoir le muscle squelettique et le tissu adipeux, il a fait l'objet de

nombreuses recherches liées à la résistance à l'insuline. La cellule répond à l'insuline en augmentant l'expression de GLUT4 dans la membrane plasmique, augmentant ainsi l'absorption cellulaire du glucose à partir de la circulation sanguine. Jusqu'à quoi est considéré comme une concentration d'insuline optimale, la cellule augmente son utilisation de la voie normale de transduction de l'insuline. Au-dessus des concentrations optimales, la cellule montre un déplacement vers le bas de l'expression de GLUT4 (**Blanco et al., 2015**). Ainsi, la glycémie reste élevée et le pancréas sécrète plus d'insuline en réponse menant à une boucle de rétroaction positive qui fait augmenter les niveaux intravasculaire d'insuline et désensibilisé les tissus périphériques à l'action d'insuline, ce qu'il va favoriser la continuité de réduction d'expression de GLUT4 et par conséquent les effets systémiques sont hyperglycémie et hyper-insulinémie et augmentation de stress oxydant. Le mécanisme derrière cette dérégulation introduit différentes protéines de transduction du signal, le NADPH4 est une enzyme oxydante puissante produit des ERO, au-dessus des concentrations optimale d'insuline, un décalage dans la voie de transduction de signal d'insuline se produit, le PI3kinase phosphoryle le Rac au lieu de PIP2 ce qu'il va amplifier l'activité du NOX4 et comme résultat les ERO va augmenter, ces derniers va activer la Casein kinase (CK2) qui va à son tour activer le rétromère. Alors le rétromère signale le réseau trans-golgienne en aval et les GLUTs4 sont transporté au lysosome pour la dégradation au lieu à la membrane plasmique donc les niveaux du glucose sanguin resté élevé dans un environnement oxydatif. On trouve aussi Les mitochondries contribuent également à l'oxydation dans la cellule en raison d'environnements riches en nutriments. En raison d'un apport accru de glucose dans les régimes riches en sucre, donc ont plus de substrat disponible pour fabriquer de l'ATP. Il faut noter que les mitochondries sont hyperactives donc aura produit davantage de leur sous-produit naturel, les ROS, ce qu'il va augmenter les ROS et endommage l'infrastructure de la cellule et induit des réponses au stress dont les mitochondries sont responsables (**Ma et al., 2014**).

## 1.5. Complications du diabète

Deux types de complications du diabète sucré existent ; aiguës et chroniques.

### 1.5.1. Complications aiguës

- **Acidocétose diabétique et coma diabétique** : Suite à l'utilisation des lipides en réponse à une carence en glucose intra-cellulaire pour l'obtention d'énergie, et que le cycle de krebs est saturé, l'acide pyruvique se transforme en acétyl co-enzyme A, dont la condensation de deux molécules de ce dernier donne de l'acétone. L'acidocétose

diabétique est une complication dangereuse (Nyenwe et Kitabchi, 2016). Il est considéré comme un événement urgent, le patient présente des signes de déshydratation, une aspiration d'acétone, il peut ensuite y avoir un déclin progressif de la conscience conduisant à la somnolence, et finalement au coma, l'acidocétose diabétique est une affection complètement réversible (Tomic et al., 2022).

- **Hypoglycémie** : survient lorsque la glycémie est très basse et constitue une complication majeure du traitement du diabète, Elle peut être causée par une dose incorrecte d'insuline (dose accrue), un exercice intense ou une consommation réduite d'aliments ou de glucides (Sircar et al., 2016).
- **Hyperglycémie** : dans laquelle les niveaux de sucre dans le sang sont trop élevés, elle est la principale cause de complications graves et potentiellement mortelles du diabète. Il apparaît lorsqu'il n'y a pas ou pas assez d'insuline dans le sang ou qu'une insuline ne fonctionne pas correctement (Bahtiyar et al., 2016).

### 1.5.2. Complications chroniques

Ces complications peuvent être résumées en :

- **Macroangiopathie** : Il s'agit de lésions cardiaques et vasculaires graves qui conduisent à l'hypertension, au rétrécissement des artères, à la maladie coronarienne, aux accidents vasculaires cérébraux (Salem et al., 2015).
- **Rétinopathie diabétique** : Elle provoque une grave détérioration de la vision principalement due à des lésions des vaisseaux de l'œil. C'est la cause la plus fréquente dans le monde occidental (Khan et al., 2017).
- **Néphropathie diabétique** : pouvant entraîner une insuffisance rénale (John, 2016).
- **Neuropathie diabétique** : Elle survient avec des troubles sensoriels, une atrophie musculaire, des difficultés à marcher, des blessures avec formation de plaies et des douleurs intenses aux membres inférieurs. Il est également responsable de tachycardie, d'hypotension orthostatique, d'incontinence urinaire, d'indigestion, de nausées, de diarrhée et/ou de constipation (Fisher et Tahrani et al., 2017).
- **Pied diabétique** : Des lésions observées chez les diabétiques au niveau des genoux et en dessous et qui sont liées à des douleurs, sécheresse cutanée, développement de callosités, plaies et ulcères, souvent compliqués d'infections locales sévères entraînant le développement d'une gangrène avec amputation des doigts.

On peut constater aussi d'autres complications ; myopathie, ostéoporose, arthropathie et des lésions hépatiques (**Ahmad, 2016**).

### 1.6. Diabète expérimental

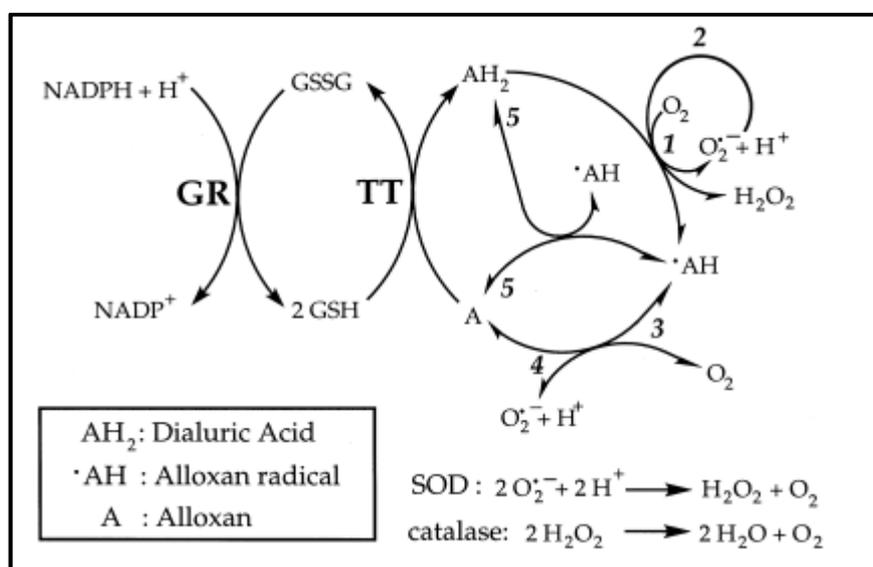
Les modèles animaux du diabète représentent un outil important dans l'investigation et la caractérisation de la physiopathologie de la maladie qui nous aide à éviter des études inutiles et éthiquement difficiles sur des sujets humains et dans l'évaluation de nouveaux agents thérapeutiques et traitements *in vivo*, bien qu'il existe plusieurs méthodes par lesquelles le diabète peut être induit, les méthodes chimiques du diabète induit par l'alloxane et la streptozotocine représentent les modèles expérimentaux les plus importants et hautement préférables pour cette condition pathologique (**Radenković et al., 2016**).

Le diabète expérimental induit par l'alloxane est une forme de diabète sucré insulino-dépendant qui survient à la suite de l'administration ou de l'injection d'alloxane à des animaux. Par la suite, plusieurs auteurs ont utilisé le modèle de diabète induit par l'alloxane comme « outil d'étude » pour élucider la physiopathologie de la maladie et bien plus encore comme un « moteur de recherche » pour les composés antidiabétiques avec de meilleures caractéristiques thérapeutiques. Le modèle utilise deux effets pathologiques distincts qui comprennent l'inhibition sélective de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et la formation induite d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui favorise la nécrose sélective des cellules bêta du pancréas (**Munday, 1988**). Le premier est associé à une inhibition spécifique d'une enzyme capteur de glucose pancréatique, la glucokinase par l'alloxane, tandis que le second est plutôt lié à la capacité de recyclage redox de l'alloxane qui entraîne la génération de ROS. Plus important encore, les deux effets ont été liés aux propriétés chimiques de l'alloxane ainsi qu'à sa structure (**Burkart et al., 1993**).

L'alloxane porte groupe carbonyle qui est hyper réactif avec les groupes thiol, ce qui indique une relation structure-fonction dans l'alloxane toxicité ou diabétogénicité. La glucokinase possède deux groupes thiol (-SH) dans son site de liaison, ce qui la rend exceptionnellement sensible à l'oxydation par l'alloxane (**Brownlee et al., 2005**). Bien que l'alloxane puisse inhiber les activités de plusieurs autres thio-enzymes fonctionnellement importantes telles que la phosphofructokinase, l'aconitase, l'hexokinase et la protéine kinase dépendante de Ca<sup>2+</sup>/calmoduline, la glucokinase est l'enzyme thiol la plus sensible à l'attaque de l'alloxane qui se trouve dans les cellules bêta. L'action inhibitrice de l'alloxane sur la glucokinase empêche l'oxydation du glucose et, par extension, la formation d'adénosine

triphosphate (ATP). À son tour, le manque d'ATP supprime le signal générant le flux métabolique nécessaire à la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. Le même mécanisme pourrait être responsable de l'action inhibitrice de l'alloxane sur la biosynthèse de l'insuline (Elsner et al., 2006).

De plus, l'alloxane est un composé très instable, une propriété qui lui permet de subir facilement des cycles redox. En présence de thiols intracellulaires, en particulier le glutathion (GSH), l'alloxane subit une réaction cyclique continue persistante pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'anion radical superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyle (OH) via l'auto-oxydation de son produit de réduction, l'acide dialurique (Winterbourn et al., 1989). Le processus implique la réduction de l'alloxane en acide dialurique et la ré-oxydation de l'acide dialurique en alloxane. La ré-oxydation de l'alloxane en acide dialurique provoque une libération de radical alloxane qui, en présence d'oxygène, génère de l' $O_2^-$  (Figure 02).



**Figure 02 :** Interactions entre l'oxygène et l'acide dialurique (Sen et Bhattacharya et al., 1952).

L'anion Superoxyde est généralement dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) relativement inoffensif par la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme antioxydante présente pratiquement dans tous les tissus. La catalase, une autre enzyme antioxydante est nécessaire pour empêcher l'accumulation de  $H_2O_2$  et sa conversion consécutive en radical hydroxyle, par dégradation rapide du composé en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, l'activité de la catalase est très faible dans le pancréas et, par conséquent, le  $H_2O_2$  s'accumule, entraînant sa conversion en radical hydroxyle hautement réactif par la réaction de Fenton (Lazarow, 1946).

Le radical hydroxyle est apparemment le radical le plus dangereux dans la cellule et considéré comme le principal responsable de la toxicité des cellules bêta et de la diabétogénicité induite par l'alloxane. Les dommages causés aux cellules bêta pancréatiques par les ROS ont été liés à la fragmentation de l'ADN de ces cellules, entraînant la stimulation de la poly ADP-ribose polymérase 1, une enzyme qui joue un rôle important dans le processus de réparation de l'ADN. Naturellement, les composés à groupe sulfhydryle (GSH, cystéine et dithiothréitol) doivent protéger la glucokinase contre l'inhibition de l'alloxane par un processus réducteur, mais ils doivent maintenir en permanence le produit de réduction, l'acide dialurique, sous sa forme réduite afin de protéger efficacement l'enzyme. Malheureusement, ce n'est pas le cas, car les thiols sont souvent épuisés par la réaction cyclique continue persistante de l'alloxane (**Lazarow et al., 1948**). Winterbourn et Munday ont informé que la quantité de GSH réduit disponible dans une cellule pour le cycle redox diminue progressivement et favorise ainsi un rapport pro-oxydant plus faible entre l'alloxane et le GSH, plutôt qu'un rapport antioxydant plus élevé. Cela explique pourquoi la co-administration de thiols tels que le GSH ou la cystéine avec l'alloxane tend à améliorer les effets toxiques et diabétogènes de l'alloxane, comme rapporté par un certain nombre d'autres études (**Sen et Bhattacharya et al., 1952**).

## 2. Régulation métabolique

### 2.1. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition postprandiale

La régulation du glucose, est contrôlée principalement par les hormones peptidiques insuline et glucagon. Ces deux hormones sont produites dans l'îlot pancréatique de Langerhans, le glucagon provenant des cellules alpha et l'insuline provenant des cellules bêta (**Mandarim-de-Lacerda, 2019**). Il existe un équilibre entre ces deux hormones en fonction de l'état métabolique de l'organisme (à jeun ou riche en énergie), avec de l'insuline à des concentrations plus élevées lors des états énergétiques et du glucagon lors du jeûne. L'insuline et le glucagon contrôlent également le transport du glucose dans et hors les cellules en modifiant l'expression d'un type de transporteur de glucose, GLUT4 (**Yang et al., 2021**). Cette

#### 2.1.1. Captation de glucose

L'entrée des molécules de glucose dans les cellules est effectuée par une grande famille de protéines de transport structurellement apparentées appelées transporteurs de glucose (**Zhang et al., 2019**). Deux principaux types de transporteurs de glucose ont été identifiés, à savoir les transporteurs liés au sodium-glucose (SGLT) et les transporteurs de glucose à diffusion facilitée (GLUT) (**Tonade et Kern, 2021**).

### 2.1.1.1. Transporteurs liés au sodium-glucose (SGLT)

Les transporteurs liés au sodium-glucose symportent le glucose en conjonction avec les ions sodium. Les SGLT sont présents sur les surfaces luminales des cellules tapissant l'intestin grêle où ils absorbent le glucose provenant de sources alimentaires. Parmi ces membres de ses transporteurs en trouve les SGLT1 qui se trouve dans l'intestin et les reins exerce sa fonction d'absorption, par contre en trouve les SGLT2 dans les tubules rénaux où ils facilitent la réabsorption du glucose du filtrat glomérulaire au rein (**Giugliano et al., 2021**).

### 2.1.1.2. Transporteurs de glucose facilitateurs (GLUT)

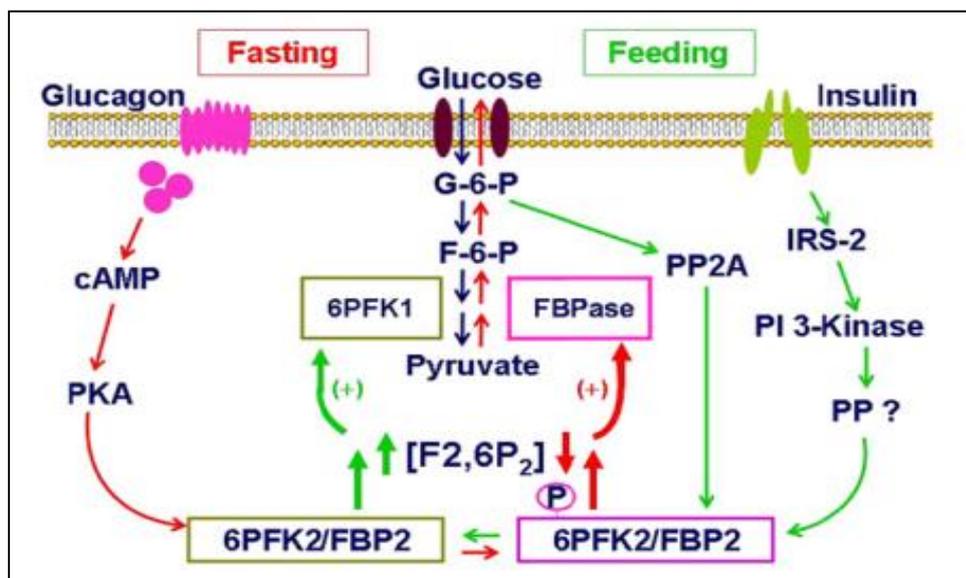
Les GLUT se trouve presque sur la plupart des cellules, et avec différentes proportions. La translocation de glucose à travers la membrane se fait selon un gradient de concentration, avec une vitesse rapide donc il s'agit d'une diffusion dite facilitée (**Sayem et al., 2018**). On trouve 10 types de GLUT répartie en trois classes : – classe I : GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 ; – classe II : GLUT5 (spécifique du fructose), GLUT7, GLUT9, GLUT11 ; – classe III : GLUT6, GLUT8, GLUT10 (**Fan et al., 2019**). La classe I de ces transporteurs représente la principale classe, parmi lesquels en trouve les GLUT2 sont exprimé surtout dans la cellule bêta pancréatique, foie et rein. La cellule bêta pancréatique murine a GLUT2 comme principal capteur de glucose impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Cependant, les cellules bêta humaines ont GLUT1, GLUT2 et GLUT3 comme capteurs de glucose à faible affinité mais à haute capacité.

**Tableau 01** : Classification des différents transporteurs des hexoses appartenant à la famille de GLUT (Shearer et al., 2022)

GLUTs	Localisation	Hexoses Transportés	Particularité	Références
<b>GLUT1 (SCL2A1)</b>	Ubiquitaire (ex : cerveau, hématies, muscles, tissu adipeux, foie, pancréas)	Glucose, mannose, galactose, glucosamine, 3-Omethylglucose et 2-deoxy-dglucose	Responsable du transport basal, maintenant un niveau énergétique stable ( $K_m = 1-2 \text{ mM}$ )	Baldwin J.M. et al, 1981 ; Mueckler M. et al, 1985 ; Kahn B.B. et al, 1992 ; Rhoads D.B., 1994 ; Maher J.C. et al, 2005
<b>GLUT2 (SCL2A2)</b>	Cellules $\beta$ pancréatiques, pôle basolatérale des entérocytes intestinaux, cellules épithéliales rénales, cerveau et foie	Principalement Glucose mais aussi galactose mannose et fructose	Equilibre des concentrations extra- et intracellulaire en condition physiologique ou d'hyperglycémie augmentation d l'absorption intestinale de glucose, favorise la sécrétion d'insuline ou de glucagon et l'expression des gènes ( $K_m \approx 17 \text{ mM}$ )	Thorens B., 1992 ; Uldry M. et al, 2002 ; Marty N. et al, 2007 ; Kellett G.L. et al, 2008 ; Leturque A. et al, 2009
<b>GLUT3 (SCL2A3)</b>	Cellules neuronales, lymphocytaires, macrophages, les plaquettes, foie, rein et coeur	Glucose, maltose, xylose, déhydroascorbate, mannose et galactose	Captation de glucose et métabolisme ( $k_m \approx 1,5 \text{ mM}$ )	Colville C.A. et al, 1993 ; Gould G.W. et Holman G.D., 1993 ; Simpson I.A. et al, 2008
<b>GLUT4 (SCL2A4)</b>	Adipocytes, muscles squelettiques et coeur	Glucose déhydroascorbate et glucosamine	Captation de glucose insulino-dépendant, contrôle rapide de la glycémie par stimulation de la glycogénèse et lipogénèse ( $k_m 2-5 \text{ mM}$ )	Cushman S.W. et Wardzala L.J., 1980 ; Holman G.D. et al, 1990 ; Zhao F.Q. et Keating A.F., 2007 ; Karnieli E. et Armoni M., 2008

### 2.1.2. Devenir du glucose

Après absorption, les monosaccharides sont amenés de l'intestin grêle au foie via la veine porte. Dans le foie, le galactose et le fructose sont convertis en glucose. Une fraction du glucose arrivant au foie, après un repas peut être transportée à travers les membranes hépatocytaires via GLUT2, après le franchissement à l'intérieur de la cellule quel que soit la voie métabolique emprunté par le glucose il faut être d'abord phosphorylé par la glucokinase pour donner le glucose-6-phosphate ce dernier va entrer soit dans la voie de la synthèse du glycogène facilitée par la glycogène synthase, ou bien dans la voie des pentoses phosphate et/ou dans la voie de la glycolyse afin de produire des substrats de 3 carbone pyruvate ou lactate, ou bien entrée dans la voie de lipogénèse de novo, ces voies métaboliques permettant de produire d'énergie ou bien des coenzyme et/ou production des réserves énergétiques sous forme du glycogène ou triglycérides (Chadt et Al-Hasani, 2020). En conditions postprandiales, les niveaux de glucose sont augmentés, ce qui stimule la libération d'insuline. La signalisation du glucose active la protéine phosphatase 2A. De plus, la signalisation de l'insuline active d'autres protéines phosphatases. De manière additive ou synergique, le glucose et l'insuline conduisent à la déphosphorylation (Serine32) de 6PFK2/FBPase2, augmentant ainsi l'activité kinase de 6PFK2/FBPase2 et diminuant l'activité phosphatase de 6PFK2/FBPase2. En conséquence, les niveaux de F2,6P2 sont augmentés, entraînant une élévation de l'activité de la 6-phosphofructo-1-kinase (6PFK1) et une réduction de l'activité de la FBPase. Cela sous-tend une augmentation des taux de glycolyse et une diminution des taux de gluconéogenèse (figure 03).



**Figure 03** : Régulation nutritionnelle et hormonale de la 6-phosphofructo-2 kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (Huo et al., 2012).

A jeun, la glycémie reste entre 4 et 5 mM, et les niveaux d'insuline sont faibles. Dans cette condition, le foie est la principale source de glucose plasmatique, car cet organe contrôle la dégradation du glycogène et la gluconéogenèse, qui sont principalement régulées par les hormones contre-régulatrices de l'insuline. Le foie, rein et l'intestin sont les seuls organes capables de produire le glucose à partir du substrat endogène et le libérer dans le sang car ces organes sont dotés d'enzyme le glucose 6 phosphatase (**Huo et al., 2012**).

## 2.2. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition de jeune

Dans la plupart des tissus, le glycogène est utilisé comme réserve d'énergie pour obtenir du glucose pendant les périodes de jeûne, d'hypoglycémie ou d'hypoxie. Cependant, le rôle du glycogène n'est pas le même dans tous les organes. En particulier, la fonction du glycogène est significativement différente dans le foie et le muscle (**Rozance et Hay, 2010**). Le foie joue un rôle important dans le contrôle de la glycémie, assurant que tous les tissus reçoivent un apport constant de glucose. Immédiatement après un repas, la glycémie augmente de manière transitoire (**Sharabi et al., 2015**).

L'enzyme régulatrice la plus importante dans la voie de dégradation du glycogène est la glycogène phosphorylase (**Agius, 2015**), l'enzyme se trouve sous deux formes, inactive (b) et active (a). La phosphorylase b dans le muscle et le foie est stimulée par l'ajout d'une liaison ester phosphate au groupe hydroxyle de résidu sérine sur chacune de ses deux sous-unités. Cette phosphorylation est catalysée par la phosphorylase kinase, qui transfère le phosphate de l'ATP et forme la glycogène phosphorylase a (**Johnson et al., 2020**) :



L'inactivation de la phosphorylase se produit par hydrolyse de la liaison ester phosphate entre la sérine et le groupe phosphoryle, qui est catalysée par la protéine phosphatase 1 (PP1). La glycogène phosphorylase a est convertie en b (**Zhang et al., 2012**) :



En période de jeune prolongé une synthèse de novo de glucose à partir de précurseurs non hexoses s'effectue grâce à la néoglucogénèse (**Miyamoto et Amrein, 2017**). Cette voie se

produit principalement dans le foie et le cortex rénal et, dans une moindre mesure, dans l'intestin grêle. Les principaux substrats de la gluconéogenèse comprennent le lactate, le pyruvate, le propionate, le glycérol et 18 des 20 acides aminés (Hanson et Owen, 2013).

### 2.3. Régulations hormonales et nerveuses de l'homéostasie glucidique

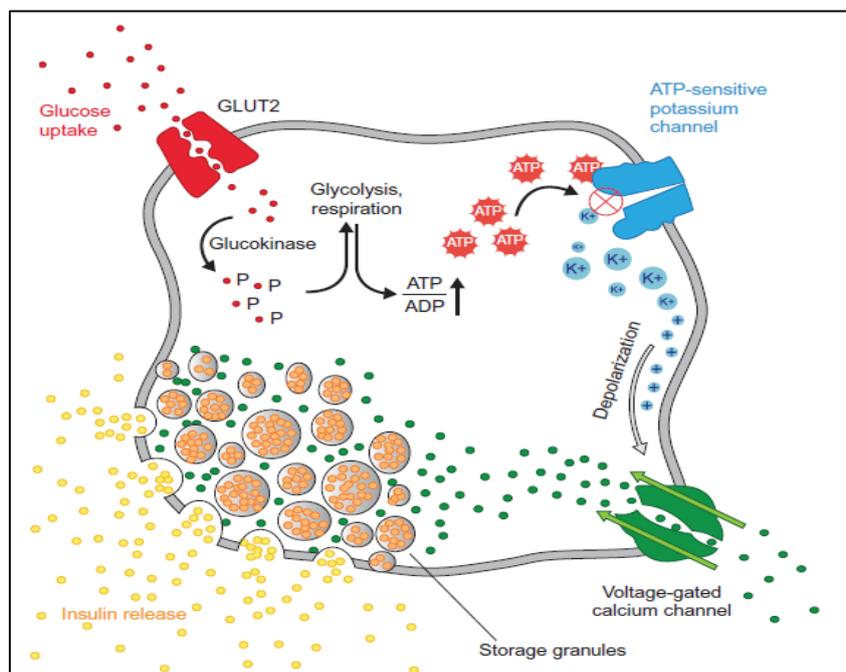
Une régulation précise du glucose circulant est cruciale pour la santé humaine et assure un apport suffisant au cerveau, qui dépend presque exclusivement du glucose pour l'énergie métabolique. L'homéostasie du glucose est coordonnée par les cellules endocrines sécrétant des hormones, ainsi que par l'utilisation et la production de glucose dans les tissus métaboliques périphériques, notamment le foie, les muscles et le tissu adipeux. Les tissus régulateurs du glucose reçoivent une innervation dense des fibres sympathiques, parasympathiques et sensorielles (Ottensmeyer et al., 2000).

#### 2.3.1. Importance des hormones dans le contrôle du métabolisme glucidique

##### 2.3.1.1. L'insuline

Se coordonne potentiellement avec le glucagon pour moduler la glycémie, l'insuline agit via une voie anabolique. L'insuline régule les niveaux de glucose dans le sang et induit son stockage entraînant une prise du poids globale (Csajbok et Tamás, 2016).

Une augmentation du niveau de glucose dans le sang de 10% ou plus est suffisante pour évoquer la libération d'insuline par la cellule  $\beta$ . Le mécanisme global de la sécrétion d'insuline en réponse à une glycémie extracellulaire élevée est montré dans la (Figure 19). Le glucose est transporté dans la cellule  $\beta$  par GLUT2 et phosphorylé par la glucokinase en glucose-6-phosphate qui est métabolisé par glycolyse (en pyruvate) et le cycle de l'acide citrique pour produire de l'ATP. Le rapport ATP/ADP élevé inhibe le canal  $K^+$  sensible à l'ATP qui provoque une dépolarisation de la membrane cellulaire conduisant à l'absorption de  $Ca^{2+}$  de l'extérieur (Ottensmeyer et al., 2000). L'entrée des ions calcium déclenche la fusion des granules contenant de l'insuline à la membrane plasmique favorisant la libération d'insuline par la cellule bêta est l'activité de l'intestin après un repas (Chang et al., 2004).



**Figure 04 :** Mécanisme de sécrétion d'insuline (Rui, 2014).

### 2.3.1.2. Glucagon

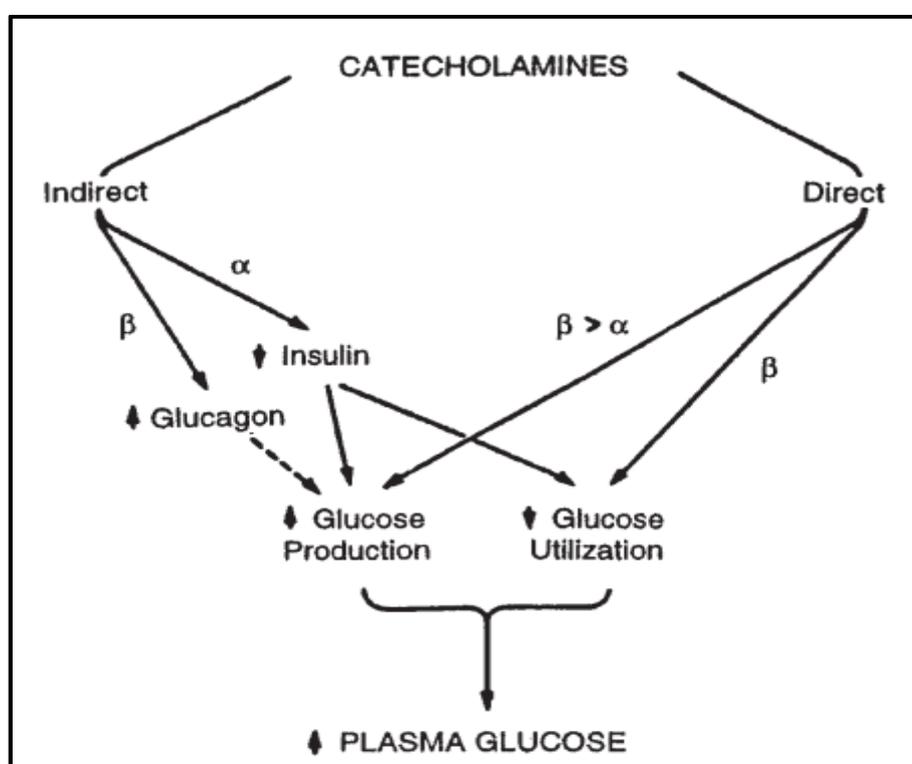
L'homéostasie du glucose dépend en grande partie de la sécrétion équilibrée de glucagon et d'insuline par les cellules pancréatiques alpha et bêta, Chez l'homme, le glucagon est sécrété par les cellules alpha des îlots de langerhans, qui ne représentent que 10 % du volume des îlots ; 80% du volume des îlots est composé de cellules bêta, qui sécrètent de l'insuline (Bromer *et al.*, 1957).

Le siège majeur de l'action physiologique du glucagon est le foie, pour plusieurs raisons. Premièrement, le foie est exposé à des concentrations de glucagon qui sont deux à trois fois plus élevées que les niveaux auxquels les autres organes sont exposés (Guillaume *et al.*, 2020). Le glucagon est sécrété dans la veine porte et partiellement extrait par le foie avant d'être dilué par le sang pauvre en glucagon de la circulation systémique (Unger, RH, 1985). Deuxièmement, les niveaux systémiques de glucagon endogène sont généralement inférieurs à ceux nécessaires pour affecter les récepteurs du glucagon sur le tissu adipeux afin de provoquer une lipolyse. De plus, le glucagon n'a pas d'effet appréciable sur la glycogénolyse musculaire. Troisièmement, les taux de glucagon dans la veine porte sont suffisamment élevés pour activer les nombreux récepteurs hépatiques du glucagon (Galsgaard *et al.*, 2019). Ces récepteurs sont couplés à la protéine G S (Gs), qui active l'adénylate cyclase via sa sous-unité alpha. L'augmentation résultante des taux d'adénosine monophosphate cyclique hépatique active la

protéine kinase A, qui, à son tour, phosphoryle les enzymes nécessaires à l'activation de la glycogénolyse hépatique (Müller et al., 2017).

### 2.3.1.3. Catécholamines

Les catécholamines activent les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans le foie et stimulent la production hépatique de glucose par de multiples mécanismes (figure 05). Dans des conditions physiologiques, la réponse du métabolisme des glucides à la stimulation des catécholamines consiste à fournir un flux de substrat énergétique aux organes dans le contexte de la réponse de flight-or-fight. La glycogénolyse et la gluconéogenèse sont améliorées, tandis que la synthèse du glycogène est inhibée. En plus de stimuler l'entrée du glucose dans la circulation sanguine (Barth et al., 2007). Alors que les mécanismes  $\alpha$  adrénergiques suppriment la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques (Hoeldtke et Boden, 1994).



**Figure 05** : Mécanismes des catécholamines induite des incréments sur concentrations de glucose plasmatique (Engle et al., 2000).

### 2.3.1.4. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (GC) jouent un rôle essentiel dans un large éventail de systèmes physiologiques du corps, affectant le métabolisme des lipides et du glucose. Les effets du cortisol sont largement médiés par le récepteur GC (GR). Les GC agissant par l'intermédiaire

du GR régulent les enzymes clés du métabolisme du glucose dans le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux et le pancréas. Dans le foie, les GC régulent l'expression des principales enzymes gluconéogéniques telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la glucose-6-phosphatase et la tyrosine aminotransférase (**Bellavance et Rivest, 2014**).

Le cortisol agit sur le foie, les muscles, le tissu adipeux et le pancréas. Dans le foie, des niveaux élevés de cortisol augmentent la gluconéogenèse et diminuent la synthèse de glycogène (**Kuo et al., 2015**). En présence de cortisol, les cellules musculaires diminuent l'absorption et la consommation de glucose et augmentent la dégradation des protéines ; cela fournit à la gluconéogenèse des acides aminés glucogéniques (**Exton, 1979**). Dans les tissus adipeux, le cortisol augmente la lipolyse. Enfin, le cortisol agit sur le pancréas pour diminuer la sécrétion l'insuline et augmenter celle du glucagon (**Rose et al., 2010**).

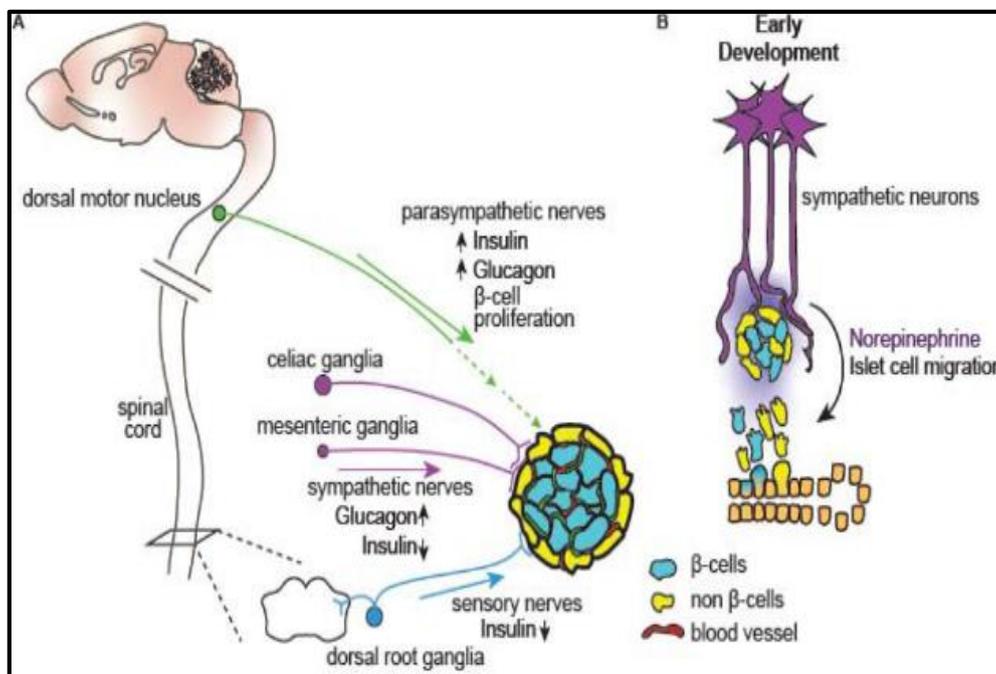
### 2.3.2. Régulation de l'homéostasie glucidique par le système nerveux

Le système nerveux central (SNC) joue un rôle clé dans la coordination de l'activité de régulation du glucose des organes périphériques. Les régions hypothalamiques contrôlent la sécrétion hormonale des îlots et l'homéostasie du glucose dans tout le corps via le système nerveux autonome, qui se compose des branches anatomiquement et fonctionnellement distinctes des systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Les nerfs autonomes innervent directement les îlots, le foie et le tissu adipeux, pour contrôler la sécrétion hormonale, la production de glucose et le métabolisme par la libération de neurotransmetteurs et de neuropeptides. De plus, les nerfs sensoriels transmettent des informations sur les signaux métaboliques des tissus périphériques au cerveau et libèrent localement des neuropeptides pour influencer l'homéostasie du glucose (**Église, 2003**).

Les îlots pancréatiques sont des micro-organes constitués de types de cellules endocrines distincts, Les îlots pancréatiques sont richement innervés par des fibres sympathiques et parasympathiques, ainsi que par des fibres sensorielles nociceptives (**Woods et Porte, 1974**).

Les nerfs sympathiques arrivent au pancréas via les nerfs splanchniques provenant des ganglions coeliaques prévertébraux et mésentériques supérieurs, l'innervation sympathique est localisée en grande partie à la périphérie des îlots, les nerfs établissant des contacts directs avec les cellules  $\alpha$  sécrétant du glucagon (**Ahren 2000**). Les premières études ont indiqué que l'innervation sympathique agit pour élever rapidement les niveaux de glucose dans le sang, L'activité sympathique est également essentielle pour la réponse de l'organisme à

l'hypoglycémie, également connue sous le nom de réponse contre-régulatrice. Une hypoglycémie prolongée, comme pendant le jeûne, améliore l'activité sympathique, qui à son tour stimule la libération de glucagon par les cellules  $\alpha$  pour augmenter les niveaux de glucose circulant (**Rodriguez-Diaz et al., 2011**) (figure 06).



**Figure 06** : Les nerfs périphériques modulent la sécrétion et le développement des hormones des îlots (**Chiu et al., 2012**).

L'innervation parasympathique du pancréas provient du noyau moteur dorsal du nerf vague. Les nerfs vagues pré-ganglionnaires se projettent sur les ganglions intra-pancréatiques, à partir desquels les projections post-ganglionnaires innervent directement les îlots. La stimulation des nerfs vagues augmente à la fois le glucagon circulant et l'insuline chez les mammifères. L'activité parasympathique contribue également à la réponse contre-régulatrice pendant l'hypoglycémie, lorsque l'activité du nerf efférent vagal est augmentée, ce qui à son tour stimule la sécrétion de glucagon pour provoquer une augmentation du glucose circulant (**Strubbe, 1992 ; Taborsky et al., 2002**).

## Chapitre II : Plante médicinale

Le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie a été signalé comme une voie connue dans la pathogenèse des complications du diabète, Il a été démontré que l'exposition de la lignée isolée des îlots des cellules  $\beta$  pancréatiques au stress oxydatif inhibe l'activité du promoteur d'expression de l'ARNm du gène de l'insuline, diminuant l'expression du gène de l'insuline, en inhibant l'activité des enzymes clés entrés dans le métabolisme des glucides. Le stress oxydatif est également fortement suspecté d'être impliqué dans la résistance à l'insuline induite par l'hyperglycémie chronique (diabète de type 2) (**Valko et al., 2007**).

Le diabète type 2 est l'une des maladies liées au mode de vie les plus courantes. Il s'agit d'un trouble endocrinien majeur qui se manifeste par des troubles cliniques, notamment l'athérosclérose, la neuropathie, la néphropathie, la rétinopathie. Les troubles métaboliques qui en résultent sont caractérisés par une hyperglycémie résultant de défauts de sécrétion et/ou d'action de l'insuline et par une altération du métabolisme des lipides, des glucides et des protéines (**Stumvoll et al., 2005**).

Les médicaments oraux pour le traitement du DT2 comprennent les médicaments qui stimulent la libération d'insuline par les cellules  $\beta$  (sulfonylurées et méglinides) ; inhibent l'absorption intestinale du glucose (inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase) ; augmentent le transport périphérique du glucose ; et réduisent la production hépatique de glucose en inhibant la gluconéogenèse (biguanides et thiazolidinediones). La metformine et le glibenclamide (biguanide, sulfonylurées) est le traitement le plus largement utilisé pour le DT2 ; malheureusement, il est associé à une augmentation de l'acidose lactique et 30% des patients signalent des problèmes gastro-intestinaux tels que diarrhée, crampes, nausées et vomissements pouvant conduire à l'arrêt du médicament (**Okayasu et al., 2012**).

Il existe un intérêt continu pour trouver des médication plus efficaces à la fois rétablissant la balance pro-oxydante/anti-oxydante et améliorant le contrôle glycémique avec moins d'effets secondaires malgré la disponibilité de divers composés pour gérer ces déficits mondial ( stress oxydant et DT2), la maladie est un problème mondial de santé avec 50 % des personnes touchées vivantes dans des zones frappées par la pauvreté en Afrique et en Asie, il est donc urgent de trouver des solutions efficaces mais moins coûteuses. L'utilisation des plantes à des fins curatives est antérieure aux premiers écrits de l'histoire et à l'origine d'une grande partie de la médecine moderne. La phytothérapie est toujours le pilier d'environ 75 à 80% de la population mondiale centralisée dans les pays en développement pour les soins de santé primaires (**Bent et al., 2008**). Notamment, ces dernières années, il y a eu un essor important de la phytothérapie dans le monde développé. En Allemagne et en France, de

nombreuses herbes et extraits d'herbes sont utilisés comme médicaments sur ordonnance, De nombreux médicaments conventionnels proviennent de sources végétales, Avant et après la découverte de l'insuline, les herbes aux effets hypoglycémiantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle et sont toujours répandues, le développement de médicaments à partir de plantes est la préoccupation des sociétés pharmaceutiques pour engagées dans le criblage pharmacologique à grande échelle de diverses plantes, y compris des herbes. Toutes les parties d'une plante, y compris les feuilles, les tiges, les fleurs, les racines et les graines, peuvent être formulées comme matière première ou comme extrait. La macération des plantes avec de l'eau, de l'alcool ou d'autres solvants entraîne l'extraction de leurs ingrédients pharmaceutiques actifs parmi ces ingrédients on trouve les flavonoïdes de la fraction acétée d'éthyle (**Aguilar et al., 2008**).

Beaucoup de littératures ont tant parlé sur le pouvoir hypoglycémiant de cette fraction, ce qui nous mène à établir un lien d'investigation entre le fait de trouver des plantes typiquement locales à l'Algérie utilisées en tant que plantes médicinales face à l'hyperglycémie et leur pouvoir d'activité avec la fraction flavonoïdique d'acétate d'éthyle. On a trouvé deux plantes très communes le *Rosmarinus officinalis* et *Thymus numidicus*.

### **1. *Rosmarinus officinalis***

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est l'une des plantes les plus connues depuis l'Antiquité. Les anciens Égyptiens utilisaient des crèmes et des huiles pour se protéger des températures élevées et de la chaleur du désert. Le romarin était l'un des ingrédients de ces produits, Dioscoride (40–90 avant JC) a nommé le romarin *Libanotis coronaria*, en référence à sa propriété de tonifier le corps fatigué, Les pères de la médecine antique, à savoir Hippocrate, Avicenne, et Galen utilisaient des onguents de fleurs et de feuilles de romarin macérées dans de l'huile d'olive pour traiter les douleurs articulaires et comme vulnéraire pour guérir les plaies (**González Minero et Bravo Díaz, 2017**).

Au cours des siècles, les *Rosmarinus* ont été utilisés dans les médecines populaires comme antispasmodiques, diurétiques, antiépileptiques, carminatifs, coliques néphrétiques, antirhumatismal et expectorant ; ainsi que pour le diabète, la dysménorrhée, les maladies cardiaques et pour soulager les troubles respiratoires (**Oumeish, 2001**).

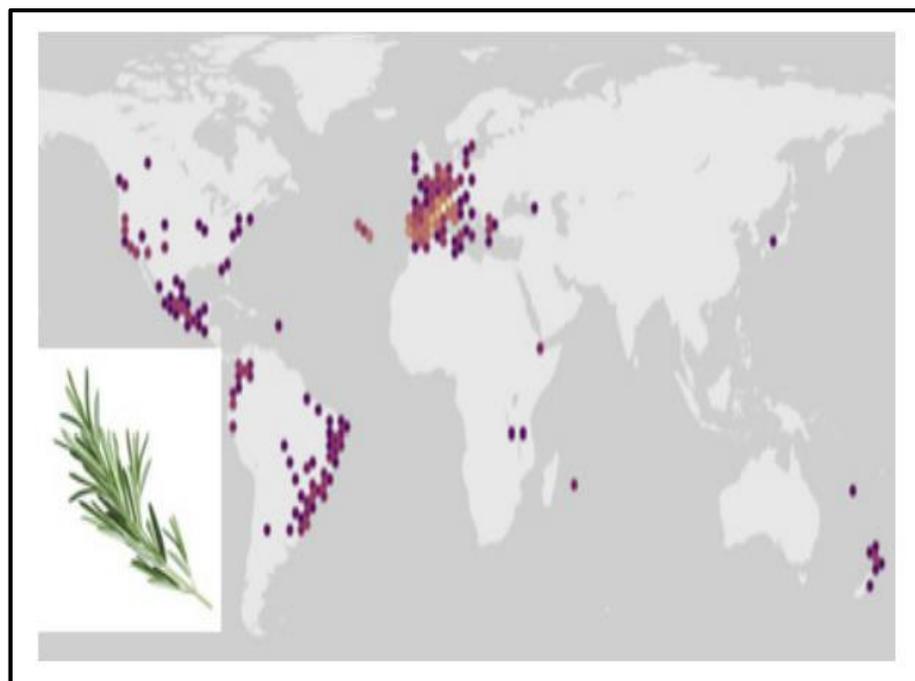
Le romarin (*Rosmarinus officinalis*), comme d'autres herbes bien connues comme le basilic, le thym, l'origan, la menthe ou la sauge les plus proches, sont taxonomiquement classés sous *Mentheae*, la tribu la plus grande et la plus importante économiquement de la sous-famille des *Nepetoideae* au sein de la famille des Lamiacées (**Andrade et al., 2018**). Le genre

*Rosmarinus* a été classé différemment par différents auteurs. Le mot *Rosmarinus* vient peut-être du grec Rhopos (buisson) et Myrinum (aromatique), l'épithète spécifique *officinalis* (donnée par Linnaeus) fait référence à l'usage médicinal de la plante. Le genre *Rosmarinus* a été fusionné avec le genre *Salvia* dans une analyse phylogénétique récente. Cela signifie que *le Rosmarinus officinalis* n'est plus le nom correct de l'espèce étudiée. Comme le nom de *Salvia officinalis* était déjà occupé lors de la fusion, cette espèce avait besoin d'une nouvelle épithète spécifique en *Salvia*, elle est donc maintenant connue sous le nom de *Salvia Rosmarinus* (De Oliveira et al., 2019).

Enfin, il convient de noter que le romarin est la plante la plus fréquemment utilisée dans la phytothérapie traditionnelle en Algérie.

### 1.1. Taxonomie botanique

La plante est originaire du Caucase et de la Méditerranée orientale, bien qu'elle ait été introduite dans de nombreuses régions du monde depuis l'Antiquité en tant qu'espèce ornementale (par exemple, le reste de l'Europe, le Chili et la Chine) (Al-Sereiti et al., 1999).



**Figure 07** : Répartition géographique de *Rosmarinus officinalis* selon le Global Biodiversity (González-Minero et al., 2020).

Cependant, c'est dans les pays au climat Méditerranéen qu'il est le plus cultivé sa classification comme suit (Begum et al., 2013) :

<b>Règne :</b>	Plantes
<b>Phylum :</b>	Magnoliophyta
<b>Classe :</b>	Angiospermes
<b>Catégorie :</b>	Lamiides
<b>Ordre :</b>	Lamiales
<b>Famille :</b>	Lamiacées
<b>Sous-Famille :</b>	Nepetoideae
<b>Tribus</b>	Menthea
<b>Genre :</b>	Salvia
<b>Espèce :</b>	Salvia rosmarinus

Brève description de la plante (adapté de la description de *Rosmarinus officinalis* dans Flora Ibérica : Le romarin est un arbuste à feuilles persistantes atteignant 1,8 m de haut, érigée ou couché). Les feuilles (10–41 × 1–3 mm) sont non pétiolées, de taille variable dans la même branche ; ils sont fortement recourbés et aiguisés, de forme linéaire ou lancéolée. La face supérieure est verte et la face inférieure est blanchâtre en raison de la présence de nombreux poils : trichomes glandulaires (capités et peltés) et non glandulaires. Ses fleurs sont petites, disposées en grappes courtes, et elles ont une corolle bilabiée violette ou blanche (8,5–13,5 mm) (González-Minero et al., 2020).

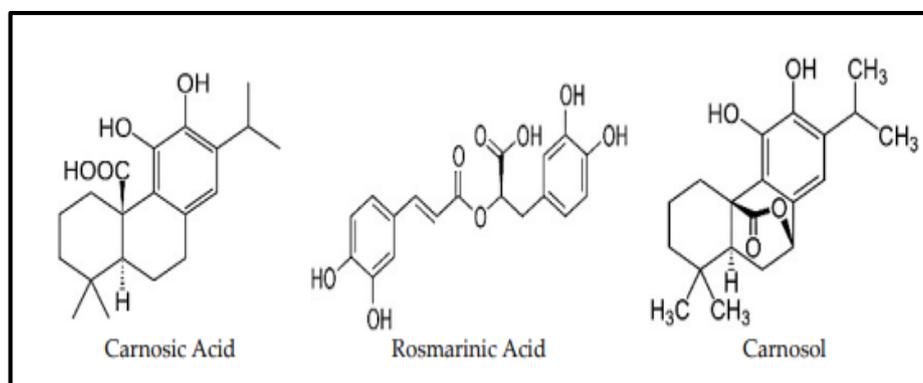


**Figure 08 :** Feuilles, et des fleurs du de *Rosmarinus officinalis* (Altinier et al., 2007).

## 1. 2. Bioactivité

Les extraits de romarin, qui sont généralement produits à partir de feuilles de romarin séchées, présentent un grand intérêt pour l'industrie alimentaire, la production apicultrice et pharmaceutique car il exerce plusieurs effets bénéfiques sur la santé, à savoir antioxydants, antibactériens, anti-inflammatoires et anti-cancérigènes ainsi que potentiels d'amélioration cognitive. Il est crucial de noter que les extraits de romarin représentent un mélange de nombreux composés qui peuvent présenter une action pharmacologique synergique ou peuvent conduire à une réduction des effets secondaires indésirables de composés spécifiques (**Altinier et al., 2007**). Cependant, l'inconvénient de leur complexité réside dans la difficulté des analyses chimiques et de l'évaluation en termes de composé ou de combinaison de composés contribuant à des effets biologiques spécifiques (**Yimam et al., 2017**).

Des méthodes d'extraction conventionnelles telles que l'hydrodistillation, la décoction et la macération ainsi que d'autres méthodes, notamment l'extrait liquide sous pression, l'extraction assistée par enzyme, la nanofiltration et l'extraction en phase solide, ont été utilisées pour extraire les polyphénols des matières végétales cette plante s'avère riche en flavonoïdes comme composé majoritaire ce dernier semble avoir un grand pouvoir antidiabétique (**Doktorovova et al., 2016**).



**Figure 09** : Structure des polyphénols majeurs de *Rosmarinus officinalis* : acide carnosique, acide rosmarinique et carnosol (**Doktorovova et al., 2016**).

Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase sont utilisés dans la gestion de l'hyperglycémie présente dans le DT2. L'acarbose est un médicament antidiabétique prescrit il réduit le taux d'absorption du glucose en inhibant l' $\alpha$ -glucosidase dans la bordure en brosse de l'intestin grêle et l' $\alpha$ -amylase pancréatique présente dans la lumière de l'intestin grêle. L'exposition à l'ER (55 mg/ml) est avéré avoir une activité inhibitrice significative de l' $\alpha$ -glucosidase (diminution

de 60 %), voici d'autres effets bénéfiques anti-diabétiques appartenant d'ER sur des lignes cellulaires in vitro (Xiao et al., 2013) :

**Tableau 02** : Effets antidiabétiques de l'extrait de romarin et de ses principaux constituants polyphénoliques : études in vitro (Doktorovova et al., 2016)

Cellule/Modèle	Traitement	Effets	Référence
Hépatocytes HepG2	ER méthanolique 100 µg/ml	↓ gluconéogenèse	Yun et al., 2013
Lipase pancréatique humaine	Acétone RE 100 µg/ml riche en AC	↓ PL humain (70 %)	Ibarra et al., 2011
3T3-L1 adipocytes	ER 50 µg/ml	↑lipide intracellulaire ↑absorption du glucose	Babish et al., 2010

## 2. *Thymus numidicus*

Le genre *Thymus*, membre de la famille des Lamiacées, est composé d'environ 400 espèces de plantes vivaces aromatiques herbacées ou sous-arbustives originaires de la région méditerranéenne dont 13 espèces poussent dans le nord de l'Algérie (Dob et al., 2006). Au sein de ce genre *Thymus numidicus*, communément appelé thym, est largement utilisé en médecine traditionnelle à des fins nutritionnelles et thérapeutiques depuis l'Antiquité comme remèdes contre les infections en raison de leurs propriétés biologiques. Des extraits ont été prescrits pour traiter diverses maladies, telles que la fièvre, l'asthme, la tuberculose et la sinusite. Elle est utilisée fréquemment comme plante hypoglycémiante en algérie ce que nous mène à investiguer leur pouvoir qui est peut-être due au composé flavonoïdique (Pottier-Alapetite, 1981).

### 2.1. Taxonomie botanique

*Thymus numidicus* Poiret caractérisé par des fleurs roses, est endémique de Tunisie et d'Algérie, où il pousse à l'état sauvage dans deux régions, Constantine (nord-est algérien) et Kabylie (nord-centre algérien) (Quézel et Santa, 1963). Connu localement sous le nom arabe Zaateur, le mot thymus en latin parfume, en grec courage sa classification comme suit :

<b>Règne :</b>	Plantes
<b>Phylum :</b>	Magnoliophyta
<b>Classe :</b>	Angiospermes
<b>Catégorie :</b>	Lamiides
<b>Ordre :</b>	Lamiales

<b>Famille :</b>	Lamiacées
<b>Sous-Famille :</b>	Nepetoideae
<b>Tribus</b>	Menthea
<b>Genre :</b>	Thymus
<b>Espèce :</b>	Thymus numidicus

*Thymus numidicus* Poir est une espèce endémique du Nord-Ouest tunisien et de l'Algérie. C'est un arbuste à vie courte et allogame principalement pollinisé par les abeilles. C'est une espèce hermaphrodite et possède une capacité de reproduction asexuée soit par multiplication végétative. Il peut atteindre 10 à 15 cm de hauteur. Les feuilles sont opposées et linéaires/lancéolées (4–15 mm). Les fleurs sont hermaphrodites, grandes (15 mm) et regroupées en capitules terminaux denses au calice irrégulier (3 mm) et à corolle rose (6 mm). La floraison a lieu entre avril et juin. En Tunisie, *T. numidicus* leur population sont réparties dans des bioclimats humides inférieurs aux bioclimats semi-arides supérieurs à des altitudes allant de 450 à 1100 m. L'espèce pousse sur des sols calcaires pauvres et fertiles et se présente en petites populations dispersées (**Pottier-Alapetite, 1981**).



**Figure 10 :** Feuilles, et des fleurs du de *Thymus numidicus* (**Pottier-Alapetite, 1981**).

## 2.2. Bioactivité

Des travaux antérieurs sur *T. numidicus* algérien ont montré que les huiles essentielles présentaient une forte activité antibactérienne, en particulier contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Enterobacter aerogenes* (**Kabouche et 10., 2005**). Les phénols de cette plante présentent des propriétés antioxydants, anti-tumorales, antivirales, anti-

inflammatoires significatives (**Apak et al., 2007 ; Zhang et al., 2011**). Les flavonoïdes de *T. numidicus* ont également été étudiés par (**Benkiniouar et al., 2010**), ils ont mentionné que cette plante est riche en flavonoïde cela peut nous conduire à chercher sur le pouvoir de cette fraction qui est communément lié à l'activité hypoglycémiante.

### 3. Flavonoïdes

#### 3.1. Flavonoïdes alimentaires

Les nutraceutiques sont des produits naturels dérivés de fruits et légumes qui procurent de multiples bienfaits pour la santé. L'attention scientifique a été accordée au cours des 20 dernières années aux composés naturels, tels que les flavonoïdes servant d'agent antidiabétique. Les flavonoïdes sont des polyphénols qui sont omniprésents dans les fruits, les légumes, les noix, le cacao, le thé, les graines de céréales et les herbes consommés quotidiennement (**A Stravodimos et al., 2017**).

Ils représentent une grande classe d'environ 8000 composés phénoliques. Les flavonoïdes sont considérés comme une classe de métabolites secondaires biologiquement actifs de plantes connus comme producteurs de pigments responsables de l'odeur et de la couleur des fleurs, où ils remplissent des fonctions antivirales, anti-allergiques, antibactériennes et anti-inflammatoires (**Ahmad et al., 2000**). La structure des flavonoïdes se compose de 15 squelettes carbonés et de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par une chaîne à trois carbones qui est généralement un cycle C hétérocyclique oxygéné. Sur la base de la structure générique d'un cycle C, des groupes fonctionnels présents sur le cycle et de la position où le cycle B est attaché aux cycles C, six sous-classes de flavonoïdes sont définies : les flavones ; les flavonols ; flavanones ; flavan-3-ols ; isoflavones ; et anthocyanosides (**Abotaleb et al., 2018**). Les flavonoïdes ont de multiples effets positifs sur la santé sur les troubles métaboliques, tels que les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'obésité et le diabète. La recherche et les études cliniques ont postulé la fonction des flavonoïdes dans la prévention et le traitement de certaines maladies virales comme la grippe (**Beecher, 2003**). Ils servent également d'antioxydants qui modulent le stress oxydatif dans le corps en neutralisant l'effet des espèces azotées et oxygénées, prévenant ainsi la maladie. L'activité antidiabétique des flavonoïdes soutient la régulation de la digestion des glucides, de la signalisation de l'insuline, de la sécrétion d'insuline, de l'absorption du glucose et du dépôt adipeux (**Middleton et al., 2000**). Ils ciblent plusieurs molécules impliquées dans la régulation de plusieurs voies, comme l'amélioration de la prolifération des cellules  $\beta$ , la promotion de la sécrétion d'insuline, la réduction de l'apoptose

et l'amélioration de l'hyperglycémie en régulant le métabolisme du glucose dans le foie (**Hossain et al., 2014**).

Une étude américaine sur 200 000 femmes et hommes a évalué l'association entre l'apport alimentaire de sous-classes de flavonoïdes et le diabète de type 2, confirmant qu'une consommation plus élevée d'anthocyanes de pommes, de myrtilles et de poires réduit le risque de diabète. On suppose que la majorité de la bioactivité des flavonoïdes se produit en raison de leur groupe hydroxyle, des cétones  $\alpha$  et  $\beta$  (**Kawser et al., 2016**).

### 3.2. Métabolisme des flavonoïdes

Les flavonoïdes hydrolysent et conjuguent les principales enzymes de l'intestin, du côlon et du foie. Dans l'intestin, les enzymes hydrolysées et conjuguées convertissent les unités monomères de flavonoïdes en O-glucuronides, en ester sulfate et en ester O-méthylrique (**Tanveer et al., 2017**). La conjugaison des flavonoïdes se produit en deux phases : L'intestin grêle (phase un), puis dans le foie, la fin de la phase une et le début de la phase deux se produisent. Dans le foie, les métabolites conjugués subissent un traitement supplémentaire pour produire des dérivés de sulfate et de glucuronide où ils sont facilités et excrétés par la bile et l'urine (Figure 11) (**Del Rio et al., 2010**). Les flavonoïdes non absorbés migrent vers le côlon où ils subissent une hydrolyse ou une fermentation par le microbiote colique. Les flavonoïdes glucuronides dans le foie sont hydrolysés par le microbiote en aglycones où ils se décomposent davantage en composés moléculaires inférieurs qui peuvent être facilement absorbés (**Scalbert et al., 2002**).

### 3.3. Effets antidiabétiques de flavonoïdes sélectionnés

#### 3.3.1. Flavonol

Les flavonols sont caractérisés par un cycle carboné insaturé au carbone 2-3 qui est oxydé en C4 tandis qu'hydroxylé en C3. On les trouve en abondance dans la laitue, les raisins, les oignons, le chou frisé et les baies (**Panche et al., 2016**).

#### 3.3.2. Quercétine

La 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou quercétine dihydratée ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) est le flavonoïde le plus abondant dans l'alimentation humaine (**Kelly., 2011**). On le trouve principalement dans les fleurs, les pommes, les graines de tomates, les baies, le fenouil, les feuilles de thé, les noix, les oignons, le brocoli, le poivre, la livèche et les échalotes (**David et al., 2016**). La quercétine agit comme base pour la formation d'autres squelettes de flavonoïdes, tels que la naringénine, la rutine et l'hespéridine. La quercétine est impliquée dans plusieurs

---

Contribution à l'évaluation de l'effet de *Thymus numidicus* et de *Rosmarinus officinalis* sur le diabète alloxanique chez les rats

actions biologiques telles que : l'homéostasie du glucose, sensibilisant et sécrétant de l'insuline, utilisation du glucose dans les tissus périphériques, l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose (**Hollman et al., 1995**). L'apport de quercétine est inversement associé à la prévalence du DT2 dans la population chinoise, ce qui suggère son activité préventive contre le DT2. Une revue systématique récente et une méta-analyse d'études animales ont montré que la quercétine diminue les taux sériques de glucose à des doses de 10, 25 et 50 mg/kg de poids corporel (**M Eid et S Haddad, 2017**). La quercétine extraite des baies a induit une voie de protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK) indépendante de l'insuline qui ralentit la consommation d'oxygène de l'adénosine diphosphate en stimulant la translocation et l'expression de GLUT 4 dans des mitochondries isolées (**Yao et al., 2019**). Ce mécanisme a une activité similaire à la metformine (médicament utilisé pour traiter le diabète de type 2) (**Fang et al., 2008**). L'action antidiabétique de la quercétine implique la réduction de la peroxydation lipidique, l'absorption du glucose par GLUT2 et l'inhibition de l'activation dépendante de l'insuline des phosphoinositides 3-kinases (PI3K). En plus de cela, la quercétine et ses dérivés stimulent une absorption de glucose dans les cellules musculaires et activent l'AMPK (**Bule et al., 2019**).

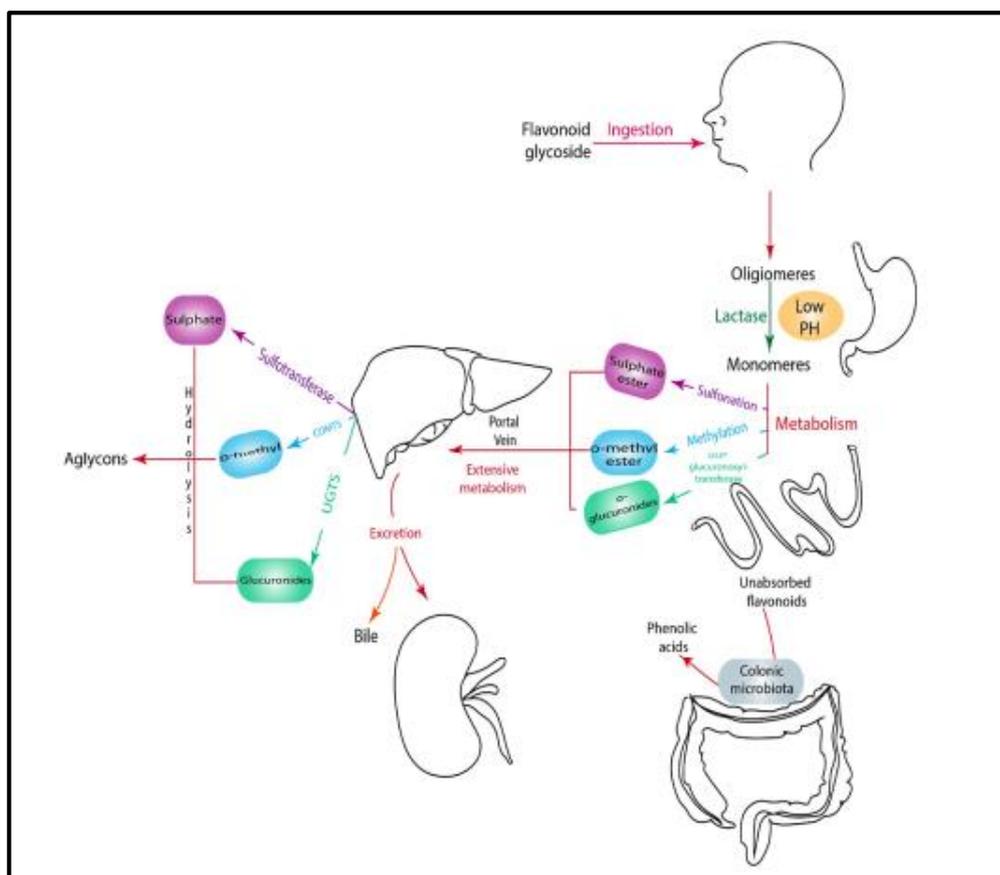
### 3.3.3. Rutine

La rutine est extraite de plantes telles que les oranges, les citrons, les raisins, les pêches, les citrons verts et le sarrasin. La rutine est également connue sous le nom de quercétine glycosylée, sophorine et quercétine-3-O-rutinosie (**Kreft et al., 1999**). Les effets antidiabétiques de la rutine comprennent la réduction de l'absorption des glucides par l'intestin grêle, l'amélioration de l'absorption du glucose par les tissus, la suppression de la gluconéogenèse tissulaire, l'activation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  et la protection des îlots de Langerhans. Des changements dégénératifs (**Huang et al., 2012**). La rutine réduit également la formation d'espèces réactives de l'oxygène, de précurseurs avancés de produits finaux de glycation, de sorbitol (**Prince et Kamalakkannan, 2006**). Lorsque des rats diabétiques ont été nourris avec 100 mg/kg de rutine, une augmentation significative des niveaux d'insuline et de l'activité des enzymes métaboliques glucidiques s'est produite. De plus, les résultats ont montré une réduction significative du niveau de glucose plasmatique (**Hao et al., 2012**).

### 3.3.4. Morin

Un flavonoïde naturel, se trouve principalement dans les herbes médicinales traditionnelles, comme *Prunus dulcis*, *Chlorophora tinctoria L.*, et des fruits comme la goyave

et les figures (**Ricardo et al., 2001**). L'administration orale de morin pendant 30 jours dans des modèles animaux a entraîné une amélioration significative de la tolérance au glucose, de l'hyperglycémie et de la résistance à l'insuline (**Sreedharan et al., 2009**). Les rats diabétiques auraient diminué les niveaux de peroxydes lipidiques et d'antioxydants après le traitement avec morin. Morin a différents effets sur les enzymes hépatiques où il réduit considérablement l'activité de la G6Pase et de la Fructose-1,6-diphosphatase (FDPase), tout en améliorant l'activité de l'hexokinase et de la G6PD (**Sendrayaperumal et al., 2014**).



**Figure 11:** Illustration d'une voie flavonoïde dans le corps humain (**Vinayagam et Xu, 2015**). Le glycoside des flavonoïdes pénètre dans l'organisme par ingestion orale. Une réaction enzymatique dans l'estomac (flèche verte) décompose les flavonoïdes en molécules plus simples. Dans l'intestin grêle, la première conjugaison des flavonoïdes se produit lorsque plusieurs réactions ont lieu, telles que la sulfatation et la méthylation, conduisant à la formation d'oglucuronides, d'ester o-méthylé et d'ester sulfate. La deuxième conjugaison des flavonoïdes a lieu dans le foie pour produire des dérivés de sulfates et de glucuronides qui pourraient être excrétés par la bile et l'urine. Les flavonoïdes non absorbés pénètrent dans le côlon pour être hydrolysés ou fermentés en composés de poids moléculaire inférieur qui peuvent être facilement absorbés.

### 3.3.5. Isoflavone

Les isoflavones se trouvent principalement dans les légumineuses, le soja et certains microbes. La génistéine et la daidzéine sont la principale source d'isoflavones (**Panche et al., 2016**). Ils ont montré un effet anti-diabétique en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques (**Vinayagam et Xu, 2015**).

### 3.3.6. Naringenin

La 5,7,4'-trihydroxyflavanone, un aglycone oxydé saturé, est présente en abondance dans les agrumes, tels que les oranges, les tomates et les pamplemousses (**Hasanein et Fazeli, 2014**). Il possède un large éventail d'activités biologiques, telles que des capacités antioxydants, antidiabétiques (**Patel et al., 2018**). L'administration de ce flavonoïde (25 mg/kg) à des rats diabétiques a montré une inhibition significative de l'activité  $\alpha$ -glucosidase qui a retardé l'absorption des glucides, réduisant ainsi la glycémie postprandiale (**Singh et al., 2018**). Chez les souris diabétiques de type 2, la naringine pourrait réguler positivement GLUT4 et réguler l'expression des enzymes hépatiques impliquées dans la gluconéogenèse et la glycolyse, ce qui améliore l'hyperglycémie (**Choi et al., 1991**).

## 3.4. Défis liés à l'utilisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes se sont révélés être de bons candidats pour réduire la pathogenèse du diabète et ses complications. Les effets antidiabétiques modulateurs des flavonoïdes réduisent l'apoptose et la résistance à l'insuline et améliorent la sécrétion d'insuline et la translocation de GLUT 4.

### 3.4.1. Estimation du niveau de consommation de flavonoïdes

Les flavonoïdes dérivés des légumes et des fruits sont consommés en faible quantité. De plus, le contenu des légumes et des fruits contient non seulement des flavonoïdes, mais également un mélange de métabolites végétaux secondaires (**Gil-Izquierdo et al., 2001**). Il est donc difficile de stimuler ce mélange en un simple complément alimentaire purifié. Des efforts ont été faits pour établir un niveau optimal de consommation alimentaire humaine de flavonoïdes dans le monde, mais les méthodes d'estimation utilisées sont mal établies (**Macgregor et Jurd, 1978**). Une étude américaine sur 805 sujets (hommes) âgés de 65 à 84 ans a rapporté que l'apport estimé de flavonoïdes provenant de la quercétine, de la myricétine, du kaempférol, de l'apigénine et de la leutéoline était de 26 mg/j et que les principales sources d'apport étaient les pommes, le thé et les oignons (**Thilakarathna et Rupasinghe, 2013**). Une autre étude menée aux Pays-Bas a rapporté un niveau deux fois plus élevé de flavonoïdes

consommés chez les adultes par rapport à l'étude américaine (50 g/jour). De plus, deux études néerlandaises ont rapporté que le niveau de consommation estimé de flavonoïdes était respectivement de 23 mg/jour et 26 mg/jour. Ces différences observées dans le niveau de consommation de flavonoïdes dépendent des habitudes alimentaires, de la situation géographique, du statut socio-économique, de la méthode de transformation et de préparation des aliments, de la solubilité des flavonoïdes et de l'ethnicité de la population. Par exemple, au Japon, les aliments contenant du soja sont fortement consommés et, par conséquent, la consommation d'isoflavones est supérieure à celle des autres sous-classes de flavonoïdes (**Suzuki et al., 1991**).

À ce jour, aucune posologie recommandée de flavonoïdes n'a été rapportée en raison de l'hétérogénéité de leur structure moléculaire et des informations limitées sur leur biodisponibilité.

Des progrès majeurs dans la compréhension de la biodisponibilité des flavonoïdes ont été réalisés, mais le défi de surmonter les problèmes, tels que la perméabilité cellulaire, la solubilité, l'excrétion et l'alternance métabolique, fait toujours défaut.

Des groupes de recherche tentent d'améliorer la biodisponibilité des flavonoïdes en ciblant les sites d'absorption, en améliorant la stabilité métabolique et l'absorption intestinale (**Skibola et Smith, 2000**).

### **3.4.2. Effets secondaires possibles de la consommation de flavonoïdes**

Il est peu probable que les concentrations nécessaires à la plupart des flavonoïdes pour générer des effets secondaires mutagènes et cytotoxiques se produisent par des sources alimentaires, mais avec une supplémentation, cela pourrait entraîner une augmentation du niveau toxique (**Egert et Rimbach, 2011**). Par exemple, la dose recommandée de suppléments de quercétine est comprise entre 500 mg/jour et 1000 mg/jour, ce qui est 20 fois plus élevé que ce qui pourrait être consommé dans un régime végétarien (**Sahu et Gray, 1993**).

### **3.4.3. Combinaisons de flavonoïdes pourraient-elles avoir des effets synergiques**

Meilleure activité peut être définie par le nombre de voies liées au diabète qui sont améliorées par la consommation de différents flavonoïdes. La quercétine stimule l'activité de trois voies différentes : Elle améliore la translocation de GLUT 4 ; inhibe l'activité tyrosine kinase ; et réduit la peroxydation des lipides. L'apoptose des cellules  $\beta$  pourrait être prévenue par l'administration de cyanidine ou de kaempférol, ou de baicaléine. La consommation de

rutine ou de cyanidine inhibe l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$  amylase qui réduisent l'absorption des glucides dans l'intestin grêle (Thomas et Gregg, 2017).

Leurs effets positifs sur le diabète pourraient-ils être encore améliorés quand en ingérant une combinaison de différents flavonoïdes qui se complètent en déclenchant des voies supplémentaires ? Par exemple, l'administration de baicaléine et de quercétine initie les effets positifs sur le diabète dans six voies principales : Le transporteur de glucose ; enzymes hépatiques ; apoptose des cellules bêta ; les PPAR ; AMPK ; tyrosine kinase ; et voies NF- $\kappa$ B. En raison de cette combinaison hypothétique, la suractivation de ces voies peut être empêchée, tandis que l'action nécessaire pour améliorer le diabète peut être réalisée (Grace et al., 2009).

#### 3.4.4. Flavonoïdes et metformine

La Metformine est un médicament antidiabétique oral dérivé du lilas français adapté au traitement du diabète avec un profil de sécurité bien connu (Zheng et al., 2018). La comparaison de l'effet de la metformine et des anthocyanes extraites des myrtilles sur la glycémie a révélé que l'extrait de myrtille (595 mg/g d'anthocyanines totales) entraînait une réduction de 33 % à 51 % de la glycémie par rapport à la réduction de 27 % observée avec la metformine. Une autre étude a rapporté que la quercétine stimule une voie AMPK dépendante de l'insuline, qui est analogue à l'activité de la metformine (Peng et al., 2017).

**Partie**  
**Pratique**

### III. Matériel et méthode

## 1. Expérimentation phytochimique

### 1.1. Matériel végétale

Les jeunes pousses de *Rosmarinus officinalis* et *Thymus numidicus* ont été collectés au mois d'Avril 2019 dans la région de Tébessa et de Constantine pendant la période de floraison. Les plantes provenant de deux localités Est d'Algérie, elles sont identifiées par un botaniste, Le spécimen de référence (05-2020) a été déposé à l'herbier du département de biologie appliquée de Larbi-Tebessi, université, Tébessa-Algérie, et après sont nettoyés et séchés à l'abri de soleil après on a récupéré seulement les feuilles, ensuite ils ont été broyés en poudre pas fine par un broyeur, les matériaux ont été stockés à température ambiante pour une utilisation postérieure.

### 1.2. Préparation de l'extrait

L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon la méthode (**Markham, 1982**) avec une modification inspirée par la méthode de (**Bruneton, 1999**). Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans un solvant organique. Cette méthode comprend 2 phases principales : phase solide-liquide et phase liquide-liquide. La première se fait avec du méthanol pour dissoudre et solubiliser les composés de la plante dans le liquide d'extraction (flavonoïdes). La seconde consiste à confronter plusieurs solvants avec l'extrait pour récupérer différents composés selon leur polarité avec le solvant.

L'extraction des flavonoïdes est réalisée à partir de la matière sèche broyée avec un calibre bien précis et macéré dans le méthanol 95% 1 poid de matiere sec dans 3 volume de solvant pendant 24h. Le macérât est filtré puis soumis à une évaporation à basse pression à 35°C (Rota Vapor, Büchi 461, Germany), le processus répété 3 fois la dernière évaporation sera à sec. Après on l'ajoute à La phase solide obtenue l'eau bouillie est conservée pendant 24 heures à 3°C pour accélérer la diffusion des molécules dans l'eau puis filtrée. Le filtrat est débarrassé des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole (3 v/v) dans une ampoule de décantage pour donner une phase aqueuse. Afin de séparer les flavonoïdes en fractions aglycones, monoglycosides et di et triglycosides, la phase aqueuse est mélangée avec l'éther diéthylique (3 v/v) pour obtenir une phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés. Encore une fois la phase aqueuse subit trois confrontations avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certains flavonoïdes les monoglycosides et les diglycosides, phase aqueuse restante est confrontée avec le *n*-butanol pour récupérer notamment les flavonoïdes di et triglycosides. Enfin les phases organiques sont évaporées à basse pression 35 C° jusqu'à sec, elles sont récupérées et pesées afin de calculer le rendement.

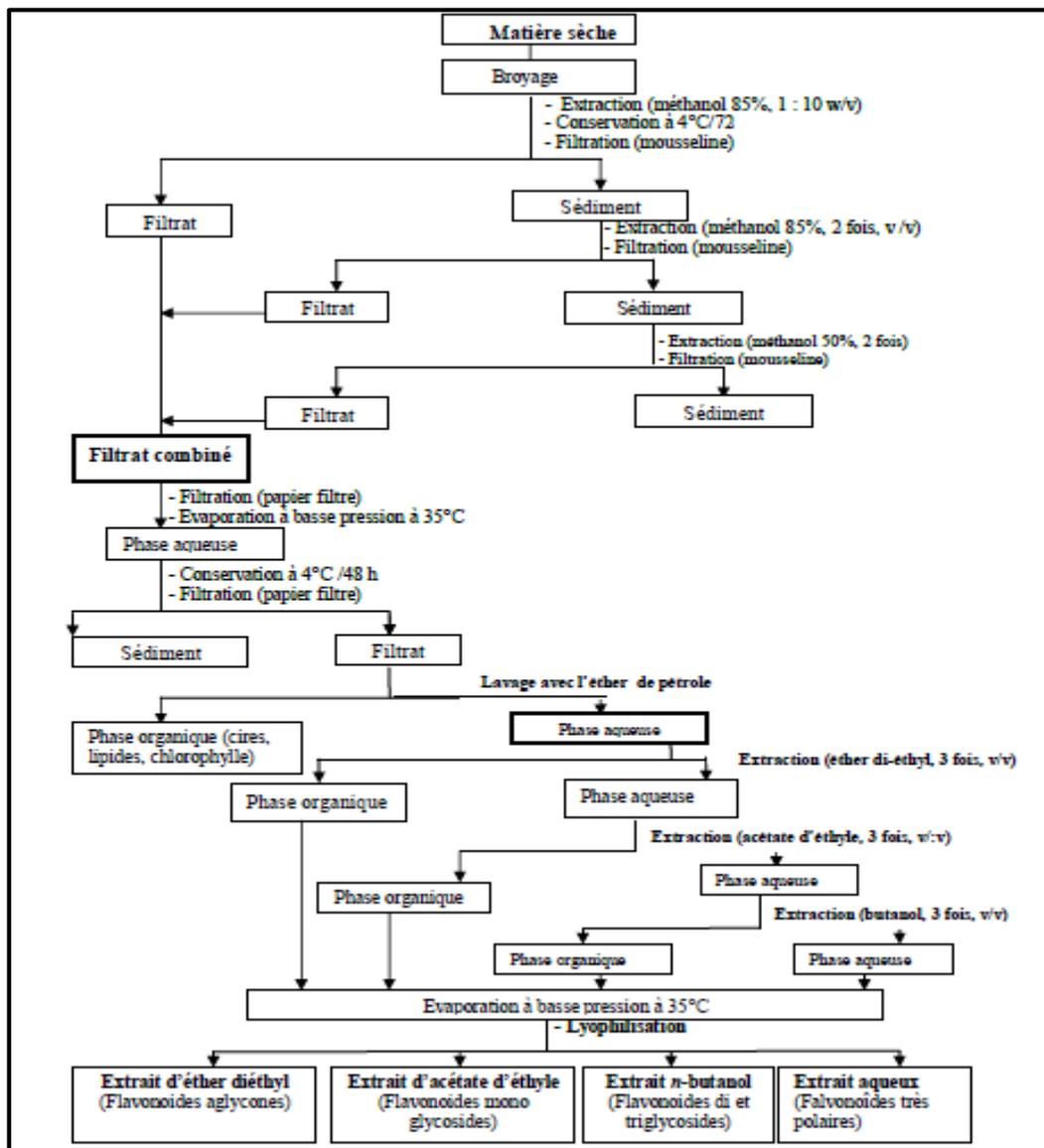


Figure 12 : Protocole de fractionnement des flavonoïdes de RO et TN (Bruneton, 1993).

### 1.3. Contenu phénolique total (TPC)

La détermination de la teneur de TPC pour les 3 fraction a été réalisée selon la méthode (Singleton et Rossi, 1965) on a utilisé le réactif de Folin-Cicalteau, une gamme d'étalonnage a été réalisée avec l'acide gallique pour calculer la teneur en TPC dans chaque extrait après les résultats ont été exprimés en 1mg d'équivalent d'acide gallique par 1g de lyophilisat.

#### Principe

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMo12O40), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W8O23) et de molybdène (Mo8O23). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 750 -765 nm.

**Réactifs**

Eau distillé, Méthanol, FCR (Folin-Ciocalteu réactif), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 7,5% (Carbonate de sodium), Acide Gallique, extrait de plante.

**Procédure**

20 µl d'extrait de plante + 100µl de FCR dilué (1 :10) + 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) + mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h + lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

**1.4. Contenu flavonoïde total (TFC)**

L'évaluation quantitative en TFC pour les 3 fraction a été établie selon la méthode (Turkoglu et al., 2007) basée sur la formation d'un complexe entre Al<sup>3+</sup> et les flavonoïdes, une gamme d'étalonnage a été réalisée avec la quercetine pour calculer la teneur en flavonoïdes dans chaque extrait les résultats ont été exprimé en 1mg d'équivalent de quercetine par 1g de lyophilisat.

**Principe**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al<sup>3+</sup> et les flavonoïdes.

**Réactifs**

Méthanol, Eau distillé, 10% nitrate d'aluminium (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H<sub>2</sub>O), 1 M Potassium acétate (CH<sub>3</sub>COOK), Quercetin (Flavonoïde), extrait de plante.

**Procédure**

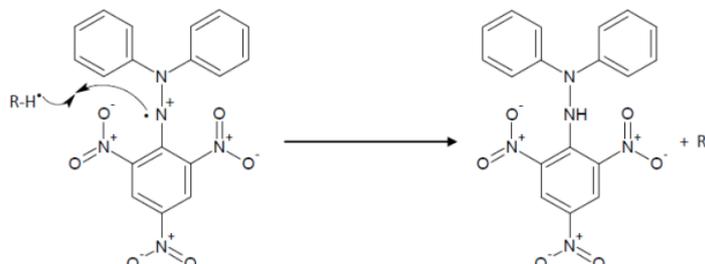
50 µl (extrait de plante) + 130 µl (MeOH) +10 µl (CH<sub>3</sub>COOK) + 10 µl (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H<sub>2</sub>O) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50µl extrait + 150µl méthanol).

**1.5. Détermination de capacité antioxydant****1.5.1. Test scavenger-radical libre DPPH**

La mesure d'activité à piégé le radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) a été établie selon la méthode décrite par (Blois, 1958) les résultats ont été donnés comme la concentration inhibent 50 % des radicaux (IC<sub>50</sub>) et on le comparant avec les standard (BHA, BHT, α-Tocophérol).

## Principe

Il s'agit d'un test d'activité Scavenger contre les radicaux libres. L'activité anti-radicalaire des produits naturels peut être dosée en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm du radical libre stable DPPH. Le radical libre de couleur violette réagit avec le piègeur pour donner le produit incolore 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine :



## Réactifs

Poudre de DPPH, Méthanol (tamponné ou ordinaire, qualité HPLC), ultrafiltré (0,22  $\mu\text{m}$ ), l'eau bidistillé.

## Procédure

160  $\mu\text{l}$  (DPPH dissout dans le méthanol) + 40  $\mu\text{l}$  (extrait) et lecture 517 nm.

$$\text{Pourcentage d'inhibition DPPH \%} = \left( \frac{(\text{AbsB} - \text{AbsE})}{\text{AbsB}} \right) \times 100$$

**AbsB** : absorbance du blanc.

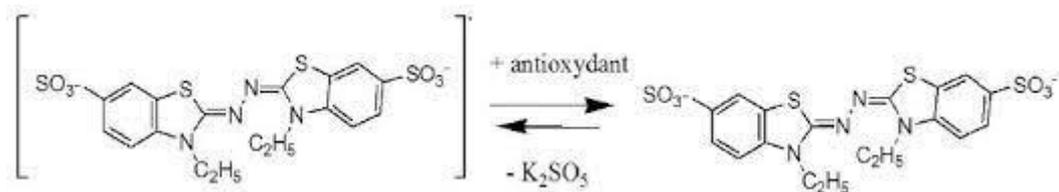
**AbsE** : absorbance d'échantillon.

### 1.5.2. Test de cation radical ABTS

Test de la capacité à scavenger le cation ABTS est une première estimation à la capacité antioxydant de notre extrait sur le radical ABTS selon la méthode (**Re et al., 1999**), les résultats ont été donnés comme la concentration qui inhibe 50 % les cations ABTS ( $\text{IC}_{50}$ ).

## Principe

Le mono-cation radicalaire préformé de l'acide L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) est généré par oxydation de l'ABTS avec du persulfate de potassium et est réduit en présence de tels antioxydants donneurs d'hydrogène :



### Réactifs

K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, ABTS, l'eau distillée, éthanol, α-Tocophérol, BHA

### Procédure

7 mM ABTS + 5 ml H<sub>2</sub>O + 2.45 mM (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) + 5 ml H<sub>2</sub>O + attendre 16 heures à l'abri de la lumière puis 160 µl d'ABTS<sup>+</sup> + 40 µl d'extrait + attendre 10 mn + lecture à 734 nm :

$$\text{Pourcentage d'inhibition ABTS \%} = \left( \frac{(AbsB - AbsE)}{AbsB} \right) \times 100$$

**AbsB** : absorbance du blanc.

**AbsE** : absorbance d'échantillon.

#### 1.5.3. Test de radical Galvinoxyl (GOR)

L'activité a piégé le radical galvinoxyle (GOR) a été déterminé selon la méthode décrit par (Shi *et al.*, 2001), les résultats ont été exprimés en (IC<sub>50</sub>).

### Principe

Le galvinoxyle est réduit par des piègeurs de radicaux libres donneurs d'hydrogène, comme le montre la réaction :



Sur la base qu'une molécule de galvinoxyle réagit avec un groupe hydroxyle actif, nous pouvons déterminer la quantité d'hydrogènes phénoliques actifs dans la réaction avec le galvinoxyle par la diminution de l'absorbance du galvinoxyle dans la solution de réaction.

### Réactifs

Radical Galvinoxyle, éthanol.

**Procédure**

40 µl extrait + 160 µl (0,1 mM Galvinoxyle) dans 100 ml MeOH + incubation 120 min  
+ lecture 428 nm :

$$\text{Pourcentage d'inhibition Galvinoxyle \%} = \left( \frac{(AbsB - AbsE)}{AbsB} \right) \times 100$$

**AbsB** : absorbance du blanc.

**AbsE** : absorbance d'échantillon.

**1.5.4. Radical superoxyde scavenging (pyrogallol)**

La capacité de neutraliser des radicaux superoxydes générés par l'auto-oxydation de pyrogallol a été déterminée selon la méthode décrit par (**liang et al., 2014**), les résultats sont été exprimés en (IC<sub>50</sub>).

**Principe**

Le pyrogallol au milieu alcalin subit une auto-oxydation qui va générer des radicaux du super- oxyde ces radicaux sont rapidement internalisés par les antioxydants de la solution à tester.

**Réactifs**

Tampon Tris-Hcl (50 mM, PH 8,2), 25 mM Pyrogallol, Hcl.

**Procédure**

4,5 ml Tompon Tris-Hcl, 0,4 ml de pyrogallol + 1 ml d'échantillon le tous incubé à 25 C° pendant 5 min puis 1 ml de Hcl gouté dans la mixture rapidement pour terminer la réaction. L'absorbance est mesurée à 420 nm :

$$\text{Pourcentage d'inhibition superoxyde de pyrogallol \%} = \left( \frac{(AbsB - AbsE)}{AbsB} \right) \times 100$$

**AbsB** : absorbance du blanc.

**AbsE** : absorbance d'échantillon.

**1.6. Activité antidiabétique****1.6.1 Test anti-glycation**

Le test de capacité de l'extrait à inhiber la formation des protéines glyqués a été évalué selon la méthode (**Matsura et al., 2002**), les résultats ont été exprimés en (IC<sub>50</sub>) ensuite on les a comparés avec le standard Rutine.

**Réactifs**

BSA (4mg/ml), D-Glucose (1M), tampon phosphate (0,1M, PH 7,4), PBS Alcalin, PH 10, (137 mM NaCl, 8,1Mm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,68mM KCL, 1,47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ajusté par 0,25N NaOH, TCA 100% (w%v), le standard : La rutine.

**Procédure**

Pour le mix réactionnel (préparation dans des tubes eppendorf 1,5 ml) :

100 µl de BSA (dissoudre 4 mg de BSA dans 1 ml d'eau distillé) + 100 µl de Glucose 200 mM + 10 µl extrait de plante + 250 µl de tampon phosphate (0,1 M – PH 7,4) + 40 µl eau distillé puis incubation du mélange à 60 C° pendant 30 h. Le contrôle négatif est préparé sans l'extrait de plante et gardé à 4 C° jusqu'à mesure de l'absorbance.

Après incubation :

Laisser refroidir, puis, transférer des aliquotes de 100 µl de chaque tube à de nouveau tubes eppendorf 1,5 ml + 10 µl de TCA 100 % (w/v) + Agitation et centrifugation (15000 tpm, 4 C°, 4 min). Eliminer le surnageant contenant le glucose, l'inhibiteur et les substances interférentes. Ajouter 400 µl de PBS Alcalin (PH : 10) au précipité AGEs-BSA pour dissolution. Transférer 200 µl de chaque tube dans une microplaque noire 96 puits pour lecture. Mesure de l'absorbance à 370 nm et 440 nm respectivement :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de glycation \%} = \frac{[Abs C - (Abs E - Abs B)]}{Abs C \times 100}$$

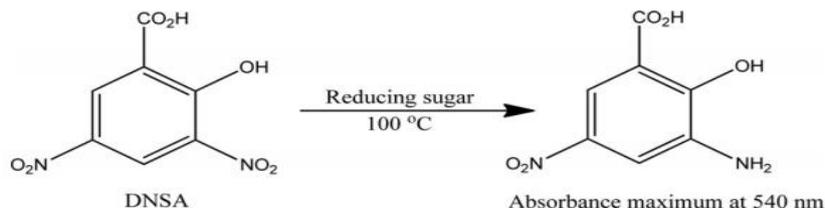
**Abs C** : absorbance de contrôle.

**Abs B** : absorbance de blanc.

**Abs E** : absorbance d'échantillon.

**1.6.2. Test d'inhibition α-amylase**

L'activité d'inhibition α-amylase a été évaluée selon la méthode décrit par (Zengin et al., 2014) les résultats sont été exprimés en (IC<sub>50</sub>) et on a été les comparés avec l'acarbose comme standard.

**Principe****Réactifs**

Amidon soluble (0.2 M, pH 6.8) + 17 mM NaCl) → S1, Enzyme  $\alpha$ -amylase (25 unit/mL) → S2, NaOH 2N : → S3, couleur réagent : acide 3,5-dinitrosalicylic (44  $\mu$ M) + potassium sodium tartrate tetrahydrate (106  $\mu$ M) + NaOH (40  $\mu$ M) → S4.

**Procédure**

75  $\mu$ l extrait + 125  $\mu$ l (S1) + 20  $\mu$ l (S2) + incubation pendant 30 min à 37 °C + 25  $\mu$ L (S3) + 20  $\mu$ L (S4) + incubation pendant 20 min à 37 C° + lecture à 540 nm.

$$\% d'inhibition = \frac{(Abs C - Abs CB) - (Abs E - Abs EB)}{(Abs C - Abs CB)} \times 100$$

**Abs C** : absorbance de contrôle.

**Abs B** : absorbance de blanc.

**Abs E** : absorbance d'échantillon.

**Abs CB** : absorbance pour blanc contrôle.

**Abs EB** : absorbance pour blanc échantillon.

**1.7. Test inhibition Acetylcholinestérase (test anti-Alzheimer)**

L'inhibition de l'acétylcholinestérase par les 3 fractions a été évaluée selon la méthode décrit par (Ellman et al., 1961), l'acétylcholinestérase iodide a été utilisé comme substrat d'enzyme et le Galanthamine comme standard ensuite les résultats sont été exprimés en (IC<sub>50</sub>).

**Principe**

Le principe de la méthode est mesuré du taux de production de thiocholine produite par l'hydrolyse de l'acétylthiocholine. Ceci est accompli par la réaction continue du thiol avec les ions 5 : 5-dithiobis-2-nitrobenzoate pour produire l'anion jaune de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque, le taux de production de couleur est mesuré à 412 nm.

**Réactifs**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, NaOH, DTNB, ACI (Acetylthiocholine iodide), AChE, Galantamine, l'eau distillé, éthanol.

**Procédure**

95 µL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) + 15 µL d'extrait solution dissous dans l'éthanol a différentes concentrations + 30 µL AChE (5.32 × 10<sup>-3</sup> U) solution + incubé à 25 C° pendant 15 mn + 25 µL de DTNB (0.5 mM) + 10 µL of acetylthiocholine iodide (0.71 mM) + lecture à 412 nm, pour 0 min une fois lecture, 5 min deux lecture, 10 min trois lecture, 15 min quatre lecture.

$$\text{Pourcentage d'inhibition Acetylcholinesterase \%} = \left( \frac{AbsE - AbsS}{AbsE} \right) \times 100$$

**Abs E** : absorbance d'activité enzymatique sans extrait.

**Abs S** : absorbance d'activité enzymatique avec l'extrait.

**1.8. Facteur d'inhibition**

Ce facteur donne une variable qui exprime le pouvoir d'inhibition d'extrait par rapport à l'inhibition de référence donc il sera démontré combien de fois nos fractions seront plus puissantes ou moins que l'inhibiteur de référence (**Owokotomo et al., 2015**), sera calculé comme suit :

$$IF (IC_{50}) = \frac{IC_{50} \text{ inhibiteur de référence}}{IC_{50} \text{ inhibiteur d'extrait}}$$

**2. Expérimentation animale**

Des rats Wistar mâles sains de *Rattus norvegicus* âgés de 2 mois pesant entre 200 et 220 g sans traitement médicamenteux préalables, ont été utilisés uniquement pour la présente étude, émanant de l'Institut Pasteur, les animaux ont été acclimatés aux conditions d'hygiène du laboratoire avant 10 jours pour démarrer l'expérience dans ces conditions (température : 23c° ± 2 c° et photopériode naturelle : 12h de lumière et 12h d'obscurité), ils ont été nourris avec un régime de granulés (ONAB-Elharouche, Skikda-Algérie), et de l'eau disponible ad libitum.

Ensuite la fraction qui apparaît, une bonne épreuve au test phytochimique sera utilisée in Vivo chez nos cobayes la fraction d'acétate d'éthyle des plantes *Rosmarinus officinalis* et *Thymus numidicus* semble la plus porteuse d'un pouvoir bioactif aux différentes activités phytochimiques.

## 2.1. Études de toxicité aiguë

Avant de commencer notre étude sur le diabète un test de toxicité aiguë a été réalisé pour évaluer notre fraction flavonoïde, ce test a été déterminé selon les directives de l'OCDE n° 420 (organisation de coopération et de développement économiques). Des rats mâles (200-220g) ont été utilisés et scindés en différents groupes de 6 rats. Chaque groupe a reçu différentes doses d'échantillon d'essai jusqu'à 2000 mg/kg de poids corporel, après les animaux ont été surveillés pendant 14 jours pour confirmer s'il y a des mortalités ou une réponse comportementale détectée. En fin de compte, aucun décès n'a été enregistré jusqu'à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel. Et comme résultat la dose 300 mg/kg de poids corporel a été choisie comme la dose expérimentale la plus avancée.

## 2.2. Activité anti-hyperglycémique de R.O-EA et T.N-EA chez des animaux normaux chargés en glucose

L'activité antidiabétique de la fraction d'acétate d'éthyle a été évaluée selon la méthode de (Jarald et al., 2009) avec une légère modification. Les animaux ont été divisés au hasard en 6 groupes, 6 rats pour chacun, le témoin négatif a reçu uniquement la solution de véhicule 1% Tween 80 dose 0,5 ml/100g p.c, le témoin positif a reçu une dose de glibenclamide 5 mg/kg p.c. Les autres groupes ont été traités avec l'extrait de RO-EA et TN-EA à différentes doses (150 mg/kg et 300 mg/kg p.c.). Les animaux ont reçu leurs doses par voie orale avec une sonde de gavage numéro 7. La glycémie des animaux a été prise après une période de jeûne nocturne à un temps 0. Juste après la première mesure, les animaux ont reçu tout le traitement après ils sont restés pour recevoir la dose de glucose 4 mg/kg p.c, et l'autre mesure de glycémie a été prise à ½, 1, 2, 3h après une dose de glucose. La glycémie a été estimée avec un glucomètre (DIAGNO-CHECK smart) à partir des extrémités de la queue des rats.

## 2.3. Activité hypoglycémiant de R.O-EA et T.N-EA chez des animaux normaux à jeun

Les mêmes étapes effectuées dans le test précédent ont été répétées. Cependant, les rats ont jeûné pendant une nuit pendant 10 h, le premier groupe qui est resté comme témoin négatif a reçu une dose de 0,5 ml/100 g de poids corporel de véhicule. Le deuxième groupe a reçu du glibenclamide comme dose de référence de 5 mg/kg dissous dans de l'eau salée (0,9 w/v NaCl). Les groupes 3 à 6 ont reçu la dose d'extrait de RO-EA et TN-EA (150 mg/kg et 300 mg/kg de poids corporel), comme mentionné dans le (tableau), les échantillons du sang ont été prélevés du bout de la queue à la fois 0 (avant administration orale) et ½, 1, 2 et 3 h après l'administration du véhicule, de l'extrait et du glibenclamide. Le taux de glycémie a été fait comme le test précédent.

#### 2.4. Effet dose-dépendant de l'extrait RO-EA et TN-EA sur le taux plasmatique de glucose et d'insuline chez les rats diabétiques

Le diabète a été induit chez les rats (après avoir jeûné pendant une nuit pendant 8 heures), avec une dose unique d'Alloxan de 120 mg/kg de poids corporel dans 0,9 p/v de NaCl par voie intrapéritonéale. Les rats ont été placés dans des cages avec des bouteilles remplies de glucose à 10 % pendant les 24 h suivantes pour prévenir l'hypoglycémie. Après 72 heures d'injection, la glycémie à jeun a été mesurée, les rats ayant montré une glycémie supérieure à 300 mg/dl ont été acceptés pour le test. Les 54 rats sélectionnés ont été répartis au hasard en 9 groupes, 6 rats pour chacun, selon le tableau suivant :

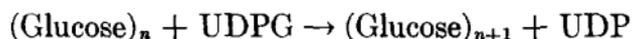
- Groupe 1:** Rats témoins normaux (véhicule 0,5 ml/100g p.c.)
- Groupe 2:** Normal + TN-EA (300 mg/kg p.c.)
- Groupe 3:** Normal + RO-EA (300 mg/kg p.c.)
- Groupe 4:** Rats témoins diabétiques (véhicule 0,5 ml/100g p.c.)
- Groupe 5:** Diabétique + TN-EA (150 mg/kg p.c.)
- Groupe 6:** Diabétique + TN-EA (300 mg/kg p.c.)
- Groupe 7:** Diabétique + RO-EA (150 mg/kg p.c.)
- Groupe 8:** Diabétique + RO-EA (300 mg/kg p.c.)
- Groupe 9:** Diabétique + Glibenclamide (5 mg/kg p.c.)

L'extrait a été dissous dans le véhicule (1% Tween 80), le glibenclamide a été dissous dans de l'eau salée 0,9 w/v NaCl, la consommation d'eau et de nourriture a été surveillée tout au long de la période de 21 jours à une heure fixe pour chaque groupe et renouvelée chaque jour, et le poids des rats a été pris avant le début du traitement et avant le sacrifice. Après 21 jours de traitement, les rats ont été mis à jeun pendant une nuit puis anesthésiés et sacrifiés par décapitation cervicale, le sang a été prélevé pour mesurer la concentration sérique de glucose et d'insuline, et le groupe de traitement qui semblait montrer une bonne amélioration du taux plasmatique de glucose et d'insuline a été sélectionné pour déterminer le taux d'Hb et d'HbA1c et aussi pour la partie histologique et le dosage de l'enzyme clé du métabolisme glucidique, le foie a été récupéré dans une solution de formol à 10% et immédiatement envoyé pour étude histologique, le foie a été rincé avec une solution saline glacée, homogénéisé avec une solution à 10% p/v de Tampon Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4), puis centrifugé (10000xg pendant 15 min à

4°C), le surnageant a été utilisé pour le dosage de l'enzyme hépatique et du glycogène. La concentration en protéines a été mesurée par la méthode de Lowry et al.

### 2.4.1. Glycogène synthase

#### Principe



L'activité est mesurée par la quantité d'UDP formée à partir d'UDPG en présence de glycogène et de G-6-P selon la méthode de **(Leloir et Goldemberg, 1962)**. L'estimation de l'UDP est réalisée en utilisant une préparation de pyruvate kinase qui catalyse le transfert de phosphate du phosphopyruvate vers l'UDP. Le pyruvate libéré est estimé par colorimétrie.

#### Réactifs

Solution de glycogène, 40 mg /ml. Tampon glycine 0,75 M, pH 8,5, contenant 0,025 M EDTA. 0,05 M G-6-P (pH 7) sel de sodium. Les solutions de glycogène, de tampon et de G-6-P mélangées à volume égal. Cystéine 0,03 M, fraîchement préparée et neutralisée. UDPG, 25 micromoles/ml. 0,01 M PEP (cyclohexylammonium ou sel de sodium) dans 0,4 M KCl. Pyruvate kinase fraîchement diluée dans 0,1 M MgSO<sub>4</sub>. 0,1 % de dinitrophénylhydrazine dans 2N d'HCl. 10N NaOH. 95% d'éthanol.

#### Procédure

On mélange 0,03 ml de la solution glycogène-tampon-G-6-P, 0,005 ml. 0,005 ml de cystéine, 0,005 ml d'enzyme (surnagent) et 0,01 ml de l'UDPG. La réaction est déclenchée dès l'addition de ce dernier, et l'incubation est effectuée à 37° pendant 5 à 10 minutes. Les tubes sont ensuite chauffés au bain-marie bouillant pendant 1 minute. Un blanc dans lequel l'UDPG est ajouté après l'incubation. Pour estimer l'UDP formé dans la réaction, 0,025 ml de PEP et 0,025 ml de pyruvate kinase sont ajoutés. Les tubes sont incubés 15 minutes à 37°, et 0,15 ml de dinitrophénylhydrazine est ajouté. Après 5 minutes 0,2 ml de 10 N NaOH et 1,1 ml d'éthanol sont ajoutés, et les tubes sont mélangés et centrifugés. La densité optique du fluide surnageant est mesurée à 520 nm. L'activité de la glycogène synthétase est exprimée en micromoles d'UDP formées par millilitre d'enzyme par minute :

$$\frac{(\Delta E / \text{min})}{260 \times I \times \text{mg}} \times V_t / V_e = \text{glycogène UI / mg}$$

**260** : coefficient d'extinction molaire de UDP.

**I** : épaisseur de trajet optique de la cuve 1 cm.

**Vt** : volume totale de la cuve.

**Ve** : volume d'échantillon.

### 2.4.2. Glucose-6-phosphatase

#### Principe



La méthode est basée sur l'incubation du substrat spécifique avec l'enzyme et la détermination de l'orthophosphate libéré selon la méthode de **(Hikaru et Toshitsugu., 1959)**.

#### Réactifs

Glucose-6-phosphate (G-6-P), Sodium sulphate,  $\text{Na}_2\text{O}_4$ , ou potassium sulphate,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , acid Trichloroacetic, Ammonium molybdate,  $(\text{NH}_4)_6\text{M}_0_7\text{O}_{24} - 4 \text{H}_2\text{O}$ , Sodium hydrogen sulphite,  $\text{NaHSO}_3$ , Sodium sulphite,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , acid l-Amino-2-naphthol-4-sulphonic, Potassium dihydrogène phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

#### Procédure

Placer deux tubes à essai contenant la solution G-6-P et le tampon dans un bain-marie à 37°C. Pour chaque échantillon préparer un tissu témoin (tube 1) et pour chaque série un réactif témoin (tube 2), Pipeter dans des tubes à centrifuger :

#### **Expérimentale :**

0,1 ml d'homogénat filtré

Placer les tubes dans un bain-marie à 37°C, après 5 min mélanger

0,1 ml G-6-P 37°C

#### **Contrôle 1 :**

0,1 ml d'homogénat filtré

0,1 ml de tampon

#### **Control 2 :**

0,1 ml de tampon

0,1 ml G-6-P 37°C

Et noter l'heure de chaque ajout Incuber les tubes exactement 15 min à 37°C puis ajouter 2 ml de solution d'acide trichloracétique, dans chaque tube puis Centrifuger et utiliser le surnageant clair pour la détermination du phosphate. La teneur en phosphate du surnageant est déterminée par colorimétrie par la méthode de **(Fiske et Subarrow, 1925)**, longueur d'onde : 660 ou 700 nm.

Pipeter dans des tubes à essai :

**Expérimental et contrôles :**

5 ml de solution de molybdate

1 ml de surnageant

Lorsque tous les tubes sont préparés, mélanger 1 ml de d'agent réducteur.

**Standard :**

5 ml de solution de molybdate

1 ml de solution étalon de phosphate

Lire la densité optique. Mettre à zéro l'instrument avec le tube préparé à partir du contrôle 2.

$$\frac{E_a - E_c}{E_s} \times [P] \times 2,2 = \mu\text{moles de phosphate libérées lors de la réaction enzymatique}$$

**E<sub>a</sub>** : densité optique du tube expérimental.

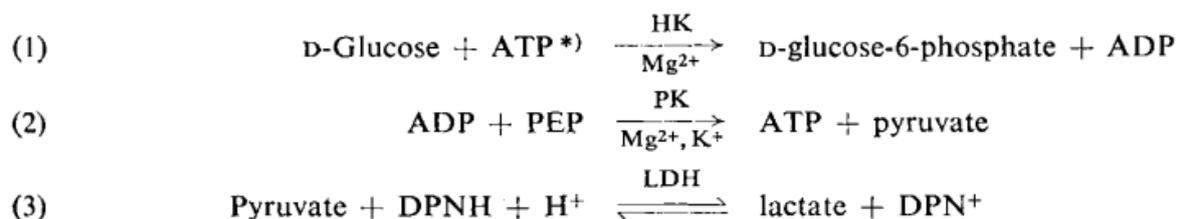
**E<sub>c</sub>** : densité optique du tube témoin 1.

**E<sub>s</sub>** : densité optique du tube standard.

**[P]** : μmoles de phosphate dans le tube standard (0,5 μmoles).

**2,2** : volume du mélange réactionnel enzymatique après addition de la solution d'acide trichloracétique [ml].

L'activité donné au μmoles de phosphate/min./mg de tissu : μmoles de phosphate/15min/mg de tissu du foie.

**2.4.3. Glycogène****Principe**

Dans cette série de réactions, le glucose est phosphorylé avec de l'ATP et des quantités stœchiométriques d'ADP sont formées. L'ADP est converti avec le PEP dans la réaction auxiliaire (2) en ATP et pyruvate, ce dernier étant déterminé au moyen de la diminution de la densité optique lors de l'oxydation de DPNH en DPN (réaction indicatrice 3). En raison des constantes de Michaelis et d'équilibre favorables, toutes les réactions se déroulent quantitativement de gauche à droite selon la méthode de (Morales et al., 1973).

**Réactifs**

Ethanol, 96% (w/v), acid Sulphuric 2 N, Sodium hydroxide 2 N, Potassium hydroxide 30% (w/v), Trichloroacetic acid, Triethanolamine hydrochloride, Phosphoenolpyruvate (PEP), diphosphopyridine nucleotide réduit (DPNH), Potassium chloride, Magnesium sulphate, A. R.,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Adenosine triphosphate (ATP), lactique déshydrogénase (LDH), Pyruvic kinase (PK), Hexokinase (HK),

**Procédure****Traitement préliminaire du matériel expérimental :**

Digestion des tissus, isolement du glycogène et hydrolyse en glucose : dans un tube à centrifuger gradué à 10 ml mélanger 2 ml de KOH 30% 1 ml d'échantillon (tissu homogénéisé, extrait de tissu ou solution déprotéinisée), chauffer 15 min dans un bain-marie bouillant et ajouter 3,5 ml d'éthanol. Portez simplement à ébullition puis laissez refroidir à température ambiante. Centrifuger le précipité contenant le glycogène et laver avec 3 ml d'éthanol. Éliminer les traces d'éthanol du précipité en chauffant au bain-marie, ajouter 2 ml 2  $NH_2SO_4$ . Chauffer 120 min au bain-marie bouillant. Le glycogène est hydrolysé en glucose. Refroidir à température ambiante, et les neutraliser (pH 5-7) avec 2 N NaOH, et diluer à 10 ml avec de l'eau distillée. Utilisez 0,1 ml de cette solution pour la détermination du glucose.

**Déprotéinisation du sang :**

Prélever du sang du bout du doigt d'un sujet à jeun et déprotéiner immédiatement Dans un tube à centrifuger pipeter 0,8 ml d'eau et 0,1 ml d'extrait, bien mélanger, ajouter 0,1 ml de solution d'acide trichloracétique, centrifuger quelques minutes dans une centrifugeuse. Utilisez le surnageant directement pour les mesures. Le tampon est suffisant pour neutraliser l'excès d'acide.

**Mesures spectrophotométriques**

Longueur d'onde : 340 ou 366 nm ; trajet lumineux : 1 cm ; volume final : 3,10 ml ; température ambiante. Lire contre un blanc d'eau.

Pipeter successivement dans la cuvette : 2.53 ml buffer, 0.04 ml PEP solution, 0.06 ml DPNH solution, 0.10 ml. KC1 solution, 0.10 ml  $MgSO_4$  solution, 0.10 ml ATP solution, 0.01 ml LDH suspension, 0.01 ml PK suspension, 0.05 ml HK solution.

Mélanger, laisser reposer 5 min. L'ADP et le pyruvate éventuellement présent sous forme d'impuretés dans les solutions réagissent pendant cette période.

Lire la densité optique Ea Démarrer la détermination du glucose en mélangeant 0,10 ml d'échantillon. La réaction est complète en 10 min. Lire la densité optique Eb.

La correction est faite pour la dilution lors de l'ajout de 0,10 ml d'échantillon :

$$\frac{30}{3,1} \times Ea = Ea, corr = 0,97 Ea$$

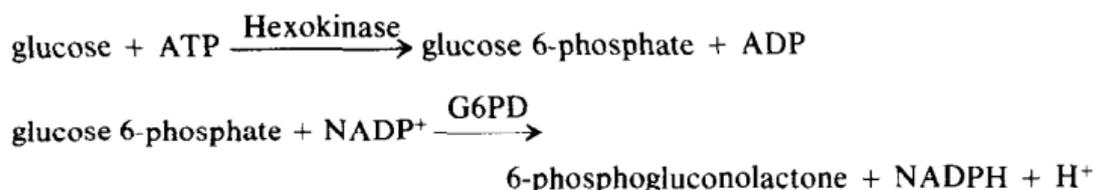
Ceci est utilisé pour calculer les résultats :  $\Delta E = Ea, corr - Eb$

$$\frac{\Delta E \times 180}{6,22 \times 1000} = \text{glycogene du foie (mg/g tissue)}$$

#### 2.4.4. Hexokinase

##### Principe

L'enzyme est quantifiée par la méthode de (**Brandstrup et al., 1957**) par la mesure spectrophotométrique à 340 nm, du NADPH formé mole pour mole avec du glucose 6-phosphate, selon le schéma réactionnel :



##### Réactifs

Tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane, Chlorure de magnésium (42 mmol/litre), Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP', 6,5 mmol/litre), Adénosine 5'-triphosphate (ATP, 42 mmol/litre), Glucose (4,17 mmol/litre), Glucose\_6-phosphate déshydrogénase (25 unités/ml), 6-phosphogluconate (6PGA, 6,75 mmol/litre), 2-mercaptoéthanol (120 mmol/litre).

##### Procédure

Deux tubes (blanc A, et échantillon B) ont été constitués comme indiqué ci-dessous pour chaque échantillon dosé, Après 5 min d'incubation dans un bain-marie à 30°C pour l'équilibrage de la température, 0,05 ml d'échantillon a été pipeté dans chaque tube à des intervalles de temps. L'activité enzymatique a été mesurée en suivant le taux de production de NADPH à 340 nm dans une cuvette de 1 cm à 3°C, pendant 10 min. L'activité 6-phosphogluconate déshydrogénase contaminant a été quantifié en ajoutant un troisième tube

(C) au dosage. Le contenu du tube C est le même que celui du tube B sauf qu'il n'y a pas d'ATP, de glucose ou de glucose 6-phosphate déshydrogénase.

L'activité d'hexokinase a été calculée en utilisant l'expression U/g de tissu :

$$\frac{(\Delta Abs_B - \Delta Abs_A) - (\Delta Abs_C - \Delta Abs_A)}{6,22 \times I} \times 2,5 \times 20 \times 10$$

**U** : activité enzymatique en unités internationales (micromoles de NADPH formées par minute).

**$\Delta Abs_B$**  : le changement d'absorbance par minute dans la cuvette B.

**$\Delta Abs_A$**  : le changement d'absorbance par minute dans la cuvette A.

**$\Delta Abs_C$**  : le changement d'absorbance par minute dans la cuvette C.

**6,22** : L'absorptivité millimolaire du NADH à 340 nm ( $1 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

**I** : épaisseur de trajet optique de la cuve 1 cm.

**2,5** : facteur de correction pour le volume final de la solution.

**20** : facteur de correction pour le volume de l'échantillon (0,05 ml).

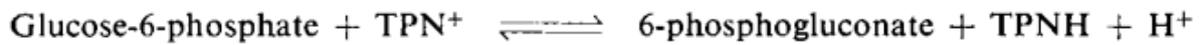
**10** : facteur de correction pour la dilution de l'homogénéisation.

Réactifs	Tube A blanc		Tube B échantillon		Tube C	
	Volume (ml)	Mmol/L	Volume (ml)	Mmol/L	Volume (ml)	Mmol/L
<b>Tris (pH 7.4)</b>	0,6	47	0,6	47	0,6	47
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0,6	10	0,6	10	0,6	10
<b>NADP</b>	0,3	0,8	0,3	0,8	0,3	0,8
<b>ATP</b>	/	/	0,3	5	/	/
<b>Glucose</b>	0,3	0,5	0,3	0,5	/	/
<b>6PGA</b>	/	/	0,1	0,27	0,1	0,27
<b>Mercaptoethanol</b>	0,1	5	0,1	0,5	0,1	5
<b>G6PD (2.5 unités)</b>	0,1	/	0,1	/	/	/
<b>échantillon</b>	0,05	/	0,05	/	0,05	/
<b>L'eau distillé</b>	0,45		0,05		0,75	

### 2.4.5. Glucose-6-phosphate Déshydrogénas

#### Principe

La G6PDH catalyse la réaction :



Le taux de formation de TPNH est une mesure de l'activité enzymatique et il peut être suivi au moyen de l'augmentation de l'absorption à 340 selon la méthode de (**Ellset et Kirkman, 1961**).

#### Réactifs

Glucose-6-phosphate 4.10 M<sup>-2</sup> G-6-P, Nucléotide triphosphopyridine (environ 3.10 M<sup>-2</sup> β-TPN), Triéthanolamine buffer (0.05 M ; pH 7.5), Sodium hydrogen carbonate, NaHCO<sub>3</sub>, EDTA.

#### Procédure

Pipeter successivement dans la cuve 2,40 ml tampon de triéthanolamine, 0,50 ml, surnageant de l'homogénat de foie, Préparer une cuve blanche miter le Triéthanolamine buffer au lieu de la solution TPN et lire contre ce blanc, 0,05 ml de Solution TPN puis incubé pendant 15 min à 35 C°. Attendre une augmentation de densité optique d'environ 0,020, démarrer un chronomètre et lire la densité optique à 2 min. intervalles de 10 min. Calculer le changement de densité optique moyen/min = ΔE/min.

$$\frac{(\Delta E/min)}{1,89 \times I \times mg} \times Vt/Ve \times 1000 = G6PDH UI/mg$$

**1,89** : coefficient d'extinction molaire de TPNH.

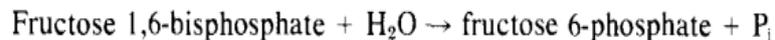
**I** : épaisseur de trajet optique de la cuve 1 cm.

**Vt** : volume totale de la cuve.

**Ve** : volume d'échantillon.

### 2.4.6. Fructose-1,6-bisphosphatase

#### Principe



La fructose-1,6-bisphosphatase catalyse l'hydrolyse de fructose 1,6-bisphosphate en fructose 6-phosphate et  $\text{P}_i$ . L'activité enzymatique peut être déterminée par spectrophotométrie en suivant la vitesse de formation du NADPH à 340 nm en présence d'un excès de glucose-phosphate isomérase et de glucose-6-phosphate déshydrogénase selon la méthode de (**Gancedo et Gancedo, 1971**).

#### Réactifs

Triéthanolamine 0,1 M (PH = 7,5), HCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  0,1 M, Sulfate d'ammonium 1 M, D-Fructose 1,6-bisphosphate, sel tétrasodique (pur à 98-100 %) 2 mM, NADP (pur à 98-100 %) 3mM, EDTA sel disodique 10 mM, Glucose-6-phosphate déshydrogénase et glucose phosphate isomérase dilué à 14 unités/ml chacune avec du Tris-HCl 5 mM, pH 7,5.

#### Procédure

Le mélange d'incubation (1,0 ml) contient du tampon triéthanolamine diéthanolamine 20 mM, pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, sulfate d'ammonium 40 mM, fructose 1,6-bisphosphate 0,15 mM, NADP 0,3 mM, EDTA 0,1 mM, 0,7 unité de glucose-6-phosphate déshydrogénase et glucose phosphate isomérase puis incubé pendant 10 min à 30 C°. La réaction est initiée par l'ajout de 10-20  $\mu\text{l}$  de surnagent hépatique et la formation de NADPH est suivie par spectrophotométrie à 340 nm à 2 min :

$$\frac{(\Delta E/min)}{6,23 \times I \times mg} \times Vt/Ve \times 1000 = \text{fructose - 1,6 - bisphosphatase UI/mg}$$

**6,23.10<sup>3</sup>** : coefficient d'extinction molaire de NADPH.

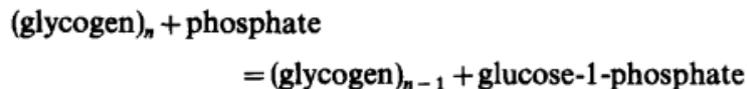
**I** : épaisseur de trajet optique de la cuve 1 cm.

**Vt** : volume totale de la cuve.

**Ve** : volume d'échantillon.

### 2.4.7. Glycogène phosphorylase

#### Principe



Glycogène phosphorylase catalyse l'hydrolyse du glycogène en présence de phosphate en glucose-1-phosphate après l'ajoute du phosphoglucomutase transforme glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate, ce dernier est métabolisé par le glucose-6-phosphatase pour donner glucose et Pi celle-ci est mesuré selon la méthode de (**Cornblath et al., 1963**), consiste à former complexe de phosphomolybdate qui sera réduit par l'acide ascorbique. L'activité enzymatique peut être déterminée par spectrophotométrie en suivant la vitesse de formation du phosphomolybdate à 820 nm.

#### Réactifs

Solution de glycogène, 33 mg /ml. Tampon glycine 0,35 M, pH 8,5. Cystéine 0,03 M, fraîchement préparée et neutralisée. 2,6 mM, NADP (pur à 98-100 %) 3mM, EDTA sel disodique 11 mM, Glucose-6-phosphatase et phosphoglucomutase dilué à 14 unités/ml chacune avec du Tris-HC 12 mM, pH 7,5, (a) Acide ascorbique, 10 %, (b) 0,42 % de molybdate d'ammonium-4 H<sub>2</sub>O dans 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### Procédure

Le mélange d'incubation (2 ml) contient du glycogène 500 µl, pH 7,5, 500 µl de Tampon glycine, solution (a+b) 150 µl, EDTA 250 µl, 0,7 µl de glucose-6-phosphatase et glucose phosphate isomérase puis incubé pendant 15 min à 32 C°. La réaction est initiée par l'ajout de 600 /µl de surnagent hépatique et la formation de phosphomolybdate est suivie par spectrophotométrie à 820 nm à 4 min :

$$\frac{(\Delta E/min)}{2,43 \times I \times mg} \times Vt/Ve \times 1000 = \text{Glycogene phosphorylase UI/mg}$$

**2,43.10<sup>3</sup>** : coefficient d'extinction molaire de NADPH.

**I** : épaisseur de trajet optique de la cuve 1 cm.

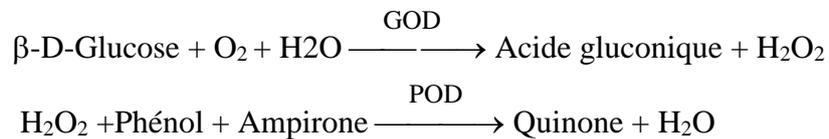
**Vt** : volume totale de la cuve.

**Ve** : volume d'échantillon.

### 2.4.8. Détermination quantitative du glucose

#### Principe

Le glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit, se détache au moyen d'un accepteur chromo génique d'oxygène, de phénol-ampirone en présence de peroxydase (POD) :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de glucose présent dans l'échantillon testé à 550 nm selon la méthode de (**Kaplan, 1984**) réalisé avec le Kit commerciale Spinreact référence (Réf : 1001190).

### 2.4.9. Détermination quantitative d'hémoglobine

#### Principe

L'hémoglobine est oxydée par l'action du ferricyanure en méta hémoglobine et par le cyanure, elle se transforme en cianmétahémoglobine.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration d'hémoglobine présente dans l'échantillon testé à 540 nm selon la méthode (**Franco, 1984**) réalisé avec le Kit commerciale Spinreact référence (Réf : 1001230).

### 2.4.10. Détermination quantitative de l'hémoglobine glyquée (HbA1c)

#### Principe

Cette méthode utilise l'interaction de l'antigène et de l'anticorps pour déterminer directement l'HbA1c dans le sang total. L'hémoglobine totale et l'HbA1c ont le même taux d'absorption non spécifique aux particules de latex. Lorsque l'anticorps monoclonal anti-HbA1c humain de souris est ajouté (R2), un complexe latex-HbA1c-anticorps anti-HbA1c humain de souris se forme. L'agglutination se forme lorsque l'anticorps polyclonal IgG anti-souris de chèvre interagit avec l'anticorps monoclonal. La quantité d'agglutination est proportionnelle à la quantité d'HbA1c absorbée à la surface des particules de latex. La quantité d'agglutination est mesurée en absorbance 660 nm selon la méthode (**Trivelli, 1971**) réalisé avec le Kit commerciale Spinreact référence (Réf : 43099). La valeur HbA1c est obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage.

### 2.4.11. Détermination taux d'insuline

Le taux d'insuline a été mesuré par la méthode d'électro chimiluminescence (**Sapin, 2003**) dans une laboratoire d'analyse biochimique avec le Kit commerciale COBAS.

#### Principe

Méthode « sandwich ». Durée totale du cycle analytique 18 minutes :

- 1ère incubation : dans une prise d'essai de 20 µL, l'échantillon est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique marqué au ruthénium. Il se forme un « sandwich ».
- 2ème incubation : les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

### 2.4.12. Histologie

La réalisation des coupes histologique se fait par la méthode décrit par (**Houlot, 1984**) à laboratoire de cytologie à l'institut louis pasteur.

### 2.4.13. Dosage des protéines

#### Principe

Le test Bradford a été mené selon la méthode décrite par Bradford (**Bradford, 1976**), il est basé sur l'observation que la Coomassie Brilliant Blue G-250 existe sous deux formes de couleurs différentes, rouge et bleu. La forme rouge est convertie en forme bleue lors de la liaison du colorant en protéine dans un milieu acide, intensité de coloration est proportionnelle à la concentration des protéines. Le complexe protéique-colorant a un coefficient d'extinction élevé conduisant ainsi à une grande sensibilité dans la mesure de la protéine.

#### Réactifs

Coomassie Brilliant Blue G-250, 85% acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 95% éthanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), l'eau distillé, BSA (L'albumine de sérum bovin).

### **Procédure**

100 mg coomassie Brilliant Blue G-250 ont été dissous dans 50 ml d'éthanol à 95% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH). Par la suite, 100 ml d'acide phosphorique à 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ont été soigneusement ajoutés sous agitation, avant que H<sub>2</sub>O ne soit ajouté à un volume total de 1 L. La solution a été filtrée et conservée à 4 ° C. Pour les mesures, l'extrait de 100 µl et la solution de Bradford de 5 ml ont été mélangés et incubés pendant 5 min. Une courbe standard a été mis avec BSA (0, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 et 1 g/L) et l'absorbance a été lue à 595 nm.

### **3. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, (n = 6) et (n = 3), La différence entre les groupes a été évaluée par analyse de variance (One Way ANOVA,) suivie d'un test post-hoc de Tukey à l'aide du logiciel Graph Pad prisme 8.0.1., le niveau de signification a été fixé à P <0,05.

## IV. Résultats

## 1. Partie phytochimique

### 1.1. Rendement d'extraction et la teneur en composés phénoliques

L'extraction des flavonoïdes par l'affrontement des différents solvants organiques à partir des jeunes pousses des feuilles des plantes RO et TN montraient que la fraction n-butanolique représente le rendement le plus élevé, suivi de la fraction d'acétate d'éthyle, puis l'éther di-éthylique les résultats ont la même tendance pour les deux plantes (Tableau 03) :

**Tableau 03** : Evaluation du rendement d'extraction, et de la teneur des différentes fractions des extraits du RO et du TN en polyphenols et en flavonoides.

Extraits		Rendement moyen (%)	Polyphénols ( $\mu\text{g}$ équivalent d'acide gallique/mg du M.S)	Flavonoïdes ( $\mu\text{g}$ équivalent de quercétine/mg du M.S)
RO	n-B	27%	$107 \pm 0,24^{bc}$	$88,84 \pm 0,21^{bc}$
	A-E	12%	$56,23 \pm 0,67^{ac}$	$33,16 \pm 0,64^{ac}$
	E- Dié	6%	$27,35 \pm 1,04^{ab}$	$9,76 \pm 0,69^{ab}$
TN	n-B	25%	$84,10 \pm 0,65^{bc}$	$67,98 \pm 0,87^{bc}$
	A-E	9%	$43,6 \pm 0,5^{ac}$	$24,53 \pm 0,98^{ac}$
	E- Dié	5%	$15,76 \pm 0,23^{ab}$	$5,43 \pm 1,07^{ab}$

Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 3), niveau significatif minimal ;  $P < 0,05$ , différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à n-B, <sup>b</sup> par rapport à A-E, <sup>c</sup> par rapport à E-Dié, (ANOVA suivi du test de Tukey), TN ; *Thymus numidicus*, RO ; *Rosmarinus officinalis*, n-B ; n-butanol, A-E ; acétate d'éthyle, E-Dié ; éthyle diéthylique.

#### 1.1.1. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux (PT) de différentes fractions des deux plantes a été estimée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Annexe : figure A). La quantité des polyphénols totaux dans l'extrait est exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par 1 mg d'extrait (mg GAE/mg d'extrait). La fraction n-butanolique de RO est la fraction la plus riche en polyphenols ( $107 \pm 0,24 \mu\text{g GAE/mg Ext}$ ), par rapport aux fractions acétate d'éthyle ( $56,23 \pm 0,67 \mu\text{g GAE/mg}$ ) et éthyl diéthylique ( $27,35 \pm 1,04 \mu\text{g GAE/mg Ext}$ ). Ainsi que la fraction n-butanolique de TN a montré une teneur en polyphenols élevée et équivalente à ( $84,10 \pm 1,509 \mu\text{g GAE/mg Ext}$ ), par rapport à celles de l'acétate d'éthyle ( $43,6 \pm 0,5 \mu\text{g GAE/mg Ext}$ ), et de l'éthyl diéthylique ( $15,76 \pm 0,23 \mu\text{g GAE/mg Ext}$ ) (Tableau 03).

#### 1.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux

La quantité de flavonoides totaux des différentes fractions des deux plantes a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de la quercetine (Annexe : figure B). La teneur en flavonoïdes (Tableau 03) est exprimée en microgramme équivalents de quercétine par

milligramme d'extrait ( $\mu\text{g QE/mg d'extrait}$ ). La fraction n-butanolique du RO représente la teneur la plus élevée ( $88,84 \pm 0,21 \mu\text{g QE / mg Ext}$ ), par rapport a celles de l'acétate d'éthyle ( $33,16 \pm 0,64 \mu\text{g QE / mg Ext}$ ), et l'éthyle diéthylique ( $9,76 \pm 0,69 \mu\text{g QE / mg Ext}$ ), pour la même plante. Alors que la quantification des flavonoides des différentes fractions du TN a montré une richesse de la fraction n-butanolique ( $67,98 \pm 0,87 \mu\text{g QE / mg Ext}$ ), par rapport aux fractions acétate d'éthyle et éthyle diéthylique ( $24,53 \pm 0,98 \mu\text{g QE/ mg d'extrait}$ ), ( $5,43 \pm 1,07 \mu\text{g QE / mg Ext}$ ) respectivement.

### 1.2. Propriété antioxydant

Dans cette étude on a testé le pouvoir antioxydant des différentes fractions des deux plantes par différentes méthodes (DPPH, ABTS, GOR, Superoxyde radical pyrogallol), les résultats ont été présenté dans le (tableau 04) :

**Table 04** : Activité des différentes fractions des extraits du RO et du TN avec différentes méthodes.

Extrait	DPPH IC <sub>50</sub> $\mu\text{g /ml}$	ABTS IC <sub>50</sub> $\mu\text{g /ml}$	GOR IC <sub>50</sub> $\mu\text{g /ml}$	S.P IC <sub>50</sub> $\mu\text{g /ml}$
<b>n-B</b>	$6,223 \pm 0,255^{abc}$	$2,433 \pm 0,146^{ab}$	$3,9 \pm 0,1253^{ab}$	$21,93 \pm 0,533^d$
<b>R.O A-E</b>	$5,762 \pm 0,871^{bc}$	$1,952 \pm 0,825^{abc}$	$2,79 \pm 1,018^{ab}$	$15,54 \pm 0,242^d$
<b>E- Dié</b>	$9,254 \pm 1,341^{abc}$	$4,024 \pm 0,142^{abc}$	$14,083 \pm 1,252^{ab}$	$25,876 \pm 1,25^d$
<b>n-B</b>	$6,930 \pm 0,185^{abc}$	$2,967 \pm 0,164^{abc}$	$4,283 \pm 0,0961^{ab}$	$24,08 \pm 0,703^d$
<b>T.N A-E</b>	$6,216 \pm 0,654^{abc}$	$2,071 \pm 0,921^{abc}$	$3,412 \pm 0,915^a$	$17,265 \pm 0,263^d$
<b>E- Dié</b>	$11,891 \pm 1,025^{abc}$	$8,287 \pm 0,21^{abc}$	$16,744 \pm 1,12^{ab}$	$28,232 \pm 1,654^d$
<b>BHA</b>	$5,750 \pm 0,091$	$1,06 \pm 0,0361$	$5,39 \pm 0,0264$	Nt
<b>BHT</b>	$4,480 \pm 0,046$	$1,617 \pm 0,031$	$3,333 \pm 0,0513$	Nt
<b><math>\alpha</math>-Tocophérol</b>	$7,453 \pm 0,463$	$2,643 \pm 0,136$	Nt	Nt
<b>A. ascorbique</b>	Nt	Nt	Nt	$12,16 \pm 0,6413$

Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 3), niveau significatif minimal ; P<0,05, différence significative ; <sup>a</sup> par rapport BHA, <sup>b</sup> par rapport à BHT, <sup>c</sup> par rapport à  $\alpha$ -Tocophérol, <sup>d</sup> par rapport à A. ascorbique, (ANOVA suivi du test de Tukey), TN ; *Thymus numidicus*, RO ; *Rosmarinus officinalis*, n-B ; n-butanol, A-E ; acétate d'éthyle, E-Dié ; éthyle diéthylique, BHA ; butylated hydroxylanisole, BHT ; butylated hydroxy toluène, Nt ; non testé.

Nos résultats de la méthode DPPH ont montrés que l'extrait acétate d'éthyle de la plante R.O a présenté le plus haut potentiel d'activités antioxydantes entre les extraits de la plante R.O et les autres extraits de la plante T.N avec une IC50 :  $(5,762 \pm 0,871 \mu\text{g} / \text{ml})$  plus forte que celui qui le possèdent  $\alpha$ -Tocophérol IC50 :  $(7,45 \pm 0,46 \mu\text{g} / \text{ml})$  ce là ce qui confirme le facteur d'inhibition (IF IC50 : 1,3), ensuite pas de différence significative avec l'activité qui le possède BHA IC50 :  $(5,750 \pm 0,091 \mu\text{g} / \text{ml})$   $P = 0,23$  donc nous les considérons égaux, et une activité moins puissante avec celui qui possèdent BHT IC50 :  $(4,480 \pm 0,046 \mu\text{g} / \text{ml})$  avec une différence significative  $P < 0,05$ .

Le T.N a démontré une activité antioxydante d'extrait d'acétate d'éthyle moins que R.O IC50 :  $(6,93 \pm 0,19 \mu\text{g} / \text{ml})$  mais avec la même tendance de R.O elle est plus élevée que les autres extraits de T.N, et avec un pouvoir plus puissant à celui qui possèdent  $\alpha$ -Tocophérol  $P < 0,05$  et un pouvoir moins puissant avec celui qui les possède BHT et BHA respectivement,  $P < 0,05$ .

Même tendance aux résultats d'ABTS que la même fraction d'acétate d'éthyle de R.O a démontré la plus forte activité antioxydante IC50 :  $(1,952 \pm 0,825 \mu\text{g} / \text{ml})$  plus puissant à celui qui le possèdent  $\alpha$ -Tocophérol IC50 :  $(2,64 \pm 0,14 \mu\text{g} / \text{ml})$   $P < 0,05$  et cela ce qui confirme le facteur d'inhibition (IF IC50 : 1,35), ensuite avec un pouvoir moins puissant comparant au BHT et BHA respectivement IC50 :  $(1,62 \pm 0,03$  et  $1,06 \pm 0,04 \mu\text{g} / \text{ml})$   $P < 0,05$ . Comparant l'activité antioxydante de T.N au R.O a été démontré moins puissante IC50 :  $(2,071 \pm 0,921 \mu\text{g} / \text{ml})$  mais plus élevée à l'activité antioxydante d'  $\alpha$ -Tocophérol  $P < 0,05$  ce qui confirme le facteur d'inhibition (IF IC50 : 1,28) ensuite avec un pouvoir moins puissant comparant aux BHT et BHA  $P < 0,05$ .

De plus avec le radical galvinoxyl (GOR) on a constaté que les 2 extraits d'acétate d'éthyle de R.O et T.N ont démontré une activité antioxydante IC50 :  $(2,79 \pm 1,018$  et  $3,412 \pm 0,915 \mu\text{g} / \text{ml})$  plus puissante qui le possède BHA IC50 :  $(5,39 \pm 0,03 \mu\text{g} / \text{ml})$  avec une différence très hautement significative  $P < 0,05$  et  $P < 0,05$  respectivement et cela a été confirmé par IF IC50 : ( R.O = 1,93 et T.N = 1,58), avec même tendance par rapport aux activités précédentes elle est plus puissante que les autres fractions. L'activité antioxydante d'extrait d'A-E de R.O est plus puissant comparue au BHT IC50 :  $(3,33 \pm 0,05 \mu\text{g} / \text{ml})$   $P < 0,05$  et c'est ce que confirme le (IF IC50 : 1,19), par contre l'activité d'A-E de T.N elle est égale à celui qui le possède le BHT et c'est ce que confirme (IF IC50 : 0,98).

Concernant les résultats de radical superoxyde pyrogallol scavenging les deux extraits d'acétate d'éthyle de R.O et T.N ont démontré une activité antioxydante modérés IC50 :  $(15,54 \pm 0,242$  et  $17,265 \pm 0,263 \mu\text{g} / \text{ml})$ , comparue à celui que possédait l'acide ascorbique IC50 :

---

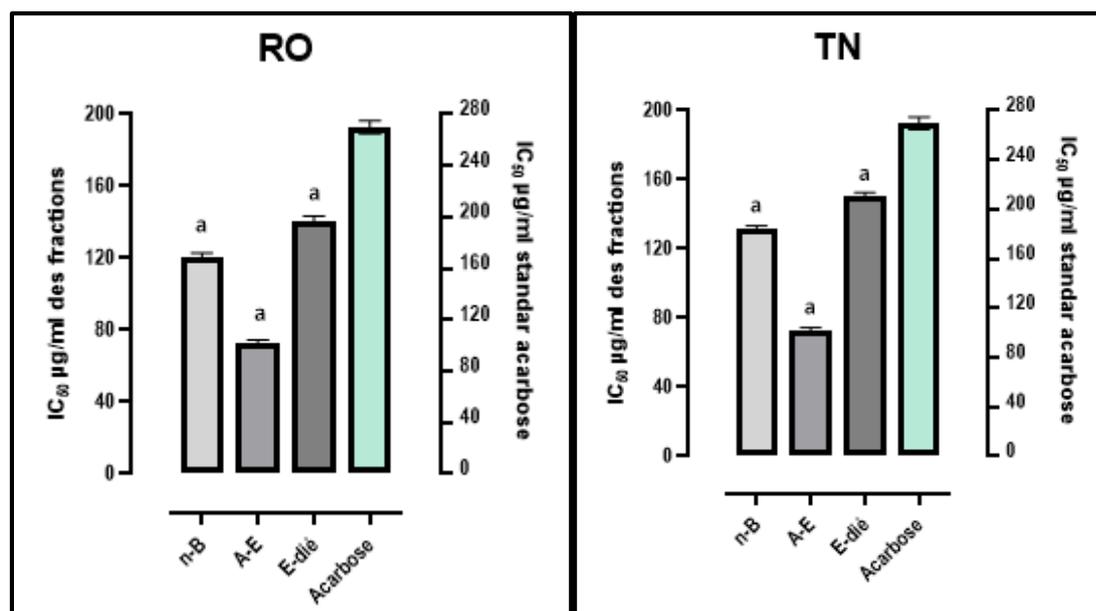
Contribution à l'évaluation de l'effet de *Thymus numidicus* et de *Rosmarinus officinalis* sur le diabète alloxanique chez les rats

( $12,16 \pm 0,64 \mu\text{g} / \text{ml}$ )  $P < 0,05$ , ils ont eu plus de 50 % d'activité d'acide ascorbique et ce qui confirme (IF IC<sub>50</sub> : 0,78) de R.O et (IF IC<sub>50</sub> : 0,7) de T.N, mais ces extraits ont toujours plus de pouvoirs antioxydants par rapport à ceux qui possèdent les autres fractions.

### 1.3. Activité antidiabétique

L'évaluation de pouvoir d'inhibition d' $\alpha$ -Amylase et de la glycation des protéines par les extraits des plantes R.O et T.N n'a pas été étudiée auparavant pour certaines fractions, pour cet objectif l'activité antidiabétique de ces fractions aura une grande importance.

#### 1.3.1. Test d'inhibition $\alpha$ -Amylase

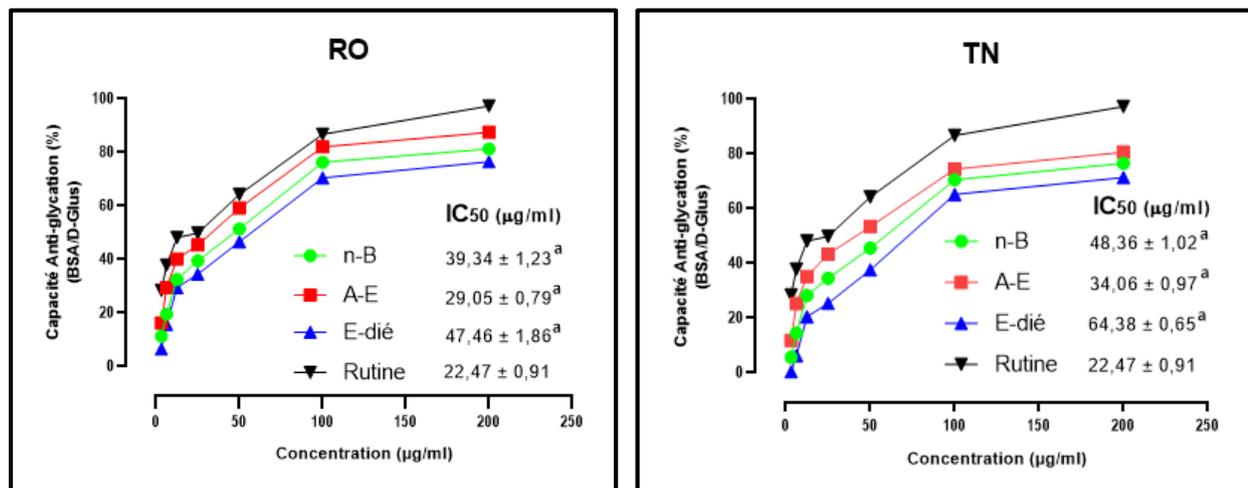


**Figure 13 :** Test d'inhibition d'activité  $\alpha$ -Amylase des différentes fractions des plantes RO et TN. Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 3), niveau significatif minimal ;  $P < 0,05$ , différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à Acarbose, TN ; *Thymus numidicus*, RO ; *Rosmarinus officinalis*, n-B ; n-butanol, A-E ; acétate d'éthyle, E-Dié ; éthyle diéthylique, Acarbose ; standard

Comme ce que démontre la (figure 13) les extraits d'R.O et T.N ont été testés en 2 mg/ml, la fraction A-E de ces plantes elle a montré un pouvoir d'inhibition IC<sub>50</sub> : ( $73,2 \pm 1,44$  et  $72,6 \pm 1,22 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) très important et plus puissant plus de 3 fois que le standard acarbose IC<sub>50</sub> : ( $269,8 \pm 4,99 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) avec une différence significative  $P < 0,05$  et c'est ce qui confirme le facteur d'inhibition IF IC<sub>50</sub> : (R.O = 3,69 et T.N = 3,71), il faut noter qu'il n'y a pas de différence entre les deux extraits  $P = 0,58$ .

### 1.3.2. Test anti-glycation

Evaluation de pouvoir anti-glycation pour les extraits de R.O et T.N ont démontré que la fraction acétate d'éthyle de ces plantes porte une puissance d'inhibition très intéressante  $IC_{50}$  : ( $29,05 \pm 0,79$  et  $34,06 \pm 0,97 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) mais moins que le standard ; Rutine  $IC_{50}$  : ( $22,47 \pm 0,91 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) avec une différence significative  $P < 0,05$  :



**Figure 14 :** Effet des différentes fractions de la plante R.O et T.N sur la glycation de protéine. Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 3), niveau significatif minimal ;  $P < 0,05$ , différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à Rutine, TN ; *Thymus numidicus*, RO ; *Rosmarinus officinalis*, n-B ; n-butanol, A-E ; acétate d'éthyle, E-Dié ; éthyle diéthylique, Rutine ; standard.

### 1.4. Test anti-Alzheimer

Cette étude a été exposée pour la première fois le pouvoir inhibiteur des extraits de différentes fractions de la plante RO et TN sur l'acétylcholinestérase, il a été démontré que la fraction acétate d'éthyle avéré une activité la plus puissante parmi les autres fractions avec une  $IC_{50}$  : ( $27,54 \pm 1,54$  et  $34,87 \pm 1,41 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) successivement, mais moins puissant que le standard galanthamine  $IC_{50}$  : ( $6,25 \pm 1,15 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), avec une différence significative  $P < 0,05$  et ce qui confirme le facteur d'inhibition ( $IF_{IC_{50}}$  : 0,26) de RO et ( $IF_{IC_{50}}$  : 0,2) de TN, comparant l'extrait A-E de T.N au R.O ce dernier porte un pouvoir d'inhibition plus puissant avec une différence significative  $P < 0,05$ , (tableau 05).

D'après ces résultats on a choisi l'extrait de la fraction d'acétate d'éthyle de ces plantes pour les prochaines tests d'investigation in vivo en raison ils ont montré des pouvoirs d'activité biologique important.

**Table 05** : Activité anti-Acétylcholinestérase des différentes fractions de la plante R.O et T.N.

	Extrait	IC <sub>50</sub> µg / ml	Facteur d'inhibition (IF <sub>IC50</sub> )
R.O	n-B	32,76 ± 0,542 <sup>a</sup>	0,22
	A-E	27,21 ± 1,54 <sup>a</sup>	0,26
	E- Dié	39,26 ± 1,97 <sup>a</sup>	0,18
T.N	n-B	38,65 ± 0,78 <sup>a</sup>	0,18
	A-E	34,87 ± 1,41 <sup>a</sup>	0,2
	E- Dié	45,26 ± 0,37 <sup>a</sup>	0,16
	Galanthamine	7,05 ± 0,801	1

Les valeurs ont été exprimées en moyennes ± SEM (n = 3), niveau significatif minimal ; P<0,05, différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à Galanthamine, (ANOVA suivi du test de Tukey), TN ; *Thymus numidicus*, RO ; *Rosmarinus officinalis*, n-B ; n-butanol, A-E ; acétate d'éthyle, E-Dié ; éthyle diéthylique.

## 2. Etude *in vivo*

### 2.1. Activité anti-hyperglycémique de R.O-EA et T.N-EA chez des animaux normaux chargés en glucose

**Table 06** : Activité anti-hyperglycémique de RO-EA et TN-EA chez des animaux normaux chargés de glucose.

Traitement groups (mg/kg p.c)	Concentration de glucose dans le sang (mg/dl)				
	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
N.Controle	84,35±1,367	130,3±1,528 <sup>b</sup>	109,5±1,515 <sup>b</sup>	84,30±1,399 <sup>b</sup>	82,15±1,412 <sup>b</sup>
N+(Gliben 5)	82,26±1,425	86,32±1,482 <sup>a</sup>	73,54±1,721 <sup>a</sup>	61,37±1,469 <sup>a</sup>	57,28±1,401 <sup>a</sup>
N+TN-AE 150	84,23±1,408	116,4±0,988 <sup>ab</sup>	104,7±0,710 <sup>ab</sup>	92,37±1,446 <sup>ab</sup>	89,53±0,786 <sup>ab</sup>
N+TN-AE 300	86,26±0,573	95,36±1,476 <sup>ab</sup>	86,23±1,380 <sup>ab</sup>	73,39±0,784 <sup>ab</sup>	71,63±0,502 <sup>ab</sup>
N+RO-AE 150	85,50±0,625	102,7±1,459 <sup>ab</sup>	95,31±0,732 <sup>ab</sup>	82,52±1,570 <sup>ab</sup>	70,53±0,809 <sup>ab</sup>
N+RO-AE 300	82,67±1,585	91,28±0,882 <sup>ab</sup>	79,37±1,635 <sup>ab</sup>	66,37±0,793 <sup>ab</sup>	59,35±0,456 <sup>ab</sup>

Les valeurs ont été exprimées en moyennes ± SEM (n =6), niveau significatif minimal ; P<0,05, différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Témoin, <sup>b</sup> par rapport à N+Gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normal, Gliben ; glibenclamide, TN ; *Thymus numidicus*, RO ; *Rosmarinus officinalis*, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.

Les rats ont reçu ces extraits à différentes doses, après 30 min d'administration de glucose on a observé une augmentation de la glycémie dans différents groupes, le groupe témoin a atteint le niveau de glycémie à jeun en 2 heures, par contre dans les groupes traités avec le glibenclamide et l'extrait de RO-EA et TN-EA à une dose de 300 mg/kg de poids corporel ont été atteints de manière significative à la fin de la 1ère heure par rapport à la dose de 150 mg/kg de poids corporel (après 2 heures), en comparant les pouvoirs anti-hyperglycémiques de ces extraits avec le glibenclamide, l'extrait de RO-EA à la dose de 300 mg/kg p.c. s'est révélée être significativement  $P < 0,05$  très proche du glibenclamide (Tableau 06).

## 2.2. Activité hypoglycémiante de RO-EA et TEA chez des animaux normaux à jeun

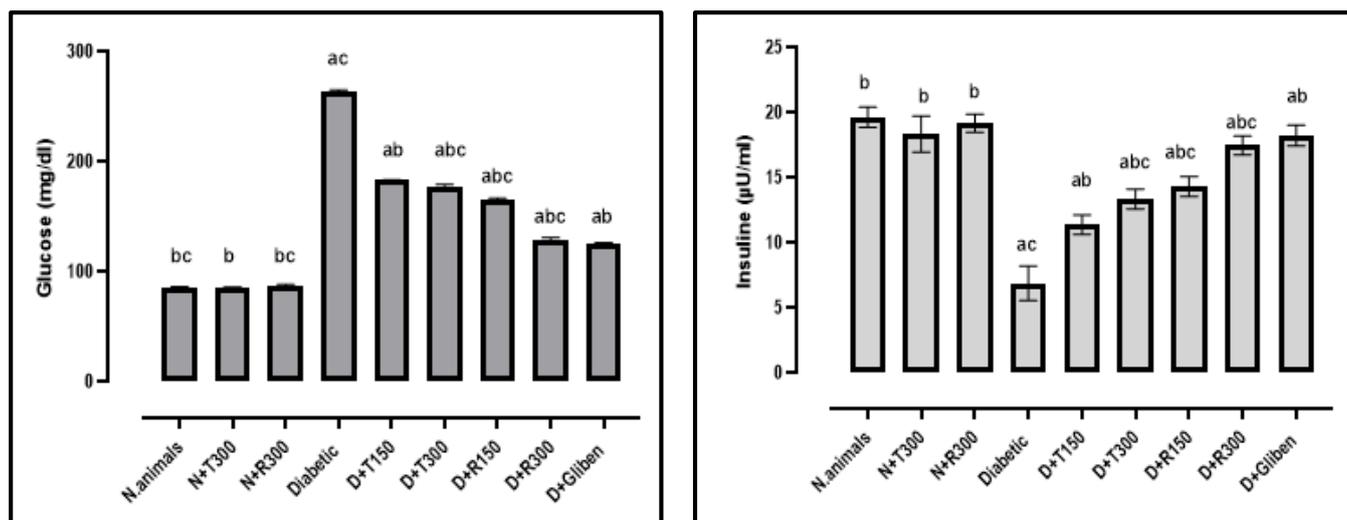
L'évaluation de l'activité hypoglycémiante a clairement montré que l'extrait de la fraction RO-EA présenté une activité hypoglycémiante très significative par rapport au groupe témoin, est significativement fort  $p < 0,05$  à la dose 300 mg/kg p.c. par rapport à la dose 150 mg /kg de poids corporel, cette activité est dose-dépendante, a été observée après les 1ère 30 min, par contre avec l'extrait de la fraction TN-EA aucune activité hypoglycémiante n'a été enregistrée avec les deux-doses, pas de différence significative  $p \geq 0,05$  par rapport au groupe témoin (tableau 07).

**Table 07 :** Activité hypoglycémiante de RO-EA et TN-EA chez des animaux normaux à jeun.

Traitement groups (mg/kg p.c)	Concentration de glucose dans le sang (mg/dl)				
	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
N.Controle	84,41±1,991	82,97±1,162 <sup>b</sup>	83,45±0,849 <sup>b</sup>	81,19±1,551 <sup>b</sup>	83,47±1,913 <sup>b</sup>
N+(Gliben 5)	81,45±0,822	47,22±0,708 <sup>a</sup>	34,27±1,512 <sup>a</sup>	31,35±0,792 <sup>a</sup>	32,41±1,435 <sup>a</sup>
N+TN-AE 150	82,34±1,441	81,31±1,454 <sup>b</sup>	83,31±0,567 <sup>b</sup>	80,22±0,711 <sup>b</sup>	81,38±3,401 <sup>b</sup>
N+TN-AE 300	81,37±1,476	83,53±0,7489 <sup>b</sup>	83,38±0,726 <sup>b</sup>	80,38±1,467 <sup>b</sup>	80,36±0,601 <sup>b</sup>
N+RO-AE 150	82,43±0,697	74,33±1,419 <sup>ab</sup>	67,35±0,765 <sup>ab</sup>	63,03±1,123 <sup>ab</sup>	59,35±1,501 <sup>ab</sup>
N+R.O-AE 300	83,40±1,170	67,33±1,347 <sup>ab</sup>	59,50±1,448 <sup>ab</sup>	51,51±1,256 <sup>ab</sup>	45,27±2,236 <sup>ab</sup>

Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n =6), niveau significatif minimal ;  $P < 0,05$ , différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Témoin, <sup>b</sup> par rapport à N+Gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normal, Gliben ; glibenclamide, TN ; *Thymus numidicus*, RO ; *Rosmarinus officinalis*, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.

### 2.3. Effet dose-dépendant des extraits RO-AE et TN-AE sur la glycémie et le taux d'insuline chez le rat diabétique



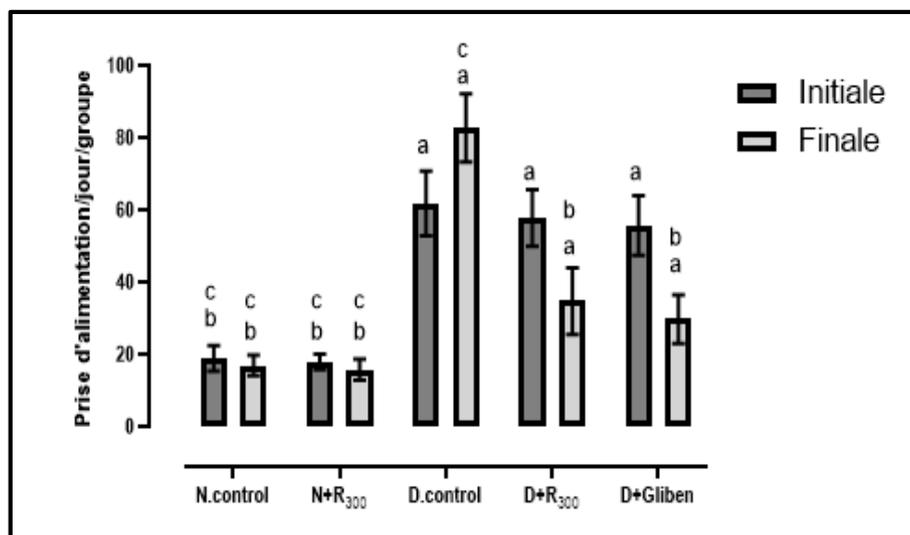
**Figure 15 :** Effet dose-dépendant de l'extrait RO-AE et TN-AE sur le taux plasmatique de glucose et d'insuline chez les rats diabétiques. Les valeurs ont été exprimées en tant que moyennes  $\pm$  SEM (n = 6), niveau significatif minimal ;  $P < 0,05$ , différence significative ; <sup>a</sup> en ce qui concerne N. Control, <sup>b</sup> en ce qui concerne controle Diabétique, <sup>c</sup> en ce qui concerne D+gliben, (ANOVA suivi avec le test de Tukey), N ; normale, Gliben ; glibenclamide, TN ; *Thymus numidicus*, R.O ; *Rosmarinus officinalis*, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.

L'analyse des résultats a montré une augmentation significative du niveau de glucose sérique et une diminution significative du niveau d'insuline plasmatique chez les rats témoins diabétiques. Après 21 jours de traitement avec l'extrait de fraction RO-AE et TN-AE, les rats ont montré une bonne amélioration, il a empêché l'augmentation du glucose plasmatique et inversé le taux d'insuline sérique par rapport au contrôle du rat diabétique, de plus, il a été observé que la dose de 300 mg/kg de poids corporel de la fraction RO-EA était plus prometteuse par rapport à l'autre dose et à l'autre fraction (TN-AE), elle prévenait significativement l'augmentation du glucose et la diminution de l'insuline, il a été observé que l'effet de cette dose la plus proche du glibenclamide, cette dose a été fixée comme dose efficace pour la suite de notre étude. En ce qui concerne l'administration d'extrait de fraction RO-EA et TN-EA à des rats normaux, aucun changement significatif n'a été observé dans les taux d'insuline et de glucose sérique par rapport aux rats témoins normaux.

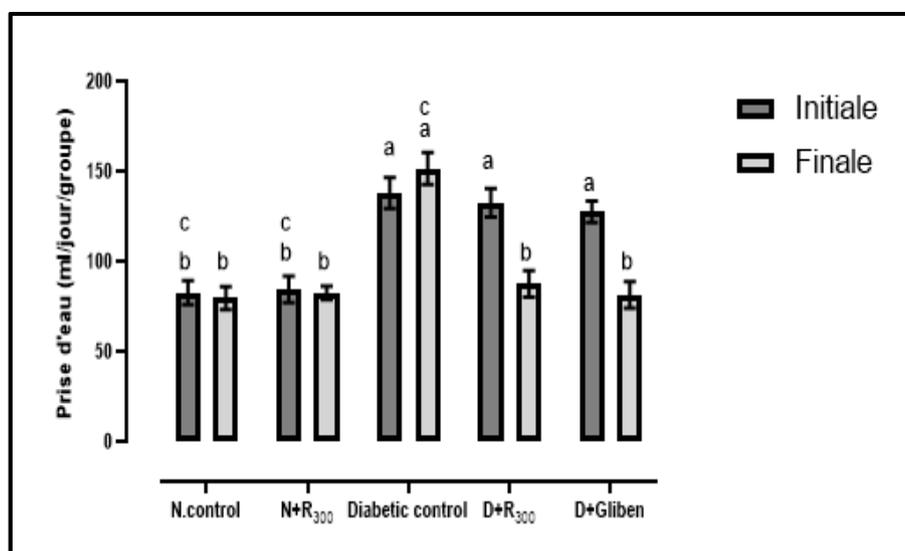
### 2.4. Effets de l'extrait de la fraction R.O-EA sur le changement du poids corporel, et la consommation d'eau et de nourriture

L'évaluation des résultats a montré une diminution significative du poids corporel chez les rats témoins diabétiques, et une augmentation significative de la consommation d'eau et de nourriture, par rapport aux rats normaux, tous ces changements ont été significativement

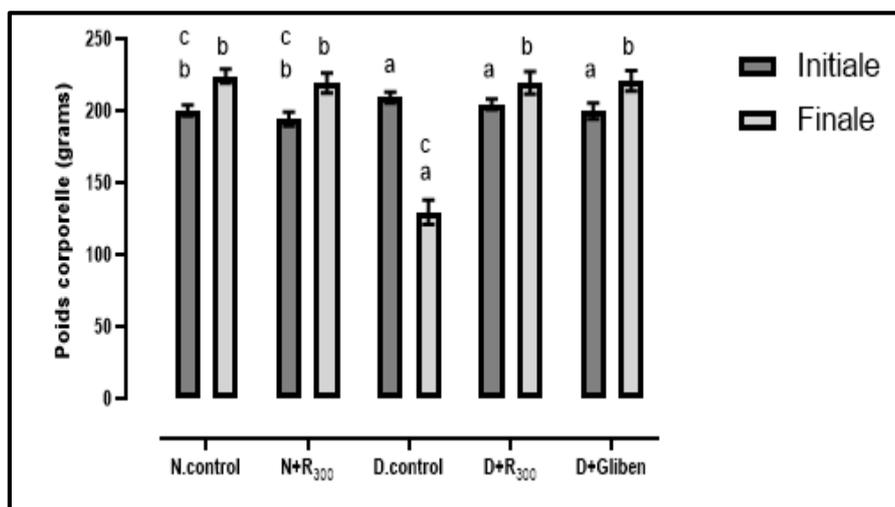
restaurés lors du traitement avec l'extrait de la fraction RO-AE et le glibenclamide, concernant les rats témoins normaux et les rats normaux traités avec la fraction RO-AE aucun changement significatif n'a été observé entre eux (Fig. 16. 17. 18).



**Figure 16 :** Effet de RO-EA sur la prise alimentaire chez les rats témoins et expérimentaux. Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 6), niveau significatif minimal ;  $P < 0,05$ , différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Control, <sup>b</sup> par rapport à contrôle Diabétique, <sup>c</sup> par rapport à D+gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normale, D ; diabétique, Gliben ; glibenclamide, RO ; Rosmarinus officinalis, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.



**Figure 17 :** Effet de RO-AE sur la consommation d'eau chez les rats témoins et expérimentaux. Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 6), niveau significatif minimal ;  $P < 0,05$ , différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Control, <sup>b</sup> par rapport à contrôle Diabétique, <sup>c</sup> par rapport à D+gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normale, D ; diabétique, Gliben ; glibenclamide, RO ; Rosmarinus officinalis, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.



**Figure 18 :** Effet de RO-AE sur le poids corporel chez les rats témoins et expérimentaux. Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 6), niveau significatif minimal ; P<0,05, différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Control, <sup>b</sup> par rapport à contrôle Diabétique, <sup>c</sup> par rapport à D+gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normale, D ; diabétique, Gliben ; glibenclamide, RO ; Rosmarinus officinalis, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.

### 2.5. Effet de la fraction RO-EA sur le taux d'Hb et d'HbA1c

Le tableau 08 résume les taux sanguins d'Hb et d'HbA1c chez les rats témoins et expérimentaux, il ressort de ce tableau que les rats diabétiques ont subi une diminution significative du taux d'Hb et une augmentation significative du taux d'HbA1c par rapport aux rats témoins normaux, après traitement avec la fraction extrait RO-AE et le glibenclamide il a été observé une bonne amélioration chez les rats diabétiques, le taux sanguin d'Hb et d'HbA1c a été restauré, aucune différence significative n'a été observée chez les rats normaux traités avec la fraction RO-AE à la dose de 300 mg/kg de poids corporel par rapport aux rats témoins normaux.

**Table 08 :** Effet de la fraction RO-AE sur le taux d'Hb et d'HbA1c.

Groupes	Hb (g/dl)	HbA1c (% Hb)
<b>Normale contrôle</b>	14,43 $\pm$ 1,61 <sup>b</sup>	5,554 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup>
<b>N+RO-EA 300 mg/kg p.c</b>	15,59 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup>	5,480 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>
<b>contrôle Diabétique</b>	6,418 $\pm$ 1,51 <sup>a c</sup>	12,36 $\pm$ 1,46 <sup>a c</sup>
<b>D+RO-EA 300 mg/kg p.c</b>	12,50 $\pm$ 0,79 <sup>b</sup>	7,544 $\pm$ 2,12 <sup>b</sup>
<b>D+Gliben 5 mg/kg p.c</b>	12,88 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>	6,246 $\pm$ 1,57 <sup>b</sup>

Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 6), niveau significatif minimal ; P < 0,05, différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Control, <sup>b</sup> par rapport à contrôle Diabétique, <sup>c</sup> par rapport à D+gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normale, D ; diabétique, Gliben ; glibenclamide, RO ; Rosmarinus Officinalis, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.

## 2.6. Effet de l'extrait de fraction RO-EA sur les activités des enzymes de métabolisme glucidiques

**Tableau 09 :** Effet de l'extrait de fraction RO-EA sur les activités de l'hexokinase, de la glucose-6 phosphate déshydrogénase, de la glucose-6-phosphatase, du fructose-1, 6-bisphosphatase, dans le foie des animaux témoins et expérimentaux.

Groups	Hexokinase (unit/g protein)	Glucose-6 phosphate Dehydrogenase ( $\times 10^{-4}$ mL U/mg)	Glucose-6- phosphatase (unit/min/mg protein)	Fructose-1, 6-bisphosphatase (unit/h/mg protein)
<b>Normale contrôle</b>	163,3 $\pm$ 6,05	3,870 $\pm$ 0,18	0,2054 $\pm$ 0,012	5,095 $\pm$ 0,69
<b>N+RO-EA 300 mg/kg p.c</b>	159,7 $\pm$ 5,09	3,950 $\pm$ 0,14	0,2210 $\pm$ 0,016	5,149 $\pm$ 0,78
<b>Contrôle Diabétique</b>	111,1 $\pm$ 3,81 <sup>b</sup>	1,300 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>	0,5432 $\pm$ 0,019 <sup>b</sup>	11,27 $\pm$ 0,81 <sup>b</sup>
<b>D+RO-EA 300 mg/kg p.c</b>	149,5 $\pm$ 5,41 <sup>c</sup>	3,040 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	0,3274 $\pm$ 0,024 <sup>c</sup>	7,778 $\pm$ 0,71 <sup>c</sup>
<b>D+Gliben 5 mg/kg p.c</b>	153,2 $\pm$ 2,23 <sup>d</sup>	3,360 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup>	0,3072 $\pm$ 0,017 <sup>d</sup>	7,048 $\pm$ 0,95 <sup>d</sup>

Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 6), niveau significatif minimal ; P < 0,05, différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Control vs N+RO-EA, <sup>b</sup> par rapport à N. control vs contrôle Diabétique, <sup>c</sup> par rapport à contrôle Diabétique vs D+RO-EA, <sup>d</sup> par rapport à contrôle Diabétique vs D+Gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normale, D ; diabétique, Gliben ; glibenclamide, RO ; Rosmarinus Officinalis, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.

L'analyse des résultats du (tableau 09) qui montre l'effet de l'extrait de la fraction RO-AE sur l'activité des enzymes du métabolisme glucidique dans le foie des rats témoins et expérimentaux, il a été constaté chez les rats diabétiques une diminution significative de l'hexokinase et du glucose -6-phosphate déshydrogénase et une augmentation significative de l'activité glucose-6-phosphatase et fructose-1,6-bisphosphatase par rapport aux rats normaux, il a été noté que cette activité revenait presque à la normale lors de l'application d'un traitement avec l'extrait de fraction RO-AE et la même chose a également été observée avec le médicament glibenclamide. Aucune différence significative n'a été remarquée chez les rats normaux traités avec RO-AE par rapport aux rats normaux.

## 2.7. Effet de l'extrait de fraction RO-AE sur la teneur en glycogène, la glycogène synthase, la glycogène phosphorylase et le poids du foie

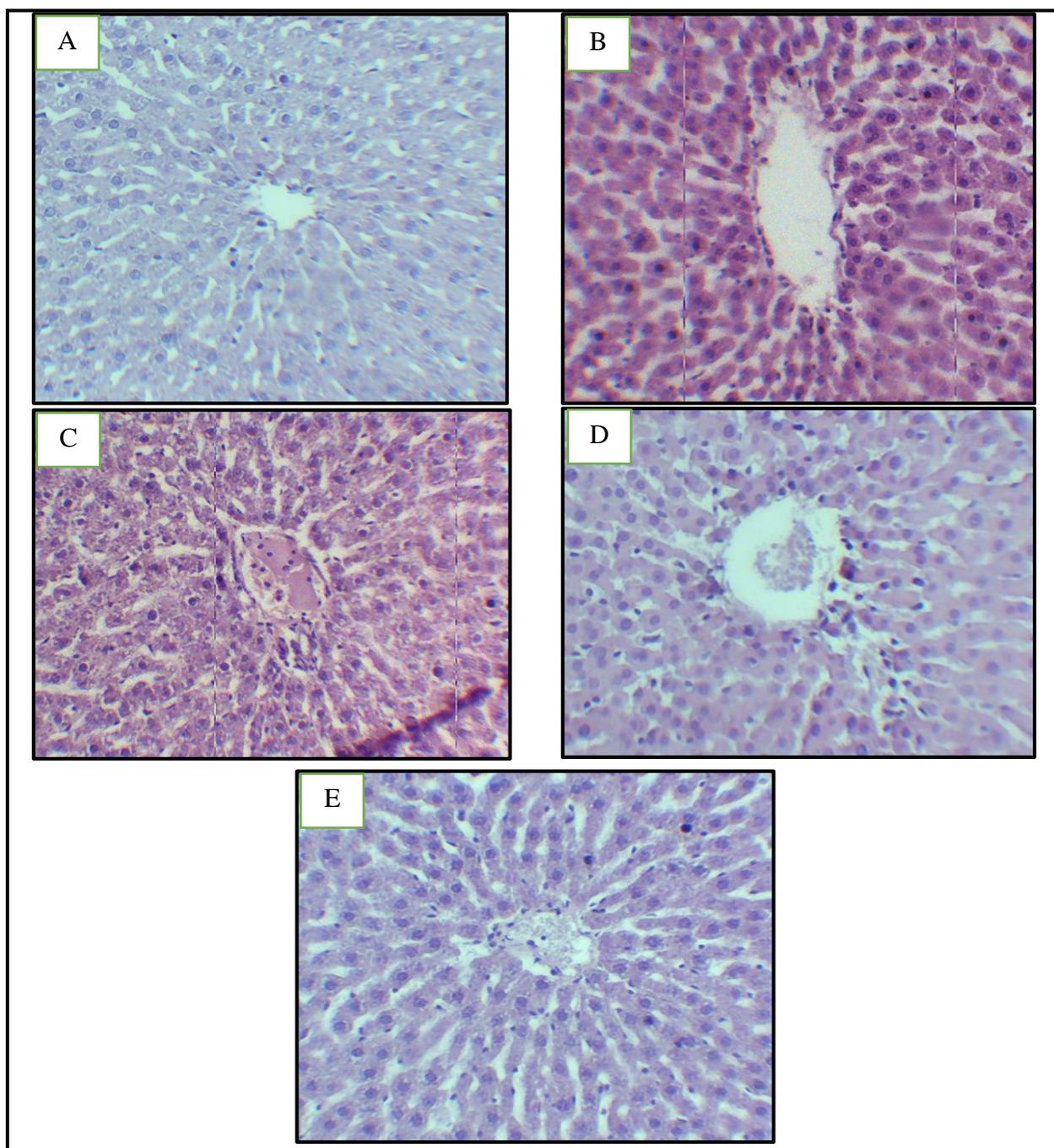
**Tableau 10 :** Effet de l'extrait de fraction RO-EA sur la teneur en glycogène, la glycogène synthase, la glycogène phosphorylase et le poids du foie.

Groups	Glycogen synthase ( $\mu$ moles of UDP formed/ h/mg protein)	Glycogen phosphorylase ( $\mu$ moles Pi liberated/h/mg protein)	Glycogène Hépatique (mg/g tissue)	Poids Hépatique (g)
Normale contrôle	694,6 $\pm$ 26,36	535,6 $\pm$ 20,94	65,37 $\pm$ 2,46	14,45 $\pm$ 2,61
N+RO-EA 300 mg/kg p.c	700,5 $\pm$ 27,17	543,0 $\pm$ 12,28	66,45 $\pm$ 3,47	13,59 $\pm$ 1,68
Contrôle Diabétique	352,4 $\pm$ 21,25 <sup>b</sup>	791,7 $\pm$ 12,05 <sup>b</sup>	33,75 $\pm$ 1,66 <sup>b</sup>	6,504 $\pm$ 1,69 <sup>b</sup>
D+RO-EA 300 mg/kg p.c	612,0 $\pm$ 19,38 <sup>c</sup>	601,7 $\pm$ 16,08 <sup>c</sup>	58,66 $\pm$ 3,49 <sup>c</sup>	11,48 $\pm$ 2,56 <sup>c</sup>
D+Gliben 5 mg/kg p.c	622,2 $\pm$ 23,57 <sup>d</sup>	595,6 $\pm$ 11,11 <sup>d</sup>	60,50 $\pm$ 2,68 <sup>d</sup>	12,74 $\pm$ 2,57 <sup>d</sup>

Les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 6), niveau significatif minimal ; P < 0,05, différence significative ; <sup>a</sup> par rapport à N. Control vs N+RO-EA, <sup>b</sup> par rapport à N. control vs contrôle Diabétique, <sup>c</sup> par rapport à contrôle Diabétique vs D+RO-EA, <sup>d</sup> par rapport à contrôle Diabétique vs D+Gliben, (ANOVA suivi du test de Tukey), N ; normale, D ; diabétique, Gliben ; glibenclamide, RO ; Rosmarinus Officinalis, AE ; fraction d'acétate d'éthyle.

Le tableau 10 résume les variations du poids du foie, de la teneur en glycogène et de l'activité enzymatique de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase chez les rats témoins et expérimentaux. Une diminution significative du poids du foie, du taux de glycogène et de l'activité de la glycogène synthase a été observée chez les rats diabétiques, par contre l'activité de la glycogène phosphorylase a été augmentée de manière significative par rapport aux rats normaux, de sorte que ces paramètres modifiés ont été restaurés presque à la normale lors du traitement avec l'extrait de fraction RO-AE et la même chose a été observée avec le médicament glibenclamide, aucune différence significative n'a été observée chez les rats normaux par rapport aux rats normaux traités.

## 2.8. Etude histomorphométrique du foie



**Figure 19 :** Coupe histologique du foie de différents groupes après 21 jours de traitement (40×). (A) ; contrôle normal, (B) ; rat normale + R0-AE 300 mg/kg p. c) ; contrôle diabétique, (D) ; rats diabétiques + R0-AE 300 mg/kg b. w, (E) ; rats diabétiques + glibenclamide 5 mg/kg p. c.

La figure 46 représente des coupes histologiques de la coloration H & E du tissu hépatique, après 21 jours de traitement chez des rats témoins et expérimentaux, les rats normaux représentent une architecture normale de l'hépatocyte, du noyau, des sinusoides et des veines centrales (A), les rats diabétiques ont montré une altération de la répartition des hépatocytes sous forme radiale, la disparition du noyau, le développement de zones nécrotiques autour de

---

Contribution à l'évaluation de l'effet de *Thymus numidicus* et de *Rosmarinus officinalis* sur le diabète alloxanique chez les rats

la veine Centro-lobulaire avec infiltration de cellules inflammatoires, dégénérescence des sinusoides, , on observe que ces modifications sont significativement atténuées chez les rats diabétiques traités avec RO-EA ou glibenclamide.

## V. Discussion

Aujourd'hui et avec tous ces progrès en phytothérapie il y a toujours un manque concernant les études sur la bioactivité particulière d'une plante précise et d'après ce concept on s'est investi sur le plan phytochimique et bioactif des plantes RO et TN sur différentes fractions. Certaines de ces fractions restent toujours mal investiguées surtout la fraction de plante T.N qui enregistre un manque d'informations dans les littératures.

Dans la présente étude on a quantifié la teneur totale des polyphénols et les flavonoïdes qui sont omniprésents dans les plantes avec différentes structures, le RO et TN tellement réputées sont riches en polyphénol et flavonoïde ces derniers ont été quantifiés dans différents extraits ils ont été très élevés pour la fraction le RO-EA comparés aux résultats obtenus par (Wang et al., 2018) pour TPC ( $88,74 \pm 1,46 \mu\text{g GAE} / \text{mg}$ ) et TFC ( $12,79 \pm 1,49 \mu\text{g QE} / \text{mg}$ ), ce qui concerne T.N nos résultats ont été moins riches en TPC comparant ce qui a été obtenu avec *T.pubescens* ( $295,57 \pm 1,91 \mu\text{g GAE} / \text{mg}$ ) par (Nickavar et Esbati, 2012) par contre ce qui a été constaté au TFC nos résultats ont été plus grands comparant ce qui a été trouvé ( $50,39 \pm 0,75 \mu\text{g GAE} / \text{mg}$ ) par (Nickavar et Esbati, 2012 ; Megateli et Krea, 2018) avec l'espèce de *T.pubescens*, ce n'est pas nécessaire de comparer nos données avec les résultats de littératures car ces variations dus à la polarité de solvant d'extraction, les espèces étudiées (Oubihl et al., 2020), à la maturité, aux conditions écologiques et climatiques et aux répartitions géographiques (Capecka et al., 2005).

Le potentiel antioxydant de nos fractions a été mesuré selon différentes méthodes basées sur 2 principes qui ont fait neutraliser le radical libre soit par réduction directe via des transferts d'atome d'électron ou par transfert d'atome d'hydrogène, partant de ce constat on trouve que la méthode DPPH et ABTS combine à la fois ces 2 principes (Prior et al., 2005) l'extrait acétate d'éthyle qu'on avait obtenu de la plante RO démontre une activité antioxydante plus grande avec la méthode DPPH comparé à ce qui a été trouvé dans l'extrait hydro-méthanolique  $\text{IC}_{50}$  ( $68,4 \pm 0,21 \mu\text{g} / \text{mg}$ ) par (Kim. H et Kim. K, 2003) et  $\text{IC}_{50}$  ( $25,26 \pm 1,56 \mu\text{g} / \text{mg}$ ) par (Moreno et al., 2006), en outre l'extrait acétate d'éthyle de TN porte une grande activité antioxydante comparé à ce qui a été trouvé  $\text{IC}_{50}$  ( $91,9 \pm 0,45 \mu\text{g} / \text{mg}$ ) et  $\text{IC}_{50}$  ( $31,47 \pm 0,29 \mu\text{g} / \text{mg}$ ) avec l'espèce *T.vulgaris* et *T.pubescens* respectivement (Kim. H et Kim. K, 2003), (Nickavar et Esbati, 2012 ; Deo et al., 2016).

Même tendance avec la méthode ABTS nos résultats étaient plus élevés pour le RO et TN par rapport à ce qui a été constaté à l'extrait méthanolique de R.O et *T.vulgaris*  $\text{IC}_{50}$  ( $14,4 \pm 1,14 \mu\text{g} / \text{mg}$ ) et  $\text{IC}_{50}$  ( $14,3 \pm 1,04 \mu\text{g} / \text{mg}$ ) respectivement par (Kim. H et Kim. K, 2003), toutes les littératures indiquent que les polyphénols et les flavonoïdes contribuent fortement à

Les plantes ont une capacité antioxydante et un pouvoir rodox très important, (**Dudonne et al., 2009 ; Dehshiri et al., 2013**).

Partant du principe élémentaire que la médecine moderne est en constante progression, une recherche de remèdes à base de plantes est au quotidien selon leurs propriétés curatives et médicinales afin de guérir de nombreuses maladies tels que le diabète de type 2 et ses complications secondaires comme les produits finaux de glycation avancée (AGE) qui sont liés au stress oxydant généré par le diabète (**Vishmi et al., 2018**), le patient atteint DT2 souffre toujours d'une hyperglycémie postprandiale et la réduction de cette dernière est une préoccupation stratégique du traitement (**Picot et Mahmoodally, 2017**) l'inhibition d' $\alpha$ -amylase est l'une des cibles de cette stratégie, l'inhibition prolongée de cette enzyme va contrôler la glycémie postprandiale (**Ramu et al., 2014**), nos résultats ont démontré que l'extrait acétate d'éthyle de RO et TN porte un pouvoir intéressant à l'inhibition d' $\alpha$ -amylase ce qui est en accord avec ce que a trouvé (**Franco et al., 2018**) et (**Hassani et al., 2016**) sur l'extrait hydro-méthanolique de RO et *T.vulgaris*, l'hyperglycémie chronique joue un rôle dans l'apparition des complications diabétiques en induisant des AGE ces derniers sont concomitantes avec diverses maladies (**Steiner et al., 2018**) des plantes médicinales ont prouvé leur pouvoir à inhiber la formation des AGE donc préviennent l'apparition de complications diabétique, nos résultats ont démontré que le RO et TN porte un potentiel anti-glycation très grand comparu à ce qui a été trouvé aux RO et *T.vulgaris*  $IC_{50}$  ( $48,5 \pm 0,35$  et  $85 \pm 13,9 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) par (**Kim. H et Kim. K, 2003**).

Environ 60 à 80 pour cent des cas de démence chez les personnes âgées liée à la maladie Alzheimer (M.A) (**Wortman, 2012**) l'une des causes de la pathologie bien acceptée est l'hypothèse amyloïde qui consiste à l'accumulation et l'agrégation de l'amyloïde-béta cette agrégation va entraîner la mort des neurones (**Cummings et Back, 1998**) et la gravité des effets cliniques sont lié directement à la perte des neurones cholinergiques, les médicaments qui sont disponibles aujourd'hui sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ne sont pas des guérissants mais ils soulagent des symptômes cliniques liés à cette maladie (**Raschetti et al., 2007**), cependant il y a une stratégie: faire remplacer ces médicaments par des substances naturelles à partir de plantes médicinales qui ont prouvé leur pouvoir à inhiber acétylcholinestérase (**Pagoni et al., 2020**), notre fraction acétate d'éthyle de RO et TN a démontré un grand pouvoir anti-acétylcholinestérase ce qui est en accord avec le travail de (**Habtemariam, 2016**) et (**Kindl et al., 2015**), ces constatations supportent la théorie que les polyphénols avaient beaucoup de cibles comprenant l'activité de Ache et stress oxydant ce qui est en accord avec (**Vladimir-Knežević et al., 2014**).

le diabète sucré est aujourd'hui une maladie métabolique grave menaçant la plupart des gens dans le monde donc nous avons utilisé un modèle expérimental de diabète induit par l'Alloxan (**Ajiboye et al., 2020**), ce modèle est bien connu pour étudier différents agents hypoglycémisants (**Sekar et al., 2020**), qui ont un rôle crucial dans la prévention des complications liées au diabète par le bon contrôle de la glycémie (**Preshaw et Bissett, 2019**), sur la base de cet énoncé nous avons utilisé des rats normaux chargés en glucose pour obtenir un modèle hyperglycémique qui va nous permettre de révéler l'activité anti-hyperglycémique de certains extraits végétaux (**Ogar et al., 2018**), ainsi pour déterminer la capacité d'un extrait à prévenir l'hyperglycémie nous utilisons un modèle hyperglycémique chargé en glucose (**Krishnan et al., 2021**), à partir de ce modèle les 2 fractions de l'extrait RO-EA et TN-EA ont révélé une activité anti-hyperglycémique plus significative à la dose de 300 mg/kg c. p de la fraction RO-EA, on sait qu'une glycémie élevée va stimuler la sécrétion d'insuline qui va favoriser l'entrée du glucose dans les tissus périphériques ils sont contrôlés par plusieurs mécanismes (**Campbell et Newgard, 2021**), ainsi d'après notre étude (témoin glucose), il semble que l'insuline nécessite 2 heures pour atteindre le niveau de glycémie à jeun, par contre dans la fraction RO-EA et le glibenclamide seulement 1 heure, ce qui donne une idée de la forte implication de l'activité du RO-EA et du glibenclamide dans l'utilisation du glucose (**Mendes et al., 2021**), lors d'un état de tolérance au glucose le glibenclamide joue un rôle crucial dans la stimulation des cellules  $\beta$  du pancréas pour la libération élevée d'insuline (**Stožer et al., 2021**), il semble donc que l'activité anti-hyperglycémique de la fraction flavonoïde RO -l'EA implique un effet analogue à l'insuline (**Etsassala et al., 2021**), probablement soit par l'amélioration de la consommation périphérique de glucose, soit par l'amélioration de la sensibilité des cellules  $\beta$  au glucose, qui va favoriser la libération d'insuline (Pereira et al., 2019), et aussi soit par inhibition des enzymes de la gluconéogenèse (**Hasanpour et al., 2020**).

Plusieurs extraits végétaux ayant une activité anti-hyperglycémique ont été décrits dans plusieurs littératures (**Jacob et Narendhirakannan, 2019**), encore la fraction RO-EA présentait une activité hypoglycémique, cette activité probablement due à l'implication de la fraction RO-EA dans l'augmentation de la libération d'insuline, cet effet semble similaire au mécanisme d'action des médicaments sulfonyles (**Chinsembu, 2019 ; Blahova et al., 2021**), d'autre part, l'extrait de la fraction TN-EA n'a présenté aucune activité hypoglycémique chez les rats normaux ou les rats diabétiques traités et bien qu'il ait déjà été démontré une activité anti-hyperglycémique dans le modèle chargé en glucose (**Honari et al., 2018**), il est proposé que ce mécanisme soit similaire à l'action du médicament biguanide (**Kifle et al., 2022**) qui ne favorise pas la libération d'insuline, il participe à l'amélioration de l'absorption du glucose par

les tissus périphériques, réduisent la gluconéogenèse hépatique (**Herrera-Balandrano et al., 2021**), de plus il a une activité anti-hyperglycémique et non hypoglycémique (**Haile et al., 2021**).

L'alloxan induit un diabète sucré par nécrose sélective des cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques, donc la quantité d'insuline diminue provoque un déséquilibre dans le contrôle de la glycémie (**Papuc et al., 2021**), la persistance de taux de glucose élevé va déclencher une réaction de glycation entre les protéines plasmatiques et le glucose (**Toma et al., 2020**), l'Hb une de ces protéines, un taux élevé de sa forme glyquée HbA1c est un indice fiable dans le contrôle de la glycémie et le diagnostic du diabète.

La quantité élevée d'HbA1c est proportionnelle au taux de glucose à jeun chez les patients diabétiques (**Lundholm et al., 2020**), l'administration de la fraction RO-EA et de glibenclamide pendant 21 jours a significativement inversé les taux d'insuline et de glucose et restauré les taux d'Hb et HbA1c à presque la normale chez les rats diabétiques traités (**Gerges et al., 2021**), nous pouvons conclure que la restauration du taux d'insuline est produite par l'effet de la fraction RO-EA qui conduit à une amélioration du contrôle glycémique (**Rodrigues et al., 2019**), probablement par inhibition de la gluconéogenèse ou amélioration de la consommation périphérique de glucose (**He et al., 2019 ; Momtaz et al., 2019**).

Plusieurs études ont cité les effets secondaires du diabète induit par l'Alloxan chez le rat, parmi ces effets figurent la polyphagie, la polydipsie, l'émaciation et la perte musculaire (**Elangovan et al., 2019**), cette dernière étant due à une carence en insuline qui entraîne une augmentation du catabolisme des protéines, l'augmentation de la protéolyse vise à compenser le rôle des glucides dans la production d'énergie (**Arcaro et al., 2021**), l'administration de la fraction RO-EA et du glibenclamide améliore la récupération du poids corporel, consommation d'eau et de nourriture, la restauration du poids corporel chez les rats diabétiques traités est probablement due à un contrôle glycémique accru qui, à son tour, entraînera une diminution de la protéolyse (**Rodrigues et al., 2019 ; Salles et al., 2021 ; Saravanakumar et al., 2020**).

Le diabète sucré a un impact direct ou indirect sur le contrôle glycémique, généralement par la diminution de la libération d'insuline, les enzymes dépendantes de l'insuline telles que l'hexokinase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la glycogène synthase seront inhibées (**Kalaivani et Sankaranarayanan, 2021 ; Mabate et al., 2021**), lequel favorisera l'activité des enzymes de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse (glucose-6-phosphatase, fructose-1,6 bisphosphate, glycogène phosphorylase) (**Sundaram et al., 2019**), et par conséquent, le glycogène hépatique sera diminué, et la protéolyse augmentera, ce qui entraînera

une diminution du poids du foie (**Balakrishnan et al., 2019**). Dans notre étude, nous avons enregistré toutes ces altérations chez le rat diabétique induits par l'Alloxan, l'administration de la fraction RO-EA et du glibenclamide a inversé toutes ces altérations, le poids du foie a été récupéré suite à l'augmentation de l'activité enzymatique de l'hexokinase, et du glucose -6-déshydrogénase et glycogène synthase (**Zangeneh et al., 2018 ; Vinayagam et al., 2018 ; Krishnan et al., 2020**), qui sont des enzymes insulino-dépendantes jouant un rôle dans le contrôle et le métabolisme du glucose, par conséquent l'activité enzymatique de la glucose-6-phosphatase, de la fructose-1,6-bisphosphatase et de la glycogène phosphorylase a été diminuée par rapport aux rats diabétiques non traités (**Amadi et al. , 2021**), ce qui entraîne à son tour une augmentation du taux de glycogène hépatique, cette amélioration du contrôle glycémique probablement due à l'action de la fraction RO-EA et du glibenclamide sur la régénération des cellules  $\beta$  pancréatiques qui augmente le taux d'insuline (**Sasikala et al., 2019 ; Jugran et al., 2021**), plusieurs études ont décrit que la fraction RO-EA riche en molécule d'acide carnosique et carnosol (Lefebvre et al., 2021), ces molécules directement impliquées dans l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) cette protéine inhibe la gluconéogenèse et favorise la glycogénèse , glycolyse et absorption de glucose (**Hasei et al., 2021 ; Roghani-Shahraki et al., 2021**).

L'étude histologique chez le rat diabétique induite par l'Alloxan a montré différentes altérations au niveau du tissu hépatique (**Ansari et al., 2019**) disparition des noyaux, zones de nécrose autour de la veine centrale, infiltration des cellules inflammatoires (**Rašeta et al., 2020**), ces altérations hépatiques impliquent le stress oxydatif dans leur développement, ce qui conduit à la progression des complications du diabète sucré. Nos résultats ont montré que le traitement des rats diabétiques avec la fraction RO-EA et le glibenclamide atténuent ces altérations sur le tissu hépatique presque à la normale, cette amélioration montrée par la fraction RO-EA pourrait être due à l'action de l'acide carnosique et du carnosol sur hépatoprotection (**Al-Sharafi et al., 2020 ; Singh et al., 2022**).

# **Conclusion**

Cette étude a rapporté pour la première fois le potentiel de différentes activités des fractions d'extraits de la plante RO et TN, elle a démontré que la fraction d'acétate d'éthyle est la plus potentielle, cette fraction a prouvé son efficacité au pouvoir antioxydant et aussi sa capacité à inhiber la glycation des protéines et les enzymes liées à l'hyperglycémie ces 2 pouvoirs peuvent être utilisés chez les patients atteints de diabète type 2 pour minimiser les complications secondaires générés par cette maladie, soutenant l'épreuve de l'implication de stress oxydant au trouble neurodégénératif et que l'inhibition de l'Aché est seulement l'approche thérapeutique efficace jusqu'à présent, notre fraction acétate d'éthyle a démontré à la fois un grand pouvoir antioxydant et anti-Aché donc on peut utiliser cette fraction comme agent prometteur pour les troubles neurodégénératifs comme la maladie Alzheimer.

Ainsi l'administration de l'extrait de la fraction RO-AE (300 mg/kg p.c.) à des rats diabétiques induits par l'Alloxan a un effet appréciable, elle a un effet anti-hyperglycémique et même hypoglycémique à la fois avec, il module significativement les taux plasmatiques de glucose et d'insuline, Poids corporel, consommation alimentaire, Hb et Les niveaux d'HbA1c et les niveaux de glycogène hépatique, ainsi cette fraction a restauré de manière significative l'activité altérée des enzymes clés de métabolisme des glucides presque à la normale elle intervient à la modulation de différentes voies de métabolisme telle que la voie de la glycolyse, pentose phosphate, gluconéogenèse, glycogénèse, glycolyse, cette fraction de l'extrait RO -AE est considérée comme une vertu thérapeutique et peut être développée comme traitement pour la complication du diabète mellitus. D'autres études sont nécessaires pour révéler le mécanisme d'action exact de la fraction RO-AE sur les principales enzymes du métabolisme des glucides.

# Référence

## A

- A Stravodimos, G., A Chetter, B., Kyriakis, E., L Kantsadi, A., SM Chatzileontiadou, D., T Skamnaki, V., ... & D Leonidas, D. (2017). Polyphénols phytogéniques comme inhibiteurs de la glycoène phosphorylase : le potentiel des triterpènes et des flavonoïdes pour le contrôle glycémique dans le diabète de type 2. *Chimie médicinale actuelle*, 24 (4), 384-403.
- Abotaleb, M., Samuel, SM, Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A. et Büsselberg, D. (2018). Flavonoïdes dans le cancer et l'apoptose. *Cancers*, 11 (1), 28.
- Agius, L. (2015). Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Molecular aspects of medicine*, 46, 34-45.
- Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R., Dekant, W., ... & Toldrá, F. (2008). Utilisation d'extraits de romarin comme additif alimentaire - Avis scientifique du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments. *EFSA J*, 721, 1-29.
- Ahmad, M., Akhtar, MS, Malik, T., & Gilani, AH (2000). Action hypoglycémiant de la fraction flavonoïde des graines de Cuminum nigrum. *Recherche en phytothérapie : une revue internationale consacrée à l'évaluation pharmacologique et toxicologique des dérivés de produits naturels*, 14 (2), 103-106.
- Ahren, B. (2000). Régulation autonome de la sécrétion hormonale des îlots - implications pour la santé et la maladie. *Diabetologia*, 43 (4), 393-410.
- Ajiboye, B. O., Shonibare, M. T., & Oyinloye, B. E. (2020). Antidiabetic activity of watermelon (*Citrullus lanatus*) juice in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19(1), 343-352. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00515-2>.
- Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., & Sena, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials.
- Al-Sharafi, N. M., Kasim, S. F., & Hamza, F. Z. (2020). Ameliorative role of PTU and rosemary leaves extract in male rats with hyperthyroidism. *EurAsian Journal of Biosciences*, 14(1). <https://doi.org/10.33899/ijvs.2020.126872.1404>.
- Altinier, G., Sosa, S., Aquino, RP, Mencherini, T., Loggia, RD et Tubaro, A. (2007). Caractérisation des composés anti-inflammatoires topiques chez *Rosmarinus officinalis* L. *Journal de chimie agricole et alimentaire*, 55 (5), 1718-1723.
- Amadi, J. A., Amadi, P. U., & Njoku, U. C. (2021). Okra Modulates Regulatory Enzymes and Metabolites of Glucose-Utilizing Pathways in Diabetic Rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 40(8), 689-698. <https://doi.org/10.1080/07315724.2020.1815249>.
- Andrade, JM, Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, CP et Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L. : une revue actualisée de sa phytochimie et de son activité biologique. *Sciences futures OA*.
- Ahmad, J. (2016). Le pied diabétique. *Diabète et syndrome métabolique : recherche clinique et revues*, 10 (1), 48-60.
- Ansari, S., Bari, A., Ullah, R., Mathanmohun, M., Veeraraghavan, V. P., & Sun, Z. (2019). Gold nanoparticles synthesized with *Smilax glabra* rhizome modulates the anti-obesity parameters in high-fat diet and streptozotocin induced obese diabetes rat model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 201, 111643. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111643>.

- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., ... & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, *12*(7), 1496-1547.
- Arcaro, C. A., Assis, R. P., Oliveira, J. O., Zanon, N. M., Paula-Gomes, S., Navegantes, L. C. C., ... & Baviera, A. M. (2021). Phosphodiesterase 4 inhibition restrains muscle proteolysis in diabetic rats by activating PKA and EPAC/Akt effectors and inhibiting FoxO factors. *Life Sciences*, *278*, 119563. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119563>.
- B**
- Balakrishnan, B. B., Krishnasamy, K., Mayakrishnan, V., & Selvaraj, A. (2019). Moringa concanensis Nimmo extracts ameliorates hyperglycemia-mediated oxidative stress and upregulates PPAR $\gamma$  and GLUT4 gene expression in liver and pancreas of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *112*, 108688. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108688>.
- Barth, E., Albuszies, G., Baumgart, K., Matejovic, M., Wachter, U., Vogt, J., ... & Calzia, E. (2007). Métabolisme du glucose et catécholamines. *Médecine de soins intensifs*, *35* (9), S508-S518.
- Beecher, GR (2003). Panorama des flavonoïdes alimentaires : nomenclature, occurrence et apport. *Le Journal de la nutrition*, *133* (10), 3248S-3254S.
- Begum, A., Sandhya, S., Vinod, K. R., Reddy, S., & Banji, D. (2013). An in-depth review on the medicinal flora Rosmarinus officinalis (Lamiaceae). *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria*, *12*(1), 61-74.
- Bellavance, MA, & Rivest, S. (2014). L'axe HPA-immunitaire et les actions immunomodulatrices des glucocorticoïdes dans le cerveau. *Frontières en immunologie*, *5*, 136.
- Benkiniouar, R., Touil, A., Zaidi, F., Rhouati, S., Chosson, E., Seguin, E., ... & Bellvert, F. (2010). ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FIVE FREE FLAVONOID AGLYCONES FROM Thymus numidicus. *Journal of the Algerian Chemical Society/Journal de Société Algérienne de Chimie*, *20*(1).
- Bent, S. (2008). Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation. *Journal of general internal medicine*, *23*(6), 854-859
- Bahtiyar, G., Gutterman, D., & Lebovitz, H. (2016). Heart failure: a major cardiovascular complication of diabetes mellitus. *Current diabetes reports*, *16*, 1-14.
- Blahova, J., Martiniakova, M., Babikova, M., Kovacova, V., Mondockova, V., & Omelka, R. (2021). Pharmaceutical drugs and natural therapeutic products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Pharmaceuticals*, *14*(8), 806. <https://doi.org/10.3390/ph14080806>.
- Blanco, CL, McGill-Vargas, LL, Gastaldelli, A., Seidner, SR, McCurnin, DC, Leland, MM, ... & Musi, N. (2015). La résistance périphérique à l'insuline et la signalisation altérée de l'insuline contribuent au métabolisme anormal du glucose chez les babouins prématurés. *Endocrinologie*, *156* (3), 813-823.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*(4617), 1199-1200.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.

- Brandstrup, N., Kirk, J. E., & Bruni, C. (1957). The hexokinase and phosphoglucoisomerase activities of aortic and pulmonary artery tissue in individuals of various ages. *Journal of Gerontology*, 12(2), 166-171. <https://doi.org/10.1093/geronj/12.2.166>.
- Bromer, W. W., Sinn, L. G., Staub, A., & Behrens, O. K. (1957). The amino acid sequence of glucagon. *Diabetes*, 6(3), 234-238.
- Brownlee, M. (2005). La pathobiologie des complications du diabète : un mécanisme fédérateur. *Diabète*, 54 (6), 1615-1625.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : phytochimie plantes médicinales (No. 581.634 B7).
- Bule, M., Abdurahman, A., Nikfar, S., Abdollahi, M. et Amini, M. (2019). Effet antidiabétique de la quercétine : revue systématique et méta-analyse d'études animales. *Toxicologie alimentaire et chimique*, 125, 494-502.
- Burkart, V., Koike, T., Brenner, H. H., Imai, Y., & Kolb, H. (1993). Dihydrolipoic acid protects pancreatic islet cells from inflammatory attack. *Agents and Actions*, 38(1), 60-65.

## C

- Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature reviews Molecular cell biology*, 22(2), 142-158. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>.
- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry*, 93(2), 223-226.
- Cerf, ME (2013). Dysfonctionnement des cellules bêta et résistance à l'insuline. *Frontières en endocrinologie*, 4, 37.
- Chadt, A., & Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 472(9), 1273-1298.
- Chang, L., Chiang, SH et Saltiel, AR (2004). Signalisation de l'insuline et régulation du transport du glucose. *Médecine moléculaire*, 10 (7), 65-71.
- Chinsembu, K. C. (2019). Diabetes mellitus and nature's pharmacy of putative antidiabetic plants. *Journal of herbal medicine*, 15, 100230. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.09.001>.
- Chiu, YC, Hua, TE, Fu, YY, Pasricha, PJ et Tang, SC (2012). Imagerie 3D et illustration de l'innervation sympathique perfusive des îlots de souris et de son remodelage en cas de blessure. *Diabetologia*, 55 (12), 3252-3261.
- Choi, J. S., Yokozawa, T., & Oura, H. (1991). Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin. *Planta medica*, 57(03), 208-211.
- Cornblath, M., Randle, P. J., Parmeggiani, A., & Morgan, H. E. (1963). Regulation of glycogenolysis in muscle: effects of glucagon and anoxia on lactate production, glycogen content, and phosphorylase activity in the perfused isolated rat heart. *Journal of biological chemistry*, 238(5), 1592-1597. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)81105-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)81105-x).
- Csajbok, É. A., & Tamás, G. (2016). Le cortex cérébral : une cible et une source d'insuline ? *Diabetologia*, 59 (8), 1609-1615.
- Cummings, J. L., & Back, C. (1998). The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 6(2), S64-S78.

## D

- Diop, S. N., Djrolo, F., Sidibé, A. T., Baldé, N. M., Monabeka, H. G., Epaka, M. E., ... & Mbaye, N. M. (2019). Consensus pour la prise en charge de l'hyperglycémie dans le diabète de type 2 en Afrique subsaharienne. Rédigé par un groupe d'experts africains du diabète. *Médecine des maladies Métaboliques*, 13(2), 210-216.
- David, A. V. A., Arulmoli, R. et Parasuraman, S. (2016). Aperçus de l'importance biologique de la quercétine : un flavonoïde bioactif. *Revue de pharmacognosie*, 10 (20), 84.
- De Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A. et De Oliveira, L. D. (2019). *Rosmarinus officinalis* L. (romarin) comme agent thérapeutique et prophylactique. *Journal des sciences biomédicales*, 26 (1), 1-22.
- Dehshiri, M. M., Aghamollaei, H., Zarini, M., Nabavi, S. M., Mirzaei, M., Loizzo, M. R., & Nabavi, S. F. (2013). Antioxidant activity of different parts of *Tetrataenium lasiopetalum*. *Pharmaceutical biology*, 51(8), 1081-1085.
- Del Rio, D., Calani, L., Scazzina, F., Jechiu, L., Cordero, C., & Brighenti, F. (2010). Biodisponibilité des catéchines du thé prêt à boire. *Nutrition*, 26 (5), 528-533.
- Deo, P., Hewawasam, E., Karakoulakis, A., Claudie, D. J., Nelson, R., Simpson, B. S., ... & Semple, S. J. (2016). In vitro inhibitory activities of selected Australian medicinal plant extracts against protein glycation, angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes linked to type II diabetes. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 1-11.
- Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., & Chelghoum, C. (2006). Etudes sur la composition en huile essentielle et l'activité antimicrobienne de *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. *Journal international d'aromathérapie*, 16 (2), 95-100.
- Doktorovova, S., Kovačević, A. B., Garcia, M. L., & Souto, E. B. (2016). Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 108, 235-252.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.

## E

- Egert, S., & Rimbach, G. (2011). Quelles sources de flavonoïdes : régimes complexes ou compléments alimentaires ? *Avancées en nutrition*, 2 (1), 8-14.
- Église, V. (2003). Coûts économiques du diabète aux États-Unis en 2002. *Soins du diabète*, 26 (3), 917-932.
- Elangovan, A., Subramanian, A., Durairaj, S., Ramachandran, J., Lakshmanan, D. K., Ravichandran, G., ... & Thilagar, S. (2019). Antidiabetic and hypolipidemic efficacy of skin and seed extracts of *Momordica cymbalaria* on alloxan induced diabetic model in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 241, 111989. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111989>.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ells, H. A., & Kirkman, H. N. (1961). A colorimetric method for assay of erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 106(3), 607-609. <https://doi.org/10.3181/00379727-106-26418>.

Elsner, M., Gurgul-Convey, E., & Lenzen, S. (2006). Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Free radical biology and medicine*, 41(5), 825-834.

Engle, TE, Spears, JW, Xi, L., & Edens, FW (2000). Effets du cuivre alimentaire sur le métabolisme des lipides et les concentrations de catécholamines circulantes chez les bouvillons de finition. *Journal of Animal Science*, 78 (10), 2737-2744.

Etsassala, N. G., Hussein, A. A., & Nchu, F. (2021). Potential application of some lamiaceae species in the management of diabetes. *Plants*, 10(2), 279. <https://doi.org/10.3390/plants10020279>.

Exton J. H. (1979). Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monographs on endocrinology*, 12, 535–546.

### F

Fan, H., Zhou, Y., Wen, H., Zhang, X., Zhang, K., Qi, X., ... & Li, Y. (2019). Identification et caractérisation à l'échelle du génome des gènes transporteurs de glucose (glut) chez le bar tacheté (*Lateolabrax maculatus*) et leur expression hépatique régulée pendant une famine à court terme. *Biochimie et physiologie comparées Partie D : Génomique et protéomique*, 30, 217-229.

Fisher, VL et Tahrani, AA (2017). Neuropathie cardiaque autonome chez les patients atteints de diabète sucré : perspectives actuelles. *Diabète, syndrome métabolique et obésité : cibles et thérapie*, 419-434.

Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. biol. Chem*, 66(2), 375-400.

Fang, XK, Gao, J. et Zhu, DN (2008). Le kaempférol et la quercétine isolés d'*Euonymus alatus* améliorent l'absorption du glucose des cellules 3T3-L1 sans activité d'adipogenèse. *Sciences de la vie*, 82 (11-12), 615-622.

Fève, B., & Sauvanet, J. P. (2021). Nouvelle classification des diabètes de l'adulte : une avancée significative vers une médecine de précision. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 15(7), 701-708.

Franco, R. R., da Silva Carvalho, D., de Moura, F. B. R., Justino, A. B., Silva, H. C. G., Peixoto, L. G., & Espindola, F. S. (2018). Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, 215, 140-146.

Franco, R. S., Kaplan, L. A. (1984). *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*, 1294-1296 and 418.

### G

Galsgaard, K. D., Pedersen, J., Knop, F. K., Holst, J. J., & Wewer Albrechtsen, N. J. (2019). Glucagon Receptor Signaling and Lipid Metabolism. *Frontiers in physiology*, 10, 413.

Gancedo, J. M., & Gancedo, C. (1971). Fructose-1, 6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non fermenting yeasts. *Archiv für Mikrobiologie*, 76(2), 132-138. <https://doi.org/10.1007/bf00411787>.

Gao, CL, Zhu, C., Zhao, YP, Chen, XH, Ji, CB, Zhang, CM, ... & Guo, XR (2010). Le dysfonctionnement mitochondrial est induit par des niveaux élevés de glucose et d'acides gras libres dans les adipocytes 3T3-L1. *Endocrinologie moléculaire et cellulaire*, 320 (1-2), 25-33.

---

Contribution à l'évaluation de l'effet de *Thymus numidicus* et de *Rosmarinus officinalis* sur le diabète alloxanique chez les rats

- Gerges, S. H., Wahdan, S. A., Elsherbiny, D. A., & El-Demerdash, E. (2021). Pharmacology of diosmin, a citrus flavone glycoside: an updated review. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s13318-021-00731-y>.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, MI, Ferreres, F., & Tomás-Barberán, FA (2001). Disponibilité in vitro des flavonoïdes et autres composés phénoliques dans le jus d'orange. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 1035-1041.
- Giugliano, D., Longo, M., Scappaticcio, L., Caruso, P., & Esposito, K. (2021). Sodium–glucose transporter-2 inhibitors for prevention and treatment of cardiorenal complications of type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, 20(1), 1-10.
- González Minero, F. J., & Bravo Díaz, L. (2017). Historia y actualidad de productos para la piel, cosméticos y fragancias. Especialmente los derivados de las plantas. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 58(1), 5-12.
- González-Minero, F. J., Bravo-Díaz, L., & Ayala-Gómez, A. (2020). Rosmarinus officinalis L.(Rosemary): An ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics*, 7(4), 77.
- Grace, M. H., Ribnicky, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Yousef, G. G., ... & Lila, M. A. (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, 16(5), 406-415.
- Guillaume, A. (2020). Étude de la fonction du récepteur aux acides gras GPR120/FFAR4 dans la régulation de l'homéostasie du glucose.

## H

- Habtemariam, S. (2016). The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Haile, T., Cardoso, S. M., de Oliveira Raphaelli, C., Pereira, O. R., Pereira, E. D. S., Vizzotto, M., ... & Karim, A. (2021). Chemical composition, antioxidant potential, and blood glucose lowering effect of aqueous extract and essential oil of thymus serrulatus hochst. Ex benth. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 621536. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.621536>.
- Hanson, R. W., & Owen, O. E. (2013). Gluconeogenesis. 381-386.
- Hao, HH, Shao, ZM, Tang, DQ, Lu, Q., Chen, X., Yin, XX, ... & Chen, H. (2012). Effets préventifs de la rutine sur le développement de la néphropathie diabétique expérimentale chez le rat. *Sciences de la vie*, 91 (19-20), 959-967.
- Houlot, R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Ed Maloine*, 19, 225-227.
- Hasanein, P., & Fazeli, F. (2014). Rôle de la naringénine dans la protection contre l'hyperalgésie diabétique et l'allodynie tactile chez les rats mâles Wistar. *Journal de physiologie et biochimie*, 70 (4), 997-1006.
- Hasanpour, M., Iranshahy, M., & Iranshahi, M. (2020). The application of metabolomics in investigating anti-diabetic activity of medicinal plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110263. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110263>.
- Hasei, S., Yamamotoya, T., Nakatsu, Y., Ohata, Y., Itoga, S., Nonaka, Y., ... & Asano, T. (2021). Carnosic acid and carnosol activate ampk, suppress expressions of gluconeogenic and

lipogenic genes, and inhibit proliferation of HepG2 cells. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4040. <https://doi.org/10.3390/ijms22084040>.

Hassani, F. V., Shirani, K., Hosseinzadeh, H. (2016). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 389(9), 931-949.

He, J. H., Chen, L. X., & Li, H. (2019). Progress in the discovery of naturally occurring anti-diabetic drugs and in the identification of their molecular targets. *Fitoterapia*, 134, 270-289. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.033>.

Herrera-Balandrano, D. D., Chai, Z., Hutabarat, R. P., Beta, T., Feng, J., Ma, K., ... & Huang, W. (2021). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of blueberry anthocyanins by AMPK activation: In vitro and in vivo studies. *Redox biology*, 46, 102100. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102100>.

Hikaru, K., & Toshitsugu, O. (1959). Pathological occurrence of glucose-6-phosphatase in serum in liver diseases. *Clinica Chimica Acta*, 4(4), 554-561. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(59\)90165-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(59)90165-2).

Hoeldtke, RD, & Boden, G. (1994). Sécrétion d'épinéphrine, ignorance de l'hypoglycémie et neuropathie autonome diabétique. *Annales de médecine interne*, 120 (6), 512-517

Hollman, PC, de Vries, JH, van Leeuwen, SD, Mengelers, MJ et Katan, MB (1995). Absorption des glycosides de quercétine alimentaires et de la quercétine chez des volontaires sains iléostomisés. *Le journal américain de nutrition clinique*, 62 (6), 1276-1282.

Honari, N., Pouraboli, I., & Gharbi, S. (2018). Antihyperglycemic property and insulin secreting activity of hydroalcoholic shoot extract of *Thymus caramanicus* Jalas: A wild predominant source of food additive in folk medicine. *Journal of Functional Foods*, 46, 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.052>.

Hossain, M. K., Choi, H. Y., Hwang, J. S., Dayem, A. A., Kim, J. H., Kim, Y. B., ... & Cho, S. G. (2014). Antiviral activity of 3, 4'-dihydroxyflavone on influenza a virus. *Journal of Microbiology*, 52(6), 521-526.

Hu, FB, Manson, JE, Stampfer, MJ, Colditz, G., Liu, S., Solomon, CG et Willett, WC (2001). Régime alimentaire, mode de vie et risque de diabète sucré de type 2 chez les femmes. *Journal de médecine de la Nouvelle-Angleterre*, 345 (11), 790-797.

Huo, Y., Guo, X., Li, H., Xu, H., Halim, V., Zhang, W., ... & Wu, C. (2012). Targeted overexpression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in adipose tissue increases fat deposition but protects against diet-induced insulin resistance and inflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 21492-21500.

Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., & Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), 94-102.

## J

Jacob, B., & Narendhirakannan, R. T. (2019). Role of medicinal plants in the management of diabetes mellitus: a review. *3 Biotech*, 9(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1528-0>.

Jarald, E. E., Joshi, S. B., & Jain, D. C. (2009). Antidiabetic activity of extracts and fraction of *Zizyphus mauritiana*. *Pharmaceutical biology*, 47(4), 328-334. <https://doi.org/10.1080/13880200902752488>.

Johnson, LN, Hajdu, J., Acharya, KR, Stuart, DI, McLaughlin, PJ, Oikonomakos, NG et Barford, D. (2020). Glycogène phosphorylase b. Dans *Enzymes allostériques* (pp. 81-127). Presse CRC.

Jugran, A. K., Rawat, S., Devkota, H. P., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2021). Diabetes and plant-derived natural products: From ethnopharmacological approaches to their potential for modern drug discovery and development. *Phytotherapy Research*, 35(1), 223-245. <https://doi.org/10.1002/ptr.6821>.

### K

Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., & Benlabed, K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, 15(3), 129-133.

Kalaivani, K., & Sankaranarayanan, C. (2021). Modulatory effect of isopulegol on hepatic key enzymes of glucose metabolism in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Archives of physiology and biochemistry*, 127(4), 318-326. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1638415>.

Kattini, R., Hummelen, R., & Kelly, L. (2020). Early gestational diabetes mellitus screening with glycated hemoglobin: a systematic review. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 42(11), 1379-1384.

Kaplan, L. A. (1984): *Clinical Chemistry*. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto.Princeton, 1032-1036.

Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., ... & Cho, SG (2016). Mécanismes moléculaires des propriétés anti-obésité et anti-diabétiques des flavonoïdes. *Journal international des sciences moléculaires*, 17 (4), 569.

Kelly, GS (2011). Quercétine. *Revue de médecine alternative*, 16 (2), 172-195.

Kifle, Z. D., Abdelwuhab, M., Melak, A. D., Meseret, T., & Adugna, M. (2022). Pharmacological evaluation of medicinal plants with antidiabetic activities in Ethiopia: A review. *Metabolism Open*, 100174. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2022.100174>.

Khan, A., Petropoulos, I. N., Ponirakis, G., & Malik, R. A. (2017). Visual complications in diabetes mellitus: beyond retinopathy. *Diabetic medicine*, 34(4), 478-484.

Kim, H. Y., & Kim, K. (2003). Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6), 1586-1591.

Kindl, M., Blažeković, B., Bucar, F., & Vladimir-Knežević, S. (2015). Antioxidant and anticholinesterase potential of six thymus species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Kreft, S., Knapp, M. et Kreft, I. (1999). Extraction de la rutine des graines de sarrasin (*Fagopyrum esculentum* Moench) et dosage par électrophorèse capillaire. *Journal de chimie agricole et alimentaire*,

Krishnan, B., Ganesan, A. R., Balasubramani, R., Nguyen, D. D., Chang, S. W., Wang, S., ... & Balasubramanian, B. (2020). Chrysoeriol ameliorates hyperglycemia by regulating the carbohydrate metabolic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Science and Human Wellness*, 9(4), 346-354. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.05.014>.

Krishnan, V., Rani, R., Awana, M., Pitale, D., Kulshreshta, A., Sharma, S., ... & Praveen, S. (2021). Role of nutraceutical starch and proanthocyanidins of pigmented rice in regulating

hyperglycemia: Enzyme inhibition, enhanced glucose uptake and hepatic glucose homeostasis using in vitro model. *Food Chemistry*, 335, 127505. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127505>.

Kuo, T., McQueen, A., Chen, T. C., & Wang, J. C. (2015). Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Glucocorticoid signaling*, 99-126.

### L

Lazarow, A. (1946). Protective Effect of Glutathione and Cysteine Against Alloxan Diabetes in the Rat. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 61(4), 441-447.

Lazarow, A., Patterson, JW et Levey, S. (1948). Le mécanisme de protection de la cystéine et du glutathion contre le diabète alloxane. *Sciences*, 108 (2803), 308-309.

Lohourignon, A. L. (2021). Contribution au diagnostic et à la prise en charge du diabète sucré en Côte d'Ivoire. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 205(6), 566-573.

Leloir, L. F., & Goldemberg, S. H. (1962). [14] Glycogen synthetase from rat liver:(Glucose) n+ (UDPG)→(Glucose) n+ 1+ UDP. In *Methods in enzymology*, 5, pp. 145-147. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(62\)05196-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(62)05196-4).

Liang, C. P., Chang, C. H., Liang, C. C., Hung, K. Y., Hsieh, C. W. (2014). In vitro antioxidant activities, free radical scavenging capacity, and tyrosinase inhibitory of flavonoid compounds and ferulic acid from *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames. *Molecules*, 19(4), 4681-4694.

Lundholm, M. D., Emanuele, M. A., Ashraf, A., & Nadeem, S. (2020). Applications and pitfalls of hemoglobin A1C and alternative methods of glycemic monitoring. *Journal of Diabetes and its Complications*, 34(8), 107585. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107585>.

### M

M Eid, H., & S Haddad, P. (2017). Le potentiel antidiabétique de la quercétine : mécanismes sous-jacents. *Chimie médicinale actuelle*, 24 (4), 355-364.

Ma, J., Nakagawa, Y., Kojima, I., & Shibata, H. (2014). Prolonged insulin stimulation down-regulates GLUT4 through oxidative stress-mediated retromer inhibition by a protein kinase CK2-dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), 133-142.

Mabate, B., Daub, C. D., Malgas, S., Edkins, A. L., & Pletschke, B. I. (2021). Fucoidan structure and Its impact on glucose metabolism: Implications for diabetes and cancer therapy. *Marine drugs*, 19(1), 30. <https://doi.org/10.3390/md19010030>.

Monnier, L., Halimi, S., & Colette, C. (2022). La recherche de nouvelles typologies des états diabétiques est-elle utile pour promouvoir une meilleure thérapeutique de précision ? *Médecine des Maladies Métaboliques*, 16(5), 477-481.

Macgregor, J. T., & Jurd, L. (1978). Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 54(3), 297-309.

Monnier, L., Fève, B., & Halimi, S. (2021). Classifications des diabètes qui surviennent chez l'adulte : actualisation. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 15(7), 687-692.

Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2019). L'îlot pancréatique : ce que nous savons 150 ans après Langerhans. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 203(8-9), 670-682.

- Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification* (Vol. 36). London: Academic press.
- Matsuura, N., Aradate, T., Sasaki, C., Kojima, H., Ohara, M. (2002). Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts. *Journal of health science*, 48(6), 520-526.
- Megateli, S., & Krea, M. (2018). Enhancement of total phenolic and flavonoids extraction from *Rosmarinus officinalis* L using electromagnetic induction heating (EMIH) process. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(5), 889-897.
- Mendes, C. P., Postal, B. G., Frederico, M. J. S., Elias, R. G. M., de Medeiros Pinto, V. A., da Fonte Ramos, C., ... & Silva, F. R. M. B. (2021). Synthesis of a novel glibenclamide-pioglitazone hybrid compound and its effects on glucose homeostasis in normal and insulin-resistant rats. *Bioorganic Chemistry*, 114, 105157. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105157>.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, TC (2000). Les effets des flavonoïdes végétaux sur les cellules de mammifères : implications pour l'inflammation, les maladies cardiaques et le cancer. *Revue pharmacologique*, 52 (4), 673-751.
- Miyamoto, T., & Amrein, H. (2017). Gluconeogenesis: An ancient biochemical pathway with a new twist. *Fly*, 11(3), 218-223.
- Momtaz, S., Salek-Maghsoudi, A., Abdolghaffari, A. H., Jasemi, E., Rezazadeh, S., Hassani, S., ... & Nabavi, S. M. (2019). Polyphenols targeting diabetes via the AMP-activated protein kinase pathway; future approach to drug discovery. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 56(7), 472-492. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1648376>.
- Morales, M. A., Jabbagy, A. J., & Terenizi, H. R. (1973). Mutations affecting accumulation of glycogen. *Neurospora News Lett*, 20(1), 24-25. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1830>.
- Müller, T. D., Finan, B., Clemmensen, C., DiMarchi, R. D., & Tschöp, M. H. (2017). The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiological reviews*, 97(2), 721–766.
- Munday, R. (1988). Dialuric acid autoxidation: effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of “active oxygen” species. *Biochemical pharmacology*, 37(3), 409-413.

### N

- Nickavar, B., & Esbati, N. (2012). Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 5(3), 119-125.
- Nyenwe, E. A., & Kitabchi, A. E. (2016). The evolution of diabetic ketoacidosis: An update of its etiology, pathogenesis and management. *Metabolism*, 65(4), 507-521.

### O

- Ogar, I., Egbung, G. E., Nna, V. U., Iwara, I. A., & Itam, E. (2018). Anti-hyperglycemic potential of *Hyptis verticillata* jacq in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1268-1276. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.115>.
- Okayasu, S., Kitaichi, K., Hori, A., Suwa, T., Horikawa, Y., Yamamoto, M., ... & Itoh, Y. (2012). L'évaluation des facteurs de risque associés aux effets indésirables des médicaments par la metformine dans le diabète sucré de type 2. *Bulletin Biologique et Pharmaceutique*, 35 (6), 933-937.

Ottensmeyer, FP, Beniac, DR, Luo, RZT et Yip, CC (2000). Mécanisme de signalisation transmembranaire : liaison à l'insuline et récepteur de l'insuline. *Biochimie*, 39 (40), 12103-12112.

Oubihi, A., Hosni, H., Nounah, I., Ettouil, A., Harhar, H. (2020). Phenolic Content, Antioxidant Activity, Anti-Inflammatory Potential, and Acute Toxicity Study of *Thymus leptobotrys* Murb. Extracts. *Biochemistry Research International*, 2020.

Oumeish, O. Y. (2001). The cultural and philosophical concepts of cosmetics in beauty and art through the medical history of mankind. *Clinics in dermatology*, 19(4), 375-386.

Owokotomo, I. A., Ekundayo, O., Abayomi, T. G., Chukwuka, A. V. (2015). In-vitro anti-cholinesterase activity of essential oil from four tropical medicinal plants. *Toxicology reports*, 2, 850-857.

## P

Pagoni, A., Marinelli, L., Di Stefano, A., Ciulla, M., Turkez, H., et al. (2020). Novel anti-Alzheimer phenol-lipoyl hybrids: Synthesis, physico-chemical characterization, and biological evaluation.

Panche, AN, Diwan, AD et Chandra, SR (2016). Flavonoïdes : un aperçu. *Journal des sciences nutritionnelles*, 5.

Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., Tudoreanu, L., & Ștefan, G. (2021). Plant polyphenols mechanisms of action on insulin resistance and against the loss of pancreatic beta cells. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 325-352. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1815644>.

Patel, K., Singh, GK et Patel, DK (2018). Une revue des aspects pharmacologiques et analytiques de la naringénine. *Revue chinoise de médecine intégrative*, 24 (7), 551-560.

Peng, J., Li, Q., Li, K., Zhu, L., Lin, X., Lin, X., ... & Xie, X. (2017). La quercétine améliore le métabolisme du glucose et des lipides des rats diabétiques : implication de la signalisation Akt et SIRT1. *Journal de recherche sur le diabète*, 2017.

Picot, M. C. N., Mahomoodally, M. F. (2017). Effects of *Aphloia theiformis* on key enzymes related to diabetes mellitus. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 864-872.

Pottier-Alapetite, G. (1981). Flore de la Tunisie Angiospermes Dicotylédones Gamopétales., pp. 809–811.

Preshaw, P. M., & Bissett, S. M. (2019). Periodontitis and diabetes. *British dental journal*, 227(7), 577-584. <https://doi.org/10.1038/s41415-019-0794-5>.

Prince, PSM, & Kamalakkannan, N. (2006). La rutine améliore l'homéostasie du glucose dans les tissus diabétiques streptozotocine en modifiant les enzymes glycolytiques et gluconéogéniques. *Tourillon de toxicologie biochimique et moléculaire*, 20 (2), 96-102.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

## Q

Quézel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2. Édit. CNRS, Paris, 603 p.

## R

Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 78, 13–31.

Ramu, R., Shirahatti, P. S., Zameer, F., Ranganatha, L. V., & Prasad, M. N. (2014). Inhibitory effect of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents Umbelliferone and Lupeol on  $\alpha$ -glucosidase, aldose reductase and glycation at multiple stages. *South African Journal of Botany*, 95, 54-63.

Raschetti, R., Albanese, E., Vanacore, N., Maggini, M. (2007). Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials. *PLoS medicine*, 4(11), e338. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040338>.

Rašeta, M., Popović, M., Čapo, I., Stilinović, N., Vukmirović, S., Milošević, B., & Karaman, M. (2020). Antidiabetic effect of two different *Ganoderma* species tested in alloxan diabetic rats. *RSC advances*, 10(17), 10382-10393. <https://doi.org/10.1039/c9ra10158f>.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Ricardo, KFS, Oliveira, TTD, Nagem, TJ, Pinto, ADS, Oliveira, MGA et Soares, JF (2001). Effet des flavonoïdes morin ; quercétine et acide nicotinique sur le métabolisme lipidique de rats nourris expérimentalement avec du triton. *Archives brésiliennes de biologie et technologie*, 44, 263-267.

Rodrigues, E. L., Marcelino, G., Silva, G. T., Figueiredo, P. S., Garcez, W. S., Corsino, J., ... & Freitas, K. D. C. (2019). Nutraceutical and medicinal potential of the *Morus* species in metabolic dysfunctions. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 301. <https://doi.org/10.3390/ijms20020301>.

Rodriguez-Diaz, R., Abdulreda, MH, Formoso, AL, Gans, I., Ricordi, C., Berggren, PO et Caicedo, A. (2011). Modèles d'innervation des axones autonomes dans le pancréas endocrinien humain. *Métabolisme cellulaire*, 14 (1), 45-54.

Roghani-Shahraki, H., Karimian, M., Valipour, S., Behjati, M., Arefnezhad, R., & Mousavi, A. (2021). Herbal therapy as a promising approach for regulation on lipid profiles: A review of molecular aspects. *Journal of Cellular Physiology*, 236(8), 5533-5546. <https://doi.org/10.1002/jcp.30282>.

Rolla, AR (2009). Répondre à la nécessité d'adapter le traitement au spectre du diabète de type 2 : nouvelles perspectives. *Technologie et thérapeutique du diabète*, 11 (5), 267-274.

Rose, A. J., Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2010). Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 122(1-3), 10-20.

Rozance, PJ et Hay Jr, WW (2010). Décrire l'hypoglycémie : définition ou seuil opérationnel ? *Développement humain précoce*, 86 (5), 275-280.

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 4: 177–197.

## S

- Sahu, S. C., & Gray, G. C. (1993). Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Letters*, 70(1-2), 73-79.
- Salles, B. C. C., Leme, K. C., da Silva, M. A., da Rocha, C. Q., Tangerina, M. M., Vilegas, W., ... & de Araújo Paula, F. B. (2021). Protective effect of flavonoids from *Passiflora edulis* Sims on diabetic complications in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(10), 1361-1368. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab046>.
- Sircar, M., Bhatia, A., & Munshi, M. (2016). Review of hypoglycemia in the older adult: clinical implications and management. *Canadian journal of diabetes*, 40(1), 66-72.
- Salem, MAEK, Adly, AAM, Ismail, EAR, Darwish, YW et Kamel, HA (2015). Les microparticules plaquettaires comme lien entre micro- et macro-angiopathie chez les jeunes patients diabétiques de type 1. *Plaquettes*, 26 (7), 682-688.
- Sapin, R. (2003). Insulin Assays: Previously known and New Analytical Features. *Clin Lab*. 49 (3-4):113-121. PMID: 12705692.
- Saravanakumar, K., Park, S., Mariadoss, A. V. A., Sathiyaseelan, A., Veeraraghavan, V. P., Kim, S., & Wang, M. H. (2021). Chemical composition, antioxidant, and anti-diabetic activities of ethyl acetate fraction of *Stachys riederi* var. *japonica* (Miq.) in streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 155, 112374. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112374>.
- Sasikala, S., & Naidu, M. D. (2019). Evaluation of protective effect of *Centella asiatica* leaves on pancreas function in diabetic rats. *International Journal of Herbal Medicine*, 7(1), 55-60. <https://doi.org/10.31142/ijahm/v9i3.06>.
- Sayem, A. S. M., Arya, A., Karimian, H., Krishnasamy, N., Ashok Hasamnis, A., & Hossain, C. F. (2018). Action of phytochemicals on insulin signaling pathways accelerating glucose transporter (GLUT4) protein translocation. *Molecules*, 23(2), 258.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282.
- Schellenberg, ES, Dryden, DM, Vandermeer, B., Ha, C. et Korownyk, C. (2013). Interventions sur le mode de vie des patients atteints et à risque de diabète de type 2 : une revue systématique et une méta-analyse. *Annales de médecine interne*, 159 (8), 543-551.
- Sekar, V., Mani, S., Malarvizhi, R., Barathidasan, R., & Vasanthi, H. R. (2020). Positive interaction of mangiferin with selected oral hypoglycemic drugs: A therapeutic strategy to alleviate diabetic nephropathy in experimental rats. *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4465-4475. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05517-0>.
- Sen, P. B., & Bhattacharya, G. (1952). Protection against alloxan diabetes by glucose. *Indian J. Physiol*, 6, 112-114.
- Sendrayaperumal, V., Pillai, S. I., & Subramanian, S. (2014). Design, synthesis and characterization of zinc–morin, a metal flavonol complex and evaluation of its antidiabetic potential in HFD–STZ induced type 2 diabetes in rats. *Chemico-biological interactions*, 219, 9-17.
- Sharabi, K., Tavares, CD, Rines, AK et Puigserver, P. (2015). Physiopathologie moléculaire de la production hépatique de glucose. *Aspects moléculaires de la médecine*, 46, 21-33.

- Shearer, A. M., Wang, Y., Fletcher, E. K., Rana, R., Michael, E. S., Nguyen, N., ... & Kuliopulos, A. (2022). PAR2 promotes impaired glucose uptake and insulin resistance in NAFLD through GLUT2 and Akt interference. *Hepatology*.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in enzymology*, 335, 157-166.
- Singh, AK, Raj, V., Keshari, AK, Rai, A., Kumar, P., Rawat, A., ... & Saha, S. (2018). La mangiférine et la naringénine isolées exercent un effet antidiabétique via une double action agoniste PPAR $\gamma$ /GLUT4 avec une forte régulation métabolique. *Interactions chimico-biologiques*, 280, 33-44.
- Singh, J., Rasane, P., Nanda, V., & Kaur, S. (2022). Bioactive compounds of corn silk and their role in management of glycaemic response. *Journal of Food Science and Technology*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05442-z>.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16, 144–58.
- Skibola, CF et Smith, MT (2000). Impacts potentiels sur la santé d'un apport excessif en flavonoïdes. *Biologie et médecine des radicaux libres*, 29 (3-4), 375-383.
- Sreedharan, V., Venkatachalam, K. K., & Namasivayam, N. (2009). Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Investigational new drugs*, 27(1), 21-30.
- Steiner, D., Marçon, C. R., & Sabban, E. N. C. (2018). Diabetes, non-enzymatic glycation, and aging. In *Dermatology and Diabetes* (pp. 243-279). Springer, Cham.
- Strubbe, JH (1992). Implication parasymphatique dans la sécrétion rapide d'insuline conditionnée associée au repas chez le rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 263 (3), R615-R618.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & Van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346.
- Sundaram, R., Nandhakumar, E., & Haseena Banu, H. (2019). Hesperidin, a citrus flavonoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(9), 644-653. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1646370>.
- Suzuki, S., Takada, T., Sugawara, Y., Muto, T. et Ryo, R. (1991). La quercétine induit des mutations recombinatoires dans les cellules en culture, détectées par les empreintes génétiques. *Journal japonais de recherche sur le cancer*, 82 (10), 1061-1064.

## T

- Taborsky Jr, GJ, Ahrén, B., Mundinger, TO, Mei, Q., & Havel, PJ (2002). Mécanisme autonome et anomalies de la réponse du glucagon à l'hypoglycémie induite par l'insuline. *Diabète, nutrition et métabolisme*, 15 (5), 318-22.
- Tomic, D., Shaw, JE et Magliano, DJ (2022). Le fardeau et les risques des complications émergentes du diabète sucré. *Nature Reviews Endocrinology* , 18 (9), 525-539.
- Tanveer, A., Akram, K., Farooq, U., Hayat, Z., & Shafi, A. (2017). Management of diabetic complications through fruit flavonoids as a natural remedy. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(7), 1411-1422.

Thilakarathna, SH, & Rupasinghe, HV (2013). Biodisponibilité des flavonoïdes et tentatives d'amélioration de la biodisponibilité. *Nutriments*, 5 (9), 3367-3387.

Thomas, I., & Gregg, B. (2017). Metformine ; un retour sur son histoire et son avenir : du lilas à la longévité. *Diabète pédiatrique*, 18 (1), 10-16.

Toma, L., Stancu, C. S., & Sima, A. V. (2020). Endothelial dysfunction in diabetes is aggravated by glycated lipoproteins; novel molecular therapies. *Biomedicines*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010018>.

Tonade, D., & Kern, T. S. (2021). Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 83, 100919.

Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273.

## U

Unger, RH (1985). Physiologie et physiopathologie du glucagon à la lumière des nouvelles avancées. *Diabetologia*, 28 (8), 574-578.

## V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MT, Mazur, M., & Telser, J. (2007). Radicaux libres et antioxydants dans les fonctions physiologiques normales et les maladies humaines. *La revue internationale de biochimie et de biologie cellulaire*, 39 (1), 44-84.

Vinayagam, R., & Xu, B. (2015). Propriétés antidiabétiques des flavonoïdes alimentaires : une revue du mécanisme cellulaire. *Nutrition et métabolisme*, 12 (1), 1-20.

Vinayagam, R., Jayachandran, M., Chung, S. S. M., & Xu, B. (2018). Guava leaf inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via AMPK/ACC signaling pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1012-1017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.127>.

Vishmi, S. T., Srianthie. A, D., Chamira, D. F., Dinusha, N. U. (2018). In Vitro  $\alpha$ -Amylase and Protein Glycation Inhibitory Activity of the Aqueous Extract of *Flueggea leucopyrus* Willd. *Journal of Chemistry*, vol. 2018, Article ID 2787138, 7 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2787138>.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A. D., et al. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, 19(1), 767-782.

## W

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*, 27(5),

Winterbourn, C. C., & Munday, R. (1989). Glutathione-mediated redox cycling of alloxan: mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH formation. *Biochemical pharmacology*, 38(2), 271-277.

Woods, SC, & Porte Jr, DANIEL (1974). Contrôle neuronal du pancréas endocrine. *Revue physiologiques*, 54 (3), 596-619.

Wortmann, M. (2012). Dementia: a global health priority-highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimer's research & therapy*, 4(5), 1-3.

Wang, YZ, Fu, SG, Wang, SY, Yang, DJ, Wu, YHS et Chen, YC (2018). Effets d'un antioxydant naturel, extrait de romarin riche en polyphénols (*Rosmarinus officinalis* L.), sur la stabilité lipidique de l'huile riche en acides gras oméga-3 d'origine végétale. *LWT*, 89, 210-216.

## X

Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., & Chen, X. (2013). Advance in dietary polyphenols as  $\alpha$ -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(8), 818-836.

## Y

Yao, Z., Gu, Y., Zhang, Q., Liu, L., Meng, G., Wu, H., ... et Niu, K. (2019). Apport quotidien estimé en quercétine et association avec la prévalence du diabète sucré de type 2 chez les adultes chinois. *Revue européenne de nutrition*, 58 (2), 819-830.

Yimam, M., Lee, YC, Jiao, P., Hong, M., Brownell, L. et Jia, Q. (2017). Une composition standardisée composée d'extraits de *Rosmarinus officinalis*, d'*Annona squamosa* et de *Zanthoxylum clava-herculis* pour la cellulite. *Recherche en pharmacognosie*, 9 (4), 319.

Yong, J., Johnson, J.D., Arvan, P. et al. (2021). Therapeutic opportunities for pancreatic  $\beta$ -cell ER stress in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 17, 455–467. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00510-4>.

## Z

Zangeneh, M. M., Zangeneh, A., Almasi, M., Tahvilian, R., Hosseini, F., & Moradi, R. (2018). A comparative study of hepatoprotective effect of *Inula britannica* L aqueous extract and glibenclamide in streptozotocin-induced diabetic mice. *Comparative Clinical Pathology*, 27(6), 1649-1657. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2789-z>.

Zengin, G., Sarikurcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.

Zhang, L., Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Smith, P. T., ... & Wu, M. J. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12361-12367.

Zhang, R., Qin, X., Kong, F., Chen, P. et Pan, G. (2019). Amélioration de l'absorption cellulaire d'entités thérapeutiques par interaction avec des composants de la membrane cellulaire. *Livraison de médicaments*, 26 (1), 328-342.

Zhang, T., Wang, S., Lin, Y., Xu, W., Ye, D., Xiong, Y., ... & Guan, K. L. (2012). Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1. *Cell metabolism*, 15(1), 75-87.

Zheng, Y., Ley, SH et Hu, FB (2018). Étiologie et épidémiologie globales du diabète sucré de type 2 et de ses complications. *Nature examine l'endocrinologie*, 14 (2), 88-98.

Zheng, Z., Zhu, W., Yang, B., Chai, R., Liu, T., Li, F., ... & Li, G. (2018). The co-treatment of metformin with flavone synergistically induces apoptosis through inhibition of PI3K/AKT pathway in breast cancer cells. *Oncology Letters*, 15(4), 5952-5958.

# **Annexes**

## ANNEXES

## 1. Courbe d'étalonnage pour dosage des polyphénoles totale (TPC)

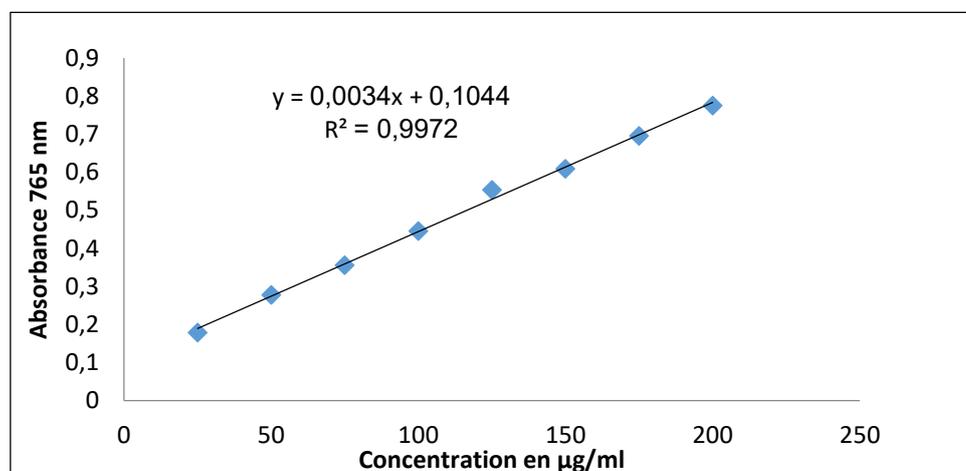


Figure A Courbe d'étalonnage pour dosage des polyphénole.

## 2. Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes (TFC)

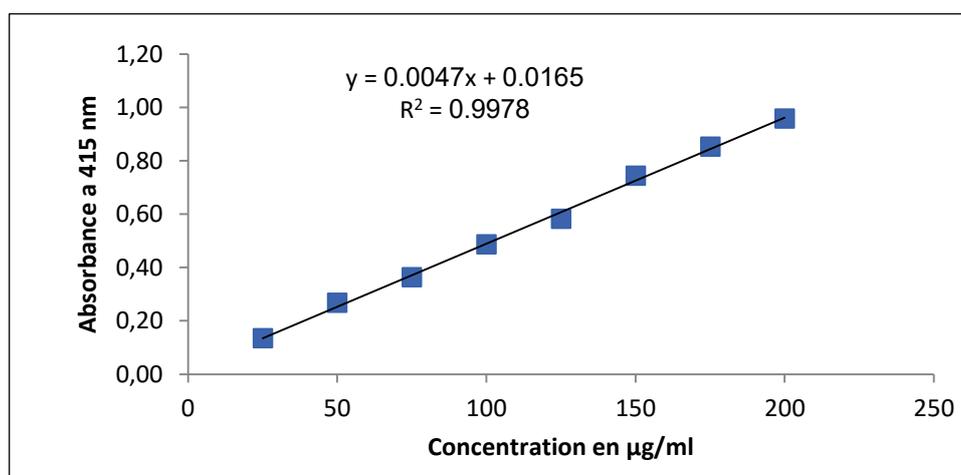
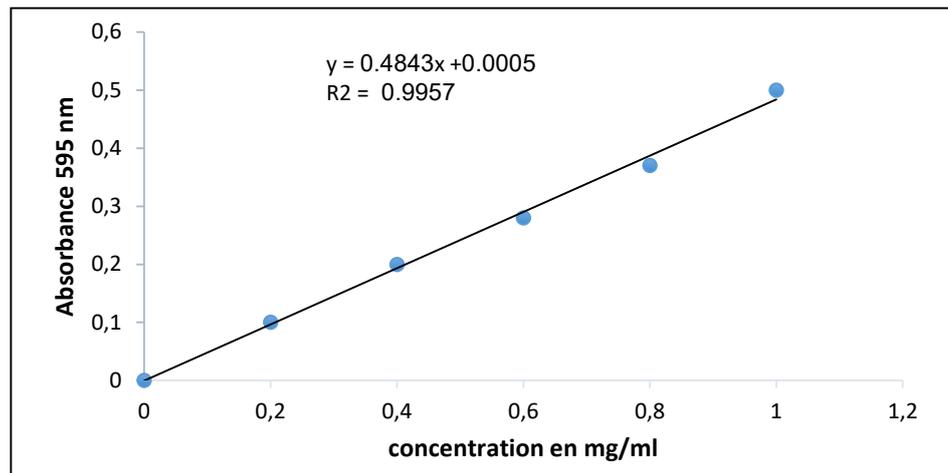


Figure B Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes.

### 3. Courbe d'étalonnage des protéines tissulaires utilisant le sérum albumine bovin (BSA)



**Figure C** Courbe d'étalonnage des protéines tissulaires.