



جامعة محمد الخامس بالرباط
Université Mohammed V de Rabat

Royaume du Maroc

Université Mohamed V

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat

Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès

Faculté Polydisciplinaire de Taza

Centre d'Etudes Doctorales Sciences de la Vie et Santé



Année 2020

N° de thèse : 4/CSVS

THÈSE DE DOCTORAT

ETUDE PHYTOCHIMIQUE & ACTIVITES ANTIOXYDANTE ET ANTIDIABETIQUE *IN VITRO* ET *IN VIVO* D'*ATRACTYLIS GUMMIFERA L.*

Formation Doctorale : Sciences du Médicament

Présentée par

Khadija BOUABID

Soutenue publiquement le : 29 / 12 / 2020

Devant les membres du jury :

Pr. Yahia CHERRAH	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.	Président
Pr. Hamid TOUFIK	Faculté Polydisciplinaire de Taza, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, Maroc.	Rapporteur
Pr. M'hammed ANSAR	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.	Rapporteur
Pr. Jaouad EL HARTI	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.	Rapporteur
Pr. Laila NASSIRI	Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail de Meknès, Maroc.	Examinatrice
Pr. Fatima LAMCHOURI	Faculté Polydisciplinaire de Taza, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, Maroc.	Co-Directeur de thèse
Pr. My Abbes FAOUZI	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc.	Directeur de thèse

Avant-propos

Ce travail de thèse s'est déroulé principalement sous l'encadrement du Pr. Fatima LAMCHOURI au sein du Laboratoire Substances Naturelles, Pharmacologie, Environnement, Modélisation, Santé & Qualité de Vie (SNAMOPEQ), antérieurement appelé Laboratoire Matériaux, Substances Naturelles, Environnement et Modélisation (LMSNEM) à la Faculté Polydisciplinaire de Taza, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès - Maroc.

Aussi, ce travail de thèse a été réalisé sous l'encadrement du Pr. My Abbes FAOUZI au sein du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Equipe de Recherche des Analyses Biopharmaceutiques et Toxicologiques de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat- Maroc.

Dédicaces

Je dédie cette thèse **À** :

Mes chers parents **Anissa El Aidouni** et **Ahmed Bouabid**

Mes bien-aimées **Salma** et **Malak**

Mon mari **Ouissam Chouali**

Ma chère sœur **Meriem**

Mes frères **Outmane**, **Ismail**, **Issam** et **Abderrahim**

Ma meilleure amie **Fatima Zahra Barchane**

Tous ceux et celles qui me sont chers.

Remerciements

Tout d'abord je remercie Dieu, le tout puissant, qui m'a aidée et m'a donné le courage et la force pour dépasser et surmonter tous les obstacles que j'ai rencontrés.

Aussi, la réalisation de cette thèse a été possible grâce à la participation de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude et mes remerciements :

Je tiens à remercier mon directeur de thèse **Pr. My Abbes FAOUZI**, de m'avoir donné sa confiance en acceptant la direction de ce travail et j'exprime toute ma reconnaissance envers lui pour son travail de supervision, pour ses conseils et pour sa grande disponibilité.

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse **Pr. Fatima LAMCHOURI**, Directrice du Laboratoire Matériaux Substances Naturelles, Environnement et Modélisation (LMSNEM) entre 2014 et 2019 et Vice-directrice du Laboratoire Substances Naturelles, Pharmacologie, Environnement, Modélisation, Santé & Qualité de Vie (SNAMOPEQ) depuis janvier 2020, Faculté Polydisciplinaire de Taza, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, Maroc pour sa patience, sa disponibilité à tous les instants, sa franchise, son esprit critique, son dynamisme, ses conseils judicieux qui ont contribué à alimenter ma réflexion et qui m'ont aidé efficacement à mener ce travail jusqu'au bout. Veuillez trouver ici cher Professeur le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements sont adressés également au **Pr. Hamid TOUFIK** de la Faculté Polydisciplinaire de Taza pour ses encouragements, ses orientations et ses conseils pertinents.

Je tiens à remercier très sincèrement tous les membres du jury :

Pr. Yahia CHERRAH, Directeur du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V de Rabat, Maroc d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à mon jury de thèse en qualité de président.

Pr. Hamid TOUFIK de la Faculté Polydisciplinaire de Taza, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, **Pr. M'hammed ANSAR** et **Pr. Jaouad EL HARTI** de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V de Rabat, Maroc qui m'ont fait l'honneur en acceptant de porter leur jugement hautement qualifié sur mon travail de thèse en qualité de rapporteurs et de sieger dans mon jury de thèse.

Pr. Laila NASSIRI de la Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail de Meknès, Maroc, pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et de m'honorer en faisant partie du jury de ma thèse.

Mes remerciements vont également aux **Dr. Meriem BOUABID**, médecin résidente en radiothérapie et **Dr. Kamal ZEROUALE**, médecin biologiste pour leur collaboration pour la réalisation des analyses médicales sanguines.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à tous les doctorants chercheurs du Laboratoire Substances Naturelles, Pharmacologie, Environnement, Modélisation, Santé & Qualité de Vie (SNAMOPEQ), antérieurement appelé Laboratoire Matériaux, Substances Naturelles, Environnement et Modélisation (LMSNEM) : **Nacima, Mohamed, Souad, Taoufik, Mourad, Nezha, Yassine, Malak** et **Sliman** qui m'ont encouragé, soutenu et contribué à rendre l'ambiance de travail au laboratoire très agréable.

Mes remerciements sont également adressés à mes collègues de l'enseignement secondaire du Lycée 02 Octobre 1955 (**Maha, Laila, Fatima, Halima, Fatima Zahra**)

Finalement, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin, intellectuellement ou matériellement à l'achèvement de ce travail.

Sommaire

Avant-propos.....	2
Dédicaces	3
Remerciements.....	4
Sommaire.....	6
Production scientifique	12
Liste des abréviations	16
Liste des figures	18
Liste des tableaux	20
Introduction générale	21
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	25
Chapitre 1 : Diabète sucré	26
1. Introduction.....	26
2. Classification étiologique du diabète sucré.....	26
2.1. Définition du diabète sucré.....	26
2.2. Diabète de type 1	27
2.3. Diabète de type 2	27
2.4. Formes hybrides du diabète	28
2.5. Autres types de diabète	29
3. Physiopathologie du diabète de type 2	30
4. Complications du diabète de type 2.....	31
5. Traitement du diabète de type 2	33
5.1. Règles hygiéno-diététiques.....	33
5.2. Antidiabétiques oraux.....	33
5.3. Insulinothérapie du diabète de type 2	34
6. Conclusion	34
Chapitre 2 : Stress oxydatif	36
1. Introduction.....	36
2. Radicaux libres.....	36

2.1. Définition des radicaux libres	36
2.2. Sources des espèces réactives d'oxygène	37
2.3. Dommages oxydatifs	38
3. Antioxydants.....	40
3.1. Antioxydants enzymatiques.....	40
3.2. Antioxydants non-enzymatiques.....	41
3.2.1. Antioxydants endogènes	41
3.2.2. Antioxydants exogènes	42
3.3. Mécanismes de réactions des antioxydants.....	43
3.3.1. Réactions de transfert de proton d'hydrogène.....	43
3.3.2. Réactions de transfert d'électrons.....	43
4. Conclusion	44
Chapitre 3 : Relation diabète et stress oxydatif	45
1. Introduction.....	45
2. Auto-oxydation du glucose	45
3. Voie des polyols ou voie de l'aldose réductase	45
4. Voie de la protéine kinase C (PKC)	46
5. Voie des hexoamines	47
6. Glycation des protéines et formation des AGEs	48
7. Conclusion	49
Chapitre 4 : Phytothérapie	50
1. Introduction.....	50
2. Phytothérapie du diabète	50
3. Phytothérapie et stress oxydatif.....	54
4. Plantes toxiques à usage thérapeutiques.....	55
5. Présentation de la plante étudiée : <i>Atractylis gummifera</i> L.....	56
5.1. Classification systématique	56
5.2. Nomenclature.....	57
5.3. Description botanique	58
5.4. Répartition géographique.....	59
5.5. Utilisations traditionnelles.....	60
5.6. Toxicité d' <i>Atractylis gummifera</i> L.....	61

5.6.1. Intoxications par <i>Atractylis gummifera</i> L.....	61
5.6.2. Principes toxiques d' <i>Atractylis gummifera</i> L.....	62
5.7. Composition chimique d' <i>Atractylis gummifera</i> L.....	63
5.8. Activités biologiques d' <i>Atractylis gummifera</i> L.....	63
6. Conclusion	64
PARTIE EXPERIMENTALE.....	65
Chapitre 1 : Etude Phytochimique	66
1. Introduction.....	66
2. Matériel et méthodes	66
2.1. Matériel végétal	66
2.2. Produits chimiques utilisés	67
2.3. Préparation des extraits.....	68
2.3.1. Extraction aqueuse	68
2.3.2. Extraction organique.....	69
2.4. Criblage phytochimique	69
2.4.1. Criblage des tannins	70
2.4.2. Criblage des anthraquinones	70
2.4.3. Criblage des flavonoïdes.....	71
2.4.4. Criblage des saponines	71
2.4.5. Criblage des alcaloïdes	72
2.4.6. Criblage des quinones libres	72
2.4.7. Criblage des stérols.....	73
2.4.8. Criblage des anthracenosides	73
2.5. Dosage phytochimique	74
2.5.1. Dosage des polyphénols totaux	74
2.5.2. Dosage des flavonoïdes	74
2.5.3. Dosage des tanins catéchiques	75
3. Résultats.....	75
3.1. Rendement des extractions aqueuse et organique.....	75
3.2. Criblage phytochimique	76

3.3. Dosage des polyphénols totaux.....	77
3.4. Dosage des flavonoïdes.....	77
3.5. Dosage des tanins catéchiques.....	78
4. Discussion	79
5. Conclusion	82
Chapitre 2 : Etude de la toxicité aigüe et de l'activité antidiabétique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	83
1. Introduction.....	83
2. Matériel et méthodes	84
2.1. Produits chimiques utilisés	84
2.2. Animaux utilisés	84
2.3. Approbation par le comité d'éthique	84
2.4. Activité antidiabétique <i>in vitro</i>	85
2.4.1. Activité inhibitrice de l'alpha amylase.....	85
2.4.2. Activité inhibitrice de l'alpha glucosidase.....	85
2.4.3. Activité inhibitrice de la bêta galactosidase.....	86
2.5. Etude de la toxicité aigüe	87
2.6. Activité antidiabétique <i>in vivo</i>	88
2.6.1. Induction du diabète.....	88
2.6.2. Traitement des animaux (souris).....	88
2.6.3. Suivi des souris	89
2.6.3.1. Suivi du poids corporel des souris	89
2.6.3.2. Suivi des paramètres biochimiques	89
a. Mesure de la glycémie à jeun	90
b. Dosage de l'urée	90
c. Dosage de la créatinine	90
d. Dosage des protéines totales.....	91
e. Dosage du Cholestérol	91
f. Dosage des triglycérides totaux	91
g. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT).....	92
h. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT).....	93
3. Résultats.....	94
3.1. Activité antidiabétique <i>in vitro</i>	94
3.1.1. Activité inhibitrice de l'alpha amylase.....	94

3.1.2. Activité inhibitrice de l'alpha glucosidase	95
3.1.3. Activité inhibitrice de la bêta galactosidase.....	96
3.2. Toxicité aigüe	98
3.3. Activité antidiabétique <i>in vivo</i>	99
3.3.1. Effet sur le poids corporel	99
3.3.2. Effet sur les paramètres biochimiques.....	100
a. Mesure de la glycémie à jeun.....	101
b. Dosage de l'urée et de la créatinine.....	102
c. Dosage des protéines totales.....	104
d. Dosage des Cholestérols totaux et des Triglycérides	104
e. Dosage d'aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase	106
4. Discussion	107
5. Conclusion	112
Chapitre 3 : Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> d'<i>Atractylis gummifera</i>..	113
1. Introduction.....	113
2. Matériel et méthodes	113
2.1. Produits chimiques utilisés	113
2.2. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	114
2.2.1. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	114
2.2.2. Test du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	115
2.2.3. Test de la réduction du radical Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS).....	115
2.2.4. Test FRAP (ferric reducing ability of plasma).....	116
2.2.5. Test du pouvoir réducteur du fer (PR)	116
2.3. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	116
2.3.1. Prélèvement des organes des souris.....	117
2.3.2. Dosage des Malondialdéhydes (MDA)	117
2.3.3. Dosage du superoxyde dismutase (SOD)	117
2.3.4. Analyse statistique	118
3. Résultats.....	118
3.1. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	118

3.1.1. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	118
3.1.2. Test du piégeage du radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	119
3.1.3. Test de la réduction du radical acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS).....	121
3.1.4. Test FRAP (ferric reducing ability of plasma).....	121
3.1.5. Test du pouvoir réducteur du fer (PR)	122
3.2. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	123
3.2.1. Dosage des Malondialdéhydes (MDA)	124
3.2.2. Dosage du Superoxyde dismutase (SOD).....	126
4. Discussion	128
5. Conclusion	132
Conclusion générale.....	133
Perspectives	135
Références bibliographiques.....	136
Résumé :	166
Abstract:	Erreur ! Signet non défini.
Annexes :	170

Production scientifique

Cette thèse a fait l'objet de quatre articles scientifiques publiés dans des journaux indexés et impactés et des communications orales et affichées présentées dans des congrès nationaux et internationaux.

Articles publiés dans des revues indexées en relation avec la thèse :

- 1) Article 4 publié dans « Journal of Ethnopharmacology », IF (2019) = 3.690 / H index = 181 / Q1 / Scopus.

Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Faouzi M E A., 2020. Phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L. Journal of ethnopharmacology. 253: 112640. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112640>.

- 2) Article 3 publié dans « Plant Science Today », IF (2018) = 0.765 / Q4 / H index = 2 / Scopus.

Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Faouzi M E A., 2019. Inventory of poisonings and toxicological studies carried out on *Atractylis gummifera* L.: A review. Plant Science Today; 6(4):1-7. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.4.582>.

- 3) Article 2 publié dans « Bangladesh journal of pharmacology », IF (2019) = 1.306 / Q3 / H index = 21 / Scopus

Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Boulfia, M., Senhaji, S., Faouzi, M. E. A., 2019. *In vivo* anti-diabetic effect of aqueous and methanolic macerated extracts of *Atractylis gummifera*. Bangladesh Journal of Pharmacology. 14, 67-73. <https://doi.org/10.3329/bjp.v14i2.38870>.

- 4) Article 1 publié dans « Plant Science Today », IF (2018) = 0.765 / Q4 / H index = 2 / Scopus

Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Sayah, K., Cherrah, Y., Faouzi, M. E. A., 2018. Phytochemical screening and *in vitro* evaluation of alpha amylase, alpha glucosidase and beta galactosidase inhibition by aqueous and organic

Atractylis gummifera L. extracts. Plant Science Today. 5(3), 103-112.
<https://doi.org/10.14719/pst.2018.5.3.393>.

Communications orales

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, My El Abbas Faouzi. « Evaluation *in vitro* et *in vivo* de l'activité antidiabétique des plantes médicinales ». Atelier d'Echanges sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) organisé à la Faculté Polydisciplinaire de Taza, Maroc Laboratoire Matériaux, Substances Naturelles, Environnement et Modélisation (LMSNEM) en collaboration avec le Centre de Formation d'Apprentis Agricoles de Bellegarde – France. **Lundi 09 octobre 2017**.

Khadija Bouabi, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Souad Senhaji, Karima Sayah, My El Abbas Faouzi. “Phytochemical study and inhibitory potential of *Atractylis gummifera* L. against enzymes linked to hyperglycemia” المؤتمر العربي الأول للنباتات الطبية والعطرية تحت شعار « تثمين النباتات الطبية والعطرية من أجل تنمية مستدامة يومي 18 و 19 أكتوبر 2017.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Souad Senhaji, Karima Sayah, My El Abbas Faouzi. « Evaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* et *in vivo* d'*Atractylis gummifera* ». Premier Congrès International sous le Thème : « Maladies Chroniques et Qualité de Vie » Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, Maroc, les **15 et 16 décembre 2016**.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Souad Senhaji, Mohamed Boulfia, Karima Sayah, My El Abbas Faouzi. « Evaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* et *in vivo* d'*Atractylis gummifera* », 5^{ème} Edition Internationale des Journées Jeunes Chercheurs de Chimie Thérapeutique, Sous le thème : « La Place de la Phytothérapie et la Chimie Médicinale dans le Processus de 'Drug Discovery' (PPCMPDD 2016) » Faculté Polydisciplinaire de Taza, les **28 & 29 novembre 2016**.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Souad Senhaji, Ilyas Marmouzi, My El Abbas Faouzi. « Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L. ». 4^{ème} Edition Internationale des Journées

Jeunes Chercheurs de Chimie Thérapeutique, Sous le thème : « Chimie Thérapeutique : Compétences plurielles » à la Faculté des Sciences, Université Chouaib Doukkali - El Jadida, les **19 & 20 novembre 2015**.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Karima Sayah, My El Abbes Faouzi. « Evaluation *in vitro* de l'activité antidiabétique des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* ». Journées d'Etudes sur les Ressources Naturelles dans la Province de Taza (JERNT 2015) organisées à la Faculté Polydisciplinaire de Taza du **16 au 18 novembre 2015**.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Jaouad El Hilaly, My El Abbes Faouzi. « Criblage pharmacologique primaire d'*Atractylis gummifera* » 1^{er} Congrès International : Substances Naturelles & Modélisation : Applications Thérapeutique, Environnementale & Développement Durable (CISNEM Taza 2014) organisé à la Faculté Polydisciplinaire de Taza, **15 - 16 décembre 2014**.

Communications par affiche

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, My El Abbes Faouzi. « Etat des lieux sur les intoxications et les études toxicologiques menées sur *Atractylis gummifera* L ». 1^{er} Congrès International : Géosciences, Ressources Naturelles & Environnement (CIGREN 2018) - Faculté Polydisciplinaire de Taza - les **12 & 13 novembre 2018**.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Souad Senhaji, Karima Sayah, My El Abbes Faouzi « Etude phytochimique d'*Atractylis gummifera* et évaluation de son pouvoir antioxydant ». 2^{ème} Edition du Forum des doctorants du Pôle Santé, Recherche Biomédicale, Biomolécules et Qualité de Vie (SRB2QV), Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès - **Jeudi 3 novembre 2016**.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Jaouad El Hilaly, My El Abbes Faouzi. « Etude *in vitro* de la toxicité des extraits aqueux d'*Atractylis gummifera* ». Journée d'Etude Scientifique du Laboratoire Matériaux, Substances Naturelles, Environnement et Modélisation, organisée à la Faculté Polydisciplinaire de Taza, le **29 octobre 2015**.

Khadija Bouabid, Fatima Lamchouri, Hamid Toufik, Jaouad El Hilaly, Ilias Marmouzi, My El Abbes Faouzi. « Dosage phytochimique des extraits aqueux d'*Atractylis gummifera* ». 1^{er} Congrès International : Substances Naturelles & Modélisation : Applications Thérapeutique, Environnementale & Développement Durable (CISNEM) organisé à la Faculté Polydisciplinaire de Taza, **15 - 16 décembre 2014**.

Prix et distinction

- **Premier prix** : Meilleure communication orale dans la 5^{ème} Edition Internationale des Journées Jeunes Chercheurs de Chimie Thérapeutique, Sous le thème : « La Place de la Phytothérapie et la Chimie Médicinale dans le Processus de ‘Drug Discovery’ (PPCMPDD 2016) » Faculté Polydisciplinaire de Taza - les **28 & 29 novembre 2016**.

- **Premier prix** : Meilleure communication orale dans le Premier Congrès International Arabe des Plantes Médicinales et Aromatiques, sous le thème « Valorisation des Plantes Médicinales et Aromatiques pour un Développement Durable » organisé à l’Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès en collaboration avec l’Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques de Fès et l’Association des Plantes Médicinales et Aromatiques de la Fédération des Conseils de la Recherche Scientifique Arabe les **18 et 19 Octobre 2017**.

Liste des abréviations

- *A. gummifera* : *Atractylis gummifera*
- Acetyl-CoA : Acétyl Coenzyme A
- ADA : American Diabetes Association
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ADO : Antidiabétiques oraux
- ADP : Adénosine diphosphate
- AG : Acides gras
- AGEs : Produits de glycation avancés
- ALAT : Alanine Amino Transférase
- ANOVA: Analysis of variance
- APG : Angiosperme Phylogénique Groupe
- ASAT : Aspartate aminotransférase
- ATP : Adénosine triphosphate
- CI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane
- DN : Diabète Néonatal
- DNS: Dinitrosalicylic acid
- DNT : Souris Diabétiques Non Traitées
- DT2 : Diabète de type 2
- DTM : Souris Diabétiques Traitées par Metformine
- DTMA : Souris Diabétiques Traitées par macéré aqueux
- DTMM : Souris Diabétiques Traitées par macéré méthanolique
- e⁻ : Electron négatif
- ERA : Espèces réactives d'azote
- ERO : Espèces réactives de l'oxygène
- ESI-MS: Electrospray ionization mass spectrometry
- ETC : Chaîne de transport d'électrons
- FeCl₃: Chlorure ferrique
- FID : Fédération Internationale du Diabète
- GCK : Glucokinase
- GSH : Glutathion réduit
- GSH-Px : Glutathion peroxydase
- GSSG : Glutathion oxydé
- H₂SO₄ : Acide sulfurique

- HbA1c : Hémoglobine glyquée
- HCL : Acide chlorhydrique
- HE : Huiles essentielles
- HNF : Facteur hépato-nucléaire
- HPLC : Chromatographie liquide à haute pression
- KOH: Hydroxyde de potassium
- LDH : Lactate-déshydrogénase
- LMSNEM : Laboratoire Matériaux Substances Naturelles Environnement et Modélisation
- MDH : Malate-déshydrogénase
- MODY: Maturity-Onset Diabetes of the Young
- Na₂CO₃: Carbonate de sodium
- NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
- NaOH : Hydroxyde de sodium
- ND : Souris Non Diabétiques
- O₂ : Oxygène
- OECD : Organisation de Coopération et de Développement Economique
- PKC : Protéine kinase
- PNDM : Permanent Neonatal Diabetes
- pNPG : p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside
- SNAMOPEQ : Substances Naturelles, Pharmacologie, Environnement, Modélisation, Santé & Qualité de Vie.
- T1DM : Diabète de type 1
- TNDM : Transient Neonatal Diabetes
- USMBA : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Liste des figures

- Figure 1** : Systèmes antioxydants enzymatiques (Medart, 2009)
- Figure 2** : Voie des polyols (Burg, 1996)
- Figure 3** : Voie des hexosamines (Kaneto *et al.*, 2001)
- Figure 4** : Processus de glycation des protéines (Brownlee, 2001)
- Figure 5** : Structure de l'atractyloside (Ricchio *et al* 1973)
- Figure 6** : Structure du carboxyatractyloside (Danieli *et al.*, 1972)
- Figure 7** : Mécanisme d'action de l'Atractyloside (ATR) (Obatomi *et al.*, 1998)
- Figure 8** : Partie souterraine d'*Atractylis gummifera* récoltée dans la commune de Tahla, province de Taza, région Fès-Meknès (Photo prise par Khadija Bouabid le 20/06/2019)
- Figure 9** : Pourcentage d'inhibition de α -amylase par les extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.
- Figure 10** : Pourcentage d'inhibition de α -glucosidase par les extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.
- Figure 11** : Pourcentage d'inhibition de β -galactosidase par les extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.
- Figure 12** : Variation du poids corporel des différents groupes de souris pendant la durée de l'étude.
- Figure 13** : Variation de la glycémie à jeun des différents groupes de souris pendant la durée de l'étude (Moyenne \pm SEM).
- Figure 14** : Variation de la créatinine et de l'urée dans le sang des différents groupes de souris.
- Figure 15** : Variation du taux des protéines totales dans le sang des différents groupes de souris.
- Figure 16** : Variation du taux des cholestérols et des triglycérides dans le sang des différents groupes de souris.
- Figure 17** : Variation du taux des Transaminases Alanine Aminotransférase (ALAT) et Aspartate Aminotransférase (ASAT) dans le sang des différents groupes de souris.
- Figure 18** : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits aqueux d'*Atractylis gummifera* L.

Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits organiques d'*A. gummifera* L.

Figure 20 : Variation du taux de malondialdéhyde (MDA) tissulaire (nM/mg de tissu) dans le foie et les reins des souris témoins (ND et DNT) et traitées (DTM, DTMA, DTMO).

Figure 21 : Variation du taux de superoxyde dismutase (SOD) tissulaire (unit/g de tissu) dans le foie et les reins des souris témoins (ND et DNT) et traitées (DTM, DTMA, DTMO).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs endogènes produisant les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Tableau 2 : Plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement de diabète.

Tableau 3 : Classification systématique *Atractylis gummifera* L.

Tableau 4 : Synonymes Botaniques d'*Atractylis gummifera* L.

Tableau 5 : Noms vernaculaires d'*Atractylis gummifera* L.

Tableau 6 : Rendement des extractions aqueuses et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

Tableau 7 : Résultats du criblage phytochimique d'*Atractylis gummifera* L.

Tableau 8 : Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera*.

Tableau 9 : Concentrations inhibitrices moyennes (CI50) ($\mu\text{g/mL}$) de l'activité inhibitrice des enzymes α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

Tableau 10 : Doses létales d'*Atractylis gummifera* L. (Bouabid *et al.*, 2019).

Tableau 11 : Activités antiradicalaire et antioxydante *in vitro* via les tests H_2O_2 , DPPH, PR, FRAP et ABTS des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera*.

Introduction générale

Depuis les temps les plus reculés, les maladies entourent l'Homme, le hantent et le menacent. Les effets qu'elles engendrent sont lourds, que ce soit à travers les pertes des vies ou à travers les complications qu'elles provoquent ou encore à travers les couts élevés de leur traitement. De son côté, l'Homme ne cesse de les surveiller, de les diagnostiquer et d'y réagir, que ce soit pour assurer une longue vie ou pour se prémunir contre les risques. Les progrès réalisés dans la plupart des disciplines scientifiques et notamment celle de la pharmacologie témoignent de cette lutte.

Dans ce sens, plusieurs recherches scientifiques s'inscrivent dans cette perspective et se sont focalisées sur plusieurs pathologies en l'occurrence le diabète et le stress oxydatif.

En effet, le diabète est une pathologie complexe par ses mécanismes physiopathologiques et la genèse de plusieurs complications de l'angiopathie qui sont fréquentes et chroniques (**Picard et al. 2017**). Il a été ainsi rapporté dans la 8^{ème} édition de l'atlas de la Fédération Internationale du Diabète (FID) (**Cho et al., 2018**), que la prévalence du diabète ne cesse d'augmenter, il est une des principales causes de décès dans le monde entier (**World Health Organization. 2016**). L'Afrique du Nord compte parmi les régions qui ont connu la hausse la plus importante du nombre de patients diabétiques, principalement le diabète de type 2 (DT2). En 2017, l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient comptaient 39 millions de patients diabétiques, les projections pour 2045 atteignent 82 millions, soit une augmentation de 110 % (**Guariguata et al., 2014 ; Cho et al., 2018**). Au Maroc, le diabète provoque plus de 24 000 décès par an et entre 2011 et 2015, le nombre de diabétiques au Maroc est passé de 1,5 million d'individus à plus de 2 millions, âgés de 20 ans et plus, soit une augmentation de 25 % en 5 ans. Par ailleurs, 625000 personnes sont sous traitement du diabète dans les hôpitaux et centres de santé nationaux, dont 15000 enfants atteints de diabète de type 1 (DT1) et 80% des cas de diabète sont de type 2 (**Cho et al., 2018**). De plus, le danger du diabète ne réside pas uniquement du fait de sa prévalence qui est très inquiétante dans le monde entier, mais aussi du fait qu'il est une pathologie communément associée à des complications à la fois micro vasculaires et macro vasculaires qui sont très graves, d'où la nécessité de bien comprendre la physiopathologie de cette maladie et de chercher le traitement le plus adéquat.

De même, le stress oxydatif est un danger qui menace le bien-être de l'Homme, il s'agit d'un déséquilibre de l'homéostasie biologique qui se manifeste dans une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques, ce qui provoque des dommages oxydatifs potentiellement impliqués dans l'apparition et la complication de nombreuses maladies métaboliques dont le diabète sucré (**Favier, 2003**).

Le diabète et le stress oxydatif sont deux troubles qui sont liés l'un à l'autre et chacun peut engendrer l'apparition de l'autre. En effet, l'implication du stress oxydatif dans le diabète sucré est considérée comme le moteur mobilisant des différents facteurs pathologiques et des complications micro et macro-vasculaires du diabète (**Delattre, 2005 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2004**). De plus, les diabétiques ont une protection antioxydante déficiente qui augmente leur vulnérabilité aux dommages oxydatifs et favorise le développement des complications diabétiques.

Ainsi, le traitement du diabète doit faire appel non seulement à des antidiabétiques, mais aussi à des antioxydants, en plus d'une activité physique et d'un régime alimentaire équilibré, moins calorique et riche en oligoéléments et en vitamines. En effet, l'utilisation d'hypoglycémisants actuels comme antidiabétiques n'est pas une solution optimale pour le traitement radical du diabète, aussi leurs administrations régulières engendrent plusieurs effets indésirables (**Bailey, 2008 ; Brouardel, 1869**), d'où la nécessité de rechercher et de développer des antidiabétiques plus efficaces, moins chers et avec moins d'effets secondaires et de contre-indications.

A cet égard, les plantes médicinales sont une précieuse piste pour le développement d'un nouveau médicament antidiabétique et antioxydant. En effet, depuis longtemps plusieurs remèdes à base de plantes ont une réputation antidiabétique (**Grover et al., 2002 ; Gunian et al., 2011**) et au cours de ces dernières décennies les chercheurs ont exploré l'utilisation traditionnelle de ces plantes et ils ont montré que leurs extraits peuvent être favorables pour l'optimisation du traitement et du contrôle du diabète (**Jain, 1968 ; Khare, 2008 ; Bailey, 2017**).

Au Maroc, le recours aux plantes médicinales est largement répondu dans les traditions médicales, c'est pourquoi plusieurs travaux de recherche ont été menés pour étudier la pharmacopée traditionnelle marocaine et pour dévoiler les secrets des plantes médicinales marocaines (**Bellakhdar, 1997, 2006**).

Ainsi, dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales marocaines, nous nous sommes intéressés à une *Asteraceae* du genre *Atractylis*, qui est une plante toxique nommée *Atractylis gummifera*, chardon à glu ou Addad (**Daniel et al., 2005 ; Vallejo et al., 2009 ; Nassiri et al., 2016 ; Bammou et al., 2015**). Elle a une grande répartition géographique et se retrouve fréquemment dans la nature à l'état sauvage. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle marocaine pour le traitement de plusieurs maladies dont le diabète (**Jouad et al., 2001 ; Bnouham et al., 2006 ; Hammiche et al., 2013 ; Najem et al., 2018**).

Ainsi, l'objectif de nos travaux de thèse est de réajuster les utilisations traditionnelles d'*Atractylis gummifera* et de confirmer ou infirmer ses bienfaits sur le plan thérapeutique.

A cet égard, nous avons réalisé une étude phytochimique accompagnée d'une étude pharmacologique sur la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* :

- L'étude phytochimique a consisté à :
 - ✓ Préparer les extraits aqueux (décocté, infusé et macéré) et organiques (méthanolique, macéré méthanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et éther de pétrole) d'*A. gummifera* en utilisant deux modalités d'extraction à froid et à chaud ;
 - ✓ Faire un criblage des différents métabolites secondaires (flavonoïdes, tanins, saponines, quinones, anthraquinones, anthracenosides, alcaloïdes et les stérols) sur la poudre de la partie sous terrainne de la plante *A. gummifera* et sur les différents extraits préalablement préparés ;
 - ✓ Réaliser un dosage des principaux métabolites secondaires qui se sont révélés présents dans les extraits préparés ;
- L'étude pharmacologique a consisté à évaluer :
 - ✓ L'activité antidiabétique *in vitro* des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* par l'inhibition de 3 enzymes : l'alpha amylase, l'alpha glucosidase et la bêta galactosidase, qui sont les enzymes responsables de la dégradation des polysaccharides et par conséquent de l'augmentation de la glycémie ;
 - ✓ L'activité antioxydante *in vitro* par cinq méthodes : la réduction du radical H₂O₂ (le peroxyde d'hydrogène), l'activité antiradicalaire du DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), la capacité antioxydante de l'ABTS (acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), le test FRAP (ferric-reducingability of plasma) et le pouvoir réducteur du fer (PR) ;

- ✓ La toxicité aigüe des extraits d'*Atractylis gummifera* les plus actifs *in vitro* et qui seront utilisés pour l'étude *in vivo* selon le protocole décrit dans la ligne directrice OECD 423 ;
- ✓ L'activité antidiabétique *in vivo* sur un modèle de souris diabétiques des deux extraits les plus actifs *in vitro* ; macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* L. ;
- ✓ L'activité antioxydante *in vivo* des macérés aqueux et méthanolique d'*A. gummifera* par le dosage de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) qui élimine les radicaux superoxydes et par le dosage du malondialdéhyde (MDA) qui est un produit de décomposition oxydative des lipides insaturés.

Le présent rapport de thèse est structuré en deux parties, dont la première est une synthèse bibliographique et qui est composée de quatre chapitres qui portent sur le diabète sucré, le stress oxydatif, la relation entre le diabète et le stress oxydatif et enfin le dernier chapitre consacré à la phytothérapie.

La seconde partie est dédiée à l'étude expérimentale, qui est divisée en trois chapitres : le premier est consacré à l'étude phytochimique, le second à l'évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* et *in vivo* des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* et le troisième chapitre, à l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo*.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Diabète sucré

1. Introduction

Le diabète est une pathologie métabolique caractérisée principalement par une hyperglycémie chronique résultant d'un déficit de sécrétion d'insuline, d'anomalies de l'action d'insuline sur les tissus cibles, ou de l'association des deux (**Durand *et al.*, 2011 ; Picard *et al.* 2017 ; Cho *et al.*, 2018**). L'insuline est l'hormone clé responsable de la régulation de la glycémie, elle est la seule hormone ayant un effet hypoglycémiant. Ainsi, tout déficit en cette hormone ou mal fonctionnement peut entraîner une hyperglycémie chronique (**American Diabetes Association, 2014 ; Picard *et al.* 2017**). Cette hyperglycémie présente des symptômes qui sont peu visibles mais qui se développent progressivement tels que la polyurie, la polydipsie, les troubles de la vision et la perte du poids. En absence de traitement adéquat, des manifestations cliniques plus graves peuvent apparaître tels que l'acidocétose, l'hyperosmolarité ou l'acidose lactique (**American Diabetes Association, 2019 ; Ramachandran *et al.*, 2017**).

Dans le présent chapitre, nous allons présenter la dernière classification du diabète sucré établie en 2019 par l'OMS, la physiopathologie du diabète, ainsi que ses complications et les différents traitements disponibles.

2. Classification étiologique du diabète sucré

Depuis 1965, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) met périodiquement à jour et publie des orientations sur la manière de classer le diabète sucré. Ainsi, les dernières orientations publiées déclarent que les états diabétiques doivent être classés non seulement en fonction des facteurs étiologiques, mais aussi en fonction des états cliniques du patient qui sont applicables à l'échelle internationale et utilisant des paramètres et des ressources cliniques simples et facilement disponibles. Ainsi, selon la dernière classification établie en 2019 par l'OMS, le diabète sucré est classifié en : diabète type 1 (DT1), diabète type 2 (DT2), formes hybrides du diabète ainsi que d'autres spécifiques types (**World Health Organization ; 2019**).

2.1. Définition du diabète sucré

Avant d'entamer la classification étiologique du diabète sucré, l'Organisation Mondiale de la Santé a défini le diabète comme étant un groupe de troubles métaboliques chroniques caractérisés et identifiés par la présence d'une hyperglycémie consécutive d'une sécrétion

insuffisante d'insuline ou d'une carence ou mauvaise utilisation de l'insuline ou l'association de ces deux anomalies. Ces troubles sont souvent accompagnés par des complications qui sont à la fois micro vasculaires (rétinopathie, néphropathie et neuropathie) et macro vasculaires (coronaropathie, accidents vasculaires cérébraux, artériopathie périphérique) (**Seino *et al.*, 2010 ; Ramachandran *et al.*, 2010 ; Picard *et al.* 2017**).

2.2. Diabète de type 1

Diabète de type 1 (T1DM), appelé autrefois diabète insulino-dépendant (DID), représente 10 à 15% des cas de diabète sucré avec une augmentation annuelle de 3 à 4 %. Les hommes et les femmes sont touchés de la même manière. Bien que le diabète de type 1 soit fréquent pendant l'enfance, son apparition peut se produire également chez les adultes (**Maahs *et al.*, 2010**). Le diabète de type 1 est dû à la destruction des cellules du pancréas spécialisées dans la production d'insuline : les cellules bêta des îlots de Langerhans, le rythme de destruction de ces cellules peut être rapide chez certains individus comme il peut être lent chez d'autres. La cause de cette destruction est souvent auto-immune (action anormale du système immunitaire) où l'organisme ne reconnaît plus les cellules bêta de Langerhans et les détruit via des anticorps et des lymphocytes T. Le glucose ne peut alors plus entrer dans les cellules et retourne dans le sang, ce qui provoque l'élévation du taux de glucose dans le sang. La cause de cette réaction auto-immune est encore inconnue : on ne sait pas exactement pourquoi elle se déclenche chez certaines personnes et non chez d'autres. Toutefois, plusieurs facteurs favorisants ont été mis en avant, tels que les facteurs environnementaux qui sont encore mal connus comme les toxiques, les virus et les facteurs génétiques qui sont liés à certains gènes du système HLA situés sur le bras court du chromosome 6 (**Durand *et al.*, 2011 ; American Diabetes Association, 2014 ; World Health Organization ; 2019**).

2.3. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est un problème de santé mondial commun et grave qui représente près de 90% à 95% des formes diagnostiquées de diabétiques qui sont non seulement des adultes, mais aussi un nombre croissant d'enfants et d'adolescents qui sont également touchés. Ce type de diabète résulte de l'incapacité de l'organisme à sécréter suffisamment d'insuline (l'insulinopénie), ainsi qu'à une éventuelle résistance à son action (l'insulinorésistance) (**Durand *et al.*, 2011 ; World Health Organization ; 2019**). Le DT2 évolue en association avec des changements culturels, économiques, sociaux et

essentiellement en association avec les changements alimentaires tels que l'augmentation de la consommation d'aliments rapides et qui est accompagnée par la réduction de l'activité physique (**Zimmet *et al.*, 2001**). Le diabète de type 2 peut être aussi causé par la malnutrition du fœtus et son exposition croissante à l'hyperglycémie pendant la grossesse (**Zimmet *et al.*, 2001 ; World Health Organization, 2016**).

2.4. Formes hybrides du diabète

Les tentatives visant à distinguer le DT1 du DT2 chez les adultes ont abouti à la proposition de nouvelles catégories et nomenclatures du diabète sucré qui apparaît sur deux formes à savoir le diabète à médiation immunitaire, qui évolue lentement, et le diabète de type 2 prédisposé à la cétose :

- Diabète à médiation immunitaire à évolution lente ou diabète auto-immun latent chez l'adulte est décrit chez des adultes qui présentent cliniquement ce que l'on pense initialement être un DT2, mais qui ont des signes d'auto-anticorps pancréatiques pouvant réagir avec des antigènes cytoplasmiques non spécifiques dans les cellules des îlots de Langerhans. Cette forme hybride de diabète ne nécessite pas d'insulinothérapie au moment du diagnostic, mais plutôt une modification du mode de vie et des antidiabétiques oraux. Cependant, cette forme de diabète progresse vers le besoin d'insuline plus rapidement que les personnes atteintes de DT2. Dans certaines régions du monde, cette forme de diabète est plus courante que le diabète de type 1 (**Tuomi *et al.*, 1993 ; Zimmet *et al.*, 1994 ; Gale, 2005**).
- Diabète de type 2 prédisposé à la cétose : Il a été identifié chez les jeunes Afro-Américains et ceux de l'Afrique subsaharienne, cependant il est moins fréquent dans les populations d'origine européenne. La pathogenèse de cette forme de diabète n'est pas encore claire, elle n'a présenté aucun marqueur génétique ou preuve d'auto-immunité, mais elle est caractérisée par une cétose qui est preuve d'une grave carence en insuline, mais qui est ensuite en rémission et ne nécessite pas de traitement insulinique. Cette carence d'insuline est due à un défaut de sécrétion transitoire d'insuline suivi d'une récupération remarquable de la capacité de sécrétion de cette hormone (**Sobngwi *et al.*, 2002 ; Mauvais-Jarvis *et al.*, 2004**).

2.5. Autres types de diabète

La dernière classification du diabète réalisée par l'OMS (**World Health Organization ; 2019**) a présenté d'autres types de diabète à savoir :

- **Diabète monogénique** : appelé monogénique du fait qu'une mutation d'un seul gène peut être responsable de ce type de diabète. Il est aussi appelé diabète néonatal (DN), car il survient à un stade très précoce chez le nouveau-né et il est diagnostiqué dès la naissance (dans les 6 premiers mois de vie) ; sa prévalence est estimée à ~1/150 000 (**Hattersley et al., 2009**).
- **Diabète dû à un défaut génétique de la fonction des cellules β** : ce type de diabète est dû à un dysfonctionnement des cellules β , tel que le diabète de maturité des jeunes (MODY), le diabète néonatal permanent (PNDM), le diabète néonatal transitoire (TNDM) et les syndromes génétiques où le diabète insulino-dépendant est associé à des caractéristiques cliniques spécifiques (**Hattersley et al., 2006**). Ces types de diabète sont dus à des mutations dans le gène de la glucokinase (GCK) qui provoque le diabète GCK MODY et des mutations dans le gène du facteur hépatonucléaire (HNF) qui provoque les diabètes HNF4A MODY et HNF1A MODY (**Spyer et al, 2009 ; Shields et al., 2010**).
- **Diabète dû à un défaut génétique de l'action de l'insuline** : il se manifeste généralement par des caractéristiques de résistance primitive à l'insuline, il est dû à des mutations du récepteur de l'insuline entraînant une hyperglycémie. Le leprechaunisme et le syndrome de Rabson-Mendenhall sont deux syndromes qui présentent des mutations dans le gène du récepteur de l'insuline avec une résistance extrême à l'insuline (**Taylor et al., 1992**).
- **Diabète dû à des maladies pancréatiques** : tout processus qui endommage le pancréas peut provoquer un diabète. Les processus acquis comprennent la pancréatite, les traumatismes, les infections, le cancer du pancréas et la pancréatectomie. Ces dommages causés au pancréas impliquent un mécanisme autre que la simple réduction de la masse cellulaire des cellules β et pour la mucoviscidose ; il y a à la fois une insuffisance pancréatique exocrine et une réduction de la sécrétion d'insuline entraînant un diabète. La pancréatopathie peut s'accompagner des douleurs abdominales, d'une calcification pancréatique et d'une dilatation des canaux (**Ewald et al., 2013 ; Hart et al., 2016**).

- **Diabète dû à des troubles endocriniens** : Plusieurs hormones (par exemple l'hormone de croissance, le cortisol, le glucagon, l'épinéphrine) antagonisent l'action de l'insuline. Les maladies associées à une sécrétion excessive de ces hormones sont également associées au diabète (par exemple acromégalie, syndrome de Cushing, glucagonome et phéochromocytome). Ces formes de l'hyperglycémie se résorbent généralement lorsque l'état sous-jacent à l'origine de l'excès d'hormones soit résolu et traité (**Mac Farlane et al., 1991**).
- **Diabète lié à une infection** : des virus particuliers ont été associés à la destruction des cellules β et ont été impliqués dans l'induction ou le déclenchement du diabète, mais leur rôle dans son étiologie est resté incertain. Il peut apparaître chez certaines personnes atteintes de rubéole congénitale, le Coxsackie B et des virus tels que le cytomégalovirus, l'adénovirus et les oreillons (**Forrest et al., 1971 ; King et al., 1983**).
- Certaines formes de diabète sont associées à des maladies immunologiques particulières telles que le syndrome de l'Homme raide (SHR) ou les personnes qui développent spontanément des anticorps dirigés contre le récepteur de l'insuline (**Hirata et al., 1972 ; Solimena et al., 1990**).
- Autres syndromes génétiques s'accompagnant parfois d'un diabète comme le syndrome de Down (trisomie du chromosome 21), syndrome de Klinefelter, syndrome de Turner, syndrome de Wolfram et bien d'autres syndromes (**Robinson et al., 1992**).
- **Le diabète gestationnel** : intolérance au glucose survenant lors de la grossesse. Il se traduit par une augmentation de la glycémie. La surveillance scrupuleuse de la femme enceinte est indispensable et un traitement adapté permet d'éviter les risques de complications (**Hennen, 2001 ; Bardot, 2012 ; World Health Organization, 2019**).

3. Physiopathologie du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle, où se conjuguent des facteurs héréditaires (résistance à l'insuline) et des facteurs liés à l'environnement (alimentation riche en graisses et en sucres rapides, sédentarité). Il est caractérisé par une diminution de l'insulino-sécrétion qui provoque l'hyperglycémie. Cette insulino-déficience est le résultat d'une période de 10 à 20 ans d'hyperinsulinisme liée à une résistance des tissus périphériques à l'insuline comme le pancréas, le foie, le muscle squelettique, le tissu

adipeux, le cerveau, le tractus gastro-intestinal et le rein (**Warram *et al.*, 1990 ; Fonseca, 2009**).

Le développement du diabète de type 2 se fait d'une façon progressive dont la physiopathologie est divisée en trois étapes principales :

- Surcharge pondérale : le diabète de type 2 commence par l'apparition d'une insulino-résistance qui est la conséquence de la surcharge pondérale où le tissu adipeux libère une quantité importante d'acide gras (AG) dans le sang. Ces AG entrent en compétition avec le glucose au niveau de plusieurs tissus et organes, ce qui provoque une diminution de la pénétration du glucose au profit des AG (**McCabe *et al.*, 2007 ; Yahagi *et al.*, 2017**).
- Insulino-résistance : la surcharge pondérale provoque le développement des adipocytes qui ont une fonction endocrine consistante dans la libération de leptine, de résistine et d'adiponectine. Ces derniers jouent un rôle important dans l'apparition d'une résistance à l'insuline qui est aussi favorisée en absence d'activité physique et de facteur génétique (**Bonora *et al.*, 2002 ; Capeau, 2003**).
- Hyper-insulinisme et diminution de l'insulino-sécrétion : la résistance à l'insuline par les différents organes provoque une augmentation de la glycémie qui stimule les cellules β responsables de l'hyperinsulinisme et par conséquent l'installation du diabète de type 2. Cependant, avec l'augmentation d'âge, l'absence de précautions hygiéno-diététiques et l'échec des antidiabétiques oraux, la sécrétion de l'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans diminue progressivement jusqu'à sa dissémination, ce qui nécessite l'introduction de l'insulinothérapie comme traitement pour le DT2 afin de maintenir une glycémie normale (**Grant *et al.*, 2009 ; Ashcroft and romsman, 2012**).

4. Complications du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est dangereux par ses complications, c'est pourquoi il constitue un problème majeur de santé publique. Il peut entraîner des complications chroniques et mêmes aiguës (**Eppens *et al.*, 2006 ; Schlienger, 2013**) :

- **Les complications aiguës du diabète de type 2** : il y a trois principales complications métaboliques aiguës à savoir :

- L'acidocétose diabétiques : est une complication potentiellement mortelle qui se produit généralement chez les personnes atteintes du DT1. Elle consiste en une accumulation de substances toxiques, appelées corps cétoniques, qui rendent le sang trop acide, ce qui peut provoquer un coma et décès en absence de traitement (**Hennen, 2001**).
 - Le coma hyperosmolaire : survient généralement chez les diabétiques âgés de type 2, qui n'ont pas conscience de leur diabète ou qui négligent leur traitement. Il est caractérisé par l'association d'une hyperglycémie supérieure ou égale à 6 g/L, une osmolarité plasmatique élevée et par l'absence d'acidose et de cétonémie. Il est souvent accompagné d'une insuffisance rénale fonctionnelle, d'une polyurie et d'une forte déshydratation (**Rousseau et al., 2017**).
 - L'acidose lactique : est une complication grave de diabète qui résulte d'une surproduction d'acide lactique et/ou une diminution de son métabolisme. Elle est favorisée par une insuffisance rénale, par une insuffisance hépatique grave, par un surdosage en biguanides, par les boissons alcoolisées ou par un jeûne prolongé (**Pillon and Buxeraud, 2013**).
- **Les complications chroniques du diabète de type 2** : ce sont les conséquences principales du DT2 qui se manifestent à long terme après une exposition à des concentrations sanguines de sucre durablement trop élevées, ce qui provoque une atteinte à la fois des petits vaisseaux sanguins (microangiopathie) et des artères principales (macroangiopathie) (**Fowler, 2008**) :
- Complications microangiopathiques : l'atteinte des petits vaisseaux se traduit au niveau des yeux, plus particulièrement les vaisseaux de la rétine et du cristallin. Elle touche également les reins, ce qui peut entraîner une insuffisance rénale : le diabète est la cause principale de mise sous dialyse. L'atteinte des petits vaisseaux provoque également des lésions des nerfs des pieds et des jambes, ce qui se traduit par une perte de sensibilité et des sensations douloureuses ou de fourmillement. La cicatrisation des plaies et des blessures est ralentie et la peau se défend moins efficacement contre les infections. Les infections de la bouche (gingivites et parodontites) sont plus fréquentes (**Schlienger, 2013**).
 - Complications macroangiopathiques : l'atteinte des artères principales de moyen et gros calibre et qui regroupe les artères coronaires, les artères à

destinée cervicale et les artères des membres inférieures. L'atteinte de ces artères se traduit par leur rétrécissement et peut entraîner un infarctus, un accident vasculaire cérébral ou une mauvaise circulation dans les artères des jambes (artérite) (**Chawla *et al.*, 2016**).

5. Traitement du diabète de type 2

Le diabète de type 2 doit être pris en charge précocement afin de ralentir l'évolution et de limiter les complications. Le traitement doit comprendre le suivi des règles hygiéno-diététiques et la prise des antidiabétiques oraux, comme il peut être traité par une insulinothérapie (**Baudet *et al.*, 2012**).

5.1. Règles hygiéno-diététiques

Le premier traitement pour le DT2 exige le respect des règles hygiéno-diététiques qui ont deux objectifs principaux. Le premier vise à diminuer l'insulinorésistance en réduisant une éventuelle surcharge pondérale et le deuxième à éviter les pics hyper glycémiques notamment pendant nuit et après les repas. Pour ce, il faut respecter un programme alimentaire établi par un médecin nutritionniste, accompagné d'une activité physique très régulière : marche, vélo, natation, gymnastique, etc (**Scheen, 2002 ; Baudet *et al.*, 2012 ; Scheen, 2015**).

5.2. Antidiabétiques oraux

Si les règles hygiéno-diététiques ne sont pas efficaces au bout de 3 mois, il sera alors nécessaire d'associer un traitement médicamenteux qui se compose des antidiabétiques oraux (ADO). Il y a quatre familles de médicaments ADO : les biguanides, les sulfamides, les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase et les glinides. Chacun de ces ADO a un mode d'action bien déterminé, à savoir (**Scheen, 2002 ; Scheen, 2015**) :

- L'amélioration de la sensibilité à l'insuline par les biguanides (la Metformine) se fait par l'intermédiaire de 3 mécanismes. En effet, les biguanides agissent dans un premier lieu en réduisant la production hépatique de glucose, en inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolysen. Ensuite, ils agissent au niveau musculaire par l'augmentation de la sensibilité à l'insuline et par la captation et l'utilisation périphérique du glucose. Aussi, les biguanides agissent en retardant l'absorption intestinale du glucose. Les effets secondaires de ces ADO sont une anorexie qui peut entrainer un amaigrissement modéré,

un goût métallique, des nausées, des vomissements, une douleur abdominale ainsi qu'une diarrhée. L'effet indésirable le plus grave des biguanides est l'acidose lactique. De plus, cet ADO est contre-indiqué chez les sujets âgés, les insuffisants rénaux, les insuffisants hépatiques, en cas de troubles cardiaques ischémiques, troubles respiratoires, grossesse, etc. Il doit être interrompu avant une injection d'iode (pour un examen radiologique) et évité avant une intervention chirurgicale (**Gan et al., 1992 ; Buyschaert, 2006**).

- La stimulation de la sécrétion de l'insuline qui se fait par les sulfamides et les glinides, qui ont une durée d'action plus ou moins longue, selon le composé. Ils agissent directement sur le pancréas en stimulant la sécrétion d'insuline. Ils sont toujours débutés à petite dose à cause du risque d'hypoglycémie. Ces médicaments sont plus efficaces chez les sujets sans ou avec peu de surpoids. Ils sont contre-indiqués chez les sujets âgés et chez les sujets ayant une insuffisance rénale avancée, une insuffisance hépatique, lors d'une grossesse ou d'une allergie aux sulfamides. Ils sont susceptibles de présenter de nombreuses interactions avec d'autres médicaments qui exposent à des risques d'hypoglycémie (**Harde et al., 1994 ; AFSSPS, 1999**).

- La diminution de la digestion et de l'absorption des glucides qui est réalisée par les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase qui agissent essentiellement sur l'augmentation de la glycémie postprandiale, parce qu'ils ralentissent l'absorption des glucides contenus dans l'alimentation. Les effets secondaires sont surtout digestifs (ballonnement, flatulence). Les contre-indications sont l'insuffisance rénale sévère, les syndromes sub-occlusifs (arrêt progressif ou brutal du transit intestinal), les troubles de malabsorption etc. (**Gérard, 2005**).

5.3. Insulinothérapie du diabète de type 2

L'insulinothérapie dans le diabète de type 2 est indiquée lorsque les objectifs glycémiques et/ou d'hémoglobine glyquée ne sont pas atteints sous traitement oral. En effet, les personnes atteintes du diabète de type 2 peuvent avoir besoin des injections d'insuline lorsque le régime alimentaire, l'activité physique et les antidiabétiques oraux n'aboutissent pas à réguler le taux de glucose dans le sang (**Philips et al., 2005 ; Grimaldi, 2011 ; Monnier et Colette, 2014**).

6. Conclusion

La plupart d'antidiabétiques oraux qui sont connus dans le marché pharmaceutique peuvent provoquer plusieurs effets secondaires. De ce fait, et malgré le développement de la

médecine moderne, la santé de l'Homme est toujours menacée par le diabète et ses complications, d'où la nécessité de chercher d'autres solutions moins coûteuses et plus efficaces.

Chapitre 2 : Stress oxydatif

1. Introduction

Le stress oxydant est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. En effet, le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. Tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont des substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène et nos cellules savent normalement comment s'en débarrasser (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**). Cependant, le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposant pas des ressources antioxydantes telles que les vitamines, les oligoéléments ou des quantités d'enzymes suffisantes pour ces radicaux libres (**Favier, 2003**).

Dans le présent chapitre, nous allons définir les radicaux libres, ainsi que les différents antioxydants qui existent et leurs mécanismes de réduction des radicaux.

2. Radicaux libres

2.1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires sur leurs couches externes (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). La présence de ces électrons célibataires confère aux radicaux libres une grande instabilité et réactivité. Ils retrouveront leurs stabilités en participant à des réactions chimiques dont la conséquence est l'oxydation des lipides membranaires, l'oxydation des acides aminés composant les protéines et l'oxydation des glucides composant les acides nucléiques (**Tremellen, 2008**).

De façon générale, les radicaux libres contribuent au stress oxydatif par une série de réactions en chaîne. Ils peuvent être dérivés d'atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote ERA), ou dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO ou ROS) :

- Les radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, les radicaux hydroxyles HO^{\cdot} , peroxyde ROO^{\cdot} , alkoxyde RO^{\cdot}) ;
- Les dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxygène singulier 1O_2 et le nitroperoxyde (ONOOH), mais qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux libres (**Favier, 2003**).

2.2. Sources des espèces réactives d'oxygène

Plusieurs facteurs responsables de la production des radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, dont nous citons :

- Les facteurs exogènes qui peuvent être représentés par des agressions environnementales, des pollutions, des produits chimiques, ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (**Castronovo, 2003**) ;
- Les facteurs endogènes qui se déclenchent dans l'organisme où il y a de nombreuses sources d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont l'importance varie selon les tissus et les organites, que ce soit au niveau des mitochondries, des membranes, du réticulum endoplasmique, ou tout simplement dans le cytosol. D'une manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés (**Castronovo, 2003**). Le tableau ci-dessous résume la majorité des facteurs endogènes produisant les ERO ainsi que leurs mécanismes.

Tableau 1 : Facteurs endogènes produisant les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Facteurs endogènes	Mécanismes
Ions métalliques (le fer et le cuivre)	Le fer et le cuivre sont des promoteurs des processus radicalaires, ils transforment le H ₂ O ₂ en radical hydroxyle (OH [•]) qui est plus toxique (Fontaine et al., 2002).
Peroxisome	C'est un organite qui contient de nombreuses enzymes générant l'H ₂ O ₂ , toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation (Servais, 2004).
Cytochrome P450	Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques et produit ainsi des ROS (Servais, 2004).
Xanthine oxydase	La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ROS en réduisant l'hypo xanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Mc Nally et al., 2003).

Lipoxygénase et acide arachidonique	L'acide arachidonique provenant de l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A2 est le substrat de la lipoxygénase pour la synthèse des leucotriènes. Cette synthèse met en jeu une série d'oxydation qui implique la production des ROS (Marnett, 1999).
Oxydes nitriques synthases	Beaucoup de cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO [*]) à partir de l'arginine et de l'oxygène, dans une réaction catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS). Cette dernière est capable de générer des anions superoxydes dans des situations de déficit de son substrat, L-arginine, ou de ses cofacteurs d'activation (Xia et al., 1998).
Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale	La mitochondrie est un organite intracellulaire qui est responsable de la majorité de la production de l'énergie. Elle est considérée comme une des principales sources des ROS dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale où 1 à 2% de l'oxygène consommé est convertie en O ₂ [*] ; essentiellement à travers la fuite des électrons au cours de leurs transferts au niveau de cette chaîne (Chance et al., 1979).

2.3. Dommages oxydatifs

En absence d'antioxydants, les radicaux libres ne retrouvent leurs stabilités qu'en participant à des réactions chimiques dont les conséquences sont très néfastes et dont nous citons :

- **L'oxydation des lipides** : les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des espèces oxygénées activées en raison de leurs hydrogènes bis-allylique facilement oxydable. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives : initiation, propagation et terminaison (**Halliwell, 1999**). La phase d'initiation consiste en une déshydrogénation d'un acide gras (LH) en un radical d'acide gras (L^{*}), provoquée par un initiateur radicalaire tel que le ^{*}OH et le HOO^{*}. Le radical lipidique L^{*} subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical plus stable, qui peut réagir avec une molécule d'O₂ et former un radical peroxyde (LOO^{*}) (**Esterbauer et al., 1992**), ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau un hydrogène d'un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. Il est généralement admis que chaque radical R^{*} peut être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxyde avant que la phase de terminaison survienne. L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de

transition divalents de Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîne la formation d'alcalanes et d'aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) qui est un marqueur de la peroxydation lipidique (**Marnett, 1999**) et qui peut réagir avec les protéines et l'ADN. Cette réaction est à l'origine de la formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ceux-ci s'accumulant dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité, et sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise. Si les dégâts sont trop importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule. Les peroxydes lipidiques peuvent aussi réagir avec d'autres composés cellulaires et être à l'origine de molécules très toxiques, par exemple, ils peuvent réagir avec l'ADN et être à l'origine de substances mutagènes.

- **L'oxydation des protéines** : en présence d'EOA, les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leurs structures primaires et secondaires. Ces modifications provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans les protéines (**Levine, 2002**). Elles sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Fe^{2+} ou le Cu^{2+} . De telles modifications conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (**Levine, 2002**) et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du GSH ou de certaines protéines, ce qui conduit à un dysfonctionnement qui peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (**Delattre et al., 2005**).
- **L'oxydation de l'ADN** : l'ADN nucléaire et mitochondrial constitue une cible cellulaire importante des ERO. Cinq classes principales des dommages oxydatifs de l'ADN qui sont causés par l' OH^\bullet peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Cadet et al., 2002**). Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîne l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées. Les ERO peuvent aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (**Cadet et al., 2002**). Ainsi, la dénaturation de l'ADN par le stress oxydatif est un facteur déclenchant plusieurs maladies telles que le diabète et le cancer (**Favier, 2003**).

3. Antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui ralentissent ou empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques à leur contact. Ils sont capables d'arrêter plusieurs réactions en se réduisant avec les radicaux libres et altérants ainsi leur action. Les antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003**). Ils peuvent être naturelles ou même synthétiques. Leur mode d'action peut reposer sur un système enzymatique qui est la première ligne de défense ou un système non enzymatique fait des molécules piégeuses d'électrons.

3.1. Antioxydants enzymatiques

Pour contrôler la production des radicaux libres, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense enzymatique qui possèdent une grande affinité pour ces radicaux et qui permettent ainsi de maintenir leurs concentrations à un taux basal (homéostasie physiologique) (**Figure 1**). Parmi les systèmes de défense enzymatiques, nous citons :

- **Les superoxydes dismutases (SOD)** : les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (**Joel *et al.*, 2002**)
- **La catalase (CAT)** : c'est une protéine hémunique dépendante du Fe, qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle prévient l'accumulation de H₂O₂ pour former le OH·. Cette enzyme est surtout présente dans les peroxysomes, là où le H₂O₂ est formé en grande quantité lors de l'oxydation des acides gras (**Joel *et al.*, 2002**).
- **Le glutathion peroxydase (GSH-Px)** : la glutathion peroxydase est une enzyme antioxydante du plasma, des fluides extracellulaires et du cytosol, dépendante du sélénium (**Sayre *et al.*, 2005**). Elle catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène H₂O₂ et lipidiques ROOH respectivement en eau et en alcool ROH. Cette réaction met en jeu une molécule antioxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite GSH (**Rush et Sandiford, 2003**).

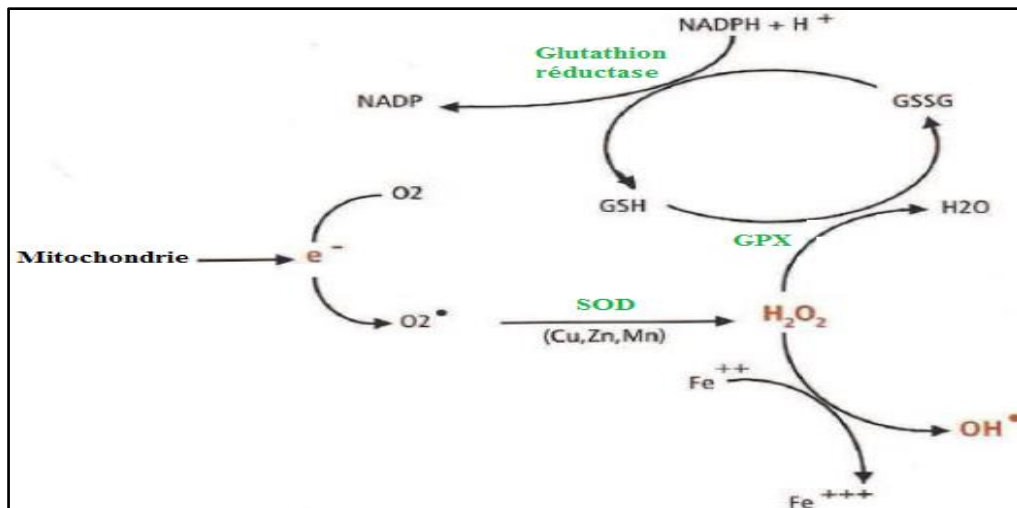


Figure 1 : Systèmes antioxydants enzymatiques (Medart, 2009)

3.2. Antioxydants non-enzymatiques

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces oxygénées réactives. Il s'agit de composés facilement oxydables qui peuvent être endogènes ou exogènes :

3.2.1. Antioxydants endogènes

Les antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols :

- **Glutathion** : thiol majoritaire, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir *in vivo* avec les radicaux OH^{\bullet} , RO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} , 1O_2 , $ONOO^{\bullet}$, des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux $HOCl$ (Delattre *et al.*, 2005).
- **Acide lipoïque** : composé appartenant aux thiols, ses deux formes oxydée et réduite présentent des propriétés antioxydantes *in vitro* en piégeant les OH^{\bullet} , RO_2^{\bullet} , l' $HOCl$ et l' 1O_2 . En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (Packer *et al.*, 2001).
- **Acide urique** : présent sous forme d'urate à pH physiologique, il possède des propriétés antioxydantes *in vitro* contre les OH^{\bullet} et RO_2^{\bullet} , tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine (Delattre *et al.*, 2005).

3.2.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et les composés phénoliques (Valko *et al.*, 2006) :

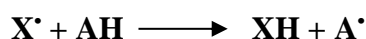
- **Vitamine C ou acide ascorbique** : c'est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes et elle est non synthétisée par l'Homme. Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky *et al.*, 1999). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle, stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée (Valko *et al.*, 2006).
- **Vitamine E** : c'est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules, dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols) (Macheix *et al.*, 2005). Ce sont de bons antioxydants alimentaires, ils sont surtout connus pour leurs rôles physiologiques chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines. Elles préviennent l'apparition d'hydroperoxydes (Medart, 2009).
- **Caroténoïdes** : ce sont des pigments issus des plantes et microorganismes et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature (Silva et Costa, 2010).
- **Composés phénoliques** : constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique leur nom, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques associés en structures plus ou moins complexes. Ils peuvent aller des molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de trente mille daltons, comme les tanins (acide tannique). Il existe différentes classes de composés phénoliques, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols (Macheix *et al.*, 2005). Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, ils jouent le rôle d'antioxydants naturels par leur faculté à achever les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons (Leopoldini *et al.*, 2011). Cet effet antioxydant suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement de maladies telles que le diabète, le cancer, les maladies inflammatoires et cardiovasculaires.

3.3. Mécanismes de réactions des antioxydants

Les antioxydants peuvent inhiber les radicaux libres suivant deux principaux mécanismes : les réactions de transfert d'électrons et les réactions de transfert d'ions d'hydrogène (H⁺). Le résultat final est le même quel que soit le mécanisme, mais la cinétique et le potentiel de réactions secondaires sont différents. Les deux mécanismes peuvent se produire en parallèle, et le mécanisme dominant dans un système donné sera déterminé par la structure et les propriétés de l'antioxydant, sa solubilité et le système du solvant. L'énergie de dissociation et le potentiel d'ionisation sont les deux facteurs majeurs qui déterminent le mécanisme et l'efficacité d'un antioxydant (**Wright et al., 2001**).

3.3.1. Réactions de transfert de proton d'hydrogène

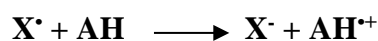
Elles mesurent la capacité d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres par le transfert d'un proton hydrogène (AH = H⁺ + A⁻ donneur) (**Prior et Schaich, 2005**).



Où X[•] est le radical libre et AH l'antioxydant. Elles sont indépendantes du pH et du solvant et sont généralement assez rapides et durent quelques secondes à quelques minutes. La présence d'agents réducteurs, y compris les métaux, complique ce genre de réactions et peut conduire à une très forte réactivité apparente (**Prior et Schaich, 2005**).

3.3.2. Réactions de transfert d'électrons

Elles mesurent le potentiel d'un antioxydant à transférer un électron et réduire n'importe quels composés à savoir les métaux, les carbonyles et les radicaux (**Prior et Schaich, 2005**).



Où X[•] est le radical libre et AH l'antioxydant. Cette réaction est dépendante du pH et la réaction de terminaison est souvent très lente. Les traces de composants et contaminants, en particulier les métaux, interfèrent avec les réactions de transfert d'électrons et peuvent donner lieu à une grande variabilité des résultats (**Prior et Schaich, 2005**).

4. Conclusion

Le stress oxydatif est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques, ce qui provoque des dommages oxydatifs qui sont potentiellement impliqués dans l'apparition et la complication de nombreuses maladies métaboliques. Cependant, les antioxydants jouent le rôle d'agent qui stabilisent les radicaux et ramènent le taux de stress oxydatif à la normale en permettant d'éviter l'apparition et la complication des maladies métaboliques, notamment le diabète.

A cet effet, il est impératif de bien comprendre la relation entre le diabète et le stress oxydatif et de savoir comment ce dernier peut engendrer l'apparition du diabète, ainsi que ses complications micro et macro vasculaires.

Chapitre 3 : Relation diabète et stress oxydatif

1. Introduction

Le stress oxydatif est impliqué dans plusieurs maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications comme dans le cas du diabète (**Favier, 2003**). De même, l'état d'hyperglycémie chronique du diabète sucré conduit à un stress oxydatif incluant plusieurs mécanismes telles que l'auto-oxydation du glucose, voie des polyols, voie de la protéine kinase C (PKC), voie des hexosamines et glycations des protéines (**Delattre, 1999 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2004**). Ces phénomènes sont développés dans le présent chapitre 3 :

2. Auto-oxydation du glucose

Sous la forme linéaire, le glucose possède une fonction aldéhyde et une fonction hydroxyle adjacente en équilibre avec la forme éne-diol. Lorsque le glucose se trouve en excès sous la forme éne-diol et en présence de métaux de transition, il entraîne la génération du radical anionique éne-diol qui est responsable de la réduction de l'oxygène et de la libération des anions superoxydes (**Hunt et Wolff, 1991**). Cette réaction peut conduire à une accumulation de la glycéraldéhyde-3- phosphate qui est ensuite converti en méthylglyoxal. Cette molécule est capable d'attaquer les protéines provoquant ainsi leurs glycation (**Maessen et al., 2015**).

3. Voie des polyols ou voie de l'aldose réductase

Dans des conditions physiologiques normales, le glucose est métabolisé en glucose-6 phosphate par l'hexokinase (voie de la glycolyse et voie des pentoses). Cependant, ces voies sont inhibées dans le cas du diabète à cause de la saturation de l'hexokinase, ce qui fait activer la voie des polyols (**Burg, 1995**) (**figure 2**). Cette voie fait intervenir deux enzymes, qui sont :

- L'aldose réductase : réduit le glucose en sorbitol (**King et Brownlee, 1996**). Le donneur d'hydrogène est le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) qui est oxydé en NADP^+ ;
- Le sorbitol déshydrogénase : oxyde une partie du sorbitol formé en fructose, en utilisant le NAD^+ comme cofacteur.

L'activation de la voie des polyols qui est dû en principe à une hyperglycémie peut avoir des effets néfastes (**Brownlee, 2001**). La principale conséquence est la modification du statut redox de la cellule. En effet, cette voie consomme du NADPH et du NAD⁺ au détriment d'autres réactions qui nécessitent ces mêmes cofacteurs. En particulier, la GSSG réductase, enzyme majeure pour la régénération du GSH, utilise des niveaux élevés de NADPH. La diminution des ressources en NADPH pour le cycle redox du glutathion pourrait augmenter le stress oxydant dans de nombreux tissus et contribuer ainsi à la pathogenèse des complications diabétiques (**Bravi et al., 1997 ; Brownlee, 2005**).

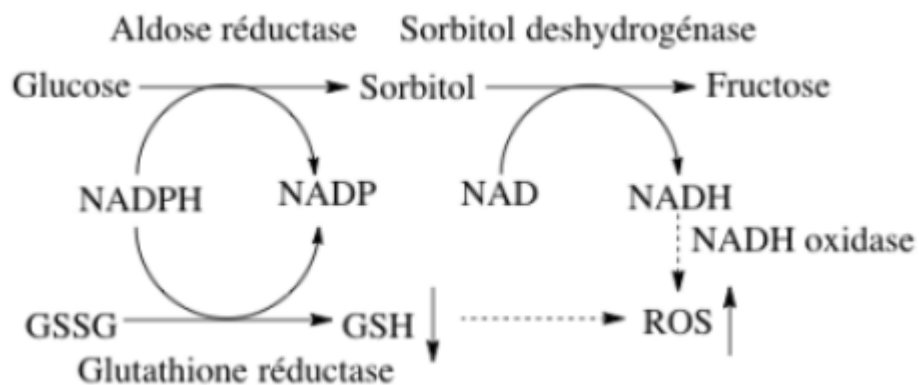


Figure 2 : Voie des polyols (Burg, 1995)

4. Voie de la protéine kinase C (PKC)

Dans le cas d'hyperglycémie, le glucose en excès entraîne une augmentation via la glycolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate, ce dernier est un précurseur du diacylglycerol, qui est un cofacteur activateur de la PKC (**Xia et al., 1994 ; King et Brownlee, 1996 ; Naruse, 2006**).

L'activation du PKC entraîne :

- L'augmentation de la production des ERO par l'augmentation de l'activité NADPH oxydase ;
- L'apparition des inflammations par l'augmentation de la synthèse du facteur pro-inflammatoire NFkB ;
- L'installation de l'insulino-résistance par la diminution de l'expression d'oxyde nitrique synthase endothélial (eNOS).

5. Voie des hexoamines

Le glucose en excès peut être détourné de la glycolyse au profit de la voie des hexosamines. L'activation de cette voie au cours de l'hyperglycémie est induite soit par une baisse du rapport NAD^+/NADH , H^+ par la voie des polyols, ou par l'augmentation de la formation des ERO (Delattre *et al.*, 2005 ; Mohora *et al.*, 2007). Ces derniers altèrent l'activité du Glyceraldehyde-3-P déshydrogénase, entraînant l'accumulation du fructose-6 phosphate qui sera converti en glucosamine-6-phosphate par l'enzyme glutamine-fructose-6-phosphate aminotransférase intervenant dans l'étape limitante du catabolisme du fructose (Du, 2000). De plus, il a été montré que la glucosamine, le produit de cette voie, inhibe l'activité de l'enzyme clé de la voie de pentose, la glucokinase déshydrogénase, nécessaire à la réduction du NADP^+ en NADPH , donc l'activation de la voie des hexosamines est couplée d'une baisse du rapport $\text{NADPH}^+/\text{NADP}$ d'où une augmentation du stress oxydant soit par la diminution de la régénération du GSH à partir du GSSG ou par la diminution de la disponibilité du NADPH^+ , ce qui diminue l'activité de certaines enzymes antioxydantes (figure 3) (Delattre *et al.*, 2005 ; Mohora *et al.*, 2007).

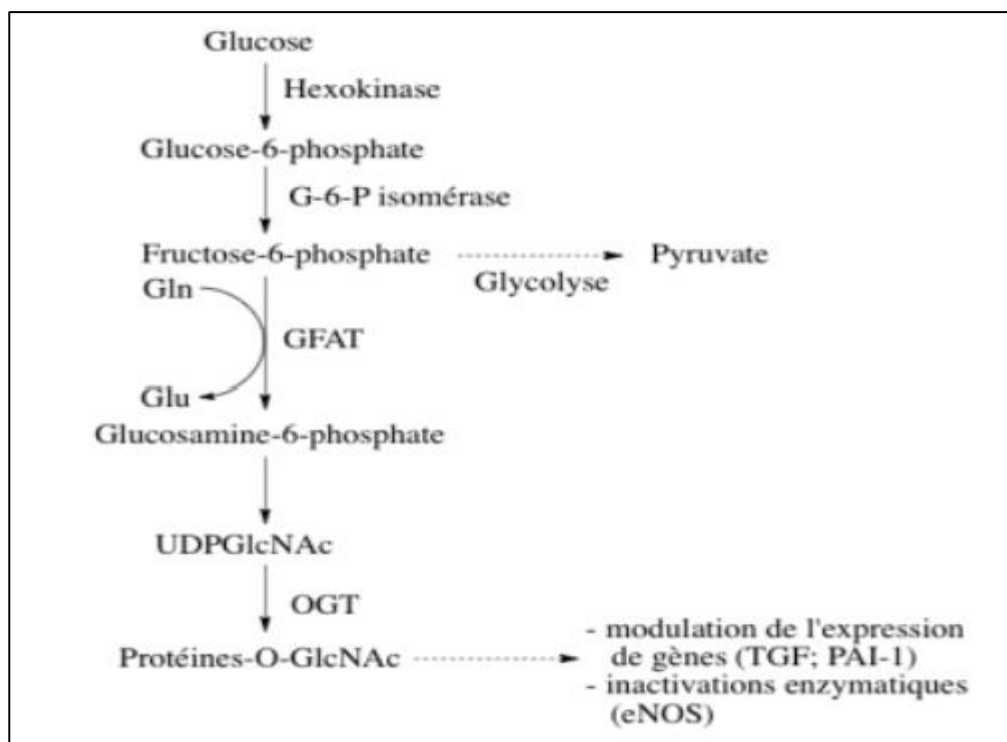


Figure 3 : Voie des hexosamines (Kaneto *et al.*, 2001)

6. Glycation des protéines et formation des AGEs

Lors de l'hyperglycémie de nombreuses protéines subissent le phénomène de glycation qui est considérée comme la principale altération qui affecte les protéines tel que l'albumine et l'hémoglobine (**Brownlee et Cerami, 1981**). La glycation des protéines est un processus qui se déroule en trois étapes de différentes durées ; commençant par la condensation rapide de glucose et des fonctions amines (quelques heures), et aboutissant à la formation de la base Schiff qui se réarrange en produit d'Amadori. Ces derniers se dégradent en formant ainsi des intermédiaires qui réagissent avec les protéines pour former les protéines glyquées qui sont appelées les produits de Maillard ou produits de glycation avancées (AGEs) et qui sont fortement mutagènes et ne peuvent pas être détruit par le protéosome (**Figure 4**). Ces produits s'accumulent alors dans la cellule et peuvent entraîner un dysfonctionnement de son métabolisme, finissant par engendrer sa mort. Une fois formées, les protéines glyquées produisent des anions superoxydes, et se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques ce qui déclenche un stress oxydatif intracellulaire et en réagissant avec les radicaux libres oxygénés toute en provoquant de nombreux désordres métaboliques (**Gillery et al., 1988 ; Thornalley et al., 1999 ; Brownlee, 2001 ; Spínola et al., 2018**).

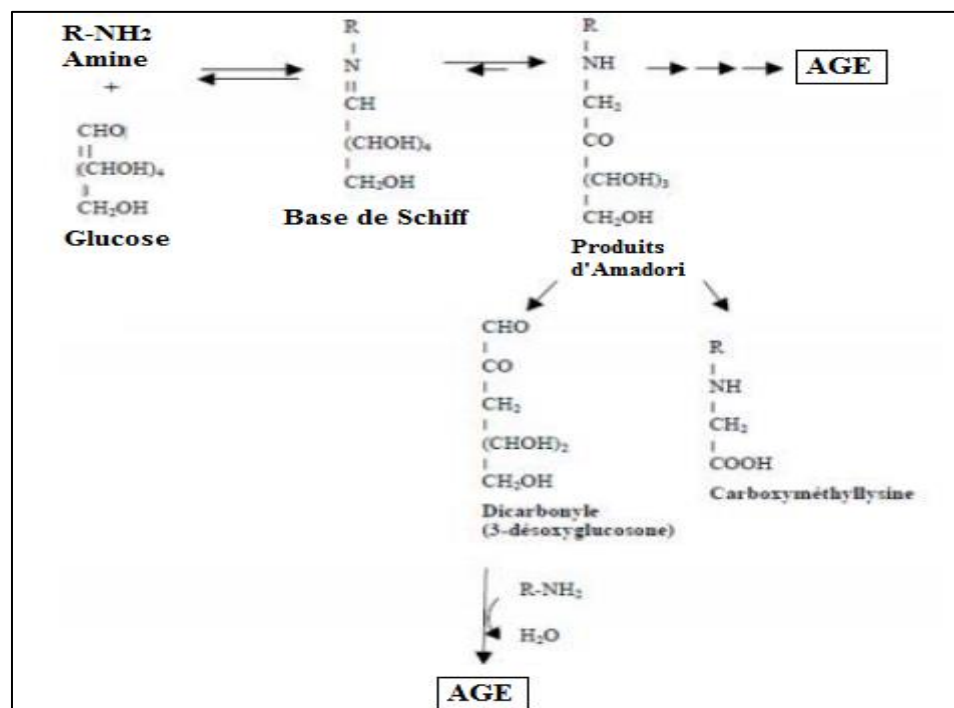


Figure 4 : Processus de glycation des protéines (Brownlee, 2001)

7. Conclusion

L'implication du stress oxydatif dans la maladie du diabète sucré est considérée comme le moteur mobilisant les différents facteurs pathologiques et les complications micro et macro-vasculaires du diabète.

De plus, les diabétiques ont une protection antioxydante déficiente qui augmente leur vulnérabilité aux dommages oxydatifs et favorise le développement des complications diabétiques. Pour cela, le traitement du diabète doit faire appel non seulement à un régime alimentaire équilibré et moins calorique, mais aussi à une alimentation riche en oligoéléments et en antioxydants. De même, le développement d'antidiabétiques oraux doit viser non seulement la réduction de l'hyperglycémie, mais aussi la réduction des radicaux libres afin de guérir le diabète et réduire ses complications, d'où le rôle de la phytothérapie qui peut être une source prometteuse d'antidiabétiques et d'antioxydants.

Chapitre 4 : Phytothérapie

1. Introduction

La phytothérapie est un terme grec qui se compose étymologiquement de deux parties : *phuton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement". C'est la thérapie qui se base sur les vertus thérapeutiques des plantes et de leurs extraits pour le traitement et la prévention des maladies. En effet, les chercheurs ont su acquérir la connaissance des plantes et de leurs propriétés thérapeutiques, où plusieurs travaux ont dévoilé les secrets des plantes médicinales et étudié la pharmacopée traditionnelle d'un point de vue biologique, chimique et pharmacologique (Bellakhdar, 1997 ; 2006). Ainsi, l'efficacité de la médecine par les plantes est reconnue et démontrée scientifiquement et ses bienfaits incontestables pour la santé ont permis à la phytothérapie d'entrer dans notre vie quotidienne pour le traitement des maladies dont le diabète et son moteur déclenchant qui est le stress oxydatif.

Le chapitre 4 sera consacré à l'utilisation des plantes dans la médecine traditionnelle pour le traitement du diabète et du stress oxydatif. Aussi, nous allons présenter le rôle des plantes toxiques dans la pharmacopée traditionnelle et nous allons terminer ce chapitre par la présentation de la plante *Atractylis gummifera* L., objet de cette étude.

2. Phytothérapie du diabète

Les plantes médicinales sont employées pour le traitement du diabète dans beaucoup de pays. Environ 1200 plantes, couvrant 725 genres différents et 183 familles de plantes dans le monde sont jugées bénéfiques pour les diabétiques et utilisées à travers le monde (Kooti *et al.*, 2016). Au Maroc, plusieurs études ethnobotaniques ont permis d'identifier les plantes médicinales utilisées par la population marocaine à des fins antidiabétiques. Dans le **tableau 2**, nous présentons les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement du diabète, leurs noms vernaculaires, ainsi que la partie utilisée de la plante (Bellakhdar, 1997 ; Jouad *et al.*, 2001 ; Hmamouchi, 2001 ; Bammou *et al.*, 2015 ; Kooti *et al.*, 2016 ; Kharchoufa *et al.*, 2018 ; Fouad et Lahcen, 2020).

Tableau 2 : Plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement du diabète

Nom scientifique de la plante	Nom vernaculaire	Partie utilisée de la plante	Références
<i>Ammi visnaga Lam.</i>	<i>Bachnikha,</i> <i>Tab'chnikh't</i>	L'ombelle et la graine	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002 ; Nassiri <i>et al.</i> , 2016)
<i>Foeniculum vulgare Gaertn</i>	<i>Nafaâ El-beldi,</i> <i>Bessbass</i>	Graines	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014 ; Hachi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Nerium oleander L.</i>	<i>Ddeflâ, ariri,</i>	Feuilles	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014 ; Hachi <i>et al.</i> , 2015 ; Khabbach <i>et al.</i> , 2012)
<i>Eruca sativa Mill</i>	<i>Ajarjir</i>	Partie aérienne	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)
<i>Brassica oleracea L. subsp. oleracea</i>	<i>Kroumb</i>	Partie aérienne	(Zeggwagh <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lepidium sativum L.</i>	<i>Hebb rchad</i>	Graines	(El Alami et Chait 2017).
<i>Opuntia ficus indica Mill</i>	<i>Hendiya</i>	Fleurs	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)
<i>Capparis spinosa L</i>	<i>Kebbar</i>	Fruit	(Slighoua <i>et al.</i> , 2019)
<i>Herniaria glabra L.</i>	<i>Hrasset lehjer</i>	Partie aérienne	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002)
<i>Chenopodium ambrosioides L.</i> <i>= Dysphania ambrosioides (L)</i> <i>Mosykin</i>	<i>Mkhinza</i>	Feuilles, fleurs	(El Alami et Chait 2017).
<i>Artemisia absinthium L.</i>	<i>Chiba, ch'hiba</i>	Tige feuillée	(Zeggwagh <i>et al.</i> , 2013)
<i>Artemisia herba alba Asso</i>	<i>Chih.Dwidi,</i> <i>Izri</i>	Partie aérienne	(Eddouks <i>et al.</i> , 2014 ; Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014 ; Salhi <i>et al.</i> , 2011 ;)

<i>Atractylis gummifera L.</i>	<i>Addad</i>	Rhizome	(Jouad <i>et al.</i> , 2001 ; Nassiri <i>et al.</i> , 2016 ; El Alami et Chait 2017) ;
<i>Cynara cardunculus L</i>	<i>Khorchef</i>	Rhizome	(El Amrani <i>et al.</i> , 2010)
<i>Citrullus colocynthis Schrab.</i>	<i>L-hdeja, taferzizt , Hantal</i>	Pulpe et Graines	(Salhi <i>et al.</i> , 2011 ; Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014)
<i>Crocus sativus L.</i>	<i>Zaefran hor</i>	Stigmates de la fleur	(Hachi <i>et al.</i> , 2011 ; Eddouks <i>et al.</i> , 2014)
<i>Tetraclinis articulata Benth.</i>	<i>Al-ar'ar, amelzi</i>	Feuilles	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002)
<i>Cuscuta epithimum Mur.</i>	<i>Hrir eddib, âksût</i>	Partie aérienne	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)
<i>Arbutus unedo L.</i>	<i>Sasnou, mrouna, bakhnou</i>	Feuilles	(El Alami et Chait 2017).
<i>Centaureum erythraea Rafn.</i>	<i>Gusset l'hayya</i>	Partie aérienne	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014)
<i>Globularia alypum L.</i>	<i>Ain larneb</i>	Feuilles	(El Alami et Chait 2017).
<i>Juglans regia L.</i>	<i>Guergaâ</i>	Fruit	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)
<i>Ajuga iva (reptans) (L)Schrab</i>	<i>Chendgûra, Tûf tolba</i>	Partie aérienne	(Eddouks <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lavandula dentata L.</i>	<i>El-khzama, Ja'da</i>	Partie aérienne	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014)
<i>Marrubium vulgare L.</i>	<i>Merriwa, Merriwta</i>	Partie aérienne	(Mikou <i>et al.</i> , 2016)
<i>Mentha pulegium L.</i>	<i>Fliyyo</i>	Partie aérienne	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014)
<i>Salvia officinalis L.</i>	<i>Ssâلمييا</i>	Feuilles	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014 ; Hachi <i>et al.</i> , 2015 ; khabbach <i>et al.</i> , 2012)

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Yazir	Partie aérienne	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002)
<i>Origanum compactum</i> Benth.	Zaatar	Feuilles	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002)
<i>Glycine max</i> (L.) Merr	Soja	Fruit	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	<i>L-halba</i> <i>Tifiddas</i>	Graines	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014 ; Khabbach <i>et al.</i> , 2012 ; Eddouks <i>et al.</i> , 2014 ; Salhi <i>et al.</i> , 2010 ; Hachi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Allium sativum</i> L.	Touma	Bulbe	(El Amrani <i>et al.</i> , 2010)
<i>Allium cepa</i> L.	<i>L-basla</i>	Bulbe	(El Amrani <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ficus carica</i> L.	<i>EL-Karmous</i>	Feuilles, Fruit	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014)
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill (sp.)	<i>Kalybtus</i>	Feuilles	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002)
<i>Myrtus communis</i> L.	<i>Raihane</i>	Feuilles	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002)
<i>Olea europaea</i> L.	<i>Zaytûn,</i>	Feuilles, huile d'olive	(El Amrani <i>et al.</i> , 2010)
<i>Sesamum indicum</i> Dc.	<i>Jenjlan</i>	Graines	(Mechchate <i>et al.</i> , 2020)
<i>Nigella sativa</i> L.	<i>Haba ssawda,</i> <i>Ssanûj</i>	Graines	(Benkhnigue <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ziziphus lotus</i> L.	<i>Sedra, Nbeg</i>	Feuilles, fruit	(El Amrani <i>et al.</i> , 2010)
<i>Calluna vulgaris</i> Pers.	<i>Khalj</i>	Fruit	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)
<i>Fragaria vesca</i> L.	<i>Fraiz berri</i>	Fruit	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)
<i>Prunus amygdalus stokes</i> var. <i>amara</i> CD.	<i>Lûz-murr</i>	Feuilles, graines	(Eddouks <i>et al.</i> , 2002)
<i>Citrus bigaradia</i> Duch	<i>Ranj, Zenboue</i>	Fruit	(Benkhnigue <i>et al.</i> ,

= <i>C. vulgaris</i> Risso			2014)
= <i>C. aurantium</i> L.			
<i>Urtica pilulifera</i> L.	Harrigua	Feuilles, graines	(Jouad <i>et al.</i> , 2001)

De nombreux remèdes contre le diabète sont préparés à base de ces plantes, mais peu ont fait l'objet d'une vérification scientifique pour évaluer leurs efficacités.

Cependant, devant l'augmentation considérable du nombre de diabétiques, 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 pour le traitement du diabète de type 2. Ainsi, le comité d'expert sur le diabète de l'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé l'utilisation d'hypoglycémiant d'origine végétale du fait qu'ils sont plus efficaces et moins toxiques (Atanasov *et al.*, 2015 ; World Health Organization, 2019). De plus, l'effet hypoglycémiant de certains extraits de plantes a été confirmé par plusieurs études scientifiques et médicales, telles que *Momordica charantia* de la famille des *Curcubitacées* qui a été objet de plusieurs études scientifiques qui ont confirmé son effet hypoglycémiant (Mahmoud *et al.*, 2017 ; Gao *et al.*, 2018 ; Peter *et al.*, 2019) ; les Liliacées avec *Allium cepa* dont les études sont très poussées sur l'activité antidiabétique (Dureshahwar *et al.*, 2017 ; Pradeep *et al.*, 2019) et sans oublier *Galega officinalis* (galéga) qui est à l'origine de la Metformine (Glucophage) ; antidiabétique orale de la classe des biguanides employée dans le traitement du DT2 (Marles *et al.*, 1994 ; Bailey, 2017).

3. Phytothérapie et stress oxydatif

Comme nous l'avons souligné précédemment dans le **chapitre 2** (Stress oxydatif), les radicaux libres se forment tout à fait normalement dans notre organisme. Cependant, ils doivent être rigoureusement contrôlés par les antioxydants qui peuvent être de nature endogène et exogène.

Les antioxydants endogènes de nature protéique, d'enzymes et d'agents oxydables, se présentent comme de petits soldats qui travaillent en synergie afin de nettoyer l'organisme des radicaux indésirables. Cependant, une réelle efficacité ne peut être atteinte qu'avec la synergie des antioxydants exogènes qui comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et les composés phénoliques. Ces derniers sont des substances naturelles

extraites des plantes ou de leurs extraits (Valko *et al.*, 2006). Les plus connues de ces substances sont :

- La rutine et la quercétine qui sont extraites de plusieurs plantes dont la pelure du raisin (*Vitis vinifera*) (Zeghad *et al.*, 2019), le gingko (*Gingko biloba*) (Wang *et al.*, 2017), le cassis (*Ribes nigrum*) (Adina *et al.*, 2017), le chardon marie (*Carduus marianus*) (Morazzoni *et al.*, 1995), l'hamamelis (*Hamamelis virginiana*) (Tourinho *et al.*, 2008) ;
- Le bêta carotène qui est extrait de plusieurs végétaux à savoir les carottes (*Daucus Carota*) (Zaini *et al.*, 2012) et le citron (*Citrus limonum*) (Sajid *et al.*, 2016) ;
- Le lycopène qui est le pigment rouge des tomates (Pincemail *et al.*, 2007).

Les recherches sur les antioxydants naturels ont permis d'aboutir à la formulation d'antioxydants d'origine végétale tel que :

- **MelSod EXTRAMEL®** : antioxydant puissant de nature végétale, il est composé de concentré de jus de Melon (*Cucumis melo*), il est commercialisé en Union Européenne en flacon de 60 gélules ;
- **Lycopène+vitamine C 60 gélules** : composé d'extrait de tomate (*Lycopersicon Esculentum*) commercialisé au Maroc comme complément alimentaire et recommandé pour la protection des cellules contre le stress oxydatif ;
- **Ubiquinol Kaneka™ Micro-encapsulation Flash™ -100 mg** : gélule végétale produite à partir de fibre de gomme d'acacia, huile de colza et vitamine C naturelle, il est commercialisé en Union Européenne, au Canada et en Australie.

4. Plantes toxiques à usage thérapeutiques

Beaucoup de plantes toxiques ont été d'une grande utilité pour notre santé grâce au savoir botanique et la bonne maîtrise des doses thérapeutiques et des doses toxiques. Ainsi, diverses molécules extraites de plantes toxiques sont des principes actifs de plusieurs médicaments à savoir la Colchicine qui est un alcaloïde tricyclique très toxique, extrait au départ du colchique d'automne, *Colchicum autumnale* (Syn. *Colchicum multiflorum* Brot.) qui est une plante du genre *Colchicum* (Nuki, 2008), aussi les oléandrosides et les nériosides qui sont des hétérosides cardiotoniques qui ont une action digitalique et qui sont extraites du Laurier rose (*Nerium oleander*) qui est une des plantes les plus toxiques (Lemoine, 2004 ; Hammiche *et al.*, 2013) et même la fameuse *Mandragora officinarum* qui est une plante

très toxique et très utilisée à des fins criminelles s'est avérée bénéfique grâce à sa richesse en alcaloïdes tropaniques qui agissent sur le système nerveux (Suleiman *et al.*, 2010 ; Najem *et al.*, 2018).

C'est pour cette raison que notre laboratoire s'est intéressé à la valorisation des plantes toxiques afin de révéler leurs effets pharmacologiques. Parmi ces plantes toxiques, notre laboratoire s'est intéressé à *Peganum harmala*, qui est une des plantes les plus toxiques et qui a été valorisée par Lamchouri et ses collaborateurs pour ses activités biologiques *in vitro* et *in vivo* et aussi en définissant les doses thérapeutiques des doses toxiques (Lamchouri *et al.*, 1999 ; Lamchouri *et al.*, 2000 ; Lamchouri *et al.*, 2002 ; Lamchouri *et al.*, 2013 ; Lamchouri *et al.*, 2014). De plus, des alcaloïdes de type β -carboline dérivés de cette même plante ont été valorisés par des études expérimentales et de modélisation moléculaire par notre Laboratoire Matériaux, Substances Naturelles, Environnement et Modélisation (LMSNEM) (Akabli *et al.*, 2018 ; Akabli *et al.*, 2019) et également par d'autres chercheurs (Herraiz *et al.*, 2017 ; Onlu *et al.*, 2018). De même, notre laboratoire s'est intéressé à la valorisation d'une autre plante toxique nommée *Atractylis gummifera* L. que nous présentons ci-dessous.

5. Présentation de la plante étudiée : *Atractylis gummifera* L.

La présente étude s'est articulée autour d'une plante toxique largement utilisée pour ses effets thérapeutiques dans la médecine traditionnelle du pourtour méditerranéen et qui est nommée *Atractylis gummifera* L.

5.1. Classification systématique

Selon la troisième version de la classification botanique des angiospermes établie par l'Angiosperme Phylogénique Groupe (APG III) en 2009, *Atractylis gummifera* L. est une herbacée de la famille des Astéracées avec *Atractylis* comme genre et *gummifera* comme espèce (Dupont *et al.*, 2015). Les Astéracées (*Asteraceae*) sont une grande famille botanique de plantes dicotylédones, elles comprennent près de 23 500 espèces réparties en 1 600 genres environ, ce qui en fait la deuxième plus vaste famille du monde végétal et des plantes à fleurs, derrière les Orchidacées (25 000 espèces). Les principaux représentants de cette famille se développent essentiellement dans les régions sujettes à la sécheresse, en dehors de la compétition des arbres des forêts tropicales humides où *Atractylis gummifera* L.

occupe la troisième position dans la répartition des fréquences des espèces d'Astéracées (Bammou *et al.*, 2015). La classification de cette plante est résumée dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Classification systématique d'*Atractylis gummifera* L.

Classification Angiosperme Phylogénique Groupe (APG III)	
Règne	Plante
Branche	Embryophytes
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Atractylis</i>
Espèce	<i>Atractylis gummifera</i>
Variété	<i>Atractylis gummifera</i> L.

5.2. Nomenclature

Atractylis gummifera L. a plusieurs synonymes botaniques qui sont des noms latins (**tableau 4**) (Aït Youssef, 2006) et elle a aussi plusieurs appellations vernaculaires qui se diffèrent en fonction des pays, des régions et des langues et dialectes (**tableau 5**).

Tableau 4 : Synonymes botaniques d'*Atractylis gummifera* L.

Synonymes botaniques	<i>Atractylis gummifera</i> L.
	<i>Carlina gummifera</i> DC.
	<i>Carlina gummifera</i> Less.
	<i>Acarna gummifera</i> Brot.
	<i>Acarna gummifera</i> Willd.

Tableau 5 : Noms vernaculaires d'*Atractylis gummifera* L.

	Pays	Noms vernaculaires	Références
Noms arabes	Maroc	<i>chouk el heulk, el-'alk</i>	(Aït Youssef, 2006)
	Algérie	<i>djerniz, leddad, addad, chouk el alek, suk el-'alk</i>	(Quézel, 1967 ; Bellakhdar, 1997)
	Tunisie	<i>dâd, ded, edded, haddad</i>	(Boukef, 1986)
Noms Aamazigh	Maroc	<i>âhfyûn, addâd, haddad</i>	(Gattefossé, 1921 ; Émile Laoust, 1983 ; Bertrand, 1991)
	Algérie	<i>adad, tifroua, tabonekkart</i>	(Aït yossef, 2006)
	Tunisie	<i>âddâd, ddâd</i>	(Bellakhdar, 1999)
Noms Français		<i>Chardon à glu, caméléon blanc, chamaéléon blanc, carthame gummifère.</i>	(Aït Youssef, 2006)
Noms Anglais		<i>Bird-lime, glue thistl.</i>	(Hammiche <i>et al.</i> , 2013)
Nom Italien		<i>Masticogna.</i>	(Hammiche <i>et al.</i> , 2013)

5.3. Description botanique

Atractylis gummifera L. est une herbacée, épineuse et vivace, possédant une partie aérienne constituée des feuilles, des fleurs, une tige et des akènes et une partie souterraine constituée d'un rhizome et des racines (Bellakhdar, 2006 ; Vallejo *et al.*, 2009) :

- Les feuilles longues et épineuses, font de 50 à 60 centimètres de long sur 10 centimètres de large et sont groupées en bouquets, les petits bouquets s'étalent sur le sol, donnant ainsi à la plante la forme d'un écusson aplati donnant une rosette à ras du sol.
- La tige est réduite ou non-apparente de laquelle coule des larmes qui constituent une sorte de glu gomme ou « Laâlk », d'où le nom de chardon à glue. En effet, cette substance inodore présente des propriétés physiques et chimiques proches de celles du caoutchouc.
- Les fleurs appelées fleurons sont de couleur rose, pourpre mauve ou rosâtre de 5 centimètres de diamètre, elles subsistent assez longtemps après que les feuilles se

sont desséchées. Elles apparaissent en été, entre les mois de juin et juillet. L'ovaire est uniloculaire et ne renferme qu'un seul ovule ;

- Le fruit : le fruit est un akène ellipsoïdal de 10 à 30 millimètres de longueur et quelques millimètres d'épaisseur. Quand ce dernier est mûr, un latex blanc sort de la base de la bractée. L'akène est surmonté d'une aigrette de couleur blanche assurant sa dispersion. Elle est capable de germer en un temps très court après sa maturation ;
- La partie souterraine de cette plante est constituée d'un rhizome volumineux qui peut atteindre 30 à 40 centimètres de long et 7 à 8 centimètres de large, il est très dur, fibreux et d'une couleur jaunâtre. Le rhizome de cette plante est attaché à une longue racine qui permet à la plante de se maintenir pendant de nombreuses années.

5.4. Répartition géographique

Atractylis gummifera L. est une plante qui est présente dans le sud de l'Europe (Espagne, Portugal, Italie, Grèce et France), Afrique du nord (Maroc, Algérie et Tunisie), Amérique du sud et en Asie Mineure, mais répandue essentiellement dans le bassin méditerranéen, (**Lemoine, 2004**). On la trouve sur presque toutes les côtes autour de la méditerranée, aussi en France (région de la haute Marne) où elle a tendance à s'éloigner de la mer, elle existe :

- En Espagne, dans la région de Valence et de Murcia ;
- En Italie au voisinage de Naples ;
- En Grèce ;
- Dans les grandes Iles de Corse ;
- En Sardaigne ;
- En Sicile ;
- Dans les Iles de la mer Egée ;
- Au Portugal ;
- En Afrique du Nord, dans les forêts claires, les terrains herbeux plus ou moins arides de la zone littorale.
- Au Maroc, son aire de croissance couvre la totalité du pays, à l'exception des régions sahariennes et présahariennes (régions désertiques et Anti-Atlas) (**Hmamouchi, 2001 ; Daniele et al., 2005**).

5.5. Utilisations traditionnelles

Selon la définition officielle de l'OMS, la médecine traditionnelle se rapporte aux pratiques, méthodes, savoirs et croyances en matière de santé qui impliquent des substances naturelles telles les plantes. *Atractylis gummifera* L. est une des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine, elle est connue depuis l'antiquité par ses propriétés thérapeutiques que nous citons ci-dessous :

- Application locale : pour cicatriser les abcès, les furoncles, les chancres et pour le traitement de la gale (**Skalli et al., 2002**) ;
- En fumigation : contre le rhume, les vertiges et les céphalées et pour faciliter l'accouchement. Dans le traitement des paralysies où on étend le membre paralysé au-dessus des vapeurs de cette plante. Un autre procédé consiste à brûler le latex qui s'écoule de la plante au printemps et qui répand une odeur qui fait fuir les mouches. En fumigation aussi le rhizome sec est utilisé pour éloigner le mauvais destin et pour son action insectifuge (**Zaim, 2008**) ;
- En décoction : cette méthode est la plus utilisée dans la médecine traditionnelle arabe, où les praticiens font bouillir un fragment de racine dans l'eau pendant quelques minutes ; la solution obtenue est prise par voie orale pour plusieurs fins thérapeutiques comme l'effet antidiabétique, propriétés abortives, contre les hémorragies, pour traiter les parasites intestinaux, l'ulcère, ainsi que pour son effet antipyrétique, diurétique, purgatif et émétique et même pour blanchir les dents où la solution obtenue par décoction sert à rincer les dents (**Bellakhdar, 1999 ; Jouad et al., 2001**) ;
- En mélange avec d'autres substances : Où Addad est mélangé avec du sel pour la toilette intime. *A. gummifera* est mélangée aussi avec le Henné pilé par les femmes pour teindre les cheveux. Ce même mélange s'emploie dans le traitement des taches de rousseur et de la gale. Une autre préparation permet de vaincre l'asthénie : où la racine d'Addad est séchée pendant 6 heures au soleil après l'avoir fait bouillir pendant deux heures puis la brûler au feu et la moule. On mélange ensuite les cendres à de la semoule, le produit obtenu est chauffé puis mangé avec du beurre le matin à jeun. Elle est utilisée contre la jaunisse et les maladies de la poitrine, on peut faire cuire dans le bouillon des racines d'Addad des œufs et des fèves qu'on absorbera après avoir jeté le bouillon. Une autre préparation consiste à répandre sur un plat à cuire le pain de la racine coupée en morceaux. On met la pâte par-dessus, le

pain étant cuit, on enlève Addad. Le pain est alors émietté dans de l'huile crue dans laquelle on a coupé un oignon frais. Le tout ingéré aurait une action bienfaisante (Larrey et Pageaux., 1995 ; Akhmis, 2000 ; Zaim, 2009).

5.6. Toxicité d'*Atractylis gummifera* L.

Malgré la fréquente utilisation traditionnelle du Chardon à glu, il est aussi une des causes principales d'intoxications végétales, cette intoxication est souvent mortelle et causée surtout par l'ingestion de la racine.

5.6.1. Intoxications par *Atractylis gummifera* L.

L'ingestion des plantes en tant que produits de la pharmacopée traditionnelle ou en tant que produits alimentaires ou même un simple contact avec elles, peut provoquer des problèmes de santé et avoir même des risques sur la vie de leur consommateur.

Atractylis gummifera L., est une plante qui est souvent incriminée dans plusieurs cas d'intoxications sévères signalés surtout au printemps et en été. Dans ce sens, 72% des victimes sont des enfants de moins de 16 ans (Belarbi *et al.*, 2013 ; Bouabid *et al.*, 2019^b). Il existe, ainsi, trois principales causes d'intoxication par cette plante :

- La principale cause d'intoxication est l'utilisation fréquente d'*A. gummifera* dans la médecine traditionnelle. En effet, il a été signalé dans plusieurs études que la racine d'*Atractylis gummifera* est très utilisée dans des remèdes traditionnels, ce qui augmente la probabilité d'intoxication par cette plante. (Chardon *et al.*, 1964 ; Gaillard *et al.*, 2001) ;
- La seconde cause d'intoxication par le chardon à glu est l'exposition accidentelle suite à une erreur d'identification d'*A. gummifera* et sa confusion avec d'autres plantes comestibles, comme l'artichaut d'Espagne (*Cynara cardunculus* var.) (Chardon *et al.*, 1964) ;
- L'intoxication peut aussi être due à l'exposition criminelle du fait de la facilité de se procurer la plante à tout moment et en tous lieux, de sa saveur peu marquée, ce qui permet sa dissimulation aisée dans les aliments, ses résultats à peu près certains et rapides, ainsi que pour la difficulté de prouver son emploi par les empoisonneurs. Aussi, l'intoxication peut être suicidaire par ingestion de la plante seule ou parfois associée à certains médicaments (Belarbi *et al.*, 2013).

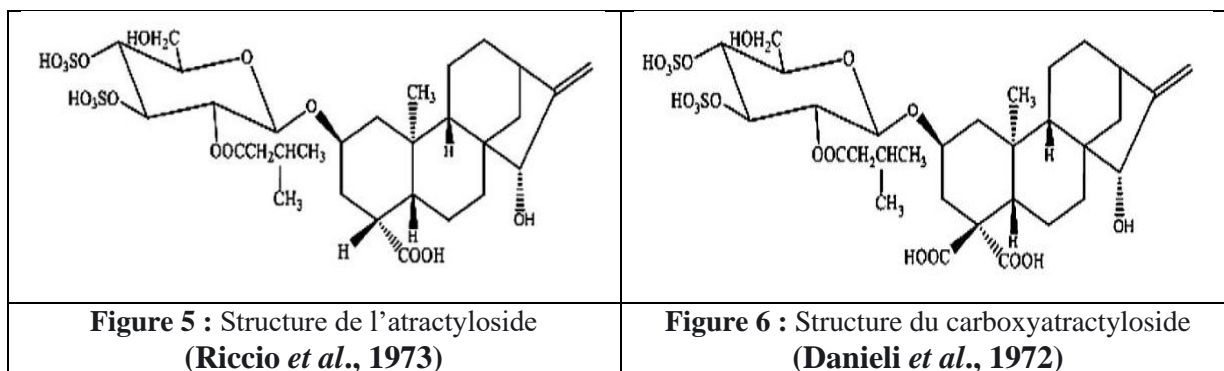
Au Maroc, le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance a enregistré 153 cas d'intoxications au chardon à glu avec trois pics : 1985 avec 20 cas, 1988 avec 20 cas et 22 cas en 1993 et 461 cas d'intoxications ont été enregistrés entre 1980 et 2009 avec un taux de létalité de 24,1% (**Achour et al., 2013 ; Najem et al., 2018**).

En Algérie, le rapport du Centre Anti-Poison a enregistré entre 1991 et 2009, 1554 cas où cette plante occupe la première position parmi les plantes responsables d'intoxications. Les décès dus à l'intoxication par cette plante, sur la même période, représentent 15% du total des décès (**Larabi et al., 2012**).

En Tunisie, selon le service de toxicologie et de soins intensifs du Centre Anti-Poison (CAP), 56 cas d'intoxications par les plantes recensées entre 1983 et 1998, dont 32 % étaient dus à l'ingestion du chardon à glu avec 16 cas de décès (**Hamouda et al., 2000**).

5.6.2. Principes toxiques d'*Atractylis gummifera* L.

Les substances responsables des effets toxiques d'*Atractylis gummifera* sont deux hétéroglucosides diterpéniques. Le premier est nommé atractyloside ou atractyline (ATR) (**Figure 5**) et a été isolé en 1868 par Lefranc (**Riccio et al 1973**). Le deuxième est le carboxyatractyloside ou gummiferine, identifié en 1964 par Danieli et ses collaborateurs (CATR) (**Figure 6**) (**Danieli et al., 1972**) ; il est un homologue de l'atractyloside mais de toxicité beaucoup plus importante.



Le mécanisme d'action de ces hétéroglucosides est l'inhibition du transport des nucléotides phosphorylés ADP/ATP à travers la membrane mitochondriale, ce qui inhibe le transport de l'ADP de part et d'autre de la membrane et ainsi empêche la phosphorylation oxydative mitochondriale et perturbe la respiration tissulaire par blocage du cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) (**Obatomi et al., 1998**) (**Figure 7**). Cette inhibition est dix

fois plus élevée par le carboxyatractyloside que l'atractyloside à cause de la présence de la deuxième fonction acide en C4 de l'Atractyloside (Romeuf *et al.*, 2006).

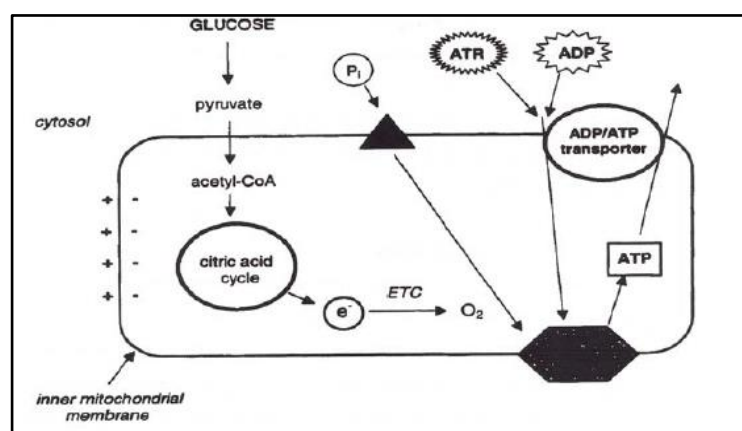


Figure 7 : Mécanisme d'action de l'Atractyloside (ATR) (Obatomi *et al.*, 1998)

Toutes les parties d'*Atractylis gummifera* contiennent de l'atractyloside et la gummiférine mais, avec des valeurs qui varient en fonction de ses organes. En effet, le rhizome renferme la plus grande teneur en toxique suivi de la tige, des bractées, de la fleur, de la graine et enfin de la feuille (Steenkamp *et al.*, 2006).

5.7. Composition chimique d'*Atractylis gummifera* L.

En plus de l'atractyloside et la carboxyatractyloside, d'autres composés chimiques ont été identifiés dans *A. gummifera*. Il s'est avéré, selon l'étude réalisée par Khadhri et ses collaborateurs en 2015 en Tunisie (Khadhri *et al.*, 2015), que cette plante est très riche en polyphénols, flavonoïdes et tanins. Aussi, une étude a été réalisée par Mejdoub et ses collaborateurs en 2019 en Algérie (Mejdoub *et al.*, 20019) et qui ont pu extraire les huiles essentielles de cette plante. De même, l'étude menée par Stanislas et ses collaborateurs en 1964 et 1965 en France a montré que toutes les parties de la plante sont riches en substances glucidiques telles que le glucose, le saccharose, l'inuline et les polysaccharides ; en acides organiques non volatils tels que l'acide oxalique et malique en acides aminés tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique et en flavonoïdes tels que flavonal et flavone (Stanislas *et al.*, 1964).

5.8. Activités biologiques d'*Atractylis gummifera* L.

L'ensemble des études rapportées dans la littérature sur *Atractylis gummifera* ont été effectuées soit sur la plante et ses utilisations traditionnelles, soit sur des cas d'intoxications

par cette plante. Cependant, peu d'études ont été menées sur les activités biologiques et pharmacologiques de cette plante. Parmi ces études, celle réalisée par Khadhri et ses collaborateurs en 2015 sur *A. gummifera* en Tunisie (**Khadhri et al., 2015**) qui a montré que les composés phénoliques de la plante ont la capacité de stabiliser les radicaux libres. Alors que l'étude réalisée en Algérie par Mejdoub et ses collaborateurs en 2019 sur les huiles essentielles (HE) isolées de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera*, a montré que ces HE possèdent des propriétés antioxydantes et antifongiques intéressantes (**Mejdoub et al., 2019**).

6. Conclusion

Le manque d'études scientifiques qui dévoilent les activités biologiques d'*Atractylis gummifera* et qui réajustent ses utilisations traditionnelles dans le traitement de plusieurs maladies, nous a orienté vers la sélection de cette plante pour notre travail de thèse.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Etude Phytochimique

1. Introduction

La valeur thérapeutique des plantes est due principalement à leurs compositions chimiques qui varient en fonction de plusieurs facteurs tel que la partie de la plante utilisée, la saison et le lieu de récolte, la méthode de séchage et de conservation et les méthodes et modalités d'extraction. La phytochimie est la science qui englobe parfaitement ces grandes étapes et qui valorise les substances naturelles d'origine végétale. En effet, la phytochimie permet de connaître l'importance du mode de préparation, d'isolement et de détermination de la substance active à partir des plantes (**Bruneton, 2016**). Cette science a fait objet de plusieurs investigations afin de découvrir les substances actives présentes dans les plantes. Pour mener ces investigations, nous avons récolté la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. de son habitat naturel où elle se retrouve fréquemment à l'état sauvage et nous l'avons valorisé par une étude phytochimique et une évaluation de ses activités biologiques.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est de séparer les constituants de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* par deux modalités d'extractions aqueuse et organique à chaud et à froid, de réaliser par la suite un criblage phytochimique qui permet de détecter la présence ou l'absence de métabolites secondaires dans la poudre de la plante et les différents extraits préparés et finalement effectuer un dosage phytochimique qui permet de quantifier les métabolites secondaires présents dans les différents extraits.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

La présente étude est menée sur la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. qui se compose d'un rhizome long et volumineux de 30 à 40 cm et des racines (**Figure 8**). L'échantillonnage a été réalisé dans la commune de Tahla, province de Taza, qui se trouve dans la région de Fès-Meknès, Maroc, située géographiquement à une latitude de 34° 03 nord et d'une longitude de 4° 25 ouest sur la route nationale N 6 Fès-Taza et l'autoroute A2. L'identification botanique de l'espèce *Atractylis gummifera* a été faite à l'aide des flores disponibles (**Quézel, 1962 ; B. Valdés et al., 2002 ; Botanica, 2012**), par Pr. Abdeslam Ennabili et Dr. Abdelmajid Khabbach. Une planche d'herbier a été confectionnée et déposée au Laboratoire Substances Naturelles, Pharmacologie, Environnement, Modélisation, Santé

& Qualité de Vie (SNAMOPEQ) de la Faculté Polydisciplinaire de Taza, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah (USMBA) de Fès, Maroc.

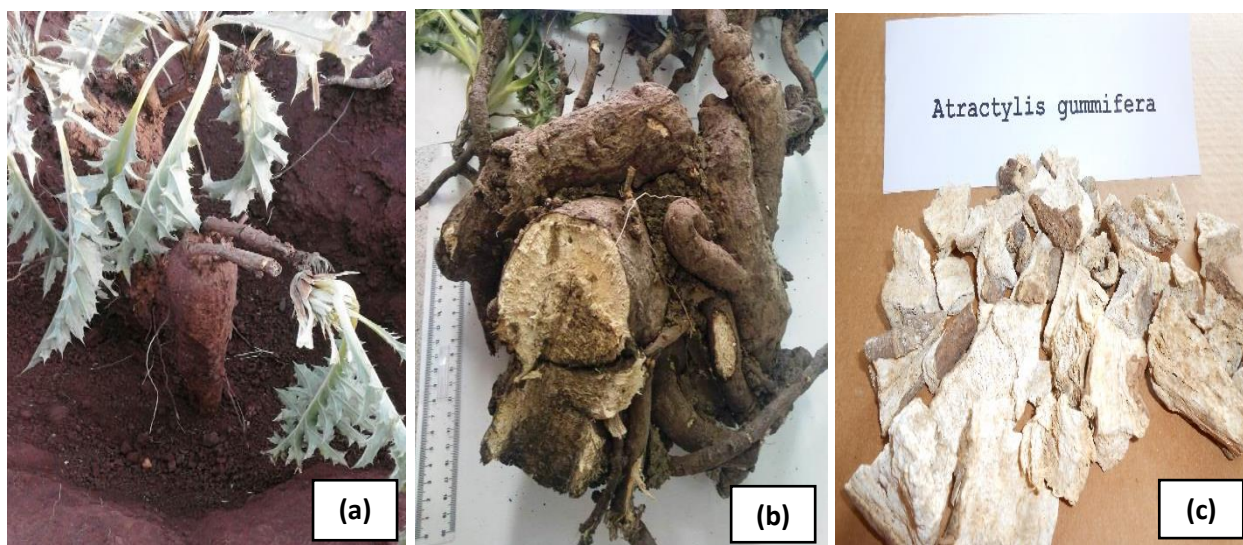


Figure 8 : Partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. récoltée dans la commune de Tahla, province de Taza, Région de Fès-Meknès

(a) Partie souterraine d'*Atractylis gummifera* dans la station de récolte

(b) Partie souterraine d'*Atractylis gummifera* dans le laboratoire (SNAMOPEQ)

(c) Partie souterraine d'*Atractylis gummifera* segmentée

(Photos prises par Khadija Bouabid le 20/06/2019)

2.2. Produits chimiques utilisés

Les produits que nous avons utilisés proviennent de Sigma- Aldrich (USA) : Méthanol ; Ethanol ; Acétate d'éthyle ; Chloroforme ; Ether de pétrole ; Acide Chlorhydrique ; Chlorure de mercure ; Iodure de potassium ; Nitrate de bismuth ; Acide acétique ; Solution d'ammoniaque ; Alcool ; Acétate de Nickel ; Folin-Ciocalteu ; Carbonate de sodium ; Acide gallique ; Nitrite de sodium ; Trichlorure d'aluminium ; Hydroxyde de sodium ; Rutine ; Vanilline ; Catéchine ; Acide sulfurique ; Anhydride acétique ; Ammoniaque ; Benzène ; Chlorure ferrique.

2.3. Préparation des extraits

2.3.1. Extraction aqueuse

Nous avons réalisé une extraction aqueuse qui est semblable à celle utilisée dans la médecine traditionnelle, elle est faite par l'eau distillée selon trois modalités (décoction, infusion et macération) qui varient en fonction de la température et du temps d'extraction :

- La décoction consiste à chauffer le matériel végétal avec de l'eau distillée, jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante. Pour ce, nous avons préparé 10 g de la partie souterraine de la plante pulvérisée et nous l'avons placé dans un récipient rempli de 100 mL d'eau et surmonté d'un système de réfrigération. Le tout est porté à ébullition et maintenu à température pendant 20min ;
- L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs par dissolution dans l'eau bouillante. Pour ce, nous avons mis dans 100 mL d'eau distillée bouillante, 10 g de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* et nous avons laissé la préparation réagir pendant 30 min, après nous avons filtré la solution obtenue ;
- La macération est une méthode d'extraction par dissolution du matériel végétal dans l'eau froide et à l'obscurité, elle est utilisée afin d'extraire les molécules sensibles à la chaleur. Pour ce, nous avons mis 10 g de la matière végétale dans 100 mL d'eau froide pendant 24 heures à température ambiante.

Les solutions aqueuses obtenues sont filtrées, congelées à - 80°C et concentrées par un lyophilisateur Heto Power Dry LL3000, les résidus obtenus sont conservés à froid (4°C) pour toutes utilisations ultérieures.

Le rendement d'extraction qui correspond à la quantité des résidus obtenus par chaque modalité d'extraction est calculé par la relation suivante :

$$R\% = \text{Masse d'extrait} * 100 / \text{Masse de la poudre végétale}$$

2.3.2. Extraction organique

C'est une technique de séparation que nous avons utilisée pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés de la plante. Nous avons adopté deux modalités d'extraction organique :

- Une extraction organique à froid : elle est réalisée par une macération de 48 heures et à température ambiante où 20 g de la matière végétale ont été macéré dans 200 mL de méthanol pendant 48 h. L'extrait méthanolique obtenu a été filtré, concentré par évaporation rotative à 60°C grâce à un Evaporateur rotatif de type Buchi R-210 et conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.
- Une extraction organique à chaud : elle est réalisée en utilisant un Soxhlet, où 20 g du matériel végétal sont introduits dans une cartouche en cellulose fixée sur un ballon, et surmonté d'un réfrigérant. 200 mL de différents solvants à polarité décroissante utilisés séparément (méthanol, chloroforme, acétate d'éthyle et éther de pétrole) sont vaporisés puis condensés tout en restant en contact avec le matériel végétal. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair, six heures pour nos conditions expérimentales.

Les solutions organiques obtenues sont filtrées, concentrées par un rotavapeur de type Buchi R-210 les résidus obtenus sont conservés à froid (4°C) pour toutes utilisations ultérieures ;

Le rendement d'extraction est calculé par la relation suivante :

$$R\% = \text{Masse d'extrait} * 100 / \text{Masse de la poudre végétale}$$

2.4. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitation ou de coloration. Ces dernières permettent de définir la présence ou non de métabolites secondaires. Dans le présent travail, nous avons criblé huit types de métabolites secondaires : tanins, anthraquinones, flavonoïdes, saponines, alcaloïdes, quinones, stérols et anthracenosides dans la poudre de la plante *Atractylis gummifera* et dans les différents extraits aqueux et organiques préparés à partir de celle-ci.

2.4.1. Criblage des tannins

Le criblage des tanins a été réalisé sur la plante pulvérisée selon la méthode décrite par Bruneton en 1995 et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par Karumi et ses collaborateurs en 2004.

- **Plante** : 1,5 g de la poudre de la partie souterraine de la plante sec sont mélangé avec 10 mL de méthanol (90%) et soumis à une agitation de 15 minutes. La solution obtenue a été filtrée puis nous avons ajouté quelques gouttes du chlorure ferrique FeCl_3 (1%). La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Bruneton, 1995**).
- **Extraits aqueux et organiques** : pour la caractérisation des tannins, nous avons ajouté quelques gouttes de FeCl_3 (2%) à 1 mL de chacun de nos huit extraits aqueux et organiques préparés de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* et dissout dans 10 mL d'eau distillée. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Karumi et al., 2004**).

2.4.2. Criblage des anthraquinones

Le criblage des anthraquinones a été réalisé sur la plante pulvérisée selon la méthode décrite par Bruneton en 1995 et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par Suleiman en 2013.

- **Plante** : pour rechercher la présence des anthraquinones dans notre plante, nous avons fait une macération de 15 min de 2g de la partie souterraine de la plante dans 20 mL de chloroforme sur laquelle nous avons ajouté 1mL de KOH aqueux (10%). Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge (**Bruneton, 1995**).
- **Extraits aqueux et organiques** : Le criblage des anthraquinones dans les différents extraits de la plante a été réalisé par le mélange de 0,5g de chaque extrait avec 10 mL de benzène, après agitation nous avons filtré le mélange et nous avons ajouté au filtrat 5mL d'une solution d'ammoniaque (10%). Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage au rouge de la phase alcaline inférieure (**Suleiman, 2013**).

2.4.3. Criblage des flavonoïdes

Le criblage des flavonoïdes a été réalisé sur la plante pulvérisée selon la méthode décrite par Bruneton en 1995 et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par N'Guessan et ses collaborateurs en 2009 :

- **Plante** : pour vérifier la présence des flavonoïdes, nous avons mis 0,5 g de la partie souterraine de la plante dans 10 mL d'eau distillée, après macération de 15min sous agitation, l'extrait est filtré et mis dans un tube, puis, 5 mL d'une solution d'ammoniac (10%) sont ajoutés, ensuite, 1 mL d'acide sulfurique est additionné, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes (**Bruneton, 1995**).
- **Extraits aqueux et organiques** : le criblage des flavonoïdes dans nos extraits a été effectué par le mélange de 2mg de chaque extrait avec 5 mL de HCl concentré et deux à trois copeaux de tournures de magnésium. L'apparition d'une couleur rouge ou orange indique la présence des flavonoïdes (**N'Guessan *et al.*, 2009**).

2.4.4. Criblage des saponines

Le criblage des saponines a été réalisé sur la plante pulvérisée et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par Bekero et ses collaborateurs en 2007 :

- **Plante** : la présence des saponines est déterminée par la préparation d'une décoction de 2g de la partie souterraine de la plante dans 100mL d'eau, à partir de cette solution, nous avons préparé 10 tubes avec 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL et 10mL, nous avons réajusté le volume final à 10 mL avec de l'eau distillée. Après, nous avons agité les tubes en position horizontale pendant 15 secondes. La présence des saponines est confirmée par l'apparition d'une mousse supérieure à 1 cm et persistante pendant 15 min (**Bekero *et al.*, 2007**).
- **Extraits aqueux et organiques** : nous avons mis en évidence la présence des saponines dans nos extraits par le test de moussage, où 5 mg de chaque extrait est dilué dans 5 mL d'eau distillée, puis introduit dans un tube à essai que nous avons agité vigoureusement pendant 15 secondes. La formation d'une mousse (hauteur supérieure à 1 cm) stable, persistante pendant 15 min indique la présence abondante de saponines (**Bekero *et al.*, 2007**).

2.4.5. Criblage des alcaloïdes

Le criblage des alcaloïdes a été réalisé sur la plante pulvérisée selon la méthode décrite par Bruneton en 1995 et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par Reifer et ses collaborateurs en 1957 :

- **Plante** : la recherche des alcaloïdes est effectuée par les révélateurs généraux des alcaloïdes : le réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium) et le réactif de Valser-Mayer (tétra-iodomercurate de potassium). Pour cela, nous avons préparé une macération de 24 heures par 10g de la partie souterraine de la plante et 50mL de H₂SO₄ à 10 %. La solution obtenue après filtration est complétée avec de l'eau distillée jusqu'à 50 mL, après nous avons prélevé 1 mL du filtrat dans deux tubes sur lesquels nous avons ajouté 5 gouttes du réactif de Mayer ou de Drangendorf. La présence des alcaloïdes est confirmée par l'apparition d'un précipité rouge orangé ou brun - rougeâtre par le réactif de Drangendorf et d'un précipité blanc-jaunâtre par le réactif de Mayer (**Bruneton, 1995**).
- **Extraits aqueux et organiques** : pour rechercher la présence des alcaloïdes dans les différents extraits, 0,1 g de résidu de chaque extrait est repris dans 6 mL d'éthanol à 60%, puis réparti dans 2 tubes à essai. Dans le premier tube, sont ajoutées 2 gouttes du réactif de Dragendorff, l'apparition d'un précipité rouge orangé ou brun - rougeâtre indique la présence d'alcaloïdes. Dans le deuxième tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif du Mayer, l'apparition d'un précipité blanc-jaunâtre confirme la présence d'alcaloïdes (**Reifer et al., 1957**).

2.4.6. Criblage des quinones libres

Le criblage des quinones a été réalisé sur la plante pulvérisée et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par Dohou et ses collaborateurs en 2003 :

- **Plante** : pour vérifier la présence des quinones libres dans la plante, nous avons préparé une macération de 24 heures de 1g de la partie souterraine de la plante dans 15 mL d'éther de pétrole. Après filtration de la solution, nous l'avons concentrée au rota vapeur. La présence de quinones libres est confirmée lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet après l'ajout de quelques gouttes de NaOH 0,1M (**Dohou et al., 2003**).

- Extraits aqueux et organiques : nous avons ajouté 2 mL d'hydroxyde de sodium 10 M à 0,01g de chaque extrait, puis nous avons agité énergiquement, l'apparition rapide ou lente d'une coloration rouge-orange indique la présence des quinones (**Dohou et al., 2003**).

2.4.7. Criblage des stérols

Le criblage des stérols a été réalisé sur la plante pulvérisée et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par N'Guessan et ses collaborateurs en 2009 :

- Plante : pour vérifier la présence des stérols dans la plante, nous avons préparé une macération de 24 heures de 1 g de la partie souterraine de la plante dans l'éther de pétrole. Après filtration, le solvant est évaporé et le résidu est récupéré par 1 mL de chloroforme sur lequel nous avons ajouté 1 mL d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique. La présence des stérols est confirmée par l'apparition d'une coloration violette devenant progressivement verte. La coloration verte se stabilise au bout de 30 minutes (**N'Guessan et al., 2009**).
- Extraits aqueux et organiques : Les stérols ont été recherchés par la réaction de Liebermann, où 10 mg du résidu de chaque extrait est dissout dans 1 mL d'anhydride acétique sur lequel nous avons ajouté 0,5 mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau violet virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive (**N'Guessan et al., 2009**).

2.4.8. Criblage des anthracenosides

Le criblage des anthracenosides a été réalisé sur la plante pulvérisée et sur les extraits aqueux et organiques selon la méthode décrite par Houta et ses collaborateurs en 2012 :

- **Plante** : pour vérifier la présence des anthracenosides dans la partie souterraine de la plante, nous avons préparé une macération pendant 15 minutes de 1g de la plante dans 10 mL du chloroforme avec agitation, après filtration de la solution, nous avons ajouté l'ammoniaque diluée, la présence des anthracenosides est confirmée par l'apparition d'une coloration rouge qui se développe après décantation (**Houta et al., 2012**).
- **Extraits aqueux et organiques** : le criblage est réalisé par la réaction de Borntraeger, où 0,1 g des extraits étudiés est macéré avec 5 mL du chloroforme dans

un tube à essai durant 15 minutes tout en agitant toutes les 5 minutes. La solution est ensuite filtrée sur un papier filtre dans un tube, puis additionnée de 2 mL d'ammoniaque. Après agitation, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'anthracenosides (**Houta et al., 2012**).

2.5. Dosage phytochimique

Le dosage phytochimique est une analyse quantitative basée sur un dosage colorimétrique réalisé par un spectrophotomètre, il permet de déterminer les quantités des métabolites secondaires dans les différents extraits de la plante. Dans la présente étude, les résultats du criblage phytochimique que nous avons obtenu, nous ont orienté vers le choix des métabolites secondaires d'*Atractylis gummifera* à doser, à savoir les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tannins :

2.5.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux sont les métabolites secondaires les plus largement disponibles dans le règne végétal. Ils sont synthétisés par les plantes au cours de leur développement normal en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet et des attaques d'insectes. Les polyphénols prennent une importance croissante du fait de leurs effets bénéfiques pour la santé où leurs rôles comme antioxydants naturels suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies.

Les polyphénols ont été dosés dans la présente étude par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu où un volume de 0,5 mL de chaque échantillon est introduit dans des tubes à essai avec 2,5 mL du réactif de Folin- Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau distillée). Ensuite, 4 mL du carbonate de sodium 7,5 % (m/v) sont ajoutés. Par la suite, les différentes solutions ont été maintenues dans un bain- marie pendant 30 minutes. L'intensité de la coloration bleue produite a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre (R-210 ; 0700011820) à une longueur d'onde de 765 nm (**Singelton et al., 1999**).

2.5.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux de la famille des polyphénols, ils sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Les bienfaits des flavonoïdes sont divers, ils ont des propriétés antioxydante, anticancéreuse et préventives contre les maladies cardiovasculaires (**Mihai et al., 2010**).

La teneur en flavonoïdes dans la présente étude a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Dans des tubes à essai ont été introduits successivement 1 mL de l'échantillon, 6,4 mL d'eau distillée et 0,3 mL de la solution de Nitrite du sodium à 5 %. Après 5 min, 0,3 mL du Trichlorure d'aluminium à 10 % ont été additionnés. Après 6 min après, nous avons ajouté 2 mL de la soude (1M). La solution obtenue 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 (**Mihai *et al.*, 2010**).

2.5.3. Dosage des tanins catéchiques

Les tanins catéchiques, appelés aussi tanins condensés sont des polymères de flavanols, ils forment un groupe important de composés phénoliques provenant de la condensation de molécules de flavonoïdes. Ils sont très abondants dans le règne végétal et sont connus pour leurs vertus médicinales, où ils ont l'attitude de piéger les radicaux libres et pourraient aussi réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de cancer et ils accéléreraient de 50 % la vitesse de cicatrisation des plaies superficielles (**Sereme *et al.*, 2011**).

Pour le dosage des tanins catéchiques, nous avons utilisé le test de la vanilline avec H_2SO_4 . Cette méthode est basée sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. Pour cela, nous avons mélangé un volume de 50 μL de chaque échantillon avec 1,5 mL de la vanilline à 4% (préparé avec du méthanol), puis 750 μL de l'acide chlorhydrique concentré ont été ajoutés. La solution bien mélangée est incubée à température ambiante dans l'obscurité pendant 20 min. Les absorbances ont été mesurées à 500 nm (**Joslyn, 1970**).

3. Résultats

3.1. Rendement des extractions aqueuse et organique

L'extraction que nous avons adopté dans le présent travail consiste en un procédé visant à extraire les constituants présents dans la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. pulvérisée, c'est une opération de séparation solide/liquide, où le matériel végétal est mis en contact avec l'eau distillée ou un solvant organique. Les composés d'intérêts sont alors solubilisés et contenus dans le solvant, ce dernier est ensuite éliminé par évaporation rotative ou concentré par lyophilisateur afin d'isoler l'extrait végétal. Le rendement d'extraction est la quantité des composés ou substances pouvant être extraites, il varie en fonction de la

modalité d'extraction (à chaud ou à froid), de la nature de l'extraction aqueuse ou organique et de la polarité du solvant utilisé.

Les rendements des extractions pour les différents solvants utilisés sont présentés dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Rendements des extractions aqueuses et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

Extraits		Rendements (%)
	<u>Décocté</u>	35
Aqueux	Infusé	32,5
	Macéré	24,5
	<u>Méthanolique</u>	15
Organiques	Macéré méthanolique	6,66
	Chloroformique	3,33
	Acétate d'éthyle	3,33
	Ether de pétrole	2,63

3.2. Criblage phytochimique

La révélation des différentes classes de métabolites secondaires a été réalisée dans un premier temps sur la poudre de la plante d'*Atractylis gummifera* L. et ensuite dans les différents extraits aqueux et organiques de la plante. Ainsi, nous avons pu faire une détermination préliminaire de la composition phytochimique de chaque extrait et les résultats obtenus sont récapitulés dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Résultats du criblage phytochimique d'*Atractylis gummifera* L.

Métabolites secondaires	Plante	Extraits aqueux			Extraits organiques				
		Décocté	Infusé	Macéré	Méthanolique	Macéré méthanolique	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Éther de pétrole
Tanins	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Anthraquinones	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoïdes	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Saponines	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinones	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Stérols	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthracenosides	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+ Présence ; ++ présence moyenne ; +++ forte présence ; - Absence)

3.3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols est effectué par le réactif de Folin Ciocalteu en se référant à l'acide gallique. La concentration des polyphénols dans nos différents extraits aqueux et organiques est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage $y = 0,0104 x + 0,0204$ (Annexe 1) et exprimée en milligramme d'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/gE). Ainsi, nous avons constaté que notre plante est riche en polyphénols avec une différence statistiquement significative ($P < 0,05$ moyenne de trois répétition) entre les différents extraits et avec une meilleure teneur en polyphénols dans l'extrait macéré méthanolique suivi respectivement par les extraits préparés à chaud par Soxhlet: extraits méthanolique, acétate d'éthyle, chloroformique et en dernier éther de pétrole, avec des valeurs respectives de $(102,88 \pm 1,38 ; 96,4 \pm 1,10 ; 72,78 \pm 1,28 ; 62,36 \pm 1,29 ; 15,68 \pm 2,63)$ mg EAG/gE. Pour les extraits aqueux, la concentration la plus élevée en polyphénols totaux a été retrouvée dans le macéré aqueux avec $49,59 \pm 2,90$ mg EAG/gE, suivi par l'infusé $29,84 \pm 0,81$ mg EAG/gE et enfin le décocté $15,07 \pm 0,25$ mg EAG/gE (**Tableau 8**).

3.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium en se référant à une courbe d'étalonnage établie par la rutine. En effet, la quantité des flavonoïdes

est déterminée à partir de l'équation de régression $y = 0,001 x + 0,056$ (**Annexe 2**) est rapportée en milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg ER/gE). Ainsi, nous avons constaté que nos extraits contiennent des teneurs variables en flavonoïdes avec une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) entre les différents extraits et nous avons trouvé que le macéré méthanolique suivi des extraits chloroformique, méthanolique, acétate d'éthyle et éther de pétrole contiennent les flavonoïdes avec des teneurs respectives de $17,25 \pm 0,06$; $15,83 \pm 0,08$; $15,29 \pm 0,24$; $13,85 \pm 0,15$ et $9,36 \pm 0,29$ mg ER/gE (**Tableau 8**).

3.5. Dosage des tanins catéchiques

Pour le dosage des tanins, nous nous sommes basés sur le test de la vanilline en milieu acide, en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée par la catéchine. En effet, la concentration des tanins dans les différents extraits est calculée à partir de l'équation de régression $y = 0,0006123 x - 0,002053$ (**Annexe 3**). La quantité des tanins a été rapportée en milligramme d'équivalent de la catéchine par gramme de l'extrait (mg EC/gE). Ainsi, nous avons constaté que la plante contient des teneurs variables de tanins avec une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) entre les différents extraits organiques et aqueux. En effet, nous avons observé que l'extrait chloroformique est le plus riche en tanins suivi de l'extrait méthanolique et du macéré méthanolique avec des valeurs respectives de $172,02 \pm 3,11$; $144,09 \pm 3,96$ et $107,84 \pm 8,48$ mg EC/gE. Pour les extraits aqueux, le macéré ($90,02 \pm 4,93$) et l'infusé ($89,22 \pm 7,41$) sont également très riches en tanins avec des teneurs voisines avec des différences statistiquement significatives et supérieures à celles des extraits organiques : éther de pétrole ($74,52 \pm 8,44$) et acétate d'éthyle ($73,87 \pm 4,57$) où la différence est statistiquement non significative entre ces deux dernières. Le décocté vient en dernière position par rapport aux sept autres extraits organiques et aqueux, avec une concentration de $70,60 \pm 5,38$ mg EC/gE et une différence statistiquement significative (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

		Polyphénols totaux (mg EAG/gE)	Flavonoïdes (mg ER/gE)	Tanins catéchiques (mg EC/gE)
Extraits aqueux	Décocté	15,55 ± 0,25	6,46 ± 0,22	70,60 ± 5,39
	Infusé	29,84 ± 0,81	6,3 ± 0,11	89,22 ± 7,41
	Macéré aqueux	49,59 ± 2,90	12,56 ± 0,31	90,02 ± 4,93
Extraits organiques	Méthanolique	96,39 ± 1,10	15,29 ± 0,24	144,09 ± 3,96
	Macéré Méthanolique	102,88 ± 1,38	17,25 ± 0,06	107,84 ± 8,48
	Acétate d'éthyle	72,78 ± 1,28	13,85 ± 0,15	73,87 ± 4,57
	Chloroformique	62,36 ± 1,29	15,83 ± 0,081	172,02 ± 3,11
	Ether de pétrole	15,68 ± 2,63	9,36 ± 0,29	74,52 ± 8,44

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± erreur standard moyenne. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Graph Pad Prism 5 par une analyse de variance à sens unique (ONE-WAY ANOVA), suivi du post test Tukey. Les données ont été indiquées en Moyenne ± Erreur Standard Moyenne. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à la valeur de $P < 0,05$

4. Discussion

Le rendement d'extraction de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. varie selon la modalité d'extraction à chaud ou à froid et en fonction du solvant utilisé pour l'extraction. En effet, nous avons constaté que les meilleurs rendements sont obtenus avec les solvants les plus polaires (extraits aqueux > extrait méthanolique > extrait chloroformique > extrait acétate d'éthyle > extrait éther de pétrole). De même, l'extraction à chaud permet de donner les meilleurs rendements par rapport aux extractions à froid par macération pour les extractions aqueuses et organiques. Les rendements des extraits aqueux sont respectivement de **35 %** pour le décocté, **32,5 %** pour l'infusé et **24,5 %** pour le macéré. Par contre pour les extraits organiques, l'extraction à chaud par le méthanol permet d'obtenir **15 %** comme rendement contre **6,66 %** à froid avec le même solvant.

Les résultats du criblage phytochimique, nous a permis de constater que la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. est riche en métabolites secondaires qui possèdent des activités biologiques intéressantes. En effet, la poudre de la plante est riche en tanins, flavonoïdes, et contient des traces de saponines, quinones, et stérols. De même, les extraits aqueux (décocté, infusé et macéré) et organiques (méthanolique, macéré méthanolique, chloroformique et acétate d'éthyle) sont très riches en tanins, flavonoïdes à l'exception de l'extrait éther de pétrole qui ne contient que des traces de flavonoïdes et de tanins. Les extraits d'*Atractylis gummifera* ne contiennent pas les anthraquinones, les alcaloïdes et les anthracenosides. A partir de ces résultats, nous pouvons déduire que la toxicité d'*Atractylis gummifera* n'est pas due aux alcaloïdes mais plutôt à deux hétérosides, qui sont : l'atractyloside qui est découvert par Lefranc en 1868 (**Riccio et al., 1973**) et la gummiferine qui est un dérivé de l'atractyloside, mais de toxicité beaucoup plus importante, découverte par Daniali et ses collaborateurs en 1972 (**Danieli et al., 1972**). L'atractyloside et ses analogues sont naturellement trouvés dans les plantes avec des teneurs qui varient d'une espèce à l'autre et même dans la même espèce en fonction des conditions climatiques du milieu et de la nature du sol (**Larabi et al., 2012**), à savoir *Coffea arabica* qui est trop consommée par l'Homme et qui est considérée parmi les plantes les plus riches en Atractyloside (**Obatomi et al., 1998 ; Stewart et al., 2000**). Bien que ces hétérosides soient bien décrits d'un point de vue chimique, biochimique et toxicologique, leurs métabolismes et pharmacocinétique n'ont pas encore été bien démontrés et étudiés.

Les résultats du criblage phytochimique nous ont orienté vers le choix des métabolites secondaires à doser. Ainsi, nous avons opté pour le dosage de trois familles de métabolites secondaires qui sont les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins qui sont présents dans la plupart de nos extraits. Cette mesure quantitative a montré que les extraits organiques sont les plus riches en métabolites secondaires, en particulier le macéré méthanolique qui contient les valeurs les plus élevées en polyphénols totaux $102,88 \pm 1,38$ mg EAG/gE, en flavonoïdes $17,25 \pm 0,06$ mg ER/gE et en tanins $144,09 \pm 3,96$ mg EC/gE. Pour les extraits aqueux, nous avons remarqué que le macéré aqueux est le plus riche en métabolites secondaires, par comparaison avec l'infusé et le décocté, mais avec des teneurs beaucoup plus faibles que le macéré méthanolique.

En comparant nos résultats avec la littérature, nous pouvons déduire que la composition chimique de nos extraits est semblable à celles des extraits de l'étude réalisée sur *Atractylis gummifera* L. par Khadhri et ses collaborateurs en Tunisie. En effet, ils ont trouvé que les

teneurs en polyphénols totaux sont variables selon l'organe de la plante étudié et que le macéré méthanolique des feuilles d'*Atractylis gummifera* est le plus riche en polyphénols de l'ordre de 17 mg EqAG/gMS et la racine occupe la 2^{ème} position avec 6 mg Eq AG/g MS. Pour le dosage des flavonoïdes, ils ont trouvé que les feuilles possèdent la teneur la plus élevée environ 7 mg EqCA/g MS, suivies par les tiges qui ont une teneur de 4,6mg Eq CA/g MS. Cette teneur est environ 12 fois supérieure à celle enregistrée chez la racine. Par ailleurs, ils ont remarqué que la teneur de la racine en tanins est la plus élevée dans le décocté avec une teneur de 2,3 mg Eq CA/g MS (**Khadhri et al., 2015**).

Ainsi, nous pouvons expliquer les résultats que nous avons obtenus par le fait que les polyphénols sont mieux extraits par les solvants polaires, car quand la polarité des solvants diminue, la teneur en polyphénols diminue aussi. Pour le même solvant, nous avons remarqué que les polyphénols sont sensibles à la chaleur car les meilleurs rendements sont obtenus par macération à froid que ça soit par le méthanol ou par l'eau distillée. Aussi, nous avons remarqué que l'extraction par solvants organiques permet d'avoir des rendements meilleurs en polyphénols par rapport à l'extraction aqueuse. Pour les flavonoïdes, ils sont mieux extraits avec les solvants polaires et à faible température. En utilisant la modalité d'extraction à froid, nous pouvons déduire que la différence de la teneur en flavonoïdes entre le macéré méthanolique et le macéré aqueux n'est pas énorme, mais elle reste statistiquement significative. En comparant nos résultats avec d'autres familles et d'autres espèces d'*Atractylis*, nous remarquons que la teneur en flavonoïdes dans les extraits d'*Atractylis gummifera* $17,25 \pm 0,06$ mgER/gE pour l'extrait macéré méthanolique est supérieure par rapport à plusieurs plantes que ce soit de la même famille et même genre tel que *Atractylis babelii* (*Astéracée*) $2,29 \pm 0,01$ mgER/gE et *Atractylis serratuloides* (*Astéracée*) 15 ± 2 mg ER/gE, ou des plantes de familles différentes tel que *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*) $1,60 \pm 0,01$ mgER/gE (**Khelifi et al., 2013 ; Bouaziz et al., 2009**). En comparant les teneurs en tanins des extraits d'*Atractylis gummifera* avec d'autres espèces d'*Atractylis* tel que *Atractylis babelii* $0,58 \pm 0,02$ mg EC/gE (**Boudebaz et al., 2015**) ou avec des plantes d'un autre genre tel que *Artemisia herba-alba* $5,47 \pm 0,09$ mg EC/gE ou même avec des plantes d'une autre famille tel que *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*) $2,03 \pm 0,06$ mg EC/gE (**Khelifi et al., 2013**), nous pouvons constater que les teneurs en tanins des extraits d'*Atractylis gummifera* sont plus élevées, ce qui explique l'utilisation traditionnelle de cette plante pour tanner la peau (**Ahid et al., 2012**). Ainsi, nous pouvons constater qu'*Atractylis gummifera* est riche en polyphénols, flavonoïdes et tanins

avec des teneurs plus élevée que celles d'autres plantes. Donc, nous pouvons supposer que ces composés peuvent être responsables de l'activité biologique de cette plante. En effet, il a été démontré dans plusieurs études que les polyphénols interagissent dans des processus physiologiques humains et sont impliqués dans plusieurs processus thérapeutiques à savoir, la protection contre le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Perera *et al.*, 2016 ; Teng et Chen, 2019 ; Teng *et al.*, 2018**).

5. Conclusion

Dans le présent chapitre, nous avons valorisé *Atractylis gummifera* L., plante fréquemment utilisée dans la médecine traditionnelle, par des études phytochimique. En effet, nous avons constaté que le meilleur rendement d'extraction est obtenu à chaud par les solvants les plus polaires qui sont les extraits aqueux, notamment le décocté qui a le plus fort rendement 35% suivi de l'infusé 32,5 % et du macéré 24,5 %. Par contre, pour les extraits organiques, l'extraction à chaud par le méthanol a permet d'obtenir 15% comme rendement contre 6,66% à froid avec le même solvant. Lors du criblage phytochimique, nous avons constaté que la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. est riche en métabolites secondaires qui possèdent des activités biologiques intéressantes. En effet, la poudre de la plante est riche en tanins, flavonoïdes et contient des traces de saponines, quinones, et stérols. De même, les extraits aqueux (décocté, infusé et macéré) et organiques (méthanolique, macéré méthanolique, chloroformique et acétate d'éthyle) sont très riches en tanins et flavonoïdes à l'exception de l'extrait éther de pétrole qui ne possède que des traces de flavonoïdes et de tanins. Aussi, les extraits d'*Atractylis gummifera* ne contiennent pas les anthraquinones, les alcaloïdes et les anthracenosides. Pour le dosage phytochimique de la partie souterraine de la plante, nous avons trouvé que les huit extraits aqueux et organiques sont riches en polyphénols, flavonoïdes et tanins en particulier le macéré du méthanol qui a les valeurs les plus élevées en polyphénols totaux $102,88 \pm 1,38$ mg EAG/gE, en flavonoïdes $17,25 \pm 0,06$ mg ER/gE et en tanins $144,09 \pm 3,96$ mg EC/gE, et pour les extraits aqueux, nous avons remarqué que le macéré aqueux est le plus riche en métabolites secondaires en comparaison par l'infusé et le décocté avec une teneur $49,59 \pm 2,90$ mgEAG/gE en polyphénols, $12,56 \pm 0,31$ mg ER/gE en flavonoïdes et $90,02 \pm 4,93$ mg EC/gE en tanins, cependant ces teneurs reste beaucoup plus faibles par rapport aux teneurs du macéré méthanolique.

Chapitre 2 : Etude de la toxicité aigüe et de l'activité antidiabétique *in vitro* et *in vivo*

1. Introduction

Le diabète sucré est un véritable problème de santé publique dont la fréquence augmente à une vitesse inquiétante partout dans le monde. Il se caractérise par une résistance à l'insuline, une altération de la régulation de la production hépatique du glucose et une diminution de la fonction des cellules pancréatiques β et qui finit par entraîner une hyperglycémie chronique qui s'accompagne le plus souvent par plusieurs complications angiopathiques (**American Diabetes Association, 2014 ; Picard *et al.* 2017**). Plusieurs méthodes sont adoptées pour traiter le diabète sucré et ce en fonction du type de diabète et du stade d'évolution de cette maladie. En effet, le diabète de type 2 peut être traité par le suivi des règles hygiéno-diététiques et/ou par la prise des antidiabétiques oraux comme il peut aussi être traité par des injections d'insuline.

Plusieurs plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète (**Bellakhdar, 1997 ; 2006 ; Jouad *et al.*, 2001**), mais les études scientifiques confirmant ou infirmant l'utilité et l'intérêt thérapeutique de ces plantes, ainsi que les mécanismes d'action via lesquels elles exercent leurs effets hypoglycémisants restent encore mal connus.

L'objectif de cette étude est d'examiner *in vitro* et *in vivo* l'effet antidiabétique des extraits de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera*, qui est une plante utilisée dans la pharmacopée traditionnelle marocaine pour le traitement de diverses maladies. Pour ce, nous avons consacré la première partie de ce chapitre pour l'évaluation *in vitro* du pouvoir antidiabétique des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) et organiques (méthanolique, macéré de méthanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et éther de pétrole) d'*Atractylis gummifera*. Cette évaluation va être réalisée par l'étude de l'activité inhibitrice des enzymes responsables de la digestion des hydrates de carbone : alpha amylase, alpha glucosidase et bêta galactosidase. Après, nous avons mené une étude *in vivo* de la toxicité aigüe des extraits qui se sont révélés les plus actifs *in vitro* aux doses allant jusqu'à 2 g/kg, selon les instructions de la ligne directrice OCDE 423 de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE).

Finally, the last part of this chapter is dedicated to the *in vivo* evaluation of the antidiabetic power of two aqueous and organic extracts that were shown to be the most active *in vitro* on a Swiss Albino mouse model, rendered diabetic after induction of diabetes by streptozotocin. The treatment of diabetic mice was performed by gastric gavage with the plant extracts in comparison with control mice treated with a reference drug (metformin), diabetic mice not treated and non-diabetic mice.

2. Matériel et méthodes

2.1. Produits chimiques utilisés

The products we used come from Sigma-Aldrich (USA), it is about :

Méthanol, Ethanol ; Acétate d'éthyle ; Chloroforme ; Ether de pétrole ; Enzyme alpha amylase ; Amidon ; Acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) ; Acarbose ; Alpha glucosidase ; P-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (pNPG) ; Tampon phosphate ; Carbonate de sodium ; β -galactosidase ; 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside ; Quercétine ; Streptozotocine ; Nicotinamide ; Acide citrique ; Citrate de sodium ; Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) ; Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).

2.2. Animaux utilisés

The animals used were Swiss Albino male mice weighing between 25 and 35 g and coming from the animal house of the Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University of Rabat-Morocco. All animals were housed in collective cages at ambient temperature (25 °C) and lit on a 12-hour light/12-hour dark cycle with permanent access to water and food.

2.3. Approbation par le comité d'éthique

The ethical approval was obtained from Mohammed V University in Rabat, under the responsibility of the Central Animal House and the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of the Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat. The study was conducted in accordance with the principles described in the « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals », 8th edition prepared by the National Academy of Sciences (**National Research Council of the National Academies, 2011**). All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used.

2.4. Activité antidiabétique *in vitro*

L'évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* a été réalisée en utilisant l'activité inhibitrice des trois enzymes : alpha amylase, alpha glucosidase et béta galactosidase. Ces derniers sont les enzymes responsables de la digestion des hydrates de carbone et de l'augmentation de la glycémie. Ainsi, toute inhibition de ces enzymes signifie une diminution de la glycémie.

2.4.1. Activité inhibitrice de l'alpha amylase

L' α -amylase est une enzyme digestive et un constituant du suc pancréatique et de la salive qui est requis pour le catabolisme des glucides à longue chaîne comme l'amidon et le glycogène en unités plus petites. En effet, l' α -amylase brise les liaisons α (1→4) glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amidon pour donner des molécules plus petites tel que le maltose et ainsi une augmentation de la glycémie (Kandra, 2003).

L'évaluation *in vitro* du pouvoir antidiabétique des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* a été réalisée en utilisant l'activité inhibitrice de l'alpha amylase. Pour effectuer ce test, 250 μ L des extraits de différentes concentrations allant de 500 à 2500 μ g/mL ont été mélangés avec 250 μ L de la solution de l'enzyme alpha amylase (2U/mL) et incubés à 37°C pendant 20 min, puis 250 μ L de l'amidon (1%) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37 °C pendant 15 min. Ensuite, 250 μ L de la solution de DNS 40 mM (Dinitrosalicylic acide) qui stoppe la réaction enzymatique a été ajoutée. Les différents tubes ont été agités et placés dans un bain-marie bouillant pendant 10 min. Le mélange est enfin dilué par addition de 10 mL d'eau distillée et l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide du spectrophotomètre (R-210 ; 0700011820) (Hashim *et al.*, 2013 ; Lordan *et al.*, 2013).

L'inhibition de l' α -amylase est exprimée par le pourcentage d'inhibition calculé par la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l}'\alpha\text{-amylase} = \frac{[(\text{DO}_{\text{Contrôle}} - \text{DO}_{\text{Blanc du contrôle}}) - (\text{DO}_{\text{Echantillon}} - \text{DO}_{\text{Blanc de l'échantillon}})] * 100}{(\text{DO}_{\text{Contrôle}} - \text{DO}_{\text{Blanc du contrôle}})}$$

2.4.2 Activité inhibitrice de l'alpha glucosidase

L'alpha glucosidase est une enzyme sécrétée par les cellules de la membrane intestinale, elle active l'étape finale du processus de l'hydrolyse des disaccharides en monosaccharides

absorbables par les cellules intestinales, d'où l'augmentation de la glycémie (**Kim et al 2010**). L'inhibition de cette enzyme est effectuée *in vitro* par le mélange de cette enzyme avec le substrat qui est une molécule de glucose liée en α -1,4 à un nitrophénol : p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (pNPG). En absence d'inhibiteur, l' α -glucosidase coupe la liaison α -1,4 de la molécule de pNPG, ce qui donne une molécule de nitrophénol et une molécule de glucose. Une fois l'hydrolyse des disaccharides est effectuée par l' α -glucosidase, une coloration jaune apparaît. Son absorbance peut être mesurée par spectrophotométrie à 405 nm. L'intensité de la coloration sera représentative de l'activité de l'enzyme. Ainsi, plus la coloration est moins intense, plus l'activité de l' α -glucosidase est inhibée.

Pour cela, 150 μ L des extraits de différentes concentrations (666 - 3330 μ g / mL) et 100 μ L de la solution de l'enzyme alpha glucosidase (0,1U/mL) préparée dans le tampon phosphate (0,1M) à pH = 6,7 ont été incubés à 37°C pendant 10 min. Ensuite, 200 μ L du substrat p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (pNPG) dissout dans 1mM de la solution tampon phosphate (0,1M) à pH = 6,7 ont été additionnés et le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min. A la fin, 1 mL de Na₂CO₃ (0,1M) a été ajouté et la lecture des résultats a été effectuée à la longueur d'onde de 405 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (R-210 ; 0700011820) (**Lordan et al., 2013**).

L'acarbose, médicament de référence, est utilisé comme control positif. L'inhibition d' α -glucosidase est exprimée par un pourcentage d'inhibition et calculée par la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l}'\alpha\text{-glucosidase} = \frac{[(\text{DO}_{\text{Contrôle}} - \text{DO}_{\text{Blanc du contrôle}}) - (\text{DO}_{\text{Echantillon}} - \text{DO}_{\text{Blanc de l'échantillon}})] * 100}{(\text{DO}_{\text{Contrôle}} - \text{DO}_{\text{Blanc du contrôle}})}$$

2.4.3 Activité inhibitrice de la bêta galactosidase

L'activité antidiabétique *in vitro* réalisée par l'inhibition de la β -galactosidase est un test basé sur l'arrêt de la dégradation des bêta galactosides par l'inhibition de l'activité du β -galactosidase intestinal. En effet, la β -galactosidase ou la lactase, est une enzyme capable d'hydrolyser le lactose en le transformant en glucose et en galactose (**Pastore et al., 1974**).

Pour cela, un mélange de 150 μ L de différentes concentrations des extraits allant de 666 to 5000 μ g / mL et 100 μ L du tampon phosphate de sodium (0,1 M) à pH = 7,6 contenant la solution d'enzyme β -galactosidase (0.1 U / mL) a été incubé à 37 ° C pendant 10 min. Après,

nous avons ajouté 200 μL du substrat 2-nitrophenyl b β -D-galactopyranoside (1mM) solubilisé dans le tampon phosphate de sodium (0,1 M) à pH = 7,6. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 37 ° C pendant 30 min. Après incubation, nous avons ajouté 1 mL de Na₂CO₃ pour stopper la réaction et nous avons enregistré l'absorbance à 410 nm, en utilisant le spectrophotomètre (R-210 ; 0700011820) (**Pastore *et al.*, 1974 ; Maruhn, 1976**).

La quercétine est utilisée comme control positif et le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de la } \beta\text{-galactosidase} = \frac{[(\text{DO}_{\text{Contrôle}} - \text{DO}_{\text{Blanc du contrôle}}) - (\text{DO}_{\text{Echantillon}} - \text{DO}_{\text{Blanc de l'échantillon}})] * 100}{(\text{DO}_{\text{Contrôle}} - \text{DO}_{\text{Blanc du contrôle}})}$$

2.5. Etude de la toxicité aigüe

La toxicité aigüe désigne les effets néfastes survenant après l'administration par voie orale d'une dose unique d'une substance, ou de plusieurs doses administrées en l'espace de 24 heures. Elle est une caractéristique biologique qui dépend de la structure atomique ou moléculaire du composé et donc de son interaction avec la matière vivante. Elle dépend aussi de la dose du composé nécessaire pour produire un effet. Ainsi, plus les effets néfastes du composé toxique sont importants, plus ce composé est toxique. Cette toxicité est exprimée en dose létale capable de tuer 50% d'une population : la DL 50 (**Hayaes *et al.*, 2014**).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la toxicité aigüe selon les instructions de la directrice élaborée en 2001 par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques 423 (OCDE 423). Elle est basée sur des évaluations biométriques avec des doses prédéterminées, convenablement séparées pour permettre de classer une substance pour des besoins de classification et d'évaluation des dangers. En effet, une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance doit être administrée par une sonde gastrique à un volume constant pour toute la gamme de doses et elle est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux qui sont à jeun et d'un seul sexe (normalement des femelles) sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité, liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante (arrêt de l'essai, administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux) (**OCDE, 2001**).

Dans cette étude, nous avons évalué la toxicité aigüe dans le but de déterminer les doses thérapeutiques des deux macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* à utiliser pour l'étude des activités antidiabétiques et antioxydante *in vivo*. Ainsi, nous avons gavé par voie gastrique deux groupes de souris Swiss Albinos de trois souris (femelles) par les deux macérés à une dose unique de 2 000 mg/kg. Après, nous avons observé les souris pendant les premières 30 minutes après le gavage, pendant les premières 24 heures et quotidiennement pendant 14 jours (OECD, 2001).

2.6. Activité antidiabétique *in vivo*

Nous avons évalué l'activité antidiabétique *in vivo* de deux extraits préparés par macération qui se sont révélés les plus actifs d'après les résultats de l'étude *in vitro* et qui sont les macérés aqueux et méthanolique sur un modèle de souris Swiss Albinos rendues diabétiques par induction avec de la Streptozotocine.

2.6.1. Induction du diabète

L'induction du diabète a été faite par injection intra péritonéale d'une solution fraîchement préparée de Streptozotocine, à une dose de 200 mg/kg, suivi d'une injection de Nicotinamide à la dose de 210 mg/kg, selon la méthode décrite par Hayashi et ses collaborateurs en 2006 (Hayashi *et al.*, 2006). Nous avons vérifié l'installation du diabète une semaine après induction par mesure de la glycémie à jeun par le glycomètre One call plus, de référence 01554. Seules les souris ayant une glycémie à jeun supérieure à 126 mg/dL mesurée à deux reprises sont considérées diabétiques et ont été incluses dans le protocole expérimental de l'étude *in vivo* (Eidi *et al.*, 2009).

2.6.2. Traitement des animaux (souris)

Nous avons utilisé 30 souris qui ont été divisées en cinq groupes de six souris chacun :

- Groupe Non Diabétique (ND) ;
- Groupe Diabétique Non Traité (DNT) ;
- Groupe Diabétique Traité par le macéré aqueux d'*A. gummifera* L. (DTMA), à une dose de 500 mg/kg ;
- Groupe Diabétique Traité par le macéré de méthanol d'*A. gummifera* L (DTMM), à une dose de 500 mg/kg ;
- Groupe Diabétique Traité par la Metformine (DTM), à la dose de 300 mg/kg (dose

thérapeutique signalée dans la littérature) ;

Nous avons traité les souris diabétiques par les macérés aqueux et méthanolique d'*A. gummifera* par une dose de 500 mg/kg, qui correspond à un quart de la dose testée lors de l'étude de la toxicité aiguë, qui est de 2000 mg/kg et qui n'a provoqué aucune mortalité. De même, aucun signe de toxicité n'a été observé lors de cette étude.

2.6.3 Suivi des souris

Pendant la période du traitement qui a duré 5 semaines, le suivi des souris a été comme suit :

- Chaque jour : par mesure du poids corporel et gavage gastrique par les deux extraits : macérés aqueux et organique de la plante *A. gummifera* et par la Metformine ;
- Chaque semaine : par mesure de la glycémie à jeun, où le sang a été prélevé à jeun de la souris avant le gavage gastrique afin de déterminer le taux de glucose sanguin à l'aide d'un glucomètre (One Call Plus) qui repose sur les bandelettes réactives. Ces dernières sont conçues pour mesurer le glucose dans le sang. Les résultats des mesures ont été exprimés en termes de milligramme par décilitre de sang. Le pourcentage de diminution de la glycémie est calculé par la relation suivante :

$$\% \text{ de diminution de la glycémie} = \frac{[(\text{glycémie finale} - \text{glycémie initiale}) / \text{glycémie initiale}] \times 100.}$$

A la fin du traitement, nous avons fait un prélèvement du sang des souris pour le dosage de plusieurs paramètres biochimiques à savoir, la glycémie à jeun, la créatinine, l'urée, l'acide urique, l'aspartate aminotransférase (AST), l'alanine aminotransférase (ALT), les protéines totales, le cholestérol et les triglycéride (TG).

2.6.3.1. Suivi du poids corporel des souris

Le suivi du poids corporel des différents groupes de souris a été réalisé quotidiennement durant toute la période du traitement, afin de noter tout changement de poids entre les souris diabétiques traitées et non traitées et des souris témoins non diabétiques.

2.6.3.2. Suivi des paramètres biochimiques

Dans la présente étude, les échantillons de sang ont été obtenus suite à un prélèvement de sang et en utilisant des tubes capillaires. Les échantillons de sang ont été centrifugés à 3000

tr / min pendant 10 min à 4 °C et le plasma résultant a été stocké à - 4°C, jusqu'à analyse biochimique des paramètres suivants : glycémie, urée, créatinine, protéine totale, cholestérol, triglycérides, aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT).

a. Mesure de la glycémie à jeun

En plus de la mesure de la glycémie à jeun par le glucomètre One Call Plus une fois par semaine durant toute la période de l'étude, le dosage du taux de glucose a été réalisé aussi à la fin du traitement dans le sérum des différents groupes de souris, où le glucose qui se trouve dans le sérum du sang des souris est mesuré après une oxydation enzymatique en présence du glucose oxydase (**Trinder, 1969**). Cette réaction est réalisée par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i, selon les instructions du fabricant.

b. Dosage de l'urée

L'urée est une substance éliminée dans le sang et les urines et qui provient de la dégradation des protéines et la désamination des acides aminés synthétisés dans le foie. Son élimination dans l'urine représente la principale voie d'élimination du nitrogène. La mesure de l'urée sanguine permet d'estimer en partie le fonctionnement des reins, mais cette mesure est moins précise que celle de la créatinine.

La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode cinétique décrite par Bergmeyer et ses collaborateurs en 1974 (**Bergmeyer et al., 1974**). Elle est réalisée dans la présente étude par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i, selon les instructions du fabricant.

c. Dosage de la créatinine

La créatinine est le produit final du catabolisme de la créatine (ou phospho-créatine). La quantité produite chaque jour de cette créatinine est relative à la masse musculaire. Elle est filtrée librement par le glomérule. Le dosage de la créatinine est réalisé par une méthode cinétique et colorimétrique où elle est basée sur la réaction de la créatinine avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon (**Bergmeyer et al., 1974**).

Cette réaction est réalisée dans notre présente étude par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i selon les instructions du fabricant.

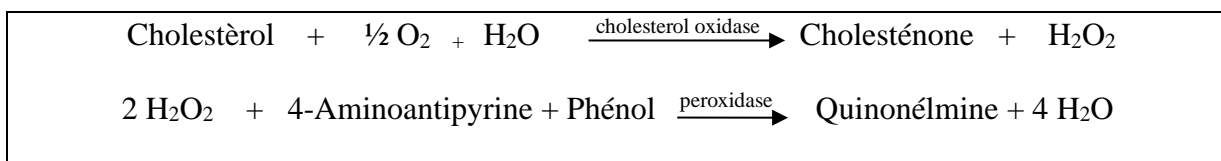
d. Dosage des protéines totales

Le glomérule se comporte comme un filtre des protéines plasmatiques. Le degré de filtration membranaire normal de chaque protéine est fonction de sa masse et de sa charge mais aussi de sa concentration plasmatique.

Le dosage des protéines totales présentes dans nos échantillons est réalisé selon la méthode décrite par Watanabe et ses collaborateurs en 1986 où la protéine réagit avec le rouge de pyrogallol et le molybdate en milieu acide pour former un complexe coloré (**Watanabe et al., 1986**). L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité de protéine. Cette réaction est réalisée dans notre présente étude par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i, selon les instructions du fabricant.

e. Dosage du Cholestérol

Le cholestérol est un stéroïde de haut poids moléculaire, il est absorbé dans l'alimentation et aussi synthétisé par le foie et autres tissus. Le cholestérol est transporté dans le plasma par des lipoprotéines. Il est sécrété tel quel dans la bile ou après une transformation en acides biliaires. Le dosage du cholestérol libre, ainsi que le cholestérol estérifié, présents dans nos échantillons est réalisé selon la méthode décrite par Allain et ses collaborateurs en 1974. En effet, le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents, l'oxydation enzymatique de ce cholestérol par le cholestérol oxydase engendre la formation de H₂O₂ qui réagit avec le phénol pour produire le quinonéimine de couleur rouge (**Allain et al., 1974**).



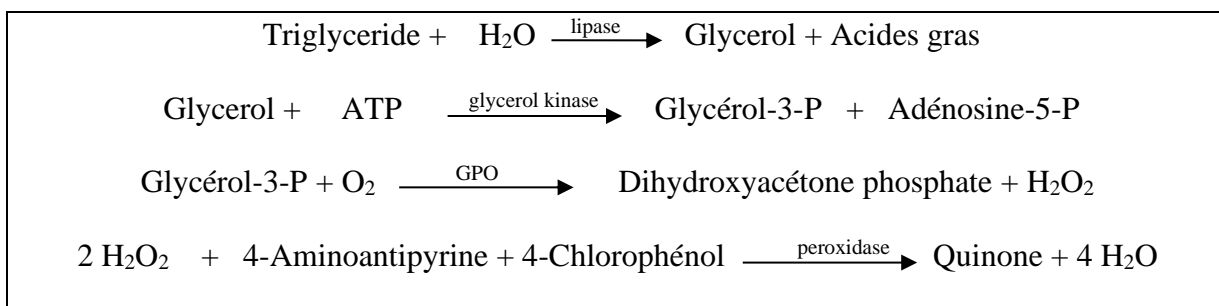
L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité de cholestérol dans le sérum de nos animaux. Cette réaction est réalisée dans notre présente étude par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i, selon les instructions du fabricant.

f. Dosage des triglycérides totaux

Les triglycérides sont constitués d'acides gras et de glycérol. Ils sont stockés dans les tissus adipeux et nous fournissent de l'énergie. Ces molécules lipidiques se forment dans l'intestin grêle à partir de graisses que nous consommons. Elles sont également produites dans le foie

à partir de l'excès de sucre dans notre alimentation. Les triglycérides sont très indispensables pour l'organisme, du fait de leur principale fonction de fournir de l'énergie aux cellules. Cependant, toute augmentation du taux des triglycérides est considérée comme une hypertriglycéridémie qui favorise la formation de pancréatites aiguës, de plaques d'athérome qui augmentent les risques cardiovasculaires et thrombotiques (**Bucolo et al., 1973**).

Le dosage des triglycérides est déterminé selon une méthode enzymatique colorimétrique décrite par Bucolo et ses collaborateurs en 1973 (**Bucolo et al., 1973**). Elle est basée sur un protocole expérimental précis. En effet, les triglycérides incubés avec la lipoprotéinlipase (LPL), libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-diphosphate (ADP) par le glycérol kinase et l'adénosine triphosphate (ATP). Le glycérol-3-phosphate (G3P) est alors converti par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et p-chlorophénol en présence de la peroxydase (POD), pour donner la quinone de coloration rouge. Le protocole comprend donc les réactions suivantes :

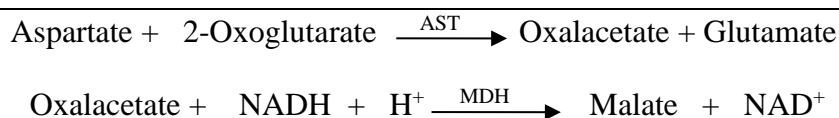


L'intensité de la couleur rouge des quinones est proportionnelle à la quantité de cholestérol dans le sérum de nos animaux. Cette réaction est réalisée dans notre présente étude par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i et ce selon les instructions du fabricant.

g. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

L'Aspartate Aminotransférase (ASAT), appelée aussi la glutamateoxaloacétate transaminase (GOT) est une enzyme, qui catalyse la formation de l'acide glutamique à partir du 2-oxoglutarate par transfert du groupement amine. Elle se trouve en grande quantité dans le foie et le muscle cardiaque, mais elle est aussi importante dans les muscles squelettiques, les reins et le pancréas.

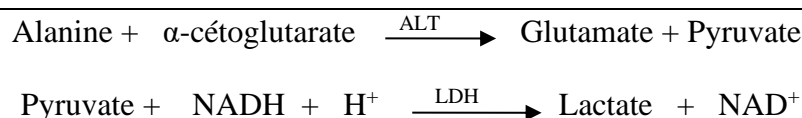
Le dosage de l'aspartate aminotransférase est déterminé selon une méthode colorimétrique décrite par la fédération internationale de chimie clinique (**Schumann et al., 2002**). Elle est basée sur la catalyse de transfert du groupement amine de l'aspartate au 2-oxoglutarate par l'ASAT, en formant l'oxaloacétate et le glutamate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH + H⁺, selon les réactions suivantes :



Le taux de la diminution de la concentration en NADH + H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'aspartate aminotransférase dans le sérum de nos animaux. Cette réaction est réalisée, dans notre présente étude, par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i, selon les instructions du fabricant.

h. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)

L'Alanine Aminotransférases (ASAT), appelée aussi la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) est une enzyme relativement spécifique du foie. Son dosage est particulièrement utile dans le cadre d'un bilan hépatique, afin de détecter une affection hépatique ou de suivre l'évolution d'une maladie du foie. Elle est déterminée selon la méthode colorimétrique décrite par la fédération internationale de chimie clinique (**Bergmeyer, 1980**). En effet, le dosage de l'ASAT est basé sur le transfert du groupement amine de l'alanine au 2-oxoglutarate par l'ALAT, en formant le pyruvate et le glutamate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate-déshydrogénase (LDH) et le NADH, selon les réactions suivantes :



Le taux de diminution de la concentration en NADH + H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'alanine aminotransférase dans le sérum de nos animaux. Dans notre présente étude, cette réaction est réalisée par un analyseur chimique automatisé Konolab Prime 30i, selon les instructions du fabricant.

3. Résultats

3.1. Activité antidiabétique *in vitro*

Selon de nombreuses études préalables, l'inhibition des enzymes responsables de la transformation des polysaccharides en glucose dans le tube digestif, est considérée comme l'une des approches efficaces pour la gestion du taux de glucose sanguin chez les patients diabétiques. Parmi ces enzymes, on trouve l' α -amylase salivaire et pancréatique qui catalyse l'hydrolyse des liaisons alpha-1,4-glucosidiques de l'amidon et du glycogène, les α -glucosidase (maltase, lactase et saccharase) qui concernent les enzymes catalysant les disaccharides en monosaccharides et les β -galactosidases qui hydrolysent des b β ta galactosides en oses plus simples. A cet \acute{e} gard, nous avons test \acute{e} les extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera L.* pour \acute{e} valuer leurs activit \acute{e} s antidiab \acute{e} tiques *in vitro* via leurs effets inhibiteurs sur ces trois enzymes.

Les r \acute{e} sultats que nous avons obtenus montrent que les extraits d'*A. gummifera L.* poss \acute{e} dent une activit \acute{e} inhibitrice de l' α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase et que le pourcentage d'inhibition de ces enzymes varie selon la nature des extraits et augmente en fonction de la concentration des extraits et atteint un plateau de saturation \grave{a} une concentration bien d \acute{e} finie pour chaque enzyme.

3.1.1. Activit \acute{e} inhibitrice de l' α amylase

L'activit \acute{e} inhibitrice d' α -amylase des extraits d'*A. gummifera* est pr \acute{e} sent \acute{e} e dans la **figure 9**, qui montre que tous les extraits inhibent l'activit \acute{e} de l' α -amylase \grave{a} des concentrations allant de 500 μ g/mL. En outre, tous les extraits ont montr \acute{e} une diff \acute{e} rence statistiquement significative ($p < 0,05$) par rapport au compos \acute{e} de r \acute{e} f \acute{e} rence, Acarbose. L'extract mac \acute{e} r \acute{e} de m \acute{e} thanol a montr \acute{e} la plus forte activit \acute{e} inhibitrice de l' α -amylase avec une valeur de la CI50 \acute{e} gale \acute{a} $557 \pm 0,013 \mu$ g/mL (**Tableau 9**) et avec une diff \acute{e} rence statistiquement significative par rapport aux autres extraits ($p < 0,05$). Ce r \acute{e} sultat reste inf \acute{e} rieur \grave{a} l'activit \acute{e} inhibitrice de l'acarbose (CI50 = $311 \pm 1,38 \mu$ g/mL), qui est une mol \acute{e} cule pure utilis \acute{e} e pour le traitement du diab \acute{e} te, mais qui provoque beaucoup d'effets secondaires et ayant beaucoup de contres indications.

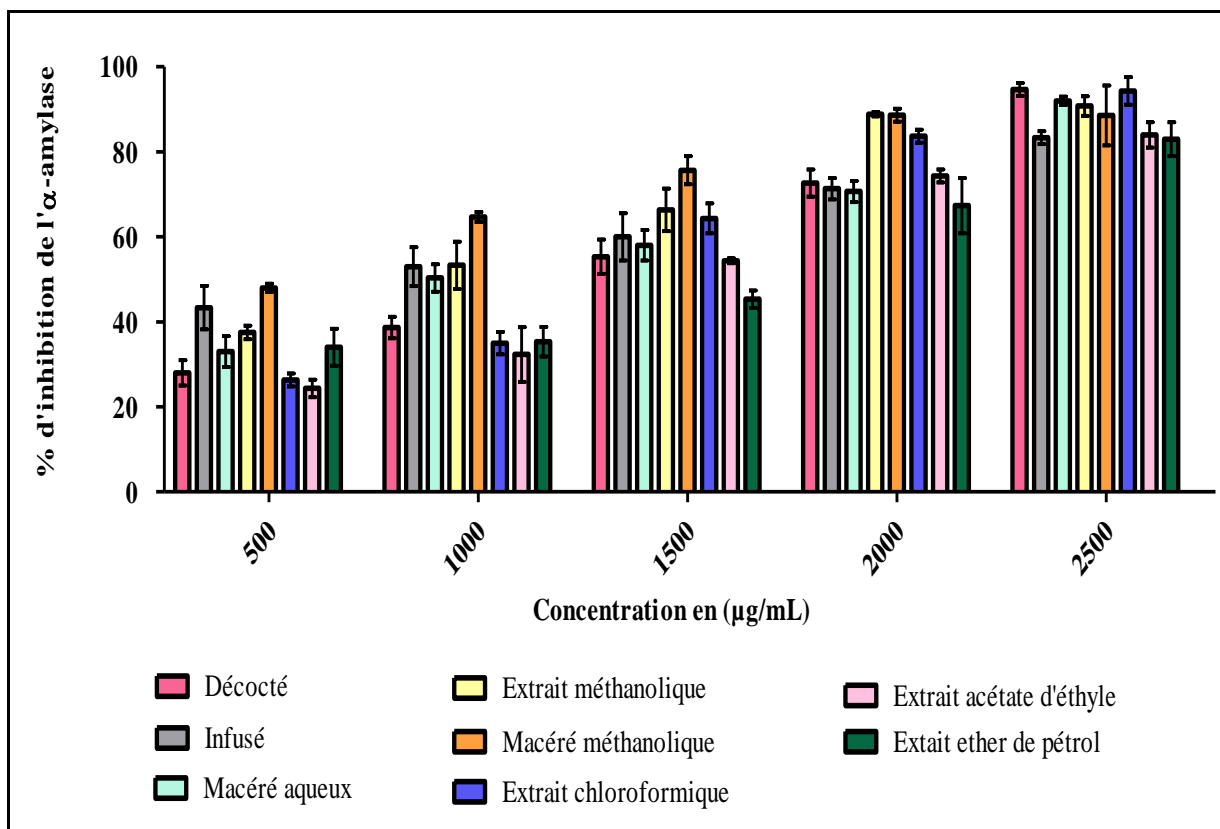


Figure 9 : Pourcentage d'inhibition de l'α-amylase des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

3.1.2. Activité inhibitrice de l'alpha glucosidase

Les extraits d'*Atractylis gummifera* à des concentrations qui varient entre 666 à 3330 µg/mL ont montré un effet inhibiteur de l'α-glucosidase, qui dépend de la concentration testée (**figure 10**). En effet, l'activité inhibitrice augmente au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente.

Tous les extraits testés avaient un effet inhibiteur de l'α-glucosidase avec une meilleure activité pour le macéré méthanolique (CI50 = 743 ± 0,017 µg/mL), mais ce résultat reste inférieur à celui du médicament de référence, Acarbose (CI50 = 180,1 ± 2,00 µg/mL) (**tableau 9**) avec des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$).

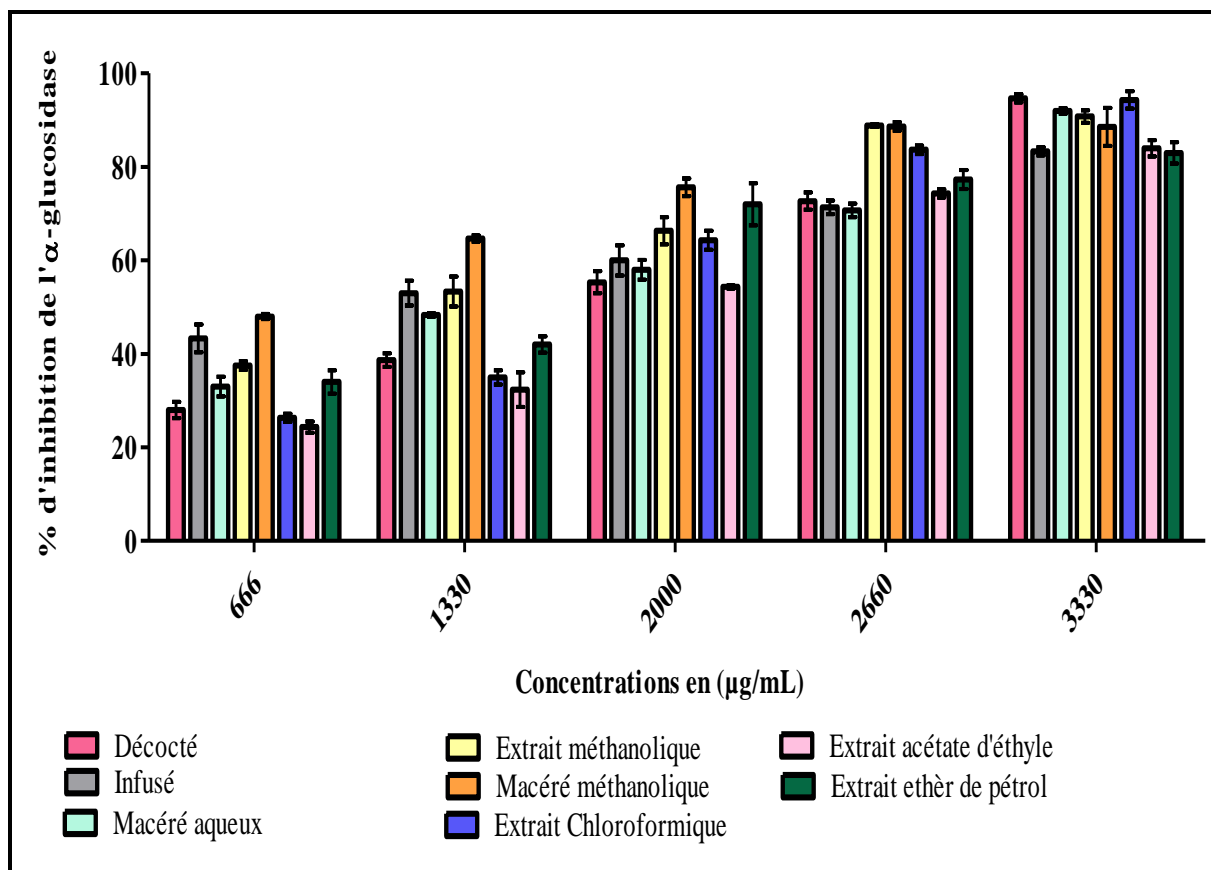


Figure 10 : Pourcentage d'inhibition de l'α-glucosidase des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

3.1.3. Activité inhibitrice de la bêta galactosidase

L'enzyme β-galactosidase qui hydrolyse les bêta galactosides a été bloquée aussi par les extraits d'*Atractylis gummifera* à des concentrations dépendantes allant de 666 jusqu'à 5000 µg/mL où le pourcentage d'inhibition augmente au fur et à mesure que la concentration augmente (**figure 11**). Les macérés aqueux et méthanolique ont la meilleure activité inhibitrice de cette enzyme avec des valeurs respectives des CI50 égales à $2230 \pm 0,012$ µg/mL et $2443 \pm 0,071$ µg/mL (**tableau 9**) avec des différences statistiquement non significatives entre ces deux extraits et aussi non significative par rapport au produit de référence, la quercétine, qui a une CI50 égale à $2460 \pm 1,09$ µg/mL. Cependant, les différences sont statistiquement significatives par rapport aux autres extraits de la plante.

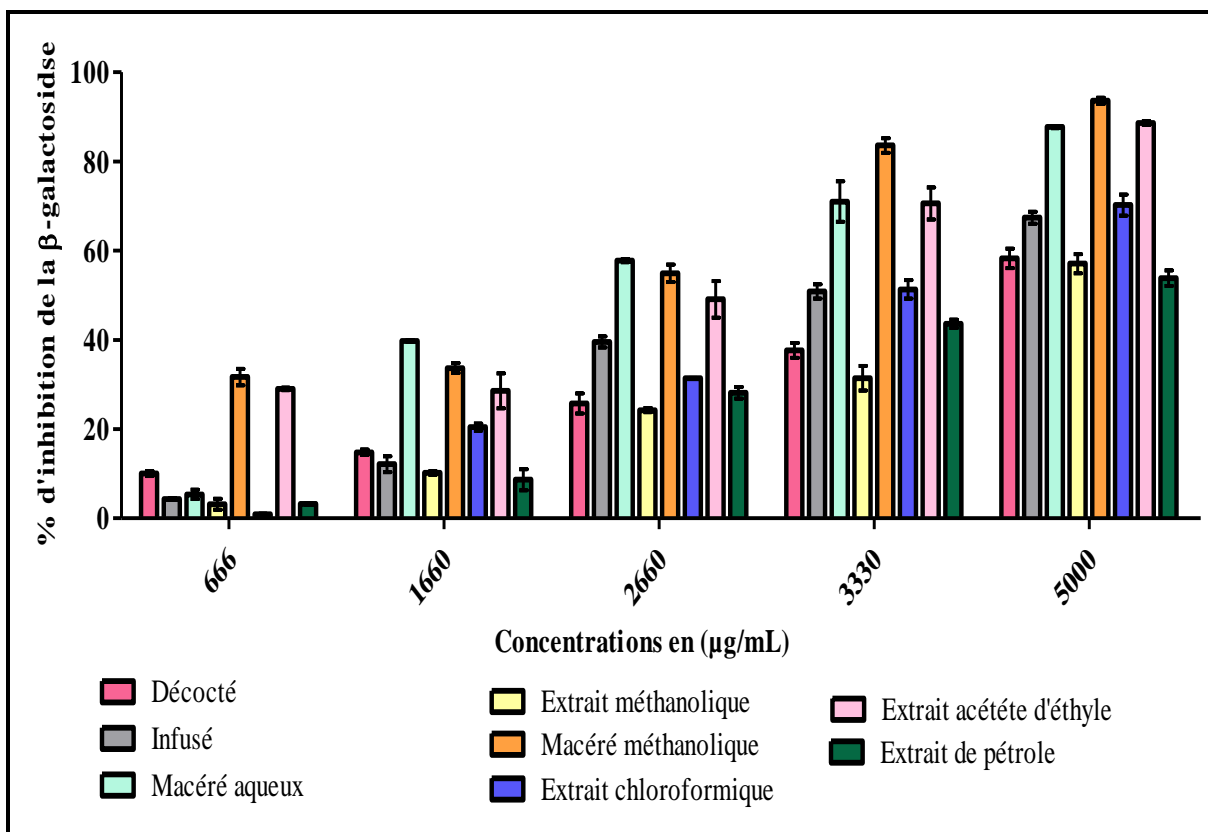


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition de β -galactosidase par les extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

Tableau 9 : Concentrations inhibitrices moyennes (CI50) ($\mu\text{g/mL}$) de l'activité inhibitrice des enzymes α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

	Extraits	α -amylase	α -glucosidase	β -galactosidase
Extraits aqueux	Décocté	1352 \pm 0,060 ^g	1802 \pm 0,080 ^g	4337 \pm 0,160 ^e
	Infusé	852 \pm 0,128 ^c	1133 \pm 0,171 ^c	3239 \pm 0,163 ^d
	Macéré aqueux	1000 \pm 0,055 ^e	1461 \pm 0,047 ^e	2230 \pm 0,012^a
Extraits organiques	Méthanolique	924 \pm 0,067 ^d	1236 \pm 0,089 ^d	4558 \pm 0,052 ^g
	Macéré méthanolique	557 \pm 0,013^b	743 \pm 0,017^b	2443 \pm 0,071^b
	Chloroformique	1256 \pm 0,029 ^f	1674 \pm 0,039 ^h	3300 \pm 0,068 ^d
	Acétate d'éthyle	1397 \pm 0,010 ^g	1863 \pm 0,013 ^g	2549 \pm 0,204 ^c
	Ether de pétrole	1605 \pm 0,005 ^h	1509 \pm 0,011 ^f	4440 \pm 0,131 ^f
Médicament de référence	Acarbose	311,20 \pm 1,38^a	180,1 \pm 2^a	-
	Quercétine	-	-	2460 \pm 1,09^b

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions \pm erreur standard moyenne. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Graph Pad Prism 5 par une analyse de variance à sens unique (ONE-WAY ANOVA), suivi du post test Tukey qui « compare all pairs of columns ». Les données ont été indiquées en Moyenne \pm Erreur Standard Moyenne. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à la valeur de $P < 0,05$

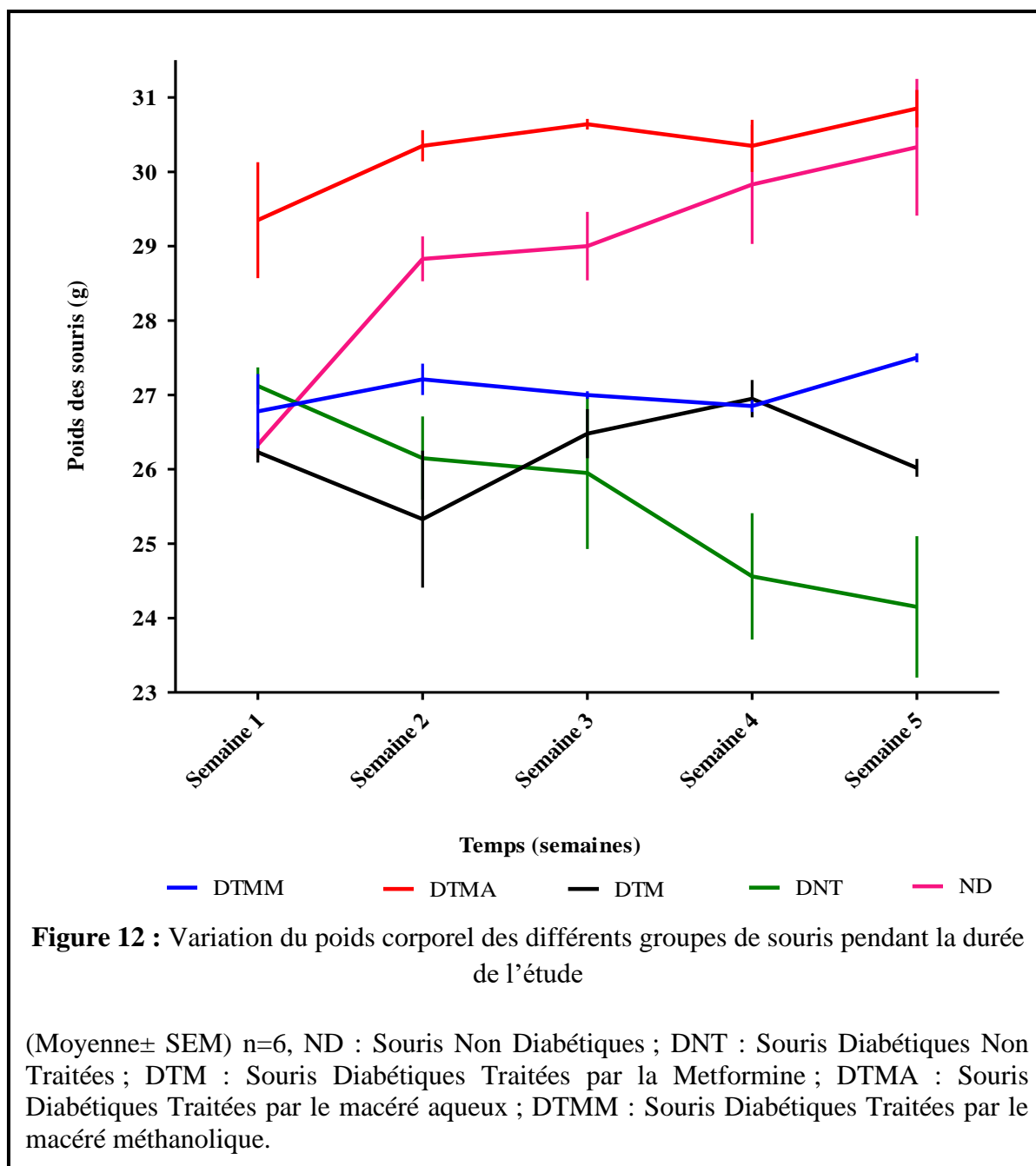
3.2. Toxicité aigüe

Durant l'étude de la toxicité aigüe, aucun décès n'a été observé pour les souris ayant reçu les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* L. à la dose de 2000 mg/kg du poids corporel. De même, les souris n'ont présenté aucun signe de toxicité tel que les modifications du comportement, les tremblements, les convulsions, les salivations, la diarrhée, le sommeil ou coma. Cela nous a permis de supposer que nos extraits sont sans danger à la dose de 2000 mg/kg.

3.3. Activité antidiabétique *in vivo*

3.3.1. Effet sur le poids corporel

Le suivi du poids corporel des animaux des différents groupes de souris de notre étude, nous a permis de noter tout changement du poids corporel des souris diabétiques traitées et non traitées et des souris témoins non diabétiques pendant toute la durée de l'étude. En effet, un gain du poids corporel a été observé dans les groupes DTM, DTMA et DTMM avec des différences statistiquement non significatives entre ces trois derniers groupes. Cependant, une diminution du poids a été observée pour le groupe diabétique non traité, qui avait une moyenne de poids au début de l'étude égale à $27,12 \pm 1,25$ g et qui est devenu de $24,15 \pm 0,95$ g avec une différence statistiquement significative entre le poids au début et à la fin de la période du traitement (**Figure 12**). L'amaigrissement des souris diabétiques non traitées est un signe clinique d'un arrêt du stockage du glucose sous forme de glycoprotéine et glycolipides et le déclenchement du processus de glycogénolyse, lipolyse et protéolyse nécessaires pour l'obtention de l'ATP, ce qui va provoquer par la suite l'amaigrissement des souris diabétiques non traitées (**Bastard *et al.*, 2013 ; Courbe *et al.*, 2017**).

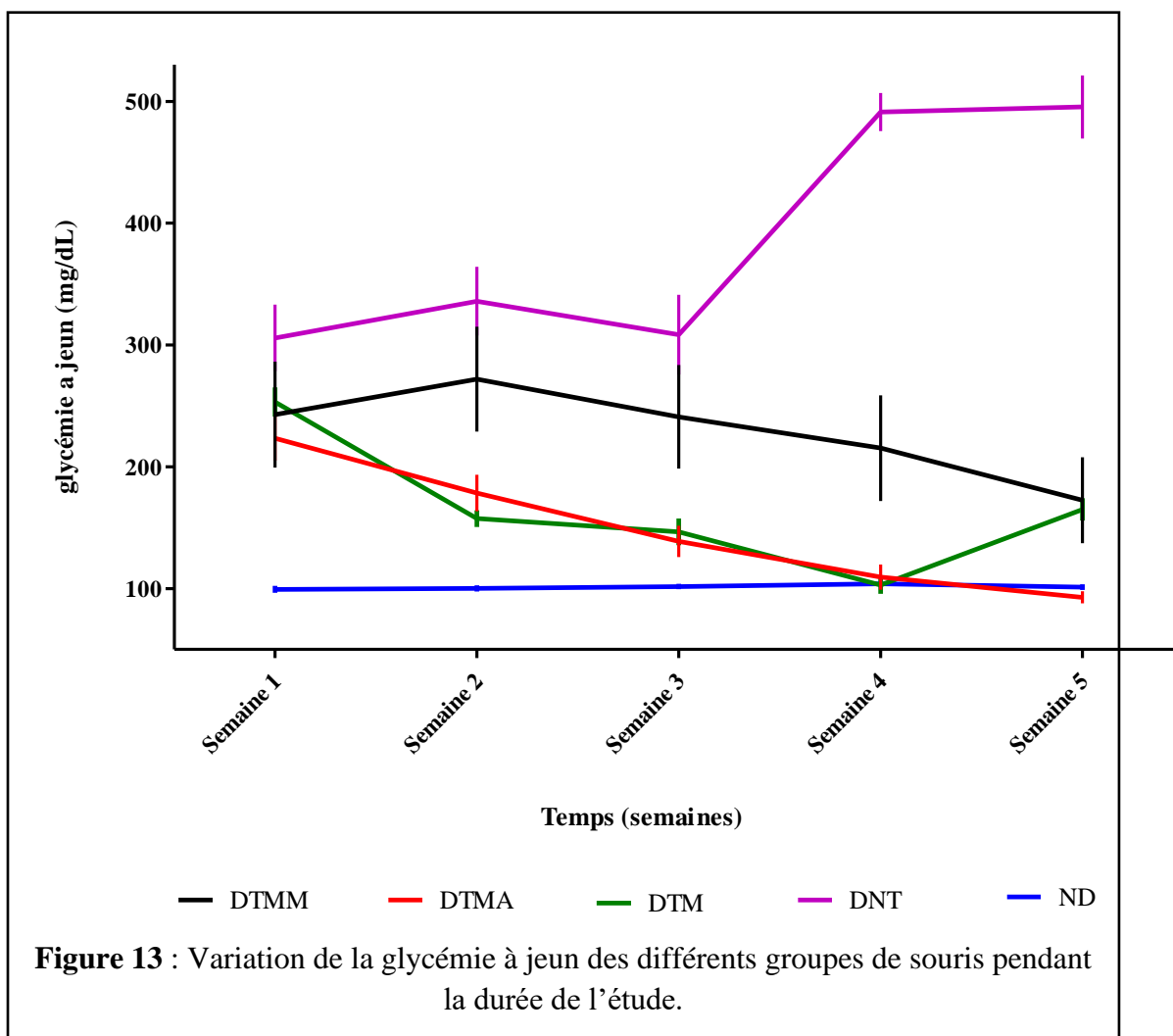


3.3.2. Effet sur les paramètres biochimiques

Le diabète de type 2 est une maladie chronique qui se caractérise non seulement par un déséquilibre de l'homéostasie du glucose, mais surtout par des complications micro et macro angiopathiques qui sont très dangereuses, d'où la nécessité d'analyser les paramètres biochimiques des différents groupes de souris.

a. Mesure de la glycémie à jeun

Les résultats de la mesure hebdomadaire de la glycémie pendant les 5 semaines de l'étude *in vivo*, montrent un taux normal de glucose chez les souris Swiss Albinos non diabétiques dont la moyenne est de $101 \pm 0,98 \text{ mg/ dL}$ (**Figure 13**). Cependant, l'administration de la STZ aux souris a provoqué une destruction des cellules β des îlots de Langerhans, responsables de la sécrétion de l'insuline, ce qui explique le taux de glucose très élevé dans le sang des souris diabétiques non traitées $387,5 \pm 43,58 \text{ mg/ dL}$ (**Figure 13**). Au cours du traitement des souris diabétiques, nous avons constaté une diminution significative du taux du glucose sanguin, dès la première semaine du traitement des souris diabétiques, soit par les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera*, ou par le médicament de référence, la Metformine, par rapport aux souris diabétiques non traitées, que le traitement. Cette diminution du taux de glucose était meilleure chez les souris diabétiques traitées par le macéré aqueux (- 62,73%), suivi par les souris diabétiques traitées par la Metformine (-59,38%) et en troisième position, les souris traitées par le macéré méthanolique (-37,11%) avec des différences statistiquement significatives entre les trois groupes. Ainsi, nous pouvons déduire que le macéré aqueux d'*Atractylis gummifera L.* a le pouvoir antidiabétique le plus puissant. Cela, peut être attribué à la richesse de cet extrait en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) et en tanins (**Bouabid et al., 2018**), qui sont connus pour leurs capacités à augmenter la sensibilité à l'insuline par les organes utilisateurs de l'insuline (foie, tissus adipeux, muscles) et / ou inhiber le processus de dégradation de polysaccharides (**Swanston-Flat et al., 1990 ; Asgharpour et al., 2013**).



b. Dosage de l'urée et de la créatinine

L'augmentation de la teneur sérique en urée et en créatinine et plus particulièrement en créatinine, est considérée comme un marqueur spécifique du dysfonctionnement rénal (Almadal *et al.* 1988). Dans cette étude, nous avons constaté que les valeurs d'urée et de créatinine chez les souris non diabétiques étaient respectivement de $0,28 \pm 0,02$ g/L et de $3,83 \pm 0,16$ mg/L et qu'elles ont augmenté de manière significative par rapport aux souris diabétiques non traitées, avec des valeurs d'urée et de créatinine ayant des valeurs respectivement de l'ordre de $0,32 \pm 0,02$ g / L et $4,66 \pm 0,21$ mg/L. Cette augmentation de la concentration sérique de créatinine et d'urée chez les souris diabétiques non traitées a chuté de manière significative chez les souris diabétiques traitées avec les macérés aqueux et méthanolique d'*A. gummifera* et par la Metformine. En effet, nous avons remarqué que le niveau de créatinine est devenu $2,25 \pm 0,63$ mg/L après le traitement des souris diabétiques

par le macéré aqueux ; $3,18 \pm 0,61$ mg/L après le traitement avec le macéré méthanolique et $3,66 \pm 0,21$ mg/L après le traitement avec la Metformine avec des différences statistiquement non significatives entre ces trois derniers groupes et significatives par rapport aux souris témoins ; souris non diabétiques et souris diabétiques non traitées ; (Figure 14). Ainsi, nous pouvons déduire que le macéré aqueux d'*A. gummifera* est le meilleur extrait parmi les 7 extraits testés et présente une activité supérieure à celle du médicament de référence : la Metformine et qui pourrait prévenir le dysfonctionnement rénal chez les souris diabétiques, suivi par le macéré méthanolique et en dernière position la Metformine. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec d'autres études menées sur des plantes marocaines et internationales qui ont démontré que les extraits de plantes peuvent réduire le dysfonctionnement rénal chez les souris diabétiques tel que *Nigella sativa* (Benhaddou *et al.*, 2011 ; Labhal *et al.*, 1999) et les extraits de *Vaccinium angustifolium* Ait (Martineau *et al.*, 2006). Ces plantes ont pu réduire le dysfonctionnement rénal chez les souris diabétiques avec une différence statistiquement significative, par rapport aux souris non diabétiques et aussi aux souris diabétiques non traitées.

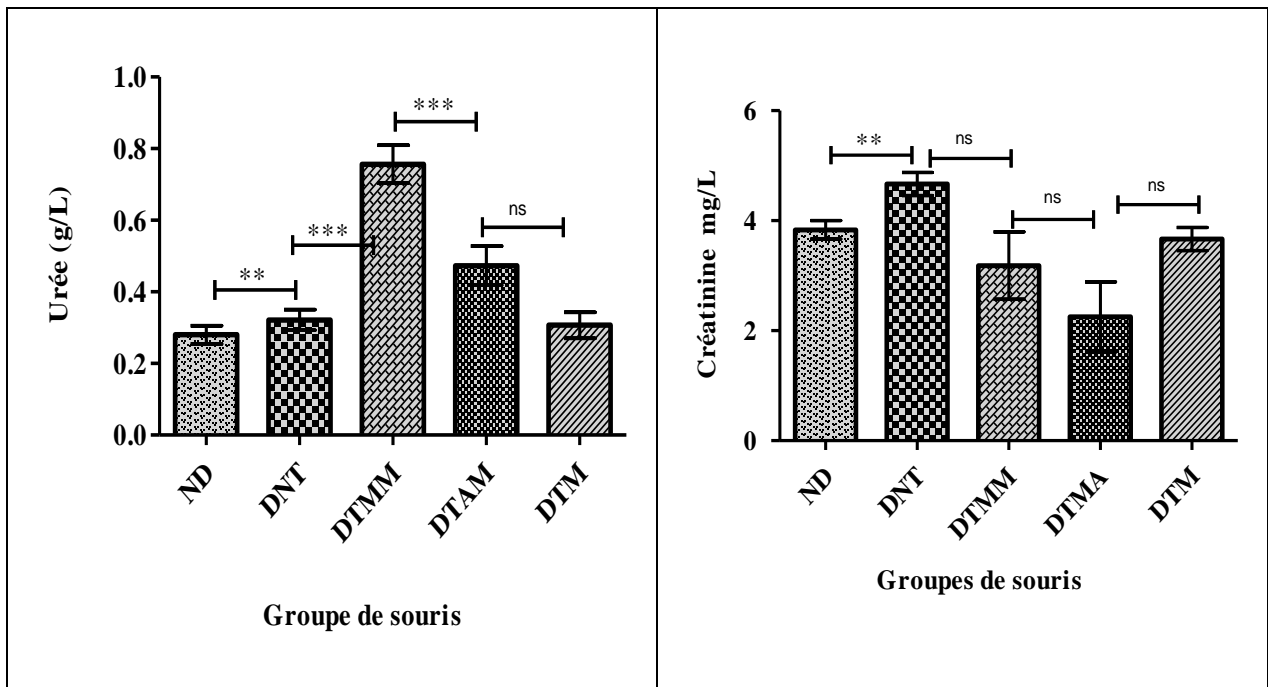


Figure 14 : Variation de la créatinine et de l'urée dans le sang des différents groupes de souris.

ND : Souris Non Diabétiques ; DNT : Souris Diabétiques Non Traitées ; DTMM : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré méthanolique ; DTMA : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré Aqueux ; DTM : Souris Diabétiques Traitées par la Metformine ; ns : Différence statistiquement non significative ; ***: Différence statistiquement très significative $p < 0.001$; **: Différence statistiquement significative $p < 0.01$; *: Différence statistiquement significative $p < 0.05$ (n=6)

c. Dosage des protéines totales

Le taux des protéines totales chez les souris témoins non diabétiques était de $62,33 \pm 3,36$ g/L, mais il a diminué avec une différence significative chez les souris diabétiques non traitées $57,16 \pm 2,67$ g/L, ce qui explique l'amaigrissement de ces souris. Cependant, le traitement des souris diabétiques par les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* a augmenté le taux sérique en protéines totales avec des valeurs respectives pour le macéré aqueux et le macéré du méthanol de $63,3 \pm 2,78$ g/L et de $78,83 \pm 2,5$ g/L avec une différence statistiquement significative entre ces deux extraits et aussi par rapport aux souris diabétiques non traitées et aux souris non diabétiques (**Figure 15**).

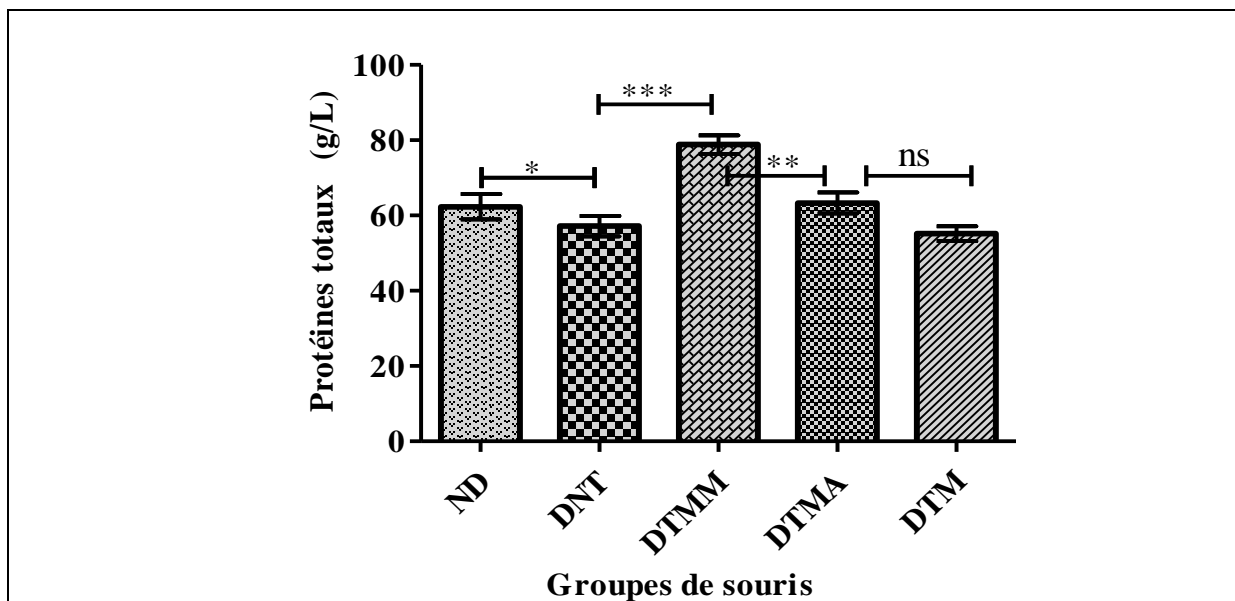


Figure 15 : Variation du taux des protéines totales dans le sang des différents groupes de souris.

ND : Souris Non Diabétiques ; DNT : Souris Diabétiques Non Traitées ; DTMM : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré méthanolique ; DTMA : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré de Aqueux ; DTM : Souris Diabétiques Traitées par la Metformine ; ns: Différence statistiquement non significative ; ***: Différence statistiquement très significative $p < 0.001$; **: Différence statistiquement significative $p < 0.01$; *: Différence statistiquement significative $p < 0.05$ (n=6)

d. Dosage des Cholestérols totaux et des Triglycérides

Dans la présente étude, les taux du cholestérol et des triglycérides chez les souris non diabétiques sont respectivement de $1,03 \pm 0,16$ g/L et $0,59 \pm 0,02$ g/L alors que nous avons remarqué une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie chez les souris diabétiques non traitées, avec une différence statistiquement significative par rapport aux souris non diabétiques avec des valeurs respectives de $1,29 \pm 0,05$ g/L et $1,28 \pm 0,06$ g/L (**Figure 16**).

Ces deux paramètres lipidiques sont deux grands problèmes de santé chez les patients atteints de diabète sucré et sont responsables des complications micro et macro angiopathiques (Maxwell *et al.*, 2013).

L'administration du macéré aqueux d'*A. gummifera* a permis la diminution de la cholestérolémie et du taux sérique des triglycérides chez les souris diabétiques avec des différences statistiquement significatives par rapport aux souris diabétiques non traitées et aux souris non diabétiques de l'ordre respective de $1,21 \pm 0,07$ g/L et $0,85 \pm 0,08$ g/L. De même, la Metformine a diminué le profil lipidique chez les souris diabétiques avec des valeurs respectives du cholestérol et de triglycérides de $1,06 \pm 0,06$ g/L et $0,89 \pm 0,14$ g/L et avec des différences statistiquement significatives, par rapport aux souris diabétiques non traitées et aux souris non diabétiques et des différences non significatives par rapport aux souris traitées par le macéré aqueux (Figure 16).

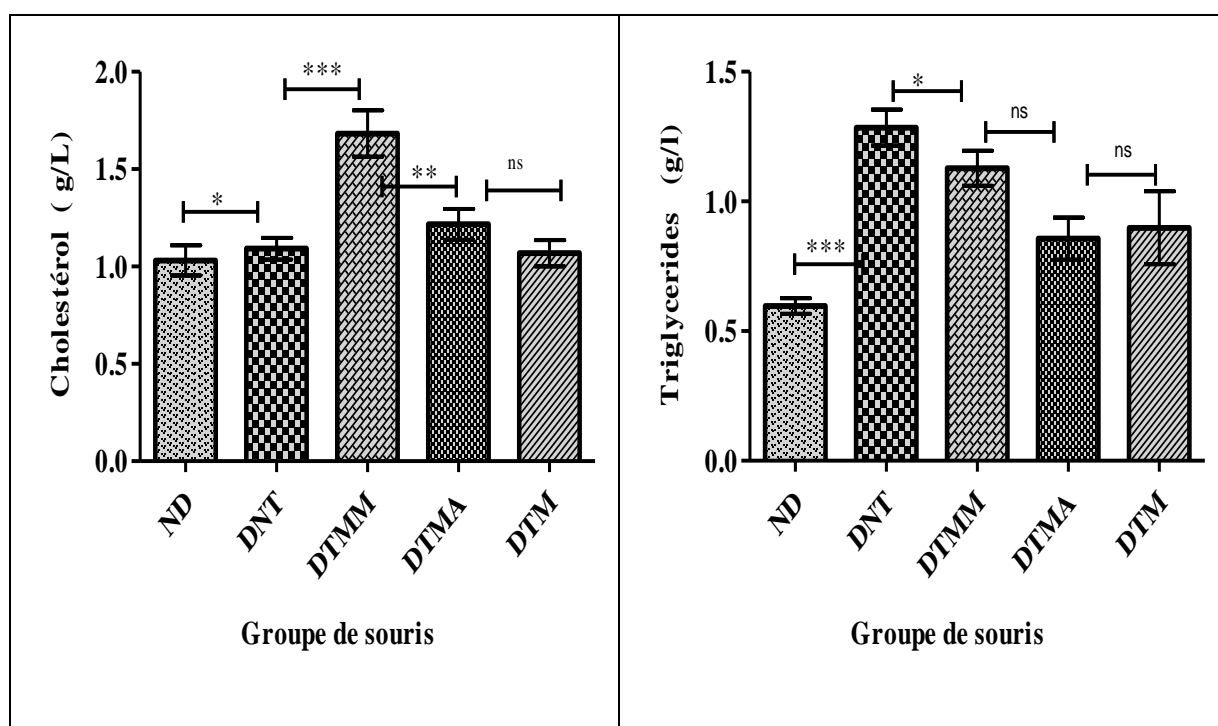


Figure 16 : Variation du taux des cholestérols et des triglycérides dans le sang des différents groupes de souris.

ND : Souris Non Diabétiques ; DNT : Souris Diabétiques Non Traitées ; DTMM : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré méthanolique ; DTMA : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré Aqueux ; DTM : Souris Diabétiques Traitées par la Metformine ; ns : Différence statistiquement non significative ; ***: Différence statistiquement très significative $p < 0,001$; **: Différence statistiquement significative $p < 0,01$; *: Différence statistiquement significative $p < 0,05$ (n=6)

e. Dosage d'aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase

L'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) sont les enzymes qui se libèrent suite à la destruction des cellules du foie. Donc, plus le taux de ces enzymes est élevé, plus le risque de développer une insuffisance hépatique est accentué.

Dans la présente étude, le taux d'ASAT et d'ALAT pour les souris non diabétiques étaient respectivement de $137,16 \pm 11,58$ IU/L et $40,66 \pm 2,45$ IU/L. Cependant, les souris diabétiques non traitées ont montré une augmentation significative de ces enzymes par rapport aux souris non diabétiques avec des valeurs respectives d'ASAT et d'ALAT de $389,6 \pm 58,1$ et $315 \pm 49,03$ IU/L. De même, nous avons remarqué que le taux de ces enzymes a augmenté avec des différences statistiquement significatives chez les souris diabétiques traitées par la Metformine par rapport aux souris non diabétiques et ceux avec des valeurs respectives d'ASAT et d'ALAT de $283,16 \pm 22,4$ et $50,66 \pm 3,27$ IU/L.

Aussi, nous avons remarqué que les souris traitées par les macérés d'*Atractylis gummifera* ont présenté une augmentation des taux d'ASAT et d'ALAT avec une différence statistiquement significative par rapport aux souris normaux, avec des valeurs respectives d'ASAT et d'ALAT de $484,16 \pm 80$ IU/L et $142,16 \pm 22$ IU/L pour le macéré aqueux et de $506,5 \pm 89$ IU/L et $342,83 \pm 96$ IU/L pour le macéré du méthanol. Cependant, nous avons remarqué que l'augmentation du taux de ces enzymes était beaucoup plus importante dans le macéré du méthanol que le macéré aqueux. Ainsi, nous pouvons déduire que le macéré aqueux est moins hépatotoxique que le macéré méthanolique (**Figure 17**).

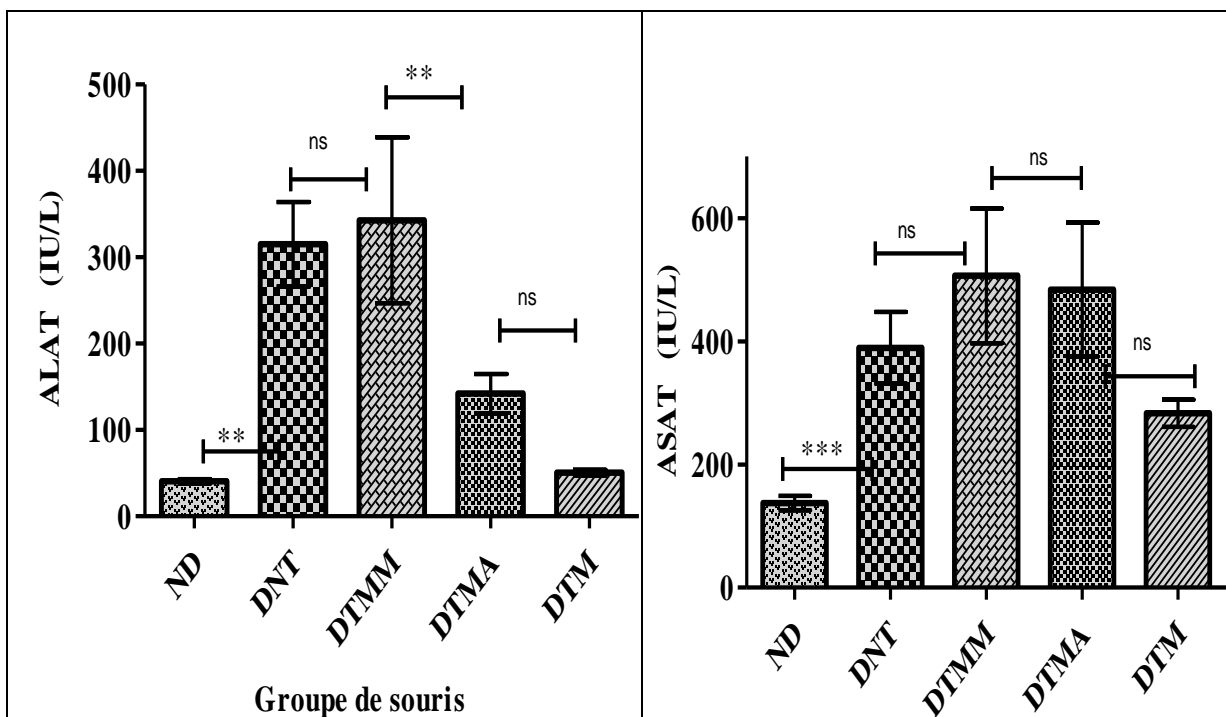


Figure 17 : Variation du taux des Transaminases Alanine Aminotransférase (ALAT) et Aspartate Aminotransférase (ASAT) dans le sang des différents groupes de souris.

ND : Souris Non Diabétiques ; DNT : Souris Diabétiques Non Traitées ; DTMM : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré méthanolique ; DTMA : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré Aqueux ; DTM : Souris Diabétiques Traitées par la Metformine ; ns : Différence statistiquement non significative ; ***: Différence statistiquement très significative $p < 0.001$; **: Différence statistiquement significative $p < 0,01$; *: Différence statistiquement significative $p < 0,05$ (n=6)

4. Discussion

L'évaluation de l'activité inhibitrice des trois enzymes ; α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase ; s'est avérée meilleure avec les extraits d'*Atractylis gummifera* préparés à froid par macération et avec les solvants les plus polaires, à savoir les macérés aqueux et méthanolique. Ce constat est conforme à des études antérieures qui ont montré que certains extraits de plantes médicinales comme l'extrait aqueux-éthanolique exprimé à 75% de la propolis, inhibe l' α -glucosidase avec une CI50 de $7,24 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$ (Zhang *et al.*, 2015). Aussi, l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Miconia sp* a présenté une CI50 pour α -amylase et α -glucosidase respectivement de $28,23 \pm 2,15$ et $1,95 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ (Ortiz-Martinez *et al.*, 2016). De plus, une étude menée dans notre laboratoire (Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat) sur l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Cistus salviifolius* a montré un pouvoir inhibiteur remarquable de l' α -

amylase et l' α -glucosidase avec des CI50 respectivement de $217,10 \pm 0,15$ et $0,95 \pm 0,14$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sayah *et al.*, 2017). Ces plantes ont des activités inhibitrices de ces enzymes plus puissantes que les inhibiteurs synthétiques commercialisés qui ont des coûts élevés (64,40dh pour ACARBOSE LAPROPHAN 100 mg ~ 6 €) et qui provoque beaucoup d'effets secondaires.

Malgré que l'activité inhibitrice de l' α -amylase et d' α -glucosidase des macérés d'*Atractylis gummifera* L. est relativement inférieure à l'activité des médicaments de référence, ces derniers sont des molécules pures possédant beaucoup d'effets secondaires et des contres indications, alors que nos extraits sont encore des mélanges contenant probablement plusieurs molécules qui nécessitent d'être purifiées et fractionnées pour extraire le ou les principe(s) actif(s). De plus, les concentrations choisies et utilisées dans nos tests sont comprises entre 500 et 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valeurs largement inférieures aux doses toxiques. En effet, d'après Lefranc, une dose de 100 g de racine fraîche en infusion lactée ou prise en nature, serait mortelle pour un adulte, alors que selon Charnot, un individu de 60 kg serait tué par 480 g de racine fraîche en infusion (Ahid *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que la dose létale chez le rat est de 431 mg/kg et chez la souris de 580 mg/kg par voie intra péritonéale (Bnouham *et al.*, 2006), et de 1100 mg/kg chez le rat par voie orale (Larabi *et al.*, 2012).

L'étude phytochimique a indiqué que les macérés aqueux et méthanolique sont très riche en composés phénoliques (flavonoïdes et tannins), ce qui suggère que ces derniers peuvent être responsables de l'inhibition des activités de l' α -amylase, l' α -glucosidase et la β -galactosidase. En effet, les composés phénoliques sont connus pour leurs capacités à inhiber les enzymes hydrolysant les glucides. Il a été démontré dans le travail réalisé par Shobana et ses collaborateurs en 2009 (Shobana *et al.*, 2009), que les composés phénoliques extraits de la couche de graines de millet et caractérisés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS), ont la plus forte inhibition de l' α -glucosidase et de l'amylase pancréatique, avec des valeurs respectives de CI50 de 16,9 et 23,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Ainsi, nous pouvons déduire que les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* qui sont très riche en composés phénoliques peuvent être une bonne source d'agents thérapeutiques contre le diabète de type 2 ; une des maladies largement traitées par les plantes médicinales et aromatiques (Rupeshkumar *et al.*, 2014). Ainsi, nous pouvons

expliquer la fréquence élevée de l'utilisation de cette plante, et de la famille des *Astéracées* d'une façon générale, dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement de plusieurs pathologies, d'après les résultats de l'enquête ethnobotanique qui a été réalisée auprès des herboristes, des tradipraticiens et des droguistes de la région de Meknès-Tafilalet au Maroc et qui a montré qu'*Attractifs gummifera* compte parmi les espèces les plus utilisées dans cette région. Elle occupe la troisième position en ce qui concerne la fréquence d'utilisation pour le traitement des affections du tube digestif et les troubles cardiovasculaires (**Bammou et al., 2015**). Aussi, l'étude réalisée par Jouad et ses collaborateurs qui ont montré qu'*Atractylis gummifera* compte parmi les plantes les plus utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diabète sucré (**Jouad et al., 2001**).

La meilleure activité des macérés aqueux et méthanolique révélée lors de l'évaluation de l'activité antidiabétiques *in vitro* en comparaison avec les autres extraits d'*A. gummifera*, nous a bio guidé dans notre étude *in vivo*, que nous avons commencé par l'étude de la toxicité aigüe de ces deux extraits. Ainsi, nous avons noté une absence de mortalité ou même des signes de toxicité pour les souris ayant reçu, par gavage gastrique, les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* L. à la dose de 2000 mg/kg du poids corporel, ce qui signifie que nos extraits sont sans danger à 2000 mg/kg. Aussi, les différentes études de toxicité réalisées sur *Atractylis gummifera* ont montré que la toxicité de cette plante dépend de la dose du toxique, de la voie dont elle est administrée et du modèle animal utilisé (**Bouabid et al., 2019**). En fonction de ces variables, les chercheurs ont pu déterminer la dose létale de cette plante. Le **tableau 10** résume la variation de la dose létale 50 (DL50) en fonction de la substance toxique, du modèle animal utilisé et de la voie d'administration.

Tableau 10 : Doses létales d'*Atractylis gummifera* L. (Bouabid *et al.*, 2019).

Matériel végétal / Substances toxiques	Modèle animal	Voie d'administration	Dose létale 50 (DL50)	Références
Partie souterraine d' <i>A. gummifera</i>	Souris	Intrapéritonéale	101,5 mg/kg	(Georgiou, 1988)
Partie souterraine d' <i>A. gummifera</i>	Souris	Orale	> 2000mg/kg	(Bouabid <i>et al.</i> , 2019 ^a)
Atractyloside	Rat	Intrapéritonéale	143 mg/kg	(Hedili <i>et al.</i> , 1989)
Carboxyatractyloside	Rat	Intrapéritonéale	2,9 mg/kg	(Zaim <i>et al.</i> , 2009)
Atractyloside	Rat	Orale	1000 mg/kg	(Haouzi <i>et al.</i> , 2002)
Carboxyatractyloside	Rat	Orale	350 mg/kg	(Kephalas <i>et al.</i> , 199)

Ainsi, nous pouvons constater que la variation de la DL50 dépend essentiellement de la partie utilisée du matériel végétal et de son passage à la circulation sanguine générale. En effet, l'absorption est souvent influencée par la voie d'administration, où la voie intraveineuse est la voie où toute la dose administrée atteint la circulation générale. Ainsi, nous avons remarqué que dans toutes les études, la DL50 reste très petite dans le cas où le toxique est administré par voie intra péritonéale, car il est injecté dans l'abdomen, contrairement à la voie orale où la DL50 est caractérisée par des valeurs plus grandes du fait que le toxique passe par plusieurs étapes avant d'atteindre la circulation sanguine, ce qui provoque sa dégradation et son métabolisme.

De ce fait, pour poursuivre nos études *in vivo*, nous avons choisi pour cette étude comme dose thérapeutique 500 mg/kg du poids corporel des souris et qui correspond à un quart de la dose testée lors de l'étude de la toxicité aiguë et qui n'a provoqué aucun décès ni signe de toxicité chez les souris. Cette dose thérapeutique se trouve dans une zone largement sécurisée et loin de la dose toxique d'*Atractylis gummifera* L. En effet, d'après la recherche réalisée par Bnouham et ses collaborateurs sur l'effet toxique de plusieurs plantes marocaines, la dose létale qui provoque 50% des décès (DL50) de l'extrait traditionnel de la racine d'*A. gummifera* chez la souris varie en fonction de la voie d'administration où elle est de 580 mg/kg par voie intra péritonéal (Bnouham *et al.*, 2006), alors qu'elle est beaucoup plus élevée par voie orale où elle est supérieure à 2000 mg/kg (Zaim, 2009). La DL50 d'*A.*

gummifera dépend aussi de la partie de la plante ingérée et de la façon dont elle est préparée (Vallejo *et al.*, 2009). En effet, une dose de 100 g de racine fraîche en infusion lactée ou prise en nature, serait mortelle pour un adulte alors que selon Charnot, un individu de 60 kg serait tué par 480 g de racine environ (Ahid *et al.*, 2012).

De ce, nous avons évalué l'activité antidiabétique *in vivo* des macérés aqueux et méthanolique via la dose thérapeutique choisie après l'étude de la toxicité aigüe et qui est de 500mg/kg. Le traitement des souris diabétiques par cette dose a montré un retour à la normale pour la majorité des paramètres sanguins chez les souris diabétiques. En effet, après l'induction du diabète dans les différents groupes de souris, nous avons d'abord suivi la variation de leur poids corporel et nous avons constaté une perte de poids chez des souris diabétiques non traitées, ce qui est un signe clinique de l'arrêt du stockage du glucose sous forme de glycoprotéines et de glycolipides et c'est aussi un signe de déclenchement du processus de glycogénolyse, de lipolyse et de protéolyse nécessaire pour l'obtention de l'ATP. Ce dernier entraînera par la suite une perte de poids chez les souris diabétiques non traitées (Martin *et al.*, 2017).

De plus, la mesure hebdomadaire de la glycémie à jeun, nous a permis de déduire que le macéré aqueux d'*Atractylis gummifera* L. possède le plus puissant pouvoir antidiabétique. Cela peut être attribué à la richesse de cet extrait en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) et en tanins (Bouabid *et al.*, 2018) qui sont connus pour leur capacité à augmenter la sensibilité à l'insuline des organes utilisateurs (foie, tissu adipeux, muscle) et/ou à inhiber le processus de dégradation des polysaccharides (Swanston-Flat *et al.*, 1990 ; Asgharpour *et al.*, 2013).

De même, l'analyse des paramètres biochimiques nous a permis de confirmer l'activité antidiabétique *in vivo* des macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera*, en particulier chez les souris diabétiques traitées avec 500 mg du macéré aqueux/kg, pendant les cinq semaines du traitement. En effet, l'analyse des paramètres biochimiques a montré que cet extrait diminue les valeurs des paramètres biochimiques (glucose à jeun, urée, créatinine, cholestérol, triglycérides, ASAT et ALAT), alors que le niveau de protéines totales était restauré à la normale par le macéré de méthanol de manière statistiquement significative, par rapport aux souris diabétiques non traitées et aux souris non diabétiques, ce qui réduirait également les facteurs de risque et les complications observées chez les patients diabétiques ; en particulier, les complications micro-angiopathiques et le dysfonctionnement

hépatique rénal. Nous pouvons donc en déduire que le macéré aqueux d'*Atractylis gummifera* pourrait bien être une source prometteuse d'un antidiabétique oral qui permettrait de rétablir le niveau de glucose dans le sang à la normale, de prévenir les complications du diabète et de réduire l'insulinorésistance. En outre, cet extrait a un rôle très important dans l'inhibition des enzymes responsables de la dégradation des polysaccharides, ce qui a été démontré *in vitro*. En fait, nous avons démontré que parmi plusieurs extraits d'*Atractylis gummifera* (3 extraits aqueux et 5 extraits organiques), les macérés aqueux et méthanolique sont ceux qui présentent la meilleure activité inhibitrice des enzymes alpha amylase, alpha glucosidase et bêta-galactosidase (**Bouabid et al., 2018**). L'activité antidiabétique du macéré aqueux est probablement due à sa teneur élevée en polyphénols, flavonoïdes et tanins qui ont un effet antidiabétique. En effet, le criblage phytochimique a révélé que le macérés aqueux d'*Atractylis gummifera* est un extrait qui contient des tanins et des flavonoïdes (**Bouabid et al., 2018**). Nous pouvons donc en déduire que la synergie moléculaire a un effet bénéfique dans ce cas, ce qui explique l'action de cet extrait sur plusieurs paramètres biochimiques et le rétablissement de leurs valeurs à la normale. Cependant, des études approfondies sont nécessaires avant toute possibilité d'extrapolation à l'Homme.

5. Conclusion

Les résultats de l'étude *in vitro* montrent que les extraits de la racine d'*Atractylis gummifera* possèdent un pouvoir inhibiteur de l'alpha amylase, l'alpha glucosidase et la bêta galactosidase avec des différences statistiquement significatives et une distinction remarquable des macérés aqueux et méthanolique. Pour l'étude *in vivo* et avec une dose thérapeutique de 500 mg/kg, nous avons noté une diminution importante de la glycémie chez les souris durant les 5 semaines du traitement et plus particulièrement pour le macéré aqueux (-62,73%). Ainsi, les paramètres biochimiques ont été rétablis aux valeurs normales, en comparaison avec le bilan sanguin des souris diabétiques non traitées.

Chapitre 3 : Etude de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* d'*Atractylis gummifera*

1. Introduction

Les organismes aérobies sont les êtres vivants dont la voie métabolique de production d'énergie utilise de l'oxygène comme accepteur d'électrons. Cet oxygène a un potentiel oxydant très élevé, ce qui le rend parallèlement dangereux pour toutes les molécules organiques. Ainsi, les organismes vivants ont développé des défenses antioxydantes qui reposent sur des systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Cependant, ce système de défense oxydatif peut être perturbé par différentes pathologies aiguës ou chroniques tel que le diabète. D'où, la nécessité de renforcer le système oxydatif par les antioxydants exogènes et l'intérêt de rechercher des antioxydants qui peuvent soutenir la défense antioxydante naturelle (Favier, 2003).

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* auxquels l'activité antidiabétique *in vitro* et *in vivo* a été évaluée auparavant (Chapitre 2 de la partie expérimentale). L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* a été réalisée par cinq différentes méthodes complémentaires : la réduction du radical peroxyde d'hydrogène H₂O₂, le test du piégeage du radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), le test de la réduction du radical cationique acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS), le test FRAP (ferric reducing ability of plasma) et le pouvoir réducteur (PR), cependant l'activité antioxydante *in vivo* a été évaluée par le dosage du superoxide dismutase (SOD) et du malondialdéhyde (MDA).

2. Matériel et méthodes

2.1. Produits chimiques utilisés

Méthanol; Chloroforme ; Acétate d'éthyle ; Ether de pétrole ; Ethanol ; Réactif Folin-Ciocalteu; Carbonate de sodium; Acide gallique ; Nitrite de sodium; Trichlorure d'aluminium; Hydroxyde de sodium ; Rutine; Vanilline ; Acide chlorhydrique ; Catéchine ; Peroxyde d'hydrogène ; Acide ascorbique ; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); Trolox ; Hydroxytoluène butylé (BHT); Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS); Persulfate de potassium ; Phosphate de potassium monobasique (KH₂ P O₄) ; Hydrogèno-phosphate de potassium (K₂H₂PO₄) ; Ferrocyanure de potassium ; Acide

trichloroacétique ; Chlorure de fer (III) ou chlorure ferrique (FeCl₃) ; Acétate de sodium ; Acide acétique ; TPTZ ; Streptozotocine ; Nicotinamide ; Metformine ; Acide thiobarbiturique ; n-butanol ; Acide phosphorique ; L-méthionine ; Acide citrique ; Citrate de sodium ; Triton x-100 ; Acide éthylène diamine tétra acétique) (EDTA) ; Méthionine ; Bleu nitré-tétrazolium chlorure (NBT).

Tous ces composés chimiques proviennent de la société Sigma-Aldrich (USA).

2.2. Activité antioxydante *in vitro*

Dans le présent travail, nous avons testé l'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques *in vitro* par cinq tests : piégeage du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, activité antiradicalaire du DPPH, capacité inhibitrice du radical ABTS, le test FRAP et le pouvoir réducteur de fer (PR). Le principe de chaque test est décrit ci-dessous :

2.2.1. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ n'est pas un radical libre car tous ses électrons périphériques sont appariés, mais il est une molécule qui peut traverser la membrane cellulaire rapidement et une fois à l'intérieure de la cellule, il peut réagir avec Fe²⁺ et Cu²⁺ en formant ainsi un radical hydroxyle qui peut être à l'origine de plusieurs effets toxiques (réaction de Fenton (Jones, 1999)). De ce, il est indispensable de contrôler la quantité de cette molécule dans le corps.



La capacité à réduire H₂O₂ dans cette étude a été déterminée à l'aide de la méthode de Ruch et ses collaborateurs (Ruch *et al.*, 1989). Une solution de H₂O₂ (40 mM) a été préparée dans une solution tampon phosphate (pH = 7,4). La concentration en H₂O₂ a été déterminée par spectrophotométrie par absorption à 230 nm. Pour cela, nous avons ajouté 1 mL de l'extrait ou de l'antioxydant standard (acide ascorbique) à la solution de H₂O₂ (0,6 mL, 40 mM). L'absorption de H₂O₂ à 230 nm a été déterminée après 10 min et comparée avec celle d'une solution témoin contenant un tampon phosphate sans H₂O₂. Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été déterminé comme suit :

$$\% = [(\text{AC} - \text{AE}) / \text{AC}] \times 100$$

Où AC : absorbance du contrôle, et AE : absorbance de l'échantillon.

2.2.2. Test du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Le DPPH⁺ (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable et de couleur violacée, qui se réduit en diphényle picryl-hydrazinen de couleur jaune, en présence de composés anti-radicalaires. Les absorbances mesurées à 517 nm nous ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition du radical qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon. Pour mesurer cette activité, un volume de 3 mL de chacun de nos extraits (préparé selon la concentration voulue) est incubé pendant 30 min, à 30°C avec 1 mL d'une solution méthanolique de DPPH 200 µM fraîchement préparée. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus pour le Trolox, le Butylhydroxytoluène (BHT) et l'acide ascorbique qui sont utilisés comme antioxydants standards. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation suivante (Sharma and Bhat, 2009) :

$$I \% = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

Où AC : absorbance du contrôle et AE : absorbance de l'échantillon.

2.2.3. Test de la réduction du radical Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS)

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS (l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant comparativement au Trolox (antioxydant standard), selon la méthode décrite par Re et ses collaborateurs en 1999 (Re *et al.*, 1999). Le radical cationique ABTS est généré en mélangeant 10 mL d'ABTS (7 mM) dans H₂O avec 5 mL du persulfate de potassium (2,45 mM), le tout est conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante durant 16h. La solution obtenue est diluée avec l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,70 à 734 nm. Après, 3 mL de cette solution fraîchement préparée, est ajouté à 30 µL de chaque échantillon et au Trolox, puis le mélange est laissé pendant 1 min avant la lecture à 734 nm. Le Trolox est utilisé comme standard et le résultat final est exprimé en milligramme d'équivalent de Trolox par gramme d'extrait.

2.2.4. Test FRAP (ferric reducing ability of plasma)

L'activité antioxydante totale de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par Benzie & Strain en 1996 (**Benzie & Strain, 1996**). Nous avons préparé une solution d'un tampon acétate 300 mM à pH = 3,6. Nous avons préparé aussi une solution de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) à 10 mM dans l'acide chloridrique (HCl) à 40 mM et une solution de FeCl₃ à 20 mM. Après nous avons préparé une solution FRAP à partir de ces trois solutions en mélangeant 25 mL du tampon acétate, 2,5 mL TPTZ et 2,5 mL FeCl₃. 100 µL de nos extraits mélangés avec 3000 µL de la solution FRAP sont mis à l'obscurité pendant 30 min. Les absorbances de la réaction colorimétrique ont été mesurées à 593nm. Le résultat final est exprimé en milligramme d'équivalent de Trolox par gramme d'extrait.

2.2.5. Test du pouvoir réducteur du fer (PR)

Le pouvoir réducteur de fer est un dosage colorimétrique de transfert d'électrons, qui évalue la réduction du fer (passage du fer ferrique au fer ferreux), en présence d'un antioxydant. Une molécule change de couleur une fois qu'elle est réduite, ce qui permet la quantification par spectrophotométrie. Le pouvoir réducteur de chacun de nos huit extraits a été déterminé selon la méthode élaborée par Oyaizu en 1986 (**Oyaizu, 1986**). 1 mL des extraits de notre plante solubilisés dans le méthanol ont été mélangés avec 2,5 mL de la solution tampon phosphate (0,2 M) à pH = 6,6) et 2,5 mL du ferricyanure de potassium (K₃ [Fe (CN)₆]) à 1%, Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min. Un volume de 2,5 mL d'acide trichloroacétique (10%) a été ajouté au mélange, qui a été ensuite centrifugé à 3000 tr / min, pendant 10 min. 2,5 mL du surnageant a été mélangé avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de FeCl₃ (0,1%) et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. Le résultat final est exprimé en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait.

2.3. Activité antioxydante *in vivo*

L'étude antioxydante *in vitro* nous a bio guidé à réaliser une étude antioxydante *in vivo* pour les extraits qui se sont avérés les plus actifs *in vitro*. Ainsi, nous avons testé les macérés aqueux et méthanolique *in vivo*, selon les conditions expérimentales suivantes :

2.3.1. Prélèvement des organes des souris

Après 5 semaines de traitement des souris diabétiques, nous avons prélevé les organes nécessaires pour le dosage des paramètres du stress oxydatif ; le malondialdéhyde (MDA) et le superoxyde dismutase (SOD) des souris diabétiques traitées par les macérés aqueux et méthanolique et la metformine, les souris diabétiques non traitées et les souris non diabétiques. Nous avons prélevé le foie et les reins où les marqueurs du stress sont exprimés le plus. Nous avons broyé ces organes à froid (4°C), en présence de 5 mL d'une solution de tampon phosphate (0,1M à pH = 7,4), pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat qui est ensuite centrifugé à 10000 tours/min, pendant 10 min à 4°C. Le surnageant obtenu est conservé à -20°C pour l'utilisation ultérieure du dosage des marqueurs du stress.

2.3.2. Dosage des Malondialdéhydes (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres. Le dosage repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100 °C), entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. Pour cela, nous avons mélangé 100 µL de l'homogénat ou MDA avec 300 µL d'acide thiobarbiturique 0,6% et 700 µL d'acide phosphorique à 1%, nous avons chauffé le tout à 95°C pendant 30 minutes, nous avons laissé refroidir, puis nous avons additionné 2mL de n-butanol. Finalement, nous avons centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tours/minute et nous avons procédé à la lecture des absorbances à 535 nm (**Ohkawa et Ohishi, 1979**).

2.3.3. Dosage du superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase est l'un des antioxydants enzymatiques les plus efficaces, son activité est déterminée par la mesure de sa capacité à inhiber la réduction du Nitro Blue Tetrazolium NBT par l'anion superoxyde produit suite à la photoréduction de l'oxygène et de la riboflavine, en présence d'un donneur d'électrons comme la méthionine. Pour doser l'activité de SOD total (T-SOD), un mélange a été préparé en ajoutant 740 µL de tampon phosphate (50 mM), 150 µL de triton x-100 (25%), 150 µL de EDTA (10mM) à pH = 8, 150 µL de L-Méthionine (120 mM), 150 µL de NBT (0,75mM) et 20µL de l'homogénat des reins et du foie des souris traitées par les extraits d'*Atractylis gummifera*. A la fin 150 µL de riboflavine (10 µM) est ajouté pour initier la réaction. La réaction a été effectuée à 25 °C et

sous la lumière pendant 10 min. L'absorbance est lue à 560 nm, l'activité de SOD est mesurée selon la relation suivante (**Sun *et al.*, 1988**) :

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

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

2.3.4. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Graph Pad Prism 5. Les données ont été traitées par une analyse de variance à sens unique (ONE-WAY ANOVA), suivi du post test Tukey. Les données ont été indiquées en Moyenne \pm Erreur Standard Moyenne. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à la valeur de $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Activité antioxydante *in vitro*

Nous avons opté dans la présente étude pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire et antioxydante *in vitro*, via cinq tests complémentaires afin d'avoir une indication sur la capacité antiradicalaire et antioxydante des extraits d'*A. gummifera*.

3.1.1. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène H₂O₂

L'eau oxygénée H₂O₂ a la capacité de générer en présence de métaux de transition, (fer et cuivre), des radicaux hautement réactifs comme le radical hydroxyle OH[•] (**Wardman *et al.*, 1996**). Il peut être formé par la dismutation de O₂⁻ par le superoxyde dismutase, ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénase. Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits d'*Atractylis gummifera* est illustré dans le **tableau 11**. Tous les extraits, à la concentration de 100 µg/mL ont la capacité de piéger le radical H₂O₂ avec une meilleure activité pour le macéré méthanolique qui est de l'ordre de 19,24 \pm 1,102 %, valeur supérieure à celle du contrôle positif (acide ascorbique) (15,91 \pm 0,01%), avec une différence statistiquement significative $p < 0,05$ suivi de l'extrait méthanolique (10,55 \pm 0,39 %). Pour les extraits aqueux, nous avons eu un meilleur pourcentage d'inhibition du radical H₂O₂ avec le macéré aqueux (6,38 \pm 0,05%), qui a aussi présenté une activité réductrice du peroxyde d'hydrogène meilleure et supérieure aux autres extraits organiques acétate d'éthyle, chloroformique et éther de pétrole.

3.1.2. Test du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier l'activité antiradicalaire. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote, cette délocalisation est responsable de la couleur violette caractéristique du radical DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette qui est due à la recombinaison des radicaux DPPH, mesurable à 517 nm. Le piégeage des radicaux par l'antioxydant (molécules hydrophiles ou lipophiles) est attribué principalement à la libération de l'électron qui est non apparié (Nanjo *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 2005 ; Popovici *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, nous avons réalisé le test de piégeage du DPPH pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits d'*A. gummifera* et nous avons exprimé nos résultats en CI50 ($\mu\text{g/mL}$). Nous avons constaté que le pourcentage d'inhibition augmente au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente (**Figure 18 et 19**). La comparaison des CI50 des extraits aqueux et organiques et celles des antioxydants de références (Trolox, BHT et acide ascorbique) a montré qu'*Atractylis gummifera* possède une bonne activité antiradicalaire. En effet, nous avons remarqué que les extraits aqueux ont une activité antiradicalaire supérieure à celles des extraits organiques, avec une différence statistiquement significative. Pour les extraits aqueux, le macéré aqueux a montré la plus puissante activité antiradicalaire (CI50 = $2,78 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$), alors que le macéré méthanolique qui s'est distingué parmi les extraits organiques, à une CI50 de $38,59 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$ (**Tableau 11**).

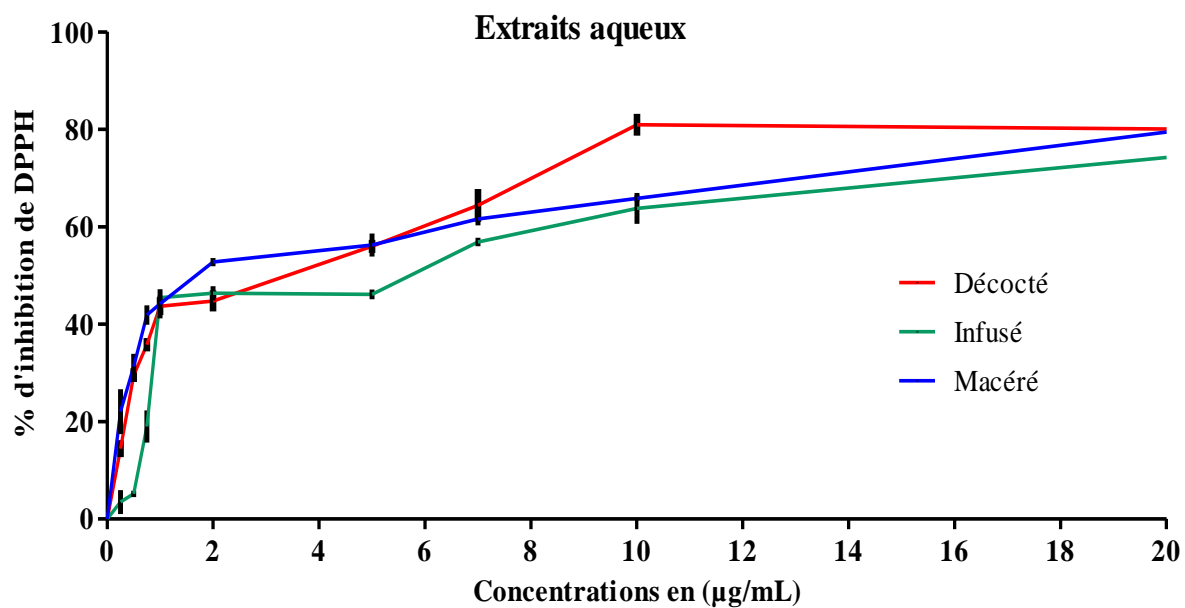


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits aqueux d'*Atractylis gummifera* L.

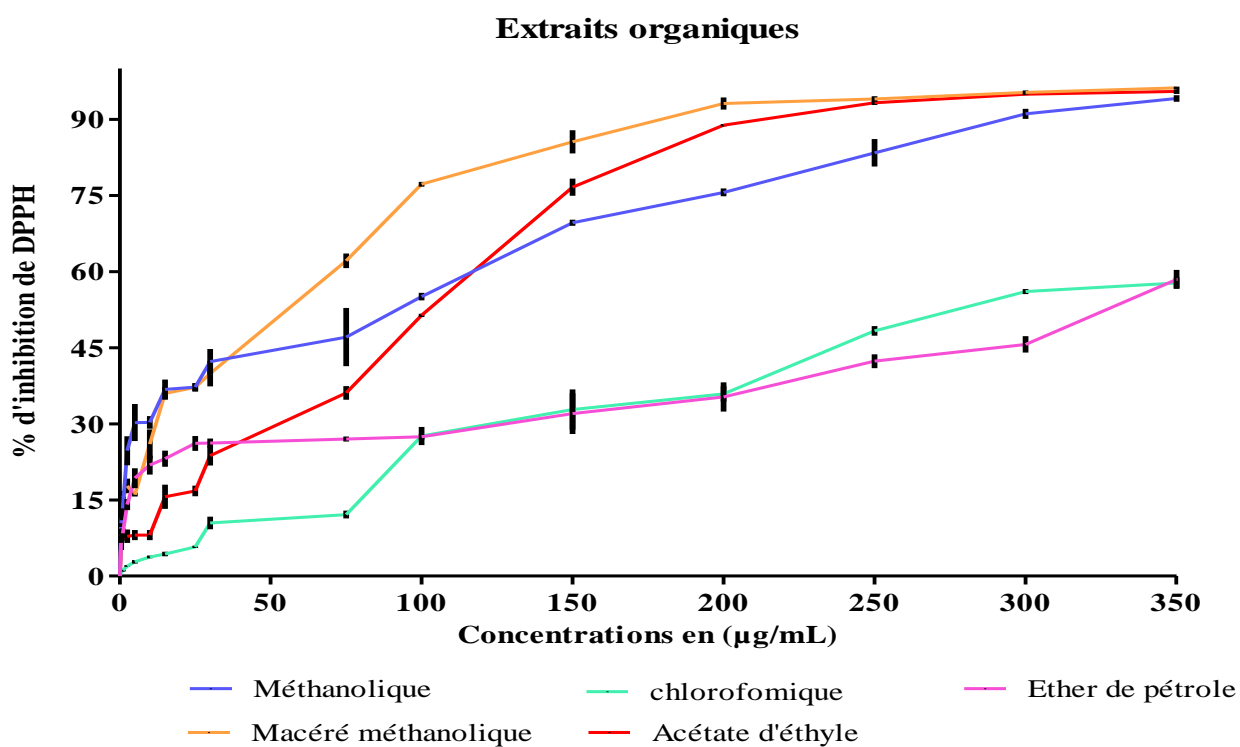


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits organiques d'*A. gummifera* L.

3.1.3. Test de la réduction du radical acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS)

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical cationique ABTS⁺. Ce test est rapide, facile et peu coûteux. Il implique les deux mécanismes réactionnels : transfert d'électrons et de protons, contrairement au test DPPH, qui ne se base que sur le transfert d'électrons (**Re et al., 1999**). De plus, avec le test ABTS, nous pouvons interpréter nos résultats sur une bande allant de 734 à 815 nm, ce qui va éviter toute interférence avec le composé testé, contrairement au DPPH qui ne possède pas d'autres bandes d'absorption à plus grande longueur d'onde.

Dans la présente étude, la capacité antioxydante des extraits d'*Atractylis gummifera*, évaluée par ABTS, est calculée à partir de l'équation de régression $y = - 0,0016 x + 0,662$, d'une courbe d'étalonnage établie par le Trolox, (**Annexe 4**). Les résultats ont été rapportés en milligramme d'équivalent de Trolox par gramme d'extrait (mg ET/gE). Les résultats obtenus montrent que tous les extraits d'*Atractylis gummifera* ont la capacité de stabiliser le radical cationique ABTS et que le macéré méthanolique a la capacité antioxydante la plus importante $122,6 \pm 0,63$ mg ET/gE, suivi du macéré aqueux $110 \pm 3,89$ mg ET/gE avec une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (**Tableau 11**).

3.1.4. Test FRAP (ferric reducing ability of plasma)

Le test de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), a été initialement développé pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin, ensuite il a été généralisé à l'étude du pouvoir antioxydant des extraits de plantes (**Benzie et Strain, 1996 ; Nilsson et al., 2005**). Ce test consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe (III)-TPTZ)], de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe (II)-TPTZ)] de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électrons. La variation de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 593 nm (**Benzie et Strain, 1996**).

L'activité antioxydante de nos extraits, est déterminée par le test FRAP, est calculée à partir de l'équation de régression $y=0,0056x+0,256$ d'une courbe d'étalonnage établie par le Trolox (**Annexe 5**). Les résultats ont été rapportés en milligramme d'équivalent de Trolox par gramme d'extrait (mg ET/gE) et ils ont révélé que tous les extraits d'*Atractylis gummifera* possèdent un pouvoir réducteur, du fait qu'une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur. En effet, nous avons remarqué, dans

un premier lieu que les extraits aqueux possèdent la plus forte activité antioxydante, avec une différence statistiquement significative entre les trois extraits (décocté, infusé et macéré) avec une distinction pour le macéré aqueux ($102,5 \pm 1,66$ mg ET/gE). Ensuite, nous avons constaté que la meilleure activité pour les extraits organiques était enregistrée par le macéré méthanolique $60,03 \pm 1,10$ mg ET/gE, suivi des extraits acétate d'éthyle $32,77 \pm 2,04$ et chloroformique $24,08 \pm 1,59$ mg ET/gE et en dernier l'extrait éther de pétrole $12,11 \pm 1,08$, avec une différence statistiquement significative entre ces extraits (**Tableau 11**). Via ce test FRAP, le macéré aqueux s'est aussi avéré posséder la meilleure activité, par rapport à l'ensemble des extraits aqueux et organiques testés d'*Atractylis gummifera* L.

3.1.5. Test du pouvoir réducteur du fer (PR)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le pouvoir réducteur du fer des extraits d'*A. gummifera* est calculé à partir de l'équation de régression $y = 0,006x + 0,114$ d'une courbe d'étalonnage établie par l'acide ascorbique (**Annexe 6**). Les résultats ont été rapportés en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/gE). Les résultats du pouvoir réducteur des extraits d'*Atractylis gummifera* sont résumés dans le **tableau 11** et montrent que tous les extraits de cette plante ont une activité réductrice de fer ferrique avec une meilleure activité pour les extraits aqueux en comparaison avec les extraits organiques. En effet, nous avons remarqué que le macéré aqueux, possède la meilleure activité réductrice de fer $96,15 \pm 1,12$ mg EAA/gE, suivi de l'infuser $84,84 \pm 1,08$ mg EAA/gE et du décocté, $69,02 \pm 0,78$ mg EAA/gE, avec une différence statistiquement significative entre ces trois extraits ($p < 0,001$). Le macéré méthanolique a la plus forte activité réductrice de fer par rapport aux autres extraits organiques ($60,55 \pm 0,36$ mg EAA/gE), avec une différence statistiquement significative entre eux ($p < 0,001$). Aussi, nous avons remarqué que le pouvoir réducteur du fer est très faible pour l'extrait éther de pétrole, qui est préparé avec le solvant le moins polaire ($3,34 \pm 0,058$ mg EAA/gE).

Tableau 11 : Activités antiradicalaire et antioxydante *in vitro* via les tests H_2O_2 , DPPH, PR, FRAP et ABTS des extraits aqueux et organiques d'*Atractylis gummifera* L.

Extraits & Standards de référence	Test H_2O_2 % d'inhibition	Test DPPH (CI50 μ g/mL)	Test ABTS (mg ET/gE)	Test PR (mg EAA/gE)	Test FRAP (mg ET/gE)
-----------------------------------	------------------------------	-----------------------------	----------------------	---------------------	----------------------

Extraits aqueux	Décocté	1,99±0,47 ^a	4,29 ± 2,71 ^a	40,4 ± 0,23 ^a	69,02 ± 0,78 ^a	44,08 ± 0,59 ^a
	Infusé	5,19±0,50 ^b	6,32 ± 2,09 ^b	64,66 ± 1,21 ^b	84,84 ± 1,08 ^b	56,11 ± 3,14 ^b
	Macéré aqueux	6,38±0,05^b	2,78 ± 1,03^c	110,93 ± 3,89	96,15 ± 1,12^c	102,5 ± 1,66^c
Extraits organiques	Méthanolique	10,55±0,39 ^c	83,88 ± 5,86 ^d	42,4 ± 1,72 ^a	18,54 ± 0,651 ^d	34,05 ± 2,25 ^d
	Macéré méthanolique	19,24±1,10^d	38,59 ± 1,74^e	122,06 ± 0,63^c	60,55 ± 0,36^e	60,03±1,10^e
	Acétate d'éthyle	3,89±0,12 ^{a,b}	101,15 ± 3,53 ^f	71,8 ± 3,75 ^b	16,34 ± 0,06 ^d	32,77 ± 2,04 ^d
	Chloroformique	4,68±0,44 ^{a,b}	297,17 ± 9,30 ^g	29,4 ± 0,23 ^d	3,47 ± 0,14 ^f	24,08 ± 1,59 ^f
	Ether de pétrole	1,11±0,11 ^a	353,15 ± 8,8 ^h	21,93 ± 0,35 ^e	3,34 ± 0,058 ^f	12,11 ± 1,08 ^g
Standards de référence	Acide ascorbique	15,90±1,28 ^d	0,17±0,02 ⁱ	-	-	-
	BHT	-	1,59±0,13 ^J	-	-	-
	Trolox	-	1,75±0,09 ^J	-	-	-

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± la moyenne de l'erreur-type. Dans la même colonne, les valeurs ayant la même lettre ne diffèrent pas statistiquement $P < 0,05$.

3.2. Activité antioxydante *in vivo*

Dans la présente étude, l'étude de l'activité antioxydante *in vivo*, était menée en se basant sur le dosage de deux paramètres déterminants de cette activité et qui sont le Malondialdéhyde (MDA), un des dérivées de l'oxydation lipidique et le Superoxyde dismutase (SOD), qui est un antioxydant enzymatique responsable de l'élimination des radicaux superoxydes. Nous avons dosé ces deux paramètres dans le foie et les reins des souris diabétiques traitées par le macéré aqueux et le macéré méthanolique d'*Atractylis gummifera*, en comparaison avec des souris témoins (souris non diabétiques, souris diabétiques non traitées et souris traitées par la metformine). Le choix de ces deux extraits est basé sur les résultats de l'étude de l'activité antioxydante *in vitro*, où ils se sont avérés les plus actifs parmi les huit extraits préparés et aussi en tenant compte des résultats de l'étude de l'activité antidiabétique. En effet, les deux macérés se sont révélés posséder la meilleure activité antidiabétique *in vitro* (Bouabid *et al.*, 2018) et *in vivo* (Bouabid *et al.*, 2019).

3.2.1. Dosage des Malondialdéhydes (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des dérivés de l'oxydation lipidique, c'est le composé le plus souvent étudié lorsqu'on recherche un stress oxydant. Son dosage a été fait au niveau du foie et des reins des souris diabétiques traitées pendant 5 semaines par les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* à une dose de 500 mg/kg et par la metformine, médicament de référence à 300 mg/ kg. La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nM/gramme du tissu (foie ou reins). Elle est obtenue grâce à une courbe standard, réalisée avec du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane, faite dans les mêmes conditions (**Annexe 7**). Ainsi, nous avons remarqué une diminution remarquable des valeurs en MDA chez les souris diabétiques traitées par les macérés aqueux et méthanolique et la Metformine, en comparaison avec les souris non traitées et les souris non diabétiques. En effet, nous avons constaté une diminution des valeurs en MDA dans le foie des souris traitées, avec une différence statistiquement non significative entre les groupes de souris traitées par les deux macérés ($128,61 \pm 15,76$ pour le macéré méthanolique et $130,73 \pm 10,73$ pour le macéré aqueux) et la Metformine ($100,87 \pm 11,29$). De même, dans les reins des souris, nous avons observé une diminution du MDA chez les souris traitées par la Metformine $22,94 \pm 3,81$, le macéré méthanolique $34,28 \pm 5,73$ et le macéré aqueux $103,18 \pm 12,67$, avec une différence statistiquement non significative entre les groupes de souris traitées par le macéré méthanolique et la Metformine et une différence significative entre les souris traitées par le macéré aqueux et le macéré organique (**Figure 20**).

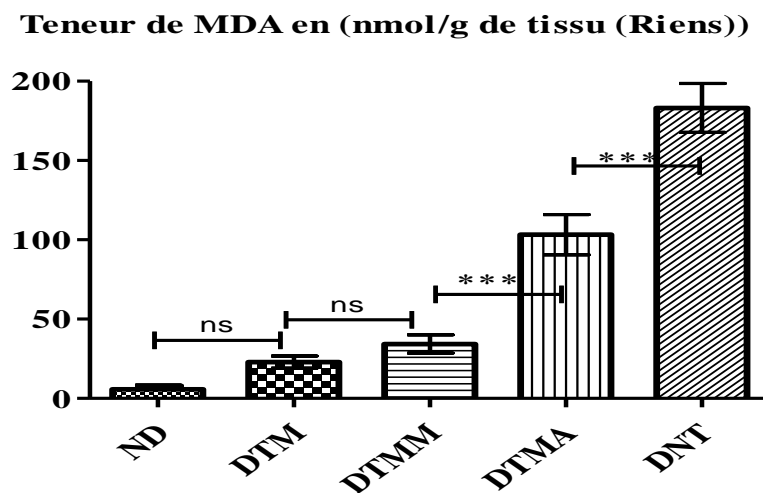
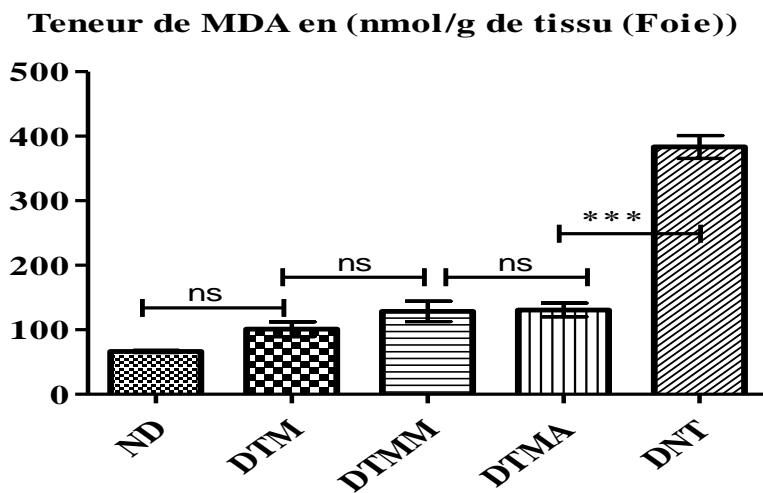


Figure 20 : Variation du taux de malondialdéhyde (MDA) tissulaire (nM/mg de tissu) dans le foie et les reins des souris témoins (ND et DNT) et traitées (DTM, DTMA, DTMO).

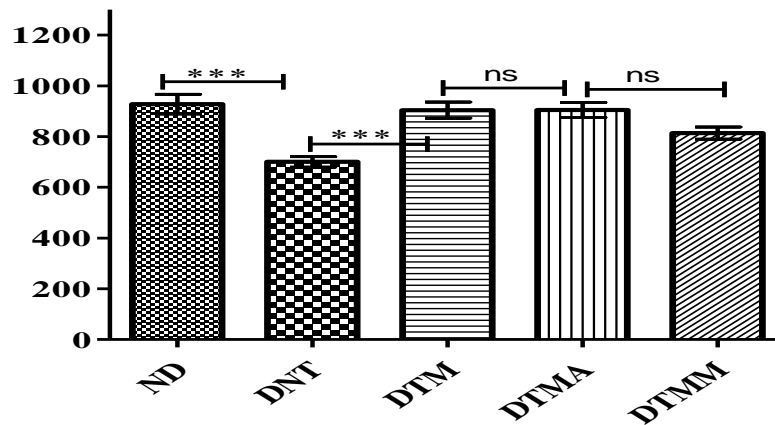
ND : Souris Non Diabétiques ; DNT : Souris Diabétiques Non Traitées ; DTMM : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré méthanolique ; DTMA : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré Aqueux ; DTM : Souris Diabétiques Traitées par la Metformine.

(Moyenne de six souris \pm erreur standard moyenne***: Différence statistique hautement significative ($p < 0.001$); **: Différence statistique très significative ($p < 0.01$); *: Différence statistique significative ($p < 0.05$); ns : Différence statistiquement non significative.

3.2.2. Dosage du Superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase SOD est l'une des principales enzymes antioxydantes. Il accélère la dismutation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , permettant ainsi à l'organisme de contrôler le taux de $O_2^{\cdot-}$ intracellulaire. Dans la présente étude, nous avons remarqué une diminution de la sécrétion du SOD chez les souris diabétiques non traitées ($700,26 \pm 31,88$ dans le foie et $616,85 \pm 17,47$ dans les reins), en comparaison avec les souris non diabétiques ($927,77 \pm 38,32$ dans le foie et $842,03 \pm 23,26$ dans les reins), avec une différence statistiquement significative (**Figure 21**). Cependant, le traitement des souris diabétiques par les macérés aqueux et méthanoliques d'*Atractylis gummifera* et la Métformine a provoqué une augmentation du taux de SOD pour le macéré aqueux ($904,26 \pm 29,10$ dans le foie et $714,16 \pm 24,83$ dans les reins), alors que pour le macéré méthanolique ($813,61 \pm 24,03$ dans le foie et $719,46 \pm 42,10$ dans les reins) et pour la Metformine ($904,26 \pm 31,88$ dans le foie et $832,12 \pm 20,09$ dans les reins), en comparaison avec les souris diabétiques non traitées et les souris non diabétiques. En effet, nous avons remarqué une meilleure augmentation de la sécrétion de l'enzyme SOD dans le foie et les reins des souris diabétiques traitées par les macérés aqueux et méthanolique et la Metformine avec des différences statistiquement non significatives entre ces trois groupes.

Teneur de T-SOD en (Unit/g de tissu (foie))



Teneur de T-SOD en (Unit/g de tissu (Reins))

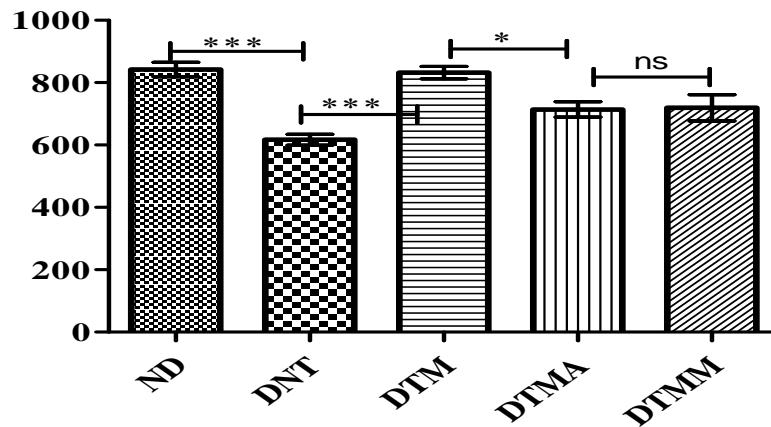


Figure 21 : Variation du taux de superoxyde dismutase (SOD) tissulaire (unit/g de tissu) dans le foie et les reins des souris témoins (ND et DNT) et traitées (DTM, DTMA, DTMO).

ND : Souris Non Diabétiques ; DNT : Souris Diabétiques Non Traitées ; DTMM : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré méthanolique ; DTMA : Souris Diabétiques Traitées par le Macéré Aqueux ; DTM : Souris Diabétiques Traitées par la Metformine.

Moyenne de six souris \pm erreur standard moyenne. ***: Différence statistique hautement significative ($p < 0,001$) ; **: Différence statistique très significative ($p < 0,01$) ; *: Différence statistique significative ($p < 0,05$) ; ns : Différence statistiquement non significative

4. Discussion

Les résultats de l'évaluation de l'activité antiradicalaire et antioxydante *in vitro*, de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L., a montré que le macéré méthanolique a le plus fort pourcentage d'inhibition du peroxyde d'hydrogène $19,24 \pm 1,102$ %. Cet extrait a aussi la capacité de stabiliser le radical cationique ABTS la plus élevée ($122,6 \pm 0,63$ mg ET/gE). Dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire par le test DPPH, nous avons trouvé que c'est le macéré aqueux qui a la plus puissante activité réductrice de ce radical avec une CI50 égale à $2,78 \pm 1,03$ µg/mL. Ce même extrait a le pouvoir réducteur du fer le plus puissant ($96,15 \pm 1,12$ mg EAA/gE), qui a été confirmé par le test FRAP ($102,5 \pm 1,66$ mg ET/gE). Les résultats de l'activité antioxydante et antiradicalaire *in vitro* ont montré que les macérés aqueux et méthanolique de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* se sont distingués dans la plupart des tests *in vitro*, ce qui nous a orienté dans le choix de ces deux extraits pour évaluer l'activité antioxydante *in vivo*. Ainsi, nous avons trouvé que ces deux extraits ont pu diminuer le MDA dans le foie et les reins des souris diabétiques, en particulier le macéré méthanolique ($128,61 \pm 15,76$ nM/gramme de foie et $34,28 \pm 5,73$ nM/gramme de reins). Aussi, nous avons remarqué que les macérés d'*A. gummifera* ont stimulé la sécrétion de la SOD : pour le macéré aqueux ($904,26 \pm 29,10$ unité /g de foie et $714,16 \pm 24,83$ unité /g des reins) et pour le macéré méthanolique ($813,61 \pm 24,03$ unité /g de foie et $719,46 \pm 42,10$ unité /g des reins), avec une différence statistiquement non significative entre ces deux extraits.

En comparant nos résultats avec la littérature, nous avons trouvé dans un premier lieu qu'aucune étude de l'activité antioxydante *in vivo* d'*Atractylis gummifera* L. n'a été réalisée auparavant et que nous sommes les premiers à avoir montré que les extraits de cette plante peuvent renforcer le système de défense enzymatique antioxydant chez des souris diabétiques. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* a été réalisée pour la première fois à la Faculté des sciences de Tunis El Manar en Tunisie par Khadhri et ses collaborateurs en 2015 (**Khadhri et al., 2015**) sur l'extrait traditionnel (décocté) et le macéré méthanolique de différentes parties d'*Atractylis gummifera* (racine, feuilles et tige) et nous avons trouvé que la composition phytochimique et l'activité antioxydante de nos extraits est semblable à celles des extraits de l'étude réalisée par Khadhri et ses collaborateurs. Ces derniers ont constaté que l'activité antioxydante dépend de la modalité d'extraction et de l'organe étudié. Ils ont remarqué aussi qu'elle est meilleure à froid (macéré méthanolique) et pour la racine de la plante. De même, une autre étude réalisée en Algérie par Mejdoub et ses collaborateurs

en 2019 (**Mejdoub et al., 2019**) sur les huiles essentielles produites à partir de la racine de la plante récoltée au début du cycle végétatif (mars), au stade de floraison (avril) et en pleine floraison (mai / juin) a montré que les huiles essentielles extraites à partir d'*A. gummifera* en pleine floraison présentaient des propriétés antioxydantes et antifongiques intéressantes, tandis que les huiles essentielles produites à partir de la plante au début du cycle végétatif (Mars) et au début du stade de floraison (avril) avaient une meilleure activité insecticide. Nous pouvons déduire que notre étude est en parfaite adéquation avec d'autres études qui prouvent que malgré la toxicité d'*Atractylis gummifera*, elle peut bien être une source prometteuse d'antioxydants naturels grâce à sa richesse en métabolites secondaires, sauf que cette activité varie en fonction de la partie de la plante, de la méthode et de la modalité d'extraction et de la période de récolte de la plante.

Lors de l'évaluation de l'activité antioxydante réalisée par l'élimination du radical H_2O_2 , nous avons constaté que le macéré de méthanol était le plus puissant car il contient les composés nécessaires pour l'élimination de ce radical. En effet, il a été démontré que les composés phénoliques protègent les cellules de la cytotoxicité induite par H_2O_2 (**Wang et al., 2015**). Aussi, en utilisant le même solvant (le méthanol), nous avons remarqué que le meilleur pourcentage d'inhibition de H_2O_2 était obtenu avec le macéré préparé par une extraction à froid ($19,24 \pm 1,10 \%$), valeur qui vaut le double que celle obtenue avec l'extrait méthanolique, préparé à chaud au Soxhlet ($10,55 \pm 0,39\%$), ce qui suggère que les molécules responsables du piégeage de ce radical sont mieux extraites à froid qu'à chaud et avec le solvant le plus polaire, puisque nous remarquons que le meilleur résultat était obtenu par l'extrait le plus polaire (méthanol $19,24 \pm 1,10 \%$) et le plus faible résultat était obtenu par l'éther de pétrole ($1,11 \pm 0,11\%$), qui est le moins polaire. Pour l'activité antiradicalaire, mesurée par le test DPPH, elle est meilleure pour les extraits aqueux principalement, le macéré qui est préparé à froid. Cette activité dépend aussi de la polarité du solvant utilisé, et nous avons constaté que ce sont les extraits préparés par les solvants les plus polaires qui ont la meilleure activité (extrait aqueux suivi, de l'extrait méthanolique). L'activité antiradicalaire d'*Atractylis gummifera* est supérieure à celles d'autres plantes de la même famille (Astéracée) tel que l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba-alba* $CI_{50} = 20,64 \pm 0,84 \mu\text{g/mL}$ et du même genre tel que *Atractylis babelii* qui a une $CI_{50} = 4,43 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ de l'extrait, préparé par une macération de 70% (eau distillé/ éthanol) préparé à base des fleurs (**Molan et al., 2012 ; Khlifi et al., 2013 ; Boudebaz et al., 2015**). Ainsi, nous pouvons déduire que les principes actifs responsables de l'activité antiradicalaire, évaluée

par le test DPPH, sont mieux extraits à froid et par les solvants les plus polaires et aussi la teneur importante en polyphénols totaux. Cependant, la capacité anti-radicalaire des extraits d'*A. gummifera* ne peut être mesurée que par le test DPPH, qui n'est pas un radical physiologique et qui peut engendrer des interférences entre les molécules qui possèdent une bande d'absorption dans le visible vers 517 nm et celle du DPPH (**Porte, 2008**). De plus, le mécanisme d'action du test DPPH est basé uniquement sur le transfert d'électrons, ce qui peut fausser nos résultats de l'activité antioxydante si les extraits d'*A. gummifera* possèdent des molécules ayant une activité antioxydante basée sur le transfert de protons. D'où, la nécessité de compléter nos résultats par d'autres tests antioxydants, à savoir le test ABTS. En fait, en évaluant l'activité antioxydante d'*A. gummifera* par ce test, nous avons remarqué qu'il dépend de la température d'extraction qui augmente avec la diminution de la température lors de la préparation des extraits (macéré aqueux > infusé > décocté). Ce résultat nous a permis de déduire que les principes actifs responsables de la capacité antioxydante, via le test ABTS, sont mieux extraits à froid qu'à chaud et que la macération permet leurs conservations et protection. En outre, la capacité antioxydante du radical cationique ABTS, dépend aussi de la polarité du solvant utilisé lors de l'extraction où elle est meilleure avec les solvants les plus polaires (Eau distillée, méthanol) et faible avec le solvant le moins polaire (éther de pétrole). De plus, les extraits qui se sont avérés les plus actifs sont les plus riches en polyphénols, ces derniers ont un mécanisme d'action antioxydant très adéquat avec le mécanisme d'action de l'ABTS, qui est basé sur le transfert d'électrons et de protons (**Prior et Schaich, 2005**). En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons constaté que la capacité antioxydante par le test ABTS d'*Atractylis gummifera* est supérieure à celle d'autres plantes de la même famille tel que l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba halba* 11,60 mg ET/gE (**Djeridane et al., 2006**). L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la partie souterraine d'*A. gummifera* a été réalisée aussi par le test du pouvoir réducteur et le test FRAP et nous avons trouvé les mêmes résultats par les deux tests qui montrent que la meilleure activité est obtenue avec le macéré aqueux. Ainsi, nous pouvons déduire que les principes actifs, responsables de la réduction du fer par ces deux tests sont extraits à froid et avec les solvants les plus polaires (eau distillée). Aussi, il s'est avéré que cet extrait est riche en polyphénols et flavonoïdes qui peuvent avoir une relation avec le mécanisme de réduction du fer qui est basé sur le transfert électronique. L'activité antioxydante totale, déterminée par le test FRAP d'*Atractylis gummifera* s'est avérée meilleure que l'activité antioxydante d'autres plantes tel que

Scorzonera Undulata, qui est de la même famille des Astéracées avec une valeur de $0,31 \pm 0,002$ mgET/gE (Molan *et al.*, 2012)

Les meilleurs résultats obtenus pour les macérés aqueux et méthanolique dans la majorité des tests *in vitro*, nous ont orienté pour adopter ces deux extraits pour l'évaluation, pour la première fois de l'activité antioxydante *in vivo* sur des souris diabétiques et ce après la détermination de la dose toxique (Bouabid *et al.*, 2019^a). Nous avons remarqué que le macéré méthanolique et le meilleur extrait qui a fait diminuer le taux de MDA et donc qui peut inhiber la peroxydation des lipides, avec une différence statistiquement non significative par rapport à la Metformine. Nous pourrions donc déduire que le macéré méthanolique d'*Atractylis gummifera* est capable de prévenir ainsi les complications du diabète vu qu'il a été démontré que l'augmentation de la peroxydation des lipides joue un rôle important dans la progression et la complication du diabète (Nanjo *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 2005 ; Monisha *et al.*, 2013 ; Renu *et al.*, 2015 ; Madiseh *et al.*, 2016). Pour le dosage du superoxyde dismutase (SOD) qui est l'une des principales enzymes antioxydantes, nous avons remarqué une diminution de la sécrétion de la SOD chez les souris diabétiques non traitées. Cette diminution pourrait conduire à l'accumulation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui à son tour génère des radicaux hydroxyyles entraînant ainsi la peroxydation lipidique et donc l'augmentation du taux de MDA, qui est déjà observé dans les tissus des souris diabétiques non traitées. Ce résultat est concordant avec d'autres études, qui ont démontré que l'activité des enzymes antioxydantes, comme la SOD, est réduite dans les tissus de rats diabétiques (Maritim *et al.*, 2003).

Ces résultats suggèrent que les macérés d'*Atractylis gummifera* peuvent renforcer le système de défense enzymatique antioxydant et atténuer ainsi les dommages provoqués par le stress oxydatif dans les tissus des souris diabétiques. Nos résultats sont en parfaite concordance avec d'autres travaux qui ont démontré que les extraits de plantes peuvent stimuler la sécrétion de l'antioxydant enzymatique SOD tel que l'étude réalisée par Mrabti et ses collaborateurs (Mrabti *et al.*, 2017), sur l'extrait aqueux d'une autre plante médicinale marocaine d'*Arbutus unedo L* à (500 mg/kg) pour laquelle la valeur est élevée SOD dans le foie et les reins des souris diabétiques avec des valeurs respectives de $918,5 \pm 89,5$ et $841,8 \pm 92,3$. Aussi, l'étude réalisée par Lee et ses collaborateurs, sur plusieurs plantes médicinales dans la médecine chinoise, qui ont démontré que les extraits de plusieurs plantes ont amélioré l'activité de toutes les enzymes antioxydantes examinées, y compris la SOD (Lee *et al.*, 2003).

En outre, il est intéressant de noter que la SOD catalyse la décomposition du radical superoxyde en O₂ et H₂O₂. Cependant, cette activité ne peut être efficace que lorsqu'elle est suivie par l'élimination du radical H₂O₂, formé par la SOD, c'est ce qui a été démontré *in vitro* par le macéré méthanolique, de notre plante qui a pu réduire efficacement ce radical.

5. Conclusion

L'étude de l'activité antioxydante *in vitro* réalisée sur la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. en utilisant cinq tests (H₂O₂, DPPH, ABTS, FRAP et PR) et *in vivo* par le dosage du SOD et du MDA a montré que les extraits de la plante et plus particulièrement ceux préparés par macérations aqueuse et méthanolique possèdent une activité antioxydante *in vitro* et *in vivo*. En effet, nous avons constaté que le macéré méthanolique a le plus fort pourcentage d'inhibition du peroxyde d'hydrogène $19,24 \pm 1,102$ %, cet extrait a aussi la capacité de stabiliser le radical cationique ABTS la plus élevée $122,6 \pm 0,63$ mg ET/gE. Dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire du DPPH, nous avons trouvé que c'est le macéré aqueux qui a la plus puissante activité réductrice de ce radical avec une CI50 égale à $2,78 \pm 1,03$ µg/mL. Ce même extrait a le pouvoir réducteur du fer le plus puissant $96,15 \pm 1,12$ mg EAA/gE, qui a été confirmé par le test FRAP $102,5 \pm 1,66$ mg ET/gE. Aussi, nous avons constaté que les macérés aqueux et méthanolique sont aussi les plus efficaces *in vivo*. Ces extraits ont pu généralement diminuer le MDA dans le foie et les reins des souris diabétiques et en particulier le macéré méthanolique ($128,61 \pm 15,76$ nM/gramme de foie et $34,28 \pm 5,73$ nM/gramme de reins). Aussi, nous avons remarqué que les macérés d'*A. gummifera* ont stimulé la sécrétion de la SOD. Pour le macéré aqueux ($904,26 \pm 29,10$ unité /g de foie et $714,16 \pm 24,83$ unité /g des reins) et pour le macéré méthanolique ($813,61 \pm 24,03$ unité /g de foie et $719,46 \pm 42,10$ unité /g des reins), avec une différence statistiquement non significative entre ces deux extraits. Ainsi, ces derniers peuvent prévenir la peroxydation lipidique et stimulent la sécrétion de l'antioxydant enzymatique SOD.

La meilleure activité des macérés aqueux et méthanolique, par rapport aux autres extraits et plus spécifiquement le macéré aqueux est un résultat très important qui permettrait l'utilisation de cet extrait en médecine traditionnelle. En effet, la modalité extraction aqueuse à froid par macération est facile et accessible à la population. Néanmoins, une étude approfondie de la toxicité de la plante s'avère utile et nécessaire pour bien cerner les doses thérapeutiques des doses toxiques.

Conclusion générale

Malgré la toxicité d'*Atractylis gummifera*, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine comme remède contre plusieurs maladies. Nous avons valorisé cette plante dans ce travail de thèse d'un point de vue phytochimique et pharmacologique.

Sur le plan phytochimique, nous avons adopté deux modalités d'extraction aqueuse et organique qui varient en fonction de la température et du solvant utilisé et nous avons constaté que le rendement d'extraction était meilleur à chaud et par les solvants les plus polaires. Après, nous avons réalisé un criblage phytochimique sur la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L. pulvérisée et sur les différents extraits et nous avons montré que la poudre de la plante est riche en tanins, flavonoïdes et contient des traces de saponines, quinones et stérols. De même les extraits aqueux (décocté, infusé et macéré) et organiques (méthanolique, macéré méthanolique, chloroformique et acétate d'éthyle) sont très riches en tanins, flavonoïdes, à l'exception de l'extrait éther de pétrole, qui ne possède que des traces de flavonoïdes et de tanins. Aussi, les extraits d'*Atractylis gummifera* ne contiennent pas les anthraquinones, les alcaloïdes et anthracenosides. Nous avons terminé l'étude phytochimique par un dosage phytochimique qui a montré que les huit extraits aqueux et organiques sont riches en polyphénols, flavonoïdes et tanins, en particulier le macéré méthanolique qui contient les valeurs les plus élevées en polyphénols totaux $102,88 \pm 1,38$ mg EAG/gE, en flavonoïdes $17,25 \pm 0,06$ mg ER/gE et en tanins $144,09 \pm 3,96$ mg EC/gE.

Sur le plan pharmacologique, nous avons mené une étude bio guidé que nous avons commencé par l'évaluation des activités antidiabétique et antioxydante *in vitro*. L'étude de l'activité antidiabétique *in vitro*, a consisté en l'évaluation de la capacité de nos extraits à inhiber les enzymes alpha amylase, alpha glucosidase et bêta galactosidase qui sont responsables de la dégradation des polysaccharides et elle s'est avéré que la meilleure activité est obtenue avec les extraits d'*Atractylis gummifera* préparés à froid et avec les solvants les plus polaires, à savoir les macérés aqueux et méthanolique. Pour l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*, elle a été réalisée par cinq tests qui sont le piégeage du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, l'activité antiradicalaire du DPPH, la capacité inhibitrice du radical ABTS, le test FRAP et pouvoir réducteur de fer (PR). Cette étude a montré que le macéré méthanolique a le plus fort pourcentage d'inhibition du peroxyde d'hydrogène et a aussi la capacité de stabiliser le radical cationique ABTS la plus élevée. Avec le test DPPH,

nous avons trouvé que c'est le macéré aqueux qui a la plus puissante activité réductrice de ce radical. Ce même extrait a le pouvoir réducteur du fer le plus puissant, qui a été confirmé par le test FRAP.

Les résultats des activités antidiabétique et antioxydante *in vitro* ont montré que les macérés aqueux et méthanolique de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* se sont distingués dans la plupart des tests *in vitro*, ce qui nous a orienté dans le choix de ces deux extraits pour évaluer leurs activités antidiabétique et antioxydante *in vivo*. Pour ce, nous avons étudié leur toxicité aiguë, selon le protocole décrit dans la ligne directrice 423 (OCDE 423) et nous avons noté qu'aucun décès n'a été observé pour les souris ayant reçu les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera* L., à la dose de 2000 mg/kg du poids corporel. De même, les souris n'ont présenté aucun signe de toxicité tel que les modifications du comportement, les tremblements, les convulsions, les salivations, la diarrhée, le sommeil ou le coma. Par conséquent, nous avons adopté 500 mg/kg du poids corporel de la souris, comme dose thérapeutique pour nos études *in vivo*, valeur qui est loin de la dose toxique.

Ainsi, nous avons terminé notre étude bio guidé par l'évaluation des activités antidiabétiques et antioxydante *in vivo* des macérés aqueux et méthanolique chez des souris Swiss Albinos. Pour l'étude de l'activité antidiabétique *in vivo*, elle a été réalisée par le suivi de l'évolution du poids corporel et des paramètres biochimiques (glucose à jeun, urée, créatinine, cholestérol, triglycérides, protéines totaux, ASAT et ALAT). Nous avons noté une diminution importante de la glycémie chez les souris, durant les 5 semaines du traitement, et plus particulièrement pour les souris traitées par le macéré aqueux. Aussi, les paramètres biochimiques ont été rétablis aux valeurs normales, en comparaison avec le bilan sanguin des souris diabétiques non traitées. Pour l'activité antioxydante *in vivo*, elle a été évaluée par un dosage de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), qui élimine les radicaux superoxydes et par le dosage du malondialdéhyde (MDA), qui est un produit de décomposition oxydative des lipides insaturés et nous avons trouvé que les macérés aqueux et méthanolique d'*A. gummifera* ont pu diminuer le MDA dans le foie et les reins des souris diabétiques, en particulier le macéré méthanolique. De même, nous avons remarqué que ces macérés ont stimulé la sécrétion de la SOD, avec une différence statistiquement non significative entre ces deux extraits. Ainsi, nous pouvons déduire que ces deux extraits peuvent représenter une source riche d'antioxydants naturels et qu'ils préviennent la peroxydation lipidique et stimulent la sécrétion de l'antioxydant enzymatique SOD.

Perspectives

Comme perspectives, nous pouvons entreprendre :

- Une étude phytochimique approfondie des macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera*, afin d'isoler les principes actifs de ces deux extraits et de déterminer leurs structures chimiques, à l'aide de différentes méthodes analytiques ;
- Une évaluation de l'activité antidiabétique et antioxydante *in vitro* et *in vivo* des principes actifs isolés ;
- Une étude des autres activités biologiques d'*Atractylis gummifera* L.

Références bibliographiques

- Achour, S., Rhalem, N., Elfakir, S., Khattabi, A., Nejjari, C., Mokhtari, A., & Soulaymani, R. (2013). Prognostic factors of *Atractylis gummifera* L. poisoning, Morocco. *Eastern Mediterranean health journal*, 19(11) : 953-959.
- Adina, F., Cecilia, G., Felicia, G., Carmen, D., & Ovidiu, T. (2017). Identification and quantification of phenolic compounds from red currant (*Ribes rubrum* L.) and raspberries (*Rubus idaeus* L.). *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 6: 30-37. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/IJPPE.6.30>
- Ahid, S., El Cadi, M. A., Meddah, B., & Cherrah, Y. (2012, May). *Atractylis gummifera* : from poisoning to the analytic methods. In *Annales de biologie clinique*. 70(3): 263-268. DOI : [10.1684/abc.2012.0699](https://doi.org/10.1684/abc.2012.0699)
- Aït Youssef, M. (2006). *Plantes médicinales de Kabylie*. Ibis Press. Paris. ISBN: 2-910728-57-9.
- Akabli, T., Lamchouri, F., Senhaji, S., & Toufik, H. (2019). Molecular docking, ADME/Tox prediction, and *in vitro* study of the cell growth inhibitory activity of five β -carboline alkaloids. *Structural Chemistry*, 30(4): 1495-1504. <https://doi.org/10.1007/s11224-019-01308-x>
- Akabli, T., Toufik, H., Yasri, A., Bih, H., & Lamchouri, F. (2018). Combining ligand-based and structure-based drug design approaches to study the structure-activity relationships of a β -carboline derivative series. *Structural Chemistry*, 29(6): 1637-1645. <https://doi.org/10.1007/s11224-018-1141-1>
- Akhmisse, M. (2000). *Médecine, magie et sorcellerie au Maroc ou l'art traditionnel de guérir* (4^{ème} Edition). Casablanca : Impr. Dar Kortoba.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. F. P. C., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*, 20(4): 470-475. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.4.470>.

- Almdal, T. P., & Vilstrup, H. (1988). Strict insulin therapy normalises organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologia*, 31(2): 114-118. <https://doi.org/10.1007/BF00395558>
- American Diabetes Association. (2014). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes care*, 37: S14. <https://doi.org/10.2337/dc14-S014>
- American Diabetes Association. (2019). Classification and diagnosis of diabète : standards of medical care in diabetes. *Diabetes care*, 42 (Supplement 1): S13-S28. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>.
- Asgharpour, F., Pouramir, M., Khalilpour, A., Alamdar, S. A., & Rezaei, M. (2013). Antioxidant activity and glucose diffusion relationship of traditional medicinal antihyperglycemic plant extracts. *International journal of molecular and cellular medicine*, 2(4): 169-176. PMID : [24551809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24551809/)
- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2012. Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. *Cell* 148: 1160–1171. [Doi: 10.1016/j.cell.2012.02.010](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.010).
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., Stuppner, H., (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8): 1582-1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Bailey, C. J. (2008). Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovascular drugs and therapy*, 22(3): 215-224. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6092-0>
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 60(9): 1566-1576. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>.
- Bailey, C.J. 2017. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 60: 1566–1576. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>

- Bammou, M., Daoudi, A., Sellam, K., ElRhaffari, L., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2015). Étude Ethnobotanique des Astéracées dans la Région Meknès-Tafilalet (Maroc)/ [Ethnobotanical Survey of Asteraceae Family used in Meknes-Tafilalet Region (Morocco)]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13(4): 789-815
- Bardot, M. (2012). Le diabète gestationnel : de nouvelles recommandations pour un dépistage ciblé : étude rétrospective sur 116 dossiers. Mémoire en sciences de la santé, Université de Lorraine, France.
- Bastard, J. P., & Fève, B. (2013). *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux*. 405 p. Springer Paris. DOI : <https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6>
- Baudet, M., Daugareil, C., & Ferrieres, J. (2012). Prévention des maladies cardiovasculaires et règles hygiéno-diététiques. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 61(2): 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.ancard.2011.05.007>
- Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., & Ehile, E. E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4(2) : 217-225. [DOI: 10.4314/scinat.v4i2.42146](https://doi.org/10.4314/scinat.v4i2.42146).
- Belarbi, N., Rhalem, N., Soulaymani, A., Hami, H., Mokhtari, A., & Soulaymani, B. R. (2013). Intoxication par l'*Atractylis gummifera* L. au Maroc (1992-2008). *Antropo*, (30): 97-104.
- Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*, 766 p. Editions Le Fennec, Casablanca, Ibis Press.
- Bellakhdar, J. (1999). La médecine traditionnelle au Maghreb : une archéologie de la science méditerranéenne antique. *Horizons Maghrébins-Le droit à la mémoire*, 39(1): 73-87.
- Bellakhdar, J. (2006). *Plantes médicinales au Maghreb et soins de base : précis de phytothérapie moderne*. Eds Le Fennec. 385 p.
- Benhaddou-Andaloussi, A., Martineau, L., Vuong, T., Meddah, B., Madiraju, P., Settaf, A., & Haddad, P. S. (2011). The *in vivo* antidiabetic activity of *Nigella sativa* is mediated through activation of the AMPK pathway and increased muscle Glut4

content. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2011, Article ID 538671, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2011/538671>

Benkhiguel, O., Ben Akka, F., Salhi, S., Fadli, M., Douira, A., & 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): 3539-68.

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant power” : the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

Bergmeyer, H. U. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie. Volume 2, Academic Press, Edition Hans Ulrich Bergmeyer. 682 p.

Bergmeyer, H. U. (1980). IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes: Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6. 1.2). *Clinica chimica acta*, 105(1): 147-154. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(80\)90105-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(80)90105-9)

Bertrand, P.Y. (1991). *Les noms des plantes au Maroc*. Rabat, Maroc : Actes Editions. Rabat, Maroc. 166 p.

Bnouham, M., Merhfouf, F. Z., Elachoui, M., Legssyer, A., Mekhfi, H., Lamnaouer, D., & Ziyat, A. (2006). Toxic effects of some medicinal plants used in Moroccan traditional medicine. *Moroccan Journal of Biology*, 2(3): 21-30.

Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J. L., Thérond, P., Peynet, J., Legrand, A., & Delattre, J. (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales pharmaceutiques françaises*. 62(3): 147-157. [https://doi.org/10.1016/S0003-4509\(04\)94297-6](https://doi.org/10.1016/S0003-4509(04)94297-6)

Bonora, E., Formentini, G., Calcaterra, F., Lombardi, S., Marini, F., Zenari, L., ... & Cacciatori, V. (2002). HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes care*, 25(7): 1135-1141. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.7.1135>

- Botanica, T. (2012). The French botany network. Available at : www.tela-botanica.org/eflore/BDNFF/4.02/nn/69461/information. Consulté [Mai, 2016].
- Bouabid, K., Lamchouri, F., Hamid, T., & Faouzi, M. E. A. (2019^b). Inventory of poisonings and toxicological studies carried out on *Atractylis gummifera* L.: A review. *Plant Science Today*, 6(4): 457-464. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.4.582>.
- Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., & Faouzi, M. E. A. (2020). Phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant : *Atractylis gummifera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 253: 112640. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112640>.
- Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Boulfia, M., Senhaji, S., Faouzi, M.E.A., 2019^a. In vivo anti-diabetic effect of aqueous and methanolic macerated extracts of *Atractylis gummifera*. *Bangladesh J. Pharmacol.* 14: 67–73. <https://doi.org/10.3329/bjp.v14i2.38870>.
- Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Sayah, K., Cherrah, Y., & Faouzi, M. E. A. (2018). Phytochemical screening and *in vitro* evaluation of alpha amylase, alpha glucosidase and beta galactosidase inhibition by aqueous and organic *Atractylis gummifera* L. extracts. *Plant Science Today*, 5(3): 103-112. <https://doi.org/10.14719/pst.2018.5.3.393>.
- Bouaziz, M., Dhouib, A., Loukil, S., Boukhris, M., & Sayadi, S. (2009). Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 8(24): 7017-7027.
- Boudebaz, K., Nia, S., Ayadi, M. T., & Cherif, J. K. (2015). The effect of extraction method on antioxidant activity of *Atractylis babelii* Hochr. leaves and flowers extracts. *Algerian Journal Of Natural Products*, 3(2) : 146-152.
- Boukef, M. K. (1986). *Plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne*. Agence de coopération culturelle et technique. ISBN : 9290280859. Tunisie. 350 p.
- Bravi, M. C., Pietrangeli, P., Laurenti, O., Basili, S., Cassone-Faldetta, M., Ferri, C., & De Mattia, G. (1997). Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-

insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, 46(10): 1194-1198.
[https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90216-X](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90216-X)

Brouardel, P. (1869). *Étude critique des diverses médications employées contre le diabète sucré*. P. Asselin. Paris. 188p.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865): 813-820. <https://doi.org/10.1038/414813a>

Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications : a unifying mechanism. *diabetes*, 54(6): 1615-1625. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>

Brownlee, M., & Cerami, A. (1981). The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annual review of biochemistry*, 50(1): 385-432
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.002125>.

Bruneton, J. (1995). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Lavoisier publishing. 915 pp. ISBN : 2743000287. Paris, France.

Bruneton, J. (2016). *Pharmacognosie : phytochimie plantes médicinales*. 5^e édition. Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-2165-8. Paris.

Bruneton, J., & Pharmacognosie, P. (2009). *Plantes médicinales*. 4^{ème} Edition. *Lavoisier Tec. & Doc*, 1288, pp. 199-204. Paris, France.

Bucolo, G., & David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical chemistry*, 19(5): 476-482.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/19.5.476>

Burg, M. B. (1995). Molecular basis of osmotic regulation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 268(6): F983-F996.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.268.6.F983>

Buyschaert M. (2006). *Diabétogène clinique*. De book ; 153: 135

Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L and Sauvaigo, S (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of

DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* 383(6): 93 - 100.
<https://doi.org/10.1515/BC.2002.100>

Capeau, J. (2003). Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *Médecine/sciences*, 19(8-9): 834-839.

Castronovo, V. (2003). Alimentation et cancer. *Revue Médicale de Liège*, 58(4): 231-9.

Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3): 527-605.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>.

Chardon G, Viala A, Vignais P et Stanislas E. (1964). L'intoxication par le chardon à glu, *Atractylis gummifera* L, *Thérapie*, 19 : 1313-22.

Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus : distinct or continuum ? *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 20(4): 546. doi: [10.4103/2230-8210.183480](https://doi.org/10.4103/2230-8210.183480)

Chen, H. H., Yu, C., Ueng, T. H., Chen, S., Chen, B. J., Huang, K. J., & Chiang, L. Y. (1998). Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C60 in rats. *Toxicologic pathology*, 26(1): 143-151.

Cho, N., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas : Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138: 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.

Courbe, A. (2017). Physiologie humaine appliquée. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, 64(12): 1293-1294. <https://doi.org/10.1007/s12630-017-0950-9>.

Daniele, C., Dahamna, S., Firuzi, O., Sekfali, N., Saso, L., & Mazzanti, G. (2005). *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2): 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.025>.

- Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., & Gabetta, B. (1972). Structure of the diterpenoid carboxyatractyloside. *Phytochemistry*, 11(12): 3501-3504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89846-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89846-5).
- Delattre, J., Beaudeau, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques). Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales. Paris, 1 405 p.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A., Gmira, N., & Douhou, N. (2003). Phytochemical screening of an ibero-moroccan endemic, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142: 61-78.
- Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22): 12222-12226. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.12222>
- Dupont, F., & Guignard, J. L. (2015). *Botanique : les familles de plantes*. 16^{ème} édition. Elsevier Masson. Paris. 408 p.
- Durand, G., & Beaudeau, J. L. (2011). *Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives*. Lavoisier. 2^{ème} édition. Paris, p.213-217.
- Dureshahwar, K., Mubashir, M., & Une, H. D. (2017). Quantification of quercetin obtained from *Allium cepa* Lam. leaves and its effects on streptozotocin-induced diabetic neuropathy. *Pharmacognosy research*, 9(3): 287. doi: [10.4103/pr.pr.147.16](https://doi.org/10.4103/pr.pr.147.16)
- Eddouks, M., Ouahidi, M. L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., & Lemhadri, A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, 5(4): 194-203. <https://doi.org/10.1007/s10298-007-0252-4>

- Eidi, A., & Eidi, M. (2009). Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 3(1): 40-44. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2008.10.007>
- El Alami, A., & Chait, A. (2017). Enquête ethnopharmacologique et ethnobotanique sur les plantes médicinales dans le Haut Atlas central du Maroc. *Algerian Journal of Natural Products*, 5(1): 427-445. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.843894>
- El Amrani, F., Rhallab, A., Alaoui, T., El Badaoui, K. H. A. L. I. D., & Chakir, S. (2010). Étude ethnopharmacologique de quelques plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Meknès-Tafilalet (Maroc). *Phytothérapie*, 8(3): 161-165. <https://doi.org/10.1007/s10298-010-0552-y>.
- Émile Laoust. Mots et choses berbères [Paris 1920 réédition Rabat, 1983].
- Eppens, M. C., Craig, M. E., Cusumano, J., Hing, S., Chan, A. K., Howard, N. J., ... & Donaghue, K. C. (2006). Prevalence of diabetes complications in adolescents with type 2 compared with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 29(6): 1300-1306. <https://doi.org/10.2337/dc05-2470>.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4): 341-390. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90181-F](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90181-F).
- Ewald, N., & Hardt, P. D. (2013). Diagnosis and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis. *World journal of gastroenterology : WJG*, 19(42): 7276-7281doi: [10.3748/wjg.v19.i42.7276](https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7276).
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 108-117.
- Fonseca, V. A. (2009). Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes care*, 32(suppl 2): S151-S156. <https://doi.org/10.2337/dc09-S301>.

- Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., & Leverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11(6): 411-420. [https://doi.org/10.1016/S1624-0693\(02\)00269-4](https://doi.org/10.1016/S1624-0693(02)00269-4)
- Forrest, J., Menser, M., & Burgess, J. A. (1971). High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. *The Lancet*, 298(7720): 332-334. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)90057-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)90057-2).
- Fouad, Z., & Lahcen, Z. (2020). Antidiabetic medicinal plants in Morocco : Ethnobotanical survey of the population of Béni Mellal. *Plant Archives*, 20(1) : 337-343. Doi: [10.19082/1832](https://doi.org/10.19082/1832).
- Fowler, M. J. (2008). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes*, 26(2): 77-82. <https://doi.org/10.2337/diaclin.26.2.77>
- Gaillard, Y., Cheze, M., & Pépin, G. (2001, November). Intoxications humaines par les végétaux supérieurs : revue de la littérature. In *Annales de Biologie Clinique*. 59(6): 764-5.
- Gale, E. A. M. (2005). Latent autoimmune diabetes in adults : a guide for the perplexed. *Diabetologia*, 48: 2195–2199. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1954-5>.
- Gan, S. C., Barr, J., Arieff, A. I., & Pearl, R. G. (1992). Biguanide-associated lactic acidosis: case report and review of the literature. *Archives of Internal Medicine*, 152(11): 2333-2336. Doi : [10.1001/archinte.1992.00400230129023](https://doi.org/10.1001/archinte.1992.00400230129023)
- Gao, H., Wen, J. J., Hu, J. L., Nie, Q. X., Chen, H. H., Xiong, T., Xie, M. Y. (2018). Polysaccharide from fermented *Momordica charantia* L. with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats. *Carbohydrate polymers*, 201: 624-633. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.075>
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, Paris, 91 p.
- Gattefossé, J. (1921). Les plantes dans la thérapeutique indigène du Maroc. Paris: Larose. 10: 73-123.

- Georgiou M, Biol D, Sianidou L. Hepatotoxicity due to *Atractylis gummifera* L. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 1988; 26: 487-93. <https://doi.org/10.3109/15563658809038564>.
- Gillery, P., Monboisse, J. C., Maquart, F. X., & Borel, J. P. (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete & metabolisme*, 14(1): 25- 30.
- Grant, R. W., Moore, A. F., & Florez, J. C. (2009). Genetic architecture of type 2 diabetes : recent progress and clinical implications. *Diabetes care*, 32(6): 1107-1114. <https://doi.org/10.2337/dc08-2171>
- Grimaldi, A. (2011). L'éducation thérapeutique du patient diabétique, ou apprendre à gérer l'incertitude : Therapeutic education of diabetic patient, or to learn how to deal with uncertainty. *Médecine des maladies Métaboliques*, 5(6): 638-642. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(11\)70332-7](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(11)70332-7)
- Grover, J. K., Yadav, S., & Vats, V. (2002). Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of ethnopharmacology*, 81(1): 81-100. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00059-4)
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice*, 103(2): 137-149. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>.
- Gunjan, M., Ravindran, M., & Jana, G. K. (2011). A review on some potential traditional phytomedicine with antidiabetic properties. *International Journal of Phytomedicine*, 3(4): 448-458.
- Halliwell, B. (1999). Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3^{ème} édition, 290 p.
- Hammiche, V., Merad, R., & Azzouz, M. (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Paris : Springer. pp. 171-174.
- Hamouda, C., Amamou, M., Thabet, H., Yacoub, M., Hedhili, A., Bescharnia, F., & Brahim, N. E. M. B. (2000). Plant poisonings from herbal medication admitted to a Tunisian

toxicologic intensive care unit, 1983-1998. *Veterinary and human toxicology*, 42(3): 137-141.

Haouzi, D. I., Cohen, I., Vieira, H. L., Poncet, D., Boya, P., Castedo, M., Vadrot, N., Belzacq, A. S., Fau, D., Bresser, C., Feldmann, G., Kroemer, G., (2002). Mitochondrial permeability transition as a novel principle of hepatorenal toxicity *in vivo*. *Apoptosis*. 7: 395-405. <https://doi.org/10.1023/A:1020026923038>.

Hart, P. A., Bellin, M. D., Andersen, D. K., Bradley, D., Cruz-Monserrate, Z., Forsmark, C. E., ... & Pandol, S. J. (2016). Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, 1(3) :226-237. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30106-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30106-6)

Hashim, A., Khan, M. S., Khan, M., Baig, M., & Ahmad, S. (2013). Antioxidant and α -amylase inhibitory property of *Phyllanthus virgatus* L. : an *in vitro* and molecular interaction study. *BioMed Research International*, Article ID 729393, 12 pages <https://doi.org/10.1155/2013/729393>

Hattersley, A., Bruining, J., Shield, J., Njolstad, P., & Donaghue, K. C. (2009). The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatric diabetes*, 10: 33-42. [doi: 10.1111/j.1399-5448.2009.00571.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2009.00571.x)

Hayes, A. W., & Kruger, C. L. (2014). *Hayes' principles and methods of toxicology*. Crc Press. 6^{ème} Edition. France. 2184p.

Hedili A, Warnet JM, Thevenin M, Martin C, Yacoub M, Claude JR. (1989). Biochemical Investigation of *Atractylis gummifera* L. Hepatotoxicity in the Rat. *Arch. Toxicol*. 13: 312-315.

Hennen, G. (2001). *Endocrinologie*. Edition De Boeck Supérieur. Bruxelles. 520 p.

Herraiz Tomico, T., Guillén Fuerte, H., Arán, V. J., & Salgado, A. (2017). Identification, occurrence and activity of quinazoline alkaloids in *Peganum harmala*. *Food and Chemical Toxicology*, 103: 261-269. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.010>

Hirata, Y., & ISHIZU, H. (1972). Elevated insulin-binding capacity of serum proteins in a case with spontaneous hypoglycemia and mild diabetes not treated with insulin. *The*

Tohoku Journal of Experimental Medicine, 107(3): 277-286. <https://doi.org/10.1620/tjem.107.277>

Hmamouchi, M. (2001). Les plantes médicinales et aromatiques marocaine utilisation traditionnelles, marché, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie, *Lexiques 2^{ème} édition*. pp115-116.

HOUTA, O., CHOUAEB, H., NEFFATI, M., & AMRI, H. (2012). Criblage chimique préliminaire des protéines et caroténoïdes présents dans un *Crithmum maritimum* cultivé en Tunisie. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*. 14: 77-82.

Huang, H., Ou, R., Prior Rior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.

Huang, H., Ou, R., Prior Rior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1991). Oxidative glycation and free radical production : a causal mechanism of diabetic complications. *Free radical research communications*, 12(1): 115-123. <https://doi.org/10.3109/10715769109145775>.

Ilarde, A., & Tuck, M. (1994). Treatment of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and its Complications. *Drugs & aging*, 4(6): 470-491. <https://doi.org/10.2165/00002512-199404060-00004>

Jain, S. K. (1968). *Medicinal plants*. National Book Trust, India. 216 p.

Joel, P., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. [Physiological Mechanisms of Antioxidant Defense.]. *Nutrition clinique and métabolisme*, 16: 233-239. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(02\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(02)00166-8).

Joslyn, M. A. (1970). Tannins and related phenolics. *Methods in food analysis*, Academic Press London. 701-725.

Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., & Eddouks, M. (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal

- diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2-3): 175-182. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00289-6).
- Kandra, L. (2003). α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666: 487-498. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2003.08.073>
- Kaneto, H., Xu, G., Song, K. H., Suzuma, K., Bonner-Weir, S., Sharma, A., & Weir, G. C. (2001). Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β -cell function through the induction of oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33): 31099-31104. [doi: 10.1074/jbc.M104115200](https://doi.org/10.1074/jbc.M104115200)
- Karumi, Y. (2004). Identification of Active Principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) Leaf Extract. *J. Med. Sci*, 4(3): 179-182.
- Kephalas T, Alikaridis F, Pantelia K, Papadakis D. Production of carboxyatractyloside and atractyloside by cell suspension cultures of *Atractylis gummifera*. *Phytochem.* 1999 ; 51: 53-54. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00710-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00710-9).
- Khadhri, A., El Mokni, R., & Smiti, S. (2015). Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu : *Atractylis gummifera*. *Revue Soc Sci Nat de Tunisie*, 39: 44-52.
- Kharchoufa, L., Merrouni, I. A., Yamani, A., & Elachouri, M. (2018). Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco : toxicity concerns. *Toxicon*, 154: 90-113. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.09.003>
- Khare, C. P. (2008). *Indian medicinal plants : an illustrated dictionary*. Springer Science & Business Media. 900 p.
- Khelifi, D., Amouri, M., Laouini, S., Hamdi, H., (2013). Composition and anti-oxidant, anticancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem. Toxicol.* 55: 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.004>.

- Khelifi, D., Sghaier, R. M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., & Bouajila, J. (2013). Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and chemical toxicology*, 55: 202-208. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.004>.
- Kim, K. Y., Nguyen, T. H., Kurihara, H., & Kim, S. M. (2010). α -Glucosidase inhibitory activity of bromophenol purified from the red alga *Polyopes lancifolia*. *Journal of food science*, 75(5): H145-H150. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01629.x>
- King, G. L., & Brownlee, M. (1996). The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 25(2): 255-270. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70324-8](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70324-8)
- King, M., Bidwell, D., Shaikh, A., Voller, A., & Banatvala, J. E. (1983). Cocksackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. *The Lancet*, 321(8339): 1397-1399. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92353-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92353-X).
- Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z., Ashtary-Larky, D., & Asadi-Samani, M. (2016). The role of medicinal plants in the treatment of diabetes : a systematic review. *Electronic physician*, 8(1): 1832-1842.
- Labhal, A., Settaf, A., Zalagh, F., Cherrah, Y., & Hassar, M. (1999). Propriétés anti-diabétiques des graines de *Nigella sativa* chez le mérione shawi obèse et diabétique. *Espérance médicale*, 6(47): 72-74.
- Lamchouri, F. (2014). Antitumor properties and toxicity effects of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae). *Plant Science Today*, 1(4): 192-195. <https://doi.org/10.14719/pst.2014.1.4.71>
- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., El Hamidi, M., Tligui, N.S., Lyoussi, B., Hassar, M., 2002. Experimental toxicity of *Peganum harmala* seeds. *Ann Pharm Fr*, 60: 123-129. PMID: 11976557. Doi: [APF-03-2002-60-2-0003-4509-101019-ART6](https://doi.org/10.1016/j.aph.2002.03.003)
- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Hassar, M., Zemzami, M., Atif, N., Nadori, EB., Zaid, A., & Lyoussi, B., 2000. *In vitro* cell-toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapia*, 71: 50-54. DOI: [10.1016/S0367-326X\(99\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00117-3)

- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Zemzami, M., Lyoussi, B., Zaid, A., Atif, N., Hassar, M. (1999). Antitumour principles from *Peganum harmala* seeds. *Therapie*, 54(6): 753-758. PMID: 10709452.
- Lamchouri, F., Zemzami, M., Jossang, A., Abdellatif, A., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2013). Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Peganum harmala* seeds. *Pak. J. Pharm. Sci*, 26(4): 699-706.
- Larabi, I. A., Azzouz, M., Abtroun, R., Reggabi, M., & Alamir, B. (2012). Déterminations des teneurs en atractyloside dans les racines d'*Atractylis gummifera* L. provenant de six régions d'Algérie. In *Annales de toxicologie analytique*. 24(2) :81-86. <https://doi.org/10.1051/ata/2012009>
- Larrey, D., & Pageaux, G. P. (1995). Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. In *Seminars in liver disease*. 15 (03): 183 -188.
- Lee, E.J., Hyun, J.H., Jung-Sun, H., Han-Seung, J., Jeong, H.K., 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci*. 73: 167–179. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00259-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00259-5).
- Lemoine, C. (2004). *Les plantes toxiques*. Editions Jean-Paul Gisserot, Paris. 31 p.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2): 288-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>
- Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9): 790-796. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00765-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00765-7)
- Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food chemistry*, 141(3) : 2170-2176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.123>
- Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., & Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 39(3): 481-497. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.011>

- Macfarlane, I. A. (1991). Diabetes mellitus and endocrine diseases. *JCG Williams : Pickup. Textbook of Diabetes. Blackwell*, London, 263 p.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et Universitaires Romandes. Italie. 192 p.
- Madiseh, M.R., Malekpour, A.T., Bahmani, M., Rafieian, M.K., 2016. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9(9): 825–831. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.001>
- Maessen, D. E., Stehouwer, C. D., & Schalkwijk, C. G. (2015). The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clinical Science*, 128(12): 839-861. <https://doi.org/10.1042/CS20140683>.
- Mahmoud, M. F., El Ashry, F. E. Z. Z., El Maraghy, N. N., & Fahmy, A. (2017). Studies on the antidiabetic activities of *Momordica charantia* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical biology*, 55(1): 758-765. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1275026>
- Maritim, A.C., Sandres, R.A., Watkins, J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17(1): 24–38. <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>.
- Marles, R. J. (1994). Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res*, 6: 149-187.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2): 83-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X)
- Martin, C., Vallet, B., & Riou, B. (2017). *Physiologie humaine appliquée (2e édition)*. Arnette-John Libbey Eurotext. Paris. 184 p.
- Martineau, L. C., Couture, A., Spoor, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B., Leduc, C., Burt, A., Vuong, T., Mai, P. L., Prentki, M., Armason, A. B. J., Haddad, P. S., (2006). Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry

Vaccinium angustifolium Ait. *Phytomedicine*, 13(9-10): 612-623.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.08.005>.

Maruhn, D. (1976). Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clinica Chimica Acta*, 73(3): 453-461.
[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(76\)90147-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(76)90147-9).

Mauvais-Jarvis, F., Sobngwi, E., Porcher, R., Riveline, J. P., Kevorkian, J. P., Vaisse, C., Charpentier, G., Guillausseau, P.J., Vexiau, P., and Gautier, J. F. (2004). Ketosis-prone type 2 diabetes in patients of sub-Saharan African origin: clinical pathophysiology and natural history of β -cell dysfunction and insulin resistance. *Diabetes*, 53(3): 645-653. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.645>.

Maxwell, T. J., Ballantyne, C. M., Cheverud, J. M., Guild, C. S., Ndumele, C. E., & Boerwinkle, E. (2013). APOE modulates the correlation between triglycerides, cholesterol, and CHD through pleiotropy, and gene-by-gene interactions. *Genetics*, 195(4): 1397-1405.
<https://doi.org/10.1534/genetics.113.157719>

McCabe, L. R. (2007). Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *Journal of cellular biochemistry*, 102(6): 1343-1357. <https://doi.org/10.1002/jcb.21573>.

McNally, J. S., Davis, M. E., Giddens, D. P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., & Harrison, D. G. (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NAD (P) H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(6): H2290-H2297.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00515.2003>

Mechchate, H., Es-safi, I., Bari, A., Grafov, A., & Bousta, D. (2020). Ethnobotanical Survey About the Management of Diabetes with Medicinal Plants Used by Diabetic Patients in Region of Fez Meknes, Morocco. *Ethnobotany Research and Applications*. 12 : 1-28.

Médart, J. (2009). Manuel pratique de nutrition : l'alimentation préventive et curative. De Boeck Supérieur. 2^{ème} édition. Bruxelles. 314 p.

- Mejdoub, K., Mami, I. R., Belabbes, R., Dib, M. E. A., DJabou, N., Tabti, B., Benyelles, N. G., Costa, J., Muselli, A. (2020). Chemical Variability of *Atractylis gummifera* Essential Oils at Three Developmental Stages and Investigation of Their Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities. *Current Bioactive Compounds*, 16(4): 489-497. DOI: <https://doi.org/10.2174/1573407215666190126152112>
- Mihai, C. M., Mărghitaș, L. A., Bobiș, O., Dezmirean, D., & Tămaș, M. (2010). Estimation of flavonoid content in propolis by two different colorimetric methods. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 43(1): 407-410.
- Mikou, K., Rachiq, S., & Oulidi, A. J. (2016). Étude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques utilisées dans la ville de Fès au Maroc. *Phytothérapie*, 14(1): 35-43. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-1013-4>.
- Mohora, M., Greabu, M., Muscurel, C., Duță, C., & Totan, A. (2007). The sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications. *Romanian J Biophys*, 17(2) : 63-84.
- Molan, A. L., Faraj, A. M., & Mahdy, A. S. (2012). Antioxidant activity and phenolic content of some medicinal plants traditionally used in Northern Iraq. *Phytopharmacology*, 2(2): 224-233.
- Monisha, B., Pushpank, V., 2013. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* 2: 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.001>.
- Monnier, L., & Colette, C. (2014). *L'insulinothérapie dans le diabète de type 2*. De la théorie à la pratique. Elsevier Masson. 208 p.
- Morazzoni, P., & Bombardelli, E. (1995). *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia*, 66(1): 3-42.
- Mrabti, H. N., Marmouzi, I., Sayah, K., Chemlal, L., El Ouadi, Y., Elmsellem, H., Charrah, Y., Faouzi, M. A. (2017). *Arbutus unedo* L. aqueous extract is associated with *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity. *J. Mater. Environ. Sci*, 8: 217-224.

- N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1) : 1-15.
- Najem, M., Belaidi, R., Harouak, H., Bouiamrine, E. H., Ibjibjen, J., & Nassiri, L. (2018). Occurrence de plantes toxiques en phytothérapie traditionnelle dans la région du Moyen Atlas central Maroc. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 35(2): 5651-5673.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y., 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* 21(6): 895–902. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00237-7](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00237-7).
- Naruse, K., Rask-Madsen, C., Takahara, N., Ha, S. W., Suzuma, K., Way, K. J., Jacobs, J. R. C., Clermont, A. C., Ueki, K., Ohshiro, Y., Zhang, J., Goldfine, A., King, G., (2006). Activation of vascular protein kinase C- β inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*, 55(3): 691-698. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0771>
- Nassiri, L., Zarkani, S., Daoudi, A., Bammou, M., Bouiamrine, E. H., & Ibjibjen, J. (2016). Contribution à l'élaboration d'un catalogue ethnobotanique de la commune rurale d'Aguelmous (Province de Khénifra, Maroc) [Contribution to the establishment of ethno botanical catalog of Aguelmous (Khenifra, Morocco)]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 17(2): 373-387.
- National Research Council. (2010). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press. English Edition. 246 p.
- Nilsson, J., Pillal, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, A., Akesson, B., 2005. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 239–246. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400083>.
- Nuki, G. (2008). Colchicine : its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation. *Current rheumatology reports*, 10(3): 218-227. <https://doi.org/10.1007/s11926-008-0036-3>.

- Obatomi, D. K., & Bach, P. H. (1998). Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside. *Food and chemical toxicology*, 36(4): 335-346. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(98\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(98)00002-7).
- OECD, O. (2001). 423-Guidelines for the testing of chemicals Acute oral toxicity-Fixed dose procedure.
- Ohkawa, H., Ohishi, N.K., 1979. Assay for peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Onlu, S., Bingol, O., Turker, M., & Ozdemir, F. A. (2018). β -carboline production from *in vitro* regenerated *Peganum harmala* L. plant. *Feb-fresenius environmental bulletin*, 27: 8447-8451.
- Ortíz-Martínez, D. M., Rivas-Morales, C., de la Garza-Ramos, M. A., Verde-Star, M. J., Nuñez-Gonzalez, M. A., & 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: 1-6. <https://doi.org/10.1155/2016/5123519>.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction—antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
- Packer, L., Kraemer, K., & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17(10) : 888-895. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00658-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00658-X).
- Pastore, M., Morisi, F., & Viglia, A. (1974). Reduction of lactose of milk by entrapped β -galactosidase. II. Conditions for an industrial continuous process. *Journal of Dairy Science*, 57(3): 269-272. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84875-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)84875-7)
- Perera, D., Soysa, P., Wijeratne, S., 2016. Polyphenols contribute to the antioxidant and antiproliferative activity of *Phyllanthus debilis* plant *in-vitro*. *BMC Compl. Alternative Med.* 16(1): 339-348. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1324-5>

- Peter, E. L., Kasali, F. M., Deyno, S., Mtewa, A., Nagendrappa, P. B., Tolo, C. U., Sesaazi, D. (2019). *Momordica charantia* L. lowers elevated glycaemia in type 2 diabetes mellitus patients: Systematic review and meta-analysis. *Journal of ethnopharmacology*, 231: 311-324. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.033>
- Philips, J. C., & Scheen, A. (2005). L'insulinothérapie dans le diabète de type 2. *Revue Médicale de Liège*, 60(5-6): 419-23.
- Picard, F., Adjedj, J., & Varenne, O. (2017). Le diabète, une pathologie prothrombotique. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. Elsevier Masson. 66(6): 385-392. <https://doi.org/10.1016/j.ancard.2017.10.011>
- Pillon, F., & Buxeraud, J. (2013). Acidose lactique sous metformine, un risque à ne pas négliger. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(524) : 36-37. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2012.12.006>
- Pincemail, J., Degruene, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., & Defraigne, J. O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21(2): 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2007.04.005>
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Agence universitaire de la Francophonie.
- Portes, E. (2008). Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes : applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse de doctorat en Chimie organique. École doctorale des sciences chimiques (Talence, Gironde) Bordeaux 1.
- Pradeep, S. R., Barman, S., & Srinivasan, K. (2019). Attenuation of diabetic nephropathy by dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and onion (*Allium cepa*) via suppression of glucose transporters and renin-angiotensin system. *Nutrition*, 67: 110543. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.06.024>

- Prior, R.L., Schaich, X., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Food Chem.* 53: 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- Quézel, P., & Santa, S. (1962). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales : Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique*. Paris. 1962–1963.
- Ramachandran, A., Snehalatha, C., & Nanditha, A. (2017). Classification and diagnosis of diabetes. *Textbook of Diabetes. JohnWiley & Sons Ltd, Chichester*, 23-28.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Reifer, I., & Niziolek, S. (1957). Colorimetric microdetermination of alkaloids in lupine seeds. *Acta biochimica Polonica*, 4(3), 165. PMID : 13487116. 1104 p.
- Renu, A.K., Manish, M., 2015. Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1852: 2474–2483. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.08.001>
- Retsky, K. L., Chen, K., Zeind, J., & Frei, B. (1999). Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2): 90-98. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00151-8)
- Riccio, P., Scherer, B., & Klingenberg, M. (1973). Isolation of a new atractyloside type compound. *Febs Letters*, 31(1): 11-14.
- Robinson, S., & Kessler, A. (1992). 9 Diabetes secondary to genetic disorders. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 6(4): 867-898. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80171-5](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80171-5)
- Romeuf, L., Cherrah, Y., Ahid, S., Ollagnier, M., Basset, T., & Gaillard, Y. (2006). Identification et dosage de l'atractyloside et du carboxyatractyloside par CLHP-SM2

et CLHP-SM3 dans le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.). *Ann Toxicol Anal.*, 18(4) : 223-257.

- Rousseau, G., Simard, G., Homedan, C., Reynier, P., & Rougé-Maillart, C. (2017). Exploration biologique des décès par acidocétose diabétique : revue de la littérature. *La Revue de Médecine Légale*, 8(3) : 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.medleg.2017.05.002>
- Ruch, R.J., Cheng, S., Klaunig, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese *green tea*. *Carcinogenesis*. 10: 1003-1008. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>
- Rupeshkumar, M., Kavitha, K., & Haldar, P. K. (2014). Role of herbal plants in the diabetes mellitus therapy: An overview. *Int J Appl Pharm*, 6(3): 1-3.
- Rush, J. W., & Sandiford, S. D. (2003). Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults : influence of gender and physical activity. *Clinical biochemistry*, 36(5): 345-351. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(03)00039-0)
- Sajid, A., Sarfraz, R. A., Hanif, M. A., & Shahid, M. (2016). Evaluation of Chemical Composition and Biological Activities of *Citrus pseudolimon* and *Citrus grandis* Peel Essential Oils. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 38(2): 266-273.
- Sayah, K., Marmouzi, I., Naceiri Mrabti, H., Cherrah, Y., & 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*. Volume 2017, Article ID 2789482, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/2789482>
- Sayre, L. M., Moreira, P. I., Smith, M. A., & Perry, G. (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 41(2): 143-164.
- Scheen, A. (2002). Pièges et conseils à propos de l'utilisation des antidiabétiques oraux conventionnels. *Revue Médicale de Liège*, 57(5): 352-6.

- Scheen, A. J. (2015). Antidiabétiques oraux dans le traitement du diabète de type 2: perspectives historiques et médico-économique. *Médecine des maladies Métaboliques*, 9(2) : 186-197. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(15\)30042-0](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(15)30042-0)
- Schlede, E., Mischke, U., Diener, W., & Kayser, D. (1995). The international validation study of the acute toxic class method (oral). *Archives of toxicology*, 69(10) : 659-667. <https://doi.org/10.1007/s002040050229>
- Schlienger, J. L. (2013). Type 2 diabetes complications. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*, 42(5) : 839-848. DOI: [10.1016/j.lpm.2013.02.313](https://doi.org/10.1016/j.lpm.2013.02.313)
- Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Féraud, G., Ferrero, C. A., Franck, P. F., ... & Kessner, A. (2002). IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 C. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 40(7): 725-733. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.125>
- Seino, Y., Nanjo, K., Tajima, N., Kadowaki, T., Kashiwagi, A., Araki, E., & Hanafusa, T. (2010). Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetology International*, 1(1): 2-20.
- Sereme, A., Milogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2011). Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 15: 41-49.
- Servais, S. (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1, France.
- Shields, B. M., Hicks, S., Shepherd, M. H., Colclough, K., Hattersley, A. T., & Ellard, S. (2010). Maturity-onset diabetes of the young (MODY) : how many cases are we missing?. *Diabetologia*, 53(12): 2504-2508. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1799-4>
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009). 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*, 115(4): 1268-1273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.042>.
- Silva, M. L. C., Costa, R. S., dos Santos Santana, A., & Koblitz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3): 669-681.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299: 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Skalli, S., Alaoui, I., Pineau, A., Zaid, A., & Soulaymani, R. (2002). L'intoxication par le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.) : à propos d'un cas clinique. *Bull Soc Pathol Exot*, 95(4): 284-286.
- Slighoua, M., Mahdi, I., Di Cristo, F., Amaghnouje, A., Grafov, A., Boucetta, N., & Bousta, D. (2020). Assessment of *in vivo* estrogenic and anti-inflammatory activities of the hydro-ethanolic extract and polyphenolic fraction of Parsley (*Petroselinum sativum* Hoffm.). *Journal of Ethnopharmacology*, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113290>
- Sobngwi, E., & Gautier, J. F. (2002). Adult-onset idiopathic type I or ketosis-prone type II diabetes : evidence to revisit diabetes classification. *Diabetologia*, 45(2) : 283-285.
- Solimena, M., Folli, F., Aparisi, R., Pozza, G., & De Camilli, P. (1990). Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *New England Journal of Medicine*, 322(22): 1555-1560. [DOI :10.1056/NEJM199005313222202](https://doi.org/10.1056/NEJM199005313222202)
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2018). Hypoglycemic, anti-glycation and antioxidant *in vitro* properties of two *Vaccinium* species from *Macaronesia* : A relation to their phenolic composition. *Journal of Functional Foods*, 40: 595-605. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.002>
- Spyer, G., Macleod, K. M., Shepherd, M., Ellard, S., & Hattersley, A. T. (2009). Pregnancy outcome in patients with raised blood glucose due to a heterozygous glucokinase gene mutation. *Diabetic Medicine*, 26(1): 14-18. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02622.x>

- Stanislas E., Rouffrac R. Les flavonoïdes du chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.). (1964). Toulouse Pharmaceutique, 259: 4872-4875.
- Steenkamp, P. A., Harding, N. M., Van Heerden, F. R., & Van Wyk, B. E. (2006). Identification of atractyloside by LC–ESI–MS in alleged herbal poisonings. *Forensic science international*, 163(1-2): 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.11.010>
- Stewart, M. J., & Steenkamp, V. (2000). The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Therapeutic drug monitoring*, 22(6): 641-649.
- Suleiman, M. H. A., Ahmed, Y. A. I., & Osman, A. A. (2016). Screening of anthraquinones and assessment of antimicrobial activities of ethanol extracts of *Adansonia digitata* L., Sudan. *International Journal of Science and Research*, 5(1): 2319-7064.
- Suleiman, R. K., Zarga, M. A., & Sabri, S. S. (2010). New withanolides from *Mandragora officinarum*: First report of withanolides from the genus *Mandragora*. *Fitoterapia*, 81(7): 864-868. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.013>
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34: 497–500.
- Swanston-Flatt, S. K., Day, C., Bailey, C. J., & Flatt, P. R. (1990). Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*, 33(8): 462-464. <https://doi.org/10.1007/BF00405106>
- Taylor, S. I. (1992). Lilly Lecture : molecular mechanisms of insulin resistance : lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes*, 41(11): 1473-1490. <https://doi.org/10.2337/diab.41.11.1473>.
- Teng, H., Chen, L., 2019. Polyphenols and bioavailability: an update. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59(13): 2040–2051. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1437023>.
- Teng, H., Yuan, B., Gothai, S., Arulselvan, P., Song, X., Chen, L., 2018. Dietary triterpenes in the treatment of type 2 diabetes: to date. *Trends Food Sci. Technol.* 72: 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.012>.

- Thornalley, P. J., Langborg, A., & Minhas, H. S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochemical Journal*, 344(1): 109-116. <https://doi.org/10.1042/bj3440109>.
- Touriño, S., Lizárraga, D., Carreras, A., Lorenzo, S., Ugartondo, V., Mitjans, M., ... & Torres, J. L. (2008). Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) bark : electron transfer capacity, *in vitro* antioxidant activity, and effects on skin-related cells. *Chemical research in toxicology*, 21(3): 696-704. <https://doi.org/10.1021/tx700425n>.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Human reproduction update*, 14(3): 243-258. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004>
- Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of clinical Biochemistry*, 6(1): 24-27.
- Tuomi, T., Groop, L. C., Zimmet, P. Z., Rowley, M. J., Knowles, W., & Mackay, I. R. (1993). Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non insulin-dependent onset of disease. *Diabetes*, 42(2) : 359-362. <https://doi.org/10.2337/diab.42.2.359>.
- Valdés, B. (Ed.). (2002). *Catalogue des plantes vasculaires du Nord du Maroc, incluant des clés d'identification* (Vol. 1). Editorial CSIC-CSIC Press. 1007 p.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1):1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.
- Vallejo, J. R., Peral, D., Gemio, P., Carrasco, M. C., Heinrich, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2009). *Atractylis gummifera* and *Centaurea ornata* in the Province of Badajoz (Extremadura, Spain) Ethnopharmacological importance and toxicological risk. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(2): 366-370. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.036>.
- Wang, J., Zhao, Y. M., Zhang, B., & Guo, C. Y. (2015). Protective effect of total phenolic compounds from *Inula helenium* on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in sh-

sy5y cells. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 77(2): 163–169. [Doi :10.4103/0250-474x.156553](https://doi.org/10.4103/0250-474x.156553).

Wang, X., Li, G., & Ho Row, K. (2017). Extraction and Determination of Quercetin from *Ginkgo biloba* by DESs-Based Polymer Monolithic Cartridge. *Journal of chromatographic science*, 55(8): 866-871. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx037>

Wardman, P., Candeias, L.P., 1996. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat. Res.* 145: 523–531. <https://doi.org/10.2307/3579270>.

Warram, J. H., Martin, B. C., Krolewski, A. S., Soeldner, J. S., & Kahn, C. R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Annals of internal medicine*, 113(12): 909-915. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-12-909>

Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K., & Tokuda, K. (1986). Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clinical chemistry*, 32(8): 1551-1554. <https://doi.org/10.1093/clinchem/32.8.1551>

World Health Organization. (2016). Global report on diabetes. Geneva: World Health Organization. ISBN 978 92 4 156525 7. Edition World Health Organization

World Health Organization. (2019). Classification of diabetes mellitus. ISBN 978-92-4-151570-2. © World Health Organization

Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants : theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6): 1173-1183. <https://doi.org/10.1021/ja002455u>

Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T. S., Engerman, R. L., Oates, P. J., & King, G. L. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43(9): 1122-1129. <https://doi.org/10.2337/diab.43.9.1122>.

- Xia, Y., Tsai, A. L., Berka, V., & Zweier, J. L. (1998). Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40): 25804-25808. [Doi : 10.1074/jbc.273.40.25804](https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25804)
- Yahagi, K., Kolodgie, F. D., Lutter, C., Mori, H., Romero, M. E., Finn, A. V., & Virmani, R. (2017). Pathology of human coronary and carotid artery atherosclerosis and vascular calcification in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(2): 191-204. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.306256>
- Yamada, A., Ohgaki, S., Noda, T., & Shimizu, M. (1985). Chronic toxicity study of dietary stevia extracts in F344 rats. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 26(2): 169-183 <https://doi.org/10.3358/shokueishi.26.169>
- Youssef, M. A. (2006). *Plantes médicinales de Kabylie*. Ibis Press. 350 p. *Kabylie. Algerie*
- Zaim, N. (2009). Etude de la toxicité de *Atractylis gummifera*. L chez la souris IOPS OFA et le rat Wistar et rôle de la trimetazidine dans la prévention des lésions hépatiques. Mémoire de thèse à la Faculté des science, Université Mohamed V de Rabat- Maroc. 153 p.
- Zaim, N., Guemouri, L., Lamnaouer, D., & Benjouad, A. (2008). Étude de quatre cas d'intoxication par *Atractylis gummifera* L. au Maroc. *Thérapie*, 63(1): 49-54. <https://doi.org/10.2515/therapie:2008008>
- Zaini, G., Brandt, K., Clench, R., M., and Le Maitre, L. C., (2012). Effects of bioactive compounds from carrots (*Daucus carota* L.), polyacetylenes, beta-carotene and lutein on human lymphoid leukaemia cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(6): 640-652. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152012800617704>
- Zeggwagh, A. A., Lahlou, Y., & Bousliman, Y. (2013). Enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à Fès, Maroc. *The Pan African Medical Journal*, 14:125. DOI: [10.11604/pamj.2013.14.125.1746](https://doi.org/10.11604/pamj.2013.14.125.1746).
- Zeghad, N., Ahmed, E., Belkhiri, A., Vander Heyden, Y., & Demeyer, K. (2019). Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia*

ficus indica fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, 5(4), e01575.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01575>

Zhang, H., Wang, G., & Dong, J. (2015). Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2015/587383>

Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865): 782-787. <https://doi.org/10.1038/414782a>

Zimmet, P., Tuomi, T., Mackay, I. R., Rowley, M. J., Knowles, W., Cohen, M., & Lang, D. A. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA) : the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic medicine*, 11(3) : 299-303. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1994.tb00275.x>.

RESUME

Titre : Etude phytochimique & activités antioxydante et antidiabétique *in vitro* et *in vivo* d'*Atractylis gummifera* L.

Auteur : Khadija Bouabid

Mots clés : *Atractylis gummifera* ; Diabète sucré ; Stress oxydant ; Etude phytochimique ; Activité antidiabétique ; Activité antioxydante ; *In vitro* ; *In vivo*.

Atractylis gummifera L. est une plante toxique que nous avons valorisé par la réalisation d'une étude phytochimique et par l'évaluation des activités antidiabétique et antioxydante *in vitro* et *in vivo*. L'étude phytochimique a consisté, en la préparation à chaud et à froid d'extraits aqueux : (décocté, infusé et macéré) et organiques (méthanolique, macéré méthanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et éther de pétrole), ensuite un criblage phytochimique des métabolites secondaires (flavonoïdes, tanins, saponines, quinones, anthraquinones, anthracenosides, alcaloïdes et stérols) a été réalisé suivi par le dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins. L'étude biologique a consisté d'une part, en une évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* par l'inhibition des enzymes α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase et une évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* par cinq méthodes: le piégeage du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'activité antiradicalaire du DPPH, la capacité inhibitrice du radical ABTS, le test FRAP et le pouvoir réducteur de fer (PR) et d'autre part, en des études *in vivo* qui ont été réalisées sur un modèle de souris Swiss Albinos, traitées par les macérés aqueux et méthanolique. L'évaluation de l'activité antidiabétique *in vivo* a été réalisée par le suivi du poids corporel et des paramètres biochimique (glycémie, protéines totaux, urée, créatinine, cholestérol, triglycérides, transaminase ALAT et ASAT) et l'étude de l'activité antioxydante *in vivo* a été évaluée par le dosage de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) et du malondialdéhyde (MDA). Les résultats de l'étude phytochimique ont montré que le meilleur rendement d'extraction est obtenu à chaud et par les solvants les plus polaires. Le criblage phytochimique, a montré que la plante est riche en métabolites secondaires, ce qui a été confirmé par le dosage phytochimique qui a montré que les huit extraits sont riches en polyphénols, flavonoïdes et tanins. L'étude biologique a montré que les extraits d'*A. gummifera* possèdent en générale un pouvoir inhibiteur de l' α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase et principalement, les macérés méthanolique et aqueux. Ces extraits ont été aussi les meilleurs à inhiber le H_2O_2 , l'ABTS et le DPPH et à réduire le fer par les tests FRAP et PR. La pertinence des macérés aqueux et méthanolique démontrée via les tests *in vitro* nous a bio guidé vers le choix de l'exploitation de ces deux extraits pour l'étude *in vivo*, qui a commencé par l'évaluation de leurs toxicités aiguës et par la suite la détermination de la dose thérapeutique (500 mg/kg). L'évaluation de l'activité antidiabétique *in vivo* des macérés aqueux et méthanolique a montré que le macéré aqueux d'*A. gummifera* a provoqué la diminution de la glycémie, mieux que le macéré méthanolique et la Metformine. De plus, nous avons remarqué que le macéré aqueux a rétabli les paramètres biochimiques des souris diabétiques à la normale. Ces résultats sont en accord avec l'étude de l'activité antioxydante *in vivo*, qui a montré une augmentation de la sécrétion de SOD chez les souris diabétiques traitées par les macérés aqueux et méthanolique et un retour à la normale de taux du MDA chez les souris traitées par les deux macérés aqueux et méthanolique.

Abstract

Title: Phytochemical study & antioxidant and antidiabetic activities *in vitro* and *in vivo* of *Atractylis gummifera* L.

Author: Khadija Bouabid

Keywords: *Atractylis gummifera*; Diabetes mellitus; Oxidative stress; Phytochemical study; Antidiabetic activity; Antioxidant activity; *In vitro*; *In vivo*

Atractylis gummifera L. is a toxic plant that we have enhanced by carrying out a phytochemical study and by evaluating its *in vitro* and *in vivo* antidiabetic and antioxidant activities.

The phytochemical study consisted in the hot and cold preparation of aqueous extracts: (decocted, infused and macerated) and organic (methanolic, methanolic macerated, chloroformic, ethyl acetate and petroleum ether), then a phytochemical screening of secondary metabolites (flavonoids, tannins, saponins, quinones, anthraquinones, anthracenosides, alkaloids and sterols) was performed followed by the dosing of polyphenols, flavonoids and tannins. The biological study consisted on the one hand of an evaluation of the *in vitro* antidiabetic activity by the inhibition of the enzymes α -amylase, α -glucosidase and β -galactosidase and on the other hand an evaluation of the *in vitro* antioxidant activity by five methods : hydrogen peroxide H_2O_2 scavenging, DPPH antiradical activity, ABTS radical inhibitory capacity, FRAP assay and iron (PR) and other pat reducing capacity in *in vivo* studies which were performed on a Swiss Albino mouse model treated with aqueous and methanolic macerated. The evaluation of the *in vivo* antidiabetic activity was performed by monitoring body weight and biochemical parameters (glycemia, total protein, urea, creatinine, cholesterol, triglycerides, ALAT and ASAT transaminase) and the study of the *in vivo* antioxidant activity was evaluated by measuring the superoxide dismutase (SOD) enzyme and malondialdehyde (MDA). The results of the phytochemical study showed that the best extraction yield is obtained when hot and with the most polar solvents. The phytochemical screening showed that the plant is rich in secondary metabolites, which was confirmed by the phytochemical assay which showed that the eight extracts are rich in polyphenols, flavonoids and tannins. The biological study showed that the extracts of *A. gummifera* have an inhibitory power of α -amylase, α -glucosidase and β -galactosidase mainly, the methanolic and aqueous macerated. These extracts were also the best at inhibiting H_2O_2 , ABTS and DPPH and at reducing iron in the FRAP and PR tests. The relevance of the aqueous and methanolic macerated demonstrated by the *in vitro* tests guided us in the choice of the use of these two extracts for the *in vivo* study which started with the evaluation of their acute toxicity and then the determination of the therapeutic dose (500 mg/kg). The evaluation of the *in vivo* antidiabetic activity of the aqueous and methanolic macerate showed that the aqueous macerated of *A. gummifera* induced the decrease in blood glucose better than the methanolic macerated and Metformin. In addition, we found that the aqueous macerated restored the biochemical parameters of the diabetic mice to normal. These results are consistent with the study of *in vivo* antioxidant activity which showed an increase in SOD secretion in diabetic mice treated with both aqueous and methanolic macerate and a return to normal MDA levels in mice treated with both aqueous and methanolic macerated.

ملخص

العنوان: دراسة الكيمياء النباتية وأنشطة مضادات الأكسدة ومضادات السكر في المختبر وفي الجسم الحي لـ *Atractylis gummifera* L.

تأليف: خديجة بوعبيد

الكلمات الرئيسية: *Atractylis gummifera* ، السكري ، الاكسدة ، دراسة كيميائية نباتية ، نشاط مضاد لمرض السكر النشاط المضاد للأكسدة؛ في المختبر؛ في الجسم الحي

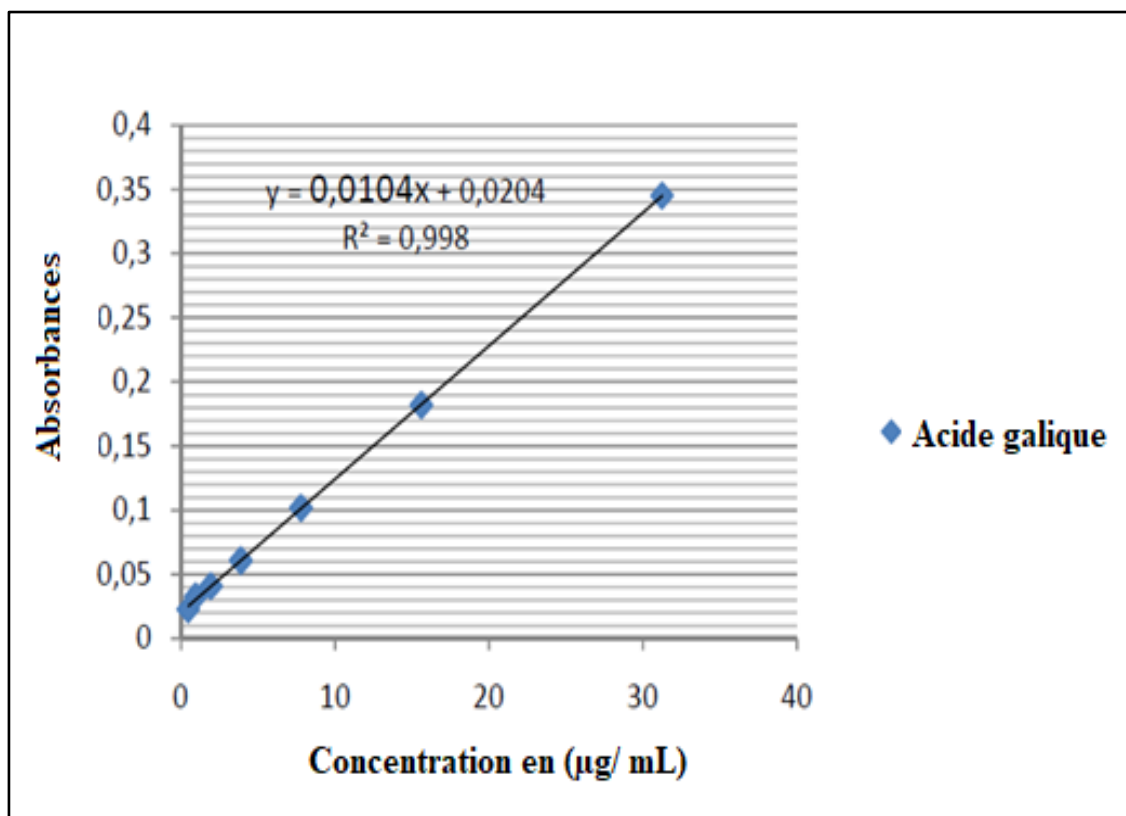
Atractylis gummifera L. نبات سام طورناه من خلال إجراء دراسة كيميائية نباتية وتقييم الأنشطة المضادة للسكري ومضادات الأكسدة في المختبر وفي الجسم الحي.

تكونت الدراسة الكيميائية النباتية من المستخلصات المائية الساخنة والباردة (منزوعة القوام ، مغمورة ومتبلدة) وعضوية (ميثانول ، ميثانول ، كلوروفورميك ، أسيتات إيثيل وإيثر البترول) ، ثم فحص المواد الكيميائية النباتية للأيضات الثانوية (الفلافونويد ، العفص ، الصابونين ، quinones ، anthraquinones ، anthracenosides ، alkaloids ، sterols) تتبعها فحص البوليفينول ، الفلافونويد والعفص. تكونت الدراسة البيولوجية من جهة في تقييم النشاط المضاد لمرض السكر في المختبر عن طريق تثبيط إنزيمات α -amylase و α -glucosidase و β -galactosidase وتقييم نشاط مضادات الأكسدة في المختبر بخمسة طرق: بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، والنشاط المضاد للجذور الحرة لـ DPPH ، والقدرة التثبيطية لجذر ABTS ، واختبار FRAP والقدرة المختزلة للحديد (PR) ، ومن ناحية أخرى ، في الدراسات المجراة التي أجريت على نموذج الفأر السويسري ألبينو ، معالج بماء مائي وميثانولي. تم تقييم النشاط المضاد لمرض السكر في الجسم الحي من خلال مراقبة وزن الجسم والمعايير الكيميائية الحيوية) نسبة السكر في الدم ، البروتينات الكلية ، اليوريا ، الكرياتينين ، الكوليسترول ، الدهون الثلاثية ، ALAT و ASAT ترانساميناز (ودراسة النشاط. فحص إنزيم ديسموتاز الفائق (SOD) و malondialdehyde (MDA).

أظهرت نتائج الدراسة الكيميائية النباتية أن أفضل محصول استخلاص يتم الحصول عليه عندما يكون ساخناً ومع معظم المذيبات القطبية. أظهر الفحص الكيميائي النباتي أن النبات غني بالمستقلبات الثانوية ، وهو ما أكده الفحص الكيميائي النباتي الذي أظهر أن المستخلصات الثمانية غنية بالبوليفينول والفلافونويد والعفص. أظهرت الدراسة البيولوجية أن مستخلصات A. gummifera يحتوي بشكل عام على قوة مثبطة لـ α -amylase و α -glucosidase و β -galactosidase وبشكل أساسي ، الميثانول والماكرات المائية. كانت هذه المستخلصات أيضاً الأفضل في تثبيط H_2O_2 و ABTS و DPPH وتقليل الحديد عن طريق اختبارات FRAP و PR. لقد وجهت لنا أهمية الماكرات المائية والميثانولية التي تم إثباتها من خلال الاختبارات المختبرية بيولوجياً في اختيار استخدام هذين المستخلصين للدراسة في الجسم الحي ، والتي بدأت بتقييم سميتها الحادة ثم تحديد الجرعة العلاجية (500 مجم / كجم). أظهر تقييم النشاط المضاد لمرض السكر في الجسم الحي للنباتات المائية والميثانولية أن النقع المائي لـ *A. gummifera* تسبب في انخفاض نسبة السكر في الدم ، أفضل من الميثانول النقع والميتفورمين. بالإضافة إلى ذلك ، لاحظنا أن النقع المائي أعاد المعلمات البيوكيميائية للفئران المصابة بالسكري إلى وضعها الطبيعي. تتفق هذه النتائج مع دراسة النشاط المضاد للأكسدة في الجسم الحي ، والتي أظهرت زيادة في إفراز SOD في الفئران المصابة بداء السكري التي عولجت بالماكرات المائية والميثانولية والعودة إلى المستويات الطبيعية من MDA فيها. النقع الميثانولي.

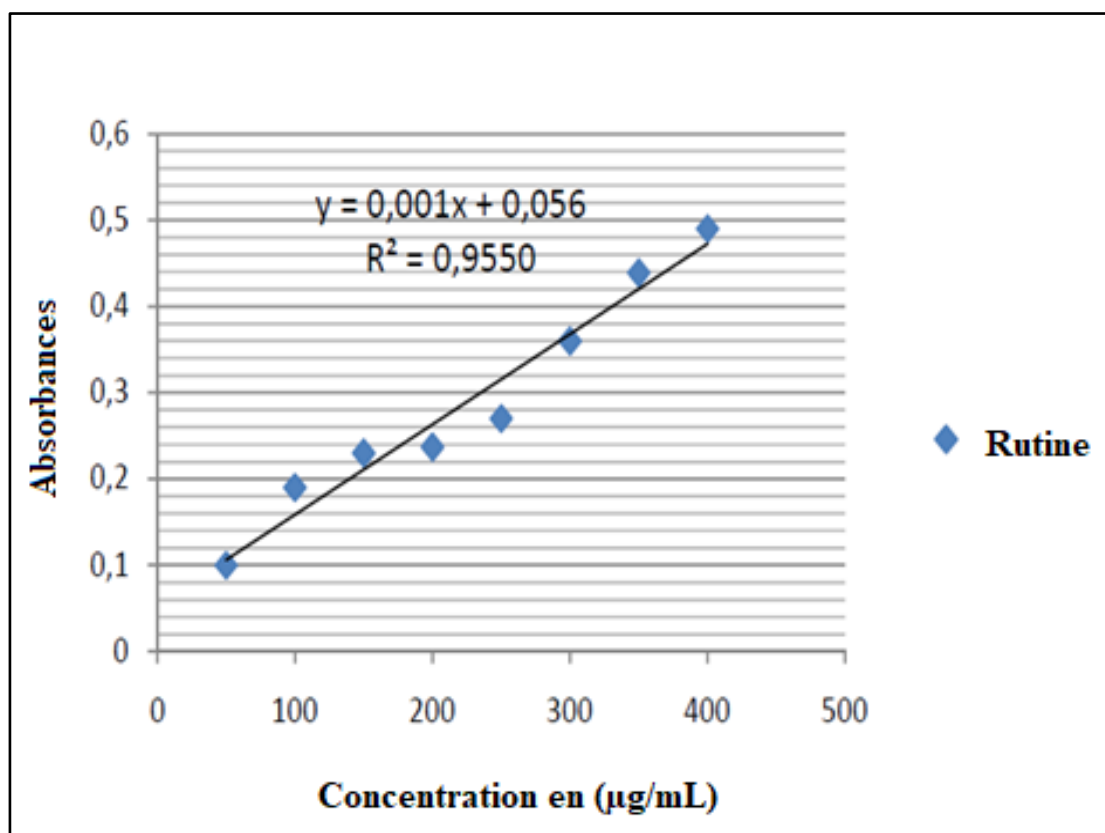
Annexes :

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



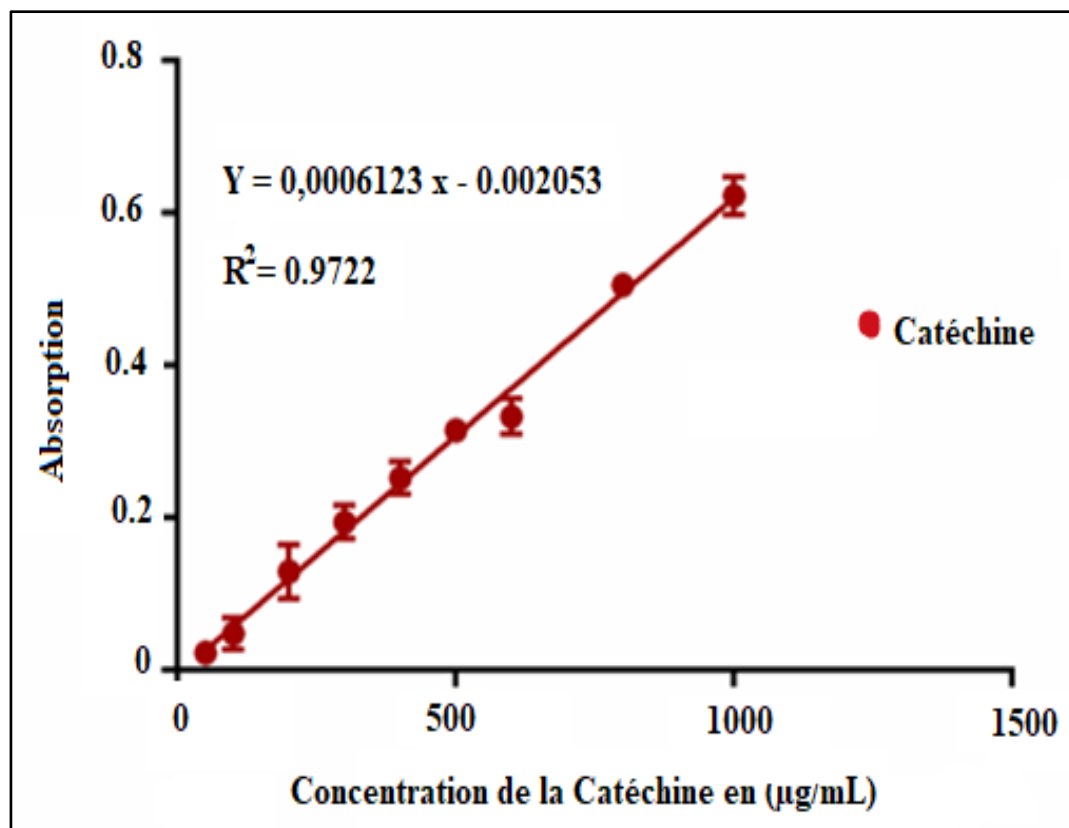
Courbe d'étalonnage d'acide gallique, utilisée pour doser les polyphénols dans les différents extraits d'*Atractylis gummifera*

Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de la Rutine



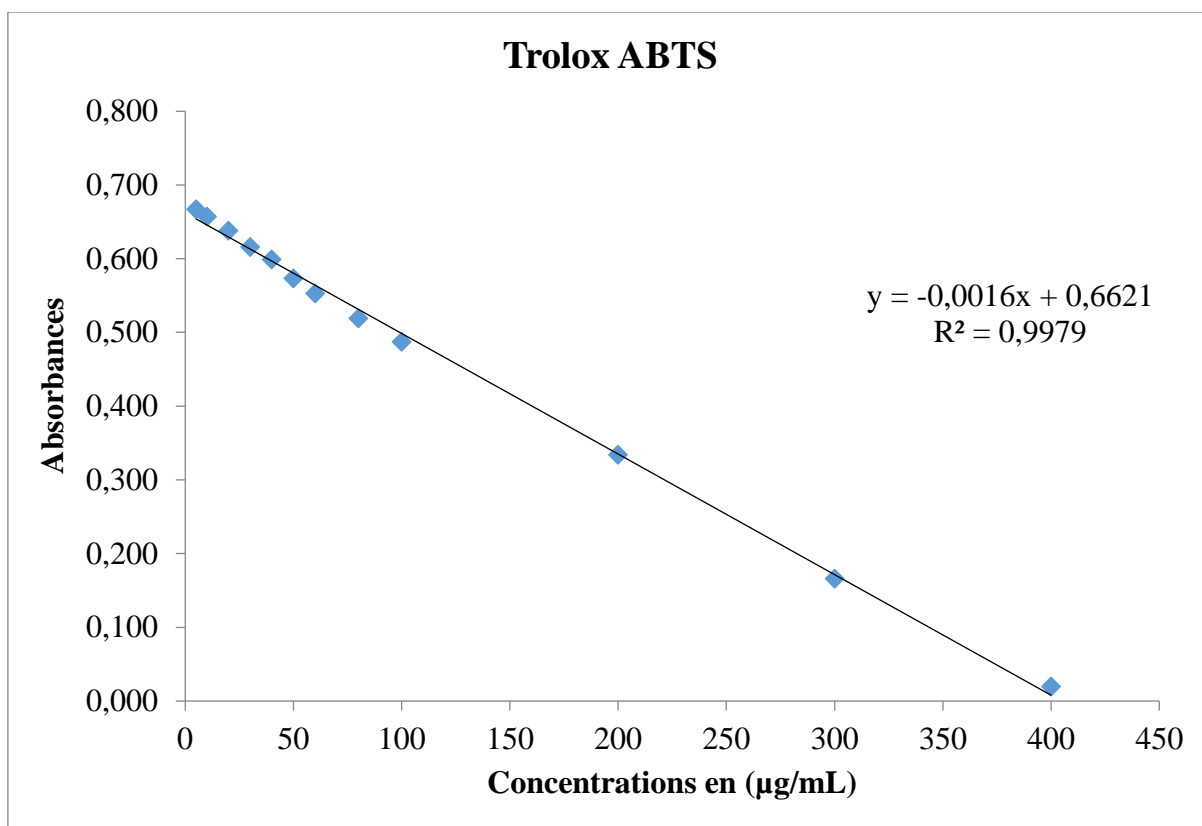
Courbe d'étalonnage de la Rutine, utilisée pour doser les flavonoïdes dans les différents extraits d'*Atractylis gummifera*

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de la Catéchine



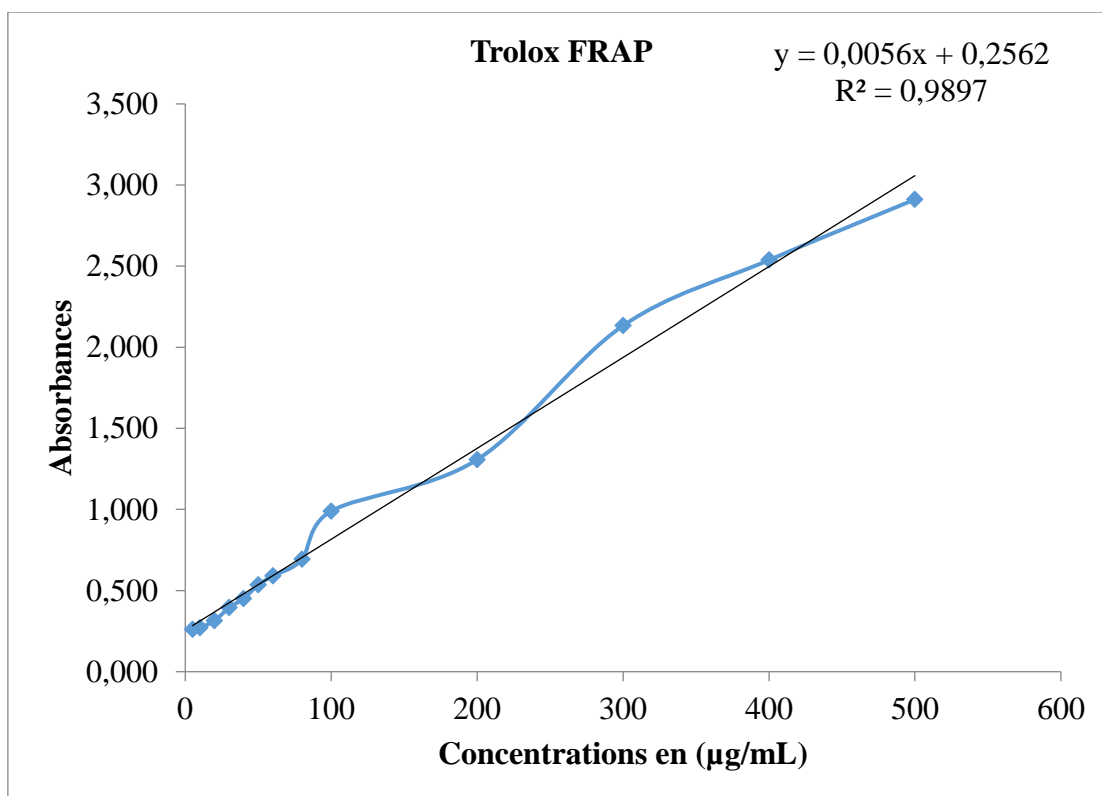
Courbe d'étalonnage de la Catéchine, utilisée pour doser les tannins catéchiqes dans les différents extraits d'*Atractylis gummifera*

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage du Trolox



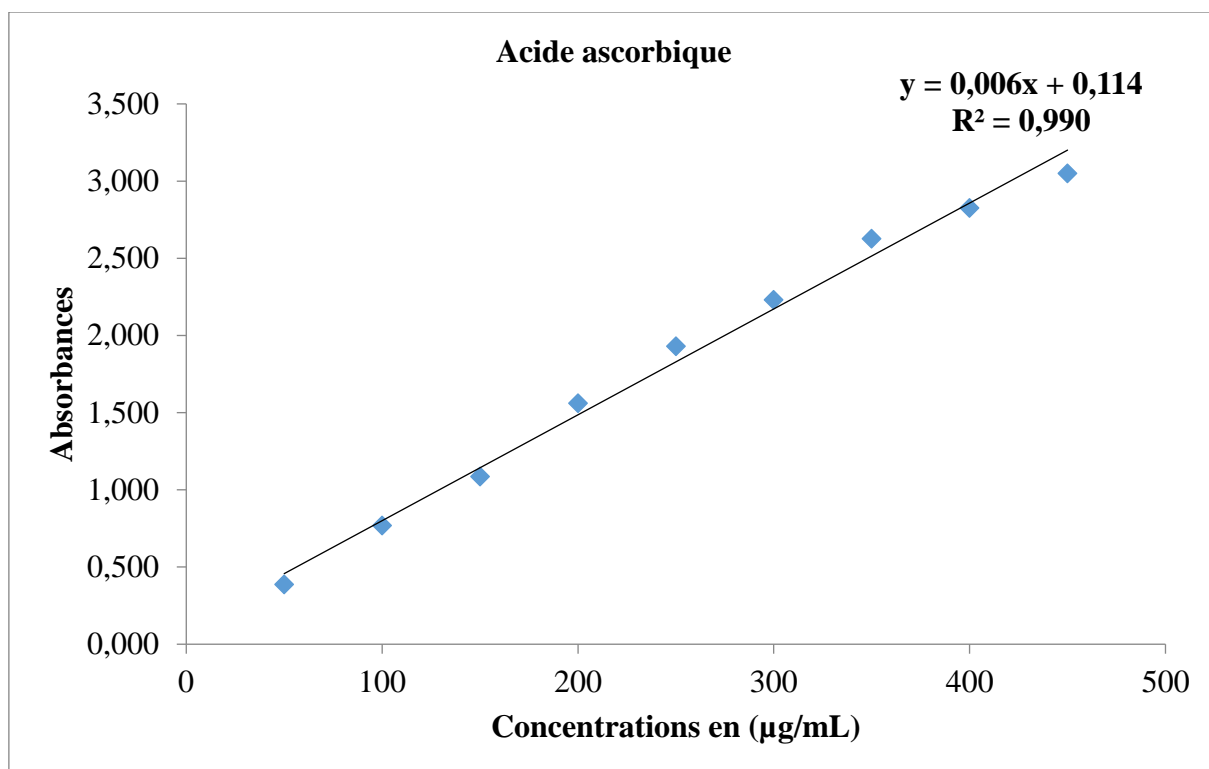
Courbe d'étalonnage du Trolox (ABTS), utilisé pour évaluer la capacité antioxydante des extraits d'*Atractylis gummifera* par le test ABTS

Annexe 5 : Courbe d'étalonnage du Trolox



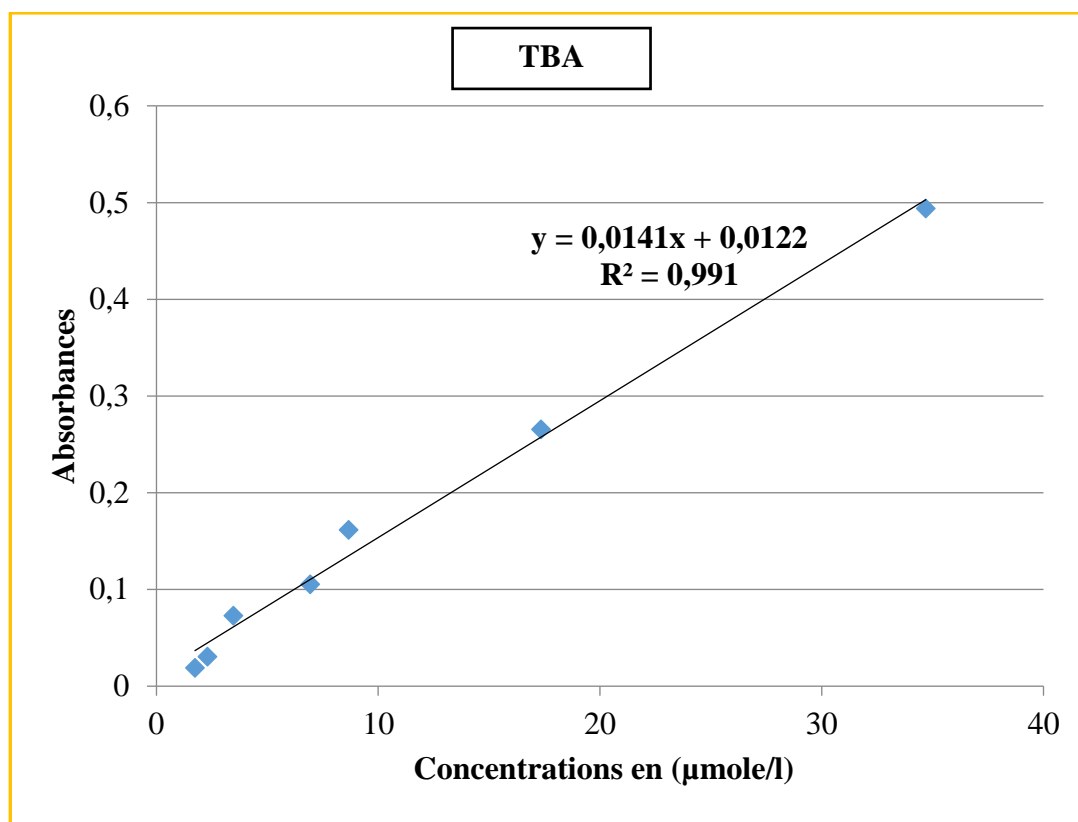
Courbe d'étalonnage du Trolox (FRAP), utilisé pour évaluer le pouvoir réducteur du fer des extraits d'*Atractylis gummifera* par le test FRAP

Annexe 6 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique



Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique (FRAP), utilisé pour évaluer le pouvoir réducteur (PR) des extraits d'*Atractylis gummifera*

Annexe 7 : Courbe d'étalonnage du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane



Courbe d'étalonnage du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane, utilisée pour le dosage de la quantité du MDA dans le foie et les reins des différents groupes de souris traitées par les macérés aqueux et méthanolique d'*Atractylis gummifera*

Annexe 8 : Production scientifique

Article 4 publié dans « Journal of Ethnopharmacology »,

IF (2019) = 3.690/ H index = 181 / Q1/ Scopus.

Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Faouzi M E A.

Publié le 03 février 2020

Phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112640>.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

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



Phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L.



Khadija Bouabid^{a,b}, Fatima Lamchouri^{a,*}, Hamid Toufik^a, My El Abbes Faouzi^b

^aLaboratory of Materials, Natural Substances, Environment and Modeling (LMSNEM), Polydisciplinary Faculty of Taza, Sidi Mohamed Ben Abdellah University of Fez, B. P.: 1223, Taza-Gare, Taza, Morocco

^bLaboratory of Pharmacology and Toxicology, Biopharmaceutical and Toxicological Analysis Research Team, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, BP 6203, Rabat-Insitantes, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

Atractylis gummifera L.
Phytochemical contents
Antioxidant activity
In vitro
In vivo

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Atractylis gummifera* is a toxic plant widely used in Mediterranean traditional medicine against colds, dizziness, and headaches, as an antisyphilitic, against boils, as a purgative, emetic and deworming. All studies reported on this plant have been carried out either on the plant and its traditional uses, or on cases of poisoning by this plant. However, few pharmacological studies have readjusted the traditional uses of this plant.

Aim of the study: The purpose of this article is to carry out a preliminary phytochemical study of *Atractylis gummifera* and to evaluate *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of its aqueous and organic extracts and to provide a complementary analysis of the mechanisms of action of the different antioxidant activity tests studied.

Methods: The phytochemical study consisted of the hot and cold preparation of aqueous extracts: (decocted, infused, macerated), organic extracts: (methanolic, methanolic macerated, chloroformic, ethyl acetate, petroleum ether) and the determination of the secondary metabolites of these extracts. In addition, the biological study consisted of evaluating antioxidant activity *in vitro* by five different methods (H_2O_2 radical reduction, DPPH, ABTS, FRAP and RP) and *in vivo* by SOD and MDA assays.

Results: The methanolic macerated is the richest in total polyphenols (102 ± 1.38 mg EAG/gE), tannins (144.09 ± 3.96 mg EC/gE) and flavonoids (17.25 ± 0.06 mg ER/gE). The same extract has the highest percentage to inhibit hydrogen peroxide ($19.24 \pm 1.10\%$) and the most potent reducing power of the ABTS radical (122.6 ± 0.63 mg ET/gE). We also noted that aqueous macerated has the most potent anti-radical activity of DPPH with an IC50 of 2.78 ± 1.03 μ g/mL, the strongest reducing power of iron 96.15 ± 1.12 mg EAA/gE and which was confirmed by the FRAP test (102.5 ± 1.66 mg ET/gE). These results are in agreement with the *in vivo* study which showed an increase in SOD secretion in diabetic mice treated with aqueous macerated extract (904.26 ± 29.10 units/g liver and 714.16 ± 24.83 units/g kidney) and methanol macerated extract (813.61 ± 24.03 units/g liver and 719.46 ± 42.10 units/g kidney) with a statistically insignificant difference between these two extracts. Furthermore, we observed a return to normal MDA levels in mice treated with aqueous macerated extract (128.61 ± 15.76 nM/g liver and 103.18 ± 12.67 nM/g kidney) and methanol macerated extract (130.73 ± 10.73 nM/g liver and 34.28 ± 5.73 nM/g kidney).

Conclusion: The aqueous and organic extracts more particularly those prepared by aqueous and methanolic

Article 3 publié dans « Plant Science Today »,

IF (2018) = 0.765 / Q4/ H index = 2/ Scopus.

Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Faouzi M E A.,

Publié le 01 octobre 2019

Inventory of poisonings and toxicological studies carried out on *Atractylis gummifera* L.: A review.

<https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.4.582>.



ISSN: 2348-1900

Plant Science Today

<http://www.plantsciencetoday.online>



Mini Review

Inventory of poisonings and toxicological studies carried out on *Atractylis gummifera* L.: A review

Khadija Bouabid^{1,2}, Fatima Lamchouri^{1*}, Hamid Toufik¹ & My El Abbes Faouzi²

¹Laboratory of Materials, Natural Substances, Environment and Modelling (LMSNEM), Polydisciplinary Faculty of Taza, Sidi Mohamed Ben Abdellah University of Fez B.P.: 1223 Taza-Gare, Taza, Morocco

²Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Pharmacokinetics Research Team, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, BP 6203, Rabat-Institutes, Rabat, Morocco

Article history

Received: 29 May 2019

Accepted: 22 June 2019

Published: 01 October 2019

Summary

Atractylis gummifera L. belongs to the family Asteraceae is widely used in traditional Moroccan medicine for its therapeutic effects (diuretic, purgative, emetic, abortive), but it causes serious and fatal poisonings, hence the objective of this work is to describe the current state of intoxication caused by *A. gummifera* in the Mediterranean and to summarize the toxicological studies carried out on this plant. The working methodology we adopted consisted in collecting data published in Arabic, French and English in specialized articles, books and on websites. Research results showed that the Centre Anti Poison and Pharmacovigilance of Morocco declared *A. gummifera* was in second place in the occurrence of poisonings in between January 1980 and December 2008. The synthesis of experimental work on plant toxicology showed that the lethal dose of *A. gummifera* varies according to the animal model used (rat or mouse), the route of administration (intraperitoneal, oral or intravenous) and the part of the plant used. The root has been found to be the most toxic part of the plant. The toxicity of *A. gummifera* is due to atractyloside and gummiferine, which are inhibitors of oxidative phosphorylation that prevent the formation of ATP from ADP in intracellular organelles. This study shows the interest in raising public awareness of the toxicity of *A. gummifera* and in rationalizing its use in traditional medicine.

Publisher

Horizon e-Publishing Group

Keywords: *Atractylis gummifera*; Intoxication; Toxicological study; Atractyloside; Carboxyatractyloside

Article 2 publié dans « Bangladesh journal of pharmacology »,

IF (2019) = 1.306 / Q3/ H index = 21 / Scopus

Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Boulfia, M., Senhaji, S., Faouzi, M. E. A.

Publié le 14 avril 2019.

***In vivo anti-diabetic effect of aqueous and methanolic macerated extracts
of *Atractylis gummifera*.***

<https://doi.org/10.3329/bjp.v14i2.38870>.

In vivo* anti-diabetic effect of aqueous and methanolic macerated extracts of *Atractylis gummifera

Khadija Bouabid^{1, 2}, Fatima Lamchouri¹, Hamid Toufik¹, Mohamed Boulfia¹, Souad Senhaji¹ and My El Abbes Faouzi²

¹Laboratory of Materials, Natural Substances, Environment and Modeling, Polydisciplinary Faculty of Taza, Sidi Mohamed Ben Abdellah University of Fez B. P., 1223 Taza-Gare, Taza, Morocco; ²Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Pharmacokinetics Research Team, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, BP 6203, Rabat-Institutes, Rabat, Morocco.

Article Info

Received: 17 November 2018
Accepted: 1 March 2019
Available Online: 14 April 2019
DOI: 10.3329/bjp.v14i2.38870

Cite this article:

Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Boulfia M, Senhaji S, Faouzi MEA. *In vivo* anti-diabetic effect of aqueous and methanolic macerated extracts of *Atractylis gummifera*. Bangladesh J Pharmacol. 2019; 14: 67-73.

Abstract

The anti-diabetic effect of *Atractylis gummifera* (plant used in traditional Moroccan medicine) has been evaluated in type 2 diabetic mice model. The mice were divided into five groups: Normal control, diabetic control, diabetic treated with aqueous macerate (500 mg/kg), diabetic treated with methanol macerate (500 mg/kg) and diabetic treated with metformin (300 mg/kg). The treatment of the mice was performed by daily gastric gavage for 5 weeks. The monitoring of the mice was carried out weekly by fasting glucose and measurement of biochemical parameters at the end of treatment. The aqueous macerate of *A. gummifera* was most effective that reduced the fasting blood glucose with 62.7%. In addition, this extract restored the biochemical parameters of diabetic mice to normal.

Introduction

Diabetes is a chronic disease characterized by insulin deficiency or resistance (OMS, 1999). The treatment of diabetes depends on its typology. Type 1 diabetes is treated with insulin therapy, as for type 2 diabetes, which in addition to diet and lifestyle changes, is treated with oral anti-diabetic agents that have a

diabetes (Bellakhdar et al., 1991). The results of these surveys have revealed a very long list of medicinal plants used in the treatment of type 2 diabetes. To confirm or refute this use, we have opted for a plant which is widely used in traditional Moroccan medicine for the treatment of several diseases such as epilepsy, psoriasis, ulcers and hemorrhage (Hammich et al., 2013; Bnouham et al., 2006). It is named *Atractylis gummifera*

Article 1 publié dans « Plant Science Today »,

IF (2018) = 0.765 / Q4/ H index = 2/ Scopus

**Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Sayah, K., Cherrah, Y., Faouzi, M. E.
A.**

Publié le 17 juillet 2018

**Phytochemical screening and *in vitro* evaluation of alpha amylase, alpha
glucosidase and beta galactosidase inhibition by aqueous and organic
Atractylis gummifera L. extracts.**

<https://doi.org/10.14719/pst.2018.5.3.393>



ISSN: 2348-1900

Plant Science Today

<http://www.plantsciencetoday.online>



Research Article

Phytochemical screening and *in vitro* evaluation of alpha amylase, alpha glucosidase and beta galactosidase inhibition by aqueous and organic *Atractylis gummifera* L. extracts

Khadija Bouabid^{a,b}, Fatima Lamchouri^{a*}, Hamid Toufik^a, Karima Sayah^b, Yahia Cherrah^b, My El Abbas Faouzi^b

^a Laboratory of Materials, Natural Substances, Environment and Modeling (LMSNEM), Polydisciplinary Faculty of Taza, Sidi Mohamed Ben Abdellah University of Fez B.P.: 1223, Taza-Gare, Taza, Morocco

^b Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Pharmacokinetics Research Team, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, BP 6203, Rabat-Institutes, Rabat, Morocco

Article history

Received: 30 March 2018

Accepted: 02 June 2018

Published: 17 July 2018

Copyright

© Bouabid et al (2018). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Editor

K K Sabu, Jawaharlal Nehru Tropical Botanic Garden and Research Institute, India

Publisher

Horizon e-Publishing Group

Abstract

Diabetes is a chronic condition which is increasingly progressing throughout the world. To treat it, several methods are used, among which is medicinal plants that still have an unknown mechanism of action. The objective of this work is to evaluate the *in vitro* hypoglycemic effect of the extracts of the underground part of *Atractylis gummifera*, a member of Asteraceae used in traditional Moroccan medicine. A phytochemical study of the aqueous extracts (decocted, infused and macerated) and organic extracts (methanol, methanol macerate, chloroformic, ethyl acetate and petroleum ether), and a phytochemical screening of the different secondary metabolites was done. The antidiabetic power of the extracts of *A. gummifera* by testing the inhibitory activity of α -amylase, α -glucosidase and β -galactosidase, which are enzymes responsible for the digestion of polysaccharides was determined. The extracts of *A. gummifera* are very rich in flavonoids and tannins, and are inhibitory to α -amylase and α -glucosidase, mainly the macerate of methanol with IC_{50} values of 0.557 ± 0.013 and 0.743 ± 0.017 mg / mL respectively. Higher β -galactosidase inhibitory potential than quercetin was observed for aqueous macerates and methanol with IC_{50} values of 2.23 ± 0.012 and 2.443 ± 0.071 mg / mL respectively. The extracts of *A. gummifera* possess a significant inhibitory activity of the alpha amylase and alpha glucosidase and beta-galactosidase enzymes, in particular the macerate of methanol followed by the aqueous macerate, among the eight extracts tested.

Keywords: Diabetes; *Atractylis gummifera*; phytochemical study; α -amylase; α -glucosidase; β -galactosidase

Citation

Résumé :

Atractylis gummifera L. est une plante toxique que nous avons valorisée par la réalisation d'une étude phytochimique et par l'évaluation des activités antidiabétique et antioxydante *in vitro* et *in vivo*.

L'étude phytochimique a consisté, en la préparation à chaud et à froid d'extraits aqueux : (décocté, infusé et macéré) et organiques (méthanolique, macéré méthanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et éther de pétrole), ensuite un criblage phytochimique des métabolites secondaires (flavonoïdes, tanins, saponines, quinones, anthraquinones, anthracenosides, alcaloïdes et stérols) a été réalisé suivi par le dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins. L'étude biologique a consisté d'une part, en une évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* par l'inhibition des enzymes α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase et une évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* par cinq méthodes: le piégeage du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'activité antiradicalaire du DPPH, la capacité inhibitrice du radical ABTS, le test FRAP et le pouvoir réducteur de fer (PR) et d'autre part, en des études *in vivo* qui ont été réalisées sur un modèle de souris Swiss Albinos, traitées par les macérés aqueux et méthanolique. L'évaluation de l'activité antidiabétique *in vivo* a été réalisée par le suivi du poids corporel et des paramètres biochimique (glycémie, protéines totaux, urée, créatinine, cholestérol, triglycérides, transaminase ALAT et ASAT) et l'étude de l'activité antioxydante *in vivo* a été évaluée par le dosage de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) et du malondialdéhyde (MDA). Les résultats de l'étude phytochimique ont montré que le meilleur rendement d'extraction est obtenu à chaud et par les solvants les plus polaires. Le criblage phytochimique, a montré que la plante est riche en métabolites secondaires, ce qui a été confirmé par le dosage phytochimique qui a montré que les huit extraits sont riches en polyphénols, flavonoïdes et tanins. L'étude biologique a montré que les extraits d'*A. gummifera* possèdent en générale un pouvoir inhibiteur de l' α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase et principalement, les macérés méthanolique et aqueux. Ces extraits ont été aussi les meilleurs à inhiber le H_2O_2 , l'ABTS et le DPPH et à réduire le fer par les tests FRAP et PR. La pertinence des macérés aqueux et méthanolique démontrée via les tests *in vitro* nous a bio guidé vers le choix de l'exploitation de ces deux extraits pour l'étude *in vivo*, qui a commencé par l'évaluation de leurs toxicités aiguës et par la suite la détermination de la dose thérapeutique (500 mg/kg). L'évaluation de l'activité antidiabétique *in vivo* des macérés aqueux et méthanolique a montré que le macéré aqueux d'*A. gummifera* a provoqué la diminution de la glycémie, mieux que le macéré méthanolique et la Metformine. De plus, nous avons remarqué que le macéré aqueux a rétabli les paramètres biochimiques des souris diabétiques à la normale. Ces résultats sont en accord avec l'étude de l'activité antioxydante *in vivo*, qui a montré une augmentation de la sécrétion de SOD chez les souris diabétiques traitées par les macérés aqueux et méthanolique et un retour à la normale de taux du MDA chez les souris traitées par les deux macérés aqueux et méthanolique.

Mots clés : *Atractylis gummifera* ; Diabète sucré ; Stress oxydant ; Etude phytochimique ; Activité antidiabétique ; Activité antioxydante ; *In vitro* ; *In vivo*.

Abstract:

Atractylis gummifera L. is a toxic plant that we have enhanced by carrying out a phytochemical study and by evaluating its *in vitro* and *in vivo* antidiabetic and antioxidant activities.

The phytochemical study consisted in the hot and cold preparation of aqueous extracts: (decocted, infused and macerated) and organic (methanolic, methanolic macerated, chloroformic, ethyl acetate and petroleum ether), then a phytochemical screening of secondary metabolites (flavonoids, tannins, saponins, quinones, anthraquinones, anthracenosides, alkaloids and sterols) was performed followed by the dosing of polyphenols, flavonoids and tannins. The biological study consisted on the one hand of an evaluation of the *in vitro* antidiabetic activity by the inhibition of the enzymes α -amylase, α -glucosidase and β -galactosidase and on the other hand an evaluation of the *in vitro* antioxidant activity by five methods : hydrogen peroxide H_2O_2 scavenging, DPPH antiradical activity, ABTS radical inhibitory capacity, FRAP assay and iron (PR) and other part reducing capacity in *in vivo* studies which were performed on a Swiss Albino mouse model treated with aqueous and methanolic macerated. The evaluation of the *in vivo* antidiabetic activity was performed by monitoring body weight and biochemical parameters (glycemia, total protein, urea, creatinine, cholesterol, triglycerides, ALAT and ASAT transaminase) and the study of the *in vivo* antioxidant activity was evaluated by measuring the superoxide dismutase (SOD) enzyme and malondialdehyde (MDA). The results of the phytochemical study showed that the best extraction yield is obtained when hot and with the most polar solvents. The phytochemical screening showed that the plant is rich in secondary metabolites, which was confirmed by the phytochemical assay which showed that the eight extracts are rich in polyphenols, flavonoids and tannins. The biological study showed that the extracts of *A. gummifera* have an inhibitory power of α -amylase, α -glucosidase and β -galactosidase mainly, the methanolic and aqueous macerated. These extracts were also the best at inhibiting H_2O_2 , ABTS and DPPH and at reducing iron in the FRAP and PR tests. The relevance of the aqueous and methanolic macerated demonstrated by the *in vitro* tests guided us in the choice of the use of these two extracts for the *in vivo* study which started with the evaluation of their acute toxicity and then the determination of the therapeutic dose (500 mg/kg). The evaluation of the *in vivo* antidiabetic activity of the aqueous and methanolic macerate showed that the aqueous macerated of *A. gummifera* induced the decrease in blood glucose better than the methanolic macerated and Metformin. In addition, we found that the aqueous macerated restored the biochemical parameters of the diabetic mice to normal. These results are consistent with the study of *in vivo* antioxidant activity which showed an increase in SOD secretion in diabetic mice treated with both aqueous and methanolic macerate and a return to normal MDA levels in mice treated with both aqueous and methanolic macerated.

Keywords: *Atractylis gummifera*; Diabetes mellitus; Oxidative stress; Phytochemical study; Antidiabetic activity; Antioxidant activity; *In vitro*; *In vivo*.

Structures de recherche : Equipe de Recherche des Analyses Biopharmaceutiques et Toxicologiques / Laboratoire Substances Naturelles, Pharmacologie, Environnement, Modélisation, Santé & Qualité de Vie (SNAMOPEQ).