



Royaume du Maroc
Université Mohammed V-Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie



Année : 2020

Thèse N° : 3/20 CSVS

CENTRE DES ETUDES DOCTORALES DES SCIENCES
DE LA VIE ET DE LA SANTE

Formation doctorale : Sciences du Médicament

Thèse de doctorat

**Etude phytochimique et pharmacologique du potentiel
antidiabétique des plantes *Cistus salviifolius* L.
& *Cistus monspeliensis* L. du Maroc**

Présentée et soutenue publiquement le : 29/06/2021

Par : Karima SAYAH

MEMBRES DE JURY

Pr. Yahia CHERRAHPrésident
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat

Pr. Moulay El Abbas FAOUZIDirecteur de thèse
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat

Pr. Khalid TAGHZOUTIRapporteur
Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat

Pr. Youssef BAKRIRapporteur
Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat

Pr. Issad NASRIRapporteur
Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan II de Casablanca

Pr. Abdelhalim MESFIOUIExamineur
Faculté des sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra

Pr. Jaouad El HARTIExamineur
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat

Dédicace



A la mémoire de mon cher père,

*Les mots ne pourront jamais exprimer ma profonde considération et mon immense gratitude !
Puisse dieux le tout puissant lui accorde la paix éternelle et l'accueille dans son vaste paradis.*

A ma chère mère,

*En témoignage de brut d'années de sacrifices, d'encouragement et de soutien.
J'implore dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.*

A ma chère sœur Hanane et mon cher frère Hamid

En témoignage de mon affection fraternelle, avec mes vœux sincères de réussite et de bonheur. Que vos rêves soient en tous exaucés.

A tous mes amis et collègues

En souvenir de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

A Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Karima

Remerciement

*J'ai eu l'honneur et le privilège de réaliser ce travail de thèse au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat sous la direction du Monsieur le **Professeur Moulay El Abbes Faouzi**.*

*Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le **Professeur Mohamed Adnaoui** le Doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, et Monsieur le **Professeur Taoufiq Dakka** le Vice-Doyen à la Recherche et la Coopération de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour l'intérêt qu'ils portent à la recherche scientifique.*

*Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse **Monsieur le professeur Moulay El Abbes Faouzi** pour son sens de responsabilité, et sa disponibilité, et pour tout le soutien, et la confiance qu'il m'a accordé tout le long de la préparation de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma vive reconnaissance.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le **Professeur Yahia Cherrah** le chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour l'encouragement et la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant au sein du laboratoire. Vous m'avez accordé un grand honneur en acceptant de présider le jury de ma thèse. Veuillez, trouver dans ce modeste travail l'expression de ma haute considération et mon profond respect.*

*Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le **Professeur Khalid Taghzouti**, de la Faculté des sciences de Rabat d'avoir accepté de juger ce travail. Durant mes années d'étude à la faculté des sciences, j'ai eu la chance de vous avoir comme enseignant, je garde un excellent souvenir de la qualité de l'enseignement que vous nous avez prodigués. C'est pour moi un grand honneur et un grand plaisir de vous voir siéger parmi les membres de jury de ma thèse. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon sincère respect.*

*Je remercie sincèrement Monsieur le **Professeur Youssef Bakri** de la Faculté des sciences de Rabat, d'avoir accepté avec amabilité de juger ce travail. Veuillez recevoir l'expression de toute ma gratitude et de mon sincère respect.*

*Je tiens à exprimer ma respectueuse gratitude à Monsieur le **Professeur Isaad Nasri** de la Faculté des sciences et Techniques de Mohammedia, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Soyez assuré de mon sincère respect.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le **Professeur Abdelhalim Mesfioui**, de la Faculté des Sciences de Kénitra d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'honorer par sa présence le jury de ma thèse. Veuillez recevoir l'expression de toute ma gratitude et de mon sincère respect.*

*Je tiens à adresser mes sincères remerciements à **Monsieur le Professeur Jaouad El Harti** de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour avoir aimablement accepté d'examiner ce travail. Veuillez croire, Monsieur, à l'assurance de ma gratitude et de mon sincère respect.*

*Je tiens à adresser mes vifs remerciements à Madame le **Professeur Sevser Sahpaz**, chef de service du laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lille, France, pour sa contribution à la réalisation des analyses phytochimiques, et pour l'accueil chaleureux au sein de son laboratoire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Monsieur Mostapha Kouach** de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lille, France, pour son aide précieux dans la réalisation des analyses en spectrométrie de masse.*

*Mes vifs remerciements s'adresse aussi à Madame **Jennifer**, technicienne au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lille, France, pour son aide précieux dans la réalisation des analyses phytochimiques.*

*Je remercie sincèrement Monsieur le **Professeur Rachid Nejjari** du Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Monsieur le*

Professeur Faouzi Kichou de l'Unité d'Histologie et d'Anatomie Pathologique de Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, et Monsieur le Professeur Soufiane Derraji du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie vivement Madame Hayat Aouari technicienne du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour sa disponibilité et serviabilité, et l'ensemble des membres du Laboratoire. Je remercie plus spécialement tous mes collègues pour la richesse de nos échanges et pour leurs encouragements.

Avant-propos

Ce travail a été réalisé principalement au sein du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Maroc, sous la direction du Pr. Moulay El Abbes Faouzi.

Une partie de l'analyse phytochimique a été réalisé au sein du laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille, France.

Une partie de l'analyse histologique a été réalisé au sein de l'unité d'Histologie et Anatomie Pathologique à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.

Production scientifique

Articles scientifiques en rapport avec le sujet de thèse

1. **Sayah, K.**, Naceiri Mrabti, H., Belarj, B., Kichou, F., Cherrah, Y., Faouzi, M.E.A., 2020. Evaluation of antidiabetic effect of *Cistus salviifolius* L. (Cistaceae) in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32.

2. **Sayah, K.**, Marmouzi, I., Naceiri Mrabti, H., Cherrah, Y. and Faouzi, M.E.A., 2017. Antioxidant activity and inhibitory potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *BioMed Research International*, 2017.

3. **Sayah, K.**, Chemlal, L., Marmouzi, I., El Jemli, M., Cherrah, Y. and Faouzi, M.E.A., 2017. In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts. *South African Journal of Botany*, 113, pp.160-163.

Article soumis:

4. **Sayah, K.**, Nejjar R., Cherrah, Y., Faouzi, M.E.A., Phytochemical investigation, sugar digestive enzymes inhibitory activity and radical scavenging capacity of different solvent fractions of two Moroccan *Cistus* L. species. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*.

Participation au congrès et journées scientifiques

- **Communications orales**

1. **Karima Sayah**, Hanae Naceiri Mrabeti, Ilias Marmouzi, Badia Belarj, Zohra Ouzzif, Yahia Cherrah, My El Abbas Faouzi. "Effect of *Cistus monspeliensis* (L.) on carbohydrate hydrolyzing enzymes activity and experimental type II diabetes", au *8ème journées scientifiques du CEDoc SVS et 5ème journées scientifiques d'AMADOC-SVS*, Nutrition et prévention des maladies, mythe ou réalité ?, le 27-31 Mars 2018 à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

2. Karima Sayah, Ilias Marmouzi, Hanae Naceiri Mrabti, Yahia Cherrah, My Faouzi. "Inhibitory effects of *Cistus salviifolius* (L.), and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts on key enzymes linked to type 2 diabetes", au *Deuxième Edition du Congrès International des Sciences Pharmaceutiques*, le 17-18 Février 2017 à la Faculté des sciences et Techniques de Béni Mellal.

3. Karima Sayah, Ilias Marmouzi, Hanae Naceiri mrabti, Yahia Cherrah, My Faouzi "Effet protecteur de l'extrait aqueux de *Cistus salviifolius* (L.) contre le stress oxydatif associé au diabète sucré", au *Colloque International : Substances naturelles Stress et métabolismes cellulaires*, Le 15 et 16 Décembre 2016, à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat.

4. Karima Sayah, Ilias Marmouzi, Yahia Cherrah, My El Abbes Faouzi. "Potentiel inhibiteur contre les enzymes α -amylase et α -glucosidase et propriété anti-oxydante de l'extrait aqueux de *Cistus salviifolius* (L.)", à la *5^{ème} Edition Internationale des Journées Jeunes Chercheurs de Chimie Thérapeutique 2016 : Place de la Phytothérapie et la Chimie Médicinale dans le Processus de «DRUG DISCOVERY»*, le 28-29 Novembre 2016, à la Faculté Polydisciplinaire de Taza.

5. Participation au *concours Francophone International « Ma thèse en 180 secondes »* de l'Université Mohammed V-Rabat, édition **2018**.

- **Communications affichées**

1. Karima Sayah, Badia Belarej, Fouzi Kichou, Zohra Ouzzif, Yahia Cherrah, My El Abbes Faouzi. "Evaluation of antidiabetic effect of *Cistus salviifolius* L (*Cistaceae*) in Streptozotocine-nicotinamide diabetic mice", à la *5^{ème} édition du forum Africain de Santé* organisé par la Fondation Cheikh Zaid et l'Université Internationale Abulcasis des sciences de la santé. Le 14 Juin 2019 à Rabat.

2. Karima Sayah, Ilias Marmouzi, Yahia Cherrah, My El Abbes Faouzi. "Phytochemical screening, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Cistus salviifolius*L., and *Cistus monspeliensis*L., of Morocco", au *Congrès International "The plant kingdom : source of drugs, nutraceuticals and cosmetics"*, organisé par IOCD (International Organisation for Chemical Sciences in Development) et la Faculté des sciences de Rabat. Le 7-10 Avril 2015 à Merrakech.

Sommaire

Production scientifique	7
Liste des abréviations.....	13
Liste des figures	14
Liste des tableaux.....	15
Introduction générale.....	16
Synthèse bibliographique.....	19
I. Généralité sur le diabète de type 2.....	20
I.1. Rôle du pancréas dans l'homéostasie glucidique	20
I.2. Physiopathologie du diabète de type 2	22
I.2.1. Insulino-résistance	22
I.2.2. Insulino-déficience.....	22
II. Stress oxydatif	23
II.1. Conséquences biochimiques du stress oxydant	23
II.1.1. Oxydation des lipides	23
II.1.2. Oxydation des protéines	24
II.1.3. Oxydation de l'ADN.....	25
II.2. Les antioxydants.....	25
II.2.1. Systèmes de défenses antioxydants	26
II.2.2. Les antioxydants naturels.....	27
II.2. 3. Les antioxydants synthétiques	30
III. Stress oxydatif et diabète de type 2.....	31
IV- Inflammation	32
IV.1. Phases de l'inflammation	32
IV.2. Médiateurs de l'inflammation.....	34
VI.3. Les anti-inflammatoires	35
VI.4. Diabète de type 2 et inflammation.....	36
V. Traitement du diabète	37
V.1. Traitement médicamenteux.....	37
V.2. Phytothérapie du diabète.....	38
VI. Les plantes <i>Cistus salvifolius</i> L. et <i>Cistus monspeliensis</i> L.	40
VI.1. Classification et description botanique	40

VI.2. Répartition géographique	42
VI. 3. Utilisations traditionnelles.....	42
VI.4. Etudes phytochimiques	43
VI.4. Etudes pharmacologiques	44
Matériel et méthodes.....	45
Chapitre I : Caractérisation phytochimique.....	46
I. Matériel végétal	46
II. Préparation des extraits	46
III. Screening phytochimique.....	46
IV. Dosage des composés phénoliques.....	49
IV.1. Dosage des polyphénols	49
IV.2. Dosage des flavonoïdes.....	50
IV. 3. Dosage des proanthocyanidines	50
V. Composition minérale	51
VI. Analyse statistique	51
Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique chez la souris.....	52
I. Animaux	52
II. Etude de la toxicité chez la souris.....	52
II.1. Toxicité aiguë	52
II. 2. Etude des effets sur les paramètres biochimiques.....	53
III. Test de tolérance au glucose	54
IV. Induction du diabète	55
V. Traitement et mesure de la glycémie	56
VI. Analyse des paramètres biochimiques	56
VII. Analyse histopathologique du pancréas	57
VIII. Analyse statistique	59
Chapitre III : Etude des mécanismes d'action des extraits.....	60
I. Etude du potentiel inhibiteur des extraits sur l'activité des enzymes digestives de sucre.....	60
I.1. Test d'inhibition de l' α -Amylase	60
I.2. Test d'inhibition de l' α -Glucosidase.....	61
II. Evaluation des effets des extraits sur l'absorption intestinale du glucose.....	62
III. Evaluation de l'effet des extraits sur le stress oxydatif	62
III.1. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	63
III.1.1. Test d'inhibition de DPPH	63

III.1.2. Test de l'ABTS.....	64
III.1.3. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	65
III.1.4. Test d'inhibition de l'oxyde nitrique.....	66
III. 2. Evaluation de l'effet des extraits sur le stress oxydatif chez les souris diabétique.....	68
III. 2.1. Analyse du taux du marqueur MDA	68
III.2. 2. Dosage de l'activité de SOD	69
IV. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	70
V. Analyse statistique.....	72
Chapitre IV : Etude phytochimique bioguidée	73
I. Préparation des fractions.....	73
II. Evaluation de l'activité antioxydante des fractions.....	75
III. Evaluation de l'effet des fractions sur l'α-amylase et α-glucosidase.....	75
IV. Analyse statistique	76
V. Analyse des fractions sur HPLC.....	76
VI. Analyse de la fraction la plus active sur HRMS.....	77
VII. Fractionnement de la fraction la plus active par CPC	77
VIII. Analyse des fractions sur CCM.....	79
IX. Analyse de la fraction la plus active et ses sous-fractions sur UPLC	80
Résultats.....	81
Chapitre I : Caractérisation phytochimique.....	82
I. Rendement d'extraction	82
II. Screening phytochimique	82
III. Dosage des composés phénoliques	83
IV. Composition minérale des plantes <i>C. salviifolius</i> et <i>C. monspeliensis</i>.....	83
Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique	85
I. Etude de la toxicité chez la souris	85
I.1. Toxicité aigue.....	85
I.2. Effets sur les paramètres biochimiques.....	85
II. Test de tolérance au glucose	86
III. Activité antidiabétique.....	87
III.1. Effet sur le poids corporel des souris diabétiques	87
III.2. Activité antihyperglycémique chez les souris diabétiques	88
III.3. Effet sur le profile lipidique	88
III.4. Effet sur les marqueurs rénaux des animaux diabétiques.....	89

III.5. Effet sur les marqueurs hépatiques des animaux diabétiques.....	89
III.6. Histopathologie du pancréas.....	90
Chapitre III : Etude des mécanismes d'action des extraits.....	92
I. Activité inhibitrice d'α-amylase.....	92
II. Activité inhibitrice d'α-glucosidase.....	92
III. Effet sur l'absorption intestinale du glucose.....	93
IV. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	94
IV.1. Activité de piégeage du DPPH.....	94
IV.2. Activité de piégeage de l'ABTS.....	95
IV.3. Pouvoir réducteur du fer.....	96
IV.4. Activité de piégeage de NO'	96
V. Effet sur le stress oxydatif <i>in vivo</i>	97
V.1. Dosage de l'MDA.....	97
V.2. Dosage de SOD	98
VI. Activité anti-inflammatoire.....	98
Chapitre IV : Etude phytochimique bioguidée	100
I. Rendement des fractions.....	100
II. Activité antioxydantedes fractions	100
III. Activité inhibitrice des fractions contre l'α-amylase et l'α-glucosidase.....	103
IV. Analyse des fractions sur HPLC	105
V. Analyse de la fraction la plus active sur HRMS	106
VI. Analyse de la fraction la plus active et de ses sous-fractions sur CCM.....	107
VII. Analyse de la fraction la plus active et de ses sous-fractions sur UPLC	110
Discussion.....	115
Conclusion et perspectives	127
Références bibliographiques	129
Résumé.....	145
Annexes	148

Liste des abréviations

ABTS	2, 2-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdiens
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
CMA	Extrait aqueux de <i>Cistus monspeliensis</i>
CSA	Extrait aqueux de <i>Cistus salviifolius</i>
DPPH	2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl.
FCMA	Fraction aqueuse de <i>Cistus monspeliensis</i>
FCMB	Fraction buthanolique de <i>Cistus monspeliensis</i>
FCME	Fraction éther-di-éthylique de <i>Cistus monspeliensis</i>
FCMH	Fraction hexanique de <i>Cistus monspeliensis</i>
FCSA	Fraction aqueuse de <i>Cistus salviifolius</i>
FCSB	Fraction buthanolique de <i>Cistus salviifolius</i>
FCSE	Fraction éther-di-éthylique de <i>Cistus salviifolius</i>
FCSH	Fraction hexanique de <i>Cistus salviifolius</i>
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
mg EAA/g	milligramme équivalent d'Acide Ascorbique par gramme d'extrait
mg EAG/g	milligramme équivalent d'Acide Gallique par gramme d'extrait
mg EC/g	milligramme équivalent de la Catéchine par gramme d'extrait
mg ER/g	milligramme équivalent de Rutine par gramme d'extrait
MDA	Malonaldialdéhyde
NO	Nitric Oxide
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
PDA	Détecteur à photodiode
SOD	Superoxyde Dismutase
Trolox	6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
QDA	Détecteur de masse ACQUITY

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique du pancréas.....	22
Figure 2: Mécanisme de la peroxydation lipidique	24
Figure 3: La plante <i>Cistus salviifolius</i> L	41
Figure 4: La plante <i>Cistus monspeliensis</i> L.....	41
Figure 5: Principe du dosage de l'activité de l'enzyme α -Glucosidase.....	62
Figure 6: Forme libre et réduit de DPPH	63
Figure 7: Piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H [•]	65
Figure 8 : Réaction de réduction de Fer	66
Figure 9: Principe de la réaction de Griess.....	67
Figure 10: Réaction de malondialdéhyde (MDA) avec l'acide thiobarbiturique (TBA)	69
Figure 11: Principe de dosage de SOD	70
Figure 12: Appareil de pléthysmomètre.....	72
Figure 13 : Appareillage de l'extraction au soxhlet	74
Figure 14: Organigramme de fractionnement	75
Figure 15: Représentation schématique des modes ascendant et descendant en CPC	77
Figure 16: Système d'appareillages de CPC	79
Figure 17: Evolution de la masse corporelle des souris	85
Figure 18: Effet de CSA et CMA sur la tolérance au glucose chez le rat	87
Figure 19 : Effet de CSA et CMA sur le poids corporel des animaux diabétiques	87
Figure 20: Effet de CSA et CMA sur le profil lipidique des animaux diabétiques	89
Figure 21: Examen histopathologique du pancréas	91
Figure 22: Pourcentage d'inhibition de l' α -amylase de CSA et CMA.....	92
Figure 23: Pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase de CSA et CMA	93
Figure 24: Absorption intestinale du glucose de CSA et CMA	94
Figure 25: Pourcentage de réduction de DPPH par CSA et CMA	95
Figure 26: Pourcentage de réduction du radical ABTS ^{•+} par CSA et CMA	95
Figure 27: Pouvoir réducteur de fer de CSA et CMA	96
Figure 28: Pourcentage de réduction de NO [•] par CSA et CMA	96
Figure 29: Pourcentage d'inhibition de l'œdème inflammatoire de CSA et CMA	99
Figure 30: Rendement des fractions de Cistus	100
Figure 31: Pourcentage de réduction du DPPH des fractions	101
Figure 32: Pourcentage de réduction de l'ABTS ^{•+} des fractions	101
Figure 33: Pourcentage d'inhibition de NO [•] des fractions	102
Figure 34: Pourcentage d'inhibition de l' α -amylase des fractions.....	103
Figure 35: Pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase des fractions	104
Figure 36: Spectre de masse de FCMB sur HRMS.....	107
Figure 37: CCM des sous-fractions de FCMB à 365 nm	108
Figure 38: CCM des sous-fractions de FCMB à 254 nm	109
Figure 39: CCM des sous-fractions de FCMB après pulvérisation du réactif de Neud	109
Figure 40: Chromatogramme de l'analyse UPLC- PDA de la fraction FCMB.....	110
Figure 41: Chromatogramme de l'analyse UPLC- PDA des sous fractions de FCMB à 254 nm.....	111
Figure 42: Chromatogramme de l'analyse UPLC- PDA des sous-fractions de FCMB à 365 nm	112

Liste des tableaux

Tableau 1: Rendement en extrait sec de CSA et CMA	82
Tableau 2: Métabolites secondaires caractérisés dans les plantes <i>C.monspeliensis</i> et <i>C.salviifolius</i> ...	82
Tableau 3: Teneurs des extraits en composés phénoliques	83
Tableau 4: Composition minérale de <i>C. salviifolius</i> et <i>C. monspeliensis</i>	84
Tableau 5: Effet de CSA et CMA sur les différents paramètres biochimiques chez la souris	86
Tableau 6: Activité anti-hyperglycémique de CSA et CMA chez les souris diabétiques	88
Tableau 7: Effet de CSA et CMA sur les marqueurs hépatiques et rénaux des souris diabétiques	90
Tableau 8: Valeurs des IC ₅₀ en µg/ml des extraits dans les tests d'inhibition des enzymes α-amylase et α-glucosidase	93
Tableau 9: Valeurs des IC ₅₀ en µg/ml des extraits aqueux dans les tests de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	97
Tableau 10: Effet des extraits aqueux sur le taux de l' MDA dans les tissus hépatiques et rénaux des souris	97
Tableau 11: Effet des extraits aqueux de Cistus sur l'activité de SOD.....	98
Tableau 12: Valeurs des IC ₅₀ (µg/ml) des fractions de Cistus dans les tests de l'activité anti-inflammatoire	102
Tableau 13: Valeurs des IC ₅₀ des fractions dans les tests d'inhibition des enzymes α-amylase et α-glucosidase	104
Tableau 14: Composés phénoliques identifiés dans les fractions dans l'analyse sur HPLC.....	106
Tableau 15: Composés phénoliques identifiés dans les sous-fractions de FCMB en UPLC	113

Introduction générale

Aujourd'hui, l'évolution du mode de vie et d'alimentation notamment au déclin de l'activité physique augmente d'une manière alarmante la prévalence des maladies métaboliques chroniques. Le diabète de type 2, constitue un exemple de ces maladies qui augmente en proportions épidémiques partout dans le monde (Zheng et al 2018). Ce type du diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique avec des altérations du métabolisme glucidique, lipidique et protéiques (Alberti, et Zimmet, 1998). En effet, il peut entraîner un large éventail de complications graves qui affectent presque tous les systèmes du corps humain (Forbes, and Cooper, 2013).

Selon les données rapportées par Cho et *al.* (2018) environ 451 millions de personnes adultes ont souffert du diabète en 2017 au niveau mondiale, ce chiffre atteindrait 693 millions d'ici 2045. Au Maroc le nombre de diabétiques est estimé à 2 millions chez les personnes âgées de 25 ans et plus dont 50% méconnaissent leur maladie (Ministère de la santé 2017). L'évolution exponentielle de cette maladie et de ses complications irréversibles impose aux pays des coûts humains, sociaux, et économiques inacceptables, quel que soit leur niveau de développement. Les facteurs de risque responsable de la propagation du diabète de type 2 sont multifactorielle et comprennent des éléments génétiques, et environnementaux qui influencent la fonction des cellules bêta pancréatique et la sensibilité à l'insuline dans les tissus (Scheen, 2003).

Le diabète s'accompagne généralement d'une production accrue de radicaux libres et/ou d'une altération des capacités de défense antioxydantes, indiquant une contribution majeure des espèces réactives de l'oxygène dans l'émergence, la progression et les conséquences pathologiques du diabète (Rolo, and Palmeira, 2006 ; Matough et *al.*, 2012).

En outre, le processus d'inflammation joue aussi un rôle important dans l'apparition du diabète de type 2 et dans sa progression (Pirola, et Ferraz, 2017). Le stress oxydatif stimule la génération des médiateurs inflammatoires et l'inflammation augmente à son tour la production d'espèces réactives de l'oxygène (Oguntibeju, 2019).

Depuis la découverte de l'insuline en 1921, les chercheurs continuent à améliorer le quotidien des diabétiques et espèrent demain vaincre la maladie. Malheureusement, les médicaments hypoglycémiantes synthétiques mis sur le marché tel que les sulfonylurées et les biguanides à part avoir un certain nombre d'effets secondaires, aucun de ces agents hypoglycémiantes oraux n'a réussi à guérir la maladie et à contrôler les complications à long terme.

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant des siècles comme une source principale de remèdes. De nos jours, et malgré les multiples progrès de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leur indication thérapeutique pour le traitement de plusieurs maladies dans divers sociétés et cultures. L'importance des plantes médicinales dans le domaine de la santé publique est très accentuée ces dernières années, et les chercheurs de partout dans le monde se sont largement focalisés sur la recherche de nouveaux agents thérapeutiques d'origine naturelle. Cette tendance peut être largement expliquée par la nécessité urgente de nouveaux traitements, et cela pour plusieurs raisons, particulièrement la dangerosité des effets secondaires des médicaments de synthèse chimique. Dans le contexte socio-économique des pays en voie de développement, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faible prix, joignant à une efficacité scientifique prouvée et une acceptabilité culturelle optimale.

Le Maroc est classé parmi les cinq premiers pays floristiquement les plus riches du bassin méditerranéen. Les conditions climatiques et écologiques hétérogène et variés du pays ont favorisé la prolifération de plus de 42 000 espèces de plantes, dont 800 espèces et sous espèces sont endémiques (Bellakhdar, 1997). L'utilisation des plantes médicinales au Maroc occupe une place très importante dans la médecine traditionnelle.

Après une étude bibliographique sur les plantes utilisées pour le traitement du diabète en médecine traditionnelle et le recensement des études scientifiques effectués sur ces plantes nous avons constaté que plusieurs études ont été effectuées et l'efficacité de plusieurs plantes médicinales a été prouvée scientifiquement. Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur les plantes *Cistus salviifolius* L. et *Cistus monspeliensis* L., à notre connaissance aucune étude pharmacologique n'a été effectuée sur ces espèces pour évaluer leurs propriétés antidiabétiques au niveau national et international.

Malgré leur utilisation en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs pathologies et leur figuration dans les études ethnobotanique comme des plantes antidiabétique au Maroc (Benkhighe, et al., 2014 ; Barkaoui, et al., 2017 ; Idm'hand, et al., 2020) et dans d'autres pays tel que la Turquie (Polat, et al., 2012). Ces deux espèces de plantes restent très peu connues au Maroc et non valorisés.

Cistus Salviifolius est connu sous le nom *Touzala* en arabe ou *Irguel* en berber et *Cistus monspeliensis* sous le nom *Touzalt* ou *Chetaipa*. Ce sont des plantes herbacées vivaces appartenant à la famille des *Cistaceae* originaire de la région méditerranéenne et parmi les plantes les plus distribuées au Maroc (Aafi, et al., 2002). Les espèces de *Cistus* sont connues

par leur durabilité et leur capacité de se régénérer très facilement même après les incendies naturels du forêt en raison de leur plus grand pouvoir germinatif après l'exposition à des températures élevées (Thanos, et *al.*, 1992).

Ainsi, dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales du Maroc, et la nécessité urgente des nouveau agents antidiabétiques plus efficace, moins chère et moins toxique que les médicaments antidiabétiques actuels, nous avons fixé comme objectif principal de notre étude d'évaluer l'efficacité des plantes *Cistus salviifolius* L. et *Cistus monspeliensis* L. du Maroc dans le traitement du diabète de type 2 par des études pharmacologiques sur l'animal et *in vitro*.

Pour cela nous avons suivi les étapes suivantes :

Dans un premier temps, nous avons effectué une analyse phytochimique préliminaire afin de caractériser les différentes familles chimiques présentes dans ces plantes en utilisant des réactifs chimiques spécifiques pour chaque famille de composés.

Dans un second temps, nous avons préparé les extraits aqueux destinés aux tests pharmacologiques et nous avons évalué leur toxicité par voie orale chez l'animal.

Ensuite, nous avons évalué l'effet antihyperglycémiant de nos extraits préparés chez les souris rendus diabétique par la méthode de Streptozotocine associé au nicotinamide et leur effet sur le profil lipidique et les différents paramètres biochimiques rénales et hépatiques liés au complications de la maladie du diabète de type 2.

Une partie a été consacrée à l'étude des différents mécanismes d'action possible de nos extraits en évaluant leurs effets sur :

- Les enzymes digestives de sucre l' α -amylase et l' α -glucosidase ;
- L'absorption intestinale du glucose chez les rats *ex situ*;
- Le stress oxydatif *in vivo* et leurs activités antioxydantes *in vitro* ;
- L'inflammation chez les rats.

Une autre partie a été consacrée à la recherche des composés bioactives de nos plantes à l'aide d'une étude phytochimique bioguidée.

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur le diabète de type 2

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le terme « diabète » est défini comme étant un trouble métabolique, caractérisé par une hyperglycémie chronique accompagnée de perturbations du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines dues à des désordres dans la sécrétion et/ou l'action de l'insuline (insulinorésistance).

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant est la forme de la maladie la plus fréquente puisqu'elle représente plus de 90% des cas diabétiques au niveau mondial. Ce type de diabète touche essentiellement les adultes.

Les critères proposés par la Société américaine de diabétologie (ADA) et reconnus par l'OMS pour diagnostiquer le diabète sont: une glycémie > 1.26 g/l (7.0 mmol/l) après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises, la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associée à une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11.1 mmol/l), une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11.1 mmol/l) 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose (HGPO), ou un taux d' HbA1c (hémoglobine glyquée) $\geq 6.5\%$ (11,1 mmol/l) quantifié selon des méthodes étalonnées sur des références internationales. Ce paramètre traduit la glycémie moyenne des trois derniers mois.

Les symptômes du diabète sont caractéristiques et se manifestent par une polyurie, une polydipsie, une perte de poids et parfois une polyphagie et des troubles de la vision. Souvent, les symptômes du diabète de type 2 ne sont pas visibles et une hyperglycémie chronique provoque des altérations progressives des vaisseaux capillaires, ainsi que l'apparition de complications à long terme, affectant en particulier les systèmes oculaire, rénal, nerveux et cardiovasculaire (Zheng et al., 2018).

I.1. Rôle du pancréas dans l'homéostasie glucidique

Le pancréas joue un rôle clé dans la régulation de la digestion des macronutriments et donc de l'homéostasie métabolique / énergétique en libérant diverses enzymes digestives et hormones pancréatiques. Le pancréas comporte deux parties distinctes tant au niveau anatomique que fonctionnel : une partie exocrine et une partie endocrine (**Fig.1**).

- **Partie endocrine**

La sécrétion endocrine du pancréas s'effectue par l'intermédiaire des cellules endocrines, qui constituent environ 2 à 3 % du volume total du pancréas. Ces cellules sont regroupées sous forme d'unités fonctionnelles ou micro-organes localisés au sein du parenchyme exocrine du pancréas : les îlots de Langerhans (du nom du Paul Langerhans (1845-1888) anatomo-pathologiste et biologiste Allemand). Ces îlots regroupent au moins 4 à 5 types de cellules produisant et sécrétant des hormones de manière spécifique principalement de l'insuline mais aussi du glucagon, du polypeptide pancréatique et de la somastatine. Ce sont les cellules β des îlots de Langerhans qui synthétisent, stockent et libèrent l'insuline, seule hormone hypoglycémisante de l'organisme. Les cellules α de ces îlots synthétisent quant à elle le glucagon, hormone qui accroît la quantité du glucose dans le sang lorsque la glycémie est basse (Röder et *al.*, 2016).

Bien que les îlots de Langerhans aient une composition cellulaire similaire entre les différentes espèces, c'est-à-dire l'homme, le rat et la souris, leur cytoarchitecture diffère grandement. Les îlots humains présentent des cellules α et β interconnectées, tandis que chez les rongeurs, ils sont principalement composés de cellules β situées au centre avec d'autres types de cellules à la périphérie (Orci et *al.*, 1975 ; Cabrera et *al.*, 2006).

La sécrétion d'insuline à partir des cellules β comprend une grande variété de modulateurs qui déclenchent, potentialisent ou inhibent la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, principalement par l'intermédiaire des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Le facteur externe le plus connu qui déclenche la sécrétion d'insuline est le glucose. En plus de sa fonction de déclenchement, le glucose induit également des voies qui amplifient la sécrétion d'insuline par le couplage métabolisme-AMPC (adénosine monophosphate cyclique) ou les hormones incrélines peptide de type glucagon (GLP) -1 et peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP) (Henquin, 2000).

- **Partie exocrine**

La partie glandulaire acineuse du pancréas comporte les acini pancréatiques et les canaux excréteurs. La fonction exocrine du pancréas est de produire et sécréter des sucs (ou enzymes) nécessaires à la transformation des aliments en substances simples, absorbables par l'intestin. Ainsi, les acini sont composés de cellules glandulaires possédant toutes les caractéristiques morphologiques des cellules sécrétrices de protéines. Le contenu enzymatique des vésicules

de sécrétion est composé d'amylase, de lipase, de protéase ainsi que de ribonucléases et désoxyribonucléase.

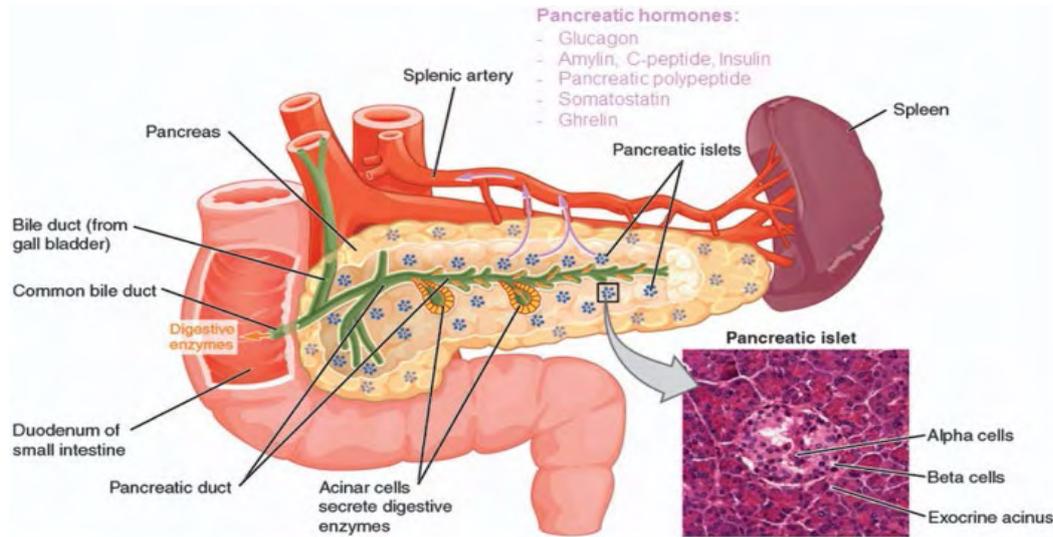


Figure 1: Représentation schématique du pancréas

I.2. Physiopathologie du diabète de type 2

L'hyperglycémie des diabétiques de types de 2 est la conséquence de deux grands mécanismes physiopathologiques. Le premier est l'insulino-résistance et le deuxième mécanisme consiste en une anomalie de l'insulino-sécrétion (Boada, et Martinez-Moreno, 2013).

I.2.1. Insulino-résistance

L'insulino-résistance se définit par une diminution de la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline touchant les tissus périphériques comme le muscle, le foie et le tissu adipeux. Cette résistance découle d'une altération de la voie de signalisation de l'insuline qui toucherait notamment le nombre de récepteurs à insuline et/ou leur affinité pour l'hormone et le nombre de transporteurs membranaires dépendants de l'insuline qui permettent l'entrée du glucose dans les cellules (Boada, et Martinez-Moreno, 2013).

I.2.2. Insulino-déficience

Suite à l'hyperglycémie, le pancréas va s'adapter en augmentant la masse des cellules β fonctionnelles (hyperplasie des îlots) visant à produire et à libérer plus d'insuline dans la circulation. Ce qui conduit à un hyperinsulinisme qui permet dans un premier temps de maintenir une glycémie normale. A terme la production d'insuline s'épuise de par une glycémie de plus en plus difficile à équilibrer et par l'entrée en apoptose des cellules β , ce qui conduit à l'insulino-déficience (Boada, et Martinez-Moreno, 2013).

II. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini par Sies (1991) comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont fait partie les radicaux libres, suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue d'ERO soit à une diminution de la capacité de défense anti-oxydante. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, métaux toxiques) (Sorg, 2004).

Le terme Espèces réactives de l'oxygène (ERO) est utilisé pour la description des formes d'oxygène qui sont énergétiquement plus réactifs que l'oxygène moléculaire. Il comprend des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques possédant un électron célibataire, ainsi que des molécules non-radicalaires mais chimiquement instables (Halliwell, 2006).

Les ERO ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation. Toutefois, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques en engendrant de sérieuses altérations aux cellules pouvant mener à la mort cellulaire. Dans les circonstances quotidiennes normales le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré par des systèmes de défenses antioxydants.

II.1. Conséquences biochimiques du stress oxydant

Les ERO peuvent potentiellement réagir avec chaque composant cellulaire et provoquer son oxydation. Cependant, les cibles préférentielles des ERO sont les lipides, suivis par les protéines et les bases constitutives du matériel génétique (De Moffarts, et al., 2005).

II.1.1. Oxydation des lipides

Les lipides membranaires et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'attaque des ERO radicalaires au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (Davies, K.J., 2000).

La peroxydation est initiée lorsqu'un radical libre de l'oxygène oxyde un acide gras insaturé (LH), formant un radical lipidique (L[•]). Ce dernier réagit avec une molécule de dioxygène pour former un radical peroxy (LOO[•]). Celui-ci attaque un autre lipide insaturé formant un radical lipidique ainsi qu'un groupement hydroperoxyde (LOOH). Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase (antioxydant enzymatique) ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes volatiles (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxy, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer des aldéhydes toxiques dont le malonaldéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (HNE) étudiés comme des marqueurs de la peroxydation lipidique. La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydant dite 'briseur de chaîne' (Fig. 2)(Khohen et Nyska, 2002).

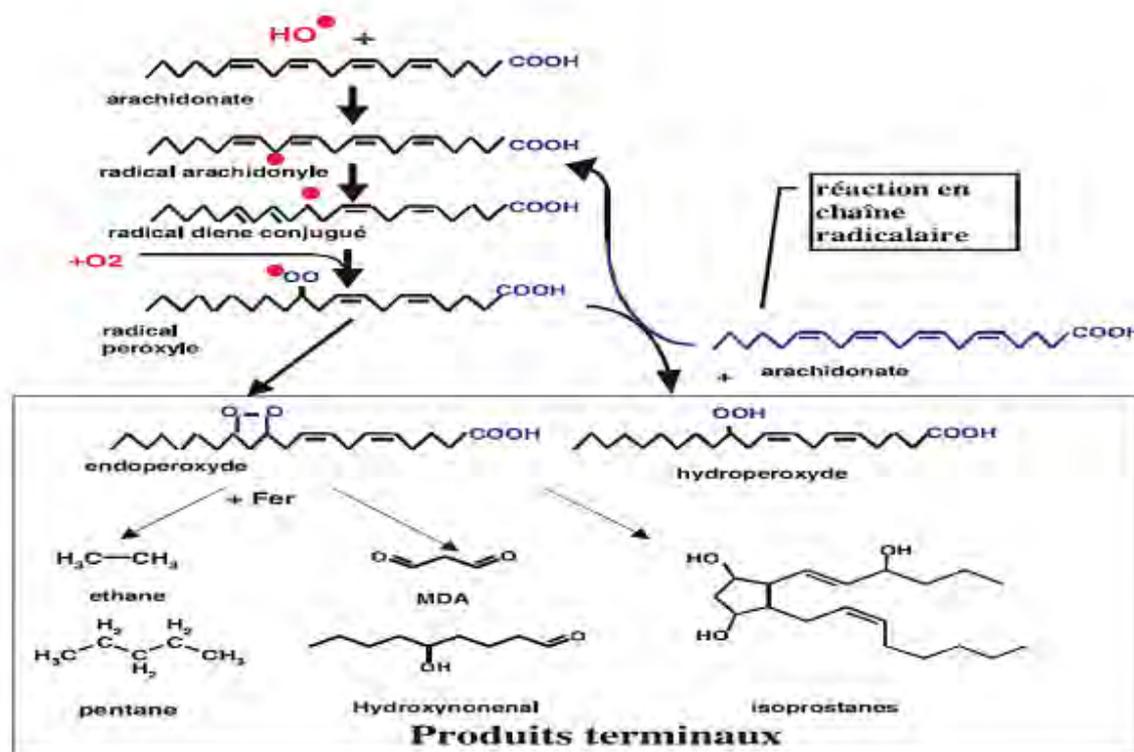


Figure 2: Mécanisme de la peroxydation lipidique

II.1.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont par voie de conséquence des cibles importantes du stress oxydant. Presque tous les acides aminés composant les protéines peuvent être oxydés par des espèces réactives de l'oxygène. Les

acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane, et histidine) étant les plus sensibles. L'action des ERO a lieu sur les chaînes latérales de ces acides aminés et également au niveau de la liaison peptidique entraînant la fragmentation de la chaîne.

La réaction d'oxydation génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines et induit des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités (Levine, 2002 ; Valko, et *al.*, 2007). Ainsi, le stress oxydant peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire.

II.1.3. Oxydation de l'ADN

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des espèces réactives de l'oxygène.

D'après Valko et *al* (2007), les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques.

Le radical hydroxyl a une grande affinité avec la base guanine, cette dernière est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est l'un des principaux marqueurs de l'oxydation dans l'ADN. Au cours de la réplication de celui-ci, la guanine s'associe normalement avec la cytosine. Par contre, la guanine oxydée (8 hydroxy-2'-deoxyguanosine) se fixe avec une autre base purique, en l'occurrence l'adénine, ce qui provoque une mutation G(uanine)-T(hymine) dans le brin fille de l'ADN. Les altérations du matériel génétique qui s'accumulent au sein de l'ADN représente la première étape de la carcinogénèse et le vieillissement (Favier, 2003 ; Valko et *al.*, 2006).

II.2. Les antioxydants

Le terme d'antioxydants est utilisé pour caractériser un ensemble de substances ou composés de nature diverse, dont la caractéristique commune d'après Halliwell et Gutteridge (2015) est d'être capable en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, de prévenir ou ralentir l'oxydation de ce substrat.

L'antioxydant peut agir par de nombreux mécanismes différents qui peuvent être l'élimination directe de l'oxygène, le piégeage des espèces réactives de l'oxygène, l'inhibition de la formation de ces ERO, la chélation des ions métalliques nécessaires à la génération des ERO ou la stimulation des défenses antioxydantes endogènes (Halliwell, 1996). L'antioxydant peut être d'origine naturel ou synthétique.

II.2.1. Systèmes de défenses antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. Un antioxydant se définit comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, capable de réduire ou d'inhiber de manière efficace l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1990). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydro- ou liposolubles. Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

- **Superoxyde dismutase (SOD)**

Les superoxydes dismutases représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Ce sont des métalloprotéases qui catalysent la dismutation des ions superoxydes $O_2^{\cdot -}$ en peroxyde d'hydrogène stable et moins toxique et en oxygène moléculaire (Comhair et Erzurum, 2001). Chez l'Homme, on décrit trois isoenzymes qui catalysent la même réaction mais diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au coeur de l'enzyme et dont la nature permettra de distinguer les SOD à manganèse (Mn) mitochondriales, les SOD à cuivre (Cu) ou à zinc (Zn) cytosoliques, et des formes Cu/Zn SOD extracellulaires.

- **La catalase**

La catalase (CAT) est une enzyme formée de quatre chaînes polypeptidiques (tétramérique), comportant chacune un groupe d'hème, qui constitue les sites actifs de l'enzyme. La CAT détoxifie indirectement la cellule des $O_2^{\cdot -}$ en transformant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 généré lors de la dismutation de l'ion superperoxyde. Cette enzyme est essentiellement présente dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (Lindau-Sehpard & shaffer, 1993).

- **La glutathion peroxydase**

La glutathion peroxydase (Gpx) est une enzyme tétramérique dont chacune des sous unités contient un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Elle réduit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH) aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH).

II.2.2. Les antioxydants naturels

- **Vitamine E**

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : Les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols, l' α -tocophérol est le plus abondant et le plus actif. La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. Elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Herrera et Barbas., 2001). L' α -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène (O_2) en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle (OH). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes (ROO) pour former un radical tocophéryle beaucoup plus stable.

La biosynthèse de la vitamine E s'effectue principalement dans les plantes, les algues et certaines plantes non photosynthétiques telles que les champignons mais pas chez les animaux (Threlfall, 1971). On la trouve principalement dans les huiles végétales (germe de blé, tournesol, olive, arachide, colza, soja...), le germe de blé, les fruits oléagineux (noix, noisettes, amandes,...), les céréales complètes.

- **Vitamine C**

La vitamine C ou acide L-ascorbique est considérée comme le plus puissant des antioxydants hydrosolubles. Leur rôle antioxydant découle de sa capacité réductrice. Elle est capable de réagir directement sur les ERO (superoxydes, hydroxyle, oxygène singulet, radicaux lipidiques) et elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. L'organisation spatiale de la vitamine C lui permet de se lier à la phase aqueuse de la vitamine E oxydée dans la membrane cellulaire, et de rapidement lui céder son électron (Evans, 2000). Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certain mammifère tel que l'homme. Les meilleures sources de vitamine C sont les agrumes, les légumes à feuilles vertes, les choux, les tomates, et les fraises.

- **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. Ils absorbent la lumière et neutralisent l'oxygène singulet. Ils sont également capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Hermes-Lima, 2005). Les caroténoïdes sont souvent retrouvés dans les plantes alimentaires. Ils sont des constituants membranaires des chloroplastes et forment un groupe de pigments liposolubles.

- **Oligoéléments**

Certains oligo-éléments interviennent comme co-facteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les ERO. Le cuivre, manganèse et zinc sont des cofacteurs de la SOD qui réduit O_2^* en H_2O_2 , le fer est un cofacteur de la catalase, et le sélénium de la glutathion peroxydase (GXP), ces deux dernières enzymes réduisent les hydroperoxydes (Jungbluth, 2008).

- **Polyphénols**

Les polyphénols, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits.

La capacité antiradicalaire de ces métabolites secondaires, fait sujet des études récentes dans le domaine des thérapeutiques antioxydantes. Les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques sont cités comme des puissants antioxydants naturels.

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes présentent la plus grande classe de polyphénols. D'après Javanovic et ses collaborateurs (1994), les flavonoïdes ont un faible potentiel redox, de ce fait, ils sont thermodynamiquement capables de réduire directement les radicaux libres comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxyde et le OH^* par transfert d'hydrogène.

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité anti-radicalaire optimale ont été établis par plusieurs auteurs, les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

-La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) responsable du pouvoir réducteur de la molécule, et ainsi, de son aptitude à réduire les EOR.

- La double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C du flavonoïde accentue la délocalisation électronique du radical semi-quinone et permet sa stabilisation, qui est accentuée par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire.

-La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 en combinaison avec la double liaison C₂-C₃ renforce également la capacité anti-radicalaire des flavonoïdes (Pietta, 2000).

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes s'accroît également avec le nombre de OH alors que la présence d'une O-glycosylation le diminue.

En outre, les flavonoïdes exercent une activité chélatrice des métaux tels que cuivre et fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. La complexation des flavonoïdes par les métaux de transition peut améliorer leur pouvoir antioxydant en diminuant leur potentiel d'oxydation (Afanas'eva, et al., 2001). En plus, les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices des ERO.

- **Tanins**

Les tannins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante grâce aux différents groupes phénoliques.

Lors de la peroxydation les tannins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi des radicaux tanniques stables sont formés. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique (Smythies, 1998). Le thé vert (*Camélia sinensis*) est l'exemple le plus cité. Les effets bénéfiques des polyphénols du thé vert, particulièrement le gallate d'épigallocatechine sont attribués à leurs propriétés antioxydantes et à leurs capacités de capter les radicaux libres.

- **Acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité

antioxydante. On les retrouve principalement dans le café, les prunes, les myrtilles, le raisin, et les pommes.

II.2. 3. Les antioxydants synthétiques

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques les plus connus sont :

Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle), Trolox ou l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique qui est l'exemple classique d'antioxydant synthétique dérivé de la vitamine E, cette molécule est souvent utilisée comme antioxydant de référence.

Bien que l'utilisation d'antioxydants synthétiques soit strictement réglementée, des préoccupations ont été exprimées au sujet de la sécurité de certains de ces derniers et leur utilisation a commencé à diminuer en raison de leur toxicité (Williams, 1994).

III. Stress oxydatif et diabète de type 2

Le stress oxydatif est considéré comme un facteur délétère conduisant à une résistance à l'insuline, à une dyslipidémie, à un dysfonctionnement des cellules β , à une altération de la tolérance au glucose et, finalement, au diabète de type 2 (Tangvarasittichai, S., 2015).

Les principales sources de stress oxydatif pendant le diabète comprennent l'auto-oxydation du glucose, la surproduction des ERO par les mitochondries, la glycation non enzymatique et la voie des polyols. Les ERO inhibent la transduction du signal de l'insuline en empêchant l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline. Les ERO perturbent et inhibent également l'insulino-sécrétion en inhibant la transduction du signal de glucose dans les cellules β .

De nombreuses preuves expérimentales ont mis en évidence un lien direct entre le stress oxydatif et le diabète grâce à la mesure des biomarqueurs du stress oxydatif chez les patients diabétiques ou les rongeurs. Un état hyperglycémique peut entraîner une augmentation des niveaux de marqueurs de dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif, tels que la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) et la 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-désoxyguanosine; produits de peroxydation lipidique mesurés en tant que substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS); les produits d'oxydation des protéines tels que les taux de nitrotyrosine et de carbonyle et réduit également l'activité des enzymes antioxydantes tel que le SOD et la CAT (Oguntibeju, 2019).

Il existe une évidence croissante que les complications microvasculaire et macrovasculaires reliées au diabète de type 2 sont associées au stress oxydant, et que la production des radicaux libres augmente suite à l'exposition prolongé à des taux élevés de glucose pendant le diabète (Giacco, and Brownlee, 2010).

IV- Inflammation

L'inflammation est une réaction de défense immunitaire et d'adaptation de l'organisme à une stimulation cellulaire excessive ou anormale due à une agression tissulaire qui peut être d'origine physiques (chaud, froid ou encore radiations ionisantes), chimiques (composés acides ou basiques, ou toxines bactériennes), ou infectieuses (présence d'un organisme pathogène comme une bactérie, un virus, un champignon, ou un parasite). (Schorderet et Dayer, 1992).

La réaction inflammatoire se caractérise par une succession d'événements plus ou moins intriqués. L'agent inducteur amorce la libération de divers médiateurs et le recrutement de cellules variées (polynucléaires, monocytes-macrophages, lymphocytes...) qui interagissent entre eux en une boucle amplificatrice.

La nature du développement de chacun de ces événements et la nature des cellules et médiateurs impliqués conditionnent le profil d'expression clinique et biologique de la réponse inflammatoire (aiguë ou chronique, locale ou systémique, protectrice ou délétère).

L'inflammation est cliniquement définie comme un processus pathophysiologique caractérisé par des rougeurs, de la fièvre, des oedèmes, de la douleur et une perte de fonctions (Russo-Marie et *al.*, 1998).

IV.1. Phases de l'inflammation

- **Phase d'initiation**

La phase initiale de l'inflammation est une réponse rapide non spécifique qui fait suite à un signal de danger, l'immunité innée, se met en place avec activation du complément, des monocytes, des macrophages et du système de coagulation. Elle se caractérise par l'apparition d'une congestion et d'un oedème inflammatoire.

La congestion résulte d'une vasodilatation active des vaisseaux artériolaires puis des vaisseaux capillaires. Le débit sanguin augmente, expliquant la rougeur et la chaleur observées cliniquement. Cette vasodilatation est à la fois initiée et entretenue par des médiateurs chimiques comme l'histamine ou la sérotonine, libérés par des mastocytes et des polynucléaires et elle est maintenue par des substances à action plus lente ou plus prolongée comme les kinines, et certaines fractions du complément.

L'œdème inflammatoire résulte du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat, fait d'eau et de protéines plasmatiques, et c'est la conséquence d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine (Regnault, 1992).

- **Phase d'amplification**

Elle correspond à la migration des leucocytes vers le site inflammatoire, les premiers en place sont les polynucléaires neutrophiles, puis ils sont remplacés par les mononuclées parmi celles-ci les macrophages qui participent à cette phase grâce à leur plus grande capacité de phagocytose. Ces cellules phagocytent et libèrent des substances vaso-actives, microbicides et protéolytiques (radicaux libres oxygénés entre autres). L'interleukine 1 (IL1) et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) synthétisés principalement par les macrophages, jouent un rôle dans la néovascularisation, l'activation cellulaire et le chimiotactisme du site inflammatoire. Le processus peut se généraliser, dans ce cas, les cytokines (IL1) et (TNF α) agissent au niveau du cerveau expliquant la fièvre et l'asthénie, au niveau de la moelle osseuse entraînant hyperleucocytose et thrombocytose, au niveau des muscles amenant à une amyotrophie progressive, et elles stimulent le foie, via l'IL6 pour la production de protéines de l'inflammation (CRP, fibrinogène, ferritine, haptoglobine...). Elles activent aussi les lymphocytes B et T, conduisant à la réaction d'immunité spécifique dite adaptative. (Chappuis, 2012).

- **Phase de résolution**

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. Une régulation se met en place avec la synthèse de cytokines « anti-inflammatoires », inhibiteurs naturels comme les récepteurs solubles qui se lient et piègent IL1 et TNF α . Des anti-protéases vont désactiver la cascade protéolytique et limiter ainsi la destruction du tissu conjonctif. Des antioxydants vont aussi limiter l'action des radicaux libres instables. Lorsque les macrophages ont phagocyté les matières étrangères, et lorsque les réactions inflammatoires ont permis d'anéantir l'agent inflammatoire, le processus de restauration s'installe avec réorganisation d'un tissu de remplacement sauf dans le cas des inflammations chroniques (Chappuis, 2012).

IV.2. Médiateurs de l'inflammation

- **Les amines vaso-actives**

Les amines vaso-actives sont les acteurs majeurs de la cascade inflammatoire à sa phase précoce. Ces médiateurs sont formés avant l'inflammation, stockés sous la forme de granules cytoplasmiques. Il s'agit de la sérotonine sécrétée par les plaquettes lors de leur agrégation et présente dans les cellules entérochromaffines et surtout de l'histamine largement présente dans les tissus, au sein des mastocytes du tissu conjonctif, polynucléaires basophiles et plaquettes (Bannwarth et *al.*, 2007).

- **Les kinines**

Les kinines sont des polypeptides à action vaso-active, la plus importante est la bradykinine. Ils représentent le deuxième médiateur après l'histamine. Après leur activation, ils sont rapidement inactivés par les kinases. Leur action est puissante mais limitée à la phase initiale de l'inflammation, et se rapprochant de l'action de l'histamine.

- **Dérivés de l'acide arachidonique**

L'acide arachidonique est un acide gras formé par dénaturation des phospholipides des membranes cellulaires, sous l'influence de la phospholipase A₂ activée par l'agression initiale (stimulus mécanique ou chimique) et par divers médiateurs.

On distingue deux voies de métabolisation de l'acide arachidonique : la voie de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2) et la voie de lipo-oxygénase.

La COX-1 est une enzyme constitutive de l'organisme, elle y est présente en permanence surtout au niveau du rein, du tube digestif et du système vasculaire. Leur site actif est composé d'acides aminés essentiels en raison de leurs groupements fonctionnels ou de leurs positions spatiales (Liu, 2013).

La COX-2 est une enzyme inductible, sa présence en quantité est induite par les stimuli de l'inflammation. Cette présence se concentre essentiellement sur le site de la réaction inflammatoire.

Les cyclo-oxygénases (COX) catalysent la formation de prostaglandines, en particulier de PGE₂ et PGI₂, qui participe aux signes cardinaux de l'inflammation (oedème, douleur, rougeur, chaleur), leurs effets sont moins rapides et plus prolongés que ceux de l'histamine.

L'acide arachidonique est en outre transformé en leucotriènes par la voie de la 5-lipoxygénase (5-LOX) (Bannwarth et *al.*, 2007).

- **Les cytokines**

Les cytokines sont des médiateurs de nature protéique, les trois principales sont : l'interleukine1 (IL1), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF α) et l'interleukine 6 (IL6).

L'IL-1 est produite par les macrophages activés, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules de Langerhans... C'est l'un des médiateurs clés du contrôle de l'inflammation. Les sources principales *in vivo* de L'IL-6 sont les monocytes stimulés, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Il constitue une voie d'amplification majeure des signaux transmis aux cellules de l'immunité. Ainsi, IL-6 favorisera le déroulement des cascades de réaction qui mèneront à l'inflammation.

Le TNF- α active les monocytes et augmente la phagocytose et la cytotoxicité des neutrophiles et module l'expression de médiateurs clés tels que l'IL-1 et l'IL-6 (Dohan et *al.*, 2004).

VI.3. Les anti-inflammatoires

Pour limiter l'inflammation, la thérapie employée en médecine moderne consiste en l'utilisation des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes, et non stéroïdiens (AINS).

- **Anti-inflammatoires stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien.

L'industrie pharmaceutique a mis au point de nombreux dérivés du cortisol comme la dexaméthasone et le budésonide (Hellal, 2007).

Leur activité anti-inflammatoire est relativement étendue, une partie de leurs effets anti-inflammatoires passe par l'inhibition de la production des prostaglandines et des leucotriènes par blocage de la phospholipase A₂. Ce blocage est obtenu par l'induction de la synthèse de l'enzyme lipocortine. Les AIS diminuent aussi la migration des polynucléaires, monocytes, macrophages vers les sites de l'inflammation et la production de médiateurs comme l'histamine, les cytokines et la sérotonine. Malgré leur efficacité, ces traitements ont de

nombreux effets adverses sur le long terme (Troubles endocriniens, insuffisance de la glande surrénale à l'arrêt du traitement, troubles digestifs troubles psychiques, Effet immunosuppresseur) (Haugine., 2010).

- **Anti-inflammatoires non stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont constitués d'une vaste famille aux produits chimiquement distincts, mais tous exercent un effet anti-inflammatoire essentiellement par l'inhibition de l'activité enzymatique de COX (Vane et Botting, 1987), en bloquant l'action des COX, entraînent une baisse des prostaglandines et de thromboxane, ce qui conduit une diminution des effets de l'inflammation.

La plupart des AINS tel que l'indométacine inhibent de manière non sélective la COX-1 et la COX-2 alors que l'inhibition de la COX-1 a un grand nombre d'effets indésirables (gastro-intestinaux et rénaux, entre autres), celle de la COX-2 est associée à des effets qui sont, pour la plupart, souhaités. Le concept d'une inhibition COX-2-sélective est attrayant dans la mesure où il permettrait de séparer les effets indésirables des effets recherchés.

VI.4. Diabète de type 2 et inflammation

Actuellement, il est bien connu qu'il existe un lien étroit entre l'inflammation, le stress oxydatif et la pathogenèse du diabète de type 2 et ses complications. Le syndrome métabolique et le développement du diabète de type 2 sont associés à une production accrue de plusieurs substances pro-inflammatoire, et médiateurs de l'inflammation dont l'interleukine 1 bêta (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), une augmentation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, dont la protéine C réactive (CRP), et une activation des voies de signalisation de l'inflammation (Pickup, 2004).

Ces substances pro-inflammatoires, produites principalement par les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux et le foie, ainsi que le stress oxydatif jouent un rôle majeur dans le développement d'une résistance à l'insuline associée à l'obésité et dans la progression de l'obésité vers le Diabète de type 2 (Olefsky, and Glass, 2010 ; Shoelson, et *al.*, 2007).

En plus, l'hyperglycémie chronique chez les diabétiques endommage tous les vaisseaux sanguins en les rétrécissant, empêchant une bonne circulation sanguine dans les membres inférieurs et favorisant l'apparition des symptômes inflammatoires tels que les douleurs, les gonflements des jambes, des chevilles ou des pieds et une mauvaise cicatrisation des plaies.

V. Traitement du diabète

Le diabète de type 2, peut être contrôlé dans les stades précoces de la maladie par un régime alimentaire et une activité physique, mais si la glycémie normale n'est pas atteinte, une prescription d'antidiabétiques oraux s'avère obligatoire, un recours à l'insuline peut aussi être nécessaire.

V.1. Traitement médicamenteux

Plusieurs familles d'antidiabétiques oraux existent. En général, il existe cinq classes d'antidiabétiques oraux, le traitement étant adapté à chaque patient diabétique :

- **Les biguanides**

De tous les biguanides, la metformine (glucophage) constitue le médicament de premier choix dans la gestion du diabète dans le monde, alors que les autres dérivés ou analogues à la metformine tels que la phénformine ont été retirés du marché en raison des effets secondaires potentiellement mortels qu'ils ont démontrés (Spiller, and Sawyer, 2006 ; Tran, et *al.*, 2015).

La metformine agit principalement en augmentant l'action de l'insuline au niveau du foie et en diminuant ainsi la production hépatique de glucose. Elle exerce aussi un effet antilipolytique qui diminue la concentration d'acides gras libres et réduit ainsi la disponibilité de substrat pour la néoglucogenèse. La Metformine accroît aussi la captation et l'utilisation périphérique de glucose en augmentant, d'une part, la translocation ou la synthèse des transporteurs du glucose (Glut1 et Glut4) et, d'autre part, en favorisant la synthèse de glycogène. La metformine, le biguanide le plus commercialisé dans le monde, provoque des états d'acidose lactique (Stumvoll, et *al.*, 1995; DeFronzo et *al.*, 2016).

- **Les sulfonylurées**

Les sulfonylurées sont les médicaments les plus utilisés pour le traitement du diabète de type 2. Le récepteur aux sulfonylurées est une composante du canal ATP dépendant du potassium dans les cellules β du pancréas. La liaison des sulfonylurées conduit à l'inhibition de ces canaux qui modifient le potentiel de repos de la cellule, induisant un influx de calcium et une stimulation de la sécrétion d'insuline. Les sulfonylurées sont donc uniquement utiles chez les patients qui ont encore une fonction résiduelle des cellules β (Ducobu, 2003). Les

sulfonylurées provoquent un état d'hypoglycémie, ainsi qu'un gain de poids dû à l'hyperinsulinémie (Vicent, *et al.*, 1995 ; DeFronzo, 1999).

- **Les thiazolidinediones (TZD),**

Les thiazolidinediones également connues sous le nom de glitazones, constituent la troisième classe d'hypoglycémisants oraux représentés par la rosiglitazone et la pioglitazone. Les TZD sont des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR- γ induisant la différenciation adipocytaire et agissant sur le métabolisme lipidique par un stockage plus efficace des acides gras libres dans le tissu adipeux et une sécrétion plus importante d'adiponectine, et moindre d'adipokines délétères sur le plan de la sensibilité à l'insuline (Jia, *et al.*, 2011).

Dans les milieux expérimentaux et cliniques, les TZD diminuent la résistance à l'insuline, en partie par leur effet de diminuer le rapport de la leptine à l'adiponectine, qui sont deux adipokines importantes impliquées dans le contrôle de l'appétit et de la sensibilité à l'insuline, respectivement. Les limites de leur utilisation comprennent les effets secondaires hépatiques et cardiovasculaires (Elte, 2007 ; Haddad, *et al.*, 2012).

- **Les glinides**

Ce sont des médicaments hypoglycémisants, de très courte durée d'action, utilisés soit seuls, soit en combinaison. Ils sont différents structurellement des sulfonylurées, mais agissent sur le même récepteur au niveau d'un site différent. Ils se fixent avec une très grande affinité et se détachent très rapidement de leur liaison. Ceci explique qu'ils stimulent plus vite la sécrétion d'insuline pendant un temps plus court (Haddad *et al.*, 2012).

- **Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase**

Les inhibiteurs de l'enzyme α -glucosidase tel que l'acarbose ralentissent l'absorption intestinale du glucose. Ils peuvent être utilisés seuls ou en thérapie combinée, notamment pour réduire l'hyperglycémie postprandiale. Cependant, ils présentent des effets secondaires gastro-intestinaux qui peuvent limiter leur utilisation (Josse, 1995 ; Baron, 1998).

V.2. Phytothérapie du diabète

La médecine traditionnelle reste encore le principal recours pour une majeure partie de la population mondiale face à la maladie pour des raisons d'ordre socioculturel, socioéconomique et sanitaire.

La phytothérapie antidiabétique connaît à ce jour un essor important du fait de la découverte de plus en plus croissante d'extraits de plantes efficaces dans le traitement du diabète. Cette pratique a fasciné les chercheurs pour entreprendre des expériences afin de comprendre le mécanisme d'action de ces remèdes naturels et d'en tirer les principes actifs. Marles et Farnsworth (1995), reportent l'existence de 1123 espèces de plantes douées d'un pouvoir antidiabétique, appartenant à 725 genres et 183 familles, parmi ces plantes utilisées traditionnellement pour le traitement du diabète, il y en a celles qui ont été testées expérimentalement, et 81% d'entre elles ont montré des résultats positifs, ce qui les a mené à constater que ces remèdes naturels représentent une source potentielle pour des nouveaux médicaments antidiabétiques (Marles, and Farnsworth, 1995).

Au Maroc, un total de 255 espèces végétales appartenant à 70 familles ont été rapportées comme étant utilisées en médecine traditionnelle et complémentaire pour le traitement et la gestion du diabète. Les espèces végétales fréquemment utilisées par les populations de la plupart des régions du Maroc sont *Trigonella foenum-graecum* (lhalba), *Artemesia herba-alba* (Chih), *Nigella sativa* (Sanouj/Haba souda), *Olea europaea* (Jbouj/Azmour/Zitoun), *Allium cepa* (Basla) et *Marrubium vulgare* (Mriwt/Ifzi) (Idm'hand, et *al.*, 2020).

VI. Les plantes *Cistus salviifolius* L. et *Cistus monspeliensis* L.

VI.1. Classification et description botanique

Le genre *Cistus* fait partie de la famille de Cistaceae qui comprend environ 180 taxons d'arbustes, arbrisseaux, annuelles ou plantes vivaces. D'après El Alaoui-Faris et *et al* (2009) ce genre regroupe 12 espèces dans la flore marocaine dont *Cistus Salviifolius* L. et *Cistus monspeliensis* L.

Leur Classification est comme suit :

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Dilleniidae
- Ordre : Violales
- Famille : Cistaceae
- Genre : *Cistus*
- Espèce : *Cistus Salviifolius* L. ; *Cistus monspeliensis* L.

Cistus salviifolius L, dont le nom commun est Ciste à feuilles de sauge, et Tuzzala en arabe, est un arbrisseau de 30 à 80 cm de hauteur, très ramifié, dont les jeunes rameaux sont couverts de poils étoilés, non visqueux. Ses Feuilles sont simples, opposées brièvement pétiolées, oblongues à elliptiques, avec un limbe réticulé un peu rugueux sur la face supérieure ; ses fleurs sont blanches de 4-5 cm de diamètre, longuement pédonculées, avec 5 pétales et 5 sépales, largement lancéolés, en coeur à la base ; son fruit est en capsule pentagonale, tronquée au sommet, et ses graines presque lisses ou fortement réticulées ; sa floraison se fait en Mars-Juin (**Fig. 3**).



Figure 3: La plante *Cistus salviifolius L*

Cistus monspeliensis L, appelé également Ciste de Montpellier, et Tuzzala ou Chetaipa en arabe, est un arbrisseau de taille moyenne (entre 0,5 et 1,2 m. de hauteur), très ramifié dès la base, avec des feuilles simples, opposées, sessiles, lancéolées, trinervées, et limbe réticulé, plissé au-dessus, à marge enroulée. Elle se caractérise par son calice et ses feuilles collants, et visqueux. Ses fleurs blanches, de 2-3 cm de diamètre, réunies par 2-4 en grappes unilatérales, avec 5 pétales, et 5 sépales en coeur ; son fruit en capsule arrondie et ses graines rugueuses ; la floraison est en Mars-Juin (**Fig.4**).



Figure 4: La plante *Cistus monspeliensis L*.

VI.2. Répartition géographique

Les espèces du genre *Cistus* poussent dans la région méditerranéenne d'Afrique, d'Europe, et d'Asie. *Cistus salviifolius* L. et *Cistus monspeliensis* L., sont parmi les espèces les plus répandues au Maroc. Ces espèces sont présentes dans les terrains chauds, ensoleillés, protégés des intempéries. *C. monspeliensis* est une espèce calcifuge fréquemment rencontré dans les forêts claires des Béni Snassen, de Debdou, du Maroc occidental, du Maroc central, du Rif, du Moyen Atlas et du Haut Atlas, jusque vers 1 300 m d'altitude. On trouve *C. salviifolius* surtout dans les forêts claires à substrat siliceux du Rif, du Moyen Atlas et du Haut Atlas jusque vers 2 100 m d'altitude (Aafi, *etal.*, 2002).

VI. 3. Utilisations traditionnelles

Diverses espèces de *Cistus* sont utilisées (en Italie, Grèce, Espagne et Turquie) pour le traitement de la diarrhée et des ulcères gastro-duodénaux, comme des agents anti-inflammatoires et antispasmodiques, et comme recours généraux pour plusieurs maladies de la peau (Attaguile et al., 2004), elles sont utilisées également pour leurs propriétés antidiabétiques (Orhan et al., 2013), antimicrobiens, et cytotoxiques (Jemia et al., 2013).

Les feuilles et les tiges de *C. salviifolius* sont utilisées en infusion pour le traitement du diabète (Polat, R. and Satil, F., 2012) en Turquie. Au Maroc, les feuilles de cette plante sont utilisées en décoction contre le diabète (Barkaoui et al., 2017), et les graines associées à celles de nigelle (*Nigella sativa*), en poudre, sont administrées par l'eau pour le traitement de cette maladie (Benkhniq et al., 2014).

Les feuilles de *C. monspoliensis* et de *C. salviifolius* sont utilisées en infusion comme digestif et pour le traitement des douleurs gastriques. Le décocté de la plante entière de *C. monspoliensis* L est utilisé, en cataplasme, pour traiter les blessures (Lahsissene & al., 2009). A Marrakech, les graines de quelques espèces du genre *Cistus* sont apprêtées avec des épices, s'emploient comme aliment apéritif. Les graines pilées de la plupart des cistes sont consommées dans les campagnes marocaines, comme amuse-gueule. Dans la région de Taïnest, ses graines sont utilisées comme chapelure dans la préparation des gâteaux. Dans le nord du Maroc (douar Agan, région de Talambot), les fruits des cistes (âmerîl) servent à confectionner le harkûs (fard à tatouage). Le bétail apprécie les pousses de *C. salviifolius* (Bellakhdar, 1997).

VI.4. Etudes phytochimiques

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces du genre *Cistus* ont montré la richesse ainsi que la diversité structurale de ce genre en métabolites secondaires.

L'analyse d'un extrait aqueux lyophilisé de *C. monspeliens* d'Italie par HPLC-DAD a montré la richesse de cette espèce en catéchine, gallocatéchine et en acide gallique (Santagati *et al.*, 2008). Ponponio et ses collaborateurs (2003) ont montré la présence de (+)-catechin et (-) gallocatechin dans l'extrait aqueux lyophilisée des parties aériennes de *C.monspeliensis* d'Italie par la méthode de Chromatographie électrocinétique en microémulsion (MEEKC).

Les travaux effectués par Qa'dan et ses collaborateurs (2011) sur les parties aériennes de *C.salviifolius* ont permis l'isolement de deux nouveaux proanthocyanidines, l'épigallocatéchine-3-O-p-hydroxybenzoate-(4 β →8)-epigallocatechin et épigallocatéchine-3-O-p- hydroxybenzoate- (4 β → 8) -epigallocatechin-3-O-gallate.

Saracini *et al* (2005) ont identifiés une série de composés polyphénoliques dans un extrait éthanolique des feuilles de *C.salviifolius* d'Italie par HPLC-DAD et HPLC-MS, ces composés sont les ellagitanins (punicalagin et ses dérivés), les dérivés de myricétine (myricétine 3-O-(6''-O-galloyl)galactoside), myricétine 3-O-galactoside, myricetin xyloside) des dérivés de quercétine (quercetin 3-O-galactoside, quercétine 3-O-glucuronide, quercétine xylosides, quercétine xylosil glucoside, quercetin 3-O-(6''-O-galloyl)galactoside)) , un mono-coumaroyl kaempferol glucoside, et un di-coumaroyl kaempferol glucoside.

L'étude phytochimique réalisée par Danne et ses collaborateurs (1994) sur l'espèce *C. salviifolius* a permis l'isolement de plusieurs composés. L'extrait acétate d'éthyle de la fraction aqueuse acétonique des parties aériennes de *C. salviifolius* a été chromatographié sur séphadex LH-20, et après une série de purification sur colonne les composés isolés sont : des dérivés de flav-3-ol , catechine, epicatechine, gallocatechine, epigallocatechine, epicatechine 3-O-gallate, gallocatechine 3-O-gallate, epigallocatechine 3-O-gallate , epigallocatechin3-O-p-hydroxy benzoate, prodilphinidine epigallocatechine (4 β —8)-epigallocatechine, epigallacatechine 3-O-gallate-(4 β —8)-epigallocatechine, epigallocatechine-(4 β —8)-epigallacatechine-3-O- gallate , epigallocatechine-(4 β —6) epigallocatechine-3-O-gallate, et phloroglucinol glucosides :1-O- β -D-glucopyranosyl-3-O-methoxy-5-hydroxy benzene, 1-O- β -D-(6'O-galloyl) glucopyranosyl-3-methoxy-5-hydroxy-benzène.

VI.4. Etudes pharmacologiques

Les études pharmacologiques ont montré que le genre *Cistus* présente des effets anti-inflammatoires (Kupeli et al., 2007), antioxydantes (Nicoletta et al., 2015 ; Amensour et al., 2010; Attaguile et al., 2000), antidiabétiques (Orhan et al., 2013), cytotoxiques et antiprolifératifs (Vitali et al., 2011 ; Jemia et al., 2013), antimicrobiens (Bouamama et al., 2006), et des effets préventifs sur la maladie d'Alzheimer (Loizzo et al., 2013).

L'étude effectuée par Nicoletta et ses collaborateurs (2015) a montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *C.monspeliensis* de Tunisie a une importante activité antioxydante in vitro. L'extrait aqueux des parties aériennes de *C. monspeliensis* d'Italie montre également une forte activité antioxydante. Il inhibe la génération de superoxyde et réduit la lipoperoxydation dans les microsomes de foie de rat, et il a une activité protectrice contre le clivage de l'ADN (Attaguile et al., 2000). Cet extrait possède également un effet cytotoxique et antiprolifératif sur les cellules prostatiques humaines (Vitali et al., 2011).

L'extrait hexanique de *C. monspeliensis* d'origine tunisien a une activité antiproliférative importante sur la lignée cellulaire de mélanome humain A-375 (Jemia et al., 2013).

Les travaux effectués par Haouat et al (2013) sur l'activité antimycobactérienne, ont montré que les extraits aqueux et éthanoliques des parties aériennes de *C. salviifolius* d'origine marocaine ont un important effet antimycobactérien.

Les extraits méthanolique des feuilles de *C. monspeliensis* marocaine possèdent un effet antimicrobien vis-à-vis de certains microorganismes impliqués dans de nombreuses infections et maladies de la peau (Bouamama et al.,2006).

Les huiles essentielles de *C.monspeliensis* de Tunisie et *C.salviifolius* d'Italie ont montrés des effets antioxydants potentiels, et des activités inhibitrices de cholinestérases utiles pour la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer (Loizzo et al., 2013).

Matériel et méthodes

Chapitre I : Caractérisation phytochimique

I. Matériel végétal

La plante *Cistus salviifolius*(L.) a été récoltée de la forêt Maâmoura à Salé, et *Cistusmonspeliensis*(L.) a été récoltée de Mâaziz (province d'El Khemisset) au Maroc. Les deux plantes ont été recueillies en mois d'Avril 2015. L'identification des espèces a été réalisée à l'institut scientifique de Rabat et des échantillons ont été déposés dans l'herbier du département botanique sous les Numéros «RAB 1012176 » et « RAB 1012177» pour *Cistus salviifolius* et *Cistus monspeliensis* respectivement.

Les parties aériennes des plantes ont été nettoyés et séchés à l'ombre et à température ambiante jusqu'au poids constant et ils sont ensuite broyés afin de procéder aux extractions.

II. Préparation des extraits

Afin de préparer les extraits aqueux des plantes étudiées, nous avons utilisé la méthode de l'infusion. Ainsi, 100 g de la matière végétale sèche de chaque espèce ont été mis en contact avec 1000 ml de l'eau bouillante et laissés refroidir pendant une heure. Le mélange est ensuite filtré sur papier Wattman et le filtrat de chaque plante est évaporé à 60°C sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (EV311).

✓ Calcul du rendement

Le rendement d'extraction désigne la masse de l'extrait obtenu, il est exprimé en pourcentage par rapport à la quantité initiale de la plante soumise à l'extraction. Nous avons déterminé les rendements des plantes étudiées en extrait sec par le calcul du rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = (P_1 - P_2 / P_3) \times 100$$

P₁ : poids du ballon après évaporation ;

P₂ : poids du ballon vide;

P₃ : poids de la matière végétale de départ

III. Screening phytochimique

Le screening phytochimique correspond à une technique de « criblage » c'est-à-dire la recherche systématique des produits naturels contenus dans les plantes en faisant une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitation (formation d'un complexe insoluble) et/ou

colorimétrique (conjugaison ou instauration dans une molécule). Il est effectué sur le matériel végétal sec et broyé que nous avons préparé.

✓ **Caractérisation des alcaloïdes**

La recherche des alcaloïdes est basée sur leurs capacités à se combiner avec les métaux lourds ou avec l'iode. Leurs précipitation en milieu acide ou basique se fait principalement à l'aide de deux réactifs : réactif de Mayer (solution de mercuri-iodure de potassium) et Dragendorff (l'iodo-bismuthate de potassium).

▪ **En milieu acide**

A une quantité de 1 g de la poudre végétale nous avons ajouté 10 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1%, et le mélange est agité pendant 15min. Après filtration, l'ajout de quelques gouttes de réactif de Mayer au filtrat conduit à l'apparition d'un précipité blanc en présence des alcaloïdes.

Si le test s'avère positif en milieu acide, on passe au test de confirmation en milieu basique.

▪ **En milieu basique**

La poudre végétale est alcalinisée en ajoutant 1 ml de NaOH, puis nous avons effectué l'extraction en utilisant le dichloromethane (Cl_2CH_2).

Après filtration, une goutte de l'extrait est déposée sur couche mince (plaque de silice).

L'application du réactif de Dragendorff par pulvérisation permet de révéler la présence d'alcaloïdes. Ceux-ci se révèlent par l'apparition d'un spot orange fluorescent.

✓ **Caractérisation des flavonoïdes**

Pour la recherche des flavonoïdes nous avons utilisé la réaction à la cyanidine qui permet de révéler la présence des flavonoïdes libres (flavones et dihydroflavols).

En effet, une quantité de 0.5 g du matériel végétal est extraite par éthanol pendant 10 min ; puis le mélange est filtré et 5 ml du filtrat est introduit dans un tube à essai. En ajoutant quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques copeaux de magnésium on observe un dégagement de chaleur puis une coloration selon le type des flavonoïdes majoritaires :

- Coloration orange : flavones,
- Coloration rose-violacée : flavonones,
- Coloration rouge cerise : flavonols.

✓ **Caractérisation des tanins**

Une quantité de 1.5 g du poudre végétale a été placée dans 10 mL de méthanol 80% est agitée durant 15 mn puis filtrée. Ensuite, quelques gouttes du chlorure ferrique (FeCl_3) 1% sont ajouté à l'extrait méthanolique déjà préparé. L'apparition d'une coloration bleue noire ou brune verdâtre indique la présence des tanins.

✓ **Caractérisation des quinones libres**

Pour la recherche des quinones libres, 1 g du poudre végétale de chaque plante est placé dans un tube en présence de 30 ml d'éther de pétrole. Le mélange est laissé sous agitation pendant 24 heures, puis, l'extrait est filtré et concentré au rotavapeur. L'ajout de quelques gouttes de NaOH 0.1 M, permet la révélation de quinones libres lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

✓ **Caractérisation des anthraquinones**

Une quantité de 1g de la poudre végétale est introduite dans un tube à essai avec 10 mL de Chloroforme (CHCl_3). Nous avons procédé à un chauffage au bain marie pendant 15min, ensuite, nous avons filtré et complété le volume à 10 mL avec du chloroforme.

Puis, nous avons ajouté 1 mL du KOH aqueux 10% (v/v) à l'extrait chloroformique préparé. Après agitation, le virage de la phase aqueuse au rouge indique la présence des anthraquinones.

✓ **Caractérisation des saponosides**

Les propriétés physicochimiques les plus caractéristiques des saponosides sont la modification de la tension superficielle et le pouvoir moussant en solution aqueuse.

En effet, la présence des saponosides dans les deux plantes est déterminée par le test de la mousse. Brièvement, 2g du matériel végétal sec de chaque espèce sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, 10 ml de chaque extrait est introduit dans un tube à essai et agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de

la mousse persistante en cm. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

✓ **Caractérisation des terpénoïdes**

Afin de mettre en évidence la présence des terpénoïdes, nous avons effectué une extraction avec 1g de la matière végétale et 10 ml du méthanol, après agitation et filtration, 5 ml de l'extrait obtenu est placé dans un tube à essai et mélangé avec 2 ml du chloroforme, la présence de terpénoïdes se traduit par une apparition d'une couleur brune rougeâtre après l'ajout de 3 ml de l'acide sulfurique.

IV. Dosage des composés phénoliques

Une analyse quantitative des extraits CSA et CMA a été réalisée au moyen de dosage spectrophotométrique, et avait pour objectif la détermination de la teneur des extraits en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (appelé également tanins catéchiques ou proanthocyanidines).

IV.1. Dosage des polyphénols

Les teneurs de nos extraits en polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode colorimétrique selon la procédure décrite par Spanos et Wrostad (1990) modifiée par Lister et Wilson (2001) en utilisant le réactif de Folin- Ciocalteu.

✓ **Principe**

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique.

Le principe de ce dosage repose sur la réduction en milieu alcalin de l'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique présents dans le réactif Folin-Ciocalteu par les polyphénols en donnant un mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène (Ribereau, 1968). Cette réduction se traduit par l'apparition d'une coloration bleue foncée dont l'intensité est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

✓ **Procédure**

Brièvement, 0.5 ml de chaque extrait est ajouté à 2.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois dans l'eau distillée, suivi par l'addition de 4 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5 %, w/v) afin de favoriser un milieu alcalin pour démarrer la réaction d'oxydoréduction. Le

mélange est ensuite incubé au bain marie à 45 °C pendant 30 minutes et l'absorbance de tous les extraits a été mesurée par spectrophotomètre à 765 nm.

L'intensité de la coloration bleue produite pour chaque extrait a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6305) à la longueur d'onde 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux dans chaque extrait est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'une gamme de solutions standard d'acide gallique (**Annexe 1**). Elle est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG / g).

IV.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes est réalisée selon la méthode colorimétrique décrite par Dewanto *et al.* (2002).

▪ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3) en donnant une couleur jaune et avec la soude (NaOH) en donnant une couleur rose.

▪ Procédure

Dans des tubes à essais ont été introduits successivement 1 ml de l'extrait et 6.4 ml d'eau distillée. Au temps initial, 0.3 ml de la solution de Nitrite de sodium NaNO_2 5 % (m/v) ont été ajoutés. Après 5 min, 0.3 ml de Trichlorure d'aluminium AlCl_3 10 % (m/v) ont été additionnés et le mélange a été laissé au repos pendant 6 min. Ensuite, 2 ml de la soude NaOH (1M) ont été ajoutés et la solution a été bien mélangée et laissée au repos pendant 30 min. Les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde égale à 510 nm.

Les teneurs de nos extraits en flavonoïdes sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon la Rutine à différentes concentrations (**Annexe 1**) et elles sont exprimées en milligrammes équivalents de Rutine par gramme d'extrait.

IV. 3. Dosage des proanthocyanidines

Le dosage des tanins condensés dans nos extraits est effectué par la méthode colorimétrique décrite par Julkunen-Titto (1985).

▪ Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la capacité de la vanilline grâce à son groupement aldéhydique de se fixer sur le carbone 6 du cycle A de la molécule de catéchine pour former un complexe chromophore rouge dont l'intensité est mesurable à la longueur d'onde 500 nm

▪ Procédure

Ainsi, 50 µl de chaque extrait a été mélangé avec 1.5 ml de la vanilline 4% (préparé avec du méthanol), puis 750 µl de l'acide chlorhydrique HCl concentré ont été ajoutés. La solution a été bien mélangée à l'aide du vortex et puis, incubée à température ambiante dans l'obscurité pendant 20 min. L'intensité de la coloration rose produite a été mesurée à 500 nm.

Les concentrations en tanins catéchiques sont calculées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie avec la Catéchine et exprimées en milligramme équivalents de la catéchine par gramme d'extrait(**Annexe 1**).

V. Composition minérale

Les teneurs de nos plantes en différents composés minéraux : Calcium (Ca), Cuivre (Cu), Magnésium (Mg), Fer (Fe), Sodium (Na), Potassium (K), et Zinc (Zn), Phosphore (P) ont été déterminés en utilisant la technique de spectroscopie d'émission atomique avec plasma à couplage inductif (ICPAES, Jobin Yvon Ultima 2).

Ainsi, 150 mg des poudres des parties aériennes de chaque plante ont été mélangé avec 2 ml d'acide nitrique HNO₃ (70%) dans un bécher en téflon, avant d'être incinéré à 110 ° C. Après avoir ajouté 0.5 mL d'acide fluorhydrique le bécher bien couvert a été placé sur un bain de sable et le mélange d'échantillon a été chauffé jusqu'à obtention d'une solution limpide. Ensuite, le mélange a été évaporé jusqu'à séchage après avoir retiré le couvercle. Enfin, 2 mL d'acide chlorhydrique (HCl) ont été ajoutés au mélange et le résidu a été extrait par 25 mL d'acide chlorhydrique (HCl) (2.0 M).

VI. Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyenne ± erreur standard. La signification statistique a été analysée par l'analyse de variance (ANOVA one way), et la comparaison multiple par le test de Tukey. La signification a été établie à $p \leq 0.05$. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism v 6.

Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique chez la souris

I. Animaux

Dans notre étude nous avons utilisé des souris Swiss albino et des rats Wistar. Ces animaux ont été élevés dans des cages en polypropylène dans l'animalerie centrale de la Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, au Maroc. Toutes les animaux ont été maintenus dans des conditions environnementales standards : l'eau de robinet, une nourriture régulière, un cycle de 12 h/12 h de lumière/obscurité et une température de 21- 23°C. Les expériences ont été menées conformément aux principes énoncés dans le « Guide pour le soin et l'utilisation des animaux du laboratoire » préparé par l'Académie National des Sciences et publié par l'Institut National de la Santé. Ainsi, tous les efforts ont été déployés pour minimiser la souffrance animale et le nombre d'animaux utilisés.

II. Etude de la toxicité chez la souris

Avant d'entamer les essais pharmacologiques, nous avons d'abord évalué la toxicité des extraits à tester en administration orale chez la souris.

II.1. Toxicité aiguë

Pour l'étude de la toxicité aiguë nous avons utilisé des souris femelles saines et adultes pesant entre 21 et 24 g.

L'étude a été réalisée conformément aux lignes directrices 423 de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (OCDE, 2002).

Cette méthode, permet d'exploiter un nombre minimal d'animaux à la différence des autres méthodes de toxicité aiguë (lignes directrices 420 et 425) permettant de classer les produits par ordre de toxicité d'une manière similaire.

Il s'agit d'administrer par voie orale à un groupe d'animaux une dose choisie du produit puis la tester dans un processus séquentiel dans lequel on utilise trois animaux à chaque étape. Selon la mortalité ou non des animaux sujets du test on détermine l'étape suivante:

- Arrêt de l'essai,
- Administration de la même dose (test confirmatif),
- Administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à un nouveau groupe d'animaux.

Les souris ont été sélectionnées par une technique d'échantillonnage aléatoire et divisé en deux groupes. Un essai limite à un niveau de dose de 2000 mg/kg est exécuté avec six animaux (trois animaux par étape).

Après une période de jeun de quatre heure les extraits CSA et CMA ont été administré par voie orale aux souris en une seule dose (2000 mg/kg) en utilisant une sonde gastrique.

Après l'administration des extraits, les animaux sont observés individuellement régulièrement pendant quatorze jours. Une attention particulière s'impose pendant les premières quatre heures.

Le comportement, les symptômes cliniques (tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, sommeil et coma..etc), la mortalité des animaux ainsi que les poids individuels de chaque souris ont été enregistrés pendant toute la durée de l'expérience.

II. 2. Etude des effets sur les paramètres biochimiques

L'objectif de cette étude est d'avoir des informations suffisantes sur l'innocuité des extraits à tester et de la dose choisie (500 mg/kg) pour l'étude pharmacologique sur une durée d'étude d'un mois.

Des souris saines mâles et femelles, aillant un poids corporel compris entre 21 et 24 g, ont été utilisées dans cette étude.

✓ Procédure

Les animaux ont été divisés en trois groupes de 10 souris chacun, ils sont pesés et marqués pour permettre une identification individuelle et gardées dans leurs cages :

- ✓ Groupe témoin traité par l'eau distillée,
- ✓ Groupe traité par CSA (500 mg/kg),
- ✓ Groupe traité par CMA (500 mg/kg).

Les souris ont été mises à jeun pendant quatre heures avant l'expérimentation.

Les extraits ont été préparés dans l'eau distillée juste avant l'administration. Ils sont administrés par voie orale à l'aide de la sonde gastrique chaque jour pendant un mois.

Les animaux ont été observés individuellement afin de relever les éventuelles manifestations cliniques, en particulier neurologiques et oculaires, ainsi que la mortalité. La date d'apparition et la progression des signes toxiques, ainsi que l'évolution du poids corporels des animaux doivent être enregistrées.

Après un mois de traitement, des échantillons du sang ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire et recueillies dans des tubes contenant l'héparine comme anticoagulant.

Ensuite, les échantillons du sang ont été centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 min à 4 °C. Puis, le sérum a été isolé pour analyser les paramètres biochimiques suivants :

- Urée,
- Créatinine,
- Aspartate aminotransférase (ASAT),
- Alanine aminotransférase (ALAT),
- Glycémie
- Cholestérol total,
- Triglycérides.
- Protéines

III. Test de tolérance au glucose

Le test de tolérance au glucose a été effectué afin d'évaluer l'effet de CSA et CMA sur l'homéostasie systémique du glucose.

Le test a été réalisé sur des rats adultes de souche Wistar mâles dont le poids corporel compris entre 160 et 200 gramme. Ces rats sont mis à jeun pendant 18 heures avant l'expérimentation.

✓ Procédure

Les rats ont été répartis en quatre lots de six rats chacun, marqués pour permettre une identification individuelle et ont reçu par voie orale les différents traitements :

- Lot témoin recevant l'eau distillée,
- Lot traité par CSA (500 mg/kg),
- Lot traité par CMA (500 mg/kg),
- Lot traité par la métformine (300 mg/kg).

Une heure après l'administration orale des extraits, métformine, ou l'eau distillée, l'hyperglycémie a été provoquée chez les animaux de chaque lot par administration orale d'une solution de glucose préparé dans l'eau distillée à la dose de 2g/kg. La glycémie des rats est suivie à l'aide d'un glucomètre (On-Call plus) sur un intervalle de 30 minutes pendant 2

heures (0, 30, 60, 90 et 120 min). Le sang est prélevé par ponction de la veine caudale latérale. Une cage de contention est utilisée pour faciliter la manipulation de l'animale lors de la mesure de la glycémie.

IV. Induction du diabète

Afin d'évaluer l'activité antidiabétique des extraits CSA et CMA un diabète de type II a été induit chez les souris par injection intra-péritonéale de Streptozotocine après administration de Nicotinamide.

La STZ est un agent diabétogène bien connu exerçant une action cytotoxique sur les cellules β productrice de l'insuline au niveau du pancréas, tandis que le nicotinamide est administré aux souris pour protéger partiellement ces cellules contre les dommages excessifs causés par la STZ. Ce régime ne produit pas un modèle de résistance à l'insuline mais une carence en insuline, dans ce modèle le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperglycémie stable et modérée, associée à une perte partielle de la fonction des cellules β .

Pour ce test, nous avons utilisé des souris mâle de la souche swiss albino dont le poids corporel compris entre 28 et 34 gramme. Ces animaux ont été mis à jeun pendant 18 heures avant l'expérimentation.

✓ Procédure

Le diabète de type II a été induit chez les souris par injection intra-péritonéale d'une solution de Streptozotocine à une dose de 200 mg/kg fraîchement préparée dans du tampon citrate (0.1 M, pH 4.5) 15 min après administration de nicotinamide à la dose de 210 mg/kg (préparée dans l'eau physiologique). Après l'induction du diabète, les souris ont été nourries avec une solution de glucose 5% pendant 24 heures afin de surmonter l'hypoglycémie générée suite à la destruction des cellules β pancréatiques et la libération massive d'insuline.

Une semaine après l'induction, le diabète a été confirmé chez les souris par mesure de la glycémie à jeun à l'aide d'un glucomètre de type One Call. Seules les souris ayant le taux de glucose sanguin supérieur à 126 mg/dl ont été considérés comme diabétiques et retenus pour cette expérimentation.

V. Traitement et mesure de la glycémie

Après la confirmation du diabète, les souris ont été réparties en 5 lots de 6 souris chacun et ont reçu par voie orale les différents traitements :

- Un lot témoin normal recevant l'eau distillée.
- Un lot témoin diabétique recevant l'eau distillée.
- Un lot de référence recevant le médicament métformine à la dose de 300 mg/kg.
- Un lot recevant l'extrait aqueux de CSA à la dose de 500 mg/kg.
- Un lot recevant l'extrait aqueux de CMA à la dose de 500 mg/kg.

Le traitement a été effectué pendant un mois par administration journalière des extraits à une dose de 500 mg/kg et de la métformine à une dose de 300 mg/kg par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique.

✓ Mesure de la glycémie

La mesure de la glycémie a été effectuée chaque semaine chez les animaux à jeun en utilisant le glucomètre On Call® Plus. Le sang a été prélevé par ponction de la veine caudale latérale. Une cage de contention est utilisée pour faciliter la manipulation de l'animale lors de la mesure de la glycémie.

✓ Mesure des poids corporels

Afin de déterminer l'influence de nos extraits sur le poids corporel et la croissance des souris, nous avons suivi l'évolution pondérale des souris témoins et traitées, chaque semaine tout au long de l'expérimentation. Le poids corporel est mesuré à l'aide d'une balance en gramme.

À la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés afin d'évaluer l'effet des extraits sur les différents paramètres biochimiques et l'analyse histopathologique du pancréas.

VI. Analyse des paramètres biochimiques

A la fin du traitement, des échantillons du sang ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire des souris et recueillies dans des tubes contenant de l'héparine (anti-coagulant).

Les échantillons du sang ont été centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 min à 4 °C. Puis, le sérum a été isolé pour l'analyse des différents paramètres biochimiques afin d'évaluer l'effet

des extraits sur les paramètres fonctionnels rénaux (urée, créatinine, acide urique), et hépatiques (l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT)), et sur le profil lipidique (cholestérol total, triglycérides). Ces analyses ont été effectuées à l'aide d'un auto-analyseur «Architect C8000» (Abbott Laboratories).

VII. Analyse histopathologique du pancréas

Les analyses histologiques ont été réalisées en utilisant les étapes successives suivantes:

✓ Prélèvement

Les pancréas ont été rapidement isolés des souris et immédiatement après le prélèvement, ils sont rincés dans l'eau physiologique.

✓ Fixation

Afin d'immobiliser les cellules dans un état proche de l'état vivant, les pancréas ont été conservés dans des flacons contenant du formol 10% (un liquide fixateur).

Cette fixation entraîne un durcissement des organes ce qui permet de maintenir les diverses formations cellulaires en place, ainsi ces tissus seront protégés contre les distorsions, les rétractions, et les attaques bactériennes.

✓ Déshydratation

Les fragments des organes ont été déshydratés en utilisant des bains successifs d'éthanol à différents degrés (50°, 70°, 95° et 100°C) et ensuite, ils ont été plongés dans des bains de toluène pendant 10 min chacun.

✓ Inclusion

L'inclusion permet de réaliser des coupes fines et régulières en utilisant la paraffine comme milieu d'inclusion. Nous avons obtenu à la fin de cette phase des blocs en paraffine réalisés dans des cassettes.

✓ Confection des coupes

Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un microtome rotatif. Nous avons réalisé des rubans de coupes à une épaisseur de 5µm, puis, nous avons les déposées sur des lames en verre préalablement nettoyées.

✓ **Étalement**

Après l'identification des lames, les rubans de coupe ont été déposés sur une goutte de liquide d'étalement (un blanc d'œuf ou de l'albumine +100ml glycine+450ml d'eau distillé). Pour faciliter l'étalement, ces lames ont été placées sur une plaque chauffante à 37 °C et ensuite, elles sont placées dans une étuve à 56 °C pendant deux heures.

✓ **Déparaffinages et hydratation**

Les lames ont été déparaffinées avant leur coloration dans deux bains de xylène pendant 10 min chacun, puis dans deux bains d'éthanol pendant une minute pour chaque bain. L'hydratation a été faite en plongeant les lames dans des bains d'alcool d'ordre décroissant, (90° puis à 50°) pendant 1 à 5 minutes, puis elles sont rincées avec l'eau pendant une minute.

✓ **Coloration**

Cette étape a pour objectif de différencier les constituants tissulaires.

La coloration utilisée est celle de la coloration tri chromique hématoxyline, éosine. Où hématoxyline colore les structures nucléaires en bleu et l'éosine colore le cytoplasme en rouge et le collagène en rose.

✓ **Déshydratations**

Après coloration, les coupes ont été trempées dans différents bains d'alcool éthylique de titre croissant afin d'éliminer l'eau présente dans les coupes :

- Alcool à 70° pendant 5 à 10 minutes.
- Alcool à 90° pendant 5 à 10 minutes.
- Alcool éthylique absolu pendant 15 minutes.
- Suivie de deux bains de xylène de 15 minutes chacun.

✓ **Montage des lames**

Afin de protéger et conserver les lames colorées sans risque d'altération et pour rendre possible leur examen microscopique nous avons recouvert les lames par des lamelles couvre-objet.

✓ **Observation microscopique**

Les lames ainsi préparées ont été examinées sous microscope optique (x10 puisx40).

VIII. Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard. La signification statistique a été analysée par l'analyse de variance (ANOVA one way), et la comparaison multiple par le test de Tukey. La signification a été établie à $p \leq 0.05$. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism v 6.

Chapitre III : Etude des mécanismes d'action des extraits

Ce chapitre est consacré à l'étude des différents mécanismes d'action possible de nos extraits aqueux en évaluant leurs effets sur :

- Les enzymes digestives de sucre l' α -amylase et l' α -glucosidase ;
- L'absorption intestinale du glucose chez les rats *ex situ* ;
- Le stress oxydatif *in vivo* et *in vitro* ;
- L'inflammation chez les rats.

I. Etude du potentiel inhibiteur des extraits sur l'activité des enzymes digestives de sucre

I.1. Test d'inhibition de l' α -Amylase

- **Principe**

La méthode employée pour l'analyse d'inhibition de l'enzyme α -amylase est basée sur le pouvoir réducteur des groupements aldéhydes et cétones des sucres libérés dans le milieu réactionnel lors de l'hydrolyse de l'amidon par l' α -amylase. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune orange en acide 3-amino-5nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel.

- **Méthode**

Le potentiel inhibiteur de l'enzyme α -amylase par nos extraits est investigué en faisant réagir différentes concentrations des extraits avec l'enzyme et l'amidon utilisé comme substrat selon la méthode décrite par (Hashim *et al.*, 2013) avec quelques modifications.

Brièvement, 250 μ l de l'échantillon et 250 μ L de l'enzyme α -amylase (240U/mL) préparé dans le tampon phosphate (0.02M, pH= 6.9) ont été incubés à 37 °C pendant 20 min. Puis, 250 μ L de la solution d'amidon 1% ont été ajoutés au mélange réactionnel. Ensuite, le mélange est incubé à 37 °C pendant 15 min. Puis, 1ml d'acide dinitro-salicylique (DNS) ont été ajoutés et le mélange est incubé au bain-marie à 95°C pendant 10 min. En fin, le mélange est dilué en ajoutant 2 ml de l'eau distillée et les absorbances ont été mesurées à 540 nm au spectrophotomètre. L'acarbose est utilisé comme référence standard.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés selon la formule suivante:

$$\text{inhibition (\%)} = [(A_c - A_{bc}) - (A_e - A_{be}) (A_c - A_{bc})] \times 100,$$

où A_c fait référence à l'absorbance du contrôle (enzyme et tampon); A_{bc} fait référence à l'absorbance du blanc de contrôle (tampon sans enzyme); A_e fait référence à l'absorbance de l'échantillon (enzyme et inhibiteur); et A_{be} est l'absorbance de l'échantillon blanc (inhibiteur sans enzyme). Les IC_{50} ont été par la suite déterminées à l'aide du Graphpad prism v6.

I.2. Test d'inhibition de l' α -Glucosidase

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase par nos extraits a été déterminée en utilisant le *p*-nitrophényl- α -D-glucopyranoside comme substrat selon la méthode décrite par (Kee et al., 2013) avec quelques modifications.

En l'absence d'inhibiteur, l' α -glucosidase coupe la liaison α -1,4 de la molécule de *p*NPG et donne une molécule de glucose et une molécule de nitrophénol de couleur jaune selon la réaction décrite en **Fig.5** plus la coloration jaune se dégrade plus que l'activité inhibitrice de l'échantillon testé vis-à-vis de l'enzyme est plus forte.

En fait, 150 μ l de l'échantillon a été mélangé avec 100 μ L de la solution d'enzyme α -glucosidase (0.1U/mL) préparée dans du tampan phosphate (0.1M, pH = 6.7) et le mélange a été incubé au bain-marie à 37°C, pendant 10min. Ensuite, 200 μ l de *p*NPG (1mM) ont été ajoutés et le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min. A la fin, nous avons ajouté 1 ml du carbonate du sodium (Na_2CO_3) 0.1M pour stopper la réaction et les absorbances ont été mesurées à 405 nm à l'aide du spectrophotomètre.

L'activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme a été exprimée en pourcentage et calculée en utilisant la même formule employée pour le calcul de l'activité inhibitrice de l' α -amylase ci-dessous. Et les IC_{50} ont été ensuite déterminées. L'acarbose est utilisé comme référence standard.

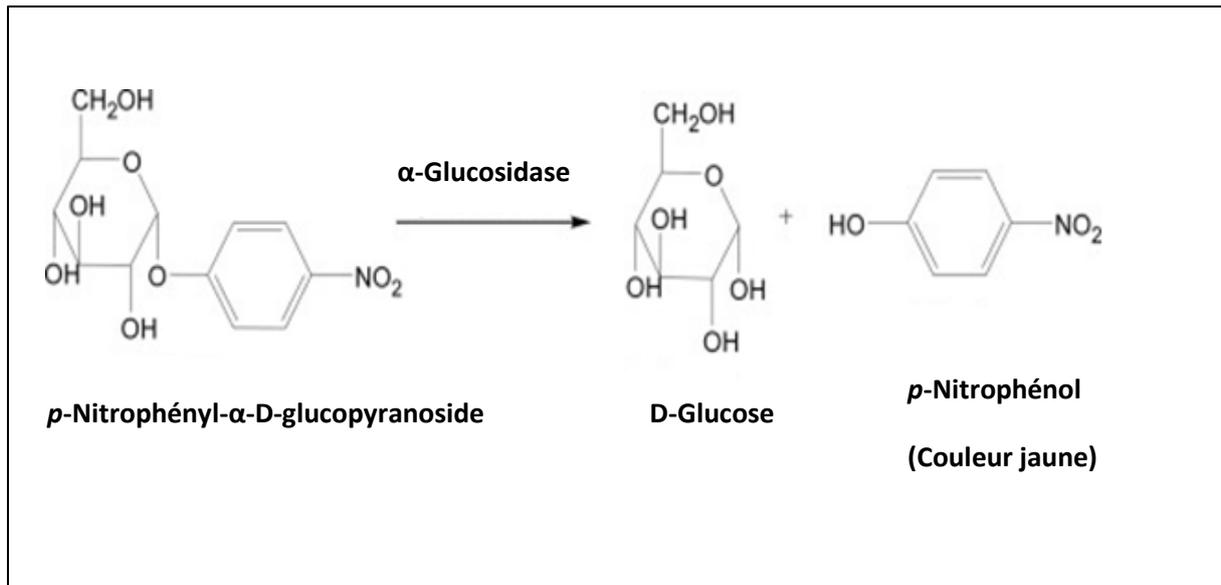


Figure 5: Principe du dosage de l'activité de l'enzyme α -Glucosidase

II. Evaluation des effets des extraits sur l'absorption intestinale du glucose

Afin d'évaluer l'effet de CMA et CSA sur l'absorption intestinale de D-glucose, des rats normaux ont été mis à jeun pendant 24 h et ils ont été par la suite anesthésiés par injection intramusculaire de pentobarbital de sodium (50 mg / kg). Chaque extrait a été ajouté à la solution de perfusion (g / L: 7.37 NaCl, 0.2 KCl, 0.065 NaH₂PO₄. 2H₂O, 0.213 MgCl₂. 6H₂O, 0.6 NaHCO₃ et 1.02 CaCl₂. 2H₂O, pH = 7.5) additionné de glucose (1 g / L) juste avant de commencer l'expérience et perfusé avec une pompe péristaltique (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) à 0.53 mL / min. Les animaux ont été divisés en quatre groupes de 6 rats. Le premier groupe a servi de témoin et a reçu la solution de perfusion; le deuxième groupe a servi de contrôle positif et a reçu la solution avec de la phlorizine ajoutée (50 mg / kg), le troisième groupe a reçu la solution avec 250 mg / kg de CSA ajouté, et le quatrième groupe a reçu la solution avec CMA (250 mg/kg). Après 60 min, le perfusat a été recueilli à partir d'un tube en polyéthylène aux extrémités proximales et la concentration en glucose a été mesurée par la méthode du glucose oxydase-peroxydase en utilisant un kit commercial (Glucose, SGM Italia). La longueur du segment jéjunale perfusé a été mesurée et l'absorption intestinale de glucose a été estimée en mg / 10 cm / 1 h.

III. Evaluation de l'effet des extraits sur le stress oxydatif

L'effet de nos extraits sur le stress oxydatif a été évalué d'abord en analysant leur activité antioxydante sur différents tests *in vitro* et ensuite *in vivo* chez les souris diabétique.

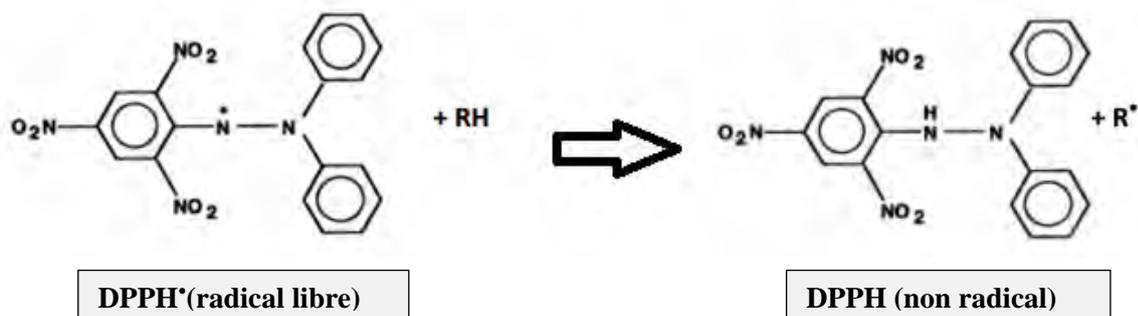
III.1. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

III.1.1. Test d'inhibition de DPPH

L'activité anti-radicalaire des extraits CSA et CMA vis-à-vis du radical DPPH[•] est évalué selon la méthode décrite par Huang et, *al.*, (2011).

La méthode employée est basée sur la mesure de la capacité des produits à piéger le radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil). Le DPPH est de couleur violette sous sa forme radicalaire, et après sa réduction par les agents antioxydants en 2,2 diphényl 1 picryl hydrazine sa couleur change vers le jaune en acceptant un atome d'hydrogène (**Fig. 6**).

Ce changement de couleur peut être suivi par le dosage spectrophotométrique à la longueur d'onde 517 nm et de cette manière le pouvoir anti-radicalaire de nos échantillons peut être déterminé.



RH : antioxydant

R[•] : radical libre

Figure 6:Forme libre et réduit de DPPH

✓ Méthode

2.5 ml de chacune des différentes concentrations de nos extraits ont été introduites dans des tubes à essai avec 0.5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (2mM) fraîchement préparée. Après agitation au vortex, les tubes ont été incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, les absorbances ont été mesurées à la longueur d'onde 517 nm à l'aide du spectrophotomètre.

Nous avons utilisé un contrôle négatif composé de la solution de DPPH seul dans le méthanol, et l'antioxydant trolox est utilisé comme référence standard.

L'activité antiradicalaire de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition et calculé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{[(\text{Absorbance C} - \text{Absorbance échantillon}) / \text{Absorbance C}] * 100}{1}$$

C : Contrôle négatif

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC₅₀) a été par la suite déterminée à l'aide du logiciel graphpad prism v6.

III.1.2. Test de l'ABTS

L'activité antiradicalaire de nos extraits vis-à-vis du radical cationique ABTS est effectuée selon la méthode décrite par Tuberoso et *al.* (2013) avec quelques modifications

- **Principe**

Le principe de cette méthode est basée sur la mesure de la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Ce dernier de couleur bleu-verte se transforme en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.

Le radical ABTS^{•+} se forme par arrachement d'un électron (e⁻) à l'atome d'azote de l'ABTS. En présence d'un antioxydant donneur de H[•], le radical d'azote concerné piège un H[•], conduisant à la formation de l'ABTSH⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution (**Fig.7**)

Le pouvoir des antioxydants à décolorer le radical ABTS^{•+} reflète la capacité de capture du radical et se traduit par la décroissance de l'absorbance mesuré par spectrophotométrie à 734 nm.

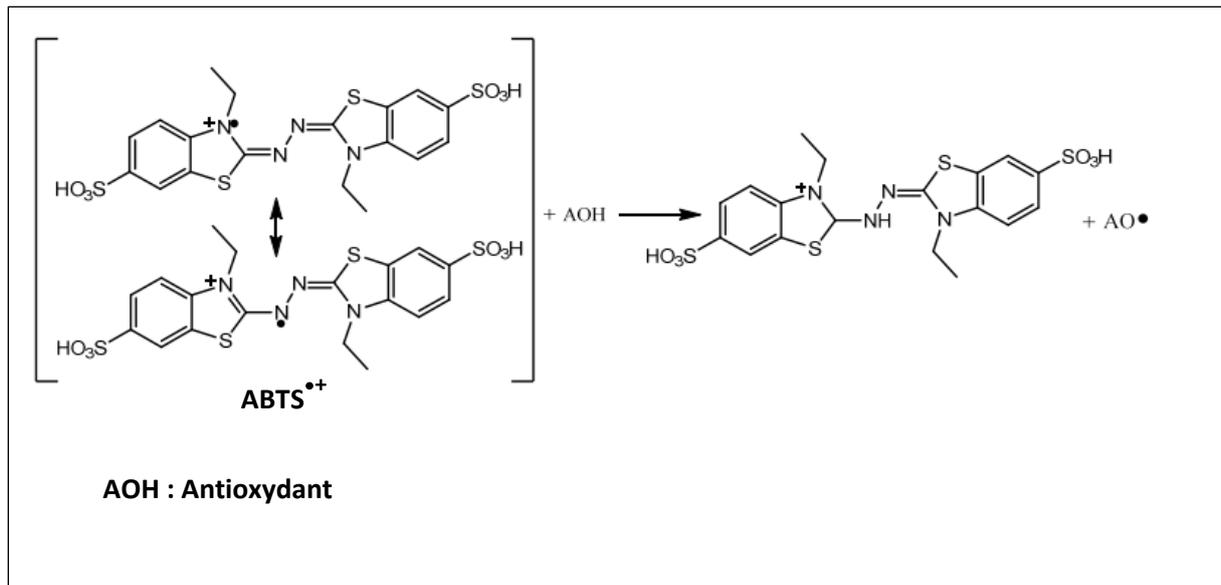


Figure 7: Piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•]

- **Méthode**

Le radical cationique ABTS^{•+} a été formé par la réaction entre 10 ml de la solution d'ABTS (2 mM) fraîchement préparé dans l'eau distillée et 100 µl d'une solution de persulfate de potassium 70 mM, ce mélange a été stocké dans l'obscurité à la température ambiante pendant 24 h. La solution d'ABTS^{•+} produite a été ensuite diluée avec le méthanol pour obtenir une absorbance de 0.70 à la longueur d'onde 734 nm. Ensuite, 200 µl de chaque extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 2 ml de la solution d'ABTS^{•+} déjà préparée et laisser réagir pendant 1 min. Enfin, les absorbances ont été mesurées à 734 nm.

III.1.3. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est effectué selon la méthode décrite par Oyaizu (1986).

- **Principe**

Cette méthode est basée sur la réaction de réduction des ions Ferricyanure (Fe(CN)₆³⁻) qui est composé d'un centre ferrique (Fe³⁺) à des ions de ferrocyanure (Fe(CN)₆⁴⁻) qui se présente sous forme d'un complexe ferreux (Fe²⁺) (**Fig. 8**) la réaction est révélée en présence par le virement du couleur jaune en couleur bleu vert en présence de l'antioxydant, l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotométrie à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique la capacité de l'échantillon à réduire le fer.

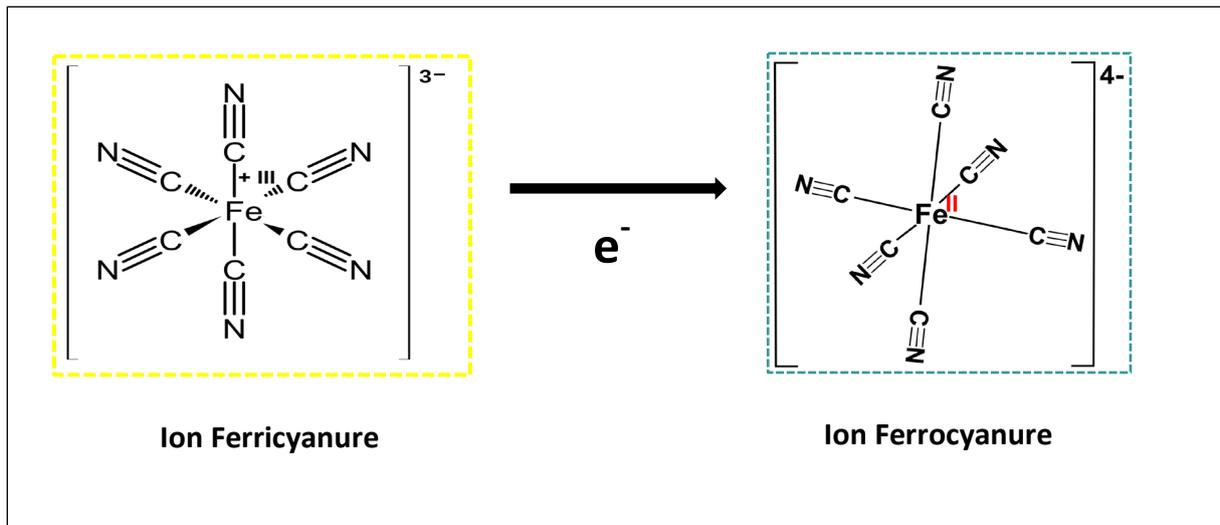


Figure 8 : Réaction de réduction de Fer

- **Méthode**

Ainsi, 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait a été mélangé avec 2.5 ml de la solution du tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ 1% (m/v).

Puis, les mélanges ont été incubés au bain-marie à une température de 50°C pendant 20 min. Après l'incubation, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) ont été additionnés. Ensuite, les solutions ont été centrifugées à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant ont été mélangés avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de trichlorure de fer ($FeCl_3$) (0.1%). Les absorbances ont été mesurées à la longueur d'onde 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme référence standard.

Les résultats du pouvoir réducteur du fer sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique présenté en (**Annexe 2**). La capacité de réduction, exprimée en équivalent d'acide ascorbique, correspond donc à la concentration de ce dernier ayant la même activité que la substance à tester à une concentration.

III.1.4. Test d'inhibition de l'oxyde nitrique

L'activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO) a été mesurée par spectrophotométrie en utilisant la méthode colorimétrique avec le réactif de Griess (Al Mahmud et *al.*, 2017).

- **Principe**

Le sodium nitroprusside dans une solution aqueuse à pH physiologique génère spontanément l'oxyde nitrique, ce dernier, interagit avec l'oxygène pour produire des ions nitrite (NO_2^-), l'acidification de ces ions génère la formation de NO^+ qui réagit avec le sulfanilamide pour produire un ion diazonium. Après couplage avec la N-(1-naphtyl) éthylènediamine, un chromophore azoïque stable (couleur rose) est formé, qui absorbe fortement à 540 nm (**Fig. 9**).

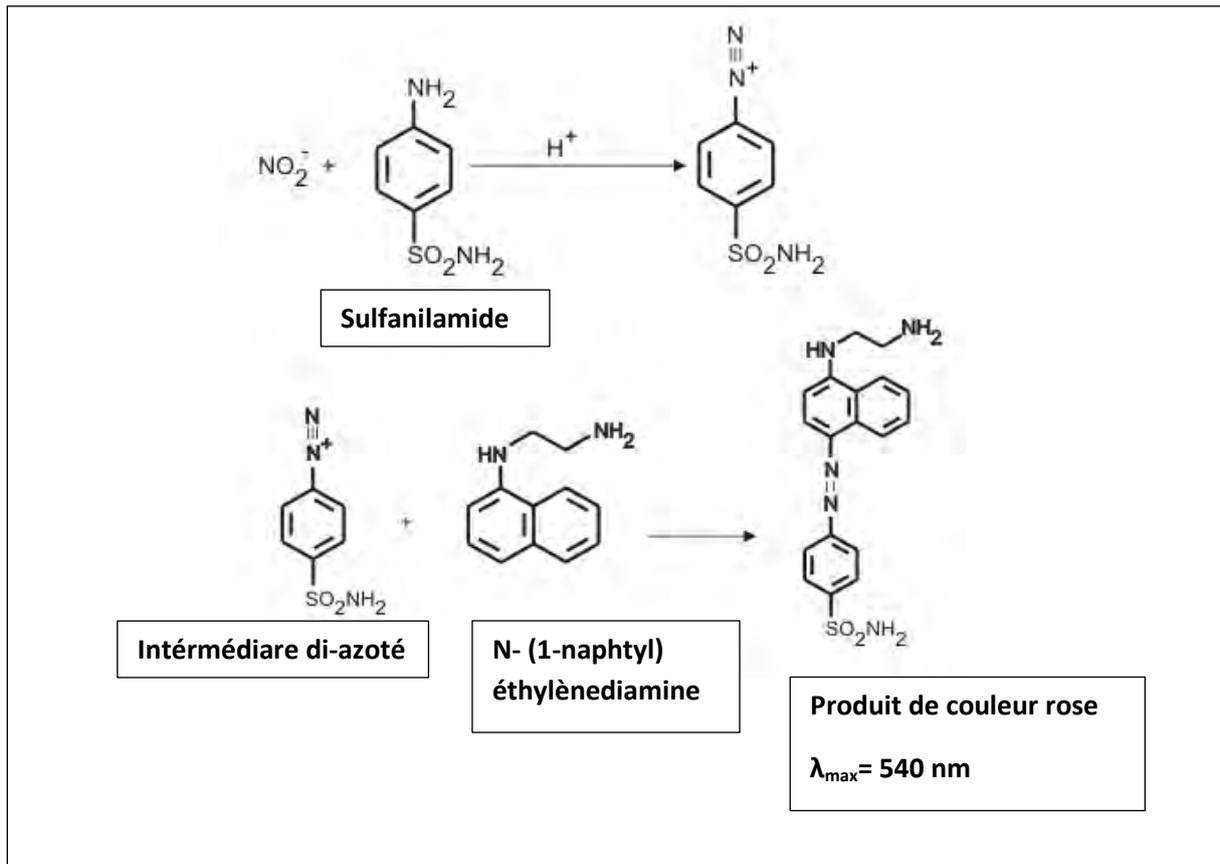


Figure 9: Principe de la réaction de Griess

- **Méthode**

Un volume de 0.250 ml de chaque extrait à différentes concentrations a été mélangé avec 0.5 ml de de sodium nitroprusside 10 mM (préparé dans un tampon phosphate pH 7.2) et incubé à 30°C pendant 2 heures. Après la période d'incubation, 0.5 ml du réactif de Griess (1% de sulfanilamide, 2% d'acide sulfurique (H_2SO_4) et 0.1% de N- (1-naphtyl) éthylènediamine dihydrochloride (NEDA)) a été ajouté. L'absorbance du chromophore qui s'est formé pendant la diazotation du nitrite avec la sulfanilamide et le couplage subséquent avec le NED a été

immédiatement lue à 550 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical NO \cdot par les échantillons a été calculé en utilisant l'équation suivante:

$$I\% = ((\text{Absorbance}_{\text{Contrôle}} - \text{Absorbance}_{\text{échantillons}}) / \text{Absorbance}_{\text{Contrôle}}) * 100$$

Où le contrôle contient tous les réactifs sauf l'inhibiteur. Les IC₅₀ ont été par la suite déterminés.

III. 2. Evaluation de l'effet des extraits sur le stress oxydatif chez les souris diabétique

L'effet des extraits sur le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie a été évalué par le dosage du marqueur du stress oxydatif la Malonaldehyde(MDA)et l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) au niveau des foies et des reins des souris diabétiques. Les groupes des souris diabétiques traités pendant un mois par les extraits CSA et CMA (500 mg/kg) par voie orale ont été comparés avec un groupe diabétique non traité, un groupe traité par la Metformine (300 mg/kg) et un groupe normal.

A la fin du traitement, les organes ont été rapidement prélevés des souris et immédiatement rincés dans l'eau physiologique. Les fragments des organes ont été homogénéisés séparément, à raison de 1 g de tissu dans 10 ml du tampon phosphate (0.05M, pH 7.4) (10% (p/v)). Puis, les homogénats préparés ont été centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse (Mikro 220R, Hettick Lab Technology, Germany) pendant 10 minutes à 3000tr, 4 °C. Ensuite, les surnageants ont été transférés dans des tubes propres et conservés à -20°C.

III. 2.1. Analyse du taux du marqueur MDA

Le dosage du marqueur du stress oxydatif MDA repose sur la formation en milieu acide et à une température élevée entre la molécule de l'MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment de couleur rose qui absorbe à 532 nm et extractible par les solvants organiques tel que le buthanol (**Fig. 10**).

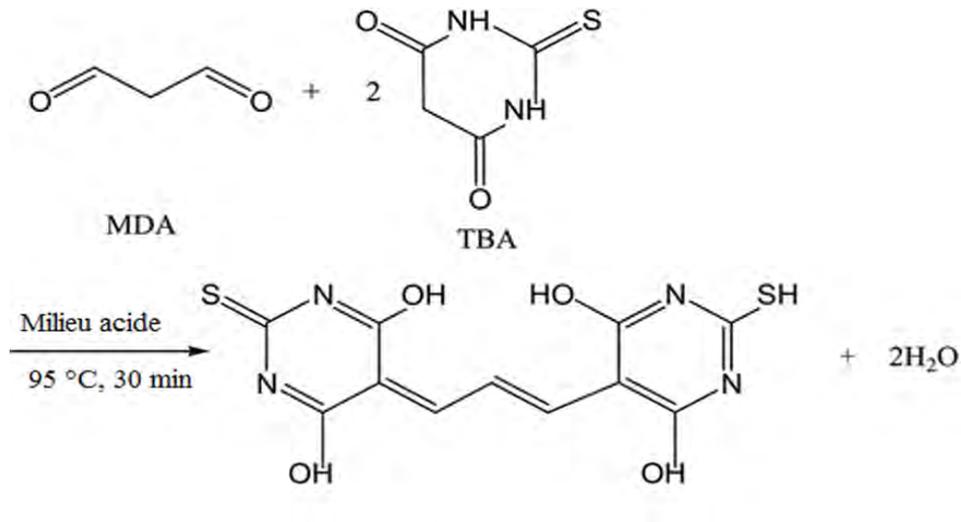


Figure 10: Réaction de malondialdéhyde (MDA) avec l'acide thiobarbiturique (TBA)

- **Méthode**

Pour le dosage du MDA, 100 µl de l'homogénat ont été mélangés avec 300 µL de TBA (0.6%) et 700 µl d'acide phosphorique (1%). Les mélanges ont été mis au bain-marie à 95 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement, 2 mL du n-butanol ont été additionnés et les mélanges ont été agités à l'aide du vortex, puis centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 minutes. En fin, les surnageant ont été transférés dans des tubes propres et leur absorbances ont été déterminées à la longueur d'onde 532 nm au spectrophotomètre. Les résultats du dosage sont exprimés en nmol/gramme de tissu et calculés à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'MDA réalisé dans les mêmes conditions(**Annexe 2**).

III.2. 2. Dosage de l'activité de SOD

- **Principe**

L'activité du superoxyde dismutase a été mesurée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich. En fait, cette méthode repose sur la mesure de la capacité de l'enzyme SOD à inhiber la réduction du nitrobleu-tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produite suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine. Le NBT de couleur jaune à l'état basal se transforme en formazan de couleur bleue mesurable à 560 nm(**Fig. 11**).

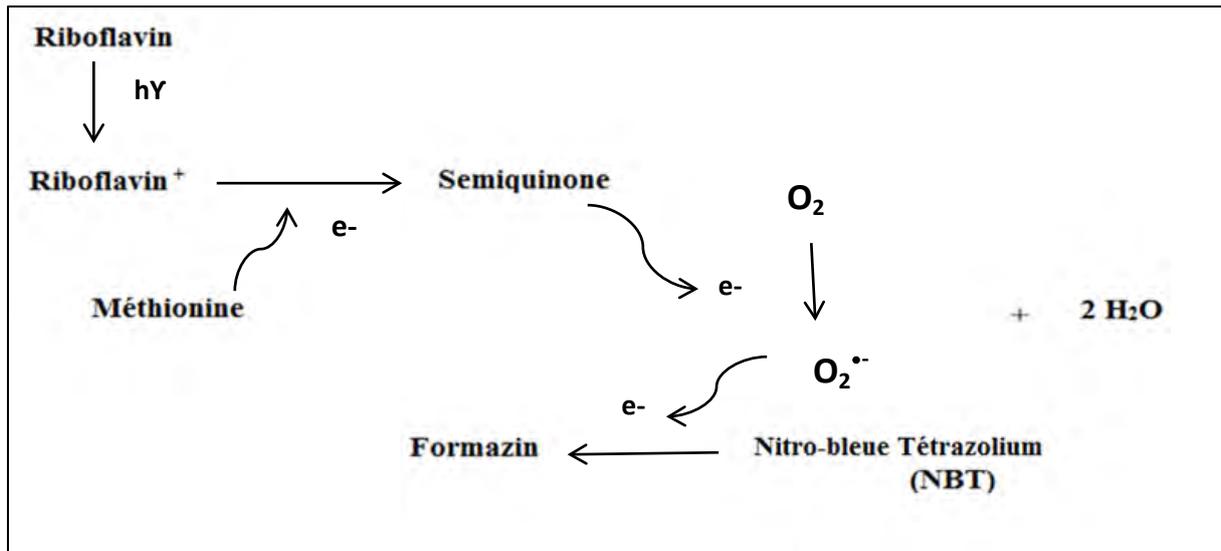


Figure 11: Principe de dosage de SOD

- **Méthode**

Afin de doser l'activité de SOD total (T-SOD), les homogénats des foies et des reins des souris (20 μ l) ont été mis en présence du mélange réactionnel qui contenait 740 μ l du tampon phosphate (50 mM), 150 μ l de triton x-100 (0.25%), 150 μ l EDTA (10 mM EDTA (pH 8)), 150 μ l L-Méthionine (120 mM), 0.75 mM 150 μ l de NBT (50 mM), et 150 μ l riboflavine (10 μ M) ajouté à la fin pour initier la réaction.

La réaction a été effectuée à 25 °C et sous la lumière pendant 10 min dans un incubateur. L'absorbance est lue à 560 nm, l'activité de SOD est mesurée selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{blanc}}) \times 100$$

Où A_{blanc} est l'absorbance du mélange contenant tous les réactifs sauf l'homogénat.

Les résultats ont été exprimés en unité par gramme de tissu.

(Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50% la réduction de NBT).

IV. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire nous avons choisi comme protocole expérimental, un modèle d'inflammation aiguë, le test de l'œdème plantaire à la carragénine. Le principe de ce test est basé sous le fait que l'injection de la carragénine, agent phlogogène, sous la face

plantaire de la patte du rat, provoque la formation de l'œdème, localisé dans la région métatarsienne. La substance anti-inflammatoire administrée préventivement à l'animal inhibe la formation de cet œdème. La technique consiste à mesurer les variations volumiques de la patte au cours du temps et à comparer le développement de l'œdème chez les animaux témoins et références.

Le test a été réalisé sur des rats adultes de souche Wistar mâles et femelles dont le poids compris entre 150 et 294 gramme. Ces rats sont mis à jeun pendant 18 heures avant l'expérimentation.

Les animaux ont été réparties en 6 lots de 5 rats chacun et ont reçu par voie orale les différents traitements :

- Un lot témoin recevant de l'eau distillée à la dose de 5 ml/kg.
- Un lot de référence recevant l'indométacine à la dose de 10 mg/kg.
- Un lot recevant l'extrait CSA à la dose de 500 mg/kg.
- Un lot recevant l'extrait CMA à la dose de 500 mg/kg.

Les animaux de chaque lot ont reçu 5 ml d'eau potable par voie orale, 30 min avant les traitements, de façon à assurer une hydratation uniforme chez tous les rats et à minimiser les variations de réponse à l'œdème des pattes.

L'inflammation a été provoquée par l'injection de 0.05 ml de carragénine à 1 % dans NaCl

9 ‰ sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat une heure après les traitements.

Le volume de patte gauche de chaque rat a été mesuré avant et une heure et 30 minutes, trois heures, et six heures après l'injection de la carragénine, en utilisant le pléthysmomètre. Le fonctionnement de cet appareil est basé sur le principe de la poussée d'Archimède l'immersion de la patte jusqu'au niveau de la malléole latérale dans le liquide (solution d'eau distillée additionnée de NaCl (1 g/l) et d'un agent mouillant (Triton à raison de 1,5 ml/l)) contenu dans la cellule du pléthysmomètre (LE 7500 Digital) (**Fig. 12**) provoque le déplacement du volume qui correspond à la quantité de volume de la patte du rat. Ce volume est traduit et enregistré grâce à la partie électronique du pléthysmomètre. Le pourcentage moyen d'augmentation du volume des pattes (% d'œdème) et le pourcentage d'inhibition de l'œdème ont été calculés avec les formules suivantes:

$$\% \text{ d'œdème (t)} = \left(\frac{V_t - V_0}{V_0} \right) * 100$$

Avec : V_0 = Volume initial de la patte avant induction de l'œdème ;

V_t = Volume de la patte après administration de la carragénine et traitement.

$$\% \text{ d'inhibition d'œdème} = \frac{\% \text{ d'œdème (témoin)} - \% \text{ d'inhibition d'œdème (traité)}}{\% \text{ d'œdème (témoin)}}$$



Figure 12: Appareil de pléthysmomètre

V. Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard. La signification statistique a été analysée par l'analyse de variance (ANOVA one way), et la comparaison multiple par le test de Tukey. La signification a été établie à $p \leq 0.05$. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism v 6.

Chapitre IV : Etude phytochimique bioguidée

Cette partie de notre travail est consacrée à la recherche des composés bioactives des plantes étudiées à l'aide d'une étude phytochimique bioguidée.

I. Préparation des fractions

Afin de séparer les différents constituants chimiques des plantes CS et CM nous avons utilisé des solvants de polarité croissante : l'hexane, l'éther-diéthylique et le buthanol.

Premièrement, nous avons employé la méthode d'extraction au soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant afin d'extraire tous les composés non phénoliques tels que les produits lipidiques, les cires et les pigments chlorophylliens.

L'extraction au soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide et porte le nom de son inventeur : Franz von Soxhlet. L'avantage de ce type d'extraction est que l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quelque soit la matrice végétale.

Une quantité de 200 g de chaque plante séchées et broyées CS et CM a été introduite dans la cartouche en papier filtre, et placée dans le soxhlet surmonté d'un réfrigérant (**Fig. 13**).

Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon contenant 1000 ml et porté à ébullition à une température de 45°C pendant 6h.

Lorsque le ballon est chauffé, les vapeurs du solvant passent à travers le tube d'adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'adducteur, trempant ainsi les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à ce qu'il atteigne le sommet du tube de siphon, qui renvoie alors le liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon est progressivement enrichi en composés solubles. Les extraits obtenus ont été évaporés sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor pour obtenir la fraction hexanique de *Cistus salviifolius* (FCSH) et de *Cistus monspeliensis* (FCMH).

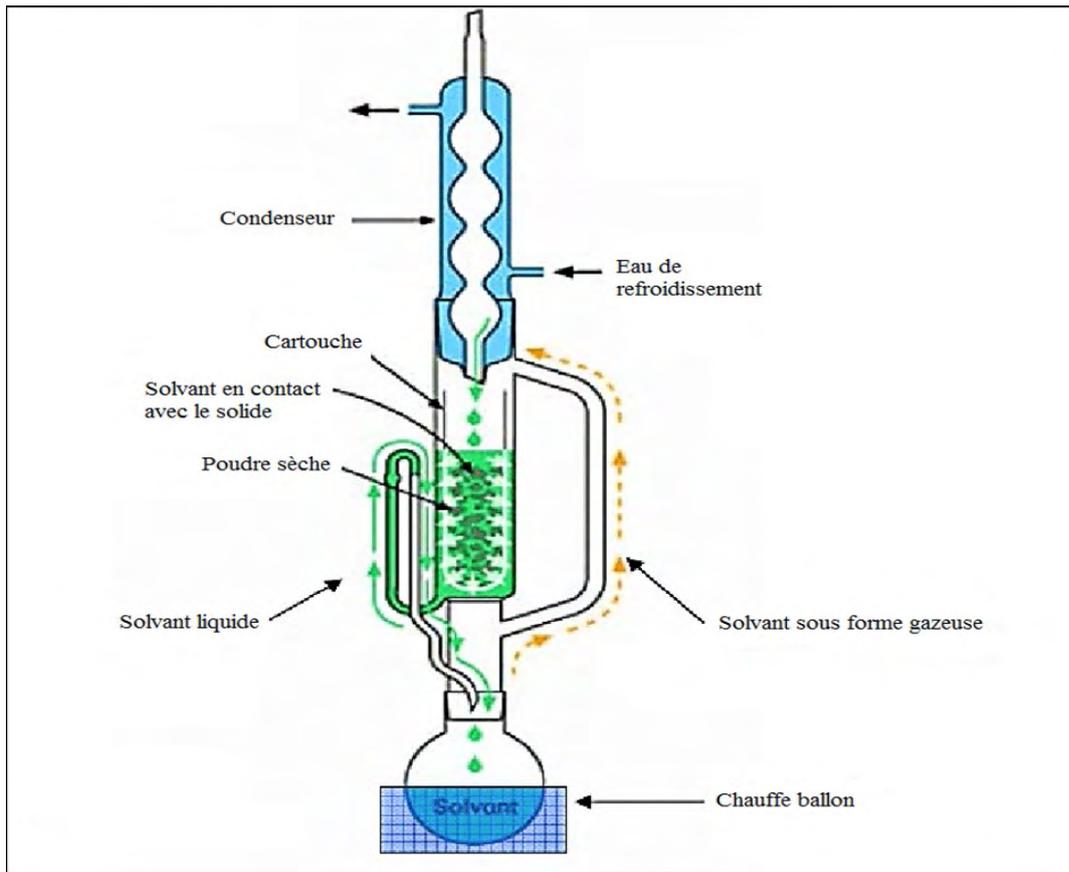


Figure 13 : Appareillage de l'extraction au soxhlet

Ensuite, la matière végétale résiduelle dégraissée par l'hexane a été soumise à une extraction par macération pendant 24h en utilisant éthanol-eau (50 : 50) afin d'extraire les différents composés phénoliques. Après filtration, l'éthanol a été évaporée à une température égale à 45°C et la phase aqueuse a été récupérée et soumise à un fractionnement liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter qui permet de partager les molécules selon leurs propriétés physicochimiques entre deux solvants non miscibles.

La phase aqueuse de chaque plante a été placée dans une ampoule à décanter. Ensuite, elle a été soumise à un processus de séparation liquide-liquide avec éther diéthylique pour extraire les génines et les flavonoides libres et ensuite avec le buthanol afin d'extraire les di-glycosides et les tri-glycosides. La phase aqueuse restante à la fin du partage a été utilisée comme fraction très polaire.

Les phases éther-diéthylique et buthanolique ainsi que la phase aqueuse résiduelle ont été évaporées séparément afin d'obtenir : une fraction d'éther diéthylique, une fraction buthanolique et une fraction aqueuse de chaque plante (FCSE, FCME, FCSB, FCMB, FCSA, FCMA pour *Cistus salviiifolius* et *Cistus monspeliensis*(**Fig. 14**).

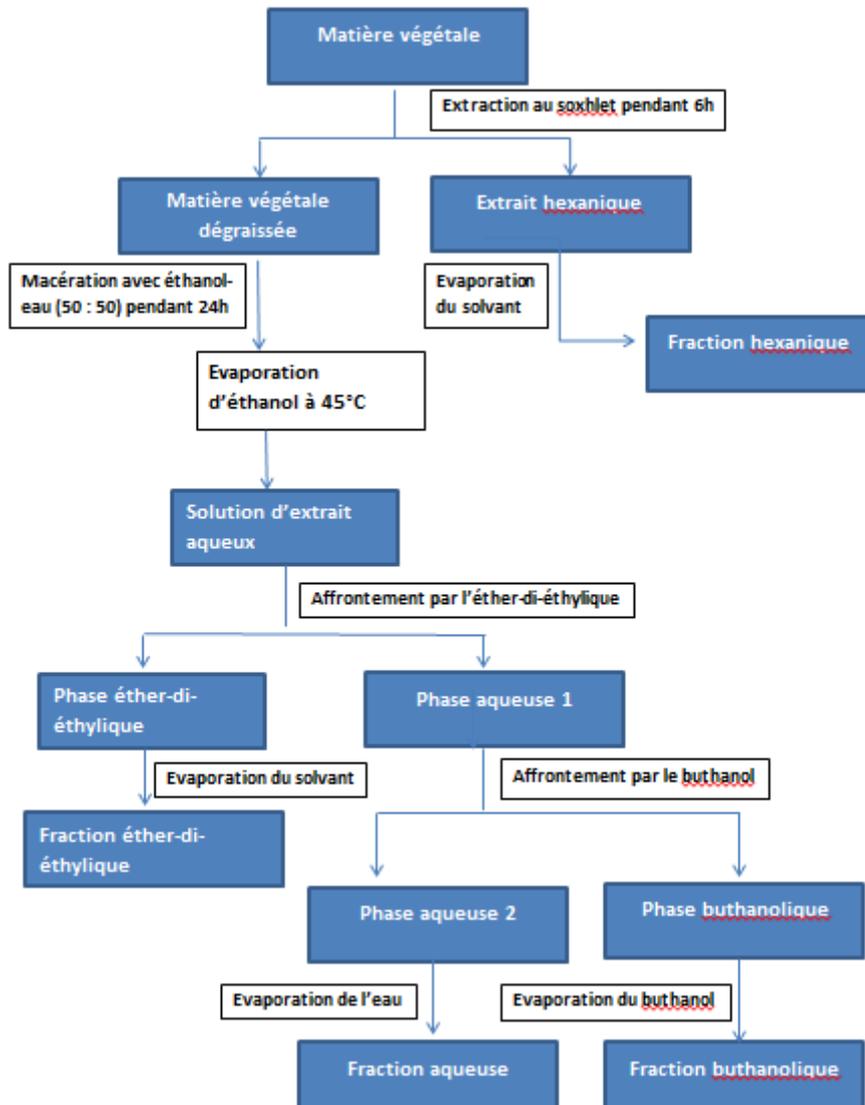


Figure 14: Organigramme de fractionnement

II. Evaluation de l'activité antioxydante des fractions

L'activité antioxydante de différentes fractions a été évaluée en utilisant le test au DPPH, le test de piégeage du radical cationique ABTS et le test d'inhibition de NO[•] en suivant les mêmes protocoles utilisés pour évaluer l'effet antioxydant des extraits aqueux.

III. Evaluation de l'effet des fractions sur l' α -amylase et α -glucosidase

La capacité inhibitrice de nos fractions sur l'enzyme α -amylase et α -glucosidase a été évaluée selon les mêmes procédures décrites pour les extraits aqueux.

IV. Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard. La signification statistique a été analysée par l'analyse de variance (ANOVA one way), et la comparaison multiple par le test de Tukey. La signification a été établie à $p \leq 0.05$. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism v 6.

V. Analyse des fractions sur HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC – High Performance Liquid Chromatography est plus fréquemment utilisée) est une technique de séparation analytique où la phase mobile est une solution liquide, souvent constituée d'un mélange de solvant, et la phase stationnaire est un solide constituée de particules fines. Dans cette méthode le mélange à séparer est entraîné à de fortes pressions par la phase mobile à travers une colonne remplie de phase stationnaire.

Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre selon leurs diverses affinités entre les deux phases stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les molécules sont détectées à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.)

La détection UV permet d'obtenir un chromatogramme où chaque pic indique généralement une molécule détectée à une longueur d'onde donnée.

- **Conditions opératoires**

Les différentes fractions de *Cistus* ont été analysées sur un HPLC quaternaire DIONEX en utilisant la colonne Phenomenex Luna, C18, 5 μ m (150x4.6 mm). La phase mobile est constituée d'eau / méthanol avec un gradient de méthanol allant de 0 à 100%. Le temps d'analyse était de 60 minutes. Le débit de la phase mobile était de 1 ml / min. Les échantillons ont été solubilisés dans du méthanol à une concentration de 1 mg / ml. Les composés phénoliques ont été identifiés en se basant sur le temps de rétention de chaque produit et de leurs spectres UV en comparaison avec les témoins standards existants au laboratoire. Les teneurs des fractions en chaque produit sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec les standards analysés (acide gallique, acide sinapique, acide syringique, acide tannique, acide rosmarinique, acide ferrulique, acide vanillique, quercétine, rutine, narginine) à différentes concentrations (**Annexe 4**) et elles sont exprimées en microgrammes par milligramme de fraction.

La fraction la plus active FCMB a été analysée sur HPLC et sur HRMS et soumise par la suite à un fractionnement sur CPC.

VI. Analyse de la fraction la plus active sur HRMS

Les analyses HRMS (High-resolution mass spectrometry) ont été effectuées sur FCMB en utilisant le Spectromètre de masse Thermo Fisher Scientific Exactive Orbitrap équipé d'une source d'ions électrospray.

VII. Fractionnement de la fraction la plus active par CPC

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative où les phases stationnaires et mobiles sont liquides. Cette technique permet la séparation des constituants d'un mélange en se basant sur leurs différences de partage entre deux phases liquides non miscibles.

L'appareillage de la CPC est muni d'un rotor constitué de plusieurs cellules reliées entre-elles, remplies de la phase stationnaire. Lorsque l'appareil est mis en rotation le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide immobile. La phase mobile qui transporte l'échantillon à séparer percole à travers la phase stationnaire permettant ainsi aux différentes molécules de se séparer selon leur affinité avec les deux phases.

En effet, l'utilisation d'un dispositif CPC permet d'inverser facilement le sens de pompage de la phase mobile à travers une vanne quatre voies. Quand la phase stationnaire est la plus dense, la phase mobile est pompée en mode ascendant à contre sens du champ de force centrifuge. Par contre, quand la phase stationnaire est la plus légère la phase mobile entre dans la direction du champ de force centrifuge, c'est -à-dire le mode descendant (**Fig. 15**).

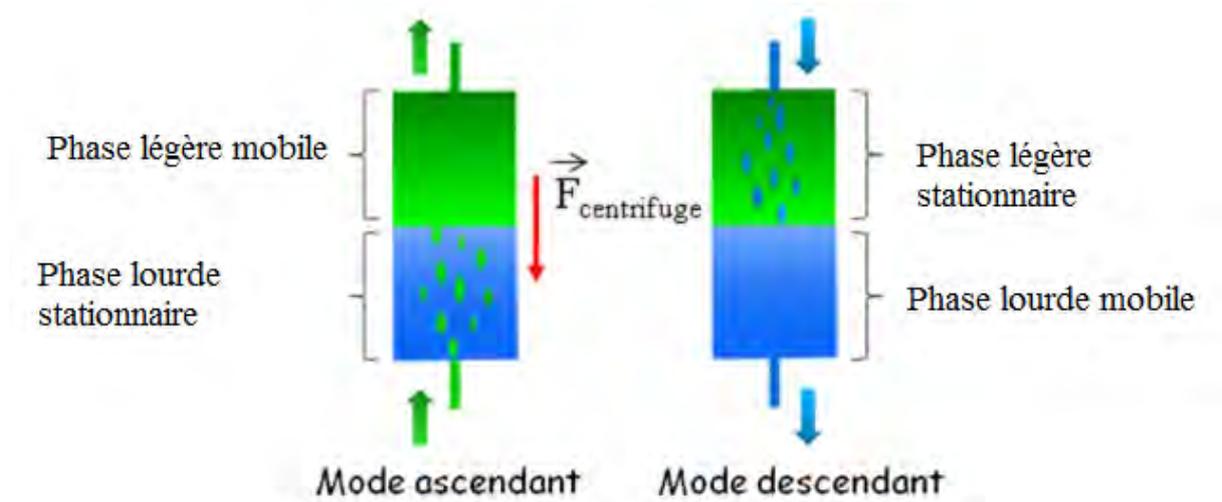


Figure 15: Représentation schématique des modes ascendant et descendant en CPC

Différents systèmes des solvants bi-phasiques de différente polarité sont actuellement largement appliqués pour le fractionnement des extraits des plantes.

Avant de procéder le fractionnement par la CPC, des systèmes du solvant bi-phasique ont été testés afin de choisir le système optimal. Le système du solvant doit se séparer rapidement en deux phases distinctes et ne doit pas former d'émulsion lors de l'ajout de l'échantillon à séparer.

Ainsi, nous avons solubilisé notre échantillon dans différents systèmes du solvant les molécules de l'échantillon se répartissent alors selon leur affinité entre les deux phases. Les phases supérieures et les phases inférieures des différents systèmes ont été par la suite analysées séparément sur CCM. Le système optimal a été choisi en se basant sur l'intensité des tâches obtenus, si l'intensité des tâches est égale entre la phase supérieure et la phase inférieure on a donc un coefficient d'affinité/partition proche de 1 ce qui signifie que le système est optimal.

Le système utilisé pour le fractionnement par CPC est constitué de :

Un appareil CPC Armen instrument muni d'un rotor dans lequel se fait le fractionnement de l'échantillon, une pompe Shimadzu, un système d'injection, un collecteur automatique (Gilson FC204) avec des tubes en verre, et un détecteur Shimadzu (**Fig. 16**).

Les cellules composant le rotor de l'appareil CPC est dans un premier temps chargées de phase stationnaire à 30ml/ min, et 500 rotations par minute (rpm). Ensuite, la phase mobile est additionnée à 8ml/min, 1600 rpm jusqu'à équilibration du système.

Notre échantillon a été solubilisée dans 10 ml du solvant bi-phasique : Acétate d'Ethyle/ Eau à raison de 1g/10 ml du solvant, et filtré sur une membrane PTFE 0.45µm, puis, injectée.

L'élution a duré 60 min, suivie par une extrusion de 15min à 30 ml/min, 1600 rpm afin de récupérer les produits qui ont restés accrochés à la phase stationnaire.

En fin, les sous fractions ont été récupérés dans les tubes en verre du collecteur automatique. Chaque échantillon collecté a été analysée par la suite sur CCM. Les sous-fractions identiques ont été rassemblés.



Figure 16: Système d'appareillages de CPC

VIII. Analyse des fractions sur CCM

La chromatographie sur couche mince est une méthode analytique simple très utilisée dans les analyses phytochimique qualitative pour la séparation et la mise en évidence des constituants d'un mélange. Le principe de cette méthode est basé sur la répartition sélective des constituants du mélange entre deux phases, la phase mobile et la phase stationnaire.

Cette méthode repose sur des phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. La répartition de différents constituants se fait en fonction de la nature de la phase mobile, et de la phase stationnaire, ainsi que des propriétés physico-chimiques des produits à séparer.

Dans ce travail, la CCM a été utilisée dans un premier temps pour la séparation et la caractérisation des composés phénoliques et des flavonoïdes présents dans la fraction la plus active sélectionnée et pour avoir une idée sur la complexité du mélange constituant

cette fraction. Par la suite, nous avons utilisé la CCM pour comparer les profils des sous-fractions obtenues après fractionnement par CPC afin de les rassembler en fonction de leurs similitudes, et d'avoir des informations sur les caractéristiques des composés majoritaires pour pouvoir les analyser d'une manière plus précise sur les autres méthodes analytiques.

Ainsi, la CCM a été effectuée sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support en aluminium : Silica gel 60 F254, (Merck). Le mélange à étudier est posé à l'aide d'un capillaire à environ 1 cm du bord puis placé dans une cuve contenant l'éluant : Toluène/Acétone/Acide formique (3/3/1).

Le niveau de l'éluant doit être en dessous de l'échantillon déposé. La cuve de chromatographie est ensuite refermée par un couvercle. L'éluant migre sur la plaque de silice par capillarité et entraîne les composés de l'échantillon déposé. Les composés qui ont une vitesse de migration différente seront séparés.

Après séchage, les chromatogrammes ont été révélés sous la lumière UV/254/366 nm avant et après pulvérisation par le réactif de Neud que nous avons utilisé comme révélateurs.

IX. Analyse de la fraction la plus active et ses sous-fractions sur UPLC

La Chromatographie en phase liquide ultra performance (UPLC) est une version développée de l'HPLC, mais le mode de fonctionnement est le même. Cependant, contrairement à la HPLC, cette méthode permet d'analyser de très petites particules, telles que des particules de 2 micromètres. En plus, elle utilise une pression de pompe plus élevée ce qui permet d'introduire l'ensemble de l'échantillon dans la colonne en générant ainsi des pics mieux définis et plus concentrés. Aussi, il fournit une analyse plus rapide.

- **Conditions opératoire**

Notre échantillon a été analysé par l'UPLC (Waters ACQUITY UPLC Classe H) combiné avec un PDA (détecteur à photodiode) et un détecteur de masse ACQUITY QDa. L'analyse a été effectuée en utilisant la colonne EC 100/2 NUCLEODUR HILIC, 1.8 µm avec une température réglée à 30 °C. La phase mobile est constituée de 0.1% d'acide formique dans l'eau (A) et de 0.1% d'acide formique dans l'acétonitrile (B). Le gradient de phase mobile était: (0-0.50 min) 10% A; (0.50-9 min) 10% A; (9-11 min) 100% A, (11-11.50 min) 100% A; (11.50-14 min) 10% A. Le mode MS-Scan a été utilisé de 100 à 1200 Da. La solution de l'extrait a été préparée dans du MeOH à 1 mg / ml et le volume d'injection était de 4 µl.

Résultats

Chapitre I : Caractérisation phytochimique

I. Rendement d'extraction

Les rendements de l'extraction aqueuse par infusion, de CSA et CMA, exprimés en pourcentage par rapport à la quantité du matériel végétal sec de départ, sont présentés dans le **Tableau 1**. Nous avons constaté que l'extraction aqueuse a donné un bon rendement en extrait sec pour les deux plantes étudiées.

Tableau 1: Rendement en extrait sec de CSA et CMA

Espèce	Extrait aqueux
<i>Cistus salviifolius</i>	17.40%
<i>Cistus monspeliensis</i>	16.00%

II. Screening phytochimique

Le screening phytochimique effectué sur le matériel végétal sec et broyé nous a permis de mettre en évidence la présence de différentes classes de métabolites secondaires dans les plantes étudiées. Les résultats présentés dans le **Tableau 2** indiquent la présence des flavonoïdes, des tanins et des terpénoïdes en quantité importante et les saponosides en quantité modérée dans les deux plantes. Tandis que les quinones libres et les anthraquinones sont présentes en traces dans CM et sont absents dans CS. Alors que les alcaloïdes sont absents dans les deux plantes.

Tableau 2: Métabolites secondaires caractérisés dans les plantes *C.monspeliensis* et *C.salviifolius*

	<i>Cistus salviifolius</i>	<i>Cistus monspeliensis</i>
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	+++	+++
Tanins	+++	+++
Quinones libres	-	+
Anthraquinones	-	+
Saponosides	++	++
Terpénoïdes	+++	+++

Les résultats sont exprimés selon :

(+++): Présent avec une importante quantité (++) : Présent avec une quantité modérée

(+): Présent à l'état de traces

(-): Absent

III. Dosage des composés phénoliques

Les résultats du dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés au moyen du spectrophotomètre sont présentés dans le **Tableau 3**. Pour les deux extraits nous avons remarqué une richesse en composés phénoliques. Les résultats ont montré que l'extrait CSA présente des teneurs en polyphénols totaux significativement ($p < 0.05$) plus élevées avec une valeur de 408.43 ± 1.09 mg EAG/g que celles données par l'extrait CMA (261.76 ± 1.93 mg EAG/g d'extrait). Aussi, nous avons constaté que CSA a une concentration en flavonoïdes (140.00 ± 1.15 mg ER/g d'extrait) relativement plus élevée que CMA (78.00 ± 1.15 mg ER/g d'extrait). CSA et CMA ont des teneurs importantes en tanins catéchiques avec des valeurs non significativement ($p < 0.05$) différentes.

Tableau 3: Teneurs des extraits en composés phénoliques

	Polyphénol totaux (mg EAG/g d'extrait)	Flavonoïdes (mg ER/g d'extrait)	Proanthocyanidine (mg EC/g d'extrait)
CSA	408.43 ± 1.09^b	140.00 ± 1.15^b	154.15 ± 3.31^a
CMA	261.76 ± 1.93^a	78.00 ± 1.15^a	151.42 ± 0.94^a

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ($n = 3$) \pm erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partagent pas une lettre commune (a et b) diffèrent significativement à $p < 0.05$.

IV. Composition minérale des plantes *C. salviifolius* et *C. monspeliensis*

Les teneurs des plantes étudiées en minéraux exprimés en mg/kg sont indiqués dans le **Tableau 4**. Cinq macroéléments (Ca, K, Mg, Na, P) et trois microéléments (Cu, Fe, Zn) ont été analysés. Les résultats ont montré que la plante CS a un contenu significativement ($p < 0.05$) plus élevé en Ca (3684.32 ± 30.21 mg / kg), Mg (785.27 ± 14.44 mg / kg), K (287.84 ± 3.13 mg / kg), P (275.26 ± 5.64 mg / kg), Na (175.97 ± 1.93 mg / kg) et Cu (84.00 ± 9.95 mg / kg) par rapport à la plante CM, tandis que CM a des quantités significativement plus élevées en Fe (29.16 ± 1.17 mg / kg); en outre, aucune différence statistiquement significative n'a été constaté entre CS et CM concernant les teneurs en Zn.

Tableau 4: Composition minérale de *C. salviifolius* et *C. monspeliensis*

	<i>Cistus salviifolius</i>	<i>Cistus monspeliensis</i>
Ca	3684.32 ± 30.21 ^b	475.32 ± 5.13 ^a
Cu	84.00 ± 9.95 ^b	17.68 ± 0.19 ^a
Fe	Fe 2.95 ± 0.17 ^a	29.16 ± 1.17 ^b
K	287.84 ± 3.13 ^b	27.87 ± 0.90 ^a
Mg	785.27 ± 14.44 ^b	95.78 ± 0.93 ^a
Na	175.97 ± 1.93 ^b	25.97 ± 0.27 ^a
P	275.26 ± 5.64 ^b	204.75 ± 4.13 ^a
Zn	5.90 ± 0.30 ^a	17.48 ± 0.35 ^a

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ($n = 3$) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même ligne et qui ne partageant pas une lettre commune (a et b) diffèrent significativement à $p < 0.05$.

Chapitre II : Etude de l'activité antidiabétique

I. Etude de la toxicité chez la souris

I.1. Toxicité aiguë

L'étude de la toxicité aiguë selon les Lignes Directrices de l'OCDE code 423 chez la souris a montré que les extraits aqueux des parties aériennes de *Cistus salvifolius* et *Cistus mospeliensis* à la dose de 2000mg/kg n'ont produit aucune mortalité ni aucune signe de toxicité durant toute la période d'observation (14 jours). De plus, aucun changement significatif de la masse corporelle n'a été enregistré durant le suivi journalier de l'évolution pondérale des souris (**Fig. 17**). Les résultats obtenus montrent que la DL₅₀ de nos extraits chez la souris est supérieure à 2000mg/kg VO.

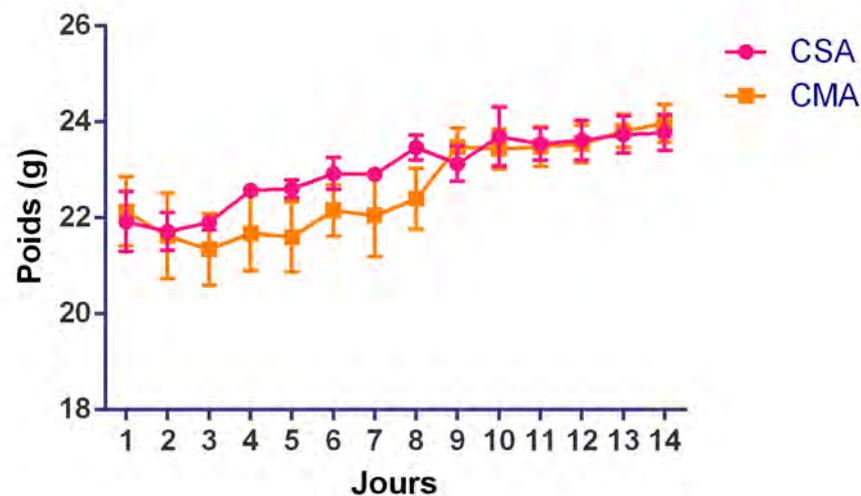


Figure 17: Evolution de la masse corporelle des souris

I.2. Effets sur les paramètres biochimiques

Durant toute la période du traitement, aucune mortalité n'a été enregistrée et aucun signe de toxicité n'a été observé dans les deux groupes des souris traitées par CSA et CMA à la dose de 500 mg/kg. Les résultats de l'analyse des paramètres biochimiques sont présentés dans le **Tableau 5**. Nous avons constaté que les extraits CSA et CMA à la dose de 500 mg/kg n'ont aucun effet significatif sur les différents paramètres biochimiques analysés en comparaison avec le groupe normal.

Tableau 5: Effet de CSA et CMA sur les différents paramètres biochimiques chez la souris

Groupe	Normal	CSA	CMA
Urée	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.33 ± 0.04
Créatinine	2.39 ± 0.02	2.43 ± 0.05	2.36 ± 0,0
Glycémie	0.83 ± 0.03	0.95 ± 0.02	0.93 ± 0.13
ASAT	231.84 ± 14.80	185.40 ± 19.22	218.91 ± 25.71
ALAT	30.96 ± 4.61	21.25 ± 2.77	29.56 ± 8.28
Protéines	57.00 ± 2.61	60.74 ± 1.60	58.68 ± 4.62
Triglycérides	0.86 ± 0.05	1.02 ± 0.10	0.98 ± 0.20
Cholestérol	0.91 ± 0.06	1.302 ± 0.04	1.02 ± 0.27

Les valeurs sont la moyenne de dix mesures ($n = 10$) ± erreur standard.

En outre, nous avons noté un gain significatif et normal du poids corporels des souris traités par CSA et CMA par rapport au poids corporels du premier jour de l'expérience, et en comparaison avec les animaux du groupe normal.

II. Test de tolérance au glucose

Dans le but d'évaluer l'effet de CSA et CMA sur l'homéostasie systémique du glucose, nous avons effectué le test de tolérance au glucose par voie orale chez des rats à jeun.

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose chez les rats traités par les extraits aqueux CSA et CMA à la dose de 500mg/kg sont illustrés en **fig. 18**.

L'administration aiguë de CSA et CMA à la dose de 500 mg/kg par voie orale a réduit significativement ($p < 0.05$) le pic de la concentration du glucose observé à 30 min après la charge orale de glucose à une dose de 2g/kg. Après 120 min CSA et CMA ont diminué la glycémie à des valeurs normales proches de celles obtenues avec la métformine. En outre, aucune différence significative n'a été observée entre CMA et CSA. Les résultats obtenus démontrent l'importante efficacité de nos extraits sur l'hyperglycémie.

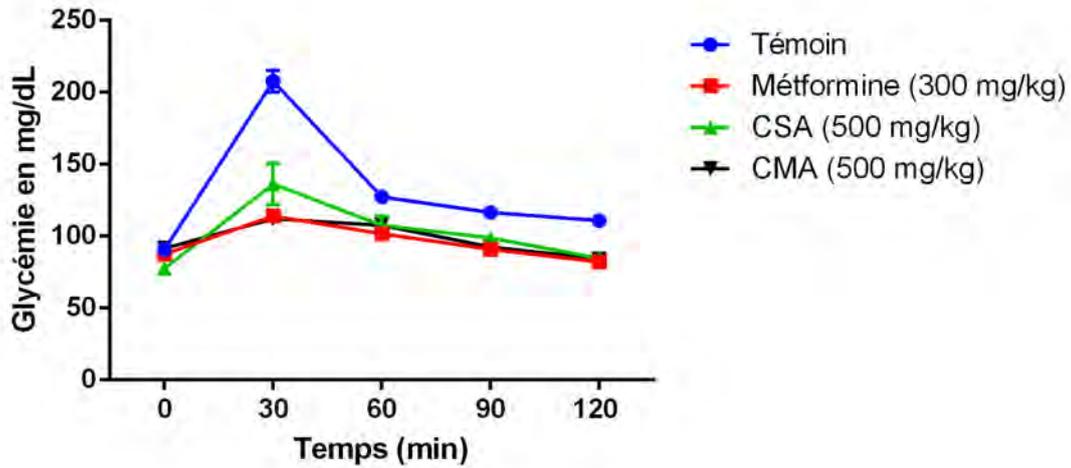


Figure 18: Effet de CSA et CMA sur la tolérance au glucose chez le rat

III. Activité antidiabétique

III.1. Effet sur le poids corporel des souris diabétiques

Au cours de la période expérimentale, le poids corporel des souris diabétiques était significativement inférieur à celui des souris non diabétiques (**Fig. 19**). L'administration journalière de CSA et CMA à la dose de 500 mg/kg par voie orale a prévenu significativement ($p < 0.05$) la perte pondérale chez les souris diabétiques en comparaison avec les souris diabétiques non traités.

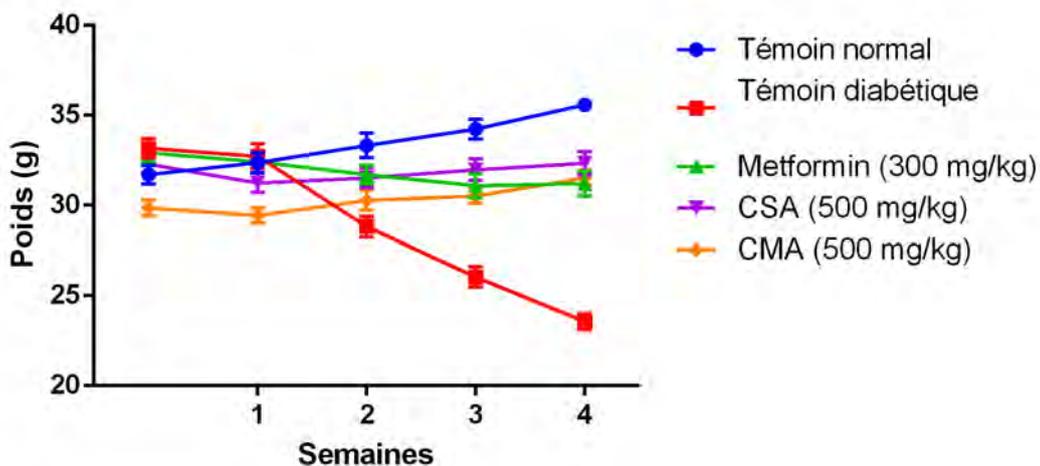


Figure 19 : Effet de CSA et CMA sur le poids corporel des animaux diabétiques

III.2. Activité antihyperglycémique chez les souris diabétiques

Le **Tableau 6** décrit les niveaux de la glycémie à jeun chez les animaux témoins et les animaux diabétiques traités par CSA, CMA, et la Métformine.

Tableau 6: Activité anti-hyperglycémique de CSA et CMA chez les souris diabétiques

Groupe	Avant Traitement	Taux de glycémie (mg/dL)			
		Après traitement			
		Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4
Témoin normal	99.33±2.82 ^a	97.16±1.66 ^a	100.16±2.67 ^a	101.66±2.21 ^a	103.83±1.6 ^a
Témoin diabétique	203.33±12.55 ^b	305.83±11.20 ^d	336.00±11.4 ^c	308.50±13.3 ^c	291.33±6.3 ^b
Méteformine 300 mg/kg	253.16±12.03 ^b	169.00±17.04 ^{cb} (33.24%)	157.50±6.88 ^b (37.78%)	146.66±10.95 ^b (42.06%)	102.83±7.11 ^a (59.38%)
CSA 500 mg/kg	245.83±10.73 ^b	158.50±9.00 ^c (35.52%)	150.83±7.21 ^b (38.64%)	118.66±2.41 ^a (51.73%)	107.50±3.80 ^a (56.27%)
CMA 500 mg/kg	237.83±15.91 ^b	199.66±9.92 ^b (16.04%)	160.33±10.3 ^b (32.58%)	118.50±1.99 ^a (50.17%)	102.16±3.81 ^a (57.04%)

Les valeurs sont la moyenne de six répétitions ($n = 6$) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partageant pas une lettre commune diffèrent significativement à $p < 0.05$.

L'administration journalière de CSA et CMA à la dose de 500 mg / kg par voie orale a entraîné une réduction significative ($p < 0.05$) de la glycémie chez les souris diabétiques par rapport au groupe témoin diabétique non traités. Ces effets ont commencé dès la première semaine du traitement et se sont poursuivis jusqu'à la fin de la quatrième semaine pour atteindre un pourcentage d'inhibition d'hyperglycémie de 56.27% et 57.04% pour CSA et CMA respectivement. Ces pourcentages ne diffèrent pas significativement en comparaison avec le pourcentage d'inhibition enregistré chez le groupe d'animaux traités par la métformine (59.38%).

III.3. Effet sur le profile lipidique

La **fig.20** présente les taux sériques de triglycérides et de cholestérol total des groupes témoin et expérimental de souris. Les souris diabétiques ont présenté une augmentation significative ($p < 0.05$) des taux de triglycérides sériques par rapport au groupe témoin normal, alors que les

taux de cholestérol total sérique du groupe témoin diabétique n'ont pas augmenté d'une manière statistiquement significative en comparaison avec le groupe normal.

Le traitement avec CSA et CMA (500 mg / kg de poids corporel) a entraîné une diminution significative ($p < 0.05$) des taux de triglycérides totaux par rapport au groupe diabétique non traité. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traités par CSA et CMA et le groupe traité par la métformine.

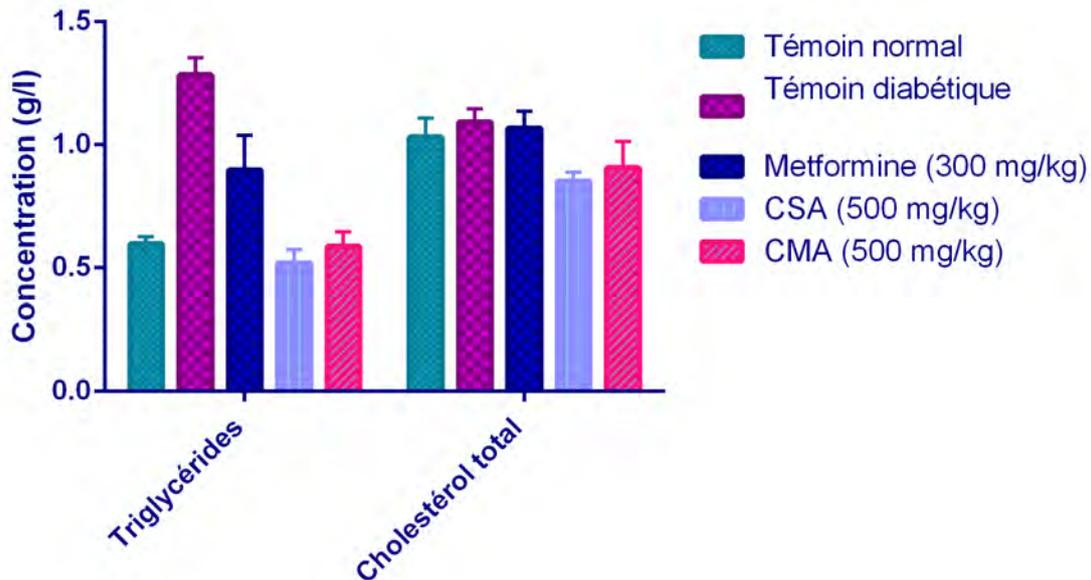


Figure 20: Effet de CSA et CMA sur le profil lipidique des animaux diabétiques

III.4. Effet sur les marqueurs rénaux des animaux diabétiques

Une augmentation significative des taux de créatinine sérique a été observée chez les souris diabétiques non traitées par rapport au groupe témoin normal. Comme la metformine, CSA et CMA (500 mg / kg de poids corporel) a significativement diminué le taux de créatinine par rapport au groupe témoin diabétique. Les concentrations d'acide urique, d'urée et des protéines enregistrées chez les souris diabétiques non traitées n'étaient pas significativement différentes de celles du groupe témoin normal.

III.5. Effet sur les marqueurs hépatiques des animaux diabétiques

Le niveau d'ASAT et d'ALAT était significativement augmenté dans le groupe témoin diabétique par rapport au groupe témoin normal ($p < 0.05$). Les souris diabétiques traitées avec CMA (500 mg / kg de poids corporel) avait une légère diminution des niveaux d'ASAT et une diminution significative des niveaux d'ALAT. Par contre, CSA à la dose de (500 mg / kg de poids corporel) n'avait pas réduit significativement les taux d'ASAT et d'ALAT.

Tableau 7: Effet de CSA et CMA sur les marqueurs hépatiques et rénaux des souris diabétiques

Groupes	Marqueurs rénaux			Marqueurs hépatiques		
	Créatinine (mg/L)	Urée (g/L)	Acide urique (mg/L)	Protéines (g/L)	ASAT (UI/I)	ALAT (UI/I)
Témoin normal	3.83± 0.16 ^a	0.28 ± 0.02 ^a	26.00 ± 2.19 ^a	62.33 ± 3.36 ^a	137.16± 11.58 ^a	40.66 ± 2.45 ^a
Témoin diabétique	4.66± 0.21 ^b	0.32 ± 0.02 ^a	26.60 ± 1.37 ^a	57.16 ± 2.67 ^a	389.66± 58.14 ^b	315.00± 49.03 ^c
Metformine (300mg/Kg)	3.66± 0.21 ^a	0.30 ± 0.03 ^a	30.00 ± 2.23 ^a	55.16 ± 1.92 ^a	283.16± 22.40 ^c	50.66 ± 3.27 ^a
CSA (500mg/Kg)	3.83± 0.40 ^a	0.21 ± 0.08 ^a	34.00 ± 4.97	56.66 ± 8.52 ^a	383.33± 28.76 ^b	301.33± 39.76 ^c
CMA (500mg/Kg)	3.66±0.51 ^a	0.42±0.05 ^b	25.50±1.70 ^a	57.66±1.68 ^a	364.16±45.12 ^b	141.00±9.50 ^b

Les valeurs sont la moyenne de six répétitions ($n = 6$) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partageant pas une lettre commune diffèrent significativement à $p < 0.05$.

III.6. Histopathologie du pancréas

L'aspect histologique des pancréas des animaux des groupes témoins et des groupes diabétiques traités par la metformine (300 mg / kg), CSA (500 mg / kg), et CMA (500 mg / kg) est illustrée en **fig.21**. L'examen microscopique a révélé que le pancréas des souris du groupe témoin normal ont des acini pancréatiques (PA) normaux et des espaces inter-acini et inter-lobulaires normaux, ainsi que des îlots de Langerhans (LI) avec un nombre normal de cellules uniformément réparties dans l'îlot.

Alors que, dans les pancréas du témoin diabétique, les îlots de Langerhans ont montré une hypercellularité et une distribution cellulaire désorganisée. Les noyaux cellulaires étaient ronds et ovales avec une taille relativement plus grande et montraient un aspect clair et vacuolaire, aussi, la matrice intercellulaire était réduite.

Concernant les pancréas des animaux traités par la metformine (300 mg/kg), nous avons observé des acini pancréatiques avec un aspect histologique normal et des changements au niveau des îlots de Langerhans similaires à ceux décrits pour le pancréas des souris diabétiques non traitées; ses noyaux cellulaires étaient ronds et ovales, mais modérément plus gros.

Le traitement par CSA et CMA, à la dose de 500 mg/kg a réduit la gravité des changements histopathologique du pancréas, les acini pancréatiques ont montré des espaces inter-acini et un

aspect histologique normal. Et les îlots de langerhans avec moins de perte de cellules par rapport au groupe témoin diabétique. Les noyaux cellulaires étaient ronds et de taille moyenne avec suffisamment de chromatine finement granulaire.

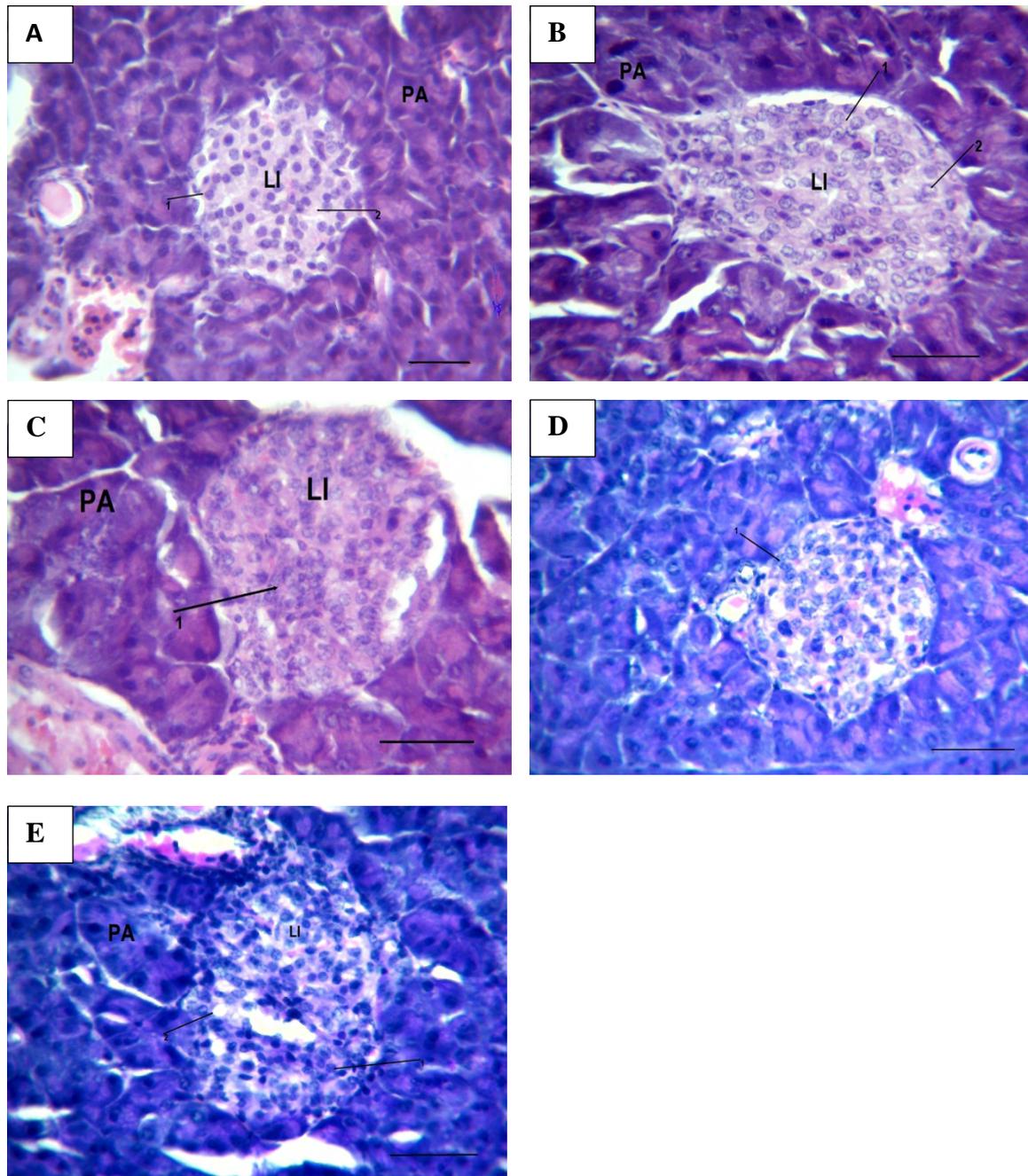


Figure 21: Examination histopathologique du pancréas

(A) : Pancréas de souris normales.

(B) : Pancreas de souris diabétique non traité.

(C) : Pancreas de souris diabétique traité par la métformine (300 mg/kg).

(D) : Pancreas de souris diabétique traité par CSA (500 mg/kg).

(E) : Pancreas de souris diabétique traité par CMA (500 mg/kg).

Chapitre III : Etude des mécanismes d'action des extraits

I. Activité inhibitrice d' α -amylase

L'effet inhibiteur des extraits CSA et CMA contre l'activité de l'enzyme α -amylase est présenté dans la **fig. 22**. Le résultat a révélé que les extraits testés inhibent l'activité d' α -amylase d'une manière concentration dépendante.

L'extrait CSA a significativement l'activité inhibitrice la plus élevée contre l' α -amylase avec une valeur d' IC_{50} de $217.10 \pm 0.15 \mu\text{g} / \text{mL}$.

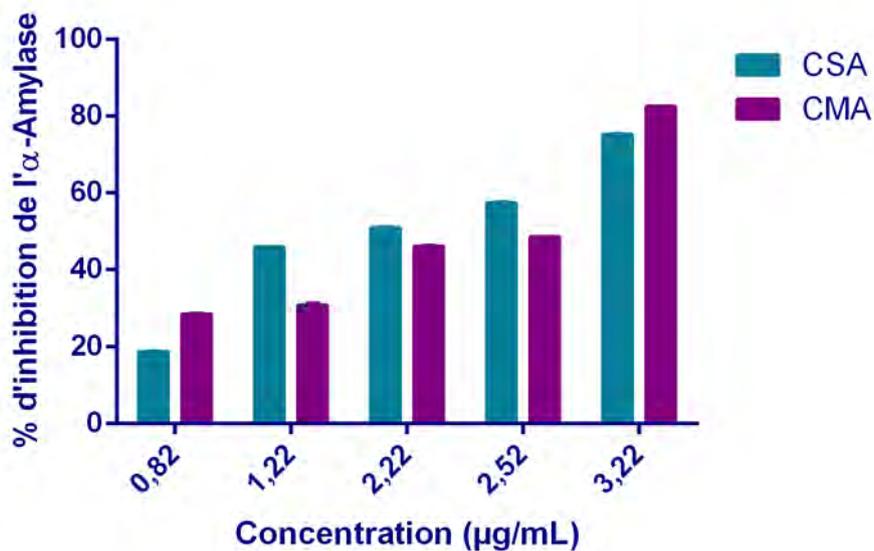


Figure 22: Pourcentage d'inhibition de l' α -amylase de CSA et CMA

II. Activité inhibitrice d' α -glucosidase

Les extraits étudiés ont montré une forte capacité inhibitrice contre l'enzyme α -glucosidase avec un effet inhibiteur dépendant de la concentration (**fig. 23**).

De plus, les deux extraits ont montré une activité significativement ($p < 0.05$) plus élevée que le composé de référence acarbose. L'extrait CSA a montré un pouvoir inhibiteur plus puissant avec une $IC_{50} = 0.95 \pm 0.14 \mu\text{g} / \text{ml}$ (**Tableau 8**).

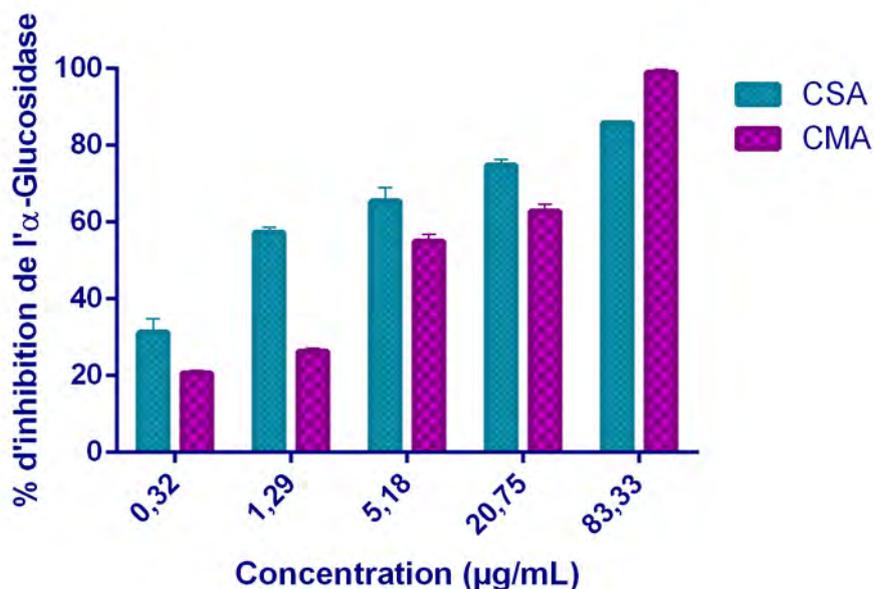


Figure 23: Pourcentage d'inhibition de l'α-glucosidase de CSA et CMA

Tableau 8: Valeurs des IC₅₀ en µg/ml des extraits dans les tests d'inhibition des enzymes α-amylase et α-glucosidase

	α-Amylase	α-Glucosidase
CSA	217.10 ± 0.15 ^a	0.95 ± 0.14 ^a
CMA	886.10 ± 0.10 ^c	14.58 ± 1.26 ^c
Acarbose	311.20 ± 1.38 ^b	18.01 ± 2.00 ^d

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions (n = 3) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partageant pas une lettre commune diffèrent significativement à p<0.05.

III. Effet sur l'absorption intestinale du glucose

Les résultats d'inhibition de l'absorption intestinale du glucose chez les rats sont illustrés en **Fig.24**. En absence d'inhibiteur, les teneurs du glucose absorbées étaient 19.40 ± 1.46 mg/10 cm/1h. En présence de Phlorizin (50 mg/kg) la quantité du glucose absorbée a été diminuée significativement (p<0.05) en comparaison avec le groupe control à une valeur égale à 8.61 ± 2.03 mg/10 cm/1h. L'absorption intestinale du glucose a été réduit significativement (p<0.05) à 12.07 ± 0.71 mg/10 cm/1h en présence de CSA et à 9.14 ± 1.85 mg/10 cm/1h en présence de CMA. Cela peut être considéré comme l'un des mécanismes par lesquels nos extraits peuvent réguler l'homéostasie du glucose chez le rat.

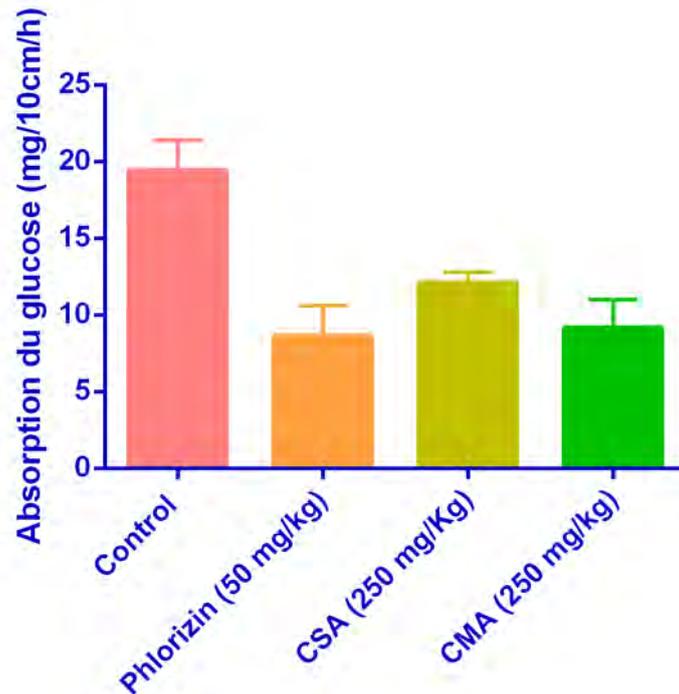


Figure 24: Absorption intestinale du glucose de CSA et CMA

IV. Activité antioxydante *in vitro*

IV.1. Activité de piégeage du DPPH

Les résultats ont montré que les deux extraits testés ont piégé efficacement le radical libre DPPH d'une manière concentration dépendante. Les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration sont représentés graphiquement en **fig.25**.

La détermination de la concentration inhibitrice de 50 % du radical DPPH (CI₅₀) nous a permis de constater que les deux extraits possèdent un puissant pouvoir anti-radicalaire traduit par des valeurs basses d'IC₅₀ (4.10 ± 0.85 µg/ml et 5.11 ± 0.17 µg/ml pour CSA et CMA respectivement) proche de celle obtenue par l'antioxydant standard trolox (**Tableau 9**).

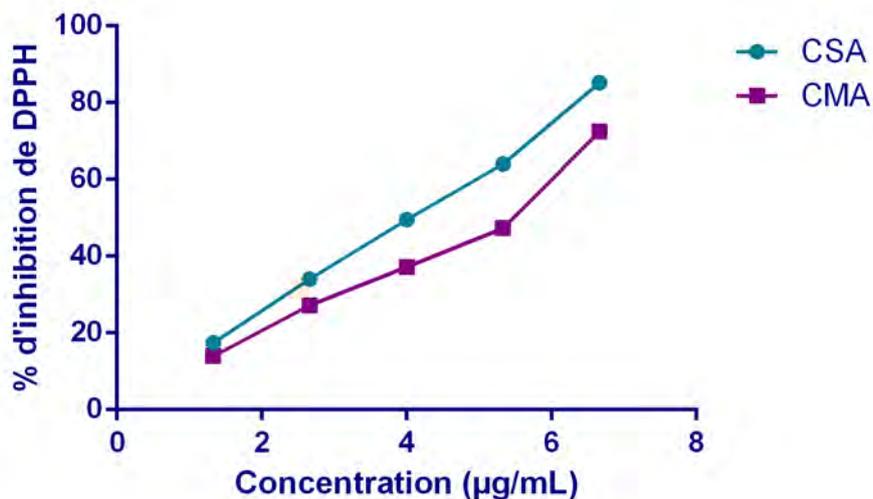


Figure 25: Pourcentage de réduction de DPPH par CSA et CMA

IV.2. Activité de piégeage de l'ABTS

Les extraits aqueux CSA et CMA ont présenté une forte capacité anti-radicalaire vis-à-vis le radical cationique ABTS^{•+}, les résultats sont illustrés en **fig.26** Plus la concentration de l'échantillon est élevée plus l'inhibition de l'ABTS^{•+} est plus forte pour les deux extraits.

Les valeurs des IC₅₀ (présentés dans le **Tableau 9**) nous ont indiqué que CSA et CMA ont une capacité de piégeage de l'ABTS presque similaires puisque aucune différence significative n'a été observée entre les deux extraits.

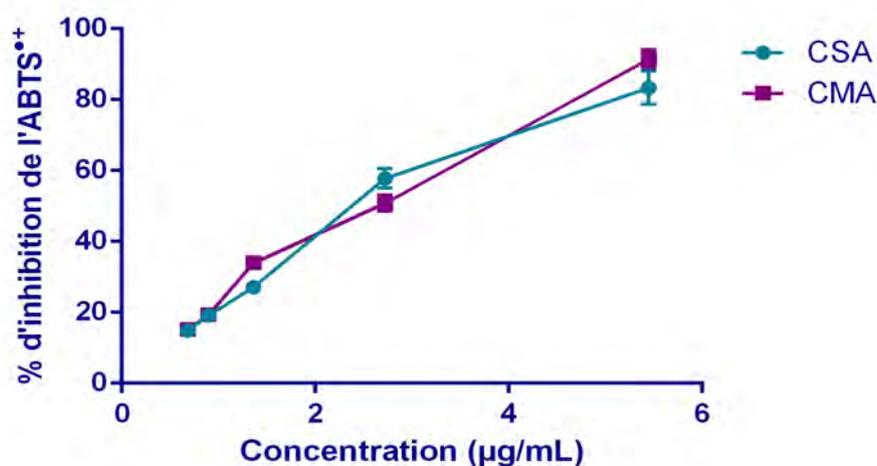


Figure 26: Pourcentage de réduction du radical ABTS^{•+} par CSA et CMA

IV.3. Pouvoir réducteur du fer

Les résultats du pouvoir réducteur du fer sont illustrés en **fig. 27** les deux extraits ont montré un important pouvoir réducteur en comparaison avec le puissant antioxydant acide ascorbique.

L'extrait CSA a présenté un pouvoir réducteur de fer significativement plus fort que CMA.

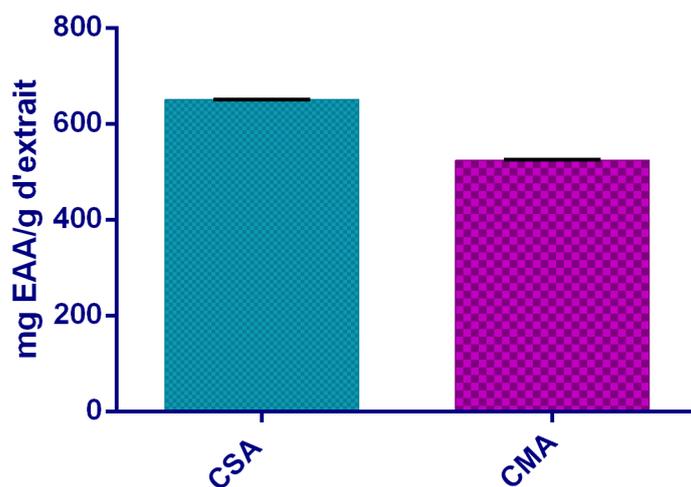


Figure 27: Pouvoir réducteur de fer de CSA et CMA

IV.4. Activité de piégeage de NO*

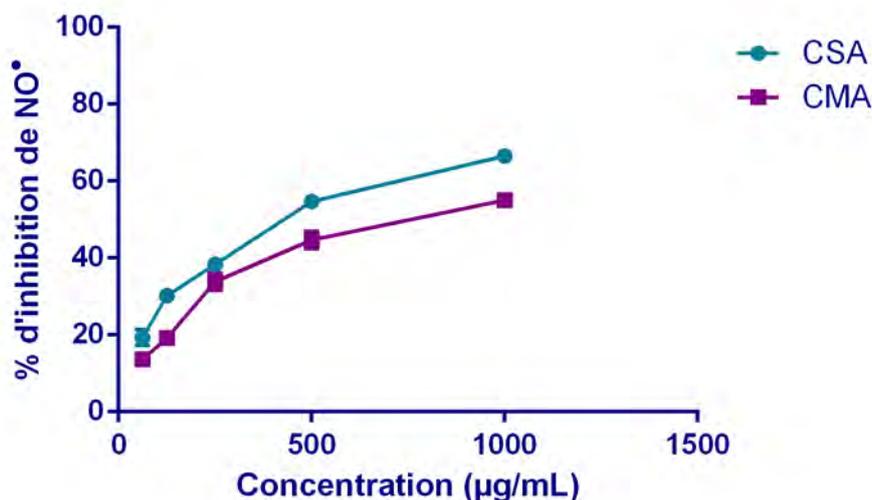


Figure 28: Pourcentage de réduction de NO* par CSA et CMA

Les résultats du piégeage de NO* ont montré que CSA et CMA ont une activité inhibitrice concentration dépendante (**Fig. 28**).

La comparaison des valeurs des IC₅₀ nous a montré que l'extrait CSA présente une activité inhibitrice du NO[•] significativement plus importante que CMA (**Tableau 9**).

Tableau 9: Valeurs des IC₅₀ en µg/ml des extraits aqueux dans les tests de l'activité antioxydante *in vitro*

	DPPH	ABTS ^{•+}	NO [•]
CSA	4.10 ± 0.85b	2.23±0.14b	409.50 ± 1.37b
CMA	5.11 ± 0.17b	2.15±0.06b	705.10 ± 1.52c
Trolox	1.47 ± 0.02a	0.68 ± 0.02a	-
Epicatechin	-	-	33.90 ± 0.30a

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ($n = 3$) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partageant pas une lettre commune (a et b) diffèrent significativement à $p < 0.05$.

V. Effet sur le stress oxydatif *in vivo*

V.1. Dosage de l'MDA

Les résultats du dosage du marqueur du stress oxydatif MDA dans les homogénats des foies et des reins des souris nous ont montré une élévation significative de la concentration de l'MDA dans les foies et les reins des souris diabétiques non traitées par rapport aux souris du groupe témoin normale qui témoigne d'une atteinte du stress oxydatif.

Le traitement pendant un mois par CSA et CMA a montré une baisse hautement significative de la concentration de l'MDA dans les deux organes étudiés chez les souris diabétiques en comparaison avec les valeurs obtenues chez les animaux du groupe témoin diabétique non traité. En plus, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe traité par CSA et CMA et entre CSA et le groupe traité par la métformine (**Tableau 10**).

Tableau 10: Effet des extraits aqueux sur le taux de l' MDA dans les tissus hépatiques et rénaux des souris

	Témoin normal	Témoin diabétique	Métformine 300 mg/kg	CSA 500 mg/kg	CMA 500 mg/kg
Foie	100.87±11.29 ^a	383.45 ± 17.74 ^d	100.87±11.29 ^{ab}	141.69 ± 4.79 ^{bc}	151.49 ± 13.83 ^c
Rein	5.69 ± 1.63 ^a	183.15 ± 6.60 ^d	22.94 ± 3.81 ^{ab}	41.75 ± 4.55 ^{bc}	54.28 ± 6.04 ^c

Les valeurs sont la moyenne de six répétitions ($n = 6$) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même ligne et qui ne partageant pas une lettre commune (a et b) diffèrent significativement à $p < 0.05$.

V.2. Dosage de SOD

L'analyse quantitative nous a permis de constater une diminution significative de l'activité de l'enzyme SOD chez les souris du groupe témoins diabétiques en comparaison avec les animaux du groupe normal cela est le signe d'un stress oxydatif induit par l'hyperglycémie.

Par contre, une augmentation significative de l'activité de l'enzyme SOD a été notée dans les homogénats des foies et des reins des souris du groupe traité par CSA (mg/kg) et du groupe traité par CMA (mg/kg). En plus, aucune variation significative n'a été observée entre le groupe traité par la métformine et les deux groupes traités par les extraits, ce qui témoigne d'une importante inhibition du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie (**Tableau 11**).

Tableau 11: Effet des extraits aqueux de Cistus sur l'activité de SOD

	Témoin normal	Témoin diabétique	Métformine 300 mg/kg	CSA 500 mg/kg	CMA 500 mg/kg
Foie	927.77 ± 38.32b	700.23 ± 20.96a	904.26 ± 31.88b	908.08 ± 19.17b	939.01 ± 28.87b
Rein	842.03 ± 23.26b	616.85 ± 17.47a	832.12 ± 20.09b	767.31 ± 11.07b	860.63 ± 48.92b

Les valeurs sont la moyenne de six répétitions ($n = 6$) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partageant pas une lettre commune diffèrent significativement à $p < 0.05$.

VI. Activité anti-inflammatoire

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits CSA et CMA évaluée par le test de l'œdème aigue induit par la carragénine chez la patte des rats et exprimés en pourcentage d'inhibition de l'œdème sont représentés dans la **Fig 29**.

Chez le lot témoin l'injection de la carragénine a provoqué une inflammation visible après une heure et trente (pourcentage d'œdème est de $27.61 \pm 6.85\%$) et l'œdème a été augmenté 56 progressivement avec le temps pour atteindre $39.29 \pm 6.07\%$ à la troisième heure et $51,33 \pm 6,74\%$ à la sixième heure.

L'administration orale de l'indométacine à la dose de 10 mg/kg a prévenu de façon significative l'augmentation de l'œdème dès l'une heure et trente qui suit l'injection et jusqu'à la sixième heure avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème de l'ordre de 68.61 ± 3.81 ; 73.14 ± 3.75 ; 62.75 ± 1.21 à une heure et trente, trois heures, et six heures respectivement.

Les extraits aqueux de nos deux espèces de plantes ont inhibé de manière progressive et significative par rapport aux témoins l'œdème induit par la carragénine avec une forte inhibition à partir de la troisième heure, les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de 85.09 ± 1.06 pour CSA et 77.64 ± 2.26 pour CMA. En plus, les pourcentages d'inhibition de l'œdème par nos extraits sont proches de ceux obtenus avec l'indométacine à une heure et trente et sont significativement ($p < 0.05$) plus élevés que les pourcentages d'inhibition de l'indométacine à la sixième heure. Ils sont de l'ordre de 91.57 ± 0.52 et 85.78 ± 0.64 pour les extraits CSA et CMA respectivement, tandis que le pourcentage d'inhibition obtenu avec l'indométacine est de 62.75 ± 1.21 à la sixième heure.

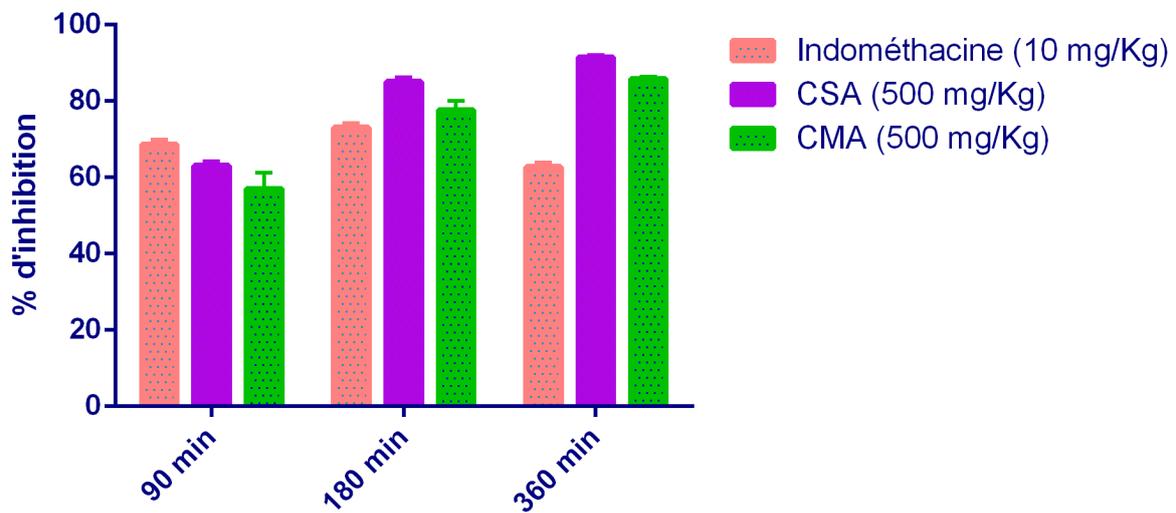


Figure 29: Pourcentage d'inhibition de l'œdème inflammatoire de CSA et CMA

Chapitre IV : Etude phytochimique bioguidée

I. Rendement des fractions

Les rendements de différentes fractions sont représentés en **fig. 30**. Les deux plantes étudiées ont le rendement le plus élevé dans la fraction aqueuse avec un pourcentage de 8.21% et 10.14% pour CSA et CMA respectivement.

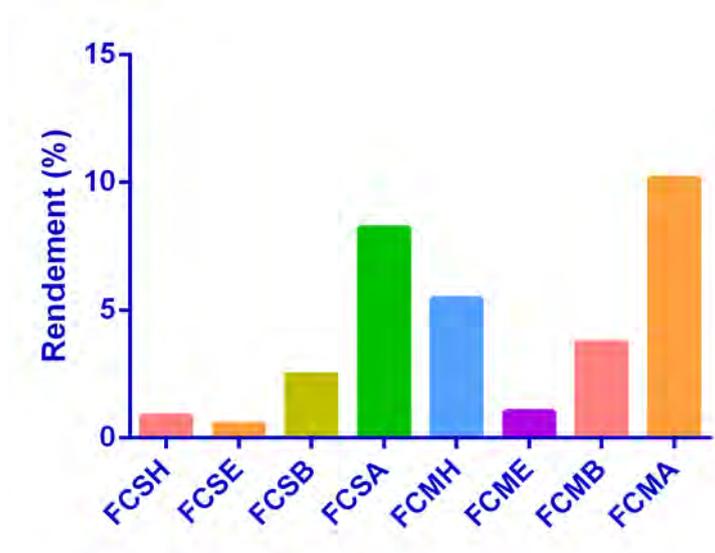


Figure 30: Rendement des fractions de *Cistus*

FCSH : Fraction hexanique de *Cistus salviifolius*; FCSE : fraction éther-di-éthylique de *Cistus salviifolius* ;
 FCSB : Fraction buthanolique de *Cistus salviifolius*; FCSA : Fraction aqueuse de *Cistus salviifolius* ;
 FCMH : Fraction hexanique de *Cistus monspeliensis*; FCME : Fraction éther-di-éthylique de *Cistus monspeliensis*;
 FCMB : Fraction buthanolique de *Cistus monspeliensis*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus monspeliensis*.

II. Activité antioxydante des fractions

Les différentes fractions ont montré une forte capacité à piéger le radical libre DPPH* (**Fig.31**). FCSE et FCMB ont été trouvés les plus puissants inhibiteurs puisqu'ils ont montré les IC₅₀ les plus basses ($3.47 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ et $3.95 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ respectivement) (**Tableau 12**).

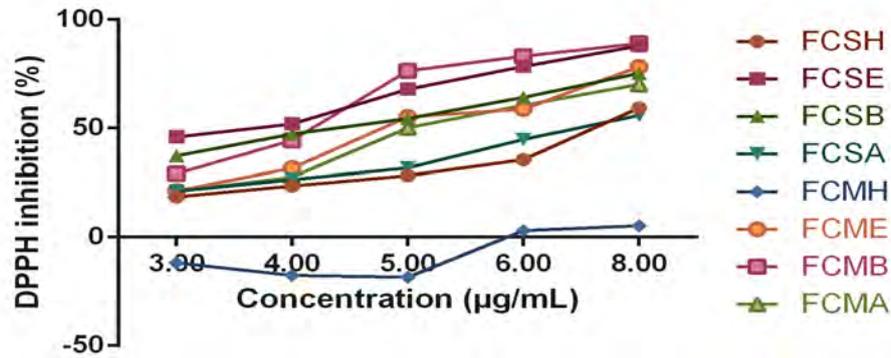


Figure 31: Pourcentage de réduction du DPPH des fractions

FCSH : Fraction hexanique de *Cistus salviifolius*; FCSE : fraction éther-di-éthylique de *Cistus salviifolius* ;
 FCSB : Fraction buthanolique de *Cistus salviifolius*; FCSA : Fraction aqueuse de *Cistus salviifolius* ;
 FCMH : Frcation hexanique de *Cistus monspeliensis*; FCME : Fraction éther-di-éthylique de *Cistus monspeliensis*;
 FCMB : Fraction buthanolique de *Cistus monspeliensis*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus monspeliensis*.

Les résultats ont montré que les fractions de la plante CS ont une activité inhibitrice du radical cationique $ABTS^{•+}$ très puissante (Fig. 32). FCSE a présenté significativement l'activité anti-radicalaire vis-à-vis de l' $ABTS^{•+}$ la plus puissante dans cette plante avec une IC_{50} égale à $3.84 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$. Les fractions FCME, FCMB, et FCMA de la plante CM ont montré une excellente capacité réductrice de l' $ABTS^{•+}$. FCMB a le meilleur effet anti-radicalaire avec une IC_{50} égale à $1.32 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ tandis que FCMH a présenté le plus faible effet avec une IC_{50} de $287.85 \pm 11.9 \mu\text{g/ml}$ (Tableau 12).

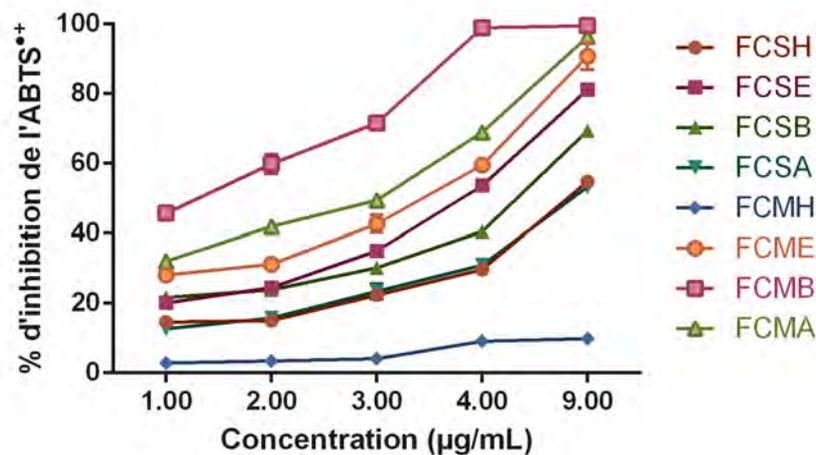


Figure 32: Pourcentage de réduction de l'ABTS^{•+} des fractions

FCSH : Fraction hexanique de *Cistus salviifolius*; FCSE : fraction éther-di-éthylique de *Cistus salviifolius* ;
 FCSB : Fraction buthanolique de *Cistus salviifolius*; FCSA : Fraction aqueuse de *Cistus salviifolius* ;
 FCMH : Frcation hexanique de *Cistus monspeliensis*; FCME : Fraction éther-di-éthylique de *Cistus monspeliensis*;
 FCMB : Fraction buthanolique de *Cistus monspeliensis*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus monspeliensis*.

Les fractions de *Cistus* ont montré un effet inhibiteur modéré contre le radical NO[•](Fig. 33)en comparaison avec l'épicatéchine (IC₅₀= 33.90 ±0.30 µg/mL). FCSE a été trouvée la plus active avec une IC₅₀ égale à 176.08 ± 0.38 µg/mL suivie par FCMB avec une IC₅₀ de 215.46 ± 0.16 µg/mL (Tableau 12), tandis que FCMH n'était pas efficace dans ce test.

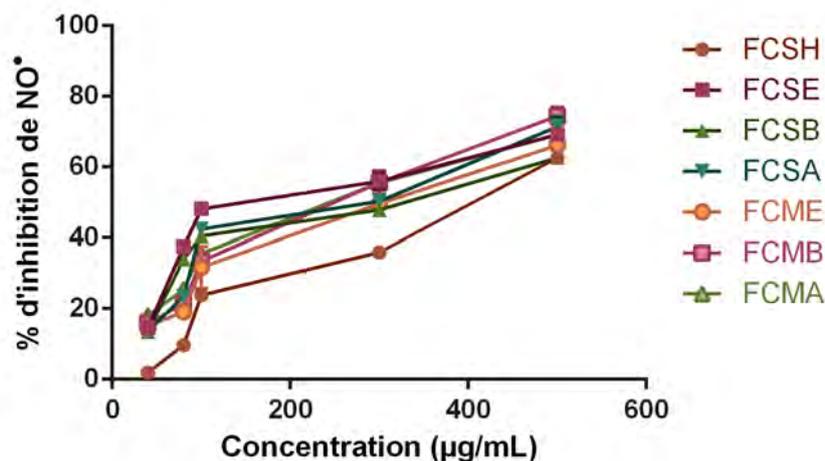


Figure 33: Pourcentage d'inhibition de NO[•]des fractions

FCSH : Fraction hexanique de *Cistus salviifolius*; FCSE : fraction éther-di-éthylique de *Cistus salviifolius* ;
 FCSB : Fraction buthanolique de *Cistus salviifolius*; FCSA : Fraction aqueuse de *Cistus salviifolius* ;
 FCMH : Fraction hexanique de *Cistus monspeliensis*; FCME : Fraction éther-di-éthylique de *Cistus monspeliensis*;
 FCMB : Fraction buthanolique de *Cistus monspeliensis*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus monspeliensis*.

Tableau 12: Valeurs des IC₅₀ (µg/ml) des fractions de *Cistus* dans les tests de l'activité anti-inflammatoire

	DPPH	ABTS ^{•+}	NO [•]
	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
FCSH	7.287 ± 0.15 ^d	8.12 ± 0.11 ^f	379.91 ± 0,31 ^f
FCSE	3.47 ± 0.01 ^a	3.84 ± 0.05 ^d	176.08 ± 0.38 ^a
FCSB	4.24 ± 0.03 ^b	5.18 ± 0.12 ^e	256.61 ± 0.21 ^d
FCSA	7.10 ± 0.21 ^d	8.25 ± 0.22 ^f	221.85 ± 0.35 ^c
FCMH	ND	287.85 ± 11.79 ^h	ND
FCME	5.00 ± 0.02 ^c	3.14 ± 0.18 ^c	272.63 ± 0.03 ^e
FCMB	3.95 ± 0.04 ^{ab}	1.32 ± 0.02 ^a	215.46 ± 0.16 ^b
FCMA	5.30 ± 0.07 ^c	2.36 ± 0.002 ^b	222.31 ± 2.71 ^c
Trolox	1.47 ± 0.02 ^f	0.68 ± 0.02 ^g	-
Epicatechin	-	-	33.90 ± 0.30 ^g

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ($n = 3$) \pm erreur standard. Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partageant pas une lettre commune diffèrent significativement à $p < 0.05$.

III. Activité inhibitrice des fractions contre l' α -amylase et l' α -glucosidase

Toutes les fractions ont montré un puissant effet inhibiteur sur l'activité des enzymes α -amylase (Fig. 34) et α -glucosidase (Fig. 35) en comparaison avec la substance de référence l'acarbose (Tableau 13).

L'activité inhibitrice des fractions est concentration dépendante. Pour la plante CS, la fraction FCSE a montré l'activité inhibitrice significativement ($p < 0.05$) la plus élevée sur l' α -amylase ($IC_{50} = 87.88 \pm 0.03 \mu\text{g} / \text{ml}$) et sur l' α -glucosidase ($4.78 \pm 0.02 \mu\text{g} / \text{ml}$). Alors que la fraction FCMB s'est révélée la plus active dans l'inhibition de l' α -amylase ($64.18 \pm 1.73 \mu\text{g} / \text{ml}$) et dans l'inhibition de l' α -glucosidase ($2.93 \pm 0.08 \mu\text{g} / \text{ml}$) par rapport aux autres fractions de la plante CM.

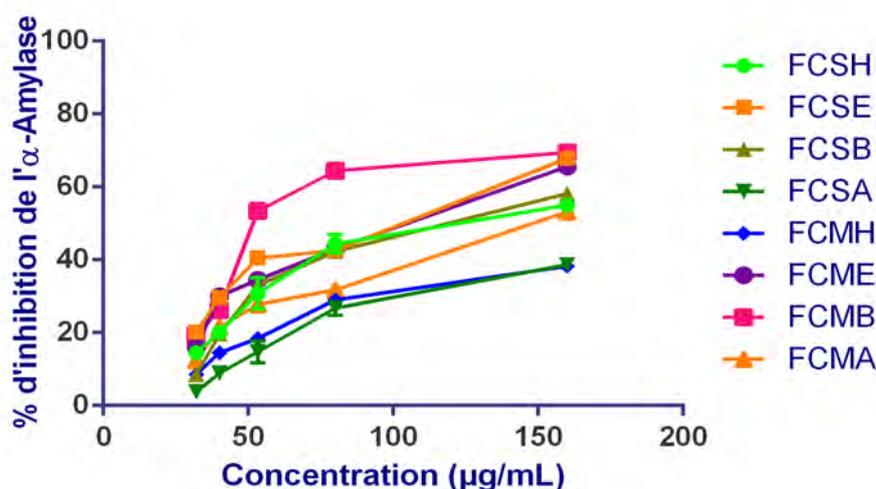


Figure 34: Pourcentage d'inhibition de l' α -amylase des fractions

FCSH : Fraction hexanique de *Cistus salviifolius*; FCSE : fraction éther-di-éthylique de *Cistus salviifolius* ;
 FCSB : Fraction buthanolique de *Cistus salviifolius*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus salviifolius* ;
 FCME : Frcation hexanique de *Cistus monspeliensis*; FCME : Fraction éther-di-éthylique de *Cistusmonspeliensis*;
 FCMB : Fraction buthanolique de *Cistus monspeliensis*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus monspeliensis*.

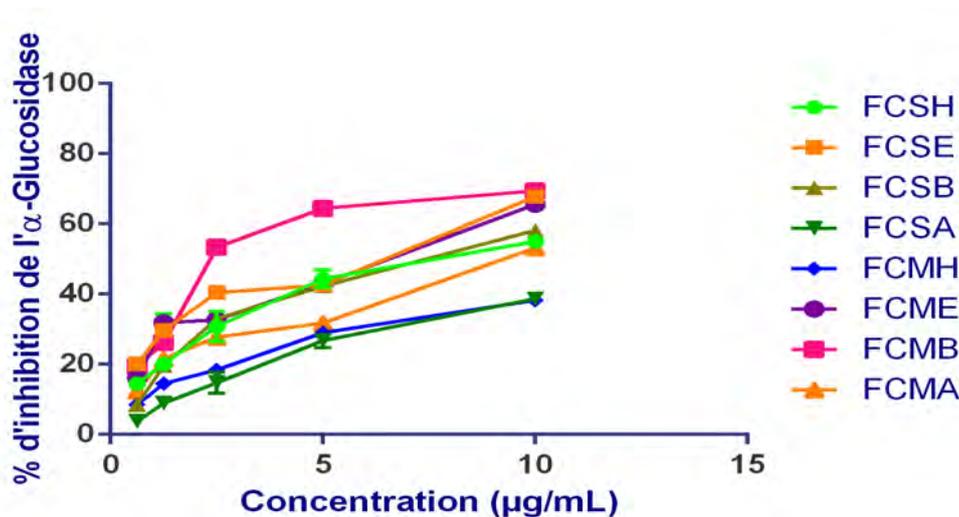


Figure 35: Pourcentage d'inhibition de l'α-glucosidase des fractions

FCSH : Fraction hexanique de *Cistus salviifolius*; FCSE : fraction éther-di-éthylique de *Cistus salviifolius* ;
 FCSB : Fraction buthanolique de *Cistus salviifolius*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus salviifolius* ;
 FCMH : Frcation hexanique de *Cistus monspeliensis*; FCME : Fraction éther-di-éthylique de *Cistusmonspeliensis*;
 FCMB : Fraction buthanolique de *Cistus monspeliensis*; FCMA : Fraction aqueuse de *Cistus monspeliensis*.

Tableau 13: Valeurs des IC₅₀ des fractions dans les tests d'inhibition des enzymes α-amylase et α-glucosidase

	α-Amylase inhibition IC ₅₀ (µg/ml)	α-Glucosidase inhibition IC ₅₀ (µg/ml)
FCSH	111.15 ± 3.55 ^b	7.43 ± 0.88 ^{ab}
FCSE	87.88 ± 0.03 ^{ab}	4.78 ± 0.02 ^a
FCSB	114.25 ± 0.15 ^b	6.70 ± 0.15 ^{ab}
FCSA	200.60 ± 0.8 ^d	16.05 ± 1.64 ^c
FCMH	254.20 ± 13.6 ^d	20.42 ± 2.20 ^c
FCME	93.515 ± 0.065 ^b	5.43 ± 0.10 ^{ab}
FCMB	64.18 ± 1.73 ^a	2.93 ± 0.08 ^a
FCMA	142.10 ± 0.9 ^c	10.25 ± 0.25 ^b
Acarbose	311.20 ± 1.38 ^e	18.01 ± 2.00 ^c

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions (n = 3) ± erreur standard.

Les valeurs qui sont dans la même colonne et qui ne partageant pas une lettre commune diffèrent significativement à p<0.05.

IV. Analyse des fractions sur HPLC

Les composés phénoliques des différentes fractions de *Cistus* analysés sur HPLC ont été présentés dans le **Tableau 14**. L'identification des composés pour lesquels des standards étaient disponibles dans notre laboratoire a été réalisée par la comparaison de leurs temps de rétention et de leurs spectres UV-vis avec ceux des témoins standards, et leurs concentrations ont été calculées à partir de l'équation de la régression linéaire des produits standards analysés.

L'acide gallique est identifié dans toutes les fractions de la plante CS sauf dans le FCSH, cette fraction a été caractérisée par une quantité élevée d'acide rosmarinique (180.38 µg / mg d'extrait). L'acide gallique est le principal constituant du FCSB (19.68 µg / mg d'extrait) suivi de l'acide ferrulique (7.50 µg / mg d'extrait), de l'acide vanilique (3.55 µg / mg d'extrait) et de l'acide syringique en faible quantité (0.31 µg / mg d'extrait). Tandis que la rutine (22,63 µg / mg d'extrait) est le principal composé du FCSE, suivie de l'acide rosmarinique (15.45 µg / mg d'extrait), de l'acide ferrulique (6.34 µg / mg d'extrait) et de l'acide gallique (4.89 µg / mg d'extrait), celui-ci est le seul composé détecté en FCSA avec une quantité de 1.24 µg / mg d'extrait.

Concernant les fractions de la plante CM, la narginine est identifiée dans le FCMH avec une faible quantité (1.12 µg / mg d'extrait) et dans le FCME avec une concentration de 12.53 µg / mg d'extrait, dans cette fraction l'acide tannique est trouvé avec une concentration importante (143.96 µg / mg de extrait) suivi de la rutine (76.85 µg / mg d'extrait) et de l'acide ferrulique en faible quantité (1.17 µg / mg d'extrait). Alors que, la quercétine (10.68 µg / mg d'extrait) est le principal constituant détecté dans la fraction FCMB et l'acide sinapique (11.69 µg / mg d'extrait) est le seul composé identifié dans la FCMA, et détecté dans la FCMH avec une faible concentration (1.04 µg / mg de extrait). D'autres produits inconnus ont été également présents dans nos fractions.

Tableau 14: Composés phénoliques identifiés dans les fractions dans l'analyse sur HPLC

Standards	Tr (min)	FCSH	FCSE	FCSB	FCSA	FCMH	FCME	FCMB	FCMA
Acide gallique	7.59	-	4.89	19.68	1.24	-	-	-	-
Acide sinapique	17.30	-	-	-	-	1.04	-	-	11.69
Acide syringique	14.22	-	-	0.31	-	-	-	-	-
Acide tannique	7.69	-	-	-	-	-	143.96	-	-
Acide rosmarinique	19.55	180.38	15.45	-	-	-	-	-	-
Acide ferrulique	17.03	-	6.34	7.50	-	-	1.17	-	-
Acide vanillique	13.72	-	-	3.55	-	-	-	-	-
Quercetine	22.52	-	-	-	-	-	-	10.68	-
Rutine	17.27	-	22.63	-	-	-	76.85	-	-
Narginine	18.62	-	-	-	-	1.12	12.53	-	-

Les résultats sont exprimés en µg/mg d'extrait

Tr: temps de rétention

V. Analyse de la fraction la plus active sur HRMS

Les résultats d'analyse sur HRMS (**Fig. 36**) nous a permis de constater que la Pedunculagine (ion m/z [H]⁻ égale à 783.07179) et la Punicalagine (ion m/z [H]⁻ égale à 1083.06343) sont les produits majoritaires dans notre fraction FCMB.

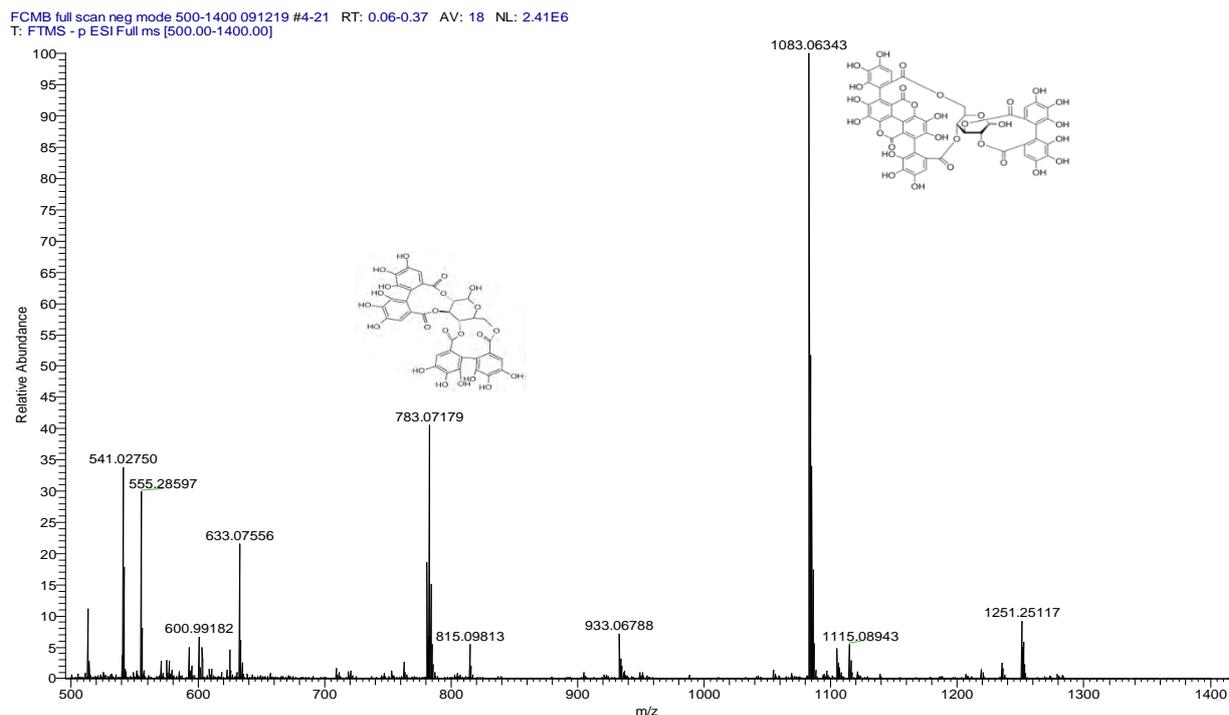


Figure 36: Spectre de masse de FCMB sur HRMS

VI. Analyse de la fraction la plus active et de ses sous-fractions sur CCM

Les résultats des analyses chromatographiques sur CCM des sous-fractions de FCMB (la fraction la plus active dans les tests biologiques effectués) obtenues suite au fractionnement par CPC et après le rassemblement des sous-fractions identiques sont présentés dans les figures 43, 44, 45. L'observation des plaques CCM sous la lumière UV à 365 nm (**Fig. 37**) et à 254 nm (**Fig. 38**) nous a montré la présence de différentes taches de couleurs variées fluorescent ou sombre, ce qui signifie la présence de différentes classes de composés phénoliques.

La pulvérisation avec le réactif de Neud qui est spécifique pour la caractérisation des flavonoïdes nous a montré des tâches de couleur orange, jaune, et brune (**Fig. 39**) ce qui confirme la présence des substances appartenant à cette grande famille très hétérogène.

Les sous-fractions (F5, F8, F9, F10, F12, F16, F19, F20, F21) qui ont présentés des tâches dont le rapport frontal (Rf), le nombre, la couleur, l'intensité et la taille sont différentes ont été sélectionnées afin de les analyser d'une manière plus précise sur UPLC.

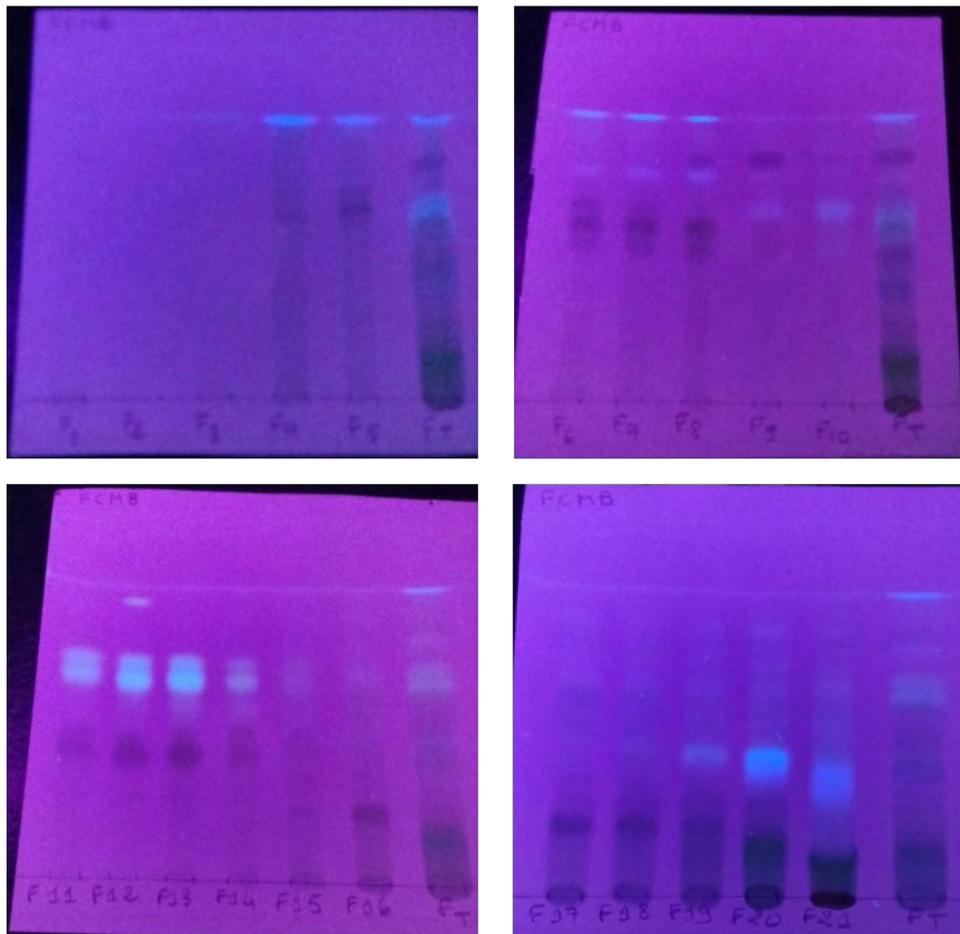


Figure 37:CCM des sous-fractions de FCMB à 365 nm

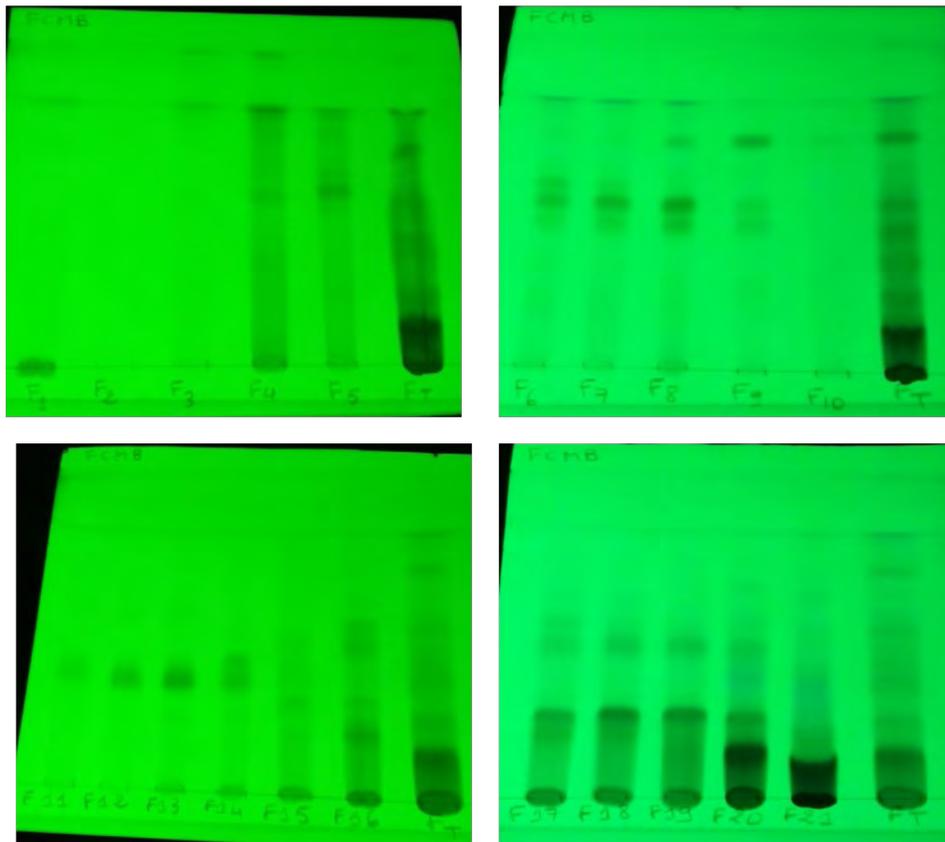


Figure 38: CCM des sous-fractions de FCMB à 254 nm

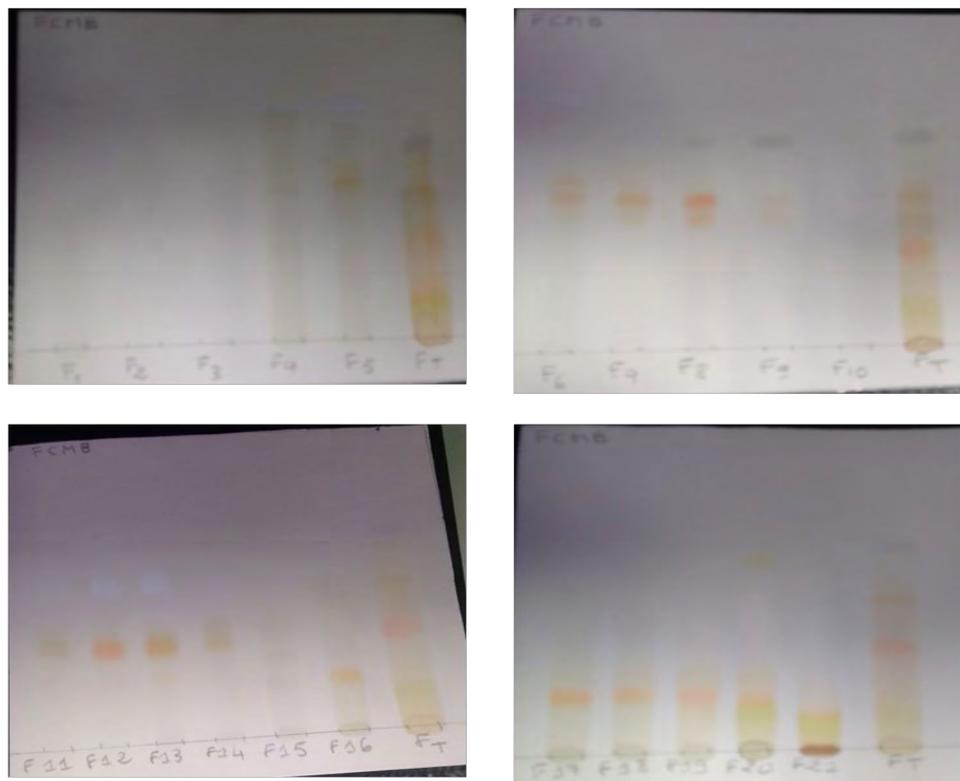


Figure 39: CCM des sous-fractions de FCMB après pulvérisation du réactif de Neud

VII. Analyse de la fraction la plus active et de ses sous-fractions sur UPLC

Les spectres PDA de la fraction FCMB (**Fig. 40**) ont montré la présence de deux type de pics, des pics qui sortent à des temps de rétentions de 1 à 3 min et d'autres plus majoritaires avec des temps de rétention de 7.2 à 8 min. Ces derniers, correspondent aux produits les plus polaires. Les deux types de pics absorbent aux deux longueurs d'onde 254 nm et 365 nm qui sont caractéristiques des composés phénoliques.

La comparaison des spectres PDA des sous-fractions obtenues de FCMB (**Fig. 41 et 42**) nous a montré une bonne séparation de différents composés de cette fraction traduite par des pics bien concentrés avec des temps de rétentions différents.

Par contre, l'analyse des spectres Qda nous a montré que les sous-fractions de FCMB ne sont pas des produits purs mais ils contiennent des composés phénoliques qui sont encore en mélange. Le **tableau 15** représente les composés phénoliques que nous avons pu identifier. D'autres produits inconnus sont aussi présents dans les sous fractions.

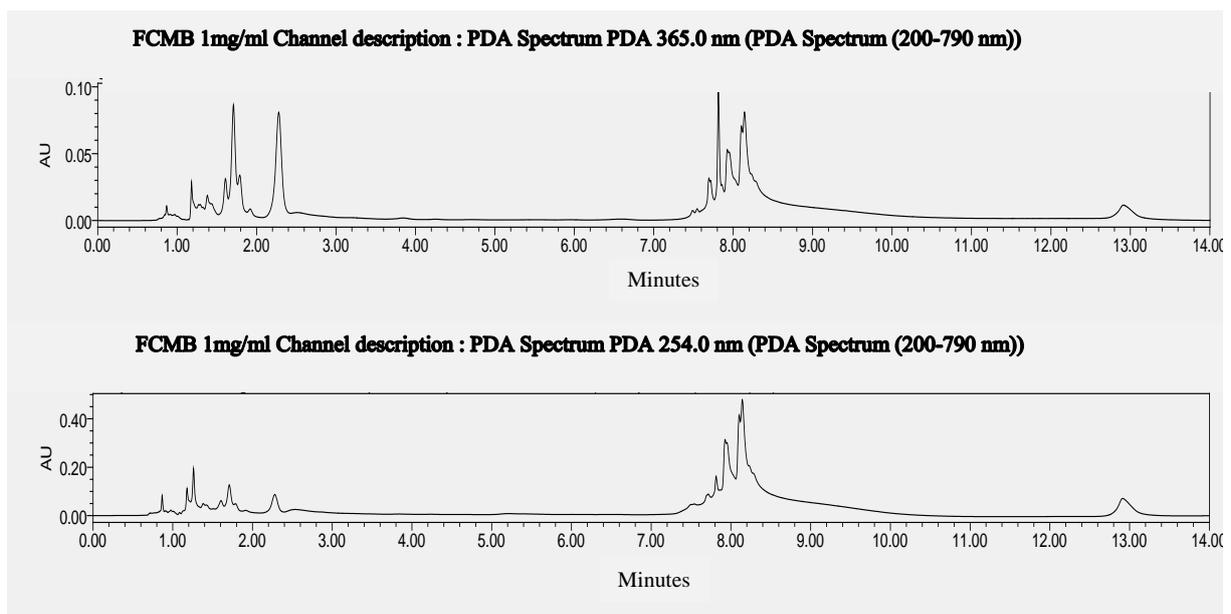


Figure 40: Chromatogramme de l'analyse UPLC- PDA de la fraction FCMB

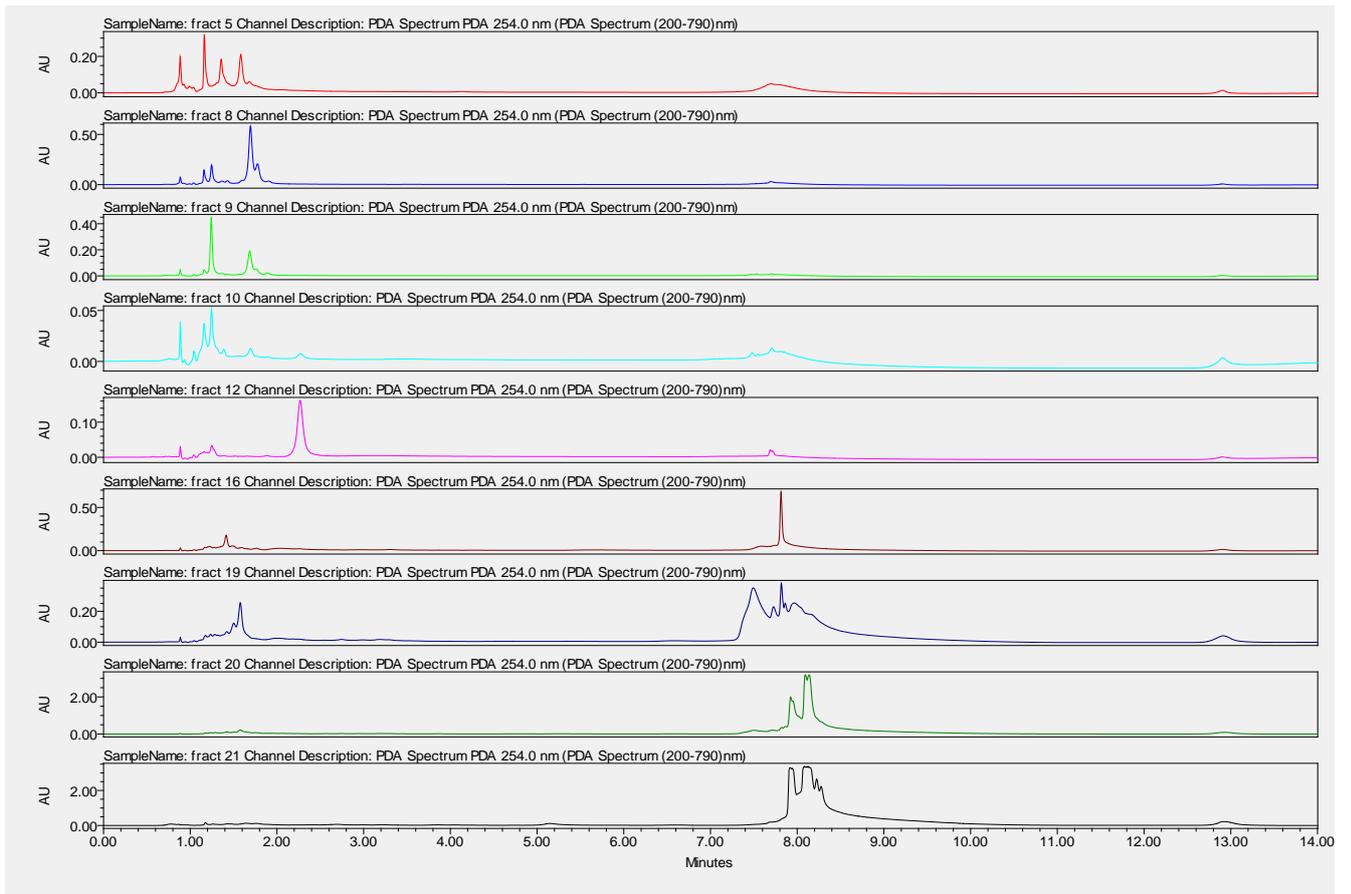


Figure 41: Chromatogramme de l'analyse UPLC- PDA des sous fractions de FCMB à 254 nm

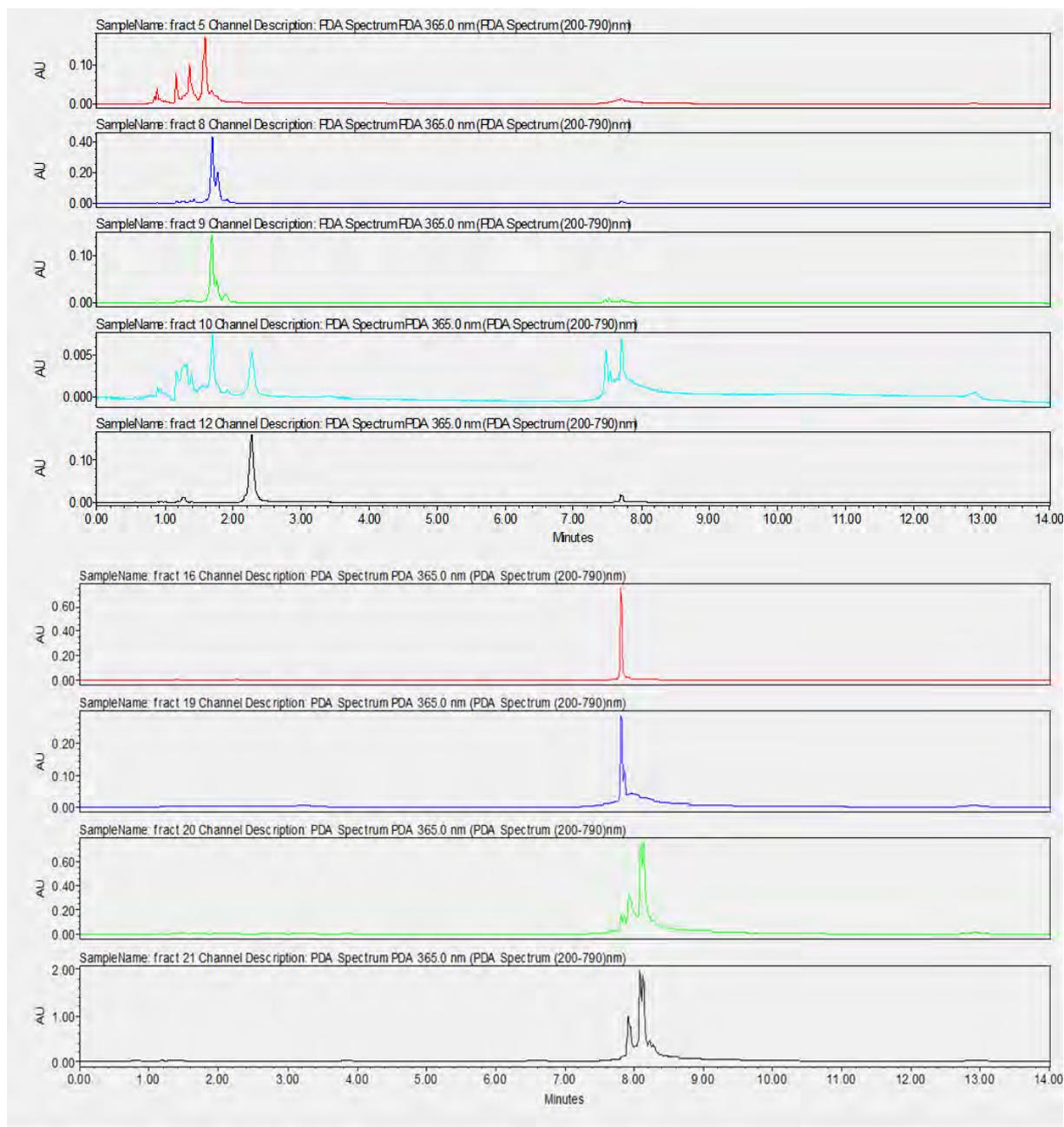


Figure 42: Chromatogramme de l'analyse UPLC- PDA des sous-fractions de FCMB à 365 nm

Tableau 15: Composés phénoliques identifiés dans les sous-fractions de FCMB en UPLC

Fractions	m/z [H] ⁻	Temps de rétention (min)	Composé identifié
F5	301.04	1.480	Acide élлагique
	317.16	2.209	Myricitine
F8	169.06	1.264	Acide gallique
	305.29	0.985	Epigallocatechine
F9	169.10	1.250	Acide gallique
	289.12	1.045	Catéchine
	609.22	7.543	Rutine
F10	305.13	1.757	Epigallocatechine gallate
	463.27	1.702	Isoquercétine
F12	305.13	1.796	Gallocatechine
	169.11	1.268	Acide gallique
F16	289.14	1.198	Catéchine
	179.06	2.204	Acide caféique
F19	783.21	7.442	Pedunculagine
F20	1083.17	8.103	Punicalagine
	289.17	4.193	Catéchine
	305.21	7.676	Epicatechine
F21	1083.20	8.135	Punicalagine
	781.25	8.066	Punicaline

Discussion

Discussion

Les plantes médicinales ont historiquement prouvé leur efficacité en tant que source potentielle de molécules bioactives, et représentent aujourd'hui un pool attractif pour découvrir de nouveaux agents antidiabétiques vu la nécessité urgente de nouveau traitement plus efficace et moins nocif que les médicaments synthétiques prescrits aux patients souffrant du diabète de type 2.

Dans ce contexte, la présente étude s'intéresse à l'évaluation du potentiel antidiabétique des plantes *Cistus salviifolius*L. et *Cistus monspeliensis*L. du Maroc et à l'investigation des possibles mécanismes d'action qui peuvent expliquer leur potentiel thérapeutique. Aussi, nous avons contribué à la recherche des éventuelles molécules bioactives de ces plantes à l'aide d'une étude phytochimique bioguidée.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. L'analyse phytochimique préliminaire que nous avons effectuée au début de l'étude nous a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes, et des saponosides et l'absence des alcaloïdes dans les deux plantes ce qui nous a permis de prévoir des activités pharmacologiques potentielles. Les flavonoïdes grâce à leur capacité de moduler le comportement de plusieurs systèmes cellulaires et de modifier l'activité de certaines enzymes peuvent exercer une multitude d'activités biologiques et thérapeutiques, notamment des activités antidiabétiques (AL-Ishaq et al., 2019), anti-inflammatoires (Maleki et al., 2019), anti-ulcéreuses (Zahran et al., 2019) antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques (Ghedira, 2005), et même antitumorales (Kikuchi et al., 2019). Les tanins ont des propriétés antihyperglycémiques, anti-hyperlipidémiques, et antioxydantes. Les terpénoïdes sont largement connus par leur propriété anti-inflammatoire (Hortelano, 2009). Les saponosides possèdent une grande variété d'activités biologiques telles que immunomodulatrice, anti-inflammatoire, cytotoxique et antitumorale. La présence des quinones et anthraquinones dans la plante *C. monspeliensis* lui confère des propriétés biologiques intéressantes, certaines quinones, dérivant de l'anthraquinone, sont des laxatifs stimulants. D'autres activités antidépressives (hypericin), antiallergiques, anti-protistes, antivirales, antibactériennes, fongicides ont été décrites. Les alcaloïdes exercent de puissants effets physiologiques et toxicologiques et sont couramment administrés à de faibles doses car ce sont de violents poisons ; l'absence de ces composés dans nos plantes est donc souhaitable. L'étude

phytochimique quantitative de nos extraits, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de leur teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines (appelé également tanins catéchiques ou tanins condensés). Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait qu'ils sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes médicinales, en plus de ses diverses activités biologiques telles que les activités anti-hyperglycémique et anti-inflammatoires. De même, pour les proanthocyanidines et les flavonoïdes qui sont considérés comme les classes les plus importantes des polyphénols. Les résultats ont révélé que l'extrait CSA présente les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux que celles données par l'extrait CMA. Aussi, nous avons constaté que CSA a une concentration en flavonoïdes relativement plus élevée que CMA. CSA et CMA ont des teneurs importantes en tanins catéchiques avec des valeurs non significativement ($p < 0.05$) différentes. Les teneurs de nos extraits en polyphénols sont supérieures à celles rapportés par Carev et ses collaborateurs (2020), qui ont trouvés des teneurs de 161.09 ± 7.2 mg EAG/g, dans un extrait aqueux de *Cistus salvifolius* de Croatia et ils sont aussi plus élevés à celles trouvées dans un extrait méthanolique des feuilles de *Cistus monspeliensis* de Tunisie 33.16 ± 0.01 mg EAG/g (Nicoletti et al 2015). Ces variations peuvent être à l'origine de divers facteurs, comme les facteurs climatiques et géographiques, le potentiel génétique des espèces individuelles pour la biosynthèse des polyphénols, les méthodes d'extraction et l'étape de maturation qui peut être également critique à cet égard (Alipour et al 2016).

L'analyse de la composition minérale des plantes étudiées a montré que *C. salvifolius* a des teneurs significativement plus élevées ($p < 0.05$) en Ca, Mg, K, P, Na et Cu par rapport à CM, tandis que CM a des quantités significativement plus élevées en Fe. La différence observée entre les deux plantes en contenu minéral est probablement lié au profil génétique et partiellement aux conditions environnementales. La présente étude a révélé que les plantes CS et CM sont riches en Ca, Mg, P, Na et K, qui sont des éléments très importants dans la nutrition humaine. A notre connaissance, il n'y a pas des études antérieures sur la composition minérale des plantes CS et CM. Néanmoins, il a été rapporté que d'autres espèces de *Cistus* (*Cistus ladanifer* L. et *Cistus libanotis* L.) du Maroc ont montré des teneurs élevées en certains éléments minéraux (Zidane et al 20116).

Avant de commencer notre étude pharmacologique *in vivo* nous avons d'abord évalué la toxicité aiguë de nos extraits par voie orale chez la souris, le principal but d'étudier la toxicité

est de connaître la nature et l'amplitude des effets secondaires des extraits à des doses bien appropriées, à fin de prévenir tout risque pour l'organisme vivant.

D'après l'étude de la toxicité aigüe que nous avons menée comme décrit dans les lignes directrices 423 de l'OCDE, les extraits CSA et CMA n'ont aucun effet toxique chez la souris jusqu'à la dose de 2000 mg/ kg par voie orale. En plus, l'administration orale des extraits CSA et CMA à la dose de 500 mg/kg pendant un mois n'a provoqué aucune toxicité chez la souris. En effet, la présente étude a été menée à la dose de 500 mg / kg b, wt pour évaluer l'activité antidiabétique.

Chez les patients diabétiques de type 2, la résistance à l'insuline est initialement compensée par une augmentation de la sécrétion d'insuline pour maintenir une glycémie normale. On pense que ce mécanisme compensatoire implique à la fois une amélioration de la fonction sécrétoire des cellules β pancréatique et une augmentation de la masse de ces cellules. Cependant, au fil du temps, une sécrétion exagérée d'insuline conduit à une défaillance progressive des cellules β , les cellules subissent une apoptose et la masse des cellules β est réduite. Le diabète induit par STZ-NA chez les animaux du laboratoire correspond au stade du diabète de type 2 chez l'homme lorsque la masse des cellules β est réduite. Ce modèle développé par Masiello, et al. (1998) est très utile dans les études de différents aspects du diabète, y compris les complications de cette maladie (Szkudelski, T., 2012).

Dans cette méthode la STZ exerce une action cytotoxique sur les cellules β productrice de l'insuline au niveau du pancréas. Elle est transportée vers les cellules β via le transporteur de glucose GLUT2 et provoque des dommages à l'ADN conduisant à une activité accrue de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1) pour réparer l'ADN. Le mécanisme de réparation de l'ADN consomme de grandes quantités de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Ainsi, l'administration du nicotinamide aux souris sert à protéger partiellement les dommages excessifs causés par la STZ sur les cellules β (Islam, M.S. and Wilson, R.D., 2012).

Les doses de STZ utilisées pour induire le diabète varient considérablement selon le sexe et la souche (Furman, 2015). Dans notre expérience, nous avons sélectionné la dose de 200 mg / kg de STZ pour induire le diabète après avoir testé différentes doses chez nos souris Swiss albinos.

Dans notre étude nous avons utilisé la méteformine comme témoin positif, ce dernier est un médicament antidiabétique appartenant à la famille des biguanides qui réagit directement ou

indirectement sur le foie pour diminuer la production du glucose. Il s'est également révélé être un sensibilisateur à l'insuline et agit probablement dans la lumière intestinale par le biais de multiples mécanismes (Rena et *al.*, 2017 ; Flory and Lipska, 2019). L'administration des extraits CSA et CMA (500 mg / kg b, wt) et la métformin (300 mg / kg b, wt) aux souris diabétiques a montré une réduction significative de l'hyperglycémie en comparaison avec les souris du groupe témoin diabétique non traité. Cet effet est probablement dû à une diminution de la production du glucose hépatique ou à une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatique puisque CSA et CMA ont réduit le dommage induit par STZ-NC sur les cellules des îlots de Langerhans. De plus, les groupes traités ont montré une amélioration significative du poids corporel, indiquant que CSA et CMA peuvent empêcher la fonte musculaire induite par l'hyperglycémie, qui est l'une des caractéristiques observées dans le diabète induit par STZ (Swanston-Flatt, et *al.*, 1990).

L'augmentation anormale des concentrations de lipides plasmatiques, y compris de triglycérides, sont des complications fréquemment observées dans le cas du diabète de type II et contribuent au développement de maladies cardiovasculaires graves (Krauss, 2004). L'administration de CSA et CMA a révélé une réduction significative du taux de triglycérides sérique. L'augmentation du taux de triglycérides sériques observée chez les souris diabétiques non traitées est collectivement corrélée avec l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, la prédisposition abdominale à l'adipose viscérale, l'augmentation de la teneur en graisse hépatique et le trouble du métabolisme des acides gras (Pang et *al.*, 2014).

En outre, nous avons constaté une élévation significative des taux de créatinine sérique chez les souris du groupe témoin diabétique par rapport au groupe témoin normal, alors que dans cette étude il n'y a pas d'augmentation significative des concentrations sériques d'urée, d'acide urique et de protéines totales. En fait, STZ-NC n'est pas spécifique pour induire une néphrotoxicité et toutes les modifications de la fonction rénale après l'administration de STZ-NC chez la souris peuvent donc être attribuées à une altération du métabolisme dans le diabète et à sa durée et sa gravité. La créatinine est un composé azoté non protéique produit par la dégradation de la créatine dans le muscle. Il est considéré comme un marqueur plus spécifique du rein, car les lésions rénales sont le seul facteur significatif qui augmente le taux de créatinine sérique (Ahangarpour, et *al.*, 2016 ; Al-Attar, A.M. and Alsalmi, 2019) alors que la formation d'urée, d'acide urique et des protéines est influencée par plusieurs facteurs tel que la fonction hépatique, le niveau du catabolisme des protéines et l'hydratation. Le traitement par CSA et CMA a diminué significativement les concentrations de créatinines sériques chez

les souris diabétiques jusqu'à des niveaux normaux. Cela indique une amélioration de la capacité d'excrétion rénale de la créatinine et suggère l'important rôle de nos extraits dans l'amélioration de la fonction rénale.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'El Kabbaoui et *al.* (2016) qui ont rapporté les propriétés antihyperglycémiques et hypolipidimiques de l'extrait aqueux d'une autre espèce de *Cistus* marocain (*Cistus ladaniferus* L.).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester. L'activité antioxydante de nos extraits est évaluée d'abord *in vitro* en utilisant quatre différentes méthodes, le test au DPPH, le test de l'ABTS et le test FRAP et le test d'inhibition de NO[•].

Les radicaux DPPH et ABTS sont les substrats les plus couramment utilisés pour l'évaluation directe de l'activité antioxydante en raison de leur stabilité en forme de radical et de leur simplicité d'analyse. Le test du FRAP est également un essai simple et reproductible utilisé pour évaluer le pouvoir réducteur du fer et il est en tout point complémentaire aux autres tests.

L'oxyde nitrique (NO[•]) est parmi les espèces réactives de l'oxygène produit dans l'organisme humain par les phagocytes et les cellules endothéliales et synthétisé à partir de l'arginine par la NO synthase. Le NO[•] réagit rapidement avec l'anion superoxyde formant un certain nombre d'espèces azotées réactives, y compris le peroxyde qui est un puissant oxydant cytotoxique. Un taux anormalement élevé de NO est généralement observé chez les diabétiques et il a été rapporté que l'hyperglycémie est impliquée dans sa production excessive (Adela et *al.*, 2015 ; Singh et *al.*, 2015). L'inhibition du NO peut donc contribuer à réduire de nombreuses pathophysiologies et complications du diabète associées à sa surproduction (Choi et *al.*, 1999 ; Škrha., 2007).

Les deux extraits testés ont montré un puissant effet anti-radicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH et du radical cationique ABTS^{•+}. Nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Nicoletti et *al.* (2015) qui ont trouvé une IC₅₀ égale à 3.00 ± 0.36 µg/ml dans le test au DPPH effectué sur un extrait méthanolique des feuilles de *C.monspeliensis* de Tunisie. Des résultats similaires sont également rapportés pour les extraits des bourgeons des fleurs de CS de Tunisie avec des valeurs d'IC₅₀ de 5.11 ± 0.53 et 4.82 µg/ml pour le test de DPPH et de l'ABTS respectivement (El Euch et *al.*, 2015). En plus, nos extraits ont montré un effet

antiradicalaire relativement plus élevé en comparaison avec l'extrait aqueux des parties aériennes de CS de Syrie qui a montré une valeur d'IC₅₀ de 11 µg / mL dans le test au DPPH (Waed et al., 2016).

L'extrait CSA a présenté un fort pouvoir réducteur du fer et une capacité inhibitrice du NO significativement plus élevés que CMA. Cela est corrélé positivement avec leur teneur en composés polyphénoliques.

Plusieurs études ont montré que le stress oxydatif joue un rôle important dans la progression du diabète, il est considéré comme le moteur mobilisant les différents facteurs pathologiques vers les complications de cette maladie et les organes associés (Maritim, et al., 2003; Mishra et al., 2017 ; Dos Santos et al., 2019).

Les lipides membranaires et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'attaque des ERO radicalaires au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information. Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des principaux produits finaux de la peroxydation lipidique qui peut réagir avec les biomolécules et exercer des effets cytotoxiques, génotoxiques. Le MDA est le biomarqueur du stress oxydatif le plus fréquemment utilisé dans plusieurs pathologies y compris le diabète (Ito et al., 2019). Dans les conditions normales, le système de défense antioxydant du corps peut produire des pièges des radicaux libres en quantité suffisante pour se protéger contre les effets des ERO. Les superoxydes dismutases représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Ce sont des métalloprotéases qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène stable et moins toxique et en oxygène moléculaire (Ighodaro, et Akinloye, 2018). Cependant, les diabétiques présentent le plus souvent un stress oxydatif plus sérieux dû à l'hyperglycémie chronique et persistante qui réduit l'activité antioxydante totale et favorise ainsi la génération des ERO (Takım, et Işık, 2020).

Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'activité de SOD dans les foies et les reins des souris diabétiques associée à une augmentation importante de la peroxydation lipidique dans ces tissus. Nos résultats sont conformes avec les études récentes qui ont démontré que l'activité des enzymes antioxydantes, telles que la SOD, sont réduites et le degré

de la peroxydation est élevé dans les tissus des animaux rendus diabétique par la méthode de STZ-NC (Ramprasad *et al.*, 2017 ; Rashid *et al.*, 2019 ; Takım, *et al.*, 2020).

Nos résultats ont montré que les deux extraits testés ont diminué le taux de l'MDA et ont augmenté l'activité de l'enzyme antioxydant SOD au niveau des foies et des reins des souris diabétiques d'une manière significative en comparaison avec les souris du groupe témoin diabétique. Ces résultats suggèrent que CSA et CMA sont capable de renforcer le système de défense enzymatique antioxydant, réduire les radicaux libres et peuvent atténuer le dommage excessive du stress oxydatif au niveau rénal et hépatique chez les diabétiques. Les résultats ont montré que les deux extraits possèdent un effet antioxydant remarquable *in vitro*; Ce pouvoir antioxydant a été retrouvé et remarqué *in vivo* chez les souris diabétique, ce qui témoigne d'un potentiel thérapeutique important pour la lutte contre les complications du diabète émanant d'un stress oxydant.

L'inhibition des enzymes digestives des sucres telles que l' α -amylase et de l' α -glucosidase est considérée comme une stratégie importante pour contrôler l'hyperglycémie postprandiale et l'une des principales approches pour prévenir les complications du diabète de type 2. Actuellement, une grande attention est portée aux extraits de plantes médicinales en tant qu'alternative potentielle aux inhibiteurs classiques de l' α -glucosidase et de l' α -amylase prescrits qui se sont révélés avoir de nombreux effets secondaires indésirables (Figueiredo-González *et al.*, 2016 ; Majeed *et al.*, 2020).

Nos résultats ont indiqué que les deux extraits ont inhibé significativement l'activité de l'enzyme α -amylase et α -glucosidase d'une manière concentration dépendante. En plus, ils ont montré une capacité inhibitrice de l' α -glucosidase significativement plus élevée que le composé de référence acarbose. L'extrait CSA a montré un pouvoir inhibiteur plus puissant avec une $IC_{50} = 0.95 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$. Notre constatation est en accord avec les études précédentes qui ont montré que certains extraits des plantes médicinales ont une activité inhibitrice de l' α -glucosidase plus élevée que les puissants inhibiteurs synthétiques tels que l'acarbose (Zhang, *et al* 2015 ; Figueiredo-González, *et al* 2016 ; Ortíz-Martinez *et al*, 2016).

De plus, nos résultats sont en accord avec une étude réalisée sur une autre espèce du genre (*Cistus laurifolius* L.) par Orhan *et al*, (2013) qui a montré que l'extrait éthanolique de cette plante est un puissant inhibiteur de la α -glucosidase ($IC_{50} = 6.3\mu\text{g} / \text{mL}$) et a une remarquable effet inhibiteur sur l' α -amylase et améliore également l'hyperglycémie chez les rats

diabétiques de type 2. La puissante capacité inhibitrice que possède nos extraits vis-à-vis de l'enzyme α -glucosidase et leur activité inhibitrice de l' α -amylase peut ralentir efficacement la digestion des glucides, prolonger ainsi le temps de digestion globale, provoquant une réduction de l'absorption du glucose et, par conséquent, une diminution importante de l'hyperglycémie postprandiale. De plus, il a été suggéré que l'inhibition de l'activité des enzymes digestives du sucre peut aider à réduire la formation des produits finaux de glycation avancée (AGE), qui sont connues comme un facteur de risque majeur de complications cardiovasculaires chez les diabétiques (Khangholi et *al.*, 2016). Aussi, l'inhibition de l'hyperglycémie post-postprandiale peut aider à limiter la prise du poids ou à améliorer la perte du poids chez les patients qui ont le diabète de type 2 (Barrett, and Udani, 2011).

L'inhibition des enzymes α -amylase et α -glucosidante retarde l'absorption du glucose et représente donc une importante stratégie pour contrôler l'hyperglycémie postprandiale chez les patients diabétiques. Mais, les inhibiteurs de ces enzymes restent incapables de prévenir l'absorption du glucose lorsque le glucose lui-même est ingéré en grande proportion (Hanamura, et *al.*, 2006). Par conséquent, l'inhibition directe de l'absorption intestinale du glucose pourrait représenter un nouveau mécanisme très important et complémentaire de l'effet des enzymes digestives des sucres pour un contrôle plus efficace de l'hyperglycémie chez les diabétiques.

Nos résultats ont montré que les extraits CSA et CMA à la dose de 250 mg/kg inhibent significativement l'absorption du glucose dans l'intestin grêle chez les rats. Cela peut être envisagé comme l'un des mécanismes par lesquels nos extraits peuvent réguler l'homéostasie du glucose chez les animaux diabétiques. En plus aucune différence significative n'a été observée entre nos extraits et le référence standard Phlorizin. Ce dernier Phlorizin est un flavonoïde glucosidique qui bloque l'absorption intestinal du glucose par inhibition compétitive du SGLT1 (transporteur du glucose dépendant du sodium 1) (Ehrenkranz, 2005). Tandis que des concentrations plus élevées interféraient avec le métabolisme aérobie et produisaient un gonflement mitochondrial. Dans l'intestin, le glucose est principalement absorbé par deux transporteurs, en fonction de la concentration de glucose. À de faibles concentrations, le glucose est transporté à travers la membrane de bordure en brosse contre le gradient de concentration par le transporteur de glucose dépendant du sodium 1 (SGLT1). À des concentrations plus élevées, le glucose est transporté principalement par le transporteur facilité de faible affinité, le transporteur de glucose 2 (GLUT2). Il est bien connu que le SGLT1 est le transporteur le plus abondant dans l'intestin. L'inhibition du SGLT1 améliore

l'homéostasie du glucose en réduisant l'absorption du glucose alimentaire dans l'intestin et en augmentant la libération d'incrétines gastro-intestinales comme le peptide-1 de type glucagon qui devrait améliorer encore le métabolisme du glucose. Le GLP-1 inhibe en outre la libération du glucagon, hormone hyperglycémisante et améliore ainsi le métabolisme du glucose (Song, et *al.*, 2016).

Des études récentes ont montré que les modifications de la glycémie systémique en OGTT reflètent l'activité du transporteur intestinal du glucose SGLT1 (Ducroc, et *al.*, 2007 ; Stumpel, 2001). Les résultats du test de l'OGTT que nous avons réalisé de manière aigüe chez les rats au début de l'étude ont montré que nos deux extraits à la dose de 500 mg/kg réduisent significativement le taux du glucose dans le sang veineux des rats par rapport aux témoins après une charge de glucose à une dose de 2g/kg. Après une ingestion orale du glucose le maintien de la tolérance au glucose dépend de la sécrétion d'insuline, de la production hépatique du glucose, du taux du glucose absorbé dans le tube digestif en plus de l'absorption du glucose par les tissus périphériques (Ndong, et *al.*, 2007).

Pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème aigüe de la patte de rat induit par la carragénine, une des méthodes les plus utilisées pour l'étude des potentialités anti-inflammatoires des nouveaux agents supposés actifs (Morris, 2003). Selon Otterness et Gans (1988), dans ce modèle expérimental, la distribution et le mécanisme d'action des anti-inflammatoires seraient proches des phénomènes observés chez l'homme. En plus, ce test trouve un intérêt particulier, dans la mesure où c'est un test dans lequel la participation des dérivés de la cyclo-oxygénase produits au cours du métabolisme de l'acide arachidonique, et la production des espèces réactives à l'oxygène sont bien établies (Smith et al, 1974). L'injection de la carragénine provoque la libération successive de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. La phase initiale de la réponse inflammatoire dure environ 1 h 30 min, est provoquée par la libération d'histamine et de sérotonine; la deuxième phase est médiée par la bradykinine de 1 h30 min à 2 h30 min; et enfin une troisième phase, dont le médiateur est suspecté d'être des prostaglandines produites sous l'action de cyclo-oxygénase, intervient de 2 h 30 min à 6 h après l'injection de carragénine (Di Rosa, 1972). De plus, la réponse inflammatoire est également liée à l'infiltration locale et l'activation de neutrophile et à la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Posadas et al, 2004 ; Salvemini et al 1996). L'industrie pharmaceutique a mis sur le marché plusieurs substances anti-inflammatoires synthétiques, efficaces mais leur intérêt est généralement perturbé par des

effets secondaires gênants notamment lorsqu'ils sont administrés par voie orale. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens tel que l'indométacine qui est une des molécules les plus connues, génèrent des troubles digestifs et rénaux graves (Arnold et al 1974 ; Roth, 2012 ; Wang et al 2019).

Nos extraits à la dose testé (500 mg / kg), ont montré une inhibition progressive et significative de l'oedème induit par la carragénine chez la patte des rats en comparaison avec le groupe témoin ce qui traduit leur importante capacité anti-inflammatoire. La richesse de nos extraits en constituants polyphénoliques capables de piéger les radicaux libres et surtout en flavonoïdes qui sont largement connus par leurs propriétés anti-inflammatoires, ainsi que l'importante activité antioxydante que présentent ces extraits peuvent expliquer en partie leurs intéressants effets anti-inflammatoires. Les résultats de la présente étude sont en accord avec l'étude d'El Youbi et ses collaborateurs. (2016) qui ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Cistus ladaniferus* (L.) du Maroc possède un puissant effet anti-inflammatoire sur l'oedème induit par la carragénine chez la patte de rat. Cependant, les résultats de Küpeli et Yesilada (2007) ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Cistus laurifolius* (L.) de Turquie ne montre aucun effet inhibiteur sur le modèle de l'oedème induit par la carragénine, tandis que l'extrait éthanolique était significativement actif à la fois à la dose de 250 et 500 mg / kg. Les différences entre les différentes espèces de *Cistus* dans la réponse anti-inflammatoire peuvent être probablement liées aux conditions environnementales, aux méthodes et solvants d'extraction et à la partie de la plante utilisée, et au profil génétique qui permettent à chaque espèce végétale d'avoir des constituants phytochimiques spécifiques et donc une réponse biologique variable.

Les composés phénoliques sont les principales biomolécules des plantes qui sont largement connues pour leur potentiel thérapeutique contre diverses maladies. Dans l'organisme humain, les composés phénoliques peuvent agir comme des protecteurs des lipides, des protéines et de l'ADN contre les espèces réactives de l'oxygène et donc jouer un rôle central dans la prévention du stress oxydatif et de ses pathologies associées telles que le diabète de type 2 (Fenercioglu et al., 2010 ; Noh et al., 2011). Les composés phénoliques de différentes fractions de nos plantes ont été analysés sur HPLC. Les résultats de cette analyse ont montré une importante variabilité entre les différentes fractions de *Cistus* pour tous les composés mesurés. Cette variation est peut être attribuée à la différence des caractéristiques génétiques entre ces deux espèces de plante et peut également être due à la différence de polarité du solvant. En effet, plusieurs études rapportées ont montré que le solvant d'extraction a un

impact sur les concentrations chimiques (Turkmen et *al.*, 2006 ; Spigno et *al.*, 2007 Rafińska et *al.*, 2019). Parmi les composés phénoliques que nous avons analysés sur HPLC seul la quercétine a été identifié dans la fraction la plus active FCMB avec une concentration de 10.68 µg/mg d'extrait. La quercétine est parmi les flavonoïdes les plus connu par ses intéressantes activités biologiques telles que l'activité antioxydante, antiinflammatoire, et antidiabétiques. Elle inhibe l'hyperglycémie d'une manière concentration dépendante (Bule, et *al.*, 2019).

Parmi les différentes fractions de la plante *C. salvifolius*, la fraction FCSE a été révélé la plus active dans le piégeage des radicaux libres DPPH, ABTS et NO, et dans l'inhibition des enzymes digestives de sucre. Cependant, l'extrait aqueux de cette plante a montré une forte capacité inhibitrice de l'enzyme α -glucosidase ($IC_{50} = 0.95 \pm 0.14$ µg/ml) plus potentielle que la FCSE ($IC_{50} = 4.78 \pm 0.02$ µg/ml) et même plus élevée que l'inhibiteur standard Acarbose ($IC_{50} = 18.01 \pm 2.00$ µg/ml). Ce résultat, suggère que cette plante contient des molécules bioactives qui réagissent en synergie et potentialisent son effet antihyperglycémiant. Par contre, chez la plante *C. monspeliensis* nous avons constaté que la fraction la plus active de cette plante (FCMB) a exercé une activité de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS ainsi qu'une activité inhibitrice de l'enzyme α -amylase ($IC_{50} = 64.18 \pm 1.73$ µg/ml) et α -glucosidase ($IC_{50} = 2.93 \pm 0.08$ µg/ml) plus importante que l'extrait aqueux CMA.

La comparaison entre les deux fractions les plus active de chaque plante nous a permis de constaté que FCMB et FCSE possèdent une activité inhibitrice non significativement différente dans le test de DPPH et dans les tests d'inhibition d' α -amylase et d' α -glucosidase.

Cependant, la fraction FCMB a présenté un rendement plus important que FCSE. En effet, nous avons sélectionné la fraction FCMB pour effectuer une analyse phytochimique d'une manière plus précise afin d'identifier leur molécules bioactives.

La fraction FCMB a été analysée sur UPLC et sur HRMS et soumis par la suite à un fractionnement sur CPC.

Le profil de la fraction FCMB sur UPLC nous a montré que les composés majoritaires de cette fraction sont des composés polaire et l'analyse sur HRMS nous a permis de constaté que la punicalagine et la pedunculagine sont les produits les plus majoritaires dans cette fraction.

Les sous fractions obtenues après la séparation de différents constituants de FCMB à l'aide de CPC ont été analysées par la suite sur UPLC afin d'identifier leur molécules bioactives. Les

Discussion

résultats ont montré une variabilité dans la composition de chaque sous fraction et les composés détectés sont principalement des acides phénoliques (acide éllagique, acide gallique, acide caféique) des flavonoïdes (myricitin, rutin, isoquercetin), des tanins catéchiques (epigallocatechin, epigallocatechin gallate, galocatechin, catéchin) et des tanins ellagiques (pedunculagin, punicalin et punicalagin). L'analyse des spectres Qda nous a montré que les sous fractions de FCMB ne sont pas des produits purs mais ils contiennent des composés phénoliques qui sont encore en mélange, d'autres produits que nous n'avons pas pu identifier sont aussi présents dans les sous fractions. La sous-fraction F₂₁ qui a été révélée la plus importante en termes de quantité a comme principal composition la punicaline et la punicalagine qui sont des tanins éllagiques. Cette famille de composés phénoliques possèdent un large spectres de propriétés biologiques notamment des propriétés antioxydantes et antidiabétiques, ainsi que des potentiels thérapeutiques contre les maladies cardiovasculaires et anti-inflammatoires (Larrosa, et *al.*, 2010 ; Cardullo, et *al.*, 2020). Nos résultats sont en accord avec des études récentes qui ont montré la richesse des espèces de *Cistus* en composés phénoliques (Carey, et *al.*, 2020 ; Lahcen, et *al.*, 2020).

Conclusion et perspectives

En conclusion, les résultats obtenus dans la présente étude ont montré que les extraits aqueux des parties aériennes des plantes *Cistus salviifolius* et *Cistus monspeliensis* du Maroc à la dose de 500 mg/kg par voie orale possèdent une importante activité antihyperglycémique significative chez les souris Swiss Albino dont le diabète de type 2 a été induit par l'injection de l'agent chimique diabéto-gène STZ associé au nicotinamide. Sur ce modèle du diabète nos extraits ont diminué également d'une manière significative les taux de triglycérides, ce qui signifie leur capacité à améliorer le métabolisme lipidique. De même, ils ont montré une diminution significative des concentrations sériques de créatinine chez les souris ce qui traduit leur capacité à prévenir ou empêcher les lésions rénales dans les conditions du diabète. Aussi, l'administration orale de nos extraits a prévenu significativement la perte pondérale chez les souris diabétiques traitées en comparaison avec les souris diabétiques non traitées. L'analyse histologique du pancréas des souris ont révélé que les extraits à la dose étudiée ont réduit le dommage induit par la STZ au niveau des îlots de Langerhans par rapport aux témoins.

L'étude de la toxicité aiguë a montré que nos extraits ne possèdent aucune toxicité ou effet indésirables sur les souris par voie orale jusqu'à la dose de 2000 mg/kg. De même, les deux extraits n'ont montré aucun effet toxique sur les différents paramètres biochimiques des souris à la dose étudiée (500 mg/kg).

La deuxième démarche de cette étude s'est penchée sur la recherche des possibles mécanismes d'action de nos extraits qui peuvent expliquer ou justifier leur potentiel antidiabétique. Ainsi, nous avons évalué leur capacité à inhiber les enzymes digestives de sucre, leur effet sur l'absorption intestinale du glucose, leur pouvoir antioxydant et en fin leur activité anti-inflammatoire.

Nos extraits ont présenté une importante activité inhibitrice de l'enzyme α -amylase et une forte capacité inhibitrice de l'enzyme α -glucosidase, l'extrait CSA a été révélé la plus active avec une IC_{50} égale à 0.95 ± 0.14 μ g/ml. En plus, CSA et CMA ont réduit significativement l'absorption intestinale du glucose chez les rats *ex situ*.

Les extraits aqueux de nos plantes ont montré un puissant pouvoir antioxydant dans les différents tests effectués *in vitro*, ce pouvoir antioxydant a été retrouvé et remarqué *in vivo* chez les souris diabétique, les deux extraits ont diminué efficacement les taux du marqueurs du stress oxydant MDA et ils ont significativement amélioré l'activité de l'enzyme SOD.

Les extraits aqueux ont montré également une importante activité anti-inflammatoire dans le test de l'œdème induit chimiquement par la carragénine chez les rats.

A la lumière de ces résultats, la dernière démarche de notre étude s'est focalisé sur le fractionnement et la séparation des différents constituants chimiques de nos plantes afin d'identifier leurs molécules bioactives à l'aide d'une étude phytochimique bioguidée.

Après fractionnement, nous avons constaté que l'extrait aqueux de la plante *C. salviifolius* a montré un effet inhibiteur plus puissant que la fraction la plus active de cette plante (FCSE) sur l'enzyme α -glucosidase et une activité réductrice plus élevée du radical ABTS, et non significativement différent du radical libre DPPH. Ce résultat suggère que cette plante contient des molécules bioactives qui réagissent en synergie et potentialisent son effet antihyperglycémiant.

La fraction FCMB de la plante *C. monspeliensis* qui a été révélée la plus active dans la plupart des tests effectués *in vitro* a été soumise à un sous-fractionnement sur CPC, et les sous-fractions obtenues ont été analysées sur UPLC afin d'identifier leur composition. Les résultats ont montré une variabilité dans la composition de chaque sous-fraction et les composés détectés sont principalement des acides phénoliques (acide éllagique, acide gallique, acide caféique) des flavonoïdes (myricitine, rutine, isoquercétine), des tanins catéchiques (epigallocatechine, epigallocatechine gallate, gallocatechine, catéchine) et des tanins éllagiques (Pedunculagine, punicaline et punicalagine). L'analyse des spectres Qda nous a montré que les sous-fractions de FCMB ne sont pas des produits purs mais ils contiennent des composés phénoliques qui sont encore en mélange, d'autres produits que nous n'avons pas pu identifier sont aussi présents dans les sous-fractions de FCMB. La sous-fraction F₂₁ qui a été révélée la plus importante en termes de quantité a comme composition principale la punicalin et la punicalagin qui sont des tanins éllagiques.

Les travaux sur la sous-fraction F₂₁ doivent se poursuivre afin d'isoler et de purifier leurs molécules, d'évaluer leurs activités antidiabétiques et d'étudier la relation structure-activité.

Les résultats obtenus dans la présente étude constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel des plantes *Cistus salviifolius* et *Cistus monspeliensis* et confirme leur potentiel thérapeutique contre la maladie du diabète de type 2. Ces résultats ouvrent la porte vers des nouvelles recherches cliniques et des nouvelles perspectives dans le traitement du diabète et ses complications.

Références bibliographiques

Aafi, A., Taleb, M.S. and Fechtal, M., 2002. Espèces remarquables de la flore du Maroc. Centre National de la Recherche Forestière: Rabat, Morocco.) Available at:(accessed 8 August 2018).

Adela, R., Nethi, S.K., Bagul, P.K., Barui, A.K., Mattapally, S., Kuncha, M., Patra, C.R., Reddy, P.N.C. and Banerjee, S.K., 2015. Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PloS one*, 10(4), p.e0125270.

Afanas'eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A. and Korkina, L.G., 2001. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical pharmacology*, 61(6), pp.677-684.

Ahangarpour, A., Oroojan, A.A., Khorsandi, L., Shabani, R. and Mojaddami, S., 2016. Preventive effects of betulinic acid on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic nephropathy in male mouse. *Journal of nephropathology*, 5(4), p.128.

Ajebli, M. and Eddouks, M., 2019. The promising role of plant tannins as bioactive antidiabetic agents. *Current medicinal chemistry*, 26(25), pp.4852-4884.

Alberti, K.G.M.M. and Zimmet, P.Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, 15(7), pp.539-553.

Alipour, M. and Saharkhiz, M.J., 2016. Phytotoxic activity and variation in essential oil content and composition of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) during different phenological growth stages. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 7, pp.271-278.

AL-Ishaq, R.K., Abotaleb, M., Kubatka, P., Kajo, K. and Büsselberg, D., 2019. Flavonoids and their anti-diabetic effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. *Biomolecules*, 9(9), p.430.

Al Mahmud, Z., Bachar, S.C., Hasan, C.M., Emran, T.B., Qais, N. and Uddin, M.M.N., 2017. Phytochemical investigations and antioxidant potential of roots of *Leea macrophylla* (Roxb.). *BMC Research Notes*, 10(1), p.245.

- Amensour, M., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J.A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J. and Fernández-López, J., 2010. Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant foods for human nutrition*, 65(2), pp.170-178.
- Arnold, L., Collins, C. and Starmer, G.A., 1974. Renal and gastric lesions after phenylbutazone and indomethacin in the rat. *Pathology*, 6(4), pp.303-313.
- Al-Attar, A.M. and Alsalmi, F.A., 2019. Influence of olive leaves extract on hepatorenal injury in streptozotocin diabetic rats. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), pp.1865-1874.
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N. and Vanella, A., 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell biology and toxicology*, 16(2), pp.83-90.
- Attaguile, G., Perticone, G., Mania, G., Savoca, F., Pennisi, G. and Salomone, S., 2004. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *Journal of ethnopharmacology*, 92(2-3), pp.245-250.
- Bannwarth.B., Bertin.P., Binard.A., Calvino.B., Grilo.R., Saraux.A., Sibilia.J., Trèves.R., Vergne-Salle.P., 2007. Douleur, inflammation et interactions système nerveux/système immunitaire. ISBN : 2 - 910844 -15-3.
- Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H. and Msanda, F., 2017. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, 198, pp.338-350.
- Baron, A.D., 1998. Postprandial hyperglycaemia and α -glucosidase inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 40, pp.S51-S55.
- Barrett, M.L. and Udani, J.K., 2011. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition Journal*, 10(1), p.24.
- Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*, 189.

- Benkhiguel, O., Ben Akka, F., Salhi, S., Fadli, M., Douira, A. and Zidane, L., 2014. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). *J Anim Plant Sci*, 23(1), pp.3539-68
- Boada, C.C. and Martinez-Moreno, J.M., 2013. Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo "insulin resistance-secretion deficit". *Nutricion Hospitalaria*, 28(2), pp.78-87.
- Bouamama, H., Noel, T., Villard, J., Benharref, A. and Jana, M., 2006. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of ethnopharmacology*, 104(1-2), pp.104-107.
- Bule, M., Abdurahman, A., Nikfar, S., Abdollahi, M. and Amini, M., 2019. Antidiabetic effect of quercetin: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Food and chemical toxicology*, 125, pp.494-502.
- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O. and Caicedo, A., 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), pp.2334-2339.
- Cardullo, N., Muccilli, V., Pulvirenti, L., Cornu, A., Pouységu, L., Deffieux, D., Quideau, S. and Tringali, C., 2020. C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: A study of α -glucosidase and α -amylase inhibition. *Food Chemistry*, 313, p.126099.
- Carev, I., Maravić, A., Ilić, N., Čikeš Čulić, V., Politeo, O., Zorić, Z. and Radan, M., 2020. UPLC-MS/MS Phytochemical Analysis of Two Croatian *Cistus* Species and Their Biological Activity. *Life*, 10(7), p.112.
- Chappuis, D., 2012. Prise en charge des syndromes inflammatoires inexplicés en médecine générale: enquête pratique auprès de 80 généralistes de Haute-Savoie.
- Cho, N., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W. and Malanda, B., 2018. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138, pp.271-281.
- Choi, K.C., Lee, S.C., Kim, S.W., Kim, N.H., Lee, J.U. and Kang, Y.J., 1999. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Korean journal of internal medicine*, 14(1), p.32.

- Comhair, S.A. and Erzurum, S.C., 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(2), pp.L246-L255.
- Danne, A., Petereit, F. and Nahrstedt, A., 1994. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry*, 37(2), pp.533-538.
- Davies, K.J., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 50(4-5), pp.279-289. (Davies, 2000).
- DeFronzo, R.A., 1999. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*, 131(4), pp.281-303.
- DeFronzo, R., Fleming, G.A., Chen, K. and Bicsak, T.A., 2016. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism*, 65(2), pp.20-29.
- De Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J. and Lekeux, P., 2005. Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 149, No. 1, pp. 1-9).
- Dewanto, V., Wu, X. and Liu, R.H., 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 50(17), pp.4959-4964.
- Dohan, D., 2004. Platelet Rich Fibrin (PRF) : Un nouveau biomatériau de cicatrisation Biotechnologies et fibrine, plaquettes et cytokines, aspects immunitaires, implications thérapeutiques. 3ème partie : aspects immunitaires Platelet-Rich Fibrin (PRF):a new healing biomaterial 3rd part: immune features. *Implantodontie* 13, 109–115.
- Dos Santos, J.M., Tewari, S. and Mendes, R.H., 2019. The role of oxidative stress in the development of diabetes mellitus and its complications.
- Di Rosa, M., 1972. Biological properties of carrageenan. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 24(2), pp.89-102.
- Ducobu, J., 2003. Oral antidiabetic drugs in 2003. *Revue medicale de Bruxelles*, 24(4), pp.A361-A368.

Ducroc, R., Voisin, T., El Firar, A. and Laburthe, M., 2007. Orexins control intestinal glucose transport by distinct neuronal, endocrine, and direct epithelial pathways. *Diabetes*, 56(10), pp.2494-2500.

Ehrenkranz, J.R., Lewis, N.G., Ronald Kahn, C. and Roth, J., 2005. Phlorizin: a review. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 21(1), pp.31-38.

El Euch, S.K., Bouajila, J. and Bouzouita, N., 2015. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, pp.1100-1105.

El Kabbaoui, M., Chda, A., Azdad, O., Mejrhit, N., Aarab, L., Bencheikh, R. and Tazi, A., 2016. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(12), pp.1044-1049.

Elte, J. and Blickle, J., 2007. Thiazolidinediones for the treatment of type 2 diabetes. *European Journal Of Internal Medicine*, 18(1), 18-25.

El Youbi, A.E.H., El Mansouri, L., Boukhira, S., Daoudi, A. and Bousta, D., 2016. In vivo anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of *Cistus ladanifer* L. from Morocco. *American journal of therapeutics*, 23(6), pp.e1554-e1559.

Evans, W.J., 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), pp.647S-652S.

Favier, A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), pp.108-117.

Fenercioglu, A.K., Saler, T., Genc, E., Sabuncu, H. and Altuntas, Y., 2010. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of endocrinological investigation*, 33(2), pp.118-124.

Figueiredo-González, M., Grosso, C., Valentão, P. and Andrade, P.B., 2016. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose?. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 118, pp.322-327.

- Flory, J. and Lipska, K., 2019. Metformin in 2019. *Jama*, 321(19), pp.1926-1927.
- Forbes, J.M. and Cooper, M.E., 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*, 93(1), pp.137-188.
- Furman, B.L., 2015. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*, 70(1), pp.5-47.).
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), pp.162-169.
- Giacco, F. and Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107(9), pp.1058-1070.
- Haddad, P.S., Musallam, L., Martineau, L.C., Harris, C., Lavoie, L., Arnason, J.T., Foster, B., Bennett, S., Johns, T., Cuerrier, A. and Coon Come, E., 2012. Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from canadian eastern james Bay cree traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1990. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 1-85). Academic Press.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. In *Advances in pharmacology* (Vol. 38, pp. 3-20). Academic Press.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), pp.312-322.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hanamura, T., Mayama, C., Aoki, H., Hirayama, Y. and Shimizu, M., 2006. Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(8), pp.1813-1820.

- Haouat, A.C., Sqalli, H., Farah, A., Haggoud, A. and Iraqui, M., 2013. Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytothérapie*, 11(6), pp.365-372.
- Hashim, A., Khan, M.S., Khan, M., Baig, M. and Ahmad, S., 2013. Antioxidant and α -amylase inhibitory property of *Phyllanthus virgatus* L.: an in vitro and molecular interaction study. *BioMed Research International*, 2013.
- Hellal, M., 2007. Phtalazinones et 2, 3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine: Synthèses et activités anti-cytokine (Doctoral dissertation, Strasbourg 1).
- Herrera, E. and Barbas, C., 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of physiology and biochemistry*, 57(1), pp.43-56.
- Henquin, J.C., 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49(11), pp.1751-1760.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*, 1, pp.319-366.
- Hortelano, S., 2009. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 8(1), pp.28-39.
- Huang, B., Ke, H., He, J., Ban, X., Zeng, H. and Wang, Y., 2011. Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), pp.185-190.
- Huguin, M., 2010. Corticoïdes et dopage sportif: justification de l'instauration d'un contrôle antidopage pour ces produits et réflexion sur les stratégies et les outils de ce contrôle (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
- Idm'hand, E., Msanda, F. and Cherifi, K., 2020. Ethnopharmacological review of medicinal plants used to manage diabetes in Morocco. *Clinical Phytoscience*, 6, pp.1-32.
- Ighodaro, O.M. and Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), pp.287-293.

Islam, M.S. and Wilson, R.D., 2012. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Animal models in diabetes research* (pp. 161-174). Humana Press, Totowa, NJ.

Jia, Y., Bhuiyan, M.J.H., Jun, H.J., Lee, J.H., Hoang, M.H., Lee, H.J., Kim, N., Lee, D., Hwang, K.Y., Hwang, B.Y. and Choi, D.W., 2011. Ursolic acid is a PPAR- α agonist that regulates hepatic lipid metabolism. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(19), pp.5876-5880

Ito, F., Sono, Y. and Ito, T., 2019. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*, 8(3), p.72.

Jemia, M.B., Kchouk, M.E., Senatore, F., Autore, G., Marzocco, S., De Feo, V. and Bruno, M., 2013. Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chemistry Central Journal*, 7(1), p.47.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B. and Simic, M.G., 1994. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), pp.4846-4851.

Josse, R.G., 1995. Acarbose for the treatment of type II diabetes: the results of a Canadian multi-centre trial. *Diabetes research and clinical practice*, 28, pp.S167-S172.

Julkunen-Tiitto, R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 33(2), pp.213-217.

Kee, K.T., Koh, M., Oong, L.X. and Ng, K., 2013. Screening culinary herbs for antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *International journal of food science & technology*, 48(9), pp.1884-1891.

Khangholi, S., Majid, F.A.A., Berwary, N.J.A., Ahmad, F. and Abd Aziz, R.B., 2016. The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition. *Planta medica*, 82(01/02), pp.32-45.

Kohen, R. and Nyska, A., 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), pp.620-650.

Kikuchi, H., Yuan, B., Hu, X. and Okazaki, M., 2019. Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *American Journal of Cancer Research*, 9(8), p.1517.

Krauss, R.M., 2004. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 27(6), pp.1496-1504.

Küpeli, E. and Yesilada, E., 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), pp.524-530.

Lahcen, S.A., El Hattabi, L., Benkaddour, R., Chahboun, N., Ghanmi, M., Satrani, B., Tabyaoui, M. and Zarrouk, A., 2020. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus Creticus* leaves. *Chemical Data Collections*, 26, p.100346.

Lahsissene, H., Kahouadji, A. and Hseini, S., 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia, revue de botanique*.

Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Espín, J.C. and Tomás-Barberán, F.A., 2010. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine*, 31(6), pp.513-539.

Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), pp.790-796.

Lindau-Shepard, B.A. and Shaffer, J.B., 1993. Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(6), pp.581-588.

Lister, E. and Wilson, P., 2001. Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication). Crop Research Institute, Lincoln, New Zealand, pp.235-239.

Liu, M., 2013. Caractérisation de métabolites oxygénés issus de l'acide alpha-linolénique: Effets anti-agrégants et anti-inflammatoires (Doctoral dissertation).

Loizzo, M.R., Jemia, M.B., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F. and Tundis, R., 2013. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and chemical toxicology*, 59, pp.586-594.

Majeed, M., Majeed, S., Mundkur, L., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K. and Ali, F., 2020. Standardized *Embllica officinalis* fruit extract inhibited the activities of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase-4 and displayed antioxidant potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), pp.509-516.

Maleki, S.J., Crespo, J.F. and Cabanillas, B., 2019. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food chemistry*, 299, p.125124.

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

Maritim, A.C., Sanders, A. and Watkins Iii, J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 17(1), pp.24-38.

Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M. and Ribes, G., 1998. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47(2), pp.224-229.

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

Mishra, S. and Mishra, B.B., 2017. Study of lipid peroxidation, nitric oxide end product, and trace element status in type 2 diabetes mellitus with and without complications. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 7(2), p.88.

Ministère de la santé, 2017.

<https://www.sante.gov.ma/Pages/Communiqués.aspx?IDCom=266>

Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In *Inflammation protocols* (pp. 115-121). Humana Press.

Ndong M., Uehara M., Katsumata S. and Suzuki K. 2007. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40, 229-233.

Noh, J.S., Park, C.H. and Yokozawa, T., 2011. Treatment with oligonol, a low-molecular polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced hepatic damage through regulation of oxidative stress and lipid metabolism. *British journal of nutrition*, 106(7), pp.1013-1022.

Nicoletti, M., Toniolo, C., Venditti, A., Bruno, M. and Ben Jemia, M., 2015. Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian Cistus: *Cistus monspeliensis* *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*. *Natural product research*, 29(3), pp.223-230.

OECD/OCDE, 2002. Guidelines for the testing of chemicals 423, acute oral toxicity-acute toxic class method. OECD publishing; doi:10.1787/9789264071018-fr.

Oguntibeju, O.O., 2019. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 11(3), p.45.).

Olefsky, J.M. and Glass, C.K., 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*, 72, pp.219-246.

Orhan, N., Aslan, M., Şüküroğlu, M. and Orhan, D.D., 2013. In vivo and in vitro antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC–TOF-MS analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), pp.859-865.

Orci, L. and Unger, R., 1975. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *The Lancet*, 306(7947), pp.1243-1244.).

Ortíz-Martínez, D.M., Rivas-Morales, C., de la Garza-Ramos, M.A., Verde-Star, M.J., Nuñez-Gonzalez, M.A. and Leos-Rivas, C., 2016. *Miconia* sp. increases mRNA levels of PPAR gamma and inhibits alpha amylase and alpha glucosidase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.

Otterness, I.G. and Gans, D.J., 1988. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: An Analysis of the Relationship between Laboratory Animal and Clinical Doses. Including Species Scaling. *Journal of pharmaceutical sciences*, 77(9), pp.790-795.

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr*, 44(6), pp.307-315.

Pang, J., Chan, D.C. and Watts, G.F., 2014. Origin and therapy for hypertriglyceridaemia in type 2 diabetes. *World journal of diabetes*, 5(2), p.165.

Pickup, J.C., 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes care*, 27(3), pp.813-823.

Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), pp.1035-1042.

Polat, R. and Satıl, F., 2012. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), pp.626-641.

Pomponio, R., Gotti, R., Santagati, N.A. and Cavrini, V., 2003. Analysis of catechins in extracts of *Cistus* species by microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography A*, 990(1-2), pp.215-223.

Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L. and Cirino, G., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British journal of pharmacology*, 142(2), pp.331-338.

Pirola, L. and Ferraz, J.C., 2017. Role of pro-and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. *World journal of biological chemistry*, 8(2), p.120.).

Rafińska, K., Pomastowski, P., Rudnicka, J., Krakowska, A., Maruška, A., Narkute, M. and Buszewski, B., 2019. Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. *Food chemistry*, 289, pp.16-25.

Ramprasad, R., Madhusudhan, S. and Kalaichelvan, V.K., 2017. In-vivo Antioxidant Activity of Ethanol Extract of *Oldenlandia corymbosa* (Linn.) on Streptozotocin with Nicotinamide induced Oxidative Stress in Wistar Rats. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(1), pp.82-89.

Rashid, U., Khan, M.R. and Sajid, M., 2019. Antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic effects of *Fagonia olivieri* DC on STZ-nicotinamide induced diabetic rats-in vivo and in vitro study. *Journal of ethnopharmacology*, 242, p.112038.

Regnault J. P., 1992. *Immunologie générale*. 5ème Edition Décarie. 278-296.

- Rena, G., Hardie, D.G. and Pearson, E.R., 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), pp.1577-1585.
- Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y. and Han, W., 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 48(3), pp.e219-e219.
- Rolo, A.P. and Palmeira, C.M., 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*, 212(2), pp.167-178.
- Roth, S.H., 2012. Coming to terms with nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs*, 72(7), pp.873-879.
- Russo-Marie, F., 1998. *L'inflammation*. John Libbey Eurotext.
- Qa'dan, F., Nahrstedt, A. and Schmidt, M., 2011. Isolation of two new bioactive proanthocyanidins from *Cistus salvifolius* herb extract. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(6), pp.454-457.
- Santagati, N.A., Salerno, L., Attaguile, G., Savoca, F. and Ronsisvalle, G., 2008. Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *Journal of chromatographic science*, 46(2), pp.150-156.
- Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M.L., Vincieri, F.F. and Pinelli, P., 2005. Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves. *Chromatographia*, 62(5-6), pp.245-249.
- Scheen, A.J., 2003. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clinica Belgica*, 58(6), pp.335-341.
- Schorderet M., Dayer J.M., 1992. Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation ; Analgésiques, Antipyrétiques anti-inflammatoires et immuno supresseurs (in pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques) Slatkine, Paris-Genève, 932.
- Shoelson, S.E., Herrero, L. and Naaz, A., 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 132(6), pp.2169-2180.

Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91(3), pp.S31-S38.

Škrha, J., 2007. Diabetes and vascular disease: From pathogenesis to treatment: Are vascular effects of hypoglycemic and hypolipidemic drugs independent of their metabolic effects?. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 1(1), pp.61-69.

Singh, R., Devi, S. and Gollen, R., 2015. Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 31(2), pp.113-126.

Smith, M.J.H., Ford-Hutchinson, A.W., Elliott, P.N.C. and Bolam, J.P., 1974. Prostaglandins and the anti-inflammatory activity of a human plasma fraction in carrageenan-induced paw oedema in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 26(9), pp.692-698.

Smythies, J.R., 1998. *Every person's guide to antioxidants*. Rutgers University Press.

Song, P., Onishi, A., Koepsell, H. and Vallon, V., 2016. Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus. *Expert opinion on therapeutic targets*, 20(9), pp.1109-1125. P.

Sorg, O., 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *Comptes rendus biologies*, 327(7), pp.649-662.

Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), pp.200-208.

Spiller, H.A. and Sawyer, T.S., 2006. Toxicology of oral antidiabetic medications. *American journal of health-system pharmacy*, 63(10), pp.929-938.

Spanos, G.A. and Wrolstad, R.E., 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(7), pp.1565-1571.

Stumpel, F., Burcelin, R., Jungermann, K. & Thorens, B. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 11330–11335 (2001).

Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G. and Gerich, J.E., 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 333(9), pp.550-554.

Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J. and Flatt, P.R., 1990. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*, 33(8), pp.462-464.

Szkudelski, T., 2012. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental biology and medicine*, 237(5), pp.481-490.

Takım, K. and Işık, M., 2020. Phytochemical Analysis of *Paliurus spina-christi* Fruit and Its Effects on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp.1-16.

Tangvarasittichai, S., 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, 6(3), p.456.

Thanos, C.A., Georghiou, K., Kadis, C. and Pantazi, C., 1992. Cistaceae: a plant family with hard seeds. *Israel Journal of Plant Sciences*, 41(4-6), pp.251-263.

Threlfall, D.R., 1971. The biosynthesis of vitamins E and K and related compounds. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 29, pp. 153-200). Academic Press.

Tran, L., Zielinski, A., Roach, A.H., Jende, J.A., Householder, A.M., Cole, E.E., Atway, S.A., Amornyard, M., Accursi, M.L., Shieh, S.W. and Thompson, E.E., 2015.

Tuberoso, C.I.G., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D. and Pirisi, F.M., 2013. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food chemistry*, 140(4), pp.686-691.

Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food chemistry*, 99(4), pp.835-841.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44-84.

Vicent, D., Garcia-Martinez, J.A., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., Valverde, I. and Malaisse, W.J., 1995. Stimulation of insulin secretion and potentiation of glibenclamide-induced insulin release by the dimethyl ester of glutamic acid in anaesthetized rats. *Diabetes research and clinical practice*, 27(1), pp.27-30.

Vitali, F., Pennisi, G., Attaguile, G., Savoca, F. and Tita, B., 2011. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Natural product research*, 25(3), pp.188-202.

Waed, A., Ghalia, S. and Adawia, K., 2016. Evaluation of Radical Scavenging Activity, Total Phenolics and Total Flavonoids Contents of *Cistus* Species in Syria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(7), pp.1071-1077.

Wang, R.Y., Tung, Y.T., Chen, S.Y., Lee, Y.L. and Yen, G.C., 2019. Protective effects of camellia oil (*Camellia brevistyla*) against indomethacin-induced gastrointestinal mucosal damage in vitro and in vivo. *Journal of Functional Foods*, 62, p.103539.

Williams, G.M., 1994. Interventive prophylaxis of liver cancer. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 3(2), pp.89-99.

Zahran, E.M., Abdelmohsen, U.R., Hussein, A.S., Salem, M.A., Khalil, H.E., Yehia Desoukey, S., Fouad, M.A. and Kamel, M.S., 2019. Antiulcer potential and molecular docking of flavonoids from *Ocimum forskolei* Benth., family Lamiaceae. *Natural Product Research*, pp.1-5.

Zhang, H., Wang, G. and Dong, J., 2015. Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Zheng, Y., Ley, S.H. and Hu, F.B., 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), p.88.

Zidane, H., Aouniti, F., Tahani, A., Fauconnier, M.L. and Elbachiri, A., 2013. Screening of mineral elements in *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* essential oils and their leaves. *Oriental Journal of Chemistry*, 29(4), pp.1319-1324.

Résumé

Titre : Etude phytochimique et pharmacologique du potentiel antidiabétique des plantes *Cistus salviifolius* L et *Cistus monspeliensis* L du Maroc.

Auteur : Karima Sayah

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales du Maroc et la nécessité urgente des nouveaux agents antidiabétiques plus efficaces, moins chers et moins toxiques que les médicaments synthétiques actuels. L'objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel antidiabétique des plantes *Cistus salviifolius* L. et *Cistus monspeliensis* L. et d'investiguer les possibles mécanismes d'action qui peuvent expliquer leur propriété thérapeutique.

L'activité antidiabétique des extraits aqueux des parties aériennes des plantes *C. salviifolius* et *C. monspeliensis* a été évalué chez les souris rendus diabétiques par injection de STZ associé au nicotinamide. Les résultats ont montré que nos extraits à la dose de 500 mg/kg par voie orale réduit significativement l'hyperglycémie, diminue les taux sériques de triglycérides et de créatinines et prévenue également la perte pondérale des souris en comparaison avec les groupes témoins. Les extraits aqueux de nos plantes ont montré un puissant pouvoir antioxydant *in vitro* et *in vivo* chez les souris diabétiques, ils ont montré un puissant effet inhibiteur contre les enzymes α -amylase et α -glucosidase, une importante activité inhibitrice de l'absorption intestinale du glucose, et une activité anti-inflammatoire prometteuse chez l'animal. Ces activités peuvent être envisagées comme les principaux mécanismes par lesquels nos extraits régulent l'homéostasie du glucose chez les souris diabétiques.

A la lumière de ces résultats, la dernière démarche de notre étude s'est focalisé sur le fractionnement et la séparation des différents constituants chimiques de nos plantes afin d'identifier leurs molécules bioactives à l'aide d'une étude phytochimique bioguidée.

Les résultats obtenus dans la présente étude constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel des plantes *C. salviifolius* et *C. monspeliensis* et confirme leur potentiel thérapeutique contre la maladie du diabète de type 2. Ces résultats, ouvrent la porte vers des nouvelles recherches cliniques et des nouvelles perspectives dans le traitement du diabète et ses complications.

Mots-clés : *Cistus salviifolius*, *Cistus monspeliensis*, activité antidiabétique, STZ-nicotinamide, α -glucosidase, α -amylase, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Abstract

Title: Phytochemical and pharmacological study of the anti-diabetic potential of *Cistus salviifolius* L and *Cistus monspeliensis* L plants of Morocco.

Authors: Karima Sayah

The present study fits into the framework of the valorization of the medicinal plants of Morocco and the urgent need of new antidiabetic agents more effective, less expensive and less toxic than the current synthetic drugs. The objective of this study was to evaluate the antidiabetic potential of the plants *Cistus salviifolius* L. and *Cistus monspeliensis* L. and to investigate the possible mechanisms of action which can explain their therapeutic property.

The anti-diabetic activity of aqueous extracts of the aerial parts of *C. salviifolius* and *C. monspeliensis* plants was evaluated in mice made diabetic by injection of STZ associated with nicotinamide. The results showed that our extracts at the dose of 500 mg/kg orally significantly reduced hyperglycemia, decreased serum triglyceride and creatinine levels and also prevented weight loss in mice compared to control groups. The aqueous extracts of our plants showed a potent antioxidant power *in vitro* and *in vivo* in diabetic mice, a potent inhibitory effect against α -amylase and α -glucosidase enzymes, a significant inhibitory activity on intestinal glucose absorption, and a promising anti-inflammatory activity in animals. These activities can be considered as the main mechanisms by which our extracts regulate glucose homeostasis in diabetic mice.

In the light of these results, the last step of our study focused on the fractionation and separation of the different chemical constituents of our plants in order to identify their bioactive molecules using a bioguided phytochemical study.

The results obtained in the present study constitute a scientific justification of the traditional use of the plants *C. salviifolius* and *C. monspeliensis* and confirm their therapeutic potential against the type 2 diabetes. These results open the door to new clinical research and new perspectives in the treatment of diabetes and its complications.

Key-words: *Cistus salviifolius* L, *Cistus monspeliensis* L, anti-diabetic activity, STZ-nicotinamide, α -glucosidase, α -amylase, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

ملخص

العنوان: دراسة كيميائية نباتية ودوائية للقدرة المضادة لمرض السكري للنببتين "*Cistus salviifolius L*" و "*Cistus monspeliensis L*" من المغرب.

المؤلف: كريمة السايح

يندرج محور هذه الدراسة في سياق تثمين النباتات الطبية التي يزخر بها المغرب والحاجة المستعجلة لمواد جديدة مضادة لمرض السكري تكون أكثر فعالية، اقتصادية، وأقل سمية من الأدوية الاصطناعية الحالية. كان الهدف من هذا العمل هو تقييم نشاط النببتين "*Cistus salviifolius L*" و "*Cistus monspeliensis L*" المضاد لمرض السكري و البحث عن آليات عملها التي قد تفسر خصائصهما العلاجية.

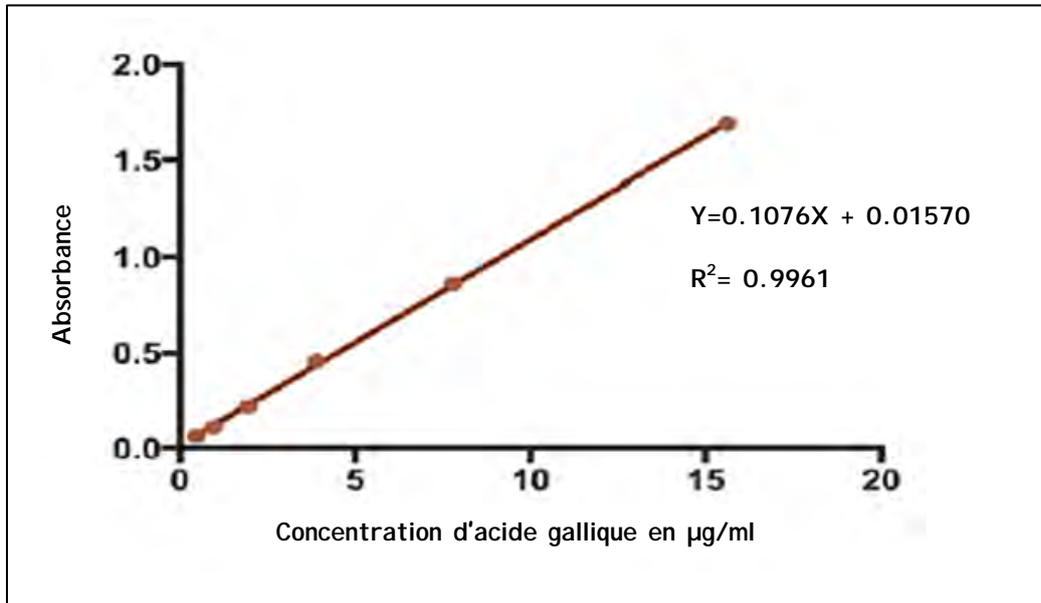
تم تقييم النشاط المضاد لمرض السكري للمستخلصات المائية للأجزاء الهوائية من "*Cistus salviifolius*" و "*Cistus monspeliensis*" عند الفئران بعد تعريضهم لمرض السكري عن طريق حقن الستيربتوزوتوسين مع النيكوتيناميد. أظهرت النتائج أن جرعة 500 ملغ/كغ من هذه المستخلصات قد قللت بشكل كبير من ارتفاع السكر في الدم ، وخفضت مستويات الدهون الثلاثية والكرياتينين في الدم ، كما حالت دون فقدان الوزن عند الفئران مقارنة مع المجموعات الشاهدة. أظهرت المستخلصات المائية للنباتات المدروسة فعالية قوية مضادة للأكسدة في المختبر وفي الجسم الحي عند الفئران المصابة بداء السكري ، وقد أظهرت تأثيرًا قويًا كابحا لنشاط إنزيم الألفا أميليز والألفا جلوكوزيداز ، فعالية قوية ضد امتصاص الأمعاء للجلوكوز ، ونشاط مهم مضاد للالتهابات عند الحيوان. يمكن اعتبار هذه الأنشطة بمثابة الآليات الرئيسية التي تعمل بها هذه الخلاصات النباتية لتنظيم توازن الجلوكوز عند الفئران المصابة بداء السكري. في ضوء هذه النتائج ، ركزنا في الخطوة الأخيرة من دراستنا على تجزئة وفصل المكونات الكيميائية المختلفة للنببتين من أجل تحديد الجزيئات النشطة بيولوجيًا باستخدام دراسة كيميائية نباتية موجهة حيويًا.

تشكل النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مبررًا علميًا للاستخدام التقليدي لهذه النببتين وتؤكد إمكاناتهما العلاجية ضد مرض السكري من النوع 2. هذه النتائج تفتح الباب أمام أبحاث سريرية جديدة ووجهات نظر جديدة في مجال علاج مرض السكري ومضاعفاته.

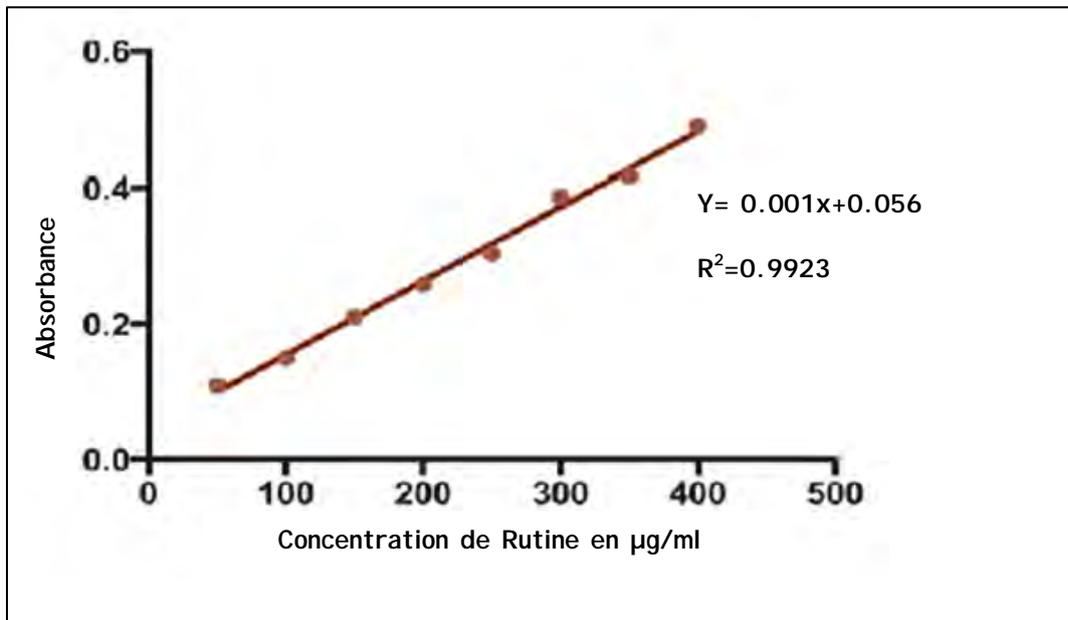
الكلمات المفتاح: نشاط مضاد لمرض السكري, الستيربتوزوتوسين مع النيكوتيناميد, ألفا أميليز, ألفا جلوكوزيداز, نشاط مضاد للأكسدة, نشاط مضاد للالتهاب

Annexes

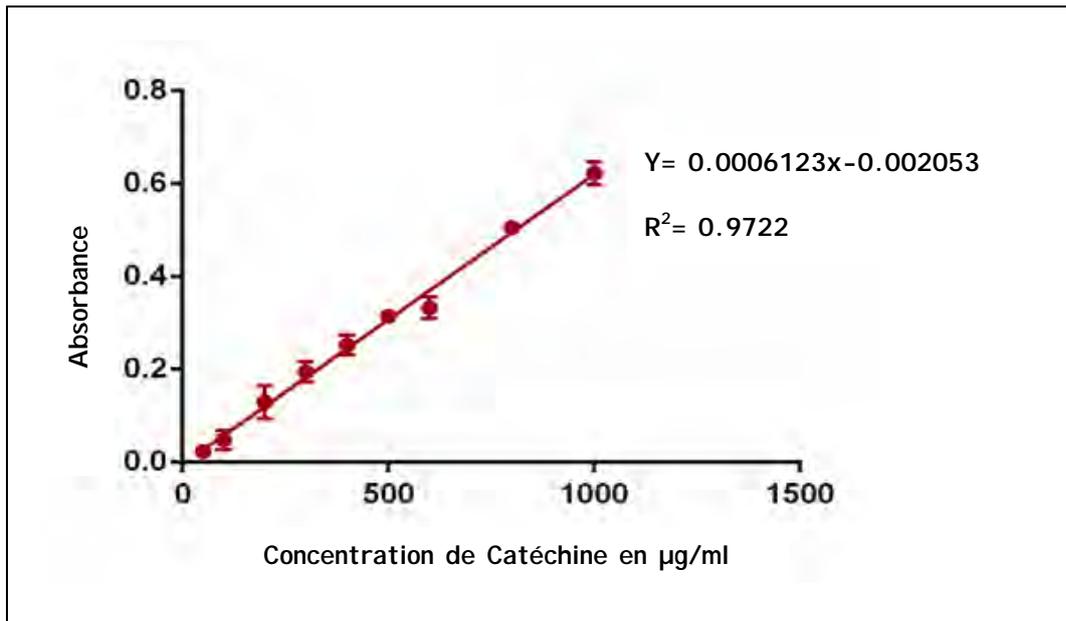
Annexe 1 : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques sur spectrophotomètre.



1- Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols

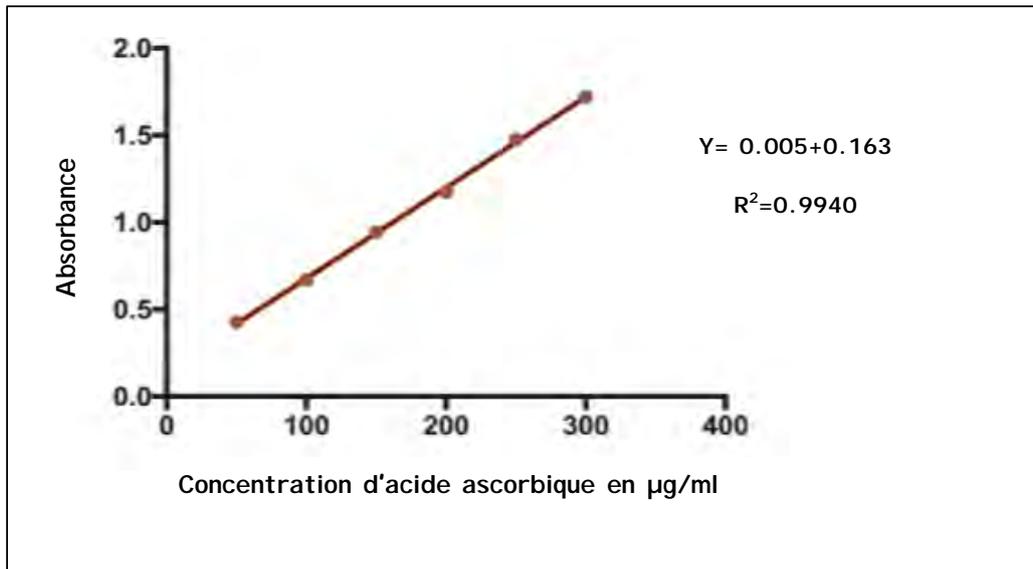


2- Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

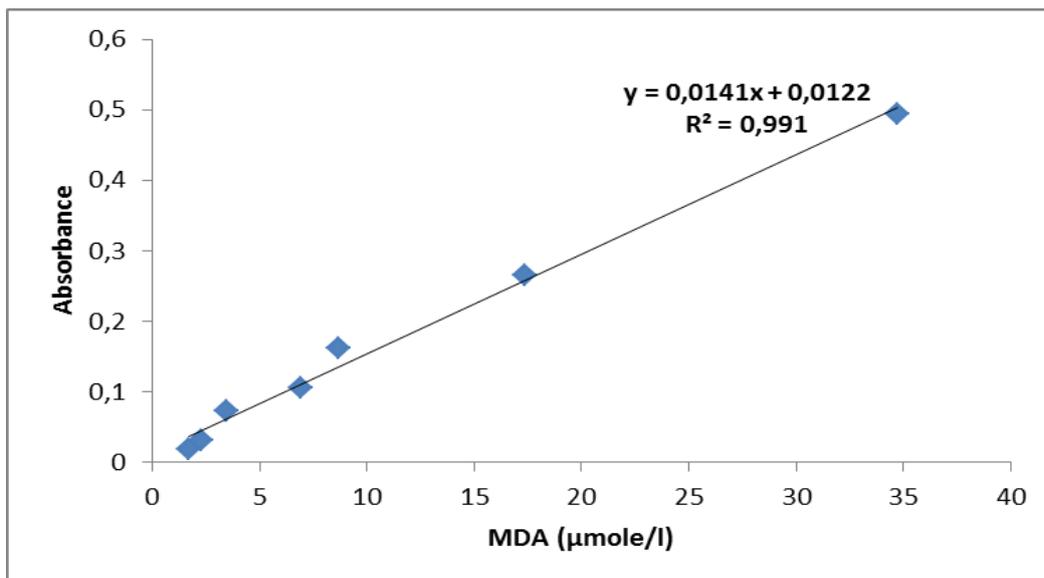


3- Courbe d'étalonnage pour le dosage des proanthocyanidines

Annexe 2 : Courbes d'étalonnage pour le dosage de l'activité antioxydante

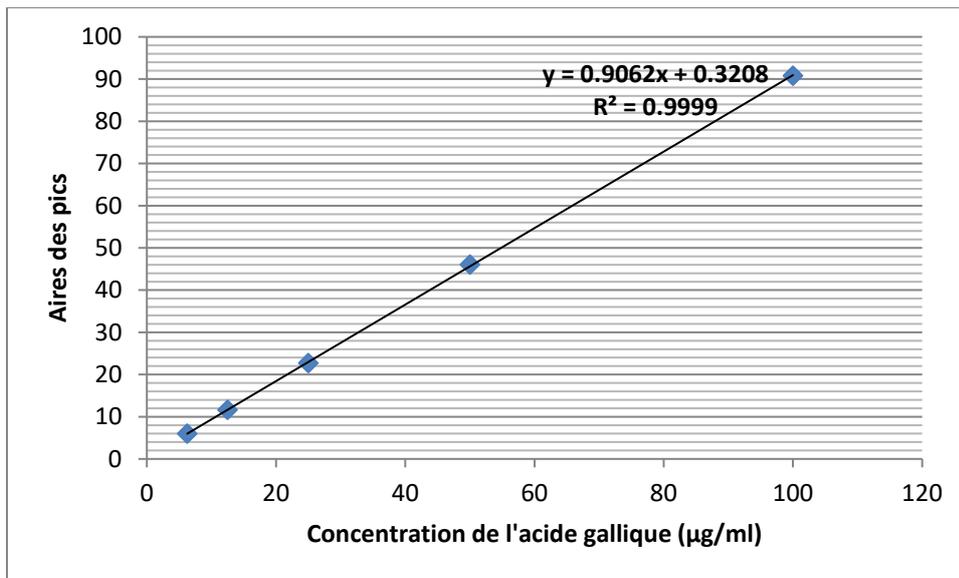


1- Courbe d'étalonnage pour le dosage du FRAP

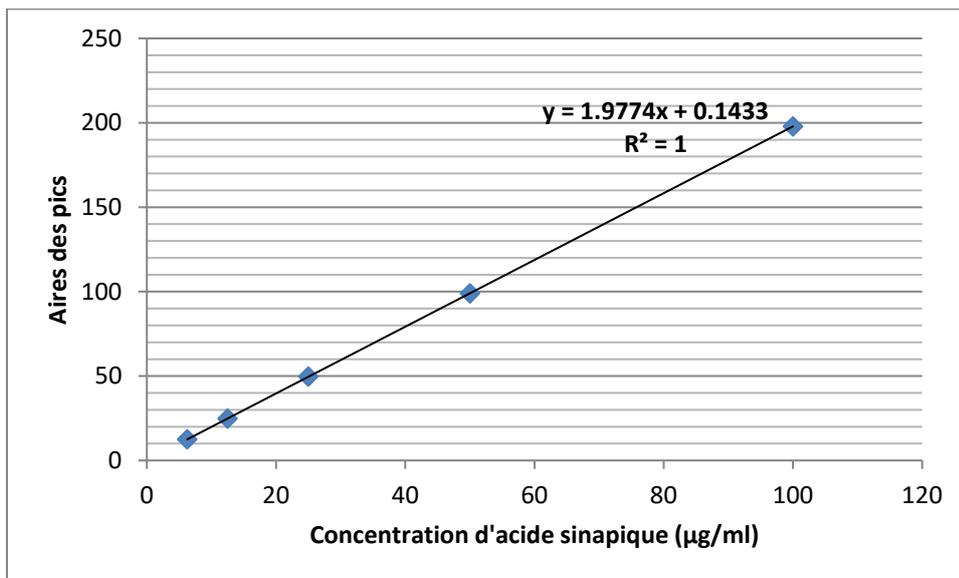


2- Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'MDA

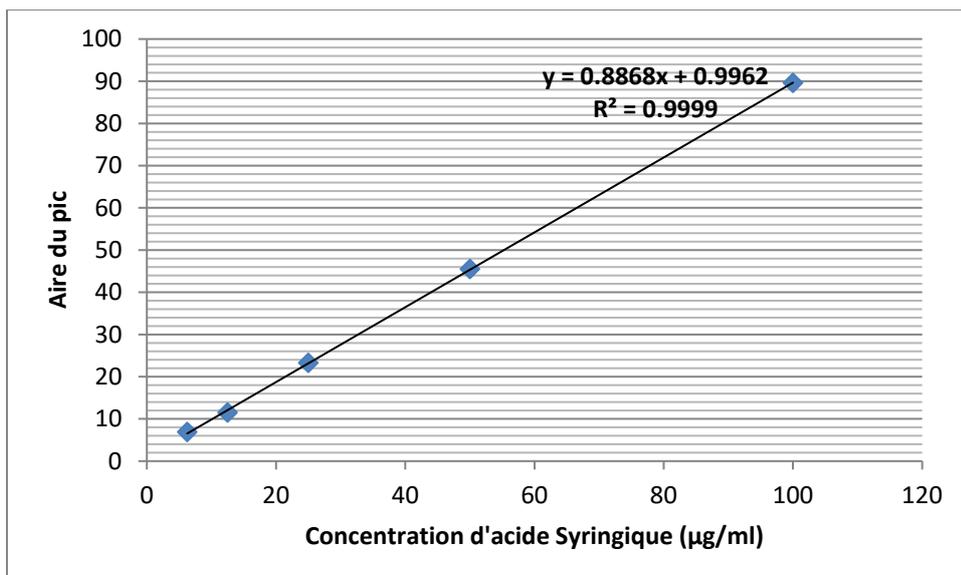
Annexe 3 : Courbes d'atalonnage pour l'analyse phytochimique sur HPLC



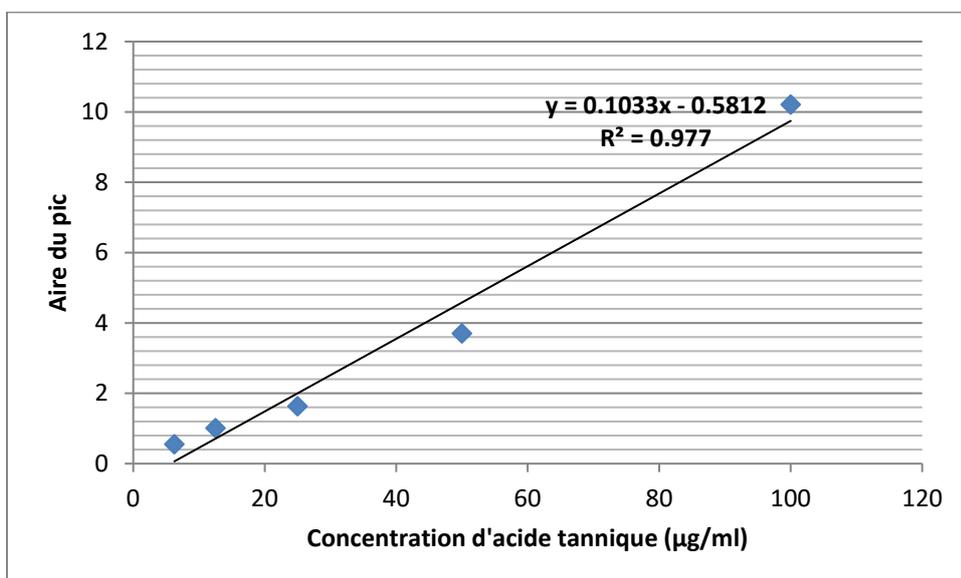
1- Courbe d'étalonnage pour l'acide gallique



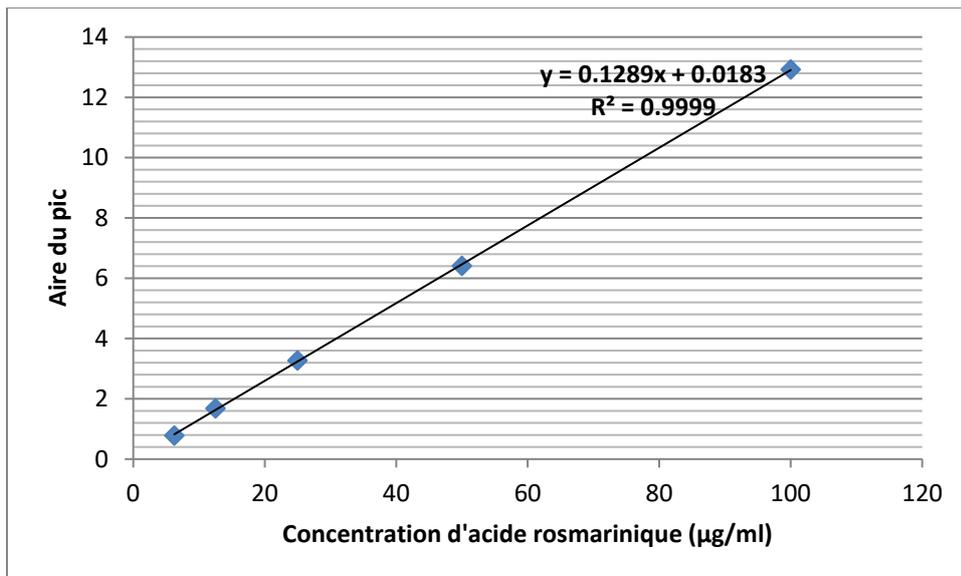
2- Courbe d'étalonnage de l'acide sinapique



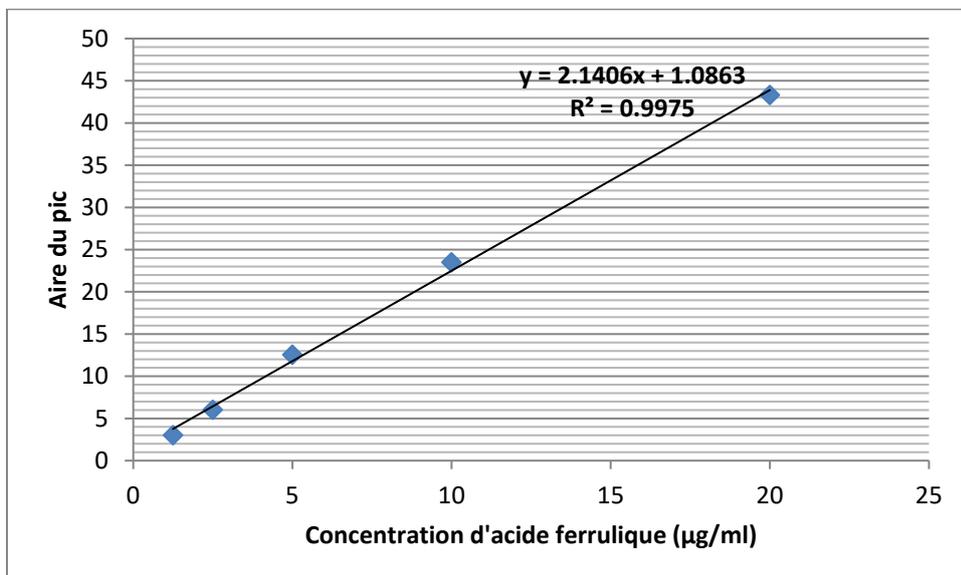
3-Courbe d'étalonnage de l'acide syringique



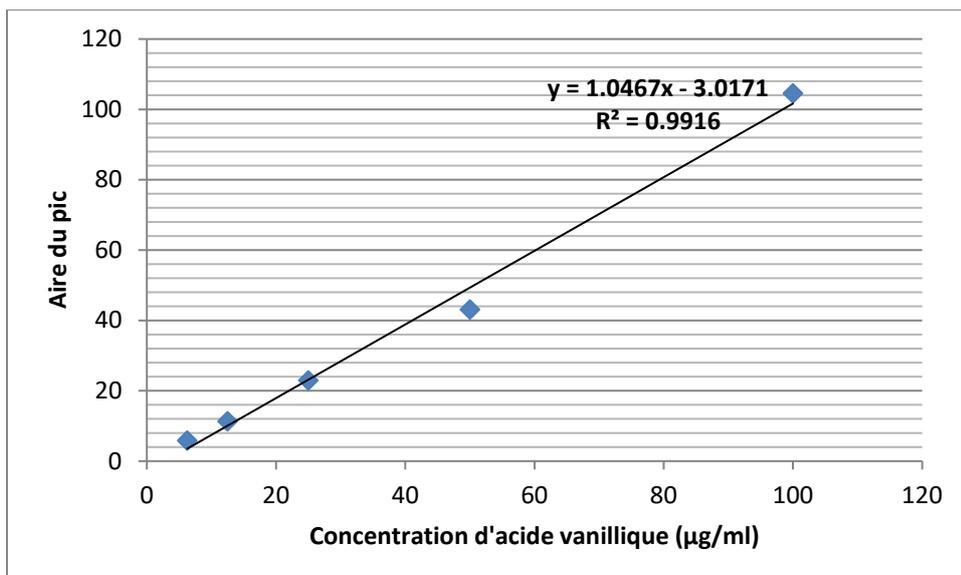
4- Courbe d'étalonnage de l'acide tannique



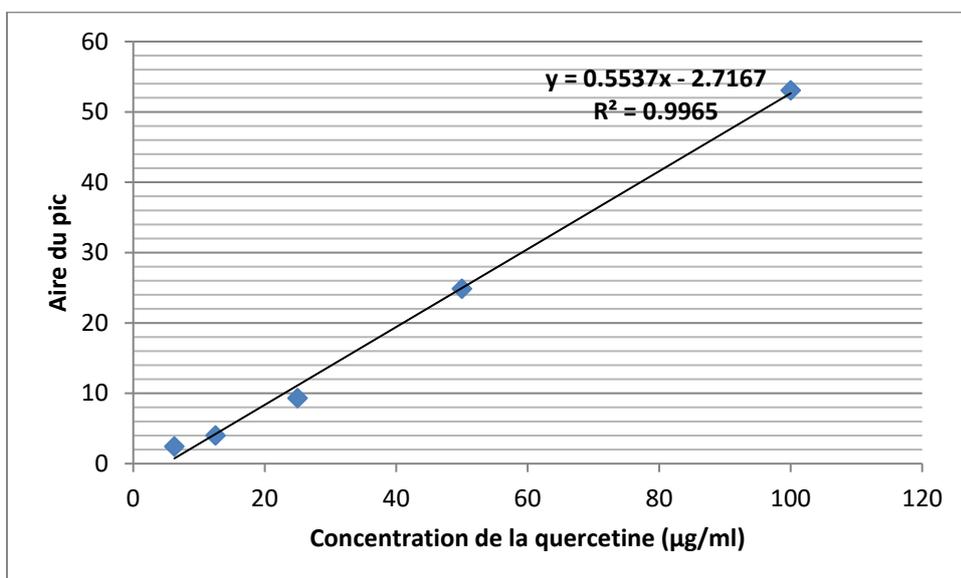
5- Courbe d'étalonnage de l'acide rosmarinique



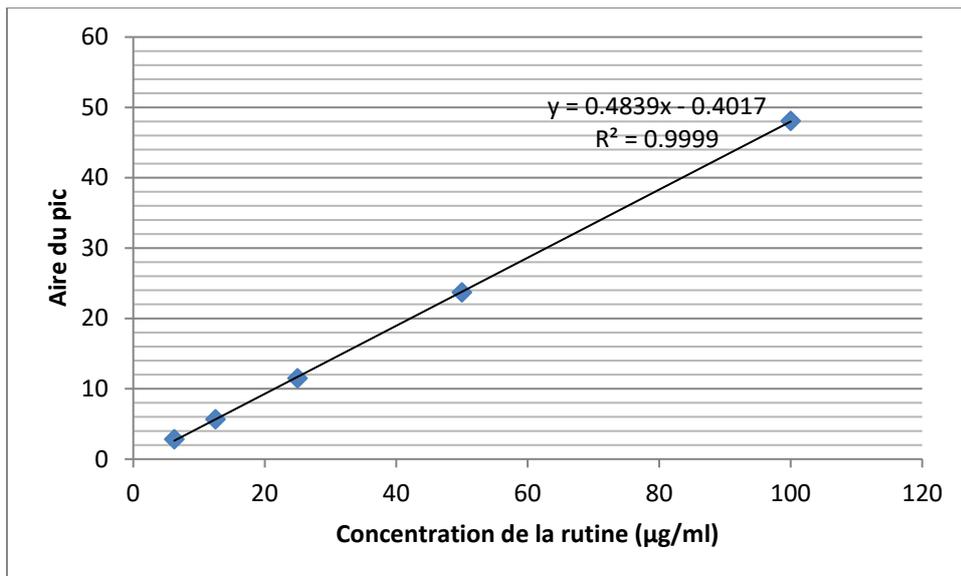
5- Courbe d'étalonnage de l'acide ferrulique



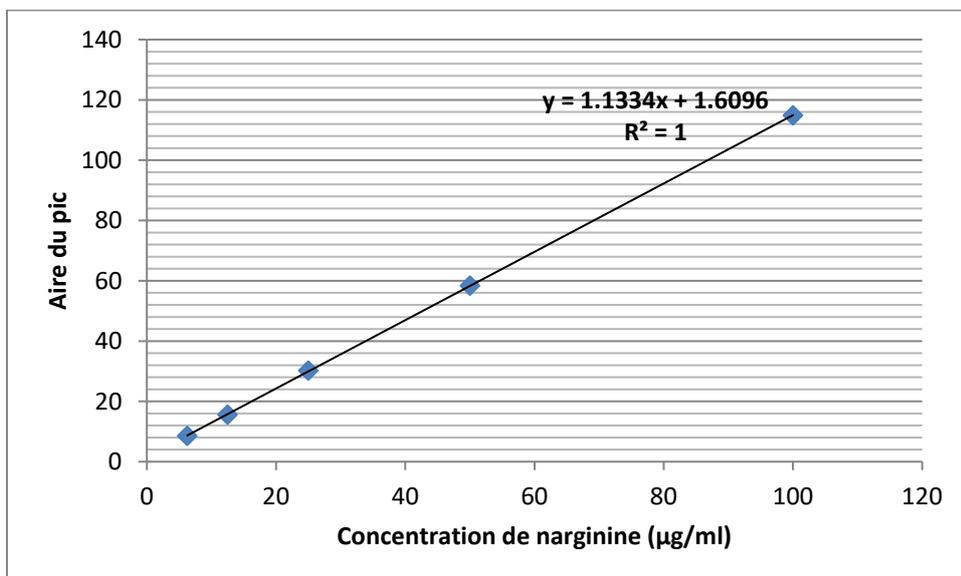
6- Courbe d'étalonnage de l'acide vanillique



7- Courbe d'étalonnage de la quercétine



8- Courbe d'étalonnage de la rutine



9- Courbe d'étalonnage de la narginine

Karima Sayah*, Hanae Naceiri Mrabti, Badia Belarj, Faouzi Kichou, Yahia Cherrah and My El Abbes Faouzi

Evaluation of antidiabetic effect of *Cistus salviifolius* L. (Cistaceae) in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice

<https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0044>

Received March 3, 2020; accepted June 25, 2020;
published online October 5, 2020

Abstract

Objectives: *Cistus salviifolius* L. is a shrub from Cistaceae family used in many traditional medicines for the treatment of various diseases including diabetes mellitus. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* antidiabetic potential of the aerial parts aqueous extract of *Cistus salviifolius* L. (CSA).

Methods: Experimental diabetes was induced in adult male mice by intra-peritoneal injection of Streptozotocin-nicotinamide (STZ-NC). CSA at a dose of 500 mg/kg was administered daily to the diabetic mice for four weeks. The effect of the extract on hyperglycemia, body weight, serum total cholesterol, triglycerides, hepatic and renal functional markers were determined. Histopathological examination of the mice pancreas was also performed. The diabetic animals treated with CSA were compared with animals treated by the standard drug metformin.

Results: Treatment with CSA showed a significant reduction in blood glucose, total triglycerides and creatinine levels and prevented the reduction of body weight caused by diabetes. Furthermore, histopathological analysis of the mice pancreas showed that the group

treated with CSA reduced damage induced by STZ-NC on islets of Langerhans cells when compared to the diabetic control.

Conclusions: The results suggest that the aqueous extract of Moroccan *C. salviifolius* L. possesses beneficial effect on treatment of diabetes.

Keywords: antidiabetic; *Cistus salviifolius*; nicotinamide; streptozotocin.

Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia with alterations of carbohydrate, fat and protein metabolism [1]. According to data reported by Cho et al. [2] approximately 451 million adult people suffered from diabetes in 2017 worldwide. These figures were expected to increase to 693 million by 2045. Type II diabetes includes the majority of diabetic people worldwide (>90%). The causes of type II diabetes are multifactorial and include genetic and environmental factors that influence beta cell function and insulin sensitivity in the tissues [3].

Despite the medical research that advances every day, diabetes mellitus remains a disease that can be prevented and managed successfully but cannot be cured yet and still imposes a heavy economic burden in the world [4].

Medicinal plants have historically proven their value as a source of secondary metabolites with therapeutic potentials, and nowadays represent an attractive pool to discover new effective anti-diabetic drugs [5, 6]. In Morocco, a total of 255 plant species belonging to 70 families were reported as being used in traditional and complementary medicine for the treatment and management of diabetes, among them *Cistus salviifolius* L. [7].

The plants belonging to the *Cistus* genus (Family: Cistaceae) are widespread in different areas of the Mediterranean region in northwest Africa, Portugal, Spain, the Canary Islands, Italy, Greece and Turkey. Traditional folk

*Corresponding author: Karima Sayah, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine and Pharmacy, Biopharmaceutical and Toxicological Analysis Research Team, Mohammed V University in Rabat, Rabat Institute, Rabat, Morocco, Phone: +212 637020220, E-mail: karimasayah31@gmail.com
Hanae Naceiri Mrabti, Yahia Cherrah and My El Abbes Faouzi, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine and Pharmacy, Biopharmaceutical and Toxicological Analysis Research Team, Mohammed V University in Rabat, Rabat Institute, Rabat, Morocco
Badia Belarj, Department Biochemistry, Military Hospital Mohammed V, Rabat, Morocco
Faouzi Kichou, Department of Veterinary Pathology and Public Health, Hassan 2 Institute of Agronomy and Veterinary Medicine, Rabat, Morocco

medicine has used *Cistus* species for a variety of purposes such as antidiarrheic, antiulcerogenic, antispasmodic, anti-inflammatory [8, 9], and antidiabetic remedies [10, 11]. *Cistus* plants were previously reported to contain a variety of natural products such as flavonoids, tanins, and terpenoids [12].

Despite the great scientific interest in *Cistus* genus currently, *C. salvifolius* L. which is among the most abundant species in Morocco, is still poorly investigated. In our previous study, extracts of this plant showed a great ability to prevent oxidative stress that triggers various metabolic disorders, such as diabetes, and they have shown a potent inhibitory effect on key enzymes related to hyperglycemia *in vitro* [13]. To our knowledge there is no previous study of *in vivo* antidiabetic activity of *C. salvifolius* L. This is what led us to evaluate in the present study the antidiabetic effect of this plant extract in STZ-NC induced diabetes in mice.

Materials and methods

Plant materials

C. salvifolius (L.) was collected in April 2015 from Maâmoura forest Salé in Morocco. A voucher specimen's number RAB 1012176 was deposited in the Herbarium of Botany Department of the Scientific Institute of Rabat, Morocco.

Preparation of plant extract

The aqueous extract of the aerial parts of *C. salvifolius* L. (CSA) was prepared by infusion as described by Sayah et al. [14]. A sample of 50 g of aerial parts from dried plant was mixed in 500 mL of boiled distilled water and allowed to cool for 1 h. The extract was then filtered on Whatman paper and the filtrate obtained was evaporated under reduced pressure, using a rotary evaporator.

Animals

Healthy adult Swiss mice (30–34 g) were used in this study. The mice were raised in polypropylene cages in the central animal facility of the Faculty of Medicine and Pharmacy in Rabat, Morocco. All mice were maintained in standard environmental conditions with access to standard diet and water *ad libitum*, in a 12 h light/12 h dark cycle at a temperature of 23±2 °C.

The recommendations described in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health were followed in the experimental procedure. Ethics approval was obtained from the University Mohammed V in Rabat, Morocco.

Diabetes induction and experimental design

Fasting male mice were made diabetic by a single intraperitoneal injection of freshly prepared STZ (200 mg/kg b, wt) in citrate buffer (0.1 M, pH 4.5) 15 min after intraperitoneal administration of nicotinamide (210 mg/kg b, wt) [15]. Because STZ is able to induce fatal hypoglycemia following massive release of pancreatic insulin, the mice received a 5% glucose solution for 24 h. After a week for the development of diabetes, mice who developed glycosuria and moderate hyperglycemia were selected for the experiment.

The mice were divided into four groups of six mice each. Treatment was performed daily for four weeks.

Group I: normal control mice received distilled water;

Group II: diabetic control mice received distilled water;

Group III: diabetic mice administered aqueous extract CSA (500 mg/kg b, wt);

Group IV: diabetic mice received standard drug metformine (300 mg/kg b, wt).

Determination of blood glucose level

Fasting blood samples were taken from the tail vein and glycemia was measured using On Call® Plus glucometer every week during the period of treatment.

Determination of biochemical parameters

After four weeks of treatment, animals were sacrificed and blood samples were collected from all groups in tubes containing heparin and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. Serum was isolated for the estimation of total cholesterol, triglycerides, creatinine, urea, total protein, uric acid, aspartate aminotransferase (ASAT), and alanine aminotransferase (ALAT) using an auto-analyzer "Architect C8000" (Abbott Laboratories).

Histopathology analysis of pancreas

The pancreas was rapidly isolated from the mice, dissected free of fat and preserved in 10% formalin. Slices (2–3 mm) were cut from tissue samples with a surgical blade. The samples were processed using a tissue processor and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were processed with a rotary microtome and stained with hematoxylin and eosin prior to examination under an optical microscope.

Statistical analysis

Results were indicated as the mean ± standard error for each measurement. Statistical significance was analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Post hoc procedure was used for significance of difference (p<0.05). Analysis was performed with Graph Pad Prism v6 software.

Results

Yield of plant extraction

The yield of the aqueous extraction, expressed as a percentage relative to the weight of the dry plant material before extraction is 17.40%.

Changes in body weight

During the experimental period, the body weight of diabetic mice was significantly lower than that of non-diabetic mice. Extract administration decreased significantly the reduction of body weight in diabetic mice (Figure 1).

Blood glucose level

Table 1 depict the levels of fasting blood glucose in the control and experimental mice. Oral administration of CSA at a dose of 500 mg/kg significantly reduced blood glucose level in diabetic mice compared to the diabetic control group. This effect started at the 1st week of treatment and continued till the end of the 4th week and recorded 56.27%. The effect was comparable to the standard drug metformin (59.38%).

Effect on lipid profile

Table 2 shows the levels of serum triglycerides and total cholesterol, of the control and experimental groups of mice. The STZ-NC diabetic mice showed significant ($p < 0.05$) increase in the level of serum triglyceride compared to the normal control group, while, there is no significant increase in the serum total cholesterol level in this study. Treatment with CSA resulted in significant

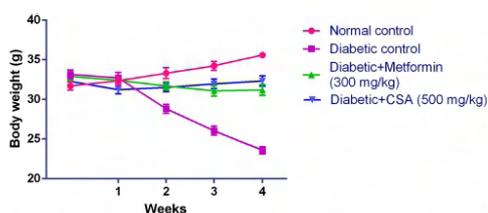


Figure 1: Effect of daily oral administration of *C. salvifolius* (L.) aqueous extract (CSA) on body weight in STZ-NC induced diabetic mice.

decrease in total triglyceride level compared to untreated diabetic group. Moreover, no significant differences were found between CSA treated group and the group treated by metformin.

All values are represented as means of six experiments \pm Standard error. Values in the same column not sharing a common letter (a to b) differ significantly at $p < 0.05$.

Effect on liver and renal markers

The results are shown in Table 3. A significant increase in the serum creatinine levels was observed in diabetic mice compared to the normal control group. Like metformin, CSA significantly decreased the level of creatinin in comparison to the diabetic control group. Serum urea, uric acid and total protein of the diabetic mice used in this study were not significantly different from those of the normal control group. The level of ASAT and ALAT was significantly increased in diabetic control group when compared to normal control group ($p < 0.05$). Diabetic mice treated with CSA (500 mg/kg body weight) was slightly diminished the serum level of ASAT and ALAT but not significantly when compared to the diabetic control ($p < 0.05$). The group treated with Metformin (300 mg/kg) was slightly diminished the serum level of ASAT and decreased significantly the serum level of ALAT.

Histopathology result

Histopathology of the pancreas of normal control, diabetic control (STZ+NA), metformin (300 mg/kg), and CSA (500 mg/kg) treated groups are shown in Figure 2. The microscopic examination revealed that the pancreas of normal control group showed normal pancreatic acini and normal interacini and interlobular spaces and the Islets of Langerhans (LI) with normal number of cells uniformly and evenly distributed within the islet. While, in the pancreas of diabetic control, LI have marked hypercellularity and a disorganized cellular distribution. Cell nuclei were round and oval with a relatively larger size and showed a clear and vacuolar appearance, also, the intercellular matrix was reduced. The pancreas tissues of animals treated with metformin have similar changes to those described for the pancreas of untreated diabetic mice; its cell nuclei were round and oval, but moderately larger. Treatment with CSA was moderately reduced the severity of the histopathologic changes with less loss of cells in islets of Langerhans when compared to the diabetic control group.

Table 1: Effect of the aqueous extract of *C. salvifolius* (CSA) on fasting blood glucose level in STZ- NA induces diabetic mice.

Groups	Blood glucose level (mg/dL)				
	Before treatment	1st week	2nd week	3rd week	After treatment 4th week
Normal control	99.33±2.82 ^a	97.16±1.66 ^a	100.16±2.67 ^a	101.66±2.21 ^a	103.83±1.66 ^a
Diabetic control	203.33±12.55 ^b	305.83±11.20 ^d	336.00±11.48 ^c	308.50±13.33 ^c	291.33±6.39 ^b
Metformin (300 mg/kg)	253.16±12.03 ^b	169.00±17.04 ^{c,b} (33.24%)	157.50±6.88 ^b (37.78%)	146.66±10.95 ^b (42.06%)	102.83±7.11 ^a (59.38%)
CSA (500 mg/kg)	245.83±10.73 ^b	158.50±9.00 ^c (35.52%)	150.83±7.21 ^b (38.64%)	118.66±2.41 ^a (51.73%)	107.50±3.80 ^a (56.27%)

The values are the mean of six experiments±Standard Error. Values in the same column not sharing a common letter (a–c) differ significantly at $p \leq 0.05$.

Table 2: Effect of aqueous extract of *C. salvifolius* (CSA) on serum lipid profile in STZ- NA induces diabetic mice.

Groups	Triglycerides (g/L)	Total cholesterol (g/L)
Normal control	0.59±0.02 ^a	1.03±0.07 ^b
Diabetic control	1.28±0.06 ^b	1.09±0.05 ^b
Metformin (300 mg/kg)	0.89±0.14 ^{a,b}	1.06±0.06 ^b
CSA (500 mg/kg)	0.52±0.13 ^a	0.85±0.11 ^a

All values are represented as means of six experiments ± Standard error. Values in the same column not sharing a common letter (a to b) differ significantly at $p \leq 0.05$.

Discussion

The present study was undertaken to evaluate the antidiabetic effect of CSA in STZ-NC induced diabetic mice. The association between STZ and nicotinamide is increasingly being used to induce diabetes mellitus in experimental animals that is similar to non-obese type II diabetes in humans [16, 17]. The stable moderate hyperglycemia recorded in mice during the present experiments confirms the type II diabetic status of the animals used in this study.

According to the oral toxicity study of CSA in mice conducted as described in the 423 guidelines of the Organization of Economic Co-operation and Development

(OECD), the present study was conducted at a dose of 500 mg/kg b, wt, since CSA did not show any mortality or adverse events up to 2 g/kg b, wt.

In this study we have used metformin as positive control, it is a biguanide antidiabetic medication that acts directly or indirectly on the liver to lower glucose production, and has also been shown to be an insulin sensitizer and to likely act in the gut lumen through multiple mechanisms [18, 19]. Oral administration of CSA (500 mg/kg b, wt) and metformin (300 mg/kg b, wt) to the diabetic mice demonstrated a significant reduction in hyperglycemia compared to diabetic control mice. This effect is may be due to a decrease on hepatic glucose production or an increase on insulin secretion from β -cells since CSA was reduced damage induced by STZ-NC on islets of Langerhans cells. In addition, the treated groups showed a significant improvement in body weight, indicating that CSA can prevent muscle wasting induced by hyperglycemia, which is one of the characteristics observed in STZ-induced diabetes [20].

Abnormally high concentrations of plasma lipids, including triglycerides, are complications that are frequently observed in the case of type II diabetes mellitus and contribute to the development of fatal cardiovascular diseases [21]. Administration of CSA to diabetic mice

Table 3: Effect of *C. salvifolius* aqueous extract (CSA) on renal and liver markers in STZ- NA induces diabetic mice.

Groups	Renal markers				Liver markers	
	Creatinine (mg/L)	Urea (g/L)	Uric acid (mg/L)	Total protein (g/L)	ASAT (UI/l)	ALAT (UI/l)
Normal control	3.83±0.16 ^a	0.28±0.02 ^a	26.00±2.19 ^a	62.33±3.36 ^a	137.16±11.58 ^a	40.66±2.45 ^a
Diabetic control	4.66±0.21 ^b	0.32±0.02 ^a	26.60±1.37 ^a	57.16±2.67 ^a	389.66±58.14 ^b	315.00±49.03 ^c
Metformin (300 mg/kg)	3.66±0.21 ^a	0.30±0.03 ^a	30.00±2.23 ^a	55.16±1.92 ^a	283.16±22.40 ^c	50.66±3.27 ^a
CSA (500 mg/kg)	3.83±0.40 ^a	0.21±0.08 ^a	34.00±4.97	56.66±8.52 ^a	383.33±28.76 ^b	301.33±39.76 ^c

The values are the mean of six experiments±Standard Error. Values in the same column not sharing a common letter (a to c) differ significantly at $p \leq 0.05$.

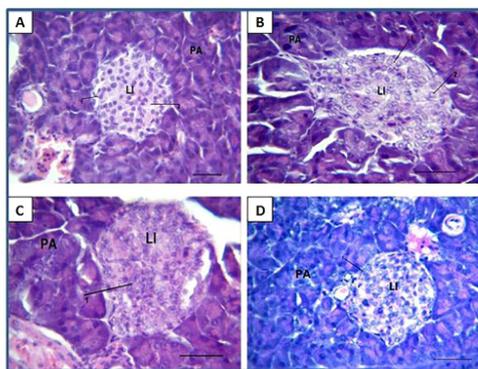


Figure 2: Histopathological examination of the pancreas. PA: Pancreatic Acini. LI: Islets of Langerhans. Pancreas of normal mice (A), LI was normal and showed a normal number of cells uniformly and evenly distributed within the islet (arrow1) and spaced from each other by indistinct, homogenous, and amorphous cell cytoplasm and borders (arrow2). Cell nuclei were round and medium-sized with sufficient finely granular chromatin. Pancreas of non treated diabetic mice (B), LI have marked hyper-cellularity and disorganized cell distribution with cells arranged and packed as cell aggregates (arrow1). Cell nuclei were round and oval with a relatively increased in size and showed a clear and vacuolar aspect (arrow2). Pancreas of mice treated by methformin (C), LI has a marked hypercellularity and disorganized cell distribution with cells arranged and packed as cell aggregates (arrow1). Pancreas of mice treated by the aqueous extract of *C. salvifolius* (CSA) (D), LI has a less marked hypercellularity in comparison to the diabetic control and the cells are uniformly distributed within the islet (arrow1).

showed a significant reduction in serum triglyceride levels. The marked increase in serum triglycerides observed in untreated diabetic mice is collectively correlated with hyperglycemia, insulin resistance, hyperinsulinemia, abdominal predisposition of visceral adipose, increased hepatic fat content and disordered fatty acids metabolism [22].

There was a significant elevation in serum creatinine levels in diabetic control compared to the normal control group, whereas in this study there is no significant increase in serum concentrations of urea, uric acid and total proteins. STZ-NC is not specific to induce nephrotoxicity and all changes in the renal function after STZ-NC administration in mice can thus be attributed to altered metabolism in diabetes and its duration and severity.

Creatinine is a non-protein nitrogenous compound that is produced by the breakdown of creatine in muscle. It is considered more specific marker of the kidney, since renal damage is the only significant factor that increases the serum creatinine level [23, 24]; while urea, uric acid and

proteins formation is influenced by a number of factors such as liver function, rate of proteins catabolism, and hydration. Treatment with CSA significantly decreased serum creatinine concentration in diabetic mice at normal levels. This indicates an improvement in the ability of renal excretion of creatinine and demonstrates the possible role of this herbal extract in improving renal function.

Our finding is in accordance with the results of El Kabbaoui et al. [25] which have been reported the *in vivo* antihyperglycemic and hypolipidemic properties of the aqueous extract of Moroccan *C. ladaniferus* (L.). Many studies have revealed that polyphenolic compounds from medicinal plants have a potent antidiabetic effect [26]. Inhibition of carbohydrates digestion, decrease in intestinal glucose absorption, reduction of oxidative stress, stimulation of insulin secretion, inhibition of tissue gluconeogenesis, activation of insulin receptors and glucose uptake in insulin-sensitive tissues are some of the mechanisms in which phenolic compounds are involved [27–29]. Danne et al. [30] were identified in *C. salvifolius* several phenolic compounds, Catechin, epicatechin, gallic acid, and epigallocatechin and their derivatives. Also, several flavonoids were isolated from this plant including myricetin, quercetin, kaempferol and their glycosylated derivatives [31]. In our previous study CSA has showed high contents of polyphenolic compounds and exhibited potent antioxidant activity and inhibitory potential on α -amylase and α -glucosidase enzymes [13], suggesting that the *in vivo* antidiabetic action of our extract may be mediated by inhibiting the sugar digestive enzymes and reducing oxidative stress due to its high contents of polyphenolic compounds.

Conclusions

In conclusion, the present findings demonstrated that the CSA exhibits significant antihyperglycemic activities in STZ-NA induced diabetic mice. This plant extract also showed improvement in total triglycerides and creatinine level and prevented the reduction of body weight caused by diabetes. Furthermore, CSA reduced damage induced by STZ-NC on islets of Langerhans cells when compared to the diabetic control. Therefore, CSA may be effective therapeutic agents for the control of hyperglycemia and would be promising for further clinical studies which can open new perspectives in the therapy of type II diabetes.

Acknowledgments: The authors are thankful to Pr. Soufiane Derraji (Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat,

Morocco) and Dr. Zohra Ouzzif (Biochemistry Department, Military Hospital Mohammed V, Rabat, Morocco) for their support in biochemical analysis, and to Dr. Ilias Marmouzi (Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat, Morocco) for his assistance in the laboratory. We are also thankful to Pr. Halim Khamar (Botanical Department of the Scientific Institute of Rabat, Morocco) for plant authentication.

Research funding: None declared.

Author contributions: All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

Competing interests: Authors state no conflict of interest.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individuals included in this study.

Ethical approval: The recommendations described in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health were followed in the experimental procedure. Ethics approval was obtained from the University Mohammed V in Rabat, Morocco.

References

- Alberti KGMM, Zimmet PF. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabet Med* 1998 Jul;15:539–53.
- Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 138: 271–81.
- Scheen AJ. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg* 2003;58: 335–41. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539–553.
- Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med* 2010; 362: 1090–101.
- Thanh HN, Huyen NT, Van Khanh N, Thu DK, Tung BT. Phytochemicals and antidiabetic activity of the aqueous extract of the Punica granatum fruit in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2019;30. doi:https://doi.org/10.1515/jbcp-2019-0061.
- Akuodor GC, Eban LK, Ajoku GA, Nwobodo NN, Akpan JL, Ezeokpo BC, et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of ethanol extract of *Salacia lehmabachii* stem bark in alloxan-induced diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2018; 30: 239–44.
- Idm'hand E, Msanda F, Cherifi K. Ethnopharmacological review of medicinal plants used to manage diabetes in Morocco. *Clin Phytosci* 2020; 6: 1–32.
- Attaguile G, Peticone G, Mania G, Savoca F, Pennisi G, Salomone S. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 245–50.
- Zidane H, Aouniti F, Tahani A, Fauconnier ML, Elbachiri A. Screening of mineral elements in *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* essential oils and their leaves. *Orient J Chem* 2014; 29: 1319–24.
- Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A. Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes Metabol* 2002; 10: 33–50.
- Polat R, Satl F. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey). *J Ethnopharmacol* 2012; 139: 626–41.
- Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis AK. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem* 2014; 2: 35.
- Sayah K, Marmouzi I, Naceiri Mrabti H, Cherrah Y, Faouzi MEA. Antioxidant activity and inhibitory potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *BioMed Res Int* 2017a;2017: 1–7.
- Sayah K, Chemlal L, Marmouzi I, El Jemli M, Cherrah Y, Faouzi MEA. In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts. *South Afr J Bot* 017b;113:160–3.
- Badole SL, Bodhankar SL. Antidiabetic activity of cycloart-23-ene-3 β , 25-diol (B2) isolated from *Pongamia pinnata* (L. Pierre) in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2010; 632: 103–9.
- Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin–nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 598–605.
- Matsuyama-Yokono A, Tahara A, Nakano R, Someya Y, Hayakawa M, Shibasaki M. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-IV with ASP8497 improved the HbA1c level, glucose intolerance, and lipid parameter level in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2009; 379: 191.
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017; 60: 1577–85.
- Flory J, Lipska K. Metformin in 2019. *Jama* 2019; 321: 1926–7.
- Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* 1990; 33: 462–4.
- Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1496–504.
- Pang J, Chan DC, Watts GF. Origin and therapy for hypertriglyceridaemia in type 2 diabetes. *World J Diabetes* 2014; 5: 165.
- Ahangarpour A, Oroojan AA, Khorsandi L, Shabani R, Mojaddami S. Preventive effects of betulinic acid on streptozotocin nicotinamide induced diabetic nephropathy in male mouse. *J Nephropathol* 2016; 5: 128.

24. Al-Attar AM, Alsalmi FA. Influence of olive leaves extract on hepatorenal injury in streptozotocin diabetic rats. *Saudi J Biol Sci* 2019; 26: 1865–74.
25. El Kabbaoui M, Chda A, Azdad O, Mejrhit N, Aarab L, Bencheikh R, et al. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6: 1044–9.
26. Munhoz A, Frode TS. Isolated compounds from natural products with potential antidiabetic activity-A systematic review. *Curr Diabetes Rev* 2018; 14: 36–106.
27. Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutr Metab* 2015; 12: 60.
28. Aryaeian N, Sara KS, Tahereh A. Polyphenols and their effects on diabetes management: a review. *Med J Islam Repub Iran* 2017; 31: 134.
29. Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomed Pharmacother* 2017; 96: 305–12.
30. Danne A, Peterleit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salviifolius*. *Phytochemistry* 1994; 37: 533–8.
31. Gürbüz P, Demirezer LÖ, Güvenalp Z, Kuruüzüm-Uz A, Kazaz C. Isolation and structure elucidation of uncommon secondary metabolites from *Cistus salviifolius* L. *Record Nat Prod* 2015; 9: 175.

Research Article

Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia

Karima Sayah, Ilias Marmouzi, Hanae Nacciri Mrabti, Yahia Cherrah, and My El Abbas Faouzi

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, l'Équipe de Pharmacocinétique, Mohammed V University in Rabat, BP 6203, Rabat Instituts, Rabat, Morocco

Correspondence should be addressed to Karima Sayah; karimasayah31@gmail.com

Received 21 August 2016; Revised 20 November 2016; Accepted 12 December 2016; Published 2 January 2017

Academic Editor: Paula I. Moreira

Copyright © 2017 Karima Sayah et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cistus genus (Cistaceae) comprises several medicinal plants used in traditional medicines to treat several pathological conditions including hyperglycemia. These include *Cistus salviifolius* L. (CS) and *Cistus monspeliensis* L. (CM), still not fully explored as a source of metabolites with therapeutic potential for human diseases. In this study, the antioxidant α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibitory effects of aqueous and hydromethanolic extracts from the aerial parts of Moroccan CS and CM were investigated. Antioxidant activity has been assessed using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radicals and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) methods. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity has been assessed using an in vitro model. Moreover, mineral and phenolic contents of CS and CM were analyzed. The extracts of both species exhibited potent antioxidant activity in all used systems and possess strong inhibitory effect towards α -glucosidase (IC_{50} : 0.95 ± 0.14 to $14.58 \pm 1.26 \mu\text{g/mL}$) and significant inhibitory potential against α -amylase (IC_{50} : 217.10 ± 0.15 to $886.10 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$). Furthermore, the result showed high levels of phenolic content and unexpectedly some higher levels of mineral content in CS. The results suggest that the phenolic rich extracts of CS and CM may have a therapeutic potential against diseases associated with oxidative stress and may be useful in the management of hyperglycemia in diabetic patients.

1. Introduction

Plants have been the basis for medical treatments through much of the human history. Nowadays, researchers are increasingly interested in medicinal plants as alternative medicine, due to their good pharmacological properties, fewer side effects, and low cost. The genus *Cistus* L. (Cistaceae) comprises many interesting medicinal plants, distributed primarily in the Mediterranean region. Among them, twelve species are members of Moroccan flora [1]. *Cistus* species are frequently used in traditional medicines for the treatment of hyperglycemia and diabetes [2, 3], peptic ulcers, and diarrhea and also as general remedies for several skin diseases and as anti-inflammatory and antispasmodic agents [4]. Furthermore, phytochemical studies on different *Cistus* species have revealed the presence of several phenolic

compounds mainly flavonoids and tannins [5–9]. Those compounds are generally involved in many biological activities, essentially in oxidative stress prevention.

Diabetes mellitus is a serious chronic metabolic disorder that causes serious health complications and is a major cause of mortality [10]. Excessive postprandial glucose excursions are a known risk factor for developing diabetes [11]. One interesting approach for limiting the excursion is to inhibit the activity of digestive enzymes of glucose production such as α -amylase and α -glucosidase [12].

Despite the great scientific interest in *Cistus* genus currently, *C. salviifolius* L. and *C. monspeliensis* L., which are among the most abundant species in Morocco, remain undiscovered and underinvestigated. To the best of our knowledge, there are no previous reports of any in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects and antioxidant

activities of Moroccan *C. salvifolius* L. and *C. monspeliensis* L. Therefore, the objective of this study was to evaluate the in vitro antioxidant α -amylase and α -glucosidase inhibitory potentials of aqueous and hydromethanolic extracts of both species.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents. *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*NPG), α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, α -amylase from *Bacillus licheniformis*, acarbose, Folin-Ciocalteu reagent, rutin, catechin, DPPH, ABTS, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), butylated hydroxytoluene (BHT), and ascorbic acid were purchased from Sigma-Aldrich (France). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Plant Material. *Cistus salvifolius* L. and *Cistus monspeliensis* L. were collected in April 2015 from Maâmoura Forest, Salé (CS), and Maaziz-Khémisset (CM) in Morocco. Voucher specimens "RAB 1012176" and "RAB 1012177" for CS and CM, respectively, were deposited in the Herbarium of Botany Department of the Scientific Institute of Rabat, Morocco. The aerial parts were cleaned and dried in the shade at room temperature until reaching a constant weight and were then powdered and used for further investigation.

2.3. Preparation of Plant Extracts. For hydromethanolic extract preparation (hydromethanolic extract of *Cistus salvifolius* (CSM) and hydromethanolic extract of *Cistus monspeliensis* (CMM)), 50 g of dried sample was extracted with 500 mL of 80% aqueous methanol at room temperature and under mechanical stirring for 24 hours. Aqueous extracts of *Cistus salvifolius* (CSA) and of *Cistus monspeliensis* (CMA) were prepared with the same ratio in boiling water and allowed to cool for one hour. The extracts were then filtered on Whatman paper and the filtrate obtained was evaporated under reduced pressure, using a rotary evaporator.

2.4. Mineral Analysis. CS and CM mineral composition (Ca, Cu, Mg, Fe, K, Mg, Na, P, and Zn) was determined using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP AES, Jobin Yvon Ultima 2) as previously described [13]. Briefly, 150 mg of the aerial parts powder was etched with 2 mL of HNO₃ acid (70%) mixture in a teflon beaker, before being incinerated at 110°C. Then, 0.5 mL of hydrofluoric acid (HF) was added and the covered beaker was placed on a sand bath. The sample mixture was heated until a clear solution was obtained. After removing the cover, the mixture was evaporated until drying. Finally, 2 mL of HCl acid was added and the residue was extracted by 25 mL of 2.0 M HCl.

2.5. Determination of Total Phenolic Content. Total phenolic content of aqueous and hydromethanolic extracts of CS and CM was determined by the method described by Spanos and Wrolstad [14] and modified by Lister and Wilson [15] using Folin-Ciocalteu reagent. The 0.5 mL of sample solution was mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (previously

diluted with distilled water 1:10 v/v) and 4 mL of sodium carbonate (7.5% w/v). The mixture is then incubated in a water bath at 45°C for 30 min. The absorbance against blank was determined at 765 nm using a UV-Vis spectrophotometer. Gallic acid (0.487–31.25 μ g/mL) was used to perform the standard curve. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of extract dry weight (mg GAE/g edw).

2.6. Determination of Total Flavonoid Content. The total flavonoid content was determined according to the method described by Dewanto et al. [16]. Briefly, 1 mL of dissolved sample was placed in a 10 mL volumetric flask. Distilled water was added to make the volume reach 7.4 mL and then 0.3 mL of NaNO₂ (5%) was added. 0.3 mL of AlCl₃ (10% w/v) was added 5 min later. After 6 min, 2 mL of 1 M NaOH was added and the solution was mixed well and allowed to stand for 30 min. The absorbance was recorded against a blank at 510 nm. Rutin (50–400 μ g/mL) was used as a standard for constructing the calibration curve. The flavonoid content was expressed as rutin equivalent per gram of extract dry weight (mg RE/g edw).

2.7. Determination of Proanthocyanidin Content. The procedure reported by Julkunen-Tiitto [17] was used to determine the proanthocyanidin content in our extracts. Aliquots of 50 μ L of the extract were mixed with 1.5 mL of 4% vanillin solution (prepared with methanol) and then 750 μ L of concentrated HCl was added. The well mixed solution was incubated at ambient temperature in the dark for 20 min. (+)-Catechin (50 μ g–1000 μ g/mL) was used to make the standard curve, and the results were expressed as catechin equivalent per gram of extract dry weight (mg CE/g edw).

2.8. Antioxidant Activities

2.8.1. DPPH Radical Scavenging Activity Assay. Radical scavenging activity of the extracts was measured using the stable radical DPPH by Huang et al. [18]. A solution of DPPH (0.2 mM) was prepared, and 0.5 mL of this solution was mixed with 2.5 mL of the extracts (1.33–1.66 μ g/mL). The reaction mixture was vortexed thoroughly and left in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance of the mixture was measured at 517 nm in a spectrophotometer. Lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity. The BHT (0.48–4.76 μ g/mL) was used as reference compound. The capability to scavenge the DPPH radical was calculated using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100, \quad (1)$$

where A_0 is the absorbance of the control reaction and A_1 is the absorbance of the sample solution or standard, and the experiment was carried out in triplicate. Scavenging activity in this assay was expressed as IC₅₀, which represents the concentration of the extract required to inhibit 50% of the free radical scavenging activity.

2.8.2. ABTS Radical Scavenging Assay. The ability of our extracts to scavenge the ABTS radical was determined according to the previously described method [19]. A solution of ABTS radical cation (ABTS^{•+}) was prepared by the reaction between 10 mL of 2 mM ABTS in H₂O and 100 μL of 70 mM potassium persulphate at room temperature in the dark for 24 h. The ABTS^{•+} solution was then diluted with methanol to obtain absorbance of 0.70 at 734 nm. Samples were prepared in triplicate by diluting 200 μL of extracts in 2 mL of the ABTS^{•+} solution diluted with methanol and allowed to react for 1 min. The absorbance was recorded on a spectrophotometer at 734 nm. The antioxidant activities of samples were expressed as TEAC values, defined as the concentration of standard Trolox with the same antioxidant capacity of the extract under investigation. The results were represented as Trolox equivalent per gram of extract dry weight (mg TE/edw).

2.8.3. Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay. The reducing power was assayed as previously described [20] with some modifications. In brief, the extract (1 mL) was mixed with 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of 1% potassium ferricyanide. The mixture was then incubated at 50°C for 20 min. Then, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Finally, 2.5 mL of the supernatant was mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL FeCl₃ solution (0.1%, w/v). The absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance values indicate a higher reducing power. The results were expressed as ascorbic acid equivalent per gram of extract dry weight (mg AAE/g edw).

2.9. α-Amylase Inhibitory Assay. The α-amylase inhibitory potentials were investigated by reacting different concentrations of the extracts with α-amylase enzyme and starch solution, according to the previously described method [21] with slight modifications. A mixture of 250 μL of samples and 250 μL of 0.02 M sodium phosphate buffer (pH = 6.9) containing the enzyme α-amylase (240 U/mL) was incubated at 37°C for 20 min. Then, 250 μL of 1% starch solution in 0.02 M sodium phosphate buffer (pH = 6.9) was added to the reacting mixture. Therefore, the reaction mixture was incubated at 37°C for 15 min. Thereafter, 1 mL of dinitrosalicylic acid (DNS) was added, and the reaction mixture was incubated in a boiling water bath for 10 min. Then, the reaction mixture was diluted by adding 2 mL of distilled water, and absorbance was measured at 540 nm in the spectrophotometer. Acarbose was used as positive control.

The results were expressed as percentage inhibition and calculated using the following formula:

$$\text{inhibition (\%)} = \left[\frac{(A_c - A_{cb}) - (A_s - A_{sb})}{(A_c - A_{cb})} \right] \times 100, \quad (2)$$

where A_c refers to the absorbance of control (enzyme and buffer); A_{cb} refers to the absorbance of control blank (buffer without enzyme); A_s refers to the absorbance of sample (enzyme and inhibitor); and A_{sb} is the absorbance of sample blank (inhibitor without enzyme). Moreover, IC₅₀ values

TABLE I: Mineral composition of *Cistus* expressed as mg/kg.

Minerals	<i>Cistus salvifolius</i>	<i>Cistus monspeliensis</i>
Ca	3684.32 ± 30.21 ^b	475.32 ± 5.13 ^a
Cu	84.00 ± 9.95 ^b	17.68 ± 0.19 ^a
Fe	2.95 ± 0.17 ^a	29.16 ± 1.17 ^b
K	287.84 ± 3.13 ^b	27.87 ± 0.90 ^a
Mg	785.27 ± 14.44 ^b	95.78 ± 0.93 ^a
Na	175.97 ± 1.93 ^b	25.97 ± 0.27 ^a
P	275.26 ± 5.64 ^b	204.75 ± 4.13 ^a
Zn	5.90 ± 0.30 ^a	17.48 ± 0.35 ^a

Data are reported as mean ($n = 3$) ± standard error.

Values in the same row not sharing a common letter (a and b) differ significantly at $p < 0.05$.

(concentration of inhibitor required to inhibit 50% of enzyme activity) were determined.

2.10. α-Glucosidase Inhibitory Assay. The α-glucosidase inhibitory activity of the extracts was determined using the substrate pNPG according to the method described by Kee et al. [22], with some modification. Briefly, a mixture of 150 μL of the samples and 100 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH = 6.7) containing the enzyme α-glucosidase solution (0.1 U/mL) was incubated at 37°C for 10 min. After preincubation, 200 μL of 1 mM pNPG solution in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH = 6.7) was added. The reaction mixtures were incubated at 37°C for 30 min. After incubation, 1 mL of 0.1 M of Na₂CO₃ was added and the absorbance was recorded at 405 nm using the spectrophotometer.

The α-glucosidase inhibitory activity was expressed as percentage inhibition, and the IC₅₀ values were determined. Acarbose was used as positive control.

2.11. Statistical Analysis. Data were indicated as the mean ± standard error. The data were analyzed by one-way analysis of variance (one-way ANOVA). Post hoc procedure was used for significance of difference. A difference in the mean values of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Analysis was performed with GraphPad Prism 6.

3. Results and Discussion

3.1. Mineral Content. Mineral contents in aerial parts of CS and CM, expressed in mg/kg, are shown in Table I. Five macroelements (calcium (Ca), potassium (K), magnesium (Mg), sodium (Na), and phosphorus (P)) and tree microelements (copper (Cu), iron (Fe), and zinc (Zn)) were analyzed. CS has significantly ($p < 0.05$) higher contents of Ca (3684.32 ± 30.21 mg/kg), Mg (785.27 ± 14.44 mg/kg), K (287.84 ± 3.13 mg/kg), P (275.26 ± 5.64 mg/kg), Na (175.97 ± 1.93 mg/kg), and Cu (84.00 ± 9.95 mg/kg) in comparison to CM, while CM has significantly higher amounts of Fe (29.16 ± 1.17 mg/kg); there is no statistically significant difference between CS and CM in Zn content. The differences in mineral contents are probably linked to genetic profile and partially to environmental conditions. The present study revealed that

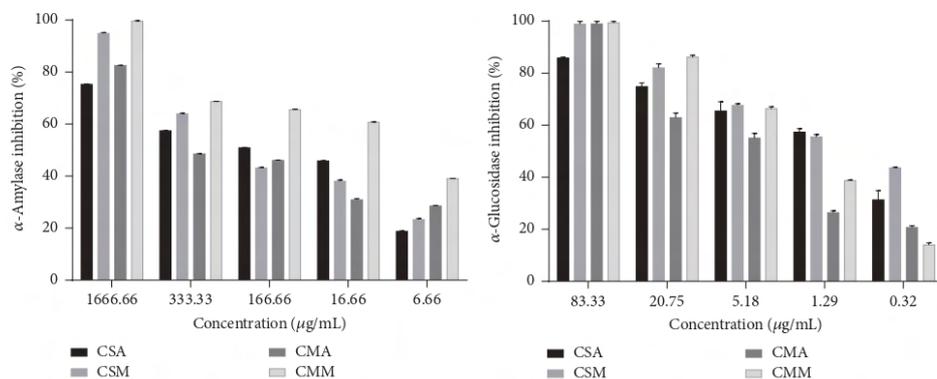


FIGURE 1: Percentage of α -amylase and α -glucosidase inhibition versus different concentrations of *Cistus* extracts. CSA: aqueous extract of *Cistus salvifolius*; CSM: methanolic extract of *Cistus salvifolius*; CMA: aqueous extract of *Cistus monspeliensis*; CMM: methanolic extract of *Cistus monspeliensis*.

values of 0.52, 0.55, and 0.82, respectively. The presence of a high concentration of phenolic compounds in plants extracts may not always translate a high antioxidant capacity; this can be explained by several factors, including the presence of different active compounds that can modify the antioxidant capacity, the synergistic effects of different compounds, and also the fact that antioxidant efficiency of the polyphenols seemed to depend on the position and extent of hydroxylation and conjugation [29].

3.4. α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activities. Salivary and pancreatic α -amylase catalyzes the hydrolysis of α -1,4-glycosidic linkages of polysaccharide such as starch and glycogen. Subsequently, the α -glucosidase located in the brush border surface membrane of intestinal cells hydrolyzes the resulting oligosaccharides into glucose, which is then transported into the blood. The inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity in the digestive tract of humans retards absorption of glucose and therefore can be an important strategy in the management of postprandial blood glucose level in diabetic patients [30, 31].

The α -amylase inhibitory property of the aqueous and hydromethanolic extracts of CS and CM is presented in Figure 1. The result revealed that the tested extracts inhibited α -amylase activity concentration-dependently (6.66–1666.66 μ g/mL). Furthermore, all extracts showed significantly ($p < 0.05$) better activity than the reference compound acarbose ($IC_{50} = 311.20 \pm 1.38 \mu$ g/mL) (Table 3). The extract CSA has the highest inhibitory activity against α -amylase with IC_{50} value of $217.10 \pm 0.15 \mu$ g/mL.

Likewise, the extracts have shown promising and concentration-dependent (0.32–83.33 μ g/mL) inhibitory effect on α -glucosidase enzyme (Figure 1).

Interestingly, the IC_{50} values $0.95 \pm 0.14 \mu$ g/mL, $8.47 \pm 0.58 \mu$ g/mL, $14.58 \pm 1.26 \mu$ g/mL, and $2.67 \pm 0.50 \mu$ g/mL for CSA, CSM, CMA, and CMM, respectively, indicate that

TABLE 3: IC_{50} values of CS and CM extracts on α -amylase and α -glucosidase inhibition.

	IC_{50} (μ g/mL)	
	α -Amylase	α -Glucosidase
Acarbose	311.20 ± 1.38^b	18.01 ± 2.00^d
CSA	217.10 ± 0.15^a	0.95 ± 0.14^e
CSM	597.10 ± 0.26^c	8.47 ± 0.58^b
CMA	886.10 ± 0.10^e	14.58 ± 1.26^c
CMM	706.50 ± 0.17^d	2.67 ± 0.50^a

The values are the mean of three determinations \pm standard error. Values in the same column not sharing a common letter (a to e) differ significantly at $p < 0.05$.

CSA: aqueous extract of *Cistus salvifolius*; CSM: methanolic extract of *Cistus salvifolius*; CMA: aqueous extract of *Cistus monspeliensis*; CMM: methanolic extract of *Cistus monspeliensis*.

all tested extracts were significantly ($p < 0.05$) stronger inhibitors of α -glucosidase than the reference compound acarbose ($IC_{50} = 18.01 \pm 2.00 \mu$ g/mL) (Table 3).

The significant inhibitory effects of CS and CM extracts against the enzymes α -amylase and α -glucosidase demonstrate their potential abilities to reduce the postprandial increase of blood glucose levels in diabetic patients and their capacities to prevent type 2 diabetes.

Our finding is in accordance with earlier reports that showed that some medicinal plant extracts have more potent α -glucosidase inhibitory activities than powerful synthetic inhibitors such as acarbose [32–34]. Also, the results are in line with a study performed on another species of *Cistus* genus (*Cistus laurifolius* L.) that showed that ethanolic extract of this plant is a potent inhibitor of α -glucosidase ($IC_{50} = 6.3 \mu$ g/mL) and has a remarkable and dose-dependent inhibitory effect on α -amylase and also improves hyperglycemia in type 2 diabetic rats [35].

Phytochemical studies on CS and CM demonstrated their abilities to produce a high amount of phenolic compounds and several flavonoids, including quercetin, myricetin, and kaempferol. Their glycosylated derivatives were isolated from the aerial parts of *C. salvifolius* plants [9]. Also, several catechin, epicatechin, gallic catechin, and epigallocatechin and their derivatives were isolated from the air-dried CS herb [5]. Likewise, catechin-related compounds [6, 8], apigenin diglucoside, myricetin, gallic and phenolic acids [36], and numerous diterpenes of labdane and clerodane types [37] were identified in CM.

A study of the correlation between total phenolic content and inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities by the investigated extracts had r^2 values of 0.98 and 0.64, respectively, indicating that the phenolic compounds present in the extracts are potentially responsible for the inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity. This is not an unexpected finding, since the phenolic compounds are known by their ability to inhibit the activities of carbohydrate-hydrolyzing enzymes due to their ability to bind with proteins [38]. Also, the flavonoids, different types of catechin, and terpenoids identified in these plants have been known to possess high inhibitory potential towards α -amylase and α -glucosidase enzymes activity [39, 40]. *Cistus* species are used in many traditional medicines to treat several pathological conditions, including hyperglycemia and diabetes [2, 3]. In general, herbal therapy is based on therapeutic action of complex mixtures of different compounds that often act in a synergistic mode to exert their full beneficial effects. This suggests that the biologically active compounds present in the investigated extracts may be acting in a synergistic therapeutic fashion to exert their carbohydrate-hydrolyzing enzymes inhibition activities and antioxidant effects.

Currently, the continuous use of synthetic α -amylase and α -glucosidase inhibitors such as acarbose is often associated with undesirable side effects such as abdominal distention, diarrhea, and flatulence [41, 42]. Additionally, only few of them are commercially available and their synthesis involves a tedious multistep procedure. Therefore, the CS and CM extracts with strong inhibitory activity against α -glucosidase and significant inhibitory activity on α -amylase enzyme may be effective therapeutic agents for the control of hyperglycemia and offer an attractive target to discover new agents for treatment of diabetes mellitus with minimal side effects.

4. Conclusion

The aqueous and hydromethanolic extracts of the aerial parts of *Cistus salvifolius* L. and *Cistus monspeliensis* L. presented high antioxidant effects against the DPPH and ABTS radicals and a strong ferric reducing power compared to the synthetic antioxidants analyzed. Those results suggest that the CS and CM extracts may have therapeutic potential against diseases associated with oxidative stress. Likewise, the interesting potential of investigated extracts to inhibit α -glucosidase enzyme and their significant inhibition of α -amylase indicate that they may be effective therapeutic agents for controlling hyperglycemia and bring about some preliminary proofs for

their antidiabetic effects. Additionally, it appears that both plants are a promising source of bioactive compounds, since those activities seem to be linked to the phenolic content, and it is noteworthy that the mineral contents of both plants may contribute significantly to their health promoting properties.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The author Karima Sayah is thankful to Pr. Fatima Ezzahra El Alaoui-faris and Pr. Kamal Hormat (Botanical Laboratory of the Faculty of Sciences of Rabat, Morocco) and Pr. Halim Khamar (Botanical Department of the Scientific Institute of Rabat, Morocco) for plants authentication.

References

- [1] F. E. El Alaoui-Faris, N. Mrabet, and H. Tahiri, "Nombre chromosomique et caryotype de *Cistus ladanifer* subsp. *Africanus* dansereau (Cistaceae)," *Lagascalia*, vol. 29, pp. 23–27, 2009.
- [2] M. Bnouham, H. Mekhfi, A. Legssyer, and A. Ziyyat, "Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco," *International Journal of Diabetes & Metabolism*, vol. 10, pp. 33–50, 2002.
- [3] R. Polat and F. Satil, "An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir—Turkey)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, no. 2, pp. 626–641, 2012.
- [4] G. Attaguile, G. Perticone, G. Mania, F. Savoca, G. Pennisi, and S. Salomone, "*Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 92, no. 2-3, pp. 245–250, 2004.
- [5] A. Danne, F. Peteret, and A. Nahrstedt, "Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*," *Phytochemistry*, vol. 37, no. 2, pp. 533–538, 1994.
- [6] R. Pomponio, R. Gotti, N. A. Santagati, and V. Cavrini, "Analysis of catechins in extracts of *Cistus* species by microemulsion electrokinetic chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 990, no. 1-2, pp. 215–223, 2003.
- [7] E. Saracini, M. Tattini, M. L. Traversi, F. F. Vincieri, and P. Pinelli, "Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves," *Chromatographia*, vol. 62, no. 5-6, pp. 245–249, 2005.
- [8] N. A. Santagati, L. Salerno, G. Attaguile, F. Savoca, and G. Ronsisvalle, "Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 46, no. 2, pp. 150–156, 2008.
- [9] P. Gürbüz, L. Ö. Demirezer, Z. Güvenalp, A. Kuruüzüm-Uz, and C. Kazaz, "Isolation and structure elucidation of uncommon secondary metabolites from *Cistus salvifolius* L.," *Records of Natural Products*, vol. 9, no. 2, pp. 175–183, 2015.
- [10] B. K. Bailes, "Diabetes mellitus and its chronic complications," *AORN Journal*, vol. 76, no. 2, pp. 265–282, 2002.
- [11] G. Williamson, "Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 57, no. 1, pp. 48–57, 2013.

- [12] M. R. Loizzo, M. Marrelli, A. Pugliese et al., "Crocus cancellatus subsp. Damascusus stigmas: chemical profile and inhibition of α -amylase and α -glucosidase and lipase, key enzymes related to type 2 diabetes and obesity," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 212–218, 2016.
- [13] I. Marmouzi, N. El Madani, Z. Charrouf, Y. Cherrah, and M. E. A. Faouzi, "Proximate analysis, fatty acids and mineral composition of processed Moroccan *Chenopodium quinoa* Willd. and antioxidant properties according to the polarity," *Phytothérapie*, vol. 13, no. 2, pp. 110–117, 2015.
- [14] G. A. Spanos and R. E. Wrolstad, "Influence of processing and storage on the phenolic composition of thompson seedless grape juice," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, no. 7, pp. 1565–1571, 1990.
- [15] E. Lister and P. Wilson, *Measurement of Total Phenolics and ABTS Assay for Antioxidant Activity*, Crop Research Institute, Lincoln, New Zealand, 2001.
- [16] V. Dewanto, X. Wu, and R. H. Liu, "Processed sweet corn has higher antioxidant activity," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 17, pp. 4959–4964, 2002.
- [17] R. Julkunen-Tiitto, "Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 33, no. 2, pp. 213–217, 1985.
- [18] B. Huang, H. Ke, J. He, X. Ban, H. Zeng, and Y. Wang, "Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 1, pp. 185–190, 2011.
- [19] C. I. G. Tuberoso, M. Boban, E. Bifulco, D. Budimir, and F. M. Pirisi, "Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey," *Food Chemistry*, vol. 140, no. 4, pp. 686–691, 2013.
- [20] M. Oyaizu, "Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine," *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, vol. 44, no. 6, pp. 307–315, 1986.
- [21] A. Hashim, M. S. Khan, M. S. Khan, M. H. Baig, and S. Ahmad, "Antioxidant and α -amylase inhibitory property of *Phyllanthus virgatus* L.: an *in vitro* and molecular interaction study," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 729393, 12 pages, 2013.
- [22] K. T. Kee, M. Koh, L. X. Oong, and K. Ng, "Screening culinary herbs for antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities," *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 48, no. 9, pp. 1884–1891, 2013.
- [23] H. Zidane, F. Aouniti, A. Tahani, M. L. Fauconnier, and A. Elbachiri, "Screening of mineral elements in *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* essential oils and their leaves," *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 29, no. 4, pp. 1319–1324, 2014.
- [24] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007.
- [25] G. M. Williams, "Interventive prophylaxis of liver cancer," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 3, no. 2, pp. 89–100, 1994.
- [26] F. Shahidi and Y. Zhong, "Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 112, no. 9, pp. 930–940, 2010.
- [27] M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200, 1958.
- [28] I. Gülçin, M. Oktay, E. Kireççi, and Ö. I. Küfrevioğlu, "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts," *Food Chemistry*, vol. 83, no. 3, pp. 371–382, 2003.
- [29] P.-G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *Journal of Natural Products*, vol. 63, no. 7, pp. 1035–1042, 2000.
- [30] M. R. Bhandari, N. Jong-Anurakkun, G. Hong, and J. Kawabata, " α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.)," *Food Chemistry*, vol. 106, no. 1, pp. 247–252, 2008.
- [31] V. Malapermal, I. Botha, S. B. N. Krishna, and J. N. Mbatha, "Enhancing antidiabetic and antimicrobial performance of *Ocimum basilicum*, and *Ocimum sanctum* (L.) using silver nanoparticles," *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015.
- [32] H. Zhang, G. Wang, T. Beta, and J. Dong, "Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 587383, 7 pages, 2015.
- [33] M. Figueiredo-González, C. Grosso, P. Valentão, and P. B. Andrade, " α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose?" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 118, pp. 322–327, 2016.
- [34] D. M. Ortíz-Martínez, C. Rivas-Morales, M. A. de la Garza-Ramos, M. J. Verde-Star, M. A. Nuñez-Gonzalez, and C. Leos-Rivas, "*Miconia* sp. increases mRNA levels of PPAR gamma and inhibits alpha amylase and alpha glucosidase," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, Article ID 5123519, 6 pages, 2016.
- [35] N. Orhan, M. Aslan, M. Sukuroglu, and D. Deliorman Orhan, "In vivo and in vitro antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC-TOF-MS analysis," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 146, no. 3, pp. 859–865, 2013.
- [36] E. Barrañón-Catalán, S. Fernández-Arroyo, C. Roldán et al., "A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship," *Phytochemical Analysis*, vol. 22, no. 4, pp. 303–312, 2011.
- [37] N. Fokialakis, E. Kalpoutzakis, B. L. Tekwani, A. L. Skaltsounis, and S. O. Duke, "Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus* sp. and semisynthetic derivatives thereof," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, no. 8, pp. 1775–1778, 2006.
- [38] S. Shobana, Y. N. Sreerama, and N. G. Malleshi, "Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase," *Food Chemistry*, vol. 115, no. 4, pp. 1268–1273, 2009.
- [39] Z. Yin, W. Zhang, F. Feng, Y. Zhang, and W. Kang, " α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants," *Food Science and Human Wellness*, vol. 3, no. 3–4, pp. 136–174, 2014.
- [40] R. Tundis, M. R. Loizzo, and F. Menichini, "Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 4, pp. 315–331, 2010.
- [41] P. Hollander, "Safety profile of acarbose, an α -glucosidase inhibitor," *Drugs*, vol. 44, no. 3, pp. 47–53, 1992.
- [42] M. Toeller, " α -glucosidase inhibitors in diabetes: Efficacy in NIDDM subjects," *European Journal of Clinical Investigation, Supplement*, vol. 24, no. 3, pp. 31–35, 1994.



In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts



K. Sayah*, L. Chemlal, I. Marmouzi, M. El Jemli, Y. Cherrah, My El Abbes Faouzi

Faculty of Medicine and Pharmacy, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Pharmacokinetic Research Team, Mohammed V University in Rabat, BP 6203, Rabat Instituts, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2017

Received in revised form 6 August 2017

Accepted 21 August 2017

Available online 29 August 2017

Edited by L.Rárová

Keywords:

Anti-inflammatory effects

Analgesic activities

Cistus salvifolius (L.)

Cistus monspeliensis (L.)

ABSTRACT

Cistus salvifolius (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) are medicinal shrubs used in traditional medicine in the treatment of inflammatory diseases. The present study was carried out to evaluate possible *in vivo* anti-inflammatory and analgesic effects of the aqueous extracts of *C. salvifolius* (L.) and *C. monspeliensis* (L.) from Morocco. The anti-inflammatory activity was investigated using the carrageenan induced paw oedema assay in rats. Further, the *in vivo* analgesic effect was evaluated using the acetic acid induced writhing and tail emersion tests. The results showed that the aqueous extracts at a dose of 500 mg/kg of body weight caused a significant inhibition of paw oedema ($91.57 \pm 0.52\%$ and $85.78 \pm 0.64\%$ for *C. salvifolius* (L.) and *C. monspeliensis* (L.) extracts respectively, 360 min after carrageenan injection) and exhibited analgesic activity in the used nociceptive models. These results demonstrate that the aqueous extracts of *C. salvifolius* (L.) and *C. monspeliensis* (L.) possess anti-inflammatory and both central and peripheral analgesic properties, supporting the traditional use of those plants in the treatment of inflammatory ailments.

© 2017 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cistus genus (*Cistaceae*) comprises several medicinal plants with a predominantly Mediterranean distribution. *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) are among the species which are widely distributed in Morocco. Traditional medicine has used *Cistus* species for treating many pathological conditions among them inflammatory disorders (Bammi and Douira 2002; Attaguile et al. 2004; Lahsissene et al. 2009; Barrajon-Catalan et al. 2011; Benkhniqie et al. 2016).

Pharmacological investigation on *Cistus* extracts reported anti-ulcerogenic and gastro-protective activities (Attaguile et al. 1995; Yeşilada et al. 1997), antioxidant (Amensour et al. 2010; Nicoletti et al. 2015), antimicrobial (Bouamama et al. 2006), antidiabetic (Orhan et al. 2013), cytotoxic and antiproliferative activities (Vitali et al. 2011).

Furthermore, phytochemical studies on *C. salvifolius* (L.) and *C. monspeliensis* (L.) have revealed their ability to produce high amounts of natural metabolites mainly flavonoid compounds, tannins, and terpenoids (Papaeftimiou et al. 2014) which are known to have many biological activities and health benefits.

Inflammation is primarily a physiological and beneficial process; non-resolving inflammatory processes can lead to onset and progression of numerous inflammatory diseases, including postoperative pain, atherosclerosis and rheumatoid arthritis (Alessandri et al. 2013).

Likewise, persistent pain is an escalating public health problem, and the control of pain is one of the most important uses to which drugs are put. The current medications available for the management of inflammation and pain are often trigger potentially serious adverse effects (Roth 2013; Sam 2008). Therefore, finding new sources of anti-inflammatory and analgesic agents is a major area of research interest, the current trend of research has shifted towards medicinal plants extracts which may greatly contribute to the development of new pharmaceutical products with lesser side effects.

To our knowledge, there are no previous studies on *in vivo* anti-inflammatory and analgesic activities of Moroccan *C. salvifolius* (L.) and *C. monspeliensis* (L.). Thus, the objective of the present paper was to study the possible anti-inflammatory and analgesic effects of *C. salvifolius* (L.) and *C. monspeliensis* (L.) aqueous extracts.

2. Materials and method

2.1. Plant material

Cistus salvifolius (L.), and *Cistus monspeliensis* (L.), were collected in April 2015 from Morocco from Maamoura forest, Sale (*C. salvifolius* L.) and Maaziz-Khemisset (*C. monspeliensis* L.). A voucher specimens number "RAB 1012176" and "RAB 1012177" for *C. salvifolius* (L.) and *C. monspeliensis* (L.) respectively were deposited in the Herbarium of Botany Department of the Scientific Institute of Rabat, Morocco. The aerial parts of the plants were cleaned and dried in the shade at room

* Corresponding author.

E-mail address: karima.sayah@um5s.net.ma (K. Sayah).

temperature until constant weight and were then powdered and used for further investigation.

2.2. Preparation of plant extracts

The aqueous extracts of *C. salvifolius* L. (CSA) and of *C. monspeliensis* L. (CMA) were prepared by infusion. A sample of 50 g of aerial parts from dried plants was mixed in 500 mL of boiled distilled water and allowed to cool for 1 h. The extracts were then filtered on Whatman paper and the filtrate obtained was evaporated under reduced pressure, using a rotary evaporator.

2.3. Animals

Adult Swiss mice and adult Wistar rat were used in this study. The animals are bred in the central animal facility of the Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat, Morocco. All animals were kept in a room maintained under environmentally controlled conditions of 23 ± 1 °C and 12 h light-12 h dark cycle and had free access to water and standard diet. The animals submitted to oral administration of the extracts or drugs were fasted for 16 h before the experiment. The study was conducted in accordance with the accepted principles outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health.

2.4. Evaluation of anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity was evaluated by the carrageenan induced rat paw oedema assay, using the reported method (Winter et al. 1962). Groups of five adult rats were used for each treatment. The extracts CSA and CMA were administered orally 30 min before carrageenan injection at a dose of 500 mg/kg. Indomethacin (10 mg/kg) was used as positive control. The negative control received distilled water (5 mL/kg). Oedema was induced by subplantar injection of 0.05 mL carrageenan (1%, w/v) in normal saline in the left paw of each rat. The paw volumes were measured just before the carrageenan injection, and then at 90 min, 180 min, and 360 min after carrageenan injection by using an Ugo Basile model LE750 plethysmometer. The anti-inflammatory activity was expressed as percentage inhibition of oedema thickness in treated animals in comparison to the control group:

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{(V_c - V_t)}{V_c} \right] * 100$$

where V_c is the Mean increase in paw volume of control group; V_t is the Mean increase in paw volume of the treated groups.

2.5. Evaluation of analgesic activity

2.5.1. Writhing test

The acetic acid-induced writhing test was carried out using the previously reported method (Koster et al. 1959) with slight modification. Female mice weighing (22–28 g) were divided into four groups of six mice each, the group 1 served as control and was administered saline 0.9%, group 2 was pre-treated with the standard drug aspirine at a dose of 150 mg/kg, group 3 and 4 were administered the extracts CSA and CMA respectively at a dose of 500 mg/kg. Writhing was induced by intraperitoneal injection of acetic acid solution 3% at a dose of 3.75 mL/kg, 30 min after the pre-treatment. The mice were placed individually in transparent cages and then, the number of writhes was counted during continuous observation for 10 min beginning at 10 min after acetic acid injection. The percent inhibitions of abdominal constrictions were calculated according to the formula given below.

Percent inhibition = $(1 - W_t/W_c) \times 100$ where W_t and W_c represents the number of writhings in treated groups, and control group respectively.

2.5.2. Tail immersion test

The test was performed according to the method described by Sewell and Spencer (Sewell and Spencer 1976). Female rats (160–180 g) were utilized in this test. The grouping of animals was kept similar to that of writhing test. In this model, morphine (0.1 mg/kg) was used as standard drug, the extracts CSA and CMA were administered at a dose of 500 mg/kg.

The test was carried out in a warm water bath set at a temperature of 55 °C, where 4 cm of animal tail was immersed into the warm water. The time between tail submersion and tail deflection was recorded at 30 min, 60 min and 120 min after the treatment by the morphine or extracts using a digital stopwatch. A cut-off time of 10 s was maintained to avoid tail tissue damage in rodents.

2.6. Statistical analysis

Data were indicated as the mean \pm standard error. Statistical significance was analyzed by the analysis of variance (ANOVA), and the multiple comparisons by Tukey's test. Significance was established at $p \leq 0.05$. Analysis was performed with Graph Pad Prism v 6 software.

3. Results and discussion

3.1. Anti-inflammatory effect

The anti-inflammatory activity of the aqueous extracts CSA and CMA was evaluated by carrageenan-induced rat paw oedema method. The results were shown in Fig. 1. At the evaluated dose (500 mg/kg), the extracts exhibited significant inhibitions of paw oedema increase from 90 min to 360 min after carrageenan injection as compared to the control group. After 360 min of carrageenan injection both extracts showed significant and higher inhibition activity ($91.57 \pm 0.52\%$ for CSA and $85.78 \pm 0.64\%$ for CMA) as compared to the reference drug indomethacin at a dose of 10 mg/kg with inhibition value of $62.75 \pm 1.21\%$.

The carrageenan-induced rat paw oedema method is considered to be one of the common methods for screening the anti-inflammatory properties of a drug (Morris 2003). This suitable *in vivo* model involves several mediators released in sequence. An initial phase during the first 1 h 30 min, is caused by the release of histamine and serotonin; a second phase is mediated by bradykinin from 1 h 30 min to 2 h 30 min; and finally a third phase, the mediator of which is suspected to be prostaglandins occurs from 2 h 30 min to 6 h after carrageenan injection (Rosa 1972). Another important mediator in acute inflammation is nitric oxide (NO), it has been reported that the carrageenan causes the production and release of NO at the injured site. Moreover, the inflammatory response is also related to the local infiltration and activation of

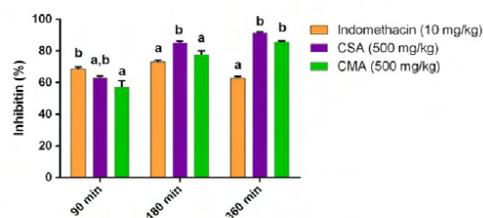


Fig. 1. Anti-inflammatory effects of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts in the carrageenan induced rat paw oedema test. Data are reported to mean ($n = 5$) \pm Standard Error. Means in the same time-point not sharing a common letter (a to b) differ significantly at $p \leq 0.05$.

neutrophil and the production of oxygen-derived free radicals (Salvemini et al. 1996; Posadas et al. 2004). Indomethacin is one of non-steroidal anti-inflammatory drugs which are the most widely medications used for inflammation. It is a well-established fact that non-steroidal anti-inflammatory drugs exert their anti-inflammatory activity by inhibition of prostaglandin biosynthesis but their use is associated with serious adverse effects (Roth 2013).

In our previous study, the aqueous extracts of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) showed interesting contents of polyphenolic, flavonoids and proanthocyanidin compounds and demonstrated strong antioxidant activity (Sayah et al. 2017), considering the possible implication of polyphenolic compounds and antioxidant agents in anti-inflammatory effects (Geronikaki and Gavalas 2006), we suggest that the rich phenolic contents of our extracts on polyphenolic compounds and their interesting antioxidant properties could contribute significantly to their noticeable anti-inflammatory effects.

The results of the present study are in agreement with the study of El Youbi et al. (2016) demonstrating that the aqueous extract of the leaves of *Cistus ladaniferus* (L.) possess potent anti-inflammatory effect when tested in the carrageenan induced hind paw oedema in rat. On the other hand, the results of Küpeli and Yesilada (2007) showed that the aqueous extract of the leaves of *Cistus laurifolius* (L.) from Turkey did not show any remarkable effect against carrageenan-induced hind paw oedema model, while ethanolic extract was significantly active both in 250 and 500 mg/kg doses. The differences between *Cistus* genus species in the anti-inflammatory response can be probably linked to the environmental conditions and to the genetic profile that allow each plant species to have specific phytochemical constituents and therefore varying biological response.

3.2. Analgesic effects

In the writhing test, acetic acid was used to induce pain of peripheral origin in mice. A writhing is indicated by stretching of the abdomen with simultaneous stretching of at least one hind limb. Analgesic activity of the test samples is inferred from decrease in the frequency of writhing.

As summarized in Table 1, the intraperitoneal administration of the aqueous extracts CSA and CMA (500 mg/kg) caused significant inhibition of writhes compared to the control group. The results were comparable to the standard drug aspirin that produced $40.29 \pm 1.30\%$ inhibition at a dose of 150 mg/kg of body weight. Writhing response is widely accepted as a visceral inflammatory pain model. In this test, acetic acid stimulates the tissue to produce several inflammatory mediators such as histamine, serotonin, and cytokines. The method has additionally been associated with prostanooids, most notably the increases in the levels of PGE2 and PGF2 α in peritoneal fluids as well as lipoxygenase products (Derardt et al. 1980).

The reduction in number of abdominal writhes caused by CSA and CMA suggests peripheral analgesic activity of both extracts which could be related to the reduction in the release of inflammatory mediators.

To evaluate possible central antinociceptive activity of the extracts, tail immersion test was performed. This assay is the most commonly used procedure to examine reflexive nociceptive behavior in rodents.

Table 1
Effect of *Cistus salvifolius* and *Cistus monspeliensis* aqueous extracts on acetic acid-induced writhing in mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Number of writhes	% inhibition
CSA	500	20.40 \pm 1.79	49.25 ^c
CMA	500	26.54 \pm 1.04	33.98 ^a
Aspirin	150	24 \pm 1.30	40.29 ^b
Control	–	40.20 \pm 1.90	–

The values are the mean of six experiments \pm Standard Error. Values in the same column not sharing a common letter (a to c) differ significantly at $p \leq 0.05$.

Table 2
Effect of *Cistus salvifolius* and *Cistus monspeliensis* aqueous extracts on nociceptive responses in tail immersion test.

Treatment	Dose (mg/kg)	Reaction time in seconds		
		30 min	60 min	120 min
CSA	500	7.48 \pm 0.32 ^b	7.98 \pm 0.42 ^{b,c}	5.10 \pm 0.25 ^b
CMA	500	8.91 \pm 0.14 ^c	8.98 \pm 0.24 ^c	5.31 \pm 0.29 ^b
Morphine	0.1	6.23 \pm 0.09 ^b	6.90 \pm 0.06 ^b	7.80 \pm 0.28 ^c
Control	–	1.43 \pm 0.32 ^a	2.13 \pm 0.15 ^a	2.62 \pm 0.32 ^a

All values are represented as means of six experiments \pm Standard error. Values in the same column not sharing a common letter (a to c) differ significantly at $p \leq 0.05$.

This is on account of reflexes are inherent in most animals and act as protective mechanism to avoid tissue damage (Gibula-Bruzda 2010). This method is highly sensitive to opiate drugs (Le Bars et al. 2001).

The extracts at the dose of 500 mg/kg did significantly increased the reaction time in the thermal stimulus at all time-points. Both extracts have maximum effect at 60 min; their effects at 120 min were less than those of the opiate drug Morphine. (Table 2).

Evaluation of analgesic activity of some *Cistus* species has been already performed, De Andres et al. (1999) found that the aqueous extract of *Cistus populifolius* (L.) leaves of Spain exhibited significant *in vivo* central analgesic effects. Ark et al. (2004) found that the chloroform extract (500 mg/kg) and the precipitated fraction obtained from *Cistus laurifolius* (L.) leaves of Turkey showed significant central analgesic activity, while aqueous, ethanol and butanol extracts of the plant had no activity. Küpeli and Yesilada, 2007 isolated through bioassay-guided fractionation procedures three flavonoids, 3-O-methylquercetin, 3,7-O-dimethylquercetin and 3,7-O-dimethylkaempferol, from the leaves of *Cistus laurifolius* as the potent antinociceptive and anti-inflammatory principals.

Several flavonoids including quercetin, myricetin, kaempferol, and their glycosylated derivatives were isolated from the aerial parts of *Cistus salvifolius* (Gürbüz et al. 2015), also, several catechin, epicatechin, gallicolcatechin, and epigallocatechin and their derivatives were isolated from this plant (Danne et al. 1994). Catechin-related compounds (Pomponio et al. 2003; Santagati et al. 2008), apigenin, diglucoside, myricetin, gallic and phenolic acids were identified in *Cistus monspeliensis* (Barrajón-Catalán et al., 2011).

The aqueous extracts of *Cistus salvifolius* and *Cistus monspeliensis* are used in many traditional medicines for the treatment of anti-inflammatory related diseases. The above results, suggest that the richness of our extracts in flavonoids which are a well known as antinociceptive agents were probably responsible for relieving or modifying responses to pain caused by either thermal or chemical stimulation of the nociceptors mediated by both central and peripheral mechanisms.

4. Conclusion

It may be concluded from the present findings that the aqueous extracts of the aerial parts of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) have significant anti-inflammatory activity and both central and peripheral analgesic properties.

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgement

The author Karima Sayah is thankful to Pr. Fatima Ezzahra El Alaouifar, Pr. Kamal Hormat (Botanical Laboratory of the Faculty of Sciences of Rabat) and Pr. Halim Khamar (Botanical Department of scientific Institute of Rabat, Morocco) for plants authentication.

References

- Alessandri, A.L., Sousa, L.P., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Pinho, V., Teixeira, M.M., 2013. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol. Ther.* 139, 189–212.
- Amensour, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J., Skali-Senhaji, N., Abrini, J., Fernandez, Lopez, J., 2010. Antioxidant and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 170–178.
- Ark, M., Üstün, O., Yeşilada, E., 2004. Analgesic activity of *Cistus laurifolius* in mice. *Pharm. Biol.* 42, 176–178.
- Attaguile, G., Caruso, A., Pennisi, G., Savoca, F., 1995. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol. Res.* 31, 29–32.
- Attaguile, G., Perticone, G., Mania, G., Savoca, F., Pennisi, G., Salomone, S., 2004. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *J. Ethnopharmacol.* 92, 245–250.
- Bammi, J., Douira, A., 2002. Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, Maroc) (Medicinal plants in the Achach forest (central plateau, Morocco)). *Acta Bot. Malacit* 27, 131–145.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312.
- Benkhiguel, O., Hachi, M., Fadli, M., Douira, A., Zidane, L., 2016. Catalogue of the medicinal plants used in the treatment of urinary infections in the area of al-haouz rhamna (central morocco). *Eur. J. Bot. Plant Sci. Phyt.* 3, 1–49.
- Bouamama, H., Noel, T., Villard, J., Benharref, A., Jana, M., 2006. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *J. Ethnopharmacol.* 104, 104–107.
- Danne, A., Peteret, F., Nahrstedt, A., 1994. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry* 37, 533–538.
- De Andres, A.I., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar, A.M., 1999. Effects of extract of *Cistus populifolius* L. on the central nervous system. *Phytother. Res.* 13, 575–579.
- Derardt, R., Jongney, S., Delevalce, F., 1980. Release of prostaglandin E and F in an analgesic reaction and its inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 51, 17.
- El Youbi, A.E.H., El Mansouri, L., Boukhira, S., Daoudi, A., Boust, D., 2016. In vivo anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of *Cistus ladanifer* L. from Morocco. *Am. J. Ther.* 23, e1554–e1559.
- Geronikaki, A.A., Gavallas, A.M., 2006. Antioxidants and anti-inflammatory diseases: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 9, 425–442.
- Gibula-Bruzda, E., 2010. Animal models of nociceptive pain. *Ann Univ Mariae Curie-Polonia* 23, 8.
- Gürbüz, P., Demirezer, L.Ö., Güvenalp, Z., Kuruzüm-Uz, A., Kazaz, C., 2015. Isolation and structure elucidation of uncommon secondary metabolites from *Cistus salvifolius* L. *Rec. Nat. Prod.* 9, 175.
- Koster, R., Anderson, M., Debeer, E.J., 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18, 412.
- Küpel, E., Yeşilada, E., 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. Ethnopharmacol.* 112, 524–530.
- Lahsissene, H., Kahouadi, A., Hseini, S., 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental) (Catalog of Medicinal Plants Used in the Region of Zaër (Occidental Morocco)). *Lejeunia, Revue de Botanique.*
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.
- Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 255, 115–121.
- Nicoletti, M., Toniolo, C., Vendittia, A., Bruno, M., Ben, Jemia M., 2015. Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian *Cistus*: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*. *Nat. Prod. Res.* 29, 223–230.
- Orhan, N., Aslan, M., Sukuroglu, M., Orhan, D.D., 2013. In vivo and in vitro antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC-TOF-MS analysis. *J. Ethnopharmacol.* 146, 859–865.
- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., Kanellis, A.K., 2014. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* 2.
- Pomponio, R., Gotti, R., Santagati, N.A., Cavrini, V., 2003. Analysis of catechins in extracts of *Cistus* species by microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 990, 215–223.
- Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.* 142, 331–338.
- Rosa, M., 1972. Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 89–102.
- Roth, S.H., 2013. Coming to terms with non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs* 72, 873–879.
- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Wyatt, P.S., Bourdon, D.M., Marino, M.H., Manning, P.T., Currie, M.G., 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 118, 829–838.
- Sam, R., 2008. Integrated pain management: using omega 3 fatty acids in a neuropathic model. *Tech. Reg. Anesth Pain Manag.* 12, 105–108.
- Santagati, N.A., Salerno, L., Attaguile, G., Savoca, F., Ronisvalle, G., 2008. Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *J. Chromatogr. Sci.* 46, 150.
- Sayah, K., Marmouzi, I., Naceiri Mrabti, H., Cherrah, Y., Faouzi, M.E.A., 2017. Antioxidant activity and inhibitory potential of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *Biomed. Res. Int.* 2017:1–7 Article ID 2789482. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/2789482>.
- Sewell, R.D., Spencer, P.S., 1976. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats. *Neuropharmacology* 15, 683–688.
- Vitali, F., Pennisib, G., Attaguile, G., Savocad, F., Tita, B., 2011. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Nat. Prod. Res.* 25, 188–202.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Exp. Biol. Med.* 111, 544–547.
- Yeşilada, E., Gürbüz, I., Ergun, E., 1997. Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesions. *J. Ethnopharmacol.* 55, 201–211.

RESUME

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales du Maroc et la nécessité urgente des nouveaux agents antidiabétiques plus efficaces, moins chers et moins toxiques que les médicaments synthétiques actuels. L'objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel antidiabétique des plantes *Cistus salviifolius* L. et *Cistus monspeliensis* L. et d'investiguer les possibles mécanismes d'action qui peuvent expliquer leur propriété thérapeutique.

L'activité antidiabétique des extraits aqueux des parties aériennes des plantes *C. salviifolius* et *C. monspeliensis* a été évalué chez les souris rendus diabétiques par injection de STZ associé au nicotinamide. Les résultats ont montré que nos extraits à la dose de 500 mg/kg par voie orale réduit significativement l'hyperglycémie, diminue les taux sériques de triglycérides et de créatinines et prévenue également la perte pondérale des souris en comparaison avec les groupes témoins. Les extraits aqueux de nos plantes ont montré un puissant pouvoir antioxydant *in vitro* et *in vivo* chez les souris diabétiques, ils ont montré un puissant effet inhibiteur contre les enzymes α -amylase et α -glucosidase, une importante activité inhibitrice de l'absorption intestinale du glucose, et une activité anti-inflammatoire prometteuse chez l'animal. Ces activités peuvent être envisagées comme les principaux mécanismes par lesquels nos extraits régulent l'homéostasie du glucose chez les souris diabétiques.

A la lumière de ces résultats, la dernière démarche de notre étude s'est focalisé sur le fractionnement et la séparation des différents constituants chimiques de nos plantes afin d'identifier leurs molécules bioactives à l'aide d'une étude phytochimique bioguidée.

Les résultats obtenus dans la présente étude constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel des plantes *C. salviifolius* et *C. monspeliensis* et confirme leur potentiel thérapeutique contre la maladie du diabète de type 2. Ces résultats, ouvrent la porte vers des nouvelles recherches cliniques et des nouvelles perspectives dans le traitement du diabète et ses complications.

Mots-clés : *Cistus salviifolius*, *Cistus monspeliensis*, activité antidiabétique, STZ-nicotinamide, α -glucosidase, α -amylase, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

ABSTRACT

The present study fits into the framework of the valorization of the medicinal plants of Morocco and the urgent need of new antidiabetic agents more effective, less expensive and less toxic than the current synthetic drugs. The objective of this study was to evaluate the antidiabetic potential of the plants *Cistus salviifolius* L. and *Cistus monspeliensis* L. and to investigate the possible mechanisms of action which can explain their therapeutic property.

The anti-diabetic activity of aqueous extracts of the aerial parts of *C. salviifolius* and *C. monspeliensis* plants was evaluated in mice made diabetic by injection of STZ associated with nicotinamide. The results showed that our extracts at the dose of 500 mg/kg orally significantly reduced hyperglycemia, decreased serum triglyceride and creatinine levels and also prevented weight loss in mice compared to control groups. The aqueous extracts of our plants showed a potent antioxidant power *in vitro* and *in vivo* in diabetic mice, a potent inhibitory effect against α -amylase and α -glucosidase enzymes, a significant inhibitory activity on intestinal glucose absorption, and a promising anti-inflammatory activity in animals. These activities can be considered as the main mechanisms by which our extracts regulate glucose homeostasis in diabetic mice.

In the light of these results, the last step of our study focused on the fractionation and separation of the different chemical constituents of our plants in order to identify their bioactive molecules using a bioguided phytochemical study.

The results obtained in the present study constitute a scientific justification of the traditional use of the plants *C. salviifolius* and *C. monspeliensis* and confirm their therapeutic potential against the type 2 diabetes. These results open the door to new clinical research and new perspectives in the treatment of diabetes and its complications.

Key-words: *Cistus salviifolius* L, *Cistus monspeliensis* L, anti-diabetic activity, STZ-nicotinamide, α -glucosidase, α -amylase, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

Structure de recherche: Equipe de Recherche des Analyses Biopharmaceutiques et Toxicologiques, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Maroc.