



UNIVERSITÉ MOHAMMED V
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
RABAT



ANNEE: 2022

THESE N°: 04/22 CSVS

CENTRE D'ÉTUDES DOCTORALES DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THESE
En vue de l'obtention du
DOCTORAT

Présentée par

Mr. Saad FETTACH

FORMATION DOCTORALE : Sciences du Médicament
Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie

**Evaluation pharmacologique et toxicologique des dérivés de la
thiazolidine-2,4-dione :
impact sur le métabolisme des glucides et lipides**

Soutenue publiquement le 04/07/2022 avec la présence du jury

Pr. Yahia CHERRAH	Université Mohammed V, Rabat-FMPR	Président
Pr. Mourad ERRASFA	Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès-USMBA	Rapporteur
Pr. Hicham BELLAOUI	Université Mohammed V, Rabat-FSR	Rapporteur
Pr. M'Hammed ANSAR	Université Mohammed V, Rabat-FMPR	Rapporteur
Pr. Bouchra BENZAOUZ	Université Ibn Tofail, Kenitra. FSK	Examinatrice
Pr. Khalid BOUGRIN	Université Mohammed V, Rabat-FSR	Examineur
Dr. Hassan SEFRIOUI	Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and Research (MAScIR)	Co-directeur de thèse
Pr. My El Abbas FAOUZI	Université Mohammed V, Rabat-FMPR	Directeur de thèse



UNIVERSITÉ MOHAMMED V
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
RABAT



ANNEE: 2022

THESE N°: 04/22 CSVS

CENTRE D'ÉTUDES DOCTORALES DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THESE
En vue de l'obtention du
DOCTORAT

Présentée par

Mr. Saad FETTACH

FORMATION DOCTORALE : Sciences du Médicament
Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie

**Evaluation pharmacologique et toxicologique des dérivés de la
thiazolidine-2,4-dione :
impact sur le métabolisme des glucides et lipides**

Soutenue publiquement le 04/07/2022 avec la présence du jury

Pr. Yahia CHERRAH	Université Mohammed V, Rabat-FMPR	Président
Pr. Mourad ERRASFA	Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès-USMBA	Rapporteur
Pr. Hicham BELLAOUI	Université Mohammed V, Rabat-FSR	Rapporteur
Pr. M'Hammed ANSAR	Université Mohammed V, Rabat-FMPR	Rapporteur
Pr. Bouchra BENZAOUZ	Université Ibn Tofail, Kenitra. FSK	Examinatrice
Pr. Khalid BOUGRIN	Université Mohammed V, Rabat-FSR	Examineur
Dr. Hassan SEFRIOUI	Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and Research (MAScIR)	Co-directeur de thèse
Pr. My El Abbas FAOUZI	Université Mohammed V, Rabat-FMPR	Directeur de thèse

Dédicaces

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Ce qui sont les plus chers au monde, mes parents

A ma mère et mon père, Merci pour votre soutien et votre réconfort pendant toutes ces années d'études, Ceci est l'aboutissement de vos efforts et sacrifices tout au long de ces nombreuses années.

Chères mère, père, ce travail est le fruit de vos efforts,

A mon petit frère Issam, Merci de m'avoir soutenu durant tout ce temps. J'ai toujours pu compter sur toi quel que soit le moment, que dieu vous garde.

Saad

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie dirigé par Professeur *Yahia CHERRAH*, Equipe de Recherche des analyses Biopharmaceutiques et Toxicologiques (ERABPT) à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat sous l'encadrement et la direction du Professeur *Moulay El Abbes FAOUZI*. Cette thèse était codirigée par Docteur *Hassan SEFRIOUI*, Directeur du Centre de Biotechnologie médicale à la fondation MAScIR. Rabat (Moroccan Foundation for Advanced Science Innovation and Research)

J'exprime ma très vive reconnaissance au Pr. *Moulay El Abbes FAOUZI*, professeur à Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, qui a dirigé, orienté et encadrer ce travail avec une grande compétence et implication tout au long de mon parcours de thèse. Sa grande disponibilité, sa rigueur et dynamique scientifique et son soutien m'ont incité et motivé à aller toujours de l'avant. Son encadrement nous a permis d'accomplir les objectifs de ce travail, permettant par ceci la mise en place d'un produit scientifique original qui enrichi les avancements récents dans le domaine de la chimie médicinale. Pour vous, professeur, j'exprime mes vifs remerciements.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude au Docteur *Hassan SEFRIOUI*, pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Biotechnologie médicale (MAScIR) et pour son suivie tout au long de ce travail. Par son enthousiasme, et ses qualités humaines, j'ai développé de compétence professionnels dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire, ainsi que des compétences dans la gestion des projets scientifiques. Vous trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance, Monsieur.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur *Yahia CHERRAH*, directeur du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il me fait le grand honneur à présider mon jury de thèse.

Mes remerciements vont aussi au Professeur *Mourad ER-RASFA*, professeur à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et de Médecine Dentaire de Fès, votre acceptation de l'invitation pour juger ce travail est un grand honneur pour moi, Professeur, malgré le long déplacement et les désagréments engendrés.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur *Hicham BELLAOUI*, professeur à la Faculté des sciences de Rabat, d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis particulièrement touché du temps que vous m'avez accordé, Professeur, c'est un honneur.

Mes remerciements vont également à notre Professeur *M'Hammed ANSAR*, à Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour accepter de rapporter ce travail. Vous trouverez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont ensuite à nos examinateurs, Madame la Professeur *Bouchra BENZAOUZ* de la faculté des sciences, Kenitra, j'ai l'honneur de vous revoir professeur, cette fois autant qu'examineur de notre travail de thèse.

Mes remerciements vont aussi au Professeur *Khalid BOUGRIN* de la faculté des sciences, Rabat. Je vous remercie Professeur, pour votre gentillesse d'abord et compréhension, et aussi l'honneur que vous nous a accordés en acceptant d'évaluer ce travail et d'être parmi le jury de cette thèse.

J'adresse à cette occasion mes remerciements à l'équipe de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique de la faculté des sciences de Rabat, pour leurs collaborations, et le travail précieux dans la synthèse innovante des molécules à effet thérapeutique, dont une série des dérivés de la famille des 2,4-thiazolidinediones fait l'objet de cette investigation pharmacologique et toxicologique. Je remercie par cela les efforts de Mlle. *Fatima Zahra THARI*.

J'adresse ma profonde reconnaissance et remerciement au Professeur *Khalid KARROUCHI*, professeur au laboratoire de Chimie analytique et de bromatologie à Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, je tiens à le remercier bien chaleureusement pour sa précieuse collaboration à la réalisation et le suivi de ce travail.

L'aboutissement de cette thèse a été aussi supporté par les discussions multidisciplinaires des collègues du domaine de la pharmacologie, la chimie thérapeutique et la bio-informatique. Je les remercie de leur contribution de près ou de loin à l'élaboration et l'aboutissement de ce travail.

Liste des publications

Fettach, Saad, Thari, Fatima Zahra et al. Pharmacological properties of novel thiazolidine-2,4-dione derivatives on chronic hyperglycemia and oxidative stress (HFD-STZ diabetic animal model). Journal of ..., 2022, (En cours de soumission)

Thari, Fatima Zahra¹, **Fettach, Saad**¹, et al. Synthesis, crystal structures, α -glucosidase and α -amylase inhibition, DFT and molecular docking investigations of two thiazolidine-2, 4-dione derivatives. Journal of Molecular Structure, 2022, p. 132960.

Fettach, Saad, Thari, Fatima Zahra, et al. Biological, toxicological and molecular docking evaluations of isoxazoline-thiazolidine-2, 4-dione analogues as new class of anti-hyperglycemic agents. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021, p. 1-13.

Fettach, Saad, Thari, Fatima Zahra, et al. Synthesis, α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities, acute toxicity and molecular docking studies of thiazolidine-2, 4-diones derivatives. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021, p. 1-12.

Autres productions scientifiques

Karrouchi, Khalid, **Fettach, Saad**, et al. Synthesis, Spectroscopic Characterization, DFT, Molecular Docking and Antidiabetic Activity of N-Isonicotinoyl Arylaldehyde Hydrazones. Polycyclic Aromatic Compounds, 2022, p. 1-13.

Karrouchi, Khalid., **Fettach, Saad**, et al. Synthesis, crystal structure, spectroscopic characterization, α -glucosidase inhibition and computational studies of (E)-5-methyl-N'-(pyridin-2-ylmethylene)-1H-pyrazole-3-carbohydrazide. Journal of Molecular Structure, 2022, 1248, 131506.

Karrouchi, Khalid, **Fettach, Saad**, et al. Synthesis, crystal structure, spectroscopic characterization, α -glucosidase inhibition and computational studies of (E)-5-methyl-N'-(pyridin-2-ylmethylene)-1H-pyrazole-3-carbohydrazide. Journal of Molecular Structure, 2022, vol. 1248, p. 131506.

Karrouchi, Khalid, **Fettach, Saad**, et al. Synthesis, crystal structure, DFT, α -glucosidase and α -amylase inhibition and molecular docking studies of (E)-N'-(4-chlorobenzylidene)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carbohydrazide. Journal of Molecular Structure, 2021, vol. 1245, p. 131067.

Karrouchi, Khalid, **Fettach, Saad**, et al. Synthesis, crystal structure, hirshfeld surface analysis, DFT calculations, anti-diabetic activity and molecular docking studies of (E)-N'-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene) isonicotinohydrazide. Journal of Molecular Structure, 2020, vol. 1221, p. 128800.

Chkirate, Karim, **Fettach, Saad**, et al. Solvent induced supramolecular polymorphism in Cu (II) coordination complex built from 1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidine: crystal structures and anti-oxidant activity. Journal of Inorganic Biochemistry, 2020, vol. 208, p. 111092.

Fettach, Saad, Mrabti H Naceiri, et al. Phenolic content, acute toxicity of *Ajuga iva* extracts and assessment of their antioxidant and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects. South African Journal of Botany, 2019, vol. 125, p. 381-385.

Karim Chkirate, **Fettach, Saad**, et al, Novel Co(II) and Cu(II) coordination complexes constructed from pyrazole-acetamide: Effect of hydrogen bonding on the self assembly process and antioxidant activity. Journal of Inorganic Biochemistry 2019; 191., DOI:10.1016/j.jinorgbio.2018.11.006

Karrouchi, Khalid, **Fettach, Saad**, et al. Synthesis, characterization, free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of novel series of hydrazone, 1, 3, 4-oxadiazole and 1, 2, 4-triazole derived from 3, 5-dimethyl-1H-pyrazole. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2019, vol. 16, no 7, p. 712-720.

Pillai, Renjith Raveendran, **Fettach, Saad**, et al. Synthesis, spectroscopic characterization, reactive properties by DFT calculations, molecular dynamics simulations and biological evaluation of Schiff bases tethered 1, 2, 4-triazole and pyrazole rings. *Journal of Molecular Structure*, 2019, vol. 1177, p. 47-54.

Liste des communication et participation scientifiques

Communication orale: *Anti-lipidememic activity of 5-benzylidene-2,4 thiazolidinediones derivatives*; 17ème EDITION OFFICINE EXPO2019, UM6SS Casablanca; 01-02 Mars 2021.

Communication affiché: *Pouvoir anti-hyperglycémique in vitro et in silico des dérivés de molécules 5-benzylidene-2,4 thiazolidinediones* ; 5ème FORUM AFRICAÏN DE LA SANTE, Abulcasis International University of Health Sciences; 14 June 2019

Communication orale: *Evaluation of Anticancer activity of Thiazolidinediones derivatives against 4 Cancer Cell lines*; LA R&D EN BIOTECHNOLOGIE MEDICALE AU SERVICE DE LA SANTE AU MAROC, Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and Research in collaboration with Mohammed VI Polytechnic University; 24 April 2019.

Communication affichée: *Evaluation of Antioxidant and antihyperglycemic potency of ajuga iva and chenopodium ambrosioides*, the “1er Rencontres Médicales et Scientifiques”, Abulcasis International University of Health Sciences. 11 May 2018

Communication affichée: *Evaluation of Anti-hyperglycemic activity of 5-benzylidene-2,4 thiazolidinediones derivatives*; 17ème EDITION OFFICINE EXPO2019, Mohammed VI University of Health Sciences; 01-02 Mars 2019.

Communication affichée: *Evaluation of Anti-hyperglycemic activity of 5-benzylidene-2,4 thiazolidinediones derivatives*; 17ème EDITION OFFICINE EXPO2019, Mohammed VI University of Health Sciences; 01-02 Mars 2019 (Prix meilleur communication).

Listes des tableaux

- Tableau 1** Inhibition de l'enzyme α -glucosidase et α -amylase des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c**
- Tableau 2** Energies de liaison, nombre de liaisons hydrogène et interaction hydrophobe des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et le médicament de référence dans les sites de liaison actif des enzyme l' α - amylase et de l' α glucosidase
- Tableau 3** Effets des dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione sur la variation du poids corporel de souris suisses à une dose de 2000 mg/kg.
- Tableau 4** Effet des Thiazolidine-2,4-dione isoxazolines **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur la tolérance postprandiale au glucose dans les groupes expérimentaux de rats normaux à 0, 30, 60, 90 et 120 min.
- Tableau 5** Effets du traitement par des dérivés de **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur l'évolution du poids corporel
- Tableau 6** Effets du traitement par des dérivés de **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur l'évolution de la glycémie à jeun (FBG).
- Tableau 7** Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dione sur le profil lipidique sérique chez des souris diabétiques (model HFD/STZ)
- Tableau 8** Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur la variation des marqueurs de lésions hépatique par rapport aux souris diabétiques (model HFD/STZ)
- Tableau 9** Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur la variation des marqueurs de lésions rénales par rapport aux souris diabétiques (model HFD/STZ)
- Tableau 10** Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur la variation des paramètres hématologique par rapport aux souris diabétiques (model HFD/STZ)
- Tableau 11** Effets de la thiazolidine-2,4-dione sur différents marqueurs antioxydant (MDA), pancréatiques, rénale et hépatiques chez les souris diabétiques traités **3d;3e;4d;4e;5b;5c**.
- Tableau 12** Effets de la thiazolidine-2,4-dione sur différents marqueurs antioxydant (SOD), pancréatiques, rénale et hépatiques chez les souris diabétiques traités **3d;3e;4d;4e;5b;5c**.
- Tableau 13** Effets de la thiazolidine-2,4-dione sur différents marqueurs antioxydant (CAT), pancréatiques, rénale et hépatiques chez les souris diabétiques traités **3d;3e;4d;4e;5b;5c**.

Annexe

- Tableau A1** Synthèse des dérivés de 5-arylidènthiazolidine-2,4-dione (**3a-3e**)
- Tableau A2** Caractéristiques spectrales des dérivés de 5-arylidènthiazolidine-2,4-dione (**3a-3e**)
- Tableau A3** Synthèse des dérivés de 5-arylidènthiazolidine-2,4-dione (**4a-4e**)
- Tableau A4** Caractéristiques spectrales des dérivés de 5-arylidènthiazolidine-2,4-dione (**4a-3e**)
- Tableau A5** Synthèse des dérivés de 5-(arylidène)-3-((3-(aryl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)méthylthiazolidine-2,4-dione (**5a-5c**)
- Tableau A6** Caractéristiques spectrales des dérivés de 5-(arylidène)-3-((3-(aryl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)méthylthiazolidine-2,4-dione (**5a-5c**)

Liste des figures

- Figure 1** Quelques Structures chimiques des thiazolidinediones (TZD)
- Figure 2** TZDs issues d'une dérivation du clofibrate
- Figure 3** Structures chimique du Ragaglitazar et de la Balaglitazone
- Figure 4** Mécanismes moléculaires des réactions biologiques des thiazolidinediones
- Figure 5** Série des molécules synthétisées de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c**
- Figure 6** Comparaison de l'activité inhibitrice des α -glucosidases et α -amylase des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c**
- Figure 7** Alignement des séquences 1D et **3d** de (a) l' α -amylase et (b) l' α -glucosidase avec le modèle sélectif (PDB:1UA3) et (PDB:3AXH).
- Figure 8** Structures superposées de (a) α -amylase et (b) α -glucosidase avec le model sélectif (couleur jaune) (PDB:1UA3) et (PDB:3AXH).
- Figure 9** Graphique de Ramachandran et statistiques des protéines α -amylase et α -glucosidase prédites.
- Figure 10** Z-score de ProSA du modèle prédit de la protéine α -amylase et α -glucosidase
- Figure 11** Tracés d'énergie du modèle prédit de la protéine α -amylase et α -glucosidase
- Figure 12** Vérification-3D du modèle prédit de la protéine α -amylase et α -glucosidase
- Figure 13** Interaction ligand-récepteur pour le ligand (a = **3b**, b = **4a**) qui présente le plus d'interactions hydrogène pour l'enzyme cible α -amylase modélisée par homologie
- Figure 14** Interactions tridimensionnelles (**3d**) et bidimensionnelles (2D) les plus étroites entre les résidus du site actif de la protéine α -amylase modélisée par homologie avec **5a**, **5b** et **5c**
- Figure 15** Interaction ligand-récepteur pour le ligand (a = **3b**, b = **3d**) qui présente le plus d'interactions hydrogène pour l'enzyme cible α -glucosidase modélisée par homologie
- Figure 16** Interactions tridimensionnelles (**3d**) et bidimensionnelles (2D) les plus étroites entre les résidus du site actif de la protéine α -glucosidase modélisée par homologie avec **5a**, **5b** et **5c**
- Figure 17** Évaluation de la cytotoxicité par le test MTT sur des cellules HepG2 après l'exposition à différentes concentrations des dérivés de Thiazolidine-2,4-dione
- Figure 18** Test de la tolérance à l'hyperglycémie et aire sous la courbe (AUC).
- Figure 19** Evolution du poids corporel des souris diabétiques HFD-STZ vs souris normales
- Figure 20** Evolution la glycémie à jeun (FBG) des souris diabétiques HFD-STZ vs souris normales.
- Figure 21** Evolution la glycémie à jeun (FBG) des souris diabétiques HFD-STZ traités par les dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone
- Figure 22** Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur le profil lipidique sérique par rapport au souris diabétique.

- Figure 23** Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur la variation des marqueurs hépatique par rapport au souris diabétique.
- Figure 24** Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur la variation des marqueurs rénaux par rapport au souris diabétique.
- Figure 25** Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur la variation des paramètres hématologiques (GR et GB) par rapport au souris diabétique.
- Figure 26** Effets sur l'histologie du foie de souris diabétiques induits par HFD/STZ colorées avec HE (×200)
- Figure 27** Effets sur l'histologie des reins de souris diabétiques induits par HFD/STZ colorées avec HE (×200).
- Figure 28** Effets sur l'histologie du pancréas de souris diabétiques induits par HFD/STZ colorées avec HE (×400).

Liste des schémas

- Schéma 1** Synthèse de la thiazolidine-2,4-dione en utilisant la thiourée et l'acide chloroacétique.
- Schéma 2** Synthèse de la thiazolidine-2,4-dione en utilisant le chloroacétate d'éthyle et le thiocyanate de potassium.
- Schéma 3** Synthèse de la thiazolidine-2,4-dione 3-substituée
- Schéma 4** Synthèse de dialkyl thiazolidinones à l'aide d'acide bromoacétique ou de chlorure de bromoacétyle substitué
- Schéma 5** Synthèse de dialkyl thiazolidinones à l'aide d'acide bromoacétique ou de chlorure de bromoacétyle substitué
- Schéma 6** Approche générale pour la synthèse des glitazones

Annexe

- Schéma A1** Voie de synthèse pour la préparation des composés **3a** à **3e** et **4a** à **4e**
- Schéma A2** Synthèse des isoxazolines **5a-c** à partir de l'oxyde d'arylnitrile et de **4a-e**

Liste des abréviations

A1C/HbA1c	Hémoglobine glyquée	LDL	Lipoprotéine de basse densité
ADN :	Acide désoxyribonucléique	MCH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
ADOPT	Essai sur la progression des résultats du diabète	MCHC	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
ALR2	Aldose Réductase 2	MCV	Volume globulaire moyen
ALT	Alanine aminotransférase	MDA	Malondialdéhyde
ALX	Alloxane	MS	Spectroscopie de masse
AMP	Adénosine monophosphate	MCHC	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
AST	Aspartate aminotransférase	MCV	Volume globulaire moyen
AUC	Aire sous la courbe	MDA	Malondialdéhyde
CAT	Catalase	MS	Spectroscopie de masse
CCM	Chromatographie sur couche mince	NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
CI ₅₀	Concentration inhibitrice médiane	NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Covid19	Coronavirus 2019	NBT	Nitroblue tétrazolium
DL ₅₀	Dose létale médiane	OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
DMSO	Diméthylsulfoxyde	OMS	Organisation Mondiale de la santé
DT2	Diabète type 2	OSTT	Tests de tolérance orale à l'amidon
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique	PBS	Tampon phosphate salin
ESI	Ionisation par électronébuliseur	PDB	Banque de données sur les protéines
FDA	Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments	PPAR	Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes
GB	Leucocyte	PTP1B	Tyrosine-protéine phosphatase non-récepteur de type 1
GPR40	Récepteur 1 des acides gras libres	RMN	Résonance magnétique nucléaire
GR	Érythrocyte	ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique	RXR	Récepteur X de rétinoïde
HCL	Chlorure d'hydrogène	SNC	Système nerveux central
HCT	Hématocrite	SOD	Superoxydes dismutases
HDL	Lipoprotéine de haute densité	STZ	Streptozotocine
HepG2	lignée cellulaire de cancer du foie humain	TBARS	Substances réactives de l'acide thiobarbiturique
HFD	Régime hypercalorique	TC	Cholestérol totaux
HGB	Hémoglobine	TG	Triglycérides
IL1	Interleukine-1	TMS	Tétraméthylsilane
IL6	Interleukine-6	TNF α	Facteurs de nécrose tumorale
IR	Infrarouge	TZD	Thiazolidinedione
IRS	Substrat récepteur de l'insuline	UV	Ultraviolet
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée	pNPG	4-nitrophenyl alpha-D-glucoside

Résumé

Titre : Evaluation pharmacologique et toxicologique des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione : impact sur le métabolisme des glucides et lipides.

Auteur : Saad Fettach

Les thiazolidinediones sont des agents introduit dans le traitement du diabète sucré de type 2 depuis la fin des années 1990, influençant favorablement la sensibilité à l'insuline et aussi la fonction des cellules β pancréatiques, par la fixation au récepteur nucléaire PPAR γ et l'activation de la transcription de gènes qui, entre autres, régulent la différenciation des adipocytes et l'adipogenèse ainsi que le métabolisme du glucose et des lipides. Cependant, malgré des avantages évidents en matière de contrôle de la glycémie, cette classe de médicaments est devenue obsolète en raison des préoccupations liées à leurs effets secondaires et indésirables, d'où leurs retraits des marchés internationaux. Pourtant, certaines approches rationalisées ont été utilisées pour poursuivre le développement de autres mécanismes d'actions possible cette classe d'agents antidiabétiques, pour la régulation de la glycémie postprandiale.

Nous avons rapporté, dans le présent travail, par des tests *in vitro*, *in silico* et *in vivo* les effets directs des dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione nouvellement synthétisées dans l'amélioration du contrôle glycémique, en abaissant les taux de glycémie à jeun et postprandiale. Nous avons montré que certains dérivés semblent avoir des effets différentiels sur la dyslipidémie, par la modulation des taux des paramètres lipidiques, ainsi que la protection contre les altérations induites par l'hyperglycémie chronique dans le foie, les reins et le pancréas. Nous avons constaté *in vivo*, sur un modèle de souris diabétique (HFD/STZ) que les thiazolidinediones synthétisées favorisent la régénération du système antioxydant endogène, ainsi que le maintien du nombre et la masse des cellules β pancréatique.

Mots clés : Thiazolidinedione, glitazone, diabète, hyperglycémie postprandial, hyperlipidémie, cellules β pancréatique.

Abstract

Title: Pharmacological and toxicological evaluation of thiazolidine-2,4-dione derivatives: impact on carbohydrate and lipid metabolism

Author: Saad Fettach

Thiazolidinediones are agents introduced in the treatment of type 2 diabetes mellitus since the late 1990s, favorably influencing insulin sensitivity and also pancreatic β -cell function, through binding to the nuclear receptor PPAR γ and activating transcription of genes that, among other things, regulate adipocyte differentiation and adipogenesis as well as glucose and lipid metabolism. However, despite clear benefits in glycemetic control, this class of drugs has become obsolete due to concerns about side effects and adverse effects, resulting in their withdrawal from international markets. Yet, some streamlined approaches have been used to further develop other possible mechanisms of this class of antidiabetic agents, for the regulation of postprandial blood glucose.

In the present work, we have reported *in vitro*, *in silico* and *in vivo* the direct effects of newly synthesized Thiazolidine-2,4-dione derivatives in improving glycemetic control, lowering fasting and postprandial blood glucose levels. We have shown that some derivatives appear to have differential effects on dyslipidemia, by modulating the levels of lipid parameters, as well as protecting against alterations induced by chronic hyperglycemia in liver, kidney and pancreas. We found *in vivo*, in a diabetic mouse model (HFD/STZ) that synthesized thiazolidinediones promote the regeneration of the endogenous antioxidant system, as well as the maintenance of the number and mass of pancreatic β -cells.

Keywords: thiazolidinedione, glitazone, diabetes, postprandial hyperglycemia, hyperlipidemia, pancreatic β cells.

المخلص

العنوان: التقييم الدوائي والسمي لمشتقات ثيازوليدين-2،4-ديون: التأثير على استقلاب الكربوهيدرات والدهون

المؤلف: سعد فتاش

ثيازوليدنديون، هي عوامل أستعملت في علاج داء السكري من النوع 2 منذ أواخر التسعينيات ، تأثر بشكل إيجابي على حساسية الأنسولين وأيضًا وظيفة خلايا البنكرياس ، من خلال الارتباط بالمستقبل النووي γ PPAR وتفعيل نسخ الجينات التي ، من بين أمور أخرى ، تنظم تمايز الخلايا الدهنية وتكوين الدهون وكذلك استقلاب الجلوكوز. مع ذلك، وعلى الرغم من الفوائد الواضحة في التحكم في نسبة السكر في الدم ، فقد أصبحت هذه الفئة من الأدوية متجاوزة بسبب المخاوف بشأن الآثار الجانبية والآثار السلبية ، مما أدى إلى سحبها من الأسواق الدولية. من جهة أخرى، فقد تم استخدام بعض الأساليب المبسطة لتطوير آليات أخرى محتملة لهذه الفئة من العوامل المضادة لمرض السكر ، من أجل تنظيم جلوكوز الدم بعد الأكل.

في هذا العمل، ابنا من خلال تجارب مخبرية وأخرى معلوماتية عن التأثيرات المباشرة لمشتقات ثيازوليدين-2،4-ديون المصنعة حديثًا في تحسين التحكم في نسبة السكر في الدم ، وخفض مستويات الجلوكوز في الدم بعد الأكل. لقد أظهرنا أن بعض المشتقات يبدو أن لها تأثيرات تفاضلية على اضطراب شحميات الدم، من خلال تعديل مستويات المعلمات الدهنية ، وكذلك الحماية من التغيرات التي يسببها ارتفاع السكر في الدم المزمن في الكبد والكلى والبنكرياس.

في حين تمكنا من خلال تجارب على الحيوانات المخبرية ، في نموذج فأر مصاب بداء السكري (HFD / STZ) أن مركبات الثيازوليدنديون تعزز تجديد نظام مضادات الأكسدة الذاتية ، وكذلك الحفاظ على عدد وكتلة خلايا البنكرياس β المسؤولة عن إفراز الأنسولين.

الكلمات المفتاحية: ثيازوليدنديون ، جليتازون ، مرض السكري ، ارتفاع السكر في الدم بعد الأكل ، اضطراب شحميات الدم ، خلايا البنكرياس.

Table des matières

<i>Dédicaces</i>	
<i>Remerciements</i>	
<i>Liste des publications</i>	
<i>Liste des communication et participation scientifiques</i>	
<i>Listes des tableaux</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Liste des schémas</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	
<i>Résumé</i>	
<i>Abstract</i>	
<i>المخلص</i>	
Introduction générale	21
Partie I : Données bibliographique	25
Implication des glitazones (dérivés de la famille des thiazolidine-2,4-dione) dans le diabète type 2	
1. Implication des Thiazolidine-2,4-dione dans le traitement du diabète	27
2. Développement chronologique des Thiazolidine-2,4-diones.....	28
3. Synthèse de dérivés de la thiazolidine-2,4-dione (TZD).....	30
4. Synthèse des Thiazolidine-2,4-diones substituées	32
5. Mécanisme d'action et effets métaboliques.....	33
i. Cible thérapeutique.....	33
ii. Les TZD en tant que ligands des PPAR	35
iii. Fonction métabolique	36
iv. Efficacité clinique.....	38

6. Effets secondaires des Thiazolidine-2,4-dione	39
7. Résumé et futures perspectives	40
Partie II : Etude expérimentale.....	42
Évaluations de l'inhibition enzymatique des α-amylase et de l'α-glucosidase et docking moléculaire des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione	
1. Matériels et méthode :	45
1.1 Pouvoir antihyperglycémique <i>in vitro</i> des dérivés de la thiazolidine- 2,4-dione isoxazoline .	45
i. Test d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase.....	46
ii. Test d'inhibition de l'enzyme α -amylase	47
1.2. Analyse computationnelle des interactions ligand-récepteur et criblage virtuel	47
i. Modélisation moléculaire par homologie et validation des structures	48
ii. Vérification et validation de modèles homologues	48
iii. Évaluation du docking moléculaire.....	49
2. Résultats et discussion	49
2.1 Activité inhibitrice de l' α -glucosidase <i>in vitro</i>	49
2.2 Activité inhibitrice de l' α -amylase <i>in vitro</i>	52
2.3 Validation de modèles homologues.....	54
2.4 Évaluation du docking moléculaire	58
Etude de la toxicité aigüe <i>in vivo</i> des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione et évaluation de l'hépatotoxicité <i>in vitro</i> sur des cellules HepG2	
1. Matériel et méthode :	66
1.1 Évaluation de la toxicité <i>in vivo</i> des dérivés de Thiazolidine-2,4-dione	66
i. Animaux	66
ii. Test de la toxicité aigüe.....	66
1.2 Évaluation de l'hépatotoxicité <i>in vitro</i> des dérivés de Thiazolidine-2,4-dione	67

i. Lignées cellulaires et mise en culture.....	67
ii. Dose/Effet des thiazolidine-2,4-dione isoxazolines sur la croissance de cellules HepG2.....	68
2. Résultats et discussion	68
2.1 Test de toxicité aiguë par voie orale	68
2.2 Hépatotoxicité in vitro des dérivés de Thiazolidine-2,4-dione	69
Effet antihyperglycémique des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-diones et leur rôle dans l'amélioration du métabolisme et du stress oxydatif chez des souris diabétiques	
1. Méthode et matériel :	73
1.1 Évaluation du test de tolérance à l'amidon chez des rats normaux	73
i. Animaux	73
ii. Test oral de tolérance au polysaccharides (OSTT).....	73
1.2 Etude des propriétés antihyperglycémique, antihyperlipidémique et antioxydantes des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dionesur des souris HFD/STZ.....	74
i. Modèle expérimental d'hyperglycémie et hyperlipidémie in vivo	74
ii. Conception expérimentale	74
iii. Mesure et analyse des paramètres biochimiques et hématologiques.....	75
iv. Examen histologique du pancréas, du foie et du rein	76
v. Enzymes et marqueurs principaux du stress oxydatif.....	76
a. Préparation de l'homogénat	76
b. Activité catalytique de la catalase (CAT).....	76
c. Activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	77
d. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	77
2. Résultats et discussion	77
i. Test de tolérance orale à l'amidon (OSTT) chez des soules rats normaux	77
ii. Effet des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur la glycémie et le poids corporel	79

iii. Effets des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur le métabolisme des lipides chez les souris diabétiques induites par HFD/STZ	82
iv. Effet des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur la variation des marqueurs de lésions hépatiques et rénales	84
v. Effet des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur la variation des paramètres hématologique	86
vi. Analyse histologique du foie, reins et pancréas des souris diabétique (HFD/STZ) traité par des dérivés synthétisés de Thiazolidine-2,4-dione.....	88
vii. Effets des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur les activités SOD, CAT et la teneur en MDA	91
Conclusion générale	94
Référence bibliographique	98
Annexe 111	

Introduction générale

Le diabète est un véritable problème de santé publique ayant un impact considérable sur le plan sanitaire et économique, qui affecte les capacités fonctionnelles et la qualité de vie des individus, entraînant une morbidité importante et une mortalité prématurée. Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie résultant des troubles dans la sécrétion d'insuline, l'activité de l'insuline, ou les deux. L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à des dommages, des dysfonctionnements et des défaillances à long terme de divers organes, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins. Certaines études ont montré que le diabète est un facteur de risque qui contribue à la gravité et à la mortalité des patients atteints de COVID-19 (Abdi et al., 2020). Plusieurs processus pathogènes sont impliqués dans le développement du diabète, ils vont de la destruction auto-immune des cellules β pancréatique, avec par conséquent une carence en insuline, aux anomalies qui entraînent une résistance à l'action de l'insuline. La base des anomalies du métabolisme des glucides, des graisses et des protéines dans le diabète est une action déficiente de l'insuline sur les tissus cibles. L'action déficiente de l'insuline résulte d'une sécrétion inadéquate d'insuline et/ou d'une diminution des réponses tissulaires à l'insuline en un ou plusieurs points des voies complexes de l'action hormonale (C. R. Kahn, 1994).

En 2021, environ 422 millions d'individus étaient touchés par le diabète soit 6,28% de la population mondiale (4,4% des 15-49 ans, 15% des 50-69 ans et 22% des 70 ans et plus), soit un taux de prévalence de 6059 cas pour 100 000. Plus de 1,5 million de décès par an sont attribués au diabète, ce qui en fait la neuvième cause de mortalité (WHO, 2021). Le manque de la sensibilisation et la promotion de la qualité de vie requis pour le bon contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques, a conduit une proportion non négligeable des patients à un besoin d'une insulinothérapie pour maintenir le contrôle glycémique à long terme, soit en monothérapie, soit en association avec un traitement antidiabétique oral. Généralement l'intervention thérapeutique intensif est attribuée à la perte progressive de la fonction des cellules β des îlots de Langerhans, suite à des inflammations liées à l'obésité (Frasca et al., 2017). Les cliniciens disposent aujourd'hui d'une gamme étendue de médicaments antidiabétiques oraux pour le diabète de type 2.

Les thiazolidine 2,4-diones (TZD) ou glitazones sont des agents hypoglycémisants actifs par voie orale dans le traitement du diabète de type 2 (DT2). Les TZD se lient avidement au récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ), influençant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, du glucose et la différenciation des préadipocytes. Ils améliorent la sensibilité à l'insuline et favorisent l'utilisation du glucose par les tissus périphériques (Biondo et al., 2020). Les TZD sont des dérivés tétrahydrogénés et dioxydés du thiazole présentant diverses activités biologiques telles

qu'antidiabétique, anticancéreuse, antiarthritique, anti-inflammatoire, antimicrobienne et anti-mélanome (Nanjan et al., 2018). Les médicaments de cette classe, qui comprennent la rosiglitazone et la pioglitazone, ont été annoncés comme de nouveaux traitements de première et de deuxième intention pour le DT2 au moment de leur introduction à la fin des années 1990, avec un contrôle de la glycémie et des effets physiologiques comparables, et dans certains cas, meilleurs, que d'autres traitements de première intention établis tels que la metformine. Les préoccupations concernant les effets indésirables issues d'un traitement par les dérivés de la thiazolidinedione sur la santé sont apparues à la fin des années 1990, suivie par leur retrait du marché mondial en raison de leurs hépatotoxicité en 2000 (Troglitazone). Depuis, de nouvelles préoccupations ont été exprimées à la fois par la communauté médicale et par les organismes de réglementation lorsque des études supplémentaires ont montrés des effets cardiovasculaires indésirables chez les patients traités par la rosiglitazone, ce qui a conduit au retrait, et à la restriction de ce médicament.

Compte tenu de ce qui précède, les chercheurs en chimie médicinale tentent de découvrir des pistes pour synthétiser de nouveaux composés plus puissants sur le plan thérapeutique et présentant moins d'effets secondaires, ce qui permettrait d'améliorer la qualité de vie et de réduire la charge financière des patients avec un diabète type 2 (DT2). En vus des activités pharmacologiques importantes de ces hétérocycles, et afin de contribuer à l'évaluation de leur puissance pharmacologique, l'objectif de la présente étude est d'identifier la capacité d'un traitement par des analogues synthétisés de la famille glitazone à moduler une hyperglycémie et une hyperlipidémie chronique, ainsi que leur effet organo-protecteur contre une altération induite par inflammation ou stress oxydatif. L'essentiel de ce travail est présenté en deux chapitre parties présentées ci-dessous.

- Le premier chapitre de ce travail fournit un aperçu bibliographique des approches de synthèse et des mécanismes d'action biologiques impliqué dans l'ajustement des métabolismes, y compris les avantages thérapeutiques et les risques des thiazolidine-2,4-diones.
- Le deuxième chapitre de ce travail est consacré à l'étude expérimentales de l'aspect pharmacologique et toxicologique des dérivés TZD synthétisé. Une investigation *in-vitro* du potentiel antihyperglycémique par inhibition des enzymes α -amylase et α -glucosidase, a été réalisée. La simulation *in silico* était faite par docking moléculaire pour mieux comprendre la nature des interactions entre la conformation structurelle de chaque molécule et les cibles protéiques. Sur la base des résultats obtenus, les molécules les plus actives ont étaient évaluées pour leurs toxicités *in vitro* sur un modèle de cellule de foie, et *in vivo* pour la détermination de leur DL₅₀. Le travail est ensuite finalisé par l'évaluation *in vivo* de l'effet des dérivés sélectionnés dans l'amélioration de la tolérance aigue au glucose (Test OSTT), suivis d'une

étude de la capacité de traitement par chaque TZD à améliorer les paramètres métaboliques chez des souris diabétiques (induction du diabète par un régime alimentaire hypercalorique (HFD) et une dose intrapéritonéale du streptozotocine (STZ)). Les animaux mis sous traitement feront l'objet d'analyses biochimique, histologique et évaluation du profil antioxydant dans le pancréas, rein et foie.

Partie I : Données bibliographique

**Implication des glitazones (dérivés de la
famille des thiazolidine-2,4-dione) dans le
diabète type 2**

1. Implication des Thiazolidine-2,4-dione dans le traitement du diabète

Les thiazolidine-2,4-diones (glitazone) sont une famille de médicaments antidiabétiques récemment utilisés pour le traitement du diabète de type 2 (Fig.1). La toute première, la troglitazone (Rezulin), a été introduite en Grande-Bretagne et aux États-Unis en 1997 mais a été retirée du marché la même année en Grande-Bretagne et ensuite en 2000 aux États-Unis en raison de son hépatotoxicité (Smith, 2003). La glitazone (TZD) suivante, la rosiglitazone (Avandia TM, GlaxoSmithKline), a été approuvée aux États-Unis en 1999 et en Europe en 2000, mais a été suspendue du marché européen en septembre 2010 en raison du risque cardiovasculaire (Kores et al., 2021). Aux États-Unis, cependant, la rosiglitazone est toujours disponible, mais uniquement dans le cadre d'un programme d'accès restreint (Avandia-Rosiglitazone Medicines Access Program) (Bourg & Phillips, 2012).

Par conséquent, la pioglitazone (Actos TM, Eli Lilly) reste la seule glitazone utilisée actuellement en Europe. Malheureusement, un risque plus élevé de cancer de la vessie chez les patients qui utilisent la pioglitazone a été rapporté, et en conséquence, la pioglitazone a été retirée du marché en France en juillet 2011 (Neumann et al., 2012), alors que l'Allemagne et le Luxembourg ont recommandé de ne pas mettre de nouveaux patients sous pioglitazone (Azoulay et al., 2012). En octobre 2011, l'Agence européenne des médicaments a conclu que la pioglitazone devait rester disponible en tant qu'option thérapeutique, à condition de procéder à une sélection et à un suivi attentif des patients (Pai & Kshirsagar, 2016). La Food and Drug Administration américaine a recommandé de prescrire la pioglitazone avec prudence chez les patients ayant des antécédents de cancer de la vessie et de ne pas l'utiliser chez les patients présentant un cancer de la vessie actif (Ferwana et al., 2013). Une nouvelle glitazone, la rivoglitazone, fait actuellement l'objet de recherches en vue de son utilisation. Les données préliminaires obtenues à partir d'une étude de 26 semaines en monothérapie contrôlée par placebo et pioglitazone ont montré que la rivoglitazone était efficace pour réduire l'hyperglycémie et améliorer la sensibilité à l'insuline, et que le profil de sécurité semblait similaire à celui de la pioglitazone (Wagstaff & Goa, 2002).

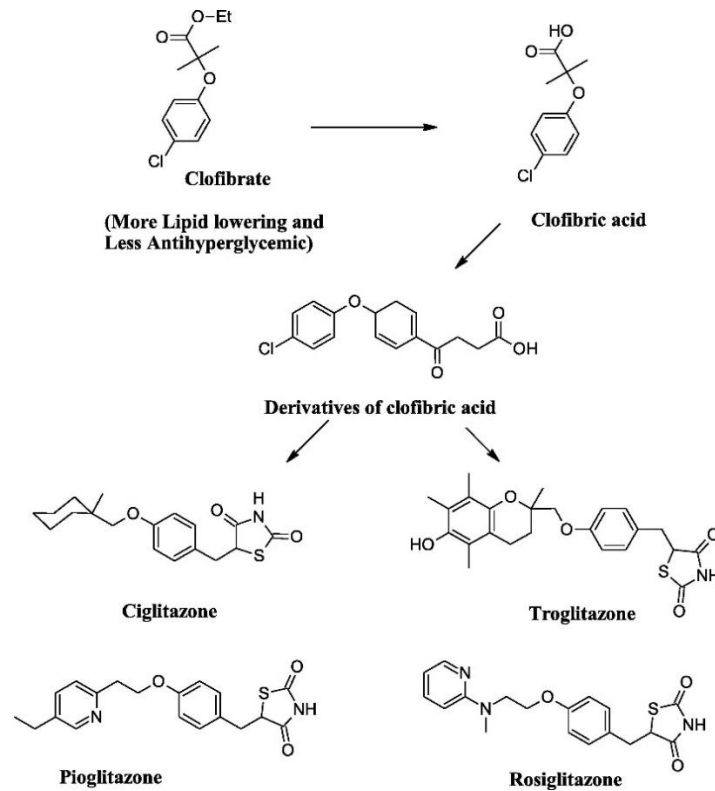


Figure. 2. TZDs issues d'une dérivation du clofibrate

La rosiglitazone et la pioglitazone se sont avérées sans danger pour le système hépatique. La rosiglitazone a rapidement conquis la majeure partie du marché des antidiabétiques oraux, devenant l'une des 25 marques les plus vendues aux États-Unis (Nissen, 2010). Cependant, en juillet 1999, un éminent endocrinologue a publiquement exprimé des inquiétudes quant à la sécurité cardiovasculaire de la rosiglitazone (Forman et al., 2000). En mars 2001, des rapports ont mis en évidence des préoccupations concernant l'insuffisance cardiaque induite par la Rosiglitazone en raison de la rétention d'eau (F. Wang et al., 2004). En 2007, une méta-analyse d'essais cliniques contrôlés a confirmé les risques cardiovasculaires associés à la rosiglitazone (Singh et al., 2007). En 2011, l'Agence européenne des médicaments a recommandé la suspension de la Rosiglitazone du marché, suite à laquelle la FDA américaine a imposé plusieurs restrictions sur la prescription et l'utilisation de la Rosiglitazone la même année (Blind et al., 2010; Pouwels & van Grootheest, 2012).

Contrairement à la rosiglitazone, la pioglitazone n'a pas suscité le même degré de polémique en ce qui concerne les risques cardiovasculaires et a été signalée comme ayant un effet cardioprotecteur modeste (DeFronzo et al., 2019). Un risque élevé d'événements ischémiques aigus avec la pioglitazone n'a pas été signalé jusqu'à présent. Toutefois, des inquiétudes ont récemment été soulevées quant au risque apparent de cancer de la vessie associé à cet agent. En conséquence, la FDA a mis à jour l'étiquette de la pioglitazone et a recommandé de ne pas commencer le traitement par la pioglitazone chez les patients présentant un cancer de la vessie

actif et de l'utiliser avec prudence chez les patients ayant des antécédents de cancer de la vessie (Ferwana et al., 2013).

La *Dr. Reddy's Research Foundation*, en Inde, a mis au point des analogues de TZD plus récents et améliorés, à savoir la Balaglitazone (DRF-2593) et le Ragaglitazar (DRF-2189) (Fig.3), pour le traitement du DT2 (Das & Chakrabarti, 2005). La molécule, le Ragaglitazar, a tenu ses promesses en phase III mais malheureusement, la dose à laquelle elle a reproduit les données animales, chez l'homme a provoqué des effets secondaires grave (Mudur, 2002). Le développement du Ragaglitazar a donc été suspendu en 2002. La Balaglitazone, un autre agoniste du PPAR γ de deuxième génération dont les propriétés agonistiques ne sont que partielles, a échoué dans les essais cliniques de phase III (Agrawal et al., 2012).

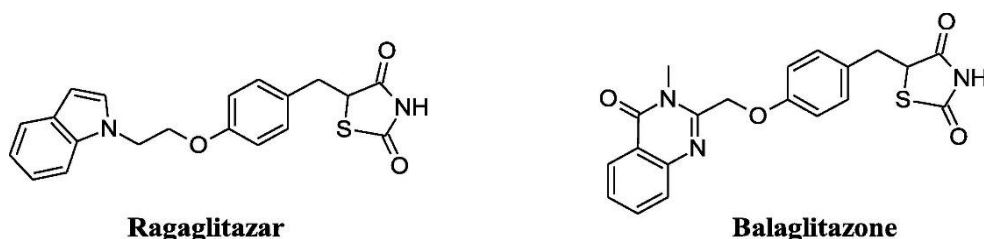


Figure 3. Structures chimique du Ragaglitazar et de la Balaglitazone.

3. Synthèse de dérivés de la thiazolidine-2,4-dione(TZD)

Plusieurs méthodes de conception, de synthèse et d'évaluation des thiazolidine-2,4-diones (TZD) ont été réalisées, en raison de leur facilité de synthèse et de la rentabilité des produits de base. La molécule de TZD peut être obtenue en utilisant différents produits de base, notamment l'acide chloroacétique, les thiocarbamates, les thiourées, les thio-semicarbazones et les thiocyanates alcalins, en milieu acide, avec l' H_2O comme solvant. En fonction de leur substitution, leur synthèse est classée comme suit. Le protocole de synthèse le plus couramment utilisé est le reflux de l'acide α -chloroacétique avec la thiourée pendant 12 heures, ce qui donne le noyau TZD via l'intermédiaire 2-imino-4-thiazolidinone (Chadha et al., 2015), comme décrit dans le [schem.1](#). Cette réaction peut être encore accélérée en utilisant une technique assistée par micro-ondes (Thari et al., 2020), dans laquelle l'acide α -chloroacétique est initialement mis en réaction avec la thiourée dans des conditions froides pour donner la 2-iminothiazolidine-4-one qui est ensuite irradiée par micro-ondes à 250W pendant 5 minutes pour obtenir des cristaux blancs de TZD ([Schém.1](#)).

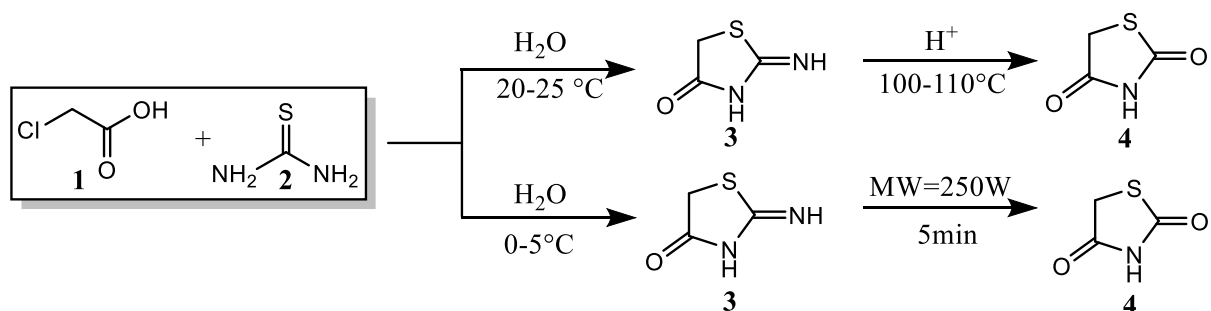


Schéma 1. Synthèse de la thiazolidine-2,4-dione en utilisant la thiourée et l'acide chloroacétique.

Le troisième protocole de synthèse est la réaction de la thiosemicarbazone avec l'ester de l'acide chloroacétique (Reeve & Barron, 2002), qui, en présence d'éthanoate de sodium, donne la 2-hydrazinothiazolidine-4-one qui, en présence d'acide chlorhydrique dilué, donne le noyau TZD (Schem.2).

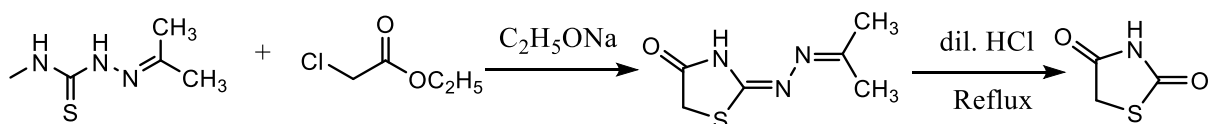


Schéma 2. Synthèse de la thiazolidine-2,4-dione en utilisant la thiosemicarbazone, le chloroacétate d'éthyle et l'éthanoate de sodium.

L'autre moyen d'obtenir le noyau TZD consiste à acidifier (avec de l'HCl dilué) le produit obtenu par réaction chimique du chloro-acétate d'éthyle avec le thiocyanate de potassium (schem.3). La valeur pKa du noyau TZD a été rapportée à 6,82 (Chadha et al., 2015).

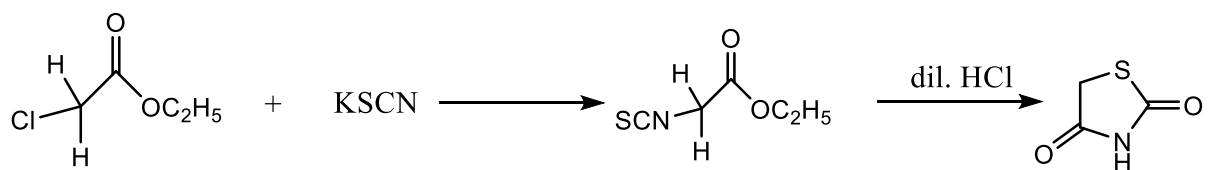


Schéma 3. Synthèse de la thiazolidine-2,4-dione en utilisant le chloroacétate d'éthyle et le thiocyanate de potassium.

Le noyau TZD non substitué existe sous la forme d'un solide cristallin blanc dont le point de fusion se situe entre 120 et 122°C. Le spectre infrarouge (IR) de ce noyau montre un étirement NH à 3145 cm⁻¹, un étirement CH₂ à 2923 cm⁻¹, un étirement carbonyle à 1738 cm⁻¹ et 1659 cm⁻¹ (pour les carbonyles C₂ et C₄, respectivement), un étirement C-N à 1318 cm⁻¹ et 1165 cm⁻¹, et un étirement C-S à 808 cm⁻¹ et 727 cm⁻¹ (Lebovitz, 2019). La RMN de ¹H montre un singulet pour les protons CH₂ à d 3,98 (ppm) et un large singulet pour les protons NH à d 12,51

(ppm), ce qui est dû à l'effet d'écrantage de deux groupes carbonyles présents des deux côtés. Le spectre de masse du TZD montre un pic de base à m/z 116 (100 %) (Rančić et al., 2013).

4. Synthèse des Thiazolidine-2,4-diones N-substituées

Il a été rapporté que la substitution des thiazolidine-2,4-diones augmente et diversifie les activités biologiques. La fraction -NH substituée de la thiazolidine-2,4-dione peut être synthétisée par le traitement de l'oxysulfure de carbone **5** avec une amine primaire **6** en présence d'hydroxyde de potassium (Schém.4) pour obtenir des thiocarbamates d'alkyle **7**, qui sont ensuite traités avec l'acide α -haloalcanoïque **1** et cyclisés pour générer la TZD 3-substituée correspondante **8** (Sundeeep Kaur Manjal et al., 2017).

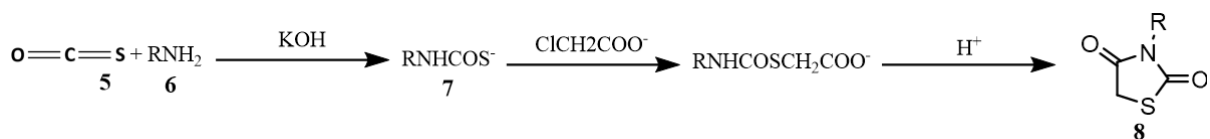


Schéma 4. Synthèse de la thiazolidine-2,4-dione 3-substituée

Dans une autre approche, le méthylène substitué des thiazolidinones a été synthétisé en utilisant l'acide bromoacétique **9** ou le chlorure de bromoacétyle **10** substitué par un dialkyle comme produit de départ. La réaction commence par le reflux de l'acide bromoacétique **9** ou du chlorure de bromoacétyle **10** substitué par un dialkyle avec la thiourée en présence d'acétate de sodium dans l'éthanol pour donner l'intermédiaire **11**, qui est ensuite hydrolysé pour donner la 5,5-dialkyl-thiazolidin-2,4-dione **12** (Schém.5) (Mendoza et al., 2005).

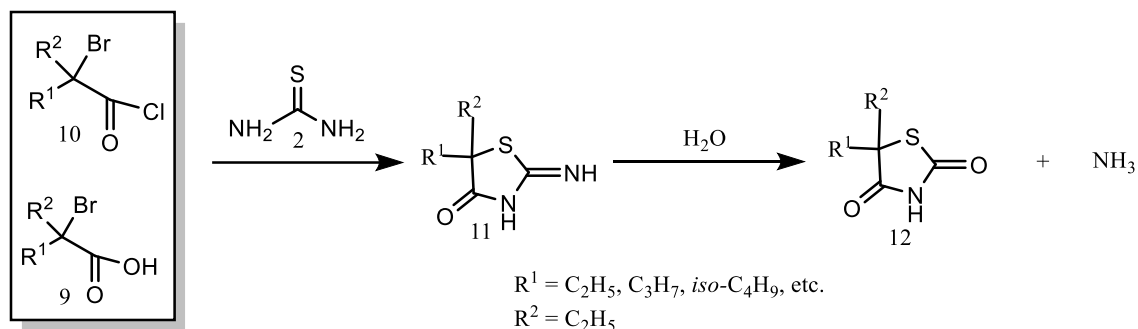


Schéma 5. Synthèse de dialkyl thiazolidinones à l'aide d'acide bromoacétique ou de chlorure de bromoacétyle substitué

Les synthèses de glitazones utilisant la TZD sont basées sur la substitution d'un aldéhyde ou d'une cétone à la partie thiazolidinedione conduisant à la formation de dérivés arylidènes, via une condensation de Knoevenagel et une réduction de la liaison benzyldène (Schém.6) (Mahalle et al., 2008).

La condensation de l'aldéhyde et de la TZD a été réalisée dans différentes conditions de réaction, notamment avec quelques gouttes de pipéridine en utilisant l'éthanol ou le méthanol

comme solvants pendant 7 à 42 heures ou de l'acétate de sodium anhydre dans l'acide acétique glacial, tandis que la condensation de la TZD avec des cétones a été réalisée en présence d'acétate d'ammonium ou d'acétate de (Tokala et al., 2022)inium dans le toluène ou l'acétate d'éthyle . Des tentatives ont également été faites pour développer une condition de réaction écologique pour la condensation de Knoevenagel en utilisant la L-tyrosine dans l'eau ou la bêta-alanine dans l'acide acétique, ou la levure de boulangerie dans l'éthanol (Prashantha Kumar et al., 2012). Ces réactions ont permis le couplage de la TZD avec divers dérivés benzylidéniques ainsi qu'avec d'autres fragments de noyaux hétérocycliques tels que les chalcones, les flavones, les acridines, les furfurals, la dibenzo-cycloheptanone, etc.

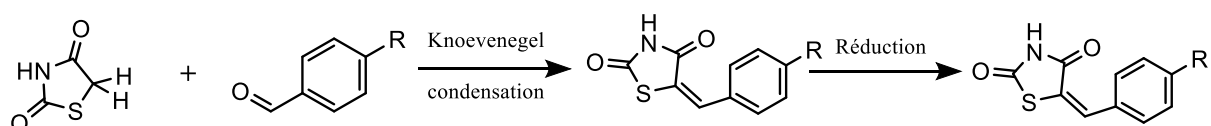


Schéma 6. Approche générale pour la synthèse des glitazones

5. Mécanisme d'action et effets métaboliques

i. Cible thérapeutique

La classe des TZD a été découverte dans les années 1970, mais ce n'est qu'au milieu des années 1990, après le développement des premières molécules à base de fibrates (agonistes du sous-type α du PPAR) et après le début du développement clinique des TZD comme la ciglitazone, la pioglitazone et la troglitazone, que l'on a découvert les TZD exerçaient des effets insulino-sensibilisants par l'activation directe des PPAR, en particulier du sous-type γ (Colca et al., 2014). Depuis, on a découvert que, selon le type de cellule ou le site de liaison, les TZD agissent comme des agonistes ou des antagonistes synthétiques des PPAR, une sous-famille de récepteurs nucléaires comprenant les isoformes α , β/δ et γ (Siclari & Gardner, 2021).

Comme les autres récepteurs nucléaires (Fig.4), les PPARs sont composés de domaines fonctionnels distincts qui sont des cibles potentielles pour la modulation des cascades de signalisation (Ahmadian et al., 2013), y compris un domaine de liaison au ligand (Kamata et al., 2020), un domaine de couplage à l'ADN hautement conservé (Chandra et al., 2008), et un domaine de transactivation qui permet une activation indépendante du ligand (Mandrup & Bugge, 2010). Après la liaison des TZDs, les PPAR subissent des changements conformationnels spécifiques qui permettent le recrutement différentiel de co-activateurs protéiques (Dias et al., 2020). Comme les TZD diffèrent dans leur capacité à interagir avec les coactivateurs, ils peuvent induire un certain nombre de réponses biologiques et métaboliques diverses (Ahmadian et al., 2013; Dias et al., 2020). Les PPARs subissent une transactivation ou

une transrépression par des mécanismes spécifiques qui conduisent à l'induction ou à la répression de l'expression des gènes cibles. La transactivation est considérée ADN-dépendante et la liaison nécessite une dimérisation avec les récepteurs de la famille des rétinoides X (RXR) (Szanto et al., 2004).

L'hétérodimérisation entre les PPAR et les RXR est indépendante de la nature et la structure de chaque molécule de TZD, mais repose sur les interfaces entre les domaines de liaison au ligand et les domaines de liaison à l'ADN de chaque récepteur (Wells & Chan, 2009). L'hétérodimère PPAR/RXR se lie à son tour aux éléments régulateurs sensibles aux PPAR dans la région promotrice des gènes cibles (Szanto et al., 2004), y compris ceux impliqués dans l'adipogenèse, le métabolisme des lipides, l'inflammation et le maintien de l'homéostasie métabolique (Barish et al., 2006). L'activation de ces gènes par les médicaments tels que les TZD se traduit par des effets hypoglycémiques et hypolipidémiques, une diminution de la résistance à l'insuline, une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une diminution de l'inflammation (Grossman & Lessem, 2005).

Les PPAR peuvent également réprimer l'expression de certains gènes par transrépression. La transrépression se produit d'une manière indépendante de la liaison à l'ADN en interférant avec d'autres voies de signalisation, ainsi que d'une manière dépendante par le recrutement de corépresseurs aux PPAR (Battaglia et al., 2010). Il a notamment été démontré que le PPAR γ induit par un ligand (TZD) inhibe l'activation transcriptionnelle des gènes responsables de la réaction inflammatoire *in vitro* en empêchant le recrutement de la machinerie qui assure la suppression des complexes corépresseurs nécessaires à la régulation des gènes, ce qui laisse les gènes cibles dans un état de répression (Pascual et al., 2005). De même, il a été démontré que PPAR β/δ contrôle l'inflammation *in vivo* par une voie transcriptionnelle dépendant du ligand en s'associant et en se dissociant des répresseurs de transcription (Gilde et al., 2003) ; à l'inverse, PPAR α agit de manière indépendante du ligand *in vitro* et *in vivo*. La transrépression peut expliquer au moins dans une certaine mesure les actions anti-inflammatoires des PPAR qui ont été rapportées (Braissant et al., 1996). Il a notamment été démontré que le PPAR stimulé par un ligand réprime l'activation transcriptionnelle des gènes de la réponse inflammatoire *in vitro* en empêchant le recrutement de la machinerie qui assure normalement l'élimination des complexes corépresseurs nécessaires à l'activation des gènes, ce qui a pour effet de laisser les gènes cibles dans un état réprimé (Pascual et al., 2005). La transrépression peut expliquer au moins dans une certaine mesure les actions anti-inflammatoires des PPAR qui ont été rapportées (Chinetti et al., 2000).

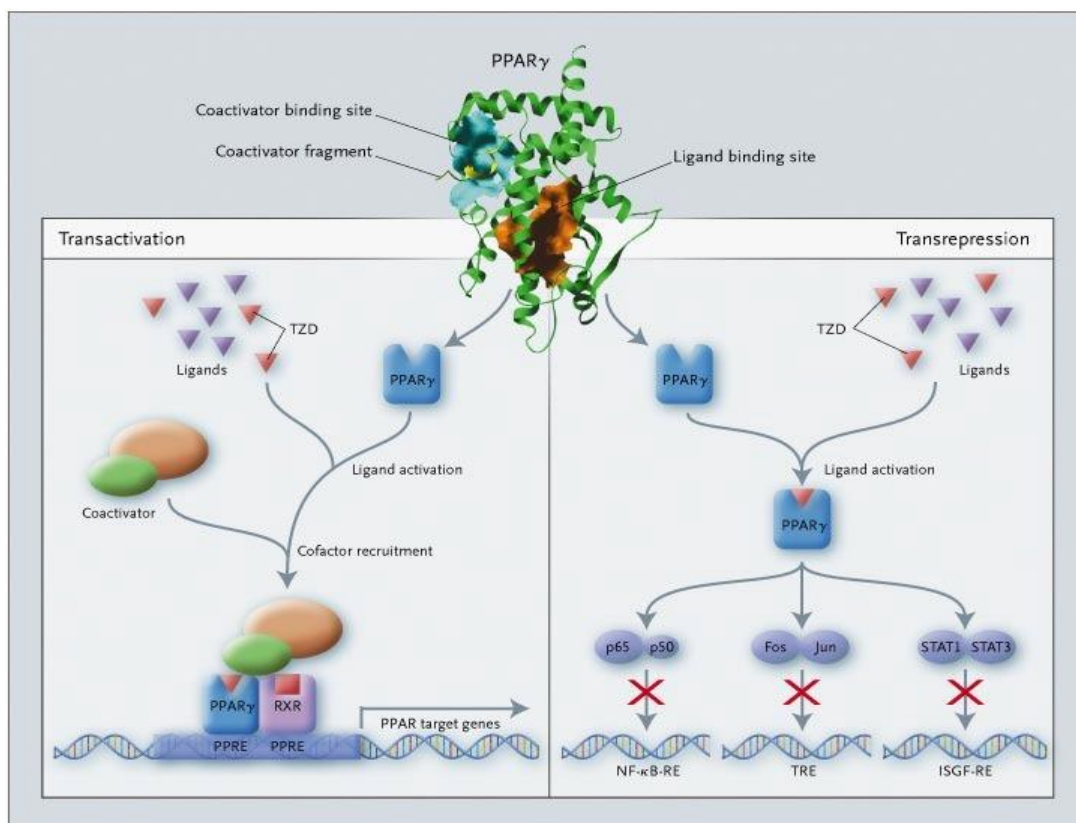


Figure 4. Mécanismes moléculaires des réactions biologiques des thiazolidinediones

ii. Les TZD en tant que ligands des PPAR

Les TZD sont des ligands synthétiques qui ont été développés sur la base de leur affinité pour le PPAR de sous-type γ (la pioglitazone, mais pas la rosiglitazone, présentant également une faible affinité pour le PPAR de sous-type α *in vitro* à des concentrations élevées) (Rajapaksha et al., 2017), le PPAR γ activé par le ligand (TZD) agit comme un facteur de transcription stimulant l'expression des gènes impliqués dans la régulation métabolique par les voies du stockage des lipides et de l'homéostasie du glucose (Corona & Duchon, 2016). L'affinité de liaison des TZD pour le PPAR γ varie, pourtant, la rosiglitazone et la pioglitazone sont considérées comme étant les agonistes du PPAR γ les plus puissants et les plus sélectifs à ce jour. Des études *in vitro* ont montré que la rosiglitazone a une affinité de liaison 10 fois plus supérieure à celle de la pioglitazone, qui elle-même a une affinité de liaison 10 fois plus supérieure à celle de la troglitazone, un médicament qui a précédé la rosiglitazone et la pioglitazone mais qui a été retiré du marché international pour hépatotoxicité (Young et al., 1998).

Cela se reflète dans les différences de dosage clinique de ces agents : 4 ou 8 mg/jour pour la rosiglitazone, 15-30 mg/jour pour la pioglitazone (qui peut être augmentée par paliers jusqu'à 45 mg/jour), et 400-800 mg/jour pour la troglitazone. Un nouveau médicament TZD, la rivoglitazone, actuellement en cours de développement, est considéré comme plus puissant que

la rosiglitazone ou la pioglitazone (Koffarnus et al., 2013). La dose initiale recommandée pour la rivoglitazone sur la base des essais cliniques menés à ce jour (Truitt et al., 2010) est de 1 mg par jour, augmentant jusqu'à une dose maximale de 2 mg par jour. Un autre nouveau médicament TZD, la netoglitazone (MCC-555), qui fait l'objet d'études pour le traitement du DT2 et du cancer, peut agir en tant qu'agoniste, agoniste partiel ou antagoniste du PPAR γ , selon la cellule cible et a démontré des effets antihyperglycémiques et antihyperlipidémiques dans des modèles animaux (Lazarenko et al., 2006). Bien que son affinité de liaison pour le PPAR γ soit relativement faible par rapport aux autres TZD, la néoglitazone est considérée comme plus puissante que d'autres ligands du PPAR γ (Yamaguchi et al., 2008), avec une puissance 50 fois supérieure à celle de la rosiglitazone pour réduire la glycémie chez les modèles de rongeurs (Min et al., 2012). Cela peut s'expliquer par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de PPAR γ (Min et al. 2012). Ses effets antihyperlipidémiques seraient dus à la modulation de PPAR α , bien qu'il se soit avéré 5 à 10 fois moins efficace que la rosiglitazone pour induire l'adipogenèse dans les préadipocytes de souris (Lazarenko et al., 2006). Il a été démontré que l'affinité de liaison est corrélée à la puissance biologique *in vitro* et il semble y avoir une corrélation entre la puissance des TZD dans la liaison et l'activation du PPAR γ *in vitro* et la réduction des taux de glucose plasmatique *in vivo* (James, 2013).

Les différences de dosage et d'affinité de liaison peuvent également contribuer aux effets indésirables signalés. Par exemple, il a été démontré que la balaglitazone, un agoniste partiel du PPAR γ qui n'active le PPAR γ qu'à 50 % à des concentrations élevées (Larsen et al., 2008), possède une puissance similaire à celle de la pioglitazone dans les modèles animaux, mais avec un profil d'effets secondaires plus favorable (Agrawal et al., 2012; Larsen et al., 2008). Bien que ce nouveau médicament se soit révélé prometteur lors des essais de phase III en raison de réductions des taux de glucose et d'un taux d'hémoglobine A1C similaires à celles de la pioglitazone à des doses plus faibles (10 et 20 mg/jour contre 45 mg/jour de pioglitazone), tout en s'accompagnant d'une prise de poids et d'une accumulation de liquide moins importantes chez les patients (Agrawal et al., 2012), il n'a jamais été commercialisé. À la lumière des préoccupations relatives aux effets indésirables liés aux médicaments TZD, de nouveaux médicaments et de nouvelles classes de médicaments continuent toutefois d'être étudiés.

iii. Fonction métabolique

Il a été démontré que la stimulation de PPAR γ par les TZD augmente la sensibilité périphérique à l'insuline, dans le foie et les muscles squelettiques (Janani & Ranjitha Kumari, 2015), et provoque une adipogenèse entraînant une diminution de la production endogène de glucose et de la gluconéogenèse postprandiale, une augmentation de la clairance de la glycémie à jeun et postprandiale, et une baisse de la glycémie et de l'insulinémie, en plus des changements signalés

dans la fonction des cellules β pancréatique, les taux de cholestérol, les taux de triglycérides et les niveaux d'inflammation (Bao et al., 2020). Par exemple, il a été démontré que l'expression de PPAR γ est nécessaire à l'adipogenèse *in vitro* et *in vivo* (Dammone et al., 2018; Xi et al., 2016), les TZD favorisant la différenciation des adipocytes (Shao et al., 2018), par l'activation de PPAR γ . Les TZD ciblent la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Ghaben & Scherer, 2019), qui comportent un plus grand nombre de transporteurs de glucose et de récepteurs d'insuline (Sánchez-Solana et al., 2012), en réduisant les acides gras libres circulants et en augmentant le dépôt de tissu adipeux sous-cutané (Booth et al., 2014).

Il a également été démontré que PPAR γ activé par un ligand (TZD) est suffisant pour induire la conversion des fibroblastes en adipocytes (Wei et al., 2010) et des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes en adipocytes plutôt qu'en ostéoblastes, car PPAR γ est exprimé dans les os (Wan, 2010). Les TZDs démontrent également une capacité à supprimer la production et l'action de la cytokine inflammatoire facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) (Lencel et al., 2011), qui est surexprimée dans le tissu adipeux chez les patients obèses (Kim et al., 2013). Dans les cellules, le TNF α inhibe la signalisation de l'insuline, notamment en bloquant l'activité du récepteur de l'insuline et en induisant la phosphorylation en sérine du substrat-1 de ce récepteur (Alipourfard et al., 2019). Les TZD semblent agir de manière indépendante et dépendante du TNF α , mais pourraient jouer un rôle plus important dans l'amélioration de l'insulinorésistance qu'en améliorant directement la sensibilité à l'insuline par l'inhibition du TNF α (Schoenberg et al., 2011).

Ce mécanisme peut résulter de l'activation de PPAR α par les TZD, car PPAR α est également le récepteur ciblé par la classe d'acide fibrique des médicaments hypolipidémiant (Hong et al., 2018). Le traitement par pioglitazone, a montré des améliorations des niveaux de triglycérides et de cholestérol à lipoprotéines de haute densité (HDL) (Peng et al., 2014). Potentiellement en raison de la faible affinité de la pioglitazone pour PPAR α . Bien que les TZD ciblent la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques par l'activation de PPAR α , des preuves suggèrent également que les TZD peuvent à la fois prévenir et traiter le DT2 par la protection et la préservation des cellules β pancréatiques via un autre mécanisme (Gupta et al., 2010).

Il a été démontré que le déficit de la fonction des cellules β était la principale raison de la réduction de la tolérance au glucose par rapport aux niveaux normaux de glucose dans différentes populations (Meier & Bonadonna, 2013). Bien que l'expression du PPAR γ se produise dans les cellules β , il a également été démontré que les TZD induisent la phosphorylation de la protéine kinase activée par l'AMP (l'adénosine monophosphate) dans les cellules β , ce qui entraîne une baisse du taux élevé de glycémie (Karunakaran et al., 2021). Des études cliniques ont également suggéré que les TZD préservent la fonction des cellules γ (A. P.

Wang et al., 2010), y compris l'étude ADOPT ("A Diabetes Outcome Progression Trial") où il a été démontré que la rosiglitazone ralentissait le taux de perte de la fonction des cellules β et améliorait la sensibilité à l'insuline dans une plus large mesure que la metformine ou le glyburide avec des progrès constants dans le temps (S. E. Kahn et al., 2011).

Les TZD ont également été étudiés pour leurs effets anti-inflammatoires, y compris ceux qui ne sont pas directement liés à des modifications de la sensibilité à l'insuline, démontrés comme étant supérieurs aux effets de la metformine dans la réduction des marqueurs inflammatoires (Zhu et al., 2012) et de l'inflammation chronique (Ciaraldi et al., 2013), et supérieurs aux effets de réduction de l'inflammation d'autres agents sécréteurs d'insuline tels que les sulfonyles et les méglitinides (Nissen et al., 2008). Par exemple, il a été démontré que l'activation du PPAR γ peut supprimer l'expression de gènes inflammatoires dans les cellules endothéliales *in vitro* (Fan et al., 2008); des preuves *in vivo* suggèrent que les TZD améliorent la fonction vasculaire dépendante de l'endothélium et les biomarqueurs inflammatoires de l'artériosclérose indépendamment de la réduction de la glycémie (Hetzl et al., 2005). Les TZD présentent également une série d'effets pléiotropiques sur la fonction des cellules cardiovasculaires, notamment la modulation de la prolifération, de la migration et du remodelage cellulaires, ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF α , interleukine-1 (IL-1) et interleukine-6 (IL-6) qui jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire du myocarde (Turner et al., 2007). Tous ces effets ont conduit aux hypothèses initiales selon lesquelles les TZD auraient des effets bénéfiques sur le plan cardiovasculaire pour les diabétiques lorsqu'ils ont été mis sur le marché.

iv. Efficacité clinique

Il a été démontré que les TZD améliorent le contrôle de la glycémie par rapport aux autres hypoglycémisants oraux, en monothérapie et en association, avec un faible risque d'hypoglycémie (S. E. Kahn et al., 2006; Raskin et al., 2001; Rodríguez et al., 2011). La rosiglitazone et la pioglitazone réduisent toutes deux l'hémoglobine glyquée (A1C) dans une mesure similaire (Davidson et al., 2017). Il a également été démontré que les TZD procèdent à des effets micro et macrovasculaires positifs et procurent des effets avantageux sur des facteurs de risque tels que le profil lipidique, bien que ces effets diffèrent d'un médicament à l'autre, seule la pioglitazone démontrant des améliorations significatives des taux de triglycérides et de cholestérol dans la plupart des études (Agha et al., 2015). Raskin et al. (2001) ont constaté que la combinaison de la rosiglitazone et de l'insuline améliorait significativement le contrôle glycémique (avec une réduction moyenne de l'HbA1c de 1,2 %), mais n'ont constaté aucune modification du profil lipidique (Lingvay et al., 2007), il a été rapporté aussi que lorsque la rosiglitazone était ajoutée à des médicaments hypoglycémisants déjà administrés, le profil lipidique était moins favorable que celui comparé pour la metformine ou les sulfonyles. À

l'inverse, Dr. Rodriguez (Rodríguez et al., 2011) a constaté que lorsque la pioglitazone était prescrite aux patients en association avec d'autres hypoglycémifiants oraux (metformine ou sulfonylurées), en particulier les associations avec la metformine, étaient liées directement à des augmentations du cholestérol HDL et à des diminutions des triglycérides ainsi que de l'indice athérogène du plasma, par rapport à la metformine associée à une sulfonylurée.

Les TZD ont également été associés à des réductions de la pression artérielle systolique et diastolique par rapport au placebo ou à d'autres agents hypoglycémifiants oraux, probablement en raison d'améliorations de la fonction endothéliale et de la modulation du système rénine-angiotensine (Ajjan & Grant, 2008). La plupart des études ont montré que les TZD sont associés à un faible risque d'échec thérapeutique. Par exemple, dans l'étude ADOPT (S. E. Kahn et al., 2006), l'incidence cumulative d'échec en monothérapie (définie par une glycémie à jeun > 180 mg/dL) après 5 ans était de 15 % pour la rosiglitazone contre 21% pour la metformine et 34% pour la sulfonylurée glyburide (ce qui représente une réduction du risque de 32 % pour la rosiglitazone par rapport à la metformine et de 63 % par rapport au glyburide), ce qui pourrait se traduire par un besoin moindre d'agents hypoglycémifiants supplémentaires. Comme il a été mentionné précédemment, la rosiglitazone a ralenti le taux de perte des cellules β et amélioré la sensibilité à l'insuline dans la même étude dans une plus grande mesure que la metformine ou le glyburide, avec une plus longue durée de contrôle, puisque le taux moyen d'A1C a été maintenu à moins de 7 % pendant une plus longue période avec la rosiglitazone (57 mois) qu'avec la metformine (45 mois) ou le glyburide (33 mois).

6. Effets secondaires des Thiazolidine-2,4-dione

Outre les avantages des TZD en termes de sensibilisation à l'insuline, il est important d'identifier leurs effets secondaires, tels que la prise de poids, la rétention d'eau, la perte osseuse et les problèmes cardiaques. Bien que la prise de poids induite par les TZD ait été attribuée à l'activation de PPAR γ dans le tissu adipeux, des études chez la souris et chez l'homme ont suggéré un rôle central de PPAR γ dans l'homéostasie énergétique du corps entier (Davidson et al., 2017). Bien que PPAR γ soit connu pour son rôle neuroprotecteur et anti-inflammatoire dans le système nerveux central (SNC), deux rapports récents et indépendants ont indiqué que l'activation de PPAR γ dans le cerveau, plutôt que dans le tissu adipeux, contribue au gain de poids induit par les TZD (Ryan et al., 2011). La rétention de l'eau associée à l'apparition des œdèmes reste un effet secondaire important des TZD. Des études récentes ont révélé que les TZD contribuent à des rétentions des fluides et des œdèmes périphériques en altérant la réabsorption du sodium et de l'eau dans les canaux collecteurs du rein (partie distale) (Frederick, 2001).

Un autre effet secondaire signalé des TZD est le taux plus élevé de fractures chez les patients diabétiques (Grey, 2007). En accord avec cela, les TZD provoquent une perte osseuse chez les souris et les rats en diminuant simultanément la formation osseuse (ostéoblastogenèse) et en augmentant la résorption osseuse (ostéoclastogenèse) (Grey, 2009). Il a été démontré que PPAR γ inhibe la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse (Shen et al., 2018). Les cellules souches embryonnaires PPAR γ -nulle ne se différencient pas en adipocytes et se différencient plutôt spontanément en ostéoblastes, alors que les TZDs inhibent la différenciation des ostéoblastes et favorisent l'adipogenèse (Xi et al., 2016). PPAR γ favorise la différenciation des ostéoclastes, et la délétion de PPAR γ dans les lignées hématopoïétiques de souris entraîne une déficience en ostéoclastes et une résistance à la résorption osseuse stimulée par les TZD (Guo et al., 2019). Ces résultats indiquent que la perte osseuse induite par les TZD est le résultat de l'action autonome de PPAR γ sur les cellules osseuses, qui inhibe simultanément l'ostéoblastogenèse tout en renforçant l'ostéoclastogenèse. Les anomalies des tests de la fonction hépatique induites par les TZD ont suscité aussi une grande inquiétude, surtout après que la troglitazone a été associée à une hépatotoxicité idiosyncrasique et à une insuffisance hépatique (Smith, 2003).

7. Résumé et futures perspectives

Les TZD constituent une classe importante de médicaments qui agissent en augmentant l'activité de transactivation des PPARs, ce qui a pour effet de réduire la production hépatique de glucose, d'augmenter l'utilisation périphérique du glucose et le métabolisme des lipides. Par conséquent, l'effet de l'insuline endogène s'améliore de manière à maintenir le niveau de glucose dans le sang. Malheureusement, les TZD utilisés en clinique, à savoir la troglitazone, la pioglitazone et la rosiglitazone, présentaient des effets secondaires graves, liés à leurs mécanismes régulateurs des facteurs de transcription PPAR γ , tels qu'une hépatotoxicité idiosyncrasique, une rétention d'eau et une prise de poids, ce qui a conduit à l'interdiction de la troglitazone et de la rosiglitazone et à la mise à jour des consignes de prise de la pioglitazone en raison du risque de cancer de la vessie. Les TZD qui ont été retirés et dont l'utilisation clinique a été restreinte ont été développés à une époque où l'on ne savait pas grand-chose du rôle et de l'assemblage des PPAR par lesquels la modulation des mécanismes moléculaires et les réponses biologiques des TZD sont médiées. Grâce aux progrès récents et à une meilleure compréhension de la structure et des fonctions des autres cibles antidiabétiques, des approches rationalisées ont été utilisées pour poursuivre le développement de cette classe d'agents antidiabétiques. Ces approches plus récentes sont basées sur des considérations structurelles des ligands, des récepteurs et des interactions ligand-récepteur. Elles comprennent le développement de doubles agonistes du PPAR α/γ , de doubles agonistes du PPAR α/δ , de

doubles agonistes du PPAR γ/δ , de pan-agonistes du PPAR, de modulateurs sélectifs du PPAR γ et d'agonistes partiels. Cette approche a permis une déviation complète du mécanisme d'action d'origine de ces molécules puisqu'elles ont également été signalées comme étant des régulateurs de la glycémie postprandiale, par l'inhibition des enzymes digestives tels l' α amylase et l' α glucosidase, ainsi que l'aldose réductase (ALR2) (Mohd Siddique et al., 2021), et la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) (Tamrakar et al., 2014). En outre, des études sur les TZD en tant qu'agonistes du récepteur des acides gras libres (FFAR1) et du récepteur 40 couplé à la protéine G (GPR40) ont également été rapportées (Gras et al., 2009). Toutes ces mécanismes thérapeutiques alternatives ont attiré, par conséquent, l'attention des chercheurs pour développer de nouveaux agonistes TZD pour le traitement du DT2. Ces cibles, que ce soit individuellement et/ou par le biais d'une action multiple, peuvent sans aucun doute créer d'énormes possibilités de développement de nouveaux TZD dépourvus d'effets secondaires indésirables.

Partie II : Etude expérimentale

**Évaluations de l'inhibition enzymatique de
l' α -amylase et de l' α -glucosidase et
docking moléculaire des dérivés
synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione**

Présentation

L'hybridation de molécules bioactives a été l'un des sujets intéressants de la chimie thérapeutique, qui repose sur la combinaison de deux ou plusieurs groupements pharmacophores différentes pour obtenir une nouvelle molécule. Récemment, des molécules hybrides à base de TZD et/ou d'isoxazoline ont montré des propriétés biologiques remarquables (Guan et al., 2019). De manière évidente, l'hybridation de la thiazolidine-2,4-dione avec l'isoxazoline a permis d'obtenir de nouveaux candidats dotés d'une excellente efficacité pharmacologique (Résultats de ce travail). Cependant, plusieurs méthodes ont été rapportées concernant la synthèse d'isoxazolines à partir d'aldoxime avec des unités allyles comme dipolarophiles (Liao et al., 2020). D'autre part, plusieurs méthodes ont été développées pour la condensation de Knoevenagel de TZD avec des aldéhydes, car il s'agit d'une étape cruciale dans la production des médicaments utilisés en médecine clinique ci-dessus. Pour atteindre cet objectif, plusieurs protocoles de préparation sont rapportés en utilisant différents réactifs comme décrit précédemment.

Au cours des dernières décennies, les ultrasons ont été largement utilisés comme un outil performant pour de nombreuses réactions organiques (Costa & Almeida Neto, 2020). Cependant, l'utilisation des ultrasons dans les composés hétérocycliques n'a pas été largement explorée. La synthèse assistée par ultrasons présente plusieurs avantages par rapport à la méthode de chauffage conventionnelle : conditions de réaction plus douces, temps de réaction court, rendements élevés avec des produits purs en utilisant des systèmes ouverts simples, tout en réduisant les réactions non désirées. Tous ces avantages ont permis de la classer parmi les méthodes écologiques et sans risque pour l'environnement (Mahmoodi et al., 2019).

Compte tenu de l'importance pharmacologique des hétérocycles isoxazoline et thiazolidine-2,4-diones et dans la réalisation de nos recherches ciblons l'évaluation du pouvoir thérapeutique et profil toxicologique des molécules bioactives, nous présentant dans la partie annexe l'approche de synthèse de nouveaux dérivés de la isoxazoline-thiazolidine-2,4-dione (Fig.5) à partir de N-allyl-5-arylidenthiazolidine-2,4-diones comme dipolarophiles avec des oxydes d'arylnitrile en se basant sur des méthodes assistées par ultrasons et micro-ondes (Annexe). Ce travail a été réalisé par l'équipe de recherche de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique à la faculté des sciences de Rabat, sous la direction de Professeur Khalid BOUGRIN en collaboration avec l'équipe du Chimie analytique et de bromatologie à la Faculté de médecine et de pharmacie Rabat, au nom du Professeur Khalid KARROUCHI.

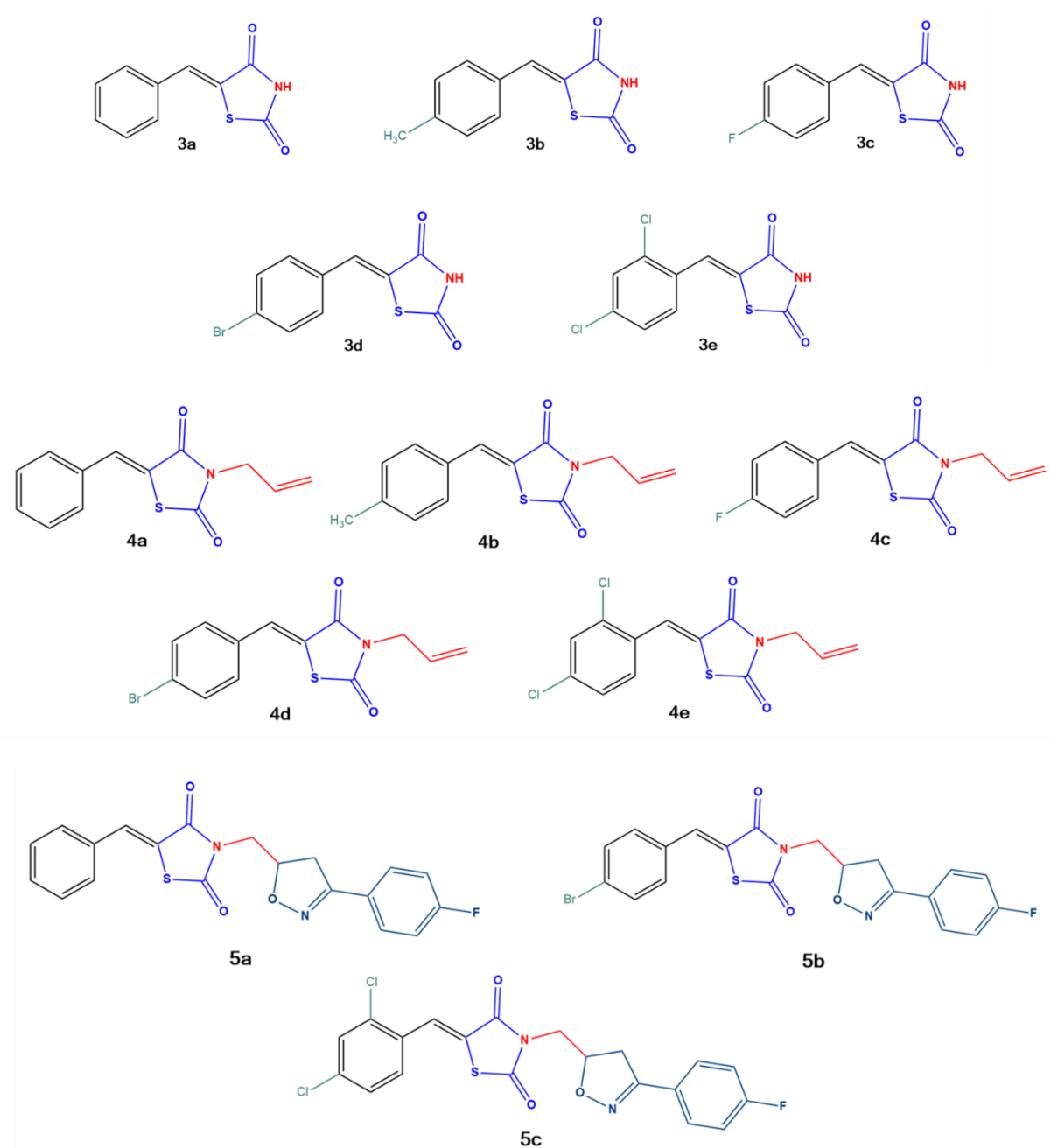


Figure 5 : Série des molécules synthétisées de Thiazolidine-2,4-dione

1. Matériels et méthode :

1.1 Pouvoir antihyperglycémique *in vitro* des dérivés de thiazolidine-2,4-dione isoxazoline

Le diabète sucré est une maladie à caractère métabolique caractérisée par une hyperglycémie accompagnée d'une perturbation du métabolisme des carbohydrates, des lipides et des protéines (McIntyre et al., 2019). Les caractéristiques mentionnées du diabète résultent d'une production insuffisante d'insuline dans le cas du diabète de type I ou d'une inefficience de l'action de l'insuline dans le cas du diabète de type II (Marhl et al., 2020). Plusieurs études ont souligné la présence d'une rétinopathie chez environ 15 à 20 % des patients atteints de diabète type II nouvellement diagnostiqués et d'une maladie coronarienne chez 5 à 15 % des patients (Thomas et al., 2019). Plusieurs stratégies sont employées pour la surveillance du diabète dont le contrôle

de l'hyperglycémie postprandiale (Vlachos et al., 2020). Parmi ces agents hypoglycémiant postprandiaux figurent les inhibiteurs d' α -glucosidase et d' α -amylase (Ashraf et al., 2020). Chez l'homme, ces enzymes facilitent la digestion des carbohydrates et de l'amidon afin de produire du glucose susceptible d'être absorbé par l'intestin, ce qui se traduit par une augmentation de la glycémie. L'inhibition de la fonction de ces enzymes chez les patients atteints de diabète de type 2 permettra de réduire l'hyperglycémie (Chenafa et al., 2021).

L' α -amylase (alpha amylases salivaires et pancréatiques) agit sur les carbohydrates à longue chaîne, tandis que les α -glucosidase (maltase glucoamylase et sucrase isomaltase) agissent sur les chaînes d'amidon plus courtes et les disaccharides pour produire du glucose (Zheng et al., 2020). Les inhibiteurs retardent l'hydrolyse des carbohydrates en inhibant ces enzymes digestives, et réduisent ainsi les taux de glucose postprandiaux, ce qui entraîne une amélioration des taux d'HbA1c chez les patients atteints de diabète de type 2 (Kuppusamy et al., 2011). Par conséquent, l' α -glucosidase et l' α -amylase ont été considérées comme une cible privilégiée pour les études pharmaceutiques afin de découvrir et de développer de nouvelles molécules non sucrées susceptibles d'être des inhibiteurs plus efficaces et sans risques. En outre, le potentiel d'inhibition enzymatique amélioré des TZDs avec un noyau arylidène a également été mis en évidence par divers chercheurs (Kaur et al., 2021). Par ce fait, les molécules hybrides basées sur un noyau de thiazolidinedione et d'isoxazoline ont été considérées comme un motif hétérocyclique privilégié pour la conception et le développement d'inhibiteurs d' α -glucosidase et α -amylase plus puissants. L'objectif de Ce chapitre consiste à la mise des dérivés de nouveaux dérivés de thiazolidine-2,4-dione isoxazoline à un screening *in vitro* et *in silico* pour choisir les molécules lead avec le potentiel inhibiteur le plus élevés. Le test consiste à révéler la capacité de chaque molécule à inhiber les enzymes digestives (α -glucosidase et α -amylase). Les études computationnelles ont été présentées par un test d'homologie et docking moléculaire, pour révéler le mécanisme moléculaire potentiel d'interaction du composé le plus actif avec les différents sites actifs de l' α -glucosidase et de l' α -amylase.

i. Test d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase

L'évaluation de l'activité d'inhibition de l' α -glucosidase a été réalisée dans du PBS (0,1M ; KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , pH 6,7), en utilisant le ρ -nitrophényl- α -D-glucoopyranoside (ρ NPG) comme substrat selon la méthode décrite par Kee (Kee et al., 2013) avec quelques modifications. Tous les dérivés du thiazolidine-2,4-dione (**3d**;**3e**;**4d**;**4e**;**5b**;**5c**) ont été solubilisés dans du PBS pour obtenir une gamme de concentrations. Brièvement, un mélange de 150 μL de l'échantillon testé et 100 μL de PBS contenant la solution d'enzyme α -glucosidase (0,1 U/mL) ont été incubés à 37 °C pendant 10 min. Ensuite, 200 μL de ρ -nitrophényl- α -D-glucoopyranoside (1mM) ont été ajoutés au mélange pour initier la réaction. Après une nouvelle incubation à 37 °C pendant 30

min, 1mL de Na₂CO₃ (0,1M) ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée à 405 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{échantillon}}) / (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{contrôle}})] \times 100$$

Où $A_{\text{contrôle}}$ désigne l'absorbance du contrôle (enzyme et tampon) ; $A_{\text{échantillon}}$ désigne l'absorbance du blanc de contrôle (tampon sans enzyme) ; $A_{\text{échantillon}}$ désigne l'absorbance de l'échantillon (enzyme et inhibiteur) ; et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du blanc d'échantillon (inhibiteur sans enzyme). Les valeurs CI_{50} ont été déterminées. L'Acarbose a été utilisé comme contrôle positif.

ii. Test d'inhibition de l'enzyme α -amylase

Le test d'inhibition de l' α -amylase a été réalisé selon le protocole de Fettach (Fettach et al., 2019), avec quelques modifications. Tout d'abord, le substrat a été préparé en dissolvant 200 mg d'amidon dans 25 ml d'hydroxyde de sodium (0,4 M) avec chauffage à 80°C pendant 5 min. Après refroidissement, le pH a été ajusté à $7,0 \pm 0,1$ et le volume final a été complété à 100 ml avec de l'eau distillée. Les différentes concentrations de chaque dérivé du Thiazolidine-2,4-dione (150 μ L) ont été mélangées avec 500 μ L de PBS 0,02 M (pH 6,9, 0,006M NaCl) contenant l'enzyme α -amylase pancréatique humaine (1,5 U/mL) et incubées pendant 10 min à 37°C. L'amidon soluble (0,2%, PBS 0,02M, pH 6,9, 0,006M NaCl) a été ajouté au mélange et incubé à 37°C pendant 10 minutes. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 250 μ l de HCl (1M), suivi de l'ajout de 300 μ L de réactif iodé (5 mM), et l'absorbance a été mesurée à 630 nm. L'activité inhibitrice de l' α -amylase a été exprimée en pourcentage d'inhibition, et les valeurs de la CI_{50} ont été déterminées. L'Acarbose a été utilisé comme contrôle positif.

1.2. Analyse computationnelle des interactions ligand-récepteur et criblage virtuel

Le docking computationnel est un outil attrayant pour comprendre les interactions biomoléculaires des médicaments pour la conception et la découverte rationalisées de médicaments, ainsi que pour l'étude de leurs mécanismes, en plaçant une molécule (ligand) dans le site de fixation préférentiel et spécifique de la région cible de l'ADN/protéine (récepteur) sous la forme d'un complexe stable pour une efficacité potentiellement élevée et une plus haute spécificité (Stanzione et al., 2021). Les informations obtenues par la technique de docking peuvent être utilisées pour déterminer l'énergie de liaison, l'énergie libre et la stabilité des complexes. Actuellement, on utilise ces techniques pour prédire à l'avance les éventuels paramètres de liaison du complexe ligand-récepteur (Bruce et al., 2018).

Le docking moléculaire de molécules sur une cible comprend un choix prédéfini de conformations possibles du ligand dans un site particulier de la cible afin d'établir la forme optimisée du complexe. Ceci peut être rendu possible en utilisant la fonctionnalité de scoring

des programmes utilisés (S. Y. Huang & Zou, 2010). Les spectroscopies infrarouges, la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) sont les techniques d'investigation et d'établissement des structures tridimensionnelles de toute molécule organique/cible biomoléculaire. Ainsi, la modélisation homologique permet de déterminer la structure provisoire des protéines de structure inconnue dont la séquence présente une forte homologie avec une structure connue (Oyedotun & Lemire, 2004). Cela fournit une approche complémentaire pour établir la structure ciblée, qui constitue le point de départ de la découverte *in silico* de médicaments.

i. Modélisation moléculaire par homologie et validation des structures

La modélisation par homologie a été employée pour construire un modèle de structure basé sur une protéine de séquence similaire dont la structure **3D** a déjà été établie (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019). La séquence primaire de 496 et 584 acides aminés de l' α -amylase d'*Homo sapiens* (humain) (P04745, format FASTA) et de l' α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 204508/S288c ; P38158, format FASTA) a été obtenue de la base de données des protéines UniProt Knowledge-base (<http://www.uniprot.org/>). Des itérations de l'algorithme BLAST (PSI-BLAST) ont été effectuées sur la banque de données des protéines (PDB) pour trouver les structures homologues des protéines modèles avec les séquences les plus similaires. Les séquences des protéines cibles et de la protéine modèle ont été alignées dans Discovery studio 3.0 pour comparer la similitude des séquences (Meraj et al., 2012). Sur la base des résultats de l'alignement, le serveur en ligne SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) a été utilisé pour réaliser un modèle d'homologie avec le modèle sélectionné (Arnold et al., 2006). Les deux structures cristallines de l' α -amylase pancréatique complexée avec des malto-oligosaccharides (PDB ID: 1UA3) et de l'isomaltase complexée avec l'isomaltose (PDB ID: **3AXH**) ont été choisies comme modèles de référence pour construire les modèles d'homologie de l' α -amylase et de l' α -glucosidase.

ii. Vérification et validation de modèles homologues

Les structures des modèles homologues obtenues par SWISS-MODEL ont été révisées et validées par différents serveurs web. RAMPAGE a été utilisé pour analyser la conformation des structures des protéines à l'aide du diagramme de Ramachandran (Laskowski, MacArthur, Moss, & Thornton, 1993). ProSA web effectue l'évaluation structurelle et les analyses stéréochimiques du modèle de protéine en comparaison avec les structures obtenues par rayons X et RMN (Wiederstein & Sippl, 2007a). Verify-**3d** détermine la compatibilité d'un modèle moléculaire avec sa séquence d'acides aminés en lui attribuant une classe structurelle basée sur sa localisation et l'environnement de la protéine (alpha, beta, boucle, polaire, non-polaire, etc.) (Eisenberg et al., 1997). ERRAT analyse les statistiques des interactions entre différents types

d'atomes dans une structure. Les structures vérifiées ont été visualisées par le logiciel Discovery Studio Client v16.

iii. Évaluation du docking moléculaire

L'étude de docking moléculaire a été réalisée à l'aide d'AutodockVina (Tagami et al., 2022) pour comprendre le mode et le mécanisme de liaison (Fan et al., 2019). L'homologie modélisée de l' α -amylase et de l' α -glucosidase a été utilisée pour les analyses de docking moléculaire. Les atomes H à caractère polaire ont été ajoutés au récepteur cible pour une ionisation correcte et établir les conditions tautomériques des résidus d'acides aminés. Les sites de liaison potentiels des modèles homologues d' α -amylase et d' α -glucosidase ont été identifiés à l'aide du serveur MetaPocket (B. Huang, 2009). Ces sites identifiés étaient basés sur la structure du récepteur uniquement, sans aucune entrée du ligand. L'AutoGrid a été réalisé pour la préparation de la géométrie du site de liaison en utilisant une grille avec plusieurs points dans la case $(x,y,z) = (60, 60, 60)$, et l'espacement de la case était de $0,375 \text{ \AA}$. Les ligands sélectionnés sont dessinés en utilisant le logiciel Chemdraw12.0 (Cousins, 2011; Hafidi et al., 2019). Afin de sélectionner la conformation la plus stable, la géométrie de ces ligands a ensuite été optimisée en utilisant le champ de force moléculaire (MMFF94) tel que réalisé dans le même logiciel. Les ligands et la protéine cible ont été convertis au format PDBQT afin d'en obtenir un format compatible avec le docking dans AutoDock Vina. Les différentes interactions des complexes protéine-ligand ont été analysées par le logiciel Discovery Studio Client v16.

2. Résultats et discussion

2.1 Activité inhibitrice de l' α -glucosidase *in vitro*

Dans le cadre de la première partie de la thèse visant à développer des nouvelles molécules à pouvoir inhibiteur des enzymes ciblés, les dérivés de la thiazolidine-2,4-dione récemment synthétisés (**3a** à **5c**) ont été examinés pour leur pouvoir inhibiteur *in vitro* de l'enzyme α -glucosidase. L'activité d'inhibition était analysée en fonction du logarithme des concentrations en utilisant une approche de courbe de régression non linéaire à partir de laquelle les valeurs CI_{50} ont été calculées. Tous les composés testés ont présenté une activité inhibitrice importante avec des valeurs de CI_{50} comprises entre $40,67 \pm 1,81$ et $380,10 \pm 1,02 \text{ \mu M}$, par rapport à l'inhibiteur standard la molécule de l'Acarbose ($CI_{50} = 97,12 \pm 0,35 \text{ mM}$) (Tab.1). Les cinq composés **3a**, **3d**, **3e**, **4a**, **4d**, **4e**, **5a**, **5b** et **5c** se sont avérés être les inhibiteurs les plus puissants que les autres composés testés, avec des valeurs de CI_{50} de $98,88 \pm 1,11 \text{ \mu M}$; $116,3 \pm 7,93 \text{ \mu M}$; $84,95 \pm 1,01 \text{ \mu M}$; $98,45 \pm 0,54 \text{ \mu M}$; $101,9 \pm 0,43 \text{ \mu M}$; $43,85 \pm 1,70 \text{ \mu M}$; $92,54 \pm 0,43 \text{ \mu M}$; $48,03 \pm 1,7 \text{ \mu M}$ et $40,67 \pm 1,81 \text{ \mu M}$ respectivement, par rapport au médicament standard, l'Acarbose. En outre, les composés **3b**, **3c**, **4b** et **4c** ont montré une activité inhibitrice modérée

avec des valeurs de CI₅₀ de 380,10 ± 1,11 µM; 339,70 ± 1,02 µM; 156,3 ± 7,93 µM; 120,8 ± 1,10 µM; 207,9 ± 4,76 µM et 211,6 ± 3,25 µM.

Sur la base de ces résultats, et pour développer l'étude de la relation structure-activité (SAR), nous avons divisé les molécules synthétisées en trois groupes : les molécules de **3a** à **3e**, avec différentes substitutions sur le cycle benzénique, le groupe de molécules de **4a** à **4e** obtenues par réaction N-allylation et le groupe de molécules de **5a** à **5c** qui représentent les analogues issues d'une réaction de cycloaddition formant des dérivés isoxazoline-thiazolidine-2,4-diones. Les caractéristiques structurales de ces analogues consistent à un cycle thiazolidine-2,4-dione (TZD), un cycle aryle et un groupe allyle. Toutes ces parties jouent un rôle important dans l'activité biologique, toutefois, une légère variation de la position et de la nature des substituants sur le noyau aromatique de la TZD, pourrait entraîner une grande variation dans l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase. En effet, dans le cadre de l'activité inhibitrice des dérivés de 5-arylidènthiazolidine-2,4-dione du **3a** à **3e**, le composé **3a** (CI₅₀ = 98,88 ± 1,11 µM) avec un cycle benzénique non-substitué a montré une bonne activité dans ce groupe de molécules. Le composé **3d** (CI₅₀ = 116,3 ± 7,93 µM) substitué par un brome en position para du cycle phényle a montré une activité modérée.

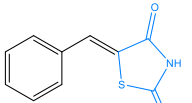
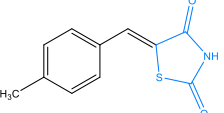
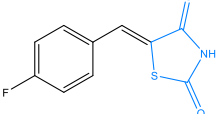
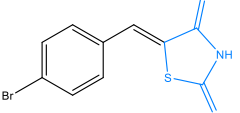
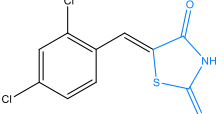
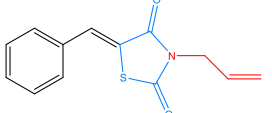
De plus, l'insertion d'un groupe méthyle ou fluor en position para des composés **3b** (CI₅₀ = 380,10 ± 1,11 µM) et **3c** (CI₅₀ = 339,70 ± 1,02 µM), a entraîné une forte diminution de l'activité inhibitrice contre l'enzyme α -glucosidase. Cependant, le composé **3e** (CI₅₀ = 84,95 ± 1,01 mM) substitué par un chlore en positions ortho et para a montré la meilleure activité inhibitrice par rapport au composé **3a** et à l'Acarbose. En général, la présence radical alkyle hydrophobe (Me) ou radicaux possédant des une paire d'électrons non liant (Br) sur le phényle de la molécule 5-arylidènthiazolidine-2,4-dione a réduit l'activité inhibitrice par rapport au phényle non substitué (composé **3a**). Par exemple, le composé **3b** contenant le groupe méthyle donneur d'électrons a montré une activité similaire contre l'enzyme α -glucosidase que le produit **3c** contenant du fluor.

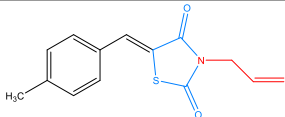
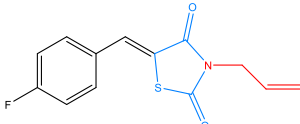
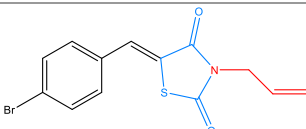
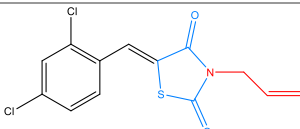
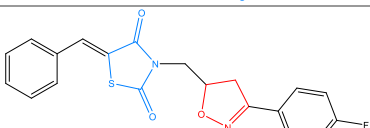
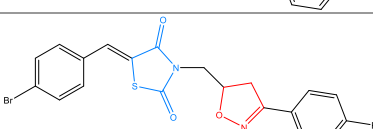
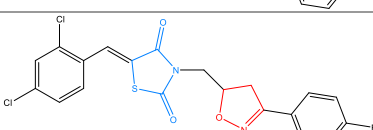
Dans la série de dérivés de N-allyl-5-arylidène-thiazolidine-2,4-dione (**4a-4e**), le composé **4e** (CI₅₀ = 43,85 ± 1,81 µM) avec deux atomes de chlore sur le benzyle en positions ortho et para a montré significativement le potentiel d'inhibition le plus important, en comparaison avec leurs analogues non allylés **3e** et l'Acarbose. En fait, le composé **4e** obtenu par N-allylation s'est avéré être 2 fois plus actif que l'analogue correspondant **3e**. Les composés **4b** (CI₅₀ = 120,8 ± 1,10 µM), **4c** (CI₅₀ = 211,6 ± 3,25 µM) et **4d** (CI₅₀ = 101,9 ± 0,43 µM) obtenus par N-allylation de **3b**, **3c** et **3d**, ont montré une augmentation considérable de l'activité inhibitrice, par rapport à leurs analogues non allylés. Par exemple, le composé **4b** obtenu par N-allylation de **3b** s'est avéré être 3 fois plus actif que l'analogue N- non allylé **3b**. Par conséquent, on peut conclure

que le groupement allyle sur N-3 du système thiazolidine-2,4-dione a montré qu'il jouait un rôle essentiel dans l'augmentation de l'affinité de fixation des molécules (**4a-4e**) sur le site actif de l'enzyme α -glucosidase en entraînant une réduction des valeurs de la CI₅₀ jusqu'à trois fois, par rapport aux composés N-nonallylés (**3a-3e**).

Par ailleurs, en ce qui concerne l'évaluation de l'activité inhibitrice des dérivés de l'isoxazoline-thiazolidine-2,4-dione (**5a-5c**), les composés portant un cycle benzénique avec un substituant halogène ou sans aucune substitution ont montré une bonne activité inhibitrice par rapport à molécule standard. En fait, le composé **5b** (CI₅₀ = 40,67 ± 1,81 μ M) portant un substituant bromo en position para du cycle phényle a montré la meilleure activité inhibitrice. La cycloaddition sur le composé **5a** (92,54 ± 0,43 mM) a entraîné une augmentation de l'activité inhibitrice. De la même manière, le composé **5c** (CI₅₀ = 48,03 ± 1,70 μ M) substitué par un groupe chloro en positions ortho et para a également montré une bonne activité inhibitrice par rapport au composé **5a** et à l'Acarbose. En général, la présence de substituants attracteurs d'électrons (Br ou Cl) sur le phényle de la fraction 5-arylidenthiazolidine augmente l'activité inhibitrice de l'enzyme α -glucosidase (Tab.1).

Tableau 1. Inhibition de l'enzyme α -glucosidase et α -amylase des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c**. SD : écart-type.

Nom du produit	Structure	CI ₅₀ ± SD (μ M)	
		α -glucosidase	α -amylase
3a		98,88 ± 1,11	126,67 ± 2,10
3b		380,10 ± 0,01	286,25 ± 4,30
3c		339,7 ± 1,02	263,73 ± 1,54
3d		116,3 ± 7,93	103,30 ± 4,70
3e		84,95 ± 1,01	47,09 ± 0,04
4a		98,45 ± 0,54	108,14 ± 2,05

4b		120,8 ± 1,10	167,02 ± 0,97
4c		211,6 ± 3,25	195,77 ± 2,14
4d		101,9 ± 0,43	96,48 ± 3,17
4e		43,85 ± ,.06	18,19 ± 0,11
5a		92,54 ± 0,43	7,51 ± 1,06
5b		48,03 ± 1,7	2,28 ± 0,05
5c		40,67 ± 1,81	7,01 ± 0,02
Acarbose		97,12 ± 0,35	2.975 ± 0,01

2.2 Activité inhibitrice de l' α -amylase *in vitro*

En vue de la recherche de nouveaux composés antihyperglycémiques avec une activité d'inhibition enzymatique, nous avons criblé nos composés 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones substitués (**3a-5c**) pour évaluer leurs potentiels inhibiteurs vis-à-vis l'enzyme α -amylase pancréatique. Les concentrations inhibitrices ont été analysées en comparaison avec l'Acarbose, l'inhibiteur standard avec une valeur CI_{50} de $2,97 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Les résultats sont présentés dans le tableau (Tab.1). Parmi les molécules évaluées, les composés **3d**, **3e** ; **4d**, **4e**, **5a**, **5b** et **5c** se sont révélés être les analogues les plus actifs de la série avec un effet inhibiteur important, donnant une valeur CI_{50} de $7,01 \pm 0,02 \mu\text{M}$ à $103,30 \pm 4,70 \mu\text{M}$. En fait, dans le cadre de l'activité inhibitrice des dérivés 5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione (**3a-3e**), l'introduction d'un groupe méthyle (**3b**, $CI_{50} = 286,25 \pm 4,30 \mu\text{M}$), fluor (**3c**, $CI_{50} = 263,73 \pm 1,54 \mu\text{M}$) en position para du cycle phényle s'est avérée être indifférents ou négligeables vis-à-vis de l'affinité envers l' α -amylase par rapport au dérivé non substitué correspondant **3a** ($CI_{50} = 126,67 \pm 2,10 \mu\text{M}$). D'autre part, la présence de deux groupes chlore en position ortho et para (composé **3e**) s'est avérée induire un effet nettement avantageux réduisant la valeur de la CI_{50} à $47,09 \pm 0,04 \mu\text{M}$.

Le groupe allyle sur N-3 de la thiazolidine-2,4-dione s'est avéré jouer un rôle critique dans l'activité inhibitrice des composés (**4a-4e**) de l'enzyme α -amylase en entraînant une réduction des valeurs IC_{50} jusqu'à deux fois par rapport aux composés N-nonallylés (**3a-3e**). Parmi les inhibiteurs N-allylés, les composés **4a** ($IC_{50} = 108,14 \pm 2,05 \mu M$), **4b** ($IC_{50} = 167,02 \pm 0,97 \mu M$), **4c** ($IC_{50} = 195,77 \pm 2,14 \mu M$) et **4d** ($IC_{50} = 96,48 \pm 3.17 \mu M$), les différences de valeurs d' IC_{50} étaient importantes, en comparaison avec leurs analogues N-nonallylés **3a** ($IC_{50} = 126,67 \pm 2,10 \mu M$), **3b** ($IC_{50} = 286,25 \pm 4,30 \mu M$), **3c** ($IC_{50} = 263,73 \pm 1,54 \mu M$) et **3d** ($IC_{50} = 103,30 \pm 4,70 \mu M$), respectivement. En fait, le dérivé N-allylé **4e** ($IC_{50} = 18,19 \pm 0,11 mM$) avec deux groupes chlore en positions ortho et para s'est avéré être le plus actif de ce groupe et a été trouvé 2 fois plus actif que son analogue N-nonallylé correspondant **3e**. Nos résultats démontrent que la substitution du cycle phényle par deux groupes chlore en position ortho et para et la N-allylation du cycle thiazolidine-2,4-dione sont très étroitement liées à la capacité de ces composés à inhiber les enzymes α -glucosidase et α -amylase.

Même dans l'inhibition de l'enzyme glucosidase (Fig.6), les halogènes substitués sur le cycle phényle dans différentes positions ont montré des effets inhibiteurs importants de l' α -amylase. En fait, comparé à l'activité inhibitrice de la 5-arylidenthiazolidine-2,4-dione-isoxazoline non substituée **5a** ($IC_{50} = 7,51 \pm 1,06 \mu M$), le pouvoir inhibiteur a été amplifié par l'introduction d'un groupe brome (**5b**, $IC_{50} = 7,01 \pm 0,01 \mu M$) en position para du cycle phényle et d'un groupe chlore (**5c**, $IC_{50} = 2,28 \pm 0,05 \mu M$) en positions para et ortho du cycle phényle. Ces résultats confirment clairement que la présence de substituants attracteurs d'électrons (Br ou Cl) sur le cycle phényle a induit un effet avantageux clair réduisant la IC_{50} par rapport au phényle non substitué, en accord avec les résultats trouvés dans le test de l' α -glucosidase.

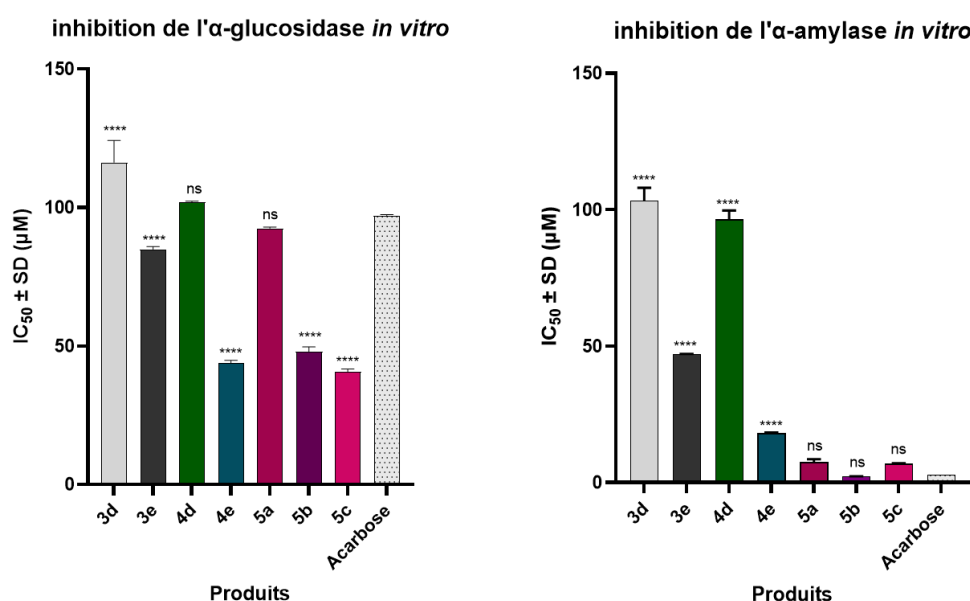


Figure 6: Comparaison de l'activité inhibitrice des α -glucosidases et α -amylase des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione (**3a-5c**). Les valeurs moyennes sont présentées et les barres représentent les écarts types (n = 6). * à **** : représentent le degré de signification (P<0,05)

2.3 Validation de modèles homologues

L'alignement des séquences cibles (**Fig.7**) des enzymes α -amylase et α -glucosidase ont été fait avec les structures cristallines de l' α -amylase pancréatique (PDB ID : 1UA3) et de l'iso-maltase (α -amylase) (PDB ID:**3aXH**) respectivement. D'après les résultats de l'alignement, l'identité et la similarité de séquence ont été de 86,90 % (71,60 %) et 92,10 % (87,2 %) respectivement pour les cibles α -amylase/ α -glucosidase. Doolittle a montré qu'une identité de séquence supérieure à 20% révèle presque toujours une relation structurelle (Doolittle, 1981).

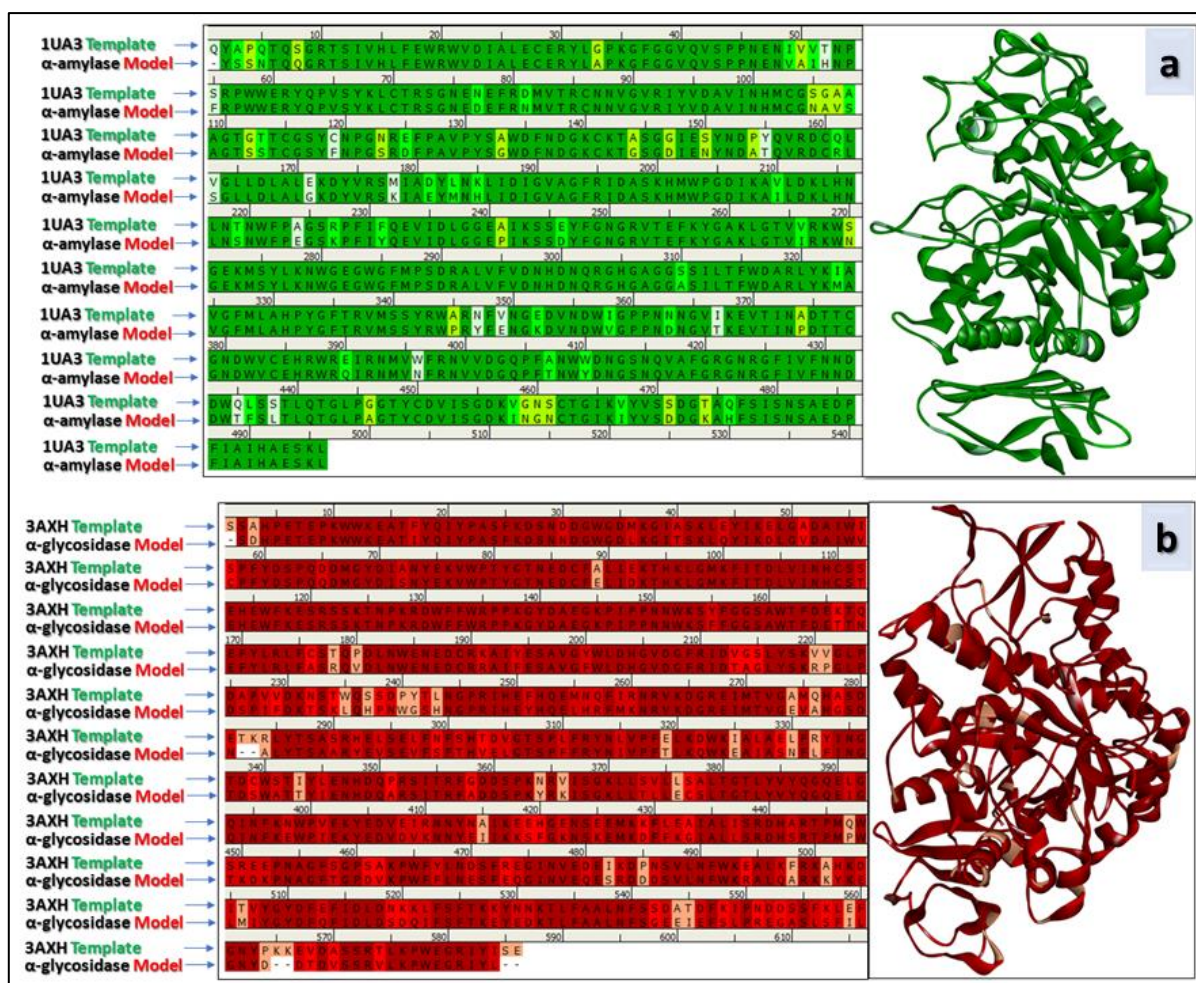


Figure 7. Alignement des séquences 1D et **3d** de (a) l' α -amylase et (b) l' α -glucosidase avec le modèle sélectif (PDB:1UA3) et (PDB:**3aXH**).

La qualité du modèle d'homologie sélectionné a été évaluée en calculant le RMSD des structures cibles et du modèle superposé (**Fig 8**), les tracés de Ramachandran, ProSA (z score), et Verify-**3d**. Les valeurs de RMSD obtenues via le serveur PDBeFOLD (Dhanavade et al., 2015), pour les structures superposées sont de 0.08Å et 0.13Å pour l' α -amylase et l' α -glucosidase. Suggérant ainsi une bonne similarité entre les modèles homologues et leurs modèles de référence.

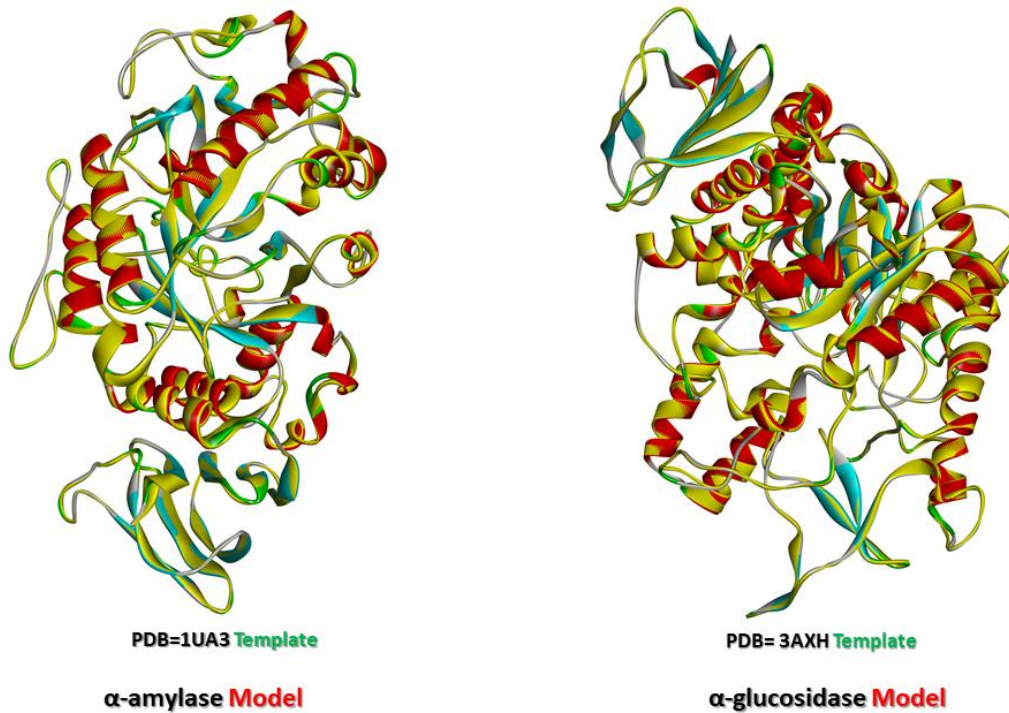
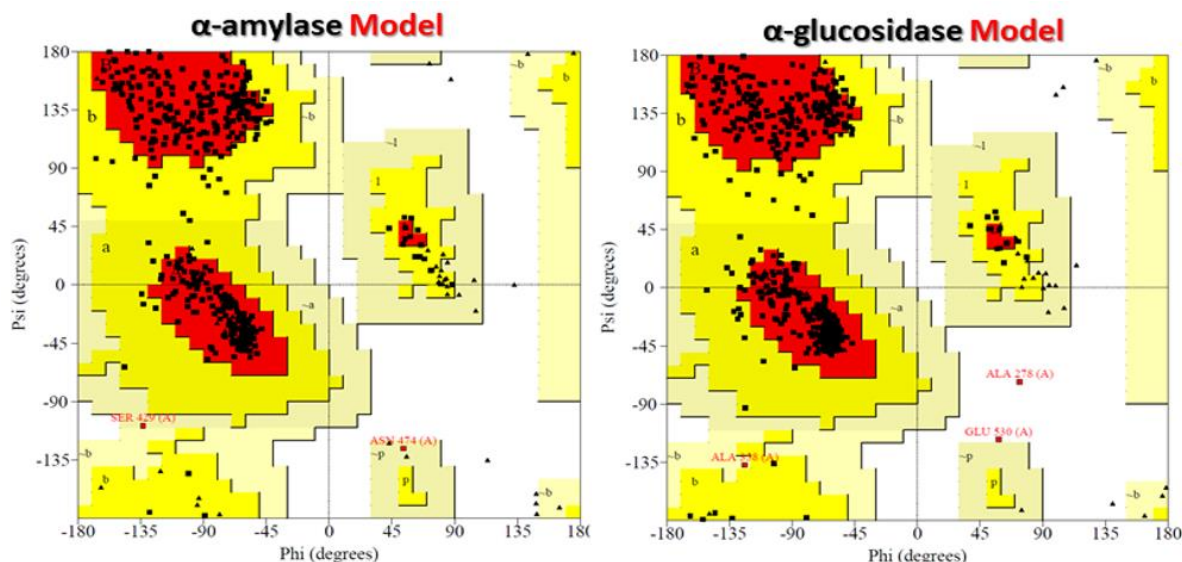


Figure 8. Structures superposées de (a) α -amylase et (b) α -glucosidase avec le model sélectif (couleur jaune) (PDB:1UA3) et (PDB:3aXH).

Les résidus d'acides aminés dans les régions favorisées de la carte de Ramachandran sont l'un des meilleurs moyens d'analyser la performance des protéines modélisées (Najibi et al., 2017)), plus le ratio de résidus d'acides aminés se trouvant dans les régions favorisées, plus la qualité stéréochimique d'une protéine sera bonne. L'analyse PROCHECK (Laskowski, MacArthur, Moss, Thornton, et al., 1993) des deux modèles construits par SWISS-MODEL montre que \approx 89% des résidus se trouvent dans les régions les plus favorisés, 10% des résidus dans les régions autorisées supplémentaires et 0,2-0,5% des résidus dans les régions généreusement autorisées (Fig.8). Par conséquent, le total 100% et 99,6% des résidus ont été trouvés dans les régions favorisées pour l' α -amylase et l' α -glucosidase respectivement et seulement 0,4% des résidus sont observés dans la région extérieure pour l' α -glucosidase, ce qui suggère la bonne qualité des deux modèles homologues (Fig.9).



Statistiques du graphique de Ramachandran	Residues	
	α-amylase	α-glucosidase
Résidus dans les régions les plus favorisées [A, B, L]	89,5	89,3
Résidus dans les régions supplémentaires autorisées [a, b, l, p]	10,0	10,2
Résidus dans les régions généreusement autorisées [a, b, l, p]	0,5	0,2
Résidus dans les régions non autorisées [xx]	0,0	0,4
Nombre de résidus non-glycine et non-proline	420	512
Nombre de résidus terminaux (à part de Gly et Pro)	2	2
Nombre de résidus de glycine	51	37
Nombre de résidus de proline	22	28
Nombre total de résidus	495	579

Figure 9. Graphique de Ramachandran et statistiques des protéines α -amylase et α -glucosidase prédites.

L'outil PROSA a été utilisé pour vérifier la qualité des modèles par deux caractéristiques qui sont dérivées et affichées sur la page ProSA-Web : le z-score et le graphique de ses énergies résiduelles (Wiederstein & Sippl, 2007b). Le z-score indique la qualité globale du modèle et mesure la déviation de l'énergie totale de la structure par rapport à une distribution d'énergie dérivée de conformations aléatoires. Les valeurs de z-score fondées pour les modèles construits d' α -amylase et d' α -glucosidase étaient respectivement de -9,73 et -11,05. Selon les graphiques de Z-score de la figure, les structures de l' α -amylase et de l' α -glucosidase sont situées dans les zones acceptables pour les études de résolutions de rayons X (Fig.10).

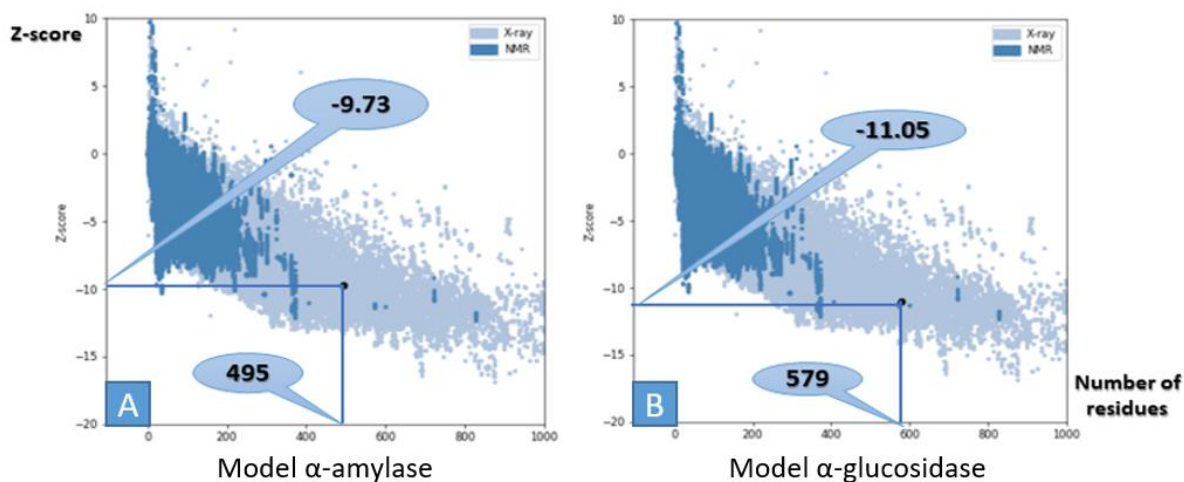


Figure 10. Z-score de ProSA du modèle prédit de la protéine α -amylase et α -glucosidase.

En outre, un autre outil caractéristique également fourni par le serveur web de PROSA est une représentation graphique de l'énergie en fonction de la position de la séquence d'acides aminés. Les valeurs d'énergie positives correspondent à des anomalies ou des erreurs qui font partie d'un modèle. L'analyse PROSA du modèle de l' α -amylase et de l' α -glucosidase donne une énergie d'interaction négative pour la plupart des résidus et très peu de résidus ont une énergie d'interaction positive (Fig.11). Globalement, les analyses PROCHECK et PROSA ont montré les bons résultats du modèle construit par SWISS-MODEL. Il est donc utilisé pour des analyses ultérieures.

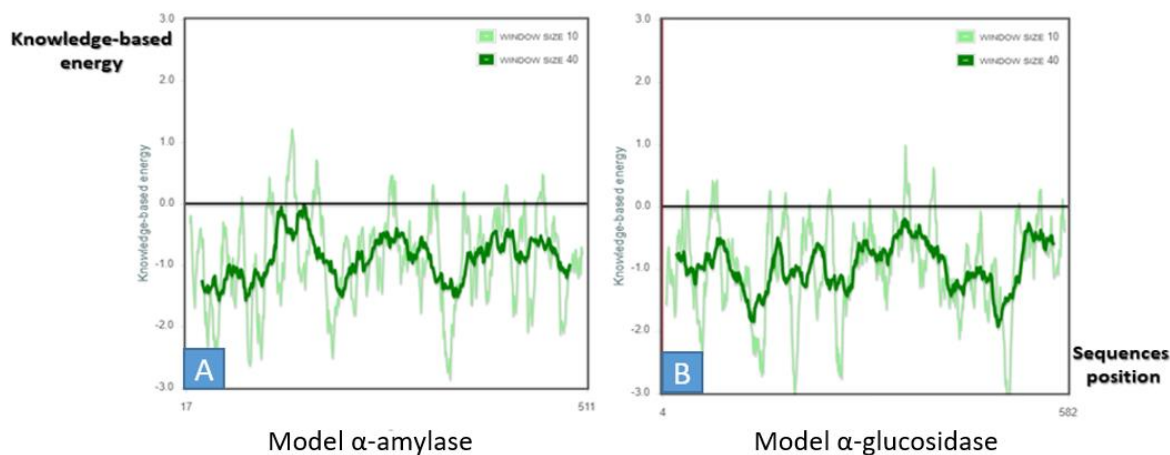


Figure 11. Tracés d'énergie du modèle prédit de la protéine α -amylase et α -glucosidase.

Alors que les méthodes de détermination expérimentale et informatique de la structure tridimensionnelle des protéines se développent, un problème persistant est de savoir comment vérifier que le modèle final de la protéine est correct. Un test efficace de l'exactitude d'un modèle de protéine **3d** est la compatibilité du modèle avec sa propre séquence d'acides aminés, mesurée par un profil **3d**. Le score de compatibilité supérieur à zéro dans le graphique VERIFY-

3d correspond aux conditions d'acceptabilité du modèle construit. Le score du profil du modèle d'homologie (Fig.12) était de 97,17% et 95,16% pour l' α -amylase et l' α -glucosidase respectivement. Ce qui signifie que 97,17% et 95,16%, des résidus respectivement, avaient un score moyen **3d** - 1D de $\geq 0,2$. Les résultats obtenus à partir des méthodes de validation ci-dessus ont révélé que les α -amylase et α -glucosidase prédites sont satisfaisantes et sont fiables pour des études ultérieures. Par conséquent, les modèles construits ont été utilisés pour les études de docking et la simulation MD.

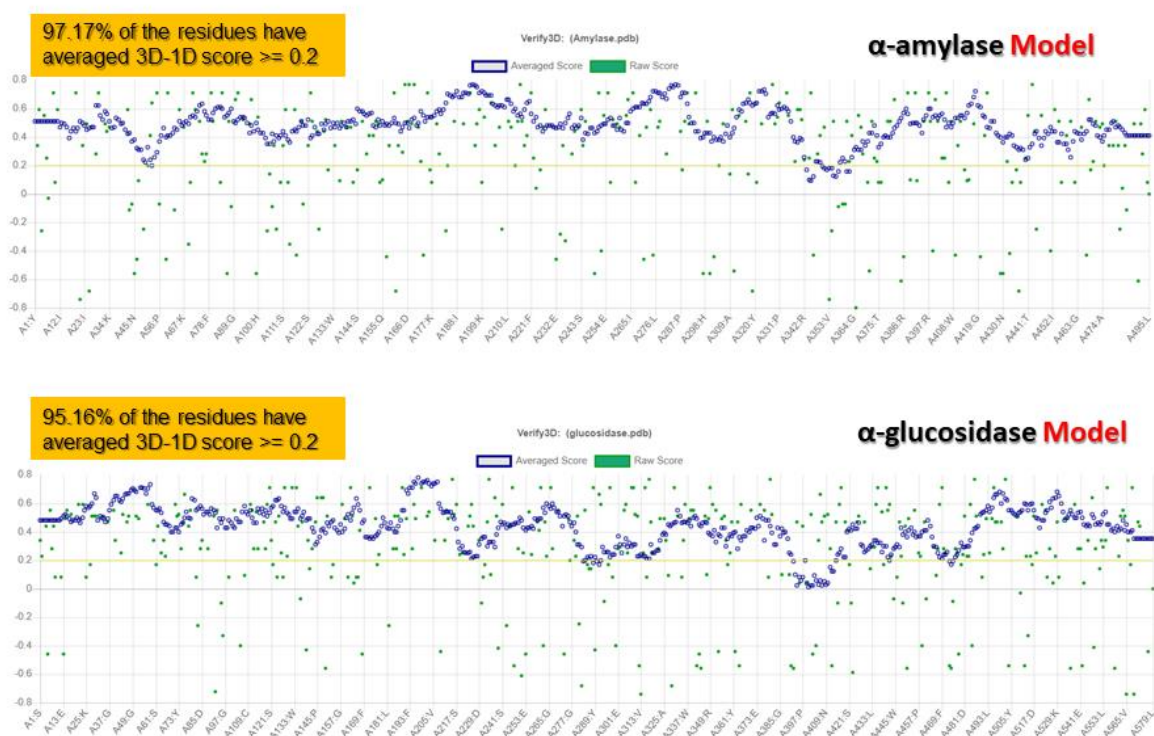


Figure 12. Vérification-**3d** du modèle prédit de la protéine α -amylase et α -glucosidase.

2.4 Évaluation du docking moléculaire

Le docking moléculaire a été considéré comme une méthode de calcul performante dans la conception de médicaments en se basant sur leurs structures, capable de prédire l'affinité de liaison des nouvelles molécules les sites de liaison de la cible réceptrice, ainsi que de caractériser les différents modes de liaison. Les composés synthétisés ont montré de bonnes valeurs d'énergie de liaison contre les deux protéines α -amylase et α -glucosidase prédites, comme le montrent le tableau (Tab.2). Il a été observé que la majorité des composés présentaient une énergie libre de liaison élevée entre -6 et -11 kcal/mol.

Les ligands analogues étudiés ont montré de bonnes interactions prometteuses (2D et **3d**) avec différents résidus d'acides aminés des sites actifs et les résultats sont présentés dans les figures (Fig.13, 14,15 et 16). L'analyse des modalités de fixation a montré que les molécules

synthétisées sont stabilisées par plusieurs interactions, notamment des interactions polaires, hydrophobes, électrostatiques et des liaisons hydrogène.

Nous pouvons voir dans le tableau que les composés **3a**, **3b**, **3c**, **3d** et **3e** de la série 1 présentent les mêmes catégories d'interaction (interactions hydrogène et hydrophobes) avec les mêmes résidus : ARG195, HIS299, ASP300, LEU165 et, TYR62. Les deux interactions hydrophobes supplémentaires de type Pi-Alkyl ont été observées entre **3b** et la TRP95, ce qui est essentiellement dû à l'existence dans sa structure moléculaire d'un groupement méthyle (-CH₃). Le groupement halogène (Fluor) ne manifeste aucune modification concernant le nombre et le type d'interaction, dans la structure de **3c**.

Le groupement fluor affecte seulement la distance d'interaction contre le même résidu présenté dans le mode d'interaction de **3a**. La contribution de l'atome de soufre a été observée uniquement dans les modes d'interaction de **3d** et **3e** contre les résidus TRP58, TYR62, HIS299 et ASP197. La seule interaction électrostatique a été observée pour le **3d** contre le résidu ASP300. De plus, les groupes halogènes Br et Cl apparaissent dans la structure chimique du **3e** et le **3d** participe à l'interaction hydrophobe contre les résidus suivants TRP59, TYR62, LEU165 et LEU162.

Tableau 2. Energies de liaison, nombre de liaisons hydrogène et interaction hydrophobe des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione 3d;3e;4d;4e;5b;5c et le médicament de référence dans les sites de liaison actif des enzyme l' α - amylase et de l' α glucosidase

Nom des produits	Énergie libre (Kcal Mol ⁻¹)	Nombre des liaisons hydrogènes	Nombre d'interactions hydrophobes
Enzyme α-amylase			
3a	-7.1	3	2
3b	-7.5	3	4
3c	-7.3	3	2
3d	-7.2	0	5
3e	-8	2	5
4a	- 8	4	4
4b	-7.5	2	3
4c	-8	2	3
4d	-7.3	0	5
4e	-8.5	0	4
5a	-7.5		
5b	-10.8		
5c	-10.2		
Acarbose	-10.4	7	0

Enzyme α -glucosidase			
3a	-6.3	3	0
3b	-6.3	3	5
3c	-6.3	2	0
3d	-6.2	1	3
3e	-6.1	1	3
4a	-7.5	0	3
4b	-6.8	0	4
4c	-7.7	3	2
4d	-6.6	0	8
4e	-6.8	0	6
5a	-6.8		
5b	-8.2		
5c	-9		
Acarbose	-11.4	15	2

Le **3d** ne présente aucune interaction hydrogène, en revanche, deux interactions hydrogène ont été observées dans le mode d'interaction du **4d** contre le résidu ASP300 et HIS299. D'après le tableau ([Annexe](#)), en comparaison avec la structure moléculaire **4a**, l'ajout d'un groupe méthyle (-CH₃) dans la structure de **4b** affectant une diminution de la participation des deux groupes Ethylène (C=C) et phényle (Cycle(C₆)) dans l'interaction hydrophobe. De plus, la structure moléculaire de **4b** favorise la contribution de l'atome de soufre à trois interactions Pi-soufre avec les résidus TRP58, TYR62 et HIS299. Deux liaisons hydrogène ont été observées dans le mode d'action de **4c**, dans lesquelles le carbonyle (C=O) et H (CH₂) sont en rapport avec ARG195 et GLU233. Par rapport à **4b**, la même interaction Pi-soufre avec le même résidu a été observée dans l'interaction de **4c**. De plus, des interactions hydrophobes ont été observées dans les modes d'interaction **4d** et **4e** contre les résidus TRP59, ALA198, LEU162 et LEU165.

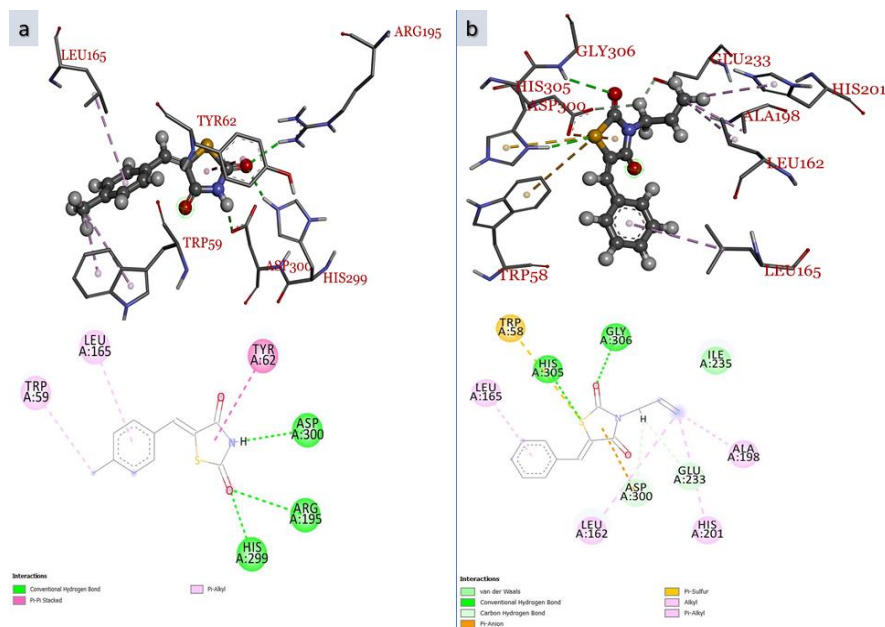


Figure 13. Interaction ligand-récepteur pour le ligand (a = **3b**, b = **4a**) qui présente le plus d'interactions hydrogène pour l'enzyme cible α -amylase modélisée par homologie

Nous pouvons voir dans le tableau (Annexe), face à l' α -amylase que les ligands **5a**, et **5c**, présentent les mêmes catégories d'interaction (liaison hydrogène conventionnelle et Pi-Soufre) avec les mêmes résidus : ARG210, HIS314 et TRP74. A l'inverse, dans le mode d'interaction de **5b**, aucun de ces deux types d'interaction n'a été observé. Par comparaison de la structure moléculaire, l'ajout d'un groupe halogénure (Br) dans la structure de **5b** affecte la participation des groupes soufre et fluor dans les modes d'interaction du ligand **5b**, d'autre part l'existence des deux atomes de chlore (Cl) dans la structure de **5c** entraîne une augmentation du nombre de type d'interactions hydrophobes contre les résidus suivants : TRP74, ILE66 et VAL122.

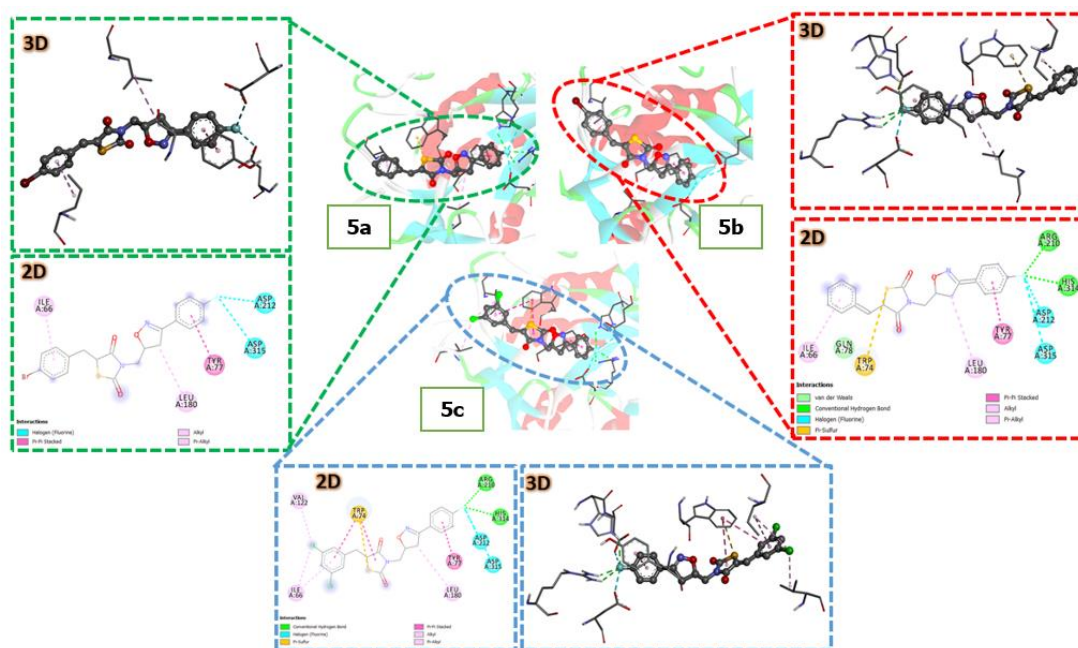


Figure 14. Interactions tridimensionnelles (**3d**) et bidimensionnelles (2D) les plus étroites entre les résidus du site actif de la protéine α -amylase modélisée par homologie avec **5a**, **5b** et **5c**

D'après le tableau (*Annexe*), tous les ligands de la série 1 présentent différentes interactions, des liaisons hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques et halogènes avec différents résidus d'acides aminés. La présence de $-\text{CH}_3$ dans la structure de **3b** freine l'interaction de deux groupements actifs communs S (soufre) et l'hydrogène de NH, par contre, ces deux groupements participent aux interactions pour les ligands **3a** et **3c**. L'absence de la contribution du site NH a été relevée dans le model d'interaction **3d** et **3e**. Les molécules **3d** et **3e** présentent une seule interaction hydrogène dans laquelle le groupe carbonyle est en interaction avec le résidu ARG552. La contribution de Br et du Cl pour le **3d** et **3e** est exprimé plus par des interactions hydrophobes contre l' α -glucosidase. Parmi les produits de la série, la molécule **3b** est celle qui réalise le plus d'interaction hydrogène avec les différents résidus ASP232, ASN496 et SER497. Par rapport à la **3a**, la présence du groupe méthyle dans la structure moléculaire de la **3b** augmente le nombre d'interactions hydrophobes avec différents résidus PHE476, ALA231 et ILE233.

Selon le tableau (*Annexe*), parmi les ligands de cette série, le **4c** avec un groupe Fluorine est le seul qui a contribué à trois liaisons hydrogène avec les résidus ARG552 et ASP469. La contribution du groupe C=C dans les interactions hydrophobes a été observée dans les modes d'interaction de tous les molécules. Pour **4d** et **4e**, leur mode d'interaction ne présente aucune interaction hydrogène, la présence de Br et Cl dans les deux structures de **4d** et **4e** augmente précisément leur caractère d'interaction hydrophobe. La seule interaction halogène a été observée du ligand **4c** contre les résidus ASP357 et ASP469.

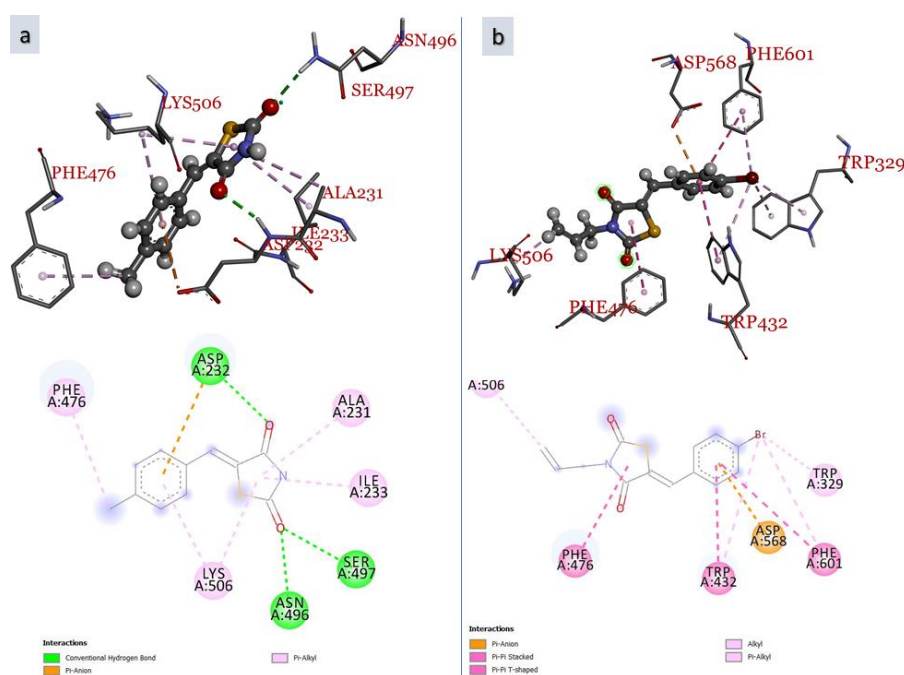


Figure 15. Interaction ligand-récepteur pour le ligand (a = **3b**, b = **3d**) qui présente le plus d'interactions hydrogène pour l'enzyme cible α -glucosidase modélisée par homologie

D'après le tableau ([Annexe](#)), contre l' α -glucosidase, les trois ligands présentent, dans leur mode d'interaction différentes interactions avec différents résidus. De plus, les groupes halogènes Br et Cl apparaissent dans la structure chimique de **5b** et **5c** ne participe que dans l'interaction hydrophobe contre les résidus suivants ARG312, PHE157, TYR313, et TRP242. la seule interaction halogène a été observée pour **5c** contre le résidu PHE157.

D'après le caractère des ligands testés contre les deux enzymes, nous pouvons construire une idée générale concernant la contribution par laquelle chaque groupement a participé aux modes d'interaction. A partir des résultats présentés dans les Tableaux ([Annexe](#)) des résultats de docking, nous constatons qu'au niveau du squelette carboné commun entre tous les ligands, les deux sites de noyaux à 6 et 5 atomes de carbones participent dans la majorité des cas aux interactions de type hydrophobe, parfois nous pouvons voir leur contribution dans les interactions de type Pi-anion. La substitution de l'hydrogène sur l'atome d'azote par un groupe propène conduit à une diminution de la participation du squelette carboné commun dans les interactions de type hydrogène, mais cette substitution a un rôle très important pour augmenter le nombre d'interactions hydrophobes contre les nombreux résidus dans les deux cibles enzymatiques. Parmi les groupes halogènes (Br, Cl et F), seul le fluor présente les types d'interactions halogènes précisément avec l'enzyme α -amylase pour les ligands **3c** et **4c**, les autres halogènes tels que le bromure et le chlorure ont pour principale contribution des interactions hydrophobes dans les poches protéiques des deux enzymes pour les molécules **3d**, **3e**, **4d**, **4e**, **5b** et **5c**.

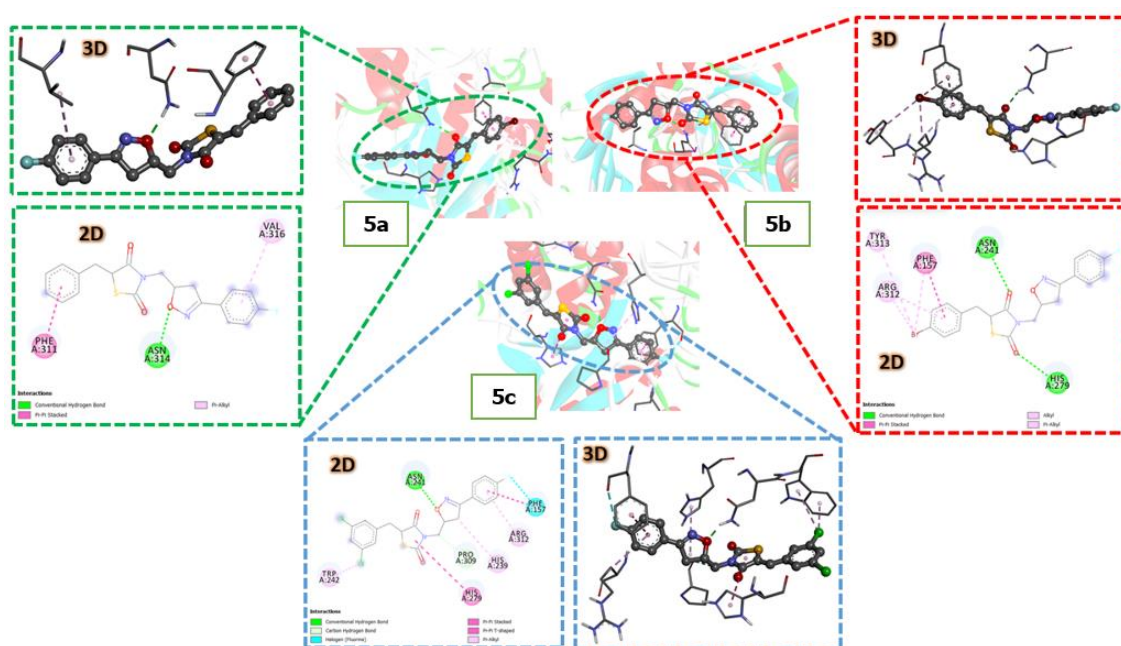


Figure 16. Interactions tridimensionnelles (**3d**) et bidimensionnelles (2D) les plus étroites entre les résidus du site actif de la protéine α -glucosidase modélisée par homologie avec **5a**, **5b** et **5c**

Il est important de mentionner ici que les résidus Asp197, Glu233 et Asp300 ont été observés dans les modes d'interaction de certaines molécules contre la cible de l'enzyme α -amylase, chaque résidu parmi ceux mentionnés ayant un rôle très important dans le mécanisme d'inhibition, selon les travaux de Rydberg et Zhang (Rydberg et al., 2002; R. Zhang et al., 2009). Pour le résidu Asp197, il a été précédemment rapporté comme catalyseur nucléophile dans les réactions d'hydrolyse de substrats polymères comme l'amidon alimentaire, de plus (Rydberg et al., 2002; R. Zhang et al., 2009), le résidu Asp300 a été identifié comme intervenant dans l'optimisation de l'orientation de la molécule de substrat en utilisant l'interaction de liaison hydrogène et comme régulateur de conformation stérique pour une meilleure liaison du substrat (Williams et al., 2012). Le dernier résidu Glu233 est connu pour agir comme un catalyseur acide-base pendant les réactions d'hydrolyse du substrat (Li et al., 2005; Williams et al., 2012).

**Etude de la toxicité aigüe *in vivo* des
dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-
dione et évaluation de l'hépatotoxicité *in
vitro* sur des cellules HepG2**

Présentation :

Cette partie concerne l'évaluation primaire de la toxicité des molécules avec le meilleur pouvoir inhibiteur de l'enzyme α -glucosidase et α -amylase. En tant que partie essentielle du processus de développement des médicaments, l'évaluation de la toxicité fournit des données pour soutenir la réalisation de tests pharmacologiques *in vivo* afin de permettre l'évaluation du risque par rapport au bénéfice potentiel des nouvelles molécules synthétisées sur les animaux soumis aux expérimentations. La toxicité étudiée des dérivés de la thiazolidine-2,4-dioneisoxazolines sera évaluée en soumettant les molécules sélectionnées à partir des essais enzymatiques réalisés, à une étude de la toxicité aiguë *in vivo*, sur des souris afin de déterminer la dose létale d'un composé (DL_{50}), et à des tests *in vitro* portant sur des lignées de cellules hépatiques (HepG2) afin d'évaluer les effets d'hépatotoxicité des molécules TZD sélectionnées en utilisant le test MTT.

1. Matériel et méthode :

1.1 Évaluation de la toxicité *in vivo* des dérivés de Thiazolidine-2,4-dione

i. Animaux

Des souris albinos suisses (20-25g), sont élevées dans l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Maroc. Les animaux ont été maintenus dans des conditions de laboratoire standard, avec de l'eau et de la nourriture standard *ad libitum*, sous un cycle de 12h de lumière/12h d'obscurité, à une température de 21 à 23°C. Les expériences ont été menées conformément aux principes établis dans le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" élaboré par la National Academy of Sciences et publié par les National Institutes of Health. Tous les efforts ont été faits pour minimiser la souffrance des animaux et le nombre d'animaux utilisés.

ii. Test de la toxicité aiguë

L'étude de toxicité aiguë par voie orale a été réalisée en conformité avec la ligne directrice 423 (OCDE) de l'Organisation de coopération et de développement économiques. Sept groupes de souris albinos suisses mâles (n=6), sélectionnés par échantillonnage aléatoire, ont été utilisés pour l'étude de toxicité aiguë. Les animaux ont été maintenus à jeun pendant 12h avant et 2h après l'administration orale, en leur fournissant uniquement de l'eau. Après l'administration des solutions aqueuses (0,5% DMSO) de chaque dérivé des TZD à une dose maximale de 2000 mg/kg, les animaux ont été observés attentivement pendant les 3 premières heures afin de détecter toute manifestation toxique telle que l'augmentation de la fréquence des mouvements, la salivation, les convulsions cloniques, le coma et la mort. Des observations ultérieures ont été faites à intervalles réguliers pendant 24 h. L'observation des variations de poids, de taux de

mortalité, de comportement de chaque animal et des signes de toxicité ont été suivies durant les 14 jours qui suivent l'administration pour déceler d'éventuels effets retardés (Botham, 2004).

1.2 Évaluation de l'hépatotoxicité *in vitro* des dérivés de Thiazolidine-2,4-dione

En général, l'hépatotoxicité des thiazolidine-2,4-diones est la principale cause du rejet de leur utilisation comme étant des antidiabétiques oraux, d'où le grand intérêt à comprendre le risque des dérivés nouvellement synthétisés à causer des dommages hépatiques. Les tests d'hépatotoxicité/cytotoxicité ou ce qu'on appelle les tests de viabilité cellulaire fournissent un moyen de mesurer la nécrose cellulaire due à l'effet cytotoxique des composés testés. L'utilisation la plus courante des études de viabilité cellulaire consiste à déterminer la CI50 d'un composé cytotoxique dans une culture cellulaire. Cependant, il existe de nombreux cas où vous avez besoin de savoir si vos cellules sont encore vivantes. Dans ce contexte, les grandes entreprises pharmaceutiques, utilisent pour les études de viabilité cellulaire, le test MTT pour les composés cytotoxiques en tant que méthode standard à haut débit. Le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) mesure la prolifération et la cytotoxicité dans le cas des criblages à haut débit dans des plaques à 96 puits. Généralement, les sels de tétrazolium sont des solutions incolores ou faiblement colorées qui, après réduction, se transforment en un produit formazan fortement coloré (Meerlo et al., 2011). La réduction du sel MTT en cristaux de couleur formazan est basée sur l'activité métabolique des cellules vivantes qui se produit uniquement dans les cellules viables par des enzymes mitochondriales comme les oxydoréductases, les déshydrogénases, les oxydases et les peroxydases utilisant le NADH, le NADPH, le succinate ou le pyruvate comme donneur d'électrons (Stockert et al., 2012). Les protocoles de dosage basés sur le MTT comprennent généralement une étape de lyse cellulaire et une étape de dissolution du formazan avant que la mesure spectrophotométrique puisse être effectuée.

i. Lignées cellulaires et mise en culture

Des cellules du carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) ont été fournies par l'Institut de pathologie (Faculté de médecine de l'Université de Mannheim, Heidelberg, Germany) et cultivées dans un incubateur à conditions standard de température (37 °C), CO₂ (5 %) et humidité (95 %) dans du milieu α -MEM. Ce dernier a été supplémenté par 10 % du sérum foetal bovin inactivé par la chaleur, 2 mM de glutamine, 50 U/ml de pénicilline G et 50 g/ml de sulfate de streptomycine. La mise en subculture a été effectuée par trypsination (0,25 %). Le nombre de cellules a été compté à l'aide d'un hématocytomètre, et la viabilité était toujours supérieure à 80 % dans toutes les tests, montrée par la méthode d'exclusion au bleu trypan. Les dilutions

des dérivés à testés étaient préparées dans du milieu de culture juste avant leur utilisation. Dans tous les tests, la concentration finale du DMSO ne dépassait pas 0,1% (v/v), soit une concentration non toxique sur les cellules. La même concentration était présente dans le groupe témoin.

ii. Dose/Effet des thiazolidine-2,4-dione isoxazolines sur la croissance de cellules HepG2

L'effet cytotoxique des composés sur la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) a été analysé par le test colorimétrique au bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT) comme décrit (Meerlo et al., 2011). En bref, les cellules en phase de croissance exponentielle ont été placées dans des plaques de 96 puits à une densité cellulaire de 8000 cellules/puits dans 0,1 ml de milieu. Après 24 h, 100 µl de milieu frais, contenant une série de concentrations allant de 250 à 12,5 µM de chaque dérivés testés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** (dissous dans le DMSO 0,1%) ont été ajoutés en duplicata aux cellules et incubés pendant 72 h à 37 °C. À la fin du traitement, 10 µl de MTT (5 mg/mL) ont été ajoutés à chaque puits, et les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 4 h. Le précipité de formazan MTT bleu violet a été dissous dans 100 µl de DMSO. Le MTT réduit a été quantifié par spectrophotométrie à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les cellules non traitées ont été considérées comme un contrôle négatif. Les concentrations induisant une inhibition de 50 % de la croissance cellulaire (CI₅₀) ont été déterminées graphiquement à l'aide de l'algorithme de redressement de courbe du logiciel GraphPad Prism 9.0. Les modifications de la morphologie ont été observées au microscope inversé pour déterminer les changements induits par les composés testés dans les cellules HepG2 exposées. Les images cellulaires ont été saisies à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (Olympus) à un grossissement de 20x.

2. Résultats et discussion

2.1 Test de toxicité aiguë par voie orale

Les résultats présentés dans le Tableau (Tab.3) résumant la toxicité aiguë des dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione isoxazolines sur des souris swiss pour enregistrer leur létalité durant 14 jours de test suite à une administration unique de chaque solution à une dose maximale de 2000 mg/kg. Les animaux présentaient une diminution de l'activité locomotrice après l'administration par quelques minutes, des composés **4d**, **5d** et **5e**, et reviennent à leurs états normaux après 10 à 20 minutes. Cependant, les composés **3d**, **3e** et **4e** n'ont provoqué aucune réaction neurotoxique évidente et aucun décès aux doses testées. Le suivi du poids corporel n'a présenté aucune diminution significative pour tous les produits. Par conséquent, les doses létales orales de ces produits sont supérieures à 2000 mg/kg.

Tableau 3. Effets des dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione sur la variation du poids corporel de souris suisses à une dose de 2000 mg/kg. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6).

Produits	Dose (mg/kg)	Poids corporel (g)		
		Poids initial (1er jour)	Poids final (14e jour)	Variation du poids
3d	2000	28,58 \pm 2,40	33,13 \pm 3,05	+ 4,55
3e	2000	29,99 \pm 1,88	32,67 \pm 0,95	+ 2,48
4d	2000	27,63 \pm 2,08	30,10 \pm 1,98	+ 2,47
4e	2000	28,82 \pm 1,82	31,23 \pm 0,86	+ 2,41
5b	2000	25,10 \pm 3,32	30,51 \pm 2,07	+ 5,41
5c	2000	27,83 \pm 2,18	31,95 \pm 1,18	+ 4,12
Control group	véhicule	27,68 \pm 3,53	29,63 \pm 3,08	+1,95

2.2 Hépatotoxicité *in vitro* des dérivés de Thiazolidine-2,4-dione

En analysant les composés pour leur hépatotoxicité potentielle, nous observons que tous les dérivés ne présentent pas d'impact d'inhibition de la croissance et développement des cellules hépatiques, aux concentrations testées, avec des CI_{50} supérieurs à 200 μ M, alors que le composé **3d** présente une faible inhibition de la croissance cellulaire sur les cellules HepG2 ($CI_{50} = 191,6 \pm 2,07 \mu$ M). La solubilité limitée des composés nous a empêché d'évaluer la cytotoxicité à des concentrations plus élevées. Sur la base des valeurs individuelles de la CI_{50} , nous concluons à l'intérêt de ces composés qui ont été observés comme ayant un pouvoir antihyperglycémique très intéressant sans présenter d'effet d'hépatotoxicité (Fig.17). De plus, les atteintes cellulaires induites par les molécules testées, ont été suivies pour évaluer des modifications de la morphologie cellulaire comme une perte des caractéristiques en forme ronde; cependant, aucun changement n'a été observé dans l'ensemble des produits à la plus forte concentration, 200 μ M.

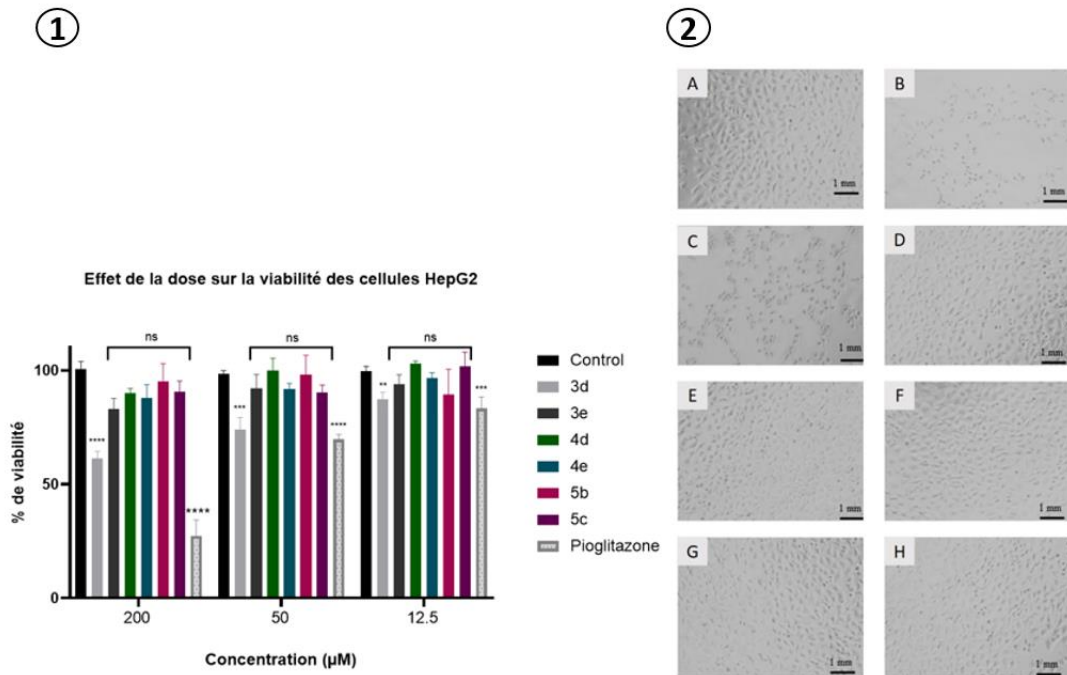


Figure 17. Évaluation de la cytotoxicité par le test MTT sur des cellules HepG2 après l'exposition à différentes concentrations des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione (1). Images microscopiques de cellules traitées avec des concentrations variables (2), A : Cellules non traitées ; B ; **3d** ; C : **3e** ; D : **4d**; E : **4e**; F : **5b**; G : **5c**; H: Pioglitazone. * à **** : représentent le degré de signification ($P < 0,05$)

**Effet antihyperglycémique des dérivés
synthétisés de la thiazolidine-2,4-diones et leur
rôle dans l'amélioration du métabolisme et du
stress oxydatif chez des souris diabétiques**

Présentation :

L'hyperglycémie chronique était cliniquement associée à l'obésité centrale, à la dyslipidémie et à l'hypertension (Baron et al., 2019). Une grande partie de la population diabétique peut également souffrir d'une hyperlipidémie, marquée par des taux hautement élevés de triglycérides (TG) et des lipoprotéines de basse densité (LDL-C) contre un taux de lipoprotéines de haute densité (HDL-C) plus faible. La dyslipidémie est souvent associée au diabète type II, et est en fait la cause principale de l'athérosclérose (L. Zhang et al., 2020).

Des études ont également rapporté que la survenue d'une hyperlipidémie aiguë augmente le taux des marqueurs de stress oxydatif (Pérez-Torres et al., 2021). Le stress oxydatif est l'équilibre entre la formation et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans des conditions saines, les enzymes antioxydantes cellulaires sont responsables de la régulation des productions de ROS. En raison de leur structure moléculaire unique, les lipides sont plus vulnérables à l'oxydation (Pisoschi et al., 2021). Le malondialdéhyde (MDA) est produit par la peroxydation des acides gras polyinsaturés et il est athérogène. Les TBARS (substances réactives de l'acide Thio-barbiturique et le MDA sont couramment utilisés chez les patients atteints de diabète de type II pour évaluer l'équilibre pro-oxydant/antioxydant, car ce sont des éléments sûrs et facilement visibles de la peroxydation lipidique (Khoubnasabjafari et al., 2015). L'hyperactivité de la voie de l'hézosamine, l'augmentation du transfert du glucose dans la voie du polyol et la génération supplémentaire de produits finaux de glycation avancée sont quelques-unes des voies impliquées dans l'induction du stress oxydatif dans le diabète type II (Oguntibeju, 2019).

Les modèles expérimentaux chez l'animal sont utilisés pour étudier divers aspects liés à la maladie, tels que ses symptômes, son évolution et ses complications. Ils ont également été utilisés pour des tests pharmacologiques dans la recherche de médicaments et de traitements plus efficaces. Le modèle de diabète le plus souvent utilisé implique l'administration d'une dose unique et élevée de streptozotocine (STZ) ou d'alloxane (ALX) à des animaux adultes, ce qui entraîne la destruction des cellules β pancréatiques et provoque une hyperglycémie (Rais et al., 2021), conséquence directe d'une production déficiente d'insuline (Correia-Santos et al., 2012). Il existe des modèles expérimentaux similaires au diabète humain, bien que certains symptômes du diabète puissent être obtenus expérimentalement en utilisant des régimes à forte teneur en lipides et en sucres (de Magalhães et al., 2019). Des études ont montré que les souris nourries avec un régime riche en graisses (HFD) développent des symptômes liés au DT2, tels que la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie, sans présenter d'hyperglycémie (Srinivasan et al., 2005). D'autre part, les régimes hyperlipidémiques associés à une dose de STZ ont montré des résultats positifs dans l'établissement du diabète de type II, en raison notamment de leur capacité

à dysfonctionner la sécrétion d'insuline, l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline et d'induire une obésité chez les animaux testés. Mais il existe des différences concernant la composition du régime, la dose de STZ à administrer, ainsi que l'espèce et l'âge de l'animal (Sihota et al., 2020).

Dans cette partie, nous avons mené une évaluation pharmacologique *in vivo* (évaluation des paramètres métaboliques) afin d'élucider les capacités antihyperglycémique, antihyperlipidémique et antioxydantes dérivés de la thiazolidine sélectionnées chez des souris caractérisés par une hyperglycémie pathologique induite par un régime riche en graisses (HFD) supplémentés par une injection intrapéritonéale de la solution aqueuse de la streptozotocine chez des souris albinos suisses. La pioglitazone, le médicament antidiabétique prescrit en clinique, a été utilisée comme référence pour comparer l'efficacité de nos composés synthétisés. Le test de tolérance à l'amidon (OSTT) a été réaliser afin de déterminer la vitesse à laquelle une augmentation de la glycémie a était stabilisé dans chez des rats sous dose de chaque de dérivés de la thiazolidine-2,4-dione. Dans cette étude, nous avons fourni aussi des informations sur l'effet des dérivés de la thiazolidine-2,4-dioneisoxazolines sur les enzymes antioxydantes, à savoir la CAT et la SOD, et sur le niveau de malondialdéhyde (MDA) dans le foie, les reins et le pancréas.

1. Méthode et matériel :

1.1 Évaluation du test de tolérance à l'amidon chez des rats normaux

i. Animaux

Des rats wistar pesant (250-300 g) et des souris albinos swiss (20-30 g) ont été maintenus dans des conditions de laboratoire standard, avec de l'eau et de la nourriture standard *ad libitum*, sous un cycle de 12h de lumière/12h d'obscurité, à une température de 21 à 23°C. Les souris destinées au test de l'hyperglycémie ont eu un accès libre à un régime normal à base de pellets et à de l'eau 3 semaines avant la manipulation de l'HFD.

ii. Test oral de tolérance au polysaccharides (OSTT)

L'OSTT a été déterminé selon la méthode rapportée (Chiu et al., 2018), avec de légères modifications. Les rats normaux ont été mis à jeun durant la nuit (16 h) avant le test et divisés en sept groupes de six animaux chacun. Les rats du groupe témoin normal (Control normal) ont reçu par voie orale une solution aqueuse de DMSO à 0,1%. Le groupe standard (Pioglitazone) a reçu de la pioglitazone sous forme de suspension de solution aqueuse de DMSO à 0,1 % à une dose de 50 mg/kg. Les groupes de **3e** à **5c** ont reçu par voie orale chaque dérivé en suspension aqueuse de DMSO à 0,1% à une dose de 50 mg/kg. Ensuite, une solution d'amidon (3 g/kg de poids corporel) a été administrée par voie orale à tous les groupes après 30 minutes

de traitement. Les concentrations de glucose dans le plasma ont été mesurées par la veine de la queue, puis à 0 (avant l'administration orale de l'amidon), 30, 60, 90 et 120 minutes (après l'administration orale de l'amidon) à l'aide d'un glucomètre ("Accu-Check", Roche, Maroc) disponible dans le commerce. La tolérance à l'amidon a été calculées à partir des surfaces sous les courbes (AUC) respectives de la glycémie pendant la période d'observation de 120 minutes.

1.2 Etude des propriétés antihyperglycémique, antihyperlipidémique et antioxydantes des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur des souris HFD/STZ

i. Modèle expérimental d'hyperglycémie et hyperlipidémie in vivo

Les souris ont été divisées en deux groupes recevant deux régimes alimentaires, en leur donnant soit un régime normal à base de granulés, soit un régime hypercalorique (HFD : 17% de glucides, 58% de lipides et 25% de protéines, en pourcentage du total des kcal), *ad libitum*, pendant la période initiale de 4 semaines. Les ingrédients et la composition chimique du régime HFD ont été suivis comme indiqué précédemment (Skovsø, 2014). Après les 4 semaines de régime alimentaire, le groupe de souris nourries au HFD a reçu une injection intrapéritonéale (i.p.) d'une dose faible et unique de Streptozotocine (85 mg/kg p.c) fraîchement préparée dans un tampon citrate froid 0,1 M, pH 4,5, tandis que les souris témoins ont reçu par voie intrapéritonéale un volume équivalent de tampon citrate véhicule. Une semaine après l'injection de STZ, les animaux à jeun pendant la nuit (10-12h) ont été soumis à un screening pour déterminer leur taux de glycémie à jeun (FBG) et leur poids corporel. Les souris ayant un taux de glucose sérique (FBG) ≥ 200 mg/dl ont été considérées comme diabétiques et sélectionnées pour la suite des expériences. Les souris ont été autorisées à se nourrir de leurs régimes alimentaires respectifs jusqu'à la fin des expériences.

ii. Conception expérimentale

Les animaux expérimentés ont été divisés en neuf groupes. Chaque groupe comprenait sept souris (n= 7) comme décrit ci-dessous. Tous les molécules testées et le médicament standard, la pioglitazone, ont été administrés par voie orale aux animaux des groupes respectifs en faisant sa suspension dans du DMSO à 0,1% (1ml/100 g) pendant 4 semaines. Des mesures hebdomadaires du poids des souris et du glucose plasmatique à jeun ont été effectuées.

Control normal (n = 7) - Groupe témoin → a reçu un régime alimentaire standard et le véhicule 0,1% DMSO

Control HFD-STZ (n=7) - Groupe témoin diabétique → HFD + STZ (85 mg/ kg p.c) et véhicule DMSO 0,1%.

Groupe **3d** (n = 7) - Groupe test → HFD + STZ (85 mg/kg b.w) + **3d** (50 mg/kg p.c)

Groupe **3e** (n = 7) - Groupe test → HFD+ STZ (85 mg/kg b.w) + **3e** (50 mg/kg p.c).

Groupe **4d** (n= 7) - Groupe test → HFD+ STZ (85 mg/kg b.w) + **4d** (50 mg/kg p.c)

Groupe **4e** (n= 7) - Groupe test → HFD+ STZ (85 mg/kg b.w) + **4e** (50 mg/kg p.c)

Groupe **5b** (n= 7) - Groupe test → HFD+ STZ (85 mg/kg b.w) + **5b** (50 mg/kg p.c)

Groupe **5c** (n= 7) - Groupe test → HFD+ STZ (85 mg/kg b.w) + **5c** (50 mg/kg p.c)

Groupe Pioglitazone (n =7) -Groupe témoin positif → HFD + STZ (85 mg/ kg b.w) + médicament standard commercialisé Pioglitazone (50 mg/kg b.w)

Le volume et la dose administrés ont été ajustés chaque semaine en fonction de toute variation du poids corporel afin de maintenir une dose similaire pour chaque souris pendant toute la durée de l'étude et ce, pour chaque groupe. Après 4 semaines, l'étude a été achevée et les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie. Des prélèvements sanguins ont été effectués pour des analyses hématologiques et biochimiques. Le foie, de rein et le pancréas ont été utilisés pour la caractérisation histologique. Les homogénats de foie, de rein et du pancréas ont été analysés pour les marqueurs de stress oxydatif.

iii. Mesure et analyse des paramètres biochimiques et hématologiques

Des prélèvements de sérum à jeun ont été utilisés pour l'analyse des paramètres biochimiques indiquant le bilan métabolique du foie, des reins et du profil lipidique. Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide de kits commerciaux, conformément aux recommandations du fabricant.

Les paramètres lipidiques, notamment le cholestérol total (TC), les triglycérides (TG) et le cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL-c), ont été quantifiés à l'aide de kits commerciaux (Sigma Aldrich chemicals Co., St. Louis, MO, USA). Les indicateurs biochimiques hépatique, notamment les taux d'aspartate aminotransférase (AST) et d'alanine aminotransférase (ALT), ont été évalués à l'aide des kits correspondants, conformément aux instructions du fabricant. L'évaluation des marqueurs rénaux biochimiques dont le taux de créatinine et d'urée ont été analysés à l'aide de kits commerciaux disponibles pour chaque examen. Les numérations des leucocytes totaux (GB), des érythrocytes (GR) et des indicateurs tels que la numération plaquettaire, le taux d'hémoglobine (HGB), l'hémoglobine corpusculaire moyenne (MCH), la concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (MCHC), le volume corpusculaire moyen (MCV) et l'hématocrite (HCT) ont été déterminés dans du sang prélevé de la veine jugulaire à l'aide de tubes capillaires contenant de l'EDTA (anticoagulant) en utilisant un analyseur automatisé (Architect c8000, Clinical Chemistry System, USA).

iv. Examen histologique du pancréas, du foie et du rein

Les tissus du foie, des reins et du pancréas ont été prélevés et examinés macroscopiquement à la fin de l'étude. Tous ont été fixés dans du formol tamponné à 10% et traités par la méthode d'histologie classique en utilisant les techniques d'inclusion de la paraffine. Les sections incluses dans la paraffine ont été coupées à entre 40 et 100 μm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Shandon Hypercut, Angleterre), puis colorées par la méthode de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine afin d'analyser les changements histologiques. Les sections des tissus colorées ont été analysées qualitativement (morphologiques) au microscope (Leica Microsystems DM2500, Allemagne), et des photomicrographies des altérations histologiques ont été prises au grossissement entre $\times 200$ et $\times 400$.

v. Enzymes et marqueurs principaux du stress oxydatif

a. Préparation de l'homogénat

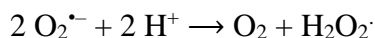
Une fois sacrifiés, le foie, les reins et le pancréas ont été excisés et découpés à la fin de l'étude. Un homogénat de 10 % du tissu a été préparé dans du PBS 50 mM glacial (pH 7,4) à l'aide d'un homogénéisateur Potter Elvehjem. L'homogénat a été centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min (à 4°C) à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérante (Mikro 220R, Hettick Lab Technology, Allemagne). Le culot a été jeté et le surnageant obtenu a été utilisé pour l'estimation des niveaux d'activités enzymatiques de peroxydation lipidique MDA (substance réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS)), superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT).

b. Activité catalytique de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase a été déterminée selon la méthode de Aebi (Aebi, 1984). La catalase est une enzyme antioxydante capable de convertir le peroxyde d'hydrogène par deux types de réaction entraînant une production d'oxygène et d'eau. La catalase annule l'effet du peroxyde d'hydrogène présent au niveau intracellulaire. L'activité de la catalase est déterminée par la diminution de H_2O_2 à une longueur d'onde de 240 nm. Une unité d'enzyme est définie comme 1 μmol d' H_2O_2 consommé par min, L'activité enzymatique serait ensuite normalisée et exprimée en unités de catalase par mg de protéines, en se basant sur la courbe d'étalonnage de la quantité totale de protéines. L'activité de la catalase est mesurée à une concentration non saturante de substrat (H_2O_2), car ceci conduise à une inactivation rapide de la catalase par le substrat. La concentration de peroxyde d'hydrogène utilisée dans ce test (50 mM) fournit un signal mesurable, et ne provoque pas l'inactivation de l'enzyme.

c. Activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Les enzymes superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines qui sont également des oxydoréductases catalysant la dismutation des anions superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en oxygène O_2 et peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :



Cette enzyme intervient dans l'explosion oxydative et est également une composante essentielle du mécanisme d'élimination des radicaux libres. L'activité du superoxyde totale a été déterminée par la méthode de Beauchamp (Beauchamp & Fridovich, 1971). Cette méthode implique l'inhibition du nitro-blue de tétrazolium (NBT) et sa réduction en utilisant la riboflavine comme générateur de superoxyde. Pour doser l'activité de la SOD totale (T-SOD), un volume de 3 mL a été préparé en ajoutant du tampon phosphate 50 mM contenant 0,025 % de X-100 triton, de l'EDTA (pH 8) à 0,1 mM, 12 mM de L-Méthionine, 75 μ M de NBT, avec 20 μ L d'homogénat et 2 μ M de riboflavine (ajoutée à la fin pour initier la réaction). La réaction a été effectuée à une température 25 °C, sous une lampe de 15W pendant 10 min dans un incubateur. L'absorbance est mesurée à 560 nm, et l'activité SOD était mesurée en se basant sur la courbe d'étalonnage.

d. Evaluation de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est la dégradation des lipides qui se produit à la suite d'un stress oxydatif et contribue à de nombreuses pathologies. Certains produits terminaux de la réaction de la peroxydation lipidique, tels que le malondialdéhyde (MDA) était détecté et quantifié dans des échantillons de sérum pour identifier les dommages oxydatifs. Ce test est basé sur la réaction d'un réactif chromogénique, l'acide 2-thiobarbiturique, avec le malondialdéhyde (MDA) à 25°C. Une molécule de MDA réagit avec 2 molécules d'acide 2-thiobarbiturique via une condensation de type Knoevenagel pour donner un chromophore dont l'absorbance est maximale à 532 nm. Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique ont été estimées en équivalent MDA (nmol MDA/mg de protéine), à partir de la courbe d'étalonnage (Beauchamp & Fridovich, 1971).

2. Résultats et discussion

i. Test de tolérance orale à l'amidon (OSTT) chez des souris rats normaux

Pour évaluer l'efficacité des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dioneisoxazolines sur l'homéostasie glycémique, un test OSTT a été réalisé chez des rats normaux à jeun après une administration orale aiguë de chaque produit à une concentration de 50 mg/kg. Une solution d'amidon (3 g/kg de poids corporel) a été administrée par voie orale à jeun, ensuite, des prélèvements sanguins ont été faits à différents intervalles de temps (0, 30, 60, 90 et 120 min)

pour mesurer la glycémie (Tab.4). Le taux de glucose sanguin dans tous les groupes a affiché une haute valeur de pointe à 30 minutes après la prise de glucose, et tous les traitements étaient significativement ($p < 0,05$) meilleurs que le groupe normal. Ces résultats montrent clairement l'activité antihyperglycémique de tous les traitements. Le niveau de glucose dans le sang continue à baisser de manière significative jusqu'à la fin du test (Fig.18).

Tableau 4. Effet des Thiazolidine-2,4-dione isoxazolines (**3d-5c**) sur la tolérance postprandiale au glucose dans les groupes expérimentaux de rats normaux à 0, 30, 60, 90 et 120 min. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. [n = 6].

Groupes	Glycémie à jeun (mg/dL)	Temps (min)				
		0	30	60	90	120
Control normal		91 \pm 8	91,2 \pm 3,76	91,4 \pm 7,92	94 \pm 1,6	93,4 \pm 1,28
Control négatif		94,2 \pm 6,24	140 \pm 3,2	122,6 \pm 2,32	105,4 \pm 7,92	97,2 \pm 3,56
3d (50 mg/kg)		93,51 \pm 3,50	125,14 \pm 2,16	102,3 \pm 4,23	98,28 \pm 7,02	92,18 \pm 6,98
3e (50 mg/kg)		92,6 \pm 9,68	98 \pm 3,6	101,2 \pm 8,16	88,4 \pm 6,48	83,6 \pm 7,52
4d (50 mg/kg)		92,48 \pm 4,18	123 \pm 3,39	100,21 \pm 4,15	97,30 \pm 3,31	93,25 \pm 5,16
4e (50 mg/kg)		90,6 \pm 6,32	105 \pm 6,4	94,4 \pm 4,88	87,4 \pm 8,48	84,6 \pm 11,52
5b (50 mg/kg)		83 \pm 3,2	102,6 \pm 5,28	95,8 \pm 5,04	93,2 \pm 3,84	84,4 \pm 4,72
5c (50 mg/kg)		94 \pm 6,8	99,1 \pm 3,04	86,8 \pm 6,16	90,2 \pm 4,64	87,4 \pm 6,88
Pioglitazone (50 mg/kg)		97,4 \pm 6,88	120,2 \pm 8,76	118,4 \pm 6,32	106,6 \pm 8,32	85,4 \pm 7,24

Les AUC de la glycémie (Fig.18) dans le groupe traité par la pioglitazone a été significativement réduite de 22,71 % par rapport au groupe control négatif. Pour le traitement avec le dérivés synthétisés, la meilleure réduction a été notée par **5b** (24,43%) suivi par **4b** (22,20%) puis **5c** (20,92%), **4e** (19,33%), **3d** (11,30%) et **3e** (8,82). Ces résultats démontrent que tous les dérivés (50 mg/kg) ont le potentiel d'augmenter la clairance du glucose dépendant de l'insuline dans les tissus périphériques et suggèrent une implication actuelle dans la régulation à court terme de l'homéostasie du glucose.

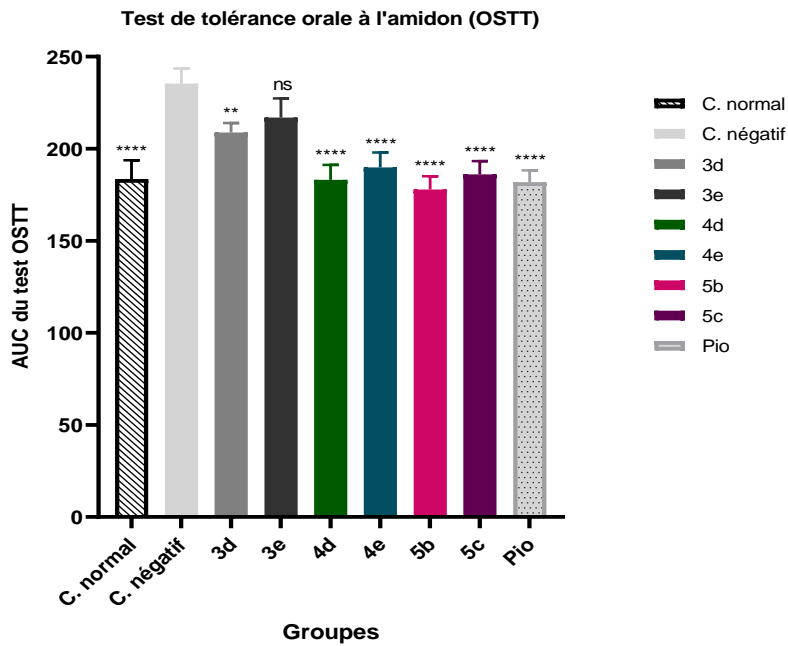


Figure 18. Test de la tolérance à l'hyperglycémie et aire sous la courbe (AUC). * à **** : significativement différentes par ANOVA avec test des plages multiples de Duncan à $p < 0,05$.

ii. Effet des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur la glycémie et le poids corporel

La consommation d'un régime hypercalorique (HFD) pendant 4 semaines a entraîné une augmentation significative du poids corporel des souris et une diminution du poids relatif du pancréas par rapport aux souris nourries avec un régime normal (Fig.19). De plus, les niveaux de glycémie à jeun (FBG) des souris nourries au HFD étaient significativement plus élevés que ceux nourries au régime normal (Fig.20), ce qui est cohérent avec l'augmentation de l'apport alimentaire et de la consommation d'eau (données non montrées).

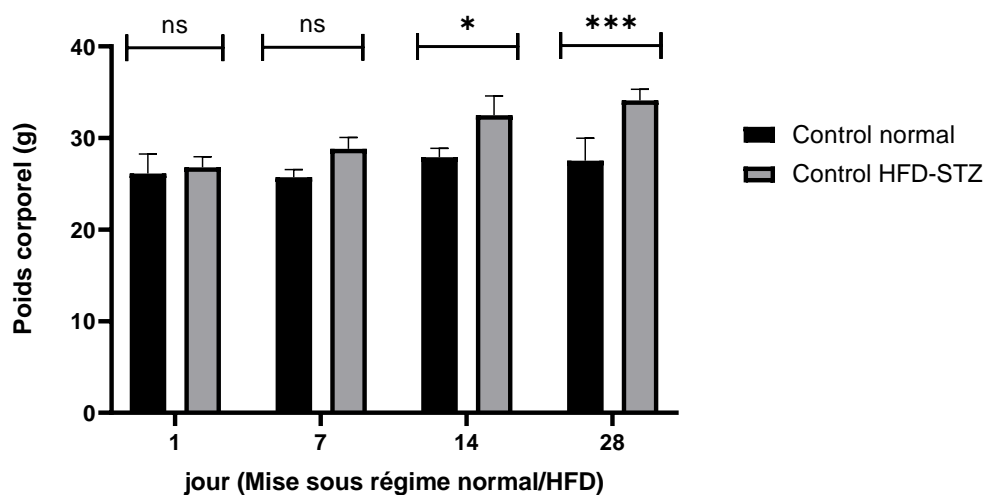


Figure 19. Evolution du poids corporel des souris diabétiques HFD-STZ vs souris normales, $n=7$. Moyenne \pm SD. $p < 0,05$

Notamment, le traitement à la streptozotocine (STZ) chez les souris nourries en HFD a réduit dramatiquement le poids corporel (Fig.21). En outre, l'injection de STZ a également entraîné une augmentation significative du taux de FBG, d'environ 3,5 et 3 fois par rapport au groupe témoin normal et au groupe nourri uniquement au HFD (Fig.21). Ces résultats suggèrent que la consommation de HFD contribue à une légère résistance à l'insuline, tandis que la combinaison de HFD avec l'injection de STZ pourrait favoriser l'apparition des symptômes du diabète chez les souris mises au test.

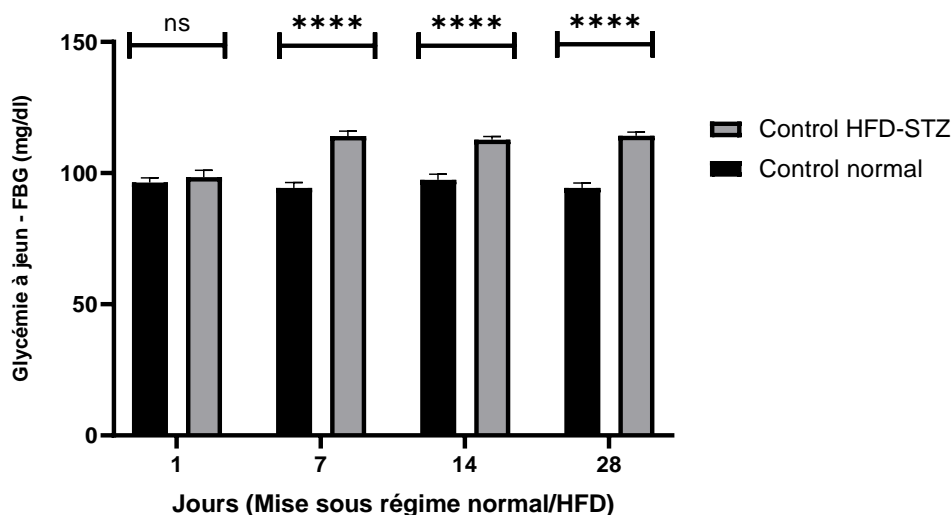


Figure 20. Evolution la glycémie à jeun (FBG) des souris diabétiques HFD-STZ vs souris normales. $p < 0,05$

L'administration des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione (**3d**;**3e**;**4d**;**4e**;**5b**;**5c**) à une dose de 50 mg/kg p.c a permis de maintenir le poids corporel des souris par rapport à la chute de poids observés chez les souris du groupe HFD-STZ (-17,24%) (diminution de 6,13% chez les souris traitées par **3d** à 5,47% pour les souris traitées par le **5c**). En outre, l'administration de la pioglitazone à une dose de 50 mg/kg p.c a considérablement réduit le poids corporel des souris par rapport au groupe témoin HFD-STZ (-4,54%) (Tab.5).

Tableau 5. Effets du traitement par des dérivés de **3d**;**3e**;**4d**;**4e**;**5b**;**5c** sur l'évolution du poids corporel. Moyenne \pm SD (n= 7)

	Poids corporel (g)			
	1 ^{er} jour	7 ^{ème} jour	14 ^{ème} jour	28 ^{ème} jour
Contrôle normal	27.31 \pm 2.38	29,62 \pm 2,05	30,42 \pm 2,40	31.14 \pm 1.92
Contrôle HFD-STZ	32,24 \pm 1,92	30,82 \pm 2,13	27,14 \pm 2,08	26,68 \pm 1,18

3d	31,24 ± 1,49	34,31 ± 1,68	33,51 ± 1,82	33,28 ± 2,01
3e	31,92 ± 1,78	34,61 ± 2,74	37,26 ± 1,28	35,17 ± 1,92
4d	32,18 ± 2,22	34,29 ± 1,84	35,18 ± 2,14	32,71 ± 2,98
4e	32,17 ± 2,18	33,15 ± 1,83	34,18 ± 2,39	34,47 ± 2,30
5b	33,48 ± 2,71	35,24 ± 1,76	33,42 ± 1,62	32,34 ± 1,81
5c	33,31 ± 2,07	37,10 ± 2,28	34,16 ± 1,94	35,24 ± 2,92
Pioglitazone	31,34 ± 2,48	34,50 ± 1,48	33,21 ± 1,40	34,91 ± 2,16

Après l'HFD (4 semaines) et l'injection de STZ (établissement du diabète) et après 28 jours de traitement avec des dérivés de N-thiazolidinediones, les souris nourries avec l'HFD (pendant 4 semaines) ont montré une augmentation significative ($p < 0,05$) de la FBG (+26,04%) par rapport aux souris témoins normaux, qui ont été nourries avec un régime standard (Tab.6). L'injection i.p de la STZ a entraîné une augmentation de près de 3,5 fois des niveaux de FBG chez les souris diabétiques par rapport à ceux normaux ($p < 0,05$).

Tableau 6. Effets du traitement par des dérivés de **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur l'évolution de la glycémie à jeun (FBG). Moyenne ± SD (n= 7)

	Glycémie à jeun (mg/dL)			
	1 ^{er} jour	7 ^{ème} jour	14 ^{ème} jour	28 ^{ème} jour
Contrôle normal	96,60 ± 4,89	97,40 ± 3,10	98,00 ± 4,00	97,56 ± 5,24
Contrôle HFD-STZ	256,14 ± 2,20	277,66 ± 2,30	294,12 ± 6,70	329,76 ± 4,10
3d	259,50 ± 3,10	241,36 ± 3,80	213,14 ± 7,50	187,25 ± 3,10
3e	253,80 ± 6,20	237,50 ± 4,00	202,83 ± 8,60	190,14 ± 6,1
4d	234,18 ± 3,80	218,36 ± 5,50	147,24 ± 8,50	124,19 ± 6,80
4e	247,32 ± 4,50	222,76 ± 3,10	182,58 ± 3,82	164,12 ± 8,02
5b	269,46 ± 5,60	194,14 ± 3,83	152,18 ± 2,40	137,82 ± 3,40
5c	244,26 ± 7,50	182,58 ± 4,10	164,16 ± 3,40	130,01 ± 5,60
Pioglitazone	270,54 ± 6,70	230,17 ± 3,0	172,82 ± 4,2	140,31 ± 5,4

En comparaison avec le groupe témoin, les niveaux de FBG dans les groupes traités ont été réduits de façon significative, passant de $244,26 \pm 7,5$ mg/dL avant le traitement à $130,01 \pm 5,6$ mg/dL après le traitement pour le dérivés **5b** (-48,85%), de même pour les autres dérivés **3d** (-26,99%), **3e** (-25,08%), **4d** (-36,96%), **4e** (-33,64%), **5c** (-46%). Le groupe traité par la pioglitazone a réduit de manière significative les taux de FBG chez les souris diabétiques (-48,13%). A partir du jour 7 de l'expérience, les traitements à une dose de 50 mg/kg p.c ont significativement supprimé la FBG chez les souris diabétiques. Sur la base des résultats ci-dessus, nous pensons que les dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione (**3e** et **5b**) réduisent les niveaux de FBG et atténuent la perte de poids chez les souris diabétiques (Fig. 21).

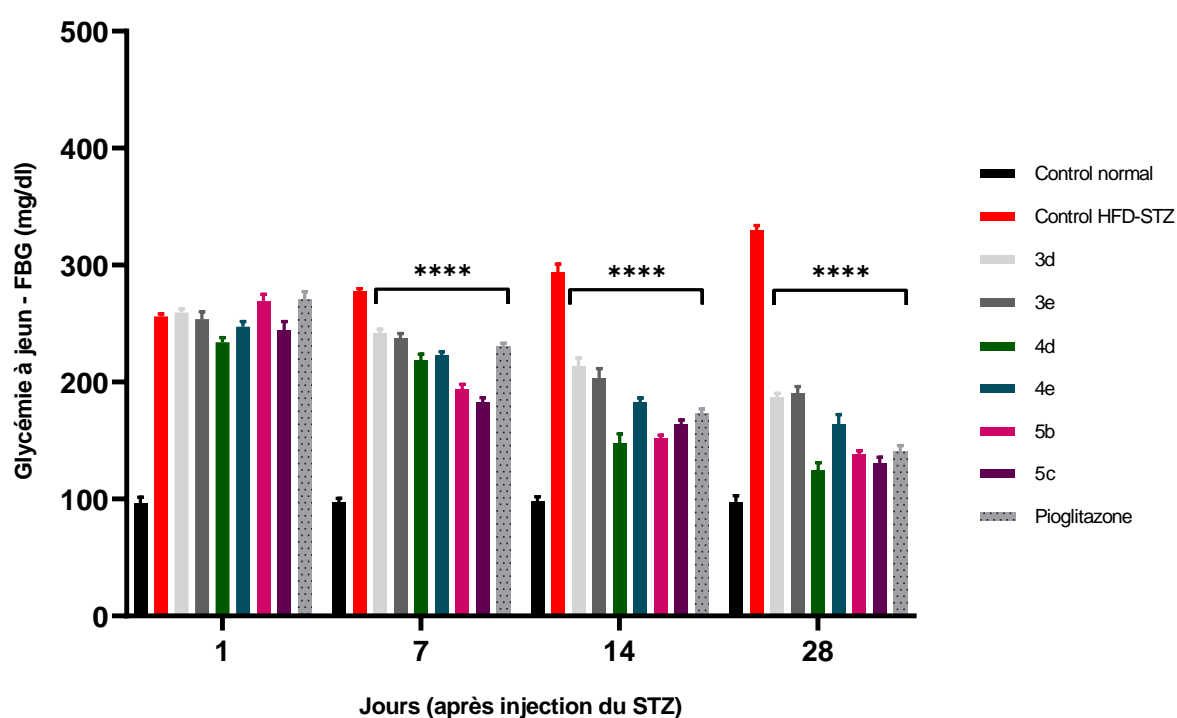


Figure 21. Evolution la glycémie à jeun (FBG) des souris diabétiques HFD-STZ traités par les dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone moyenne \pm SD (n=7). $p < 0,05$

iii. Effets des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur le métabolisme des lipides chez les souris diabétiques induites par HFD/STZ

Les effets des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione (**3d;3e;4d;4e;5b;5c**) sur la modification du profil lipidique ont été examinés en mesurant les taux sériques des métabolites lipidiques chez les souris atteintes de diabète induit par le HFD/STZ. Comme le montre la figure (Fig.22), les analyses des paramètres biochimiques ont montrées des modifications du métabolisme lipidique chez les souris du groupe HFD-STZ, mettant en évidence une augmentation significative ($p < 0.05$) des niveaux des triglycérides sériques (42,09%), du

cholestérol total (54,27%), des LDL-c (50,31%) et une diminution significative des niveaux de HDL-c (49,50%) par rapport aux souris témoins normales (Tab.7).

Tableau 7. Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dionesur le profil lipidique sérique chez des souris diabétiques (model HFD/STZ)

	Profil lipidique			
	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)
Contrôle normal	110,98 ± 5,06	80,53 ± 5,57	36,31 ± 2,08	36,89 ± 5,36
Contrôle HFD-STZ	191,67 ± 3,12	176,10 ± 3,72	73,08 ± 2,84	18,63 ± 1,43
3d	176,76 ± 5,25	136,71 ± 4,58	61,05 ± 8,06	19,73 ± 3,86
3e	165,11 ± 5,61	128,56 ± 4,50	63,71 ± 1,44	21,81 ± 2,82
4d	147,18 ± 5,26	97,04 ± 5,21	49,57 ± 4,11	20,10 ± 7,05
4e	124,81 ± 5,16	95,6 ± 6,31	49,51 ± 3,77	19,72 ± 1,90
5b	138,73 ± 5,13	88,38 ± 4,76	39,74 ± 4,05	27,15 ± 1,31
5c	126,45 ± 4,14	76,85 ± 5,12	40,05 ± 2,21	29,16 ± 2,26
Pioglitazone	106,45 ± 5,23	88,01 ± 8,06	41,83 ± 3,81	22,81 ± 6,28

Après 28 jours de traitement, le taux de LDL-c des souris des groupes traités a été significativement réduit de 45,19% à 32,17%, et peut significativement (Fig.22) les groupes **3d** et **3e** avec des pourcentages de 15,5% et 12,82% respectivement. De plus, les taux de TG chez les souris traitées été réduits de 22,36% à 56,36%, avec **5c** (56,36%), et la pioglitazone (50,02%), ce qui était significativement inférieur à ceux des souris diabétiques (HFD-STZ). Cependant, par rapport aux souris traitées diabétiques, les souris traitées présentaient une diminution des taux sanguins du cholestérol de 7,77% à 44,46% (**4e**, **5c** et pioglitazone avec 34,88%, 34,03% et 44,46%, respectivement). Cependant, il n'y a pas eu de changement significatifs dans les niveaux de HDL-c entre les groupes traités et le groupe témoin diabétique, à l'exception des dérivés **5c** qui augmente et améliore le taux du taux d'HDL-c (31,38% et 36,11%).

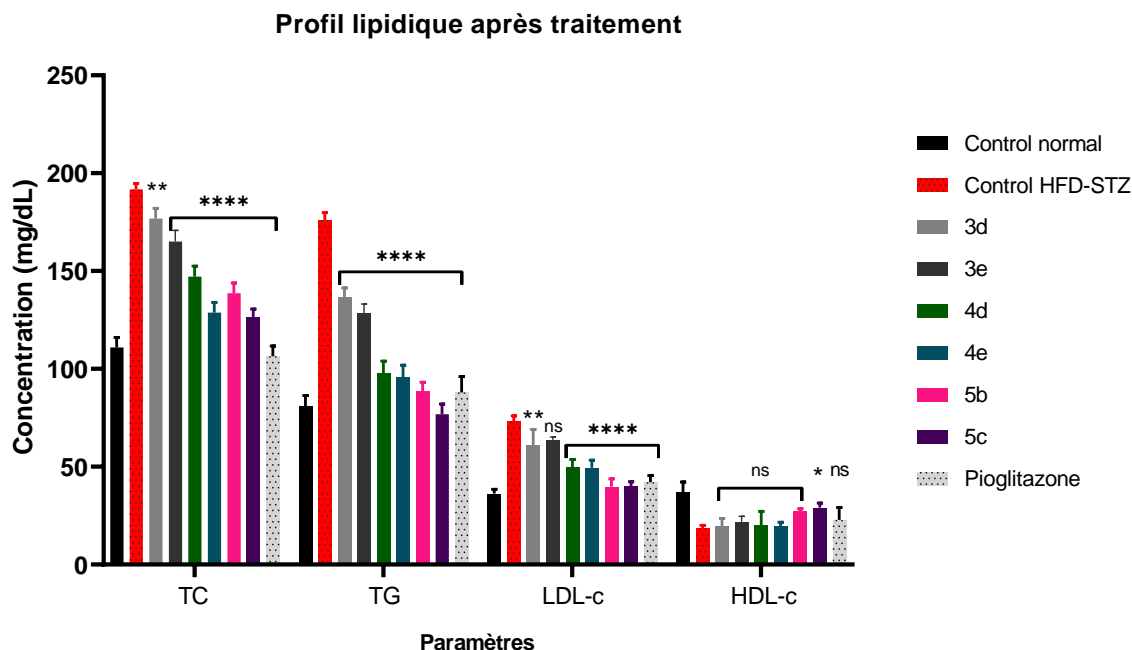


Figure 22. Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur le profil lipidique sérique par rapport au souris diabétique. * à **** : significativement différentes par ANOVA avec test des plages multiples de Duncan à $p < 0,05$.

iv. Effet des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione sur la variation des marqueurs de lésions hépatiques et rénales

Le tableau indique qu'après la fin de la période expérimentale, le groupe des souris diabétique (HFD-STZ) a présenté des lésions hépatiques graves, caractérisées par une augmentation significative ($p < 0,05$) des niveaux d'aspartate transaminase (AST) et d'alanine transaminase (ALT) par rapport aux groupes des souris normales avec un pourcentage de 54,99% et 25,80% respectivement (Tab.8).

Tableau 8. Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur la variation des marqueurs de lésions hépatique par rapport aux souris diabétiques (model HFD/STZ)

	Marqueurs du foie	
	ALT (U/L)	AST (U/L)
Contrôle normal	70,73 ± 3,77	29,30 ± 5,20
Contrôle HFD-STZ	95,33 ± 2,10	65,10 ± 2,70
3d	91,17 ± 3,82	54,50 ± 4,85
3e	86,50 ± 4,77	54,90 ± 3,75
4d	88,33 ± 7,02	50,20 ± 5,85
4e	76,46 ± 4,56	41,30 ± 7,2
5b	83,01 ± 7,70	40,5 ± 5,90
5c	79,22 ± 5,90	30,32 ± 4,17
Pioglitazone	102,32 ± 4,26	65,12 ± 6,00

Le traitement de 4 semaines avec le médicament standard pioglitazone 50 mg/kg et les dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione **3d**, **3e** et la **4d** (50 mg/kg) n'ont montrés aucuns changements significatifs dans les niveaux d'ALT par rapport au souris diabétiques (HFD-STZ). Les dérivés **4e**, **5b** et **5c** diminue modérément ($p < 0,05$) l'ALT dans le protocole de traitement standard et diminue significativement ($p < 0,05$) les niveaux sériques d'AST par rapport au souris diabétique groupe témoin standard. Le traitement avec le dérivé **4d** diminue de manière moins significative ($p < 0,05$) les niveaux élevés d'ALT et d'AST sériques (Fig.23). Ces résultats montrent que l'administration des dérivés synthétisés spécialement le produit **5c** avec un groupe di-chlore sur le benzène répare efficacement les lésions hépatiques chez les souris diabétique (diminution de 16% du taux de l'ALT et 53,42% de l'AST).

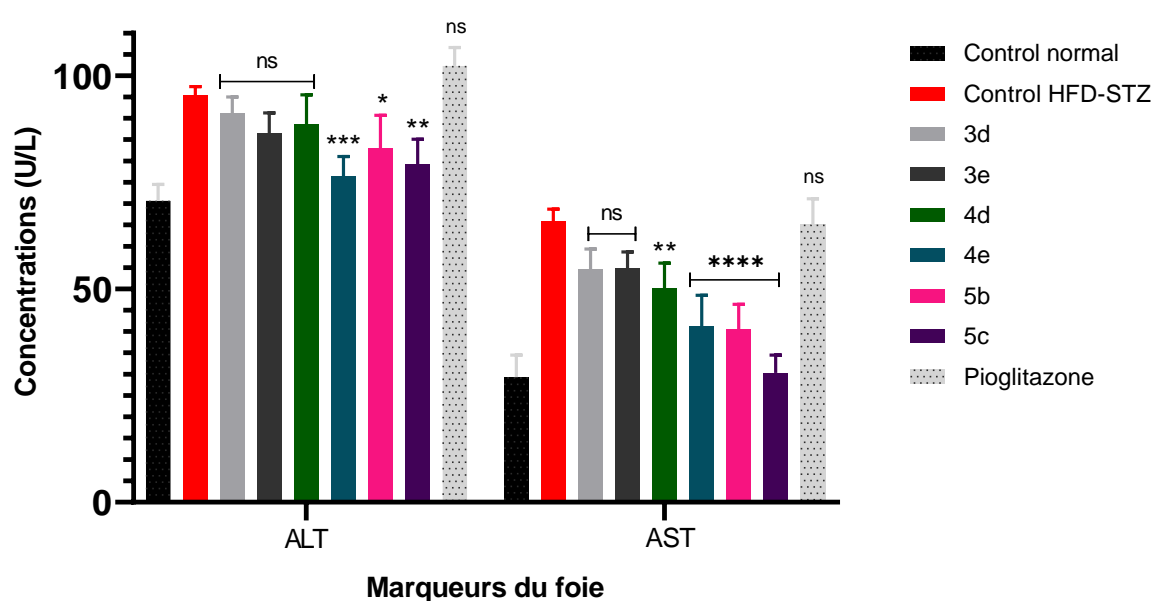


Figure 23. Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur la variation des marqueurs hépatique par rapport au souris diabétique. * à **** : significativement différentes par ANOVA avec test des pages multiples de Duncan à $p < 0,05$.

La créatinine sérique et l'urée sont des facteurs importants de dysfonctionnement rénal, et leurs niveaux peuvent refléter le degré d'endommagement des fonctions de filtration glomérulaire. Les paramètres biochimiques de la fonction rénale ont été observés dans ce travail. Nous avons constaté que les niveaux de la créatinine et de l'urée ont augmenté de manière significative chez les souris diabétique (HFD/STZ), le taux de la créatinine a été remarquablement augmentés de 41,26% par rapport au souris du groupe témoin, et l'urée avec 49,94% dans le groupe diabétique par rapport à ceux du groupe témoin (Tab.9).

Tableau 9. Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur la variation des marqueurs de lésions rénales par rapport aux souris diabétiques (model HFD/STZ)

	Marqueurs des reins	
	Créatinine (mg/L)	Urée (mg/L)
Control normal	0,37 ± 0,10	39,60 ± 6,80
Control HFD-STZ	0,63 ± 0,05	79,10 ± 5,30
3d	0,53 ± 0,03	45,43 ± 6,20
3e	0,54 ± 0,04	54,02 ± 2,40
4d	0,51 ± 0,05	49,09 ± 4,72
4e	0,52 ± 0,03	39,83 ± 3,48
5b	0,49 ± 0,04	39,68 ± 4,18
5c	0,45 ± 0,03	41,17 ± 4,78
Pioglitazone	0,49 ± 0,02	38,14 ± 4,91

Il est intéressant de noter que le traitement par les dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dionede **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone (50 mg/kg) a nettement diminué le niveau de la créatinine ($P < 0,05$) avec des pourcentages de 14,28% à 28,57% (**5c** : 28,57%), et réduit les niveaux de l'urée durant les 28 jours du test avec un pourcentage allant de 31,70% à 51,78 (le dérivé **5c** avec un pourcentage de 49,83%). Notamment, ceci a montré que les dérivés testés ont des effets synergiques significatifs, qui peuvent avoir des thérapies combinatoires potentielles pour la néphropathie diabétique des patients diabétiques (Fig.24).

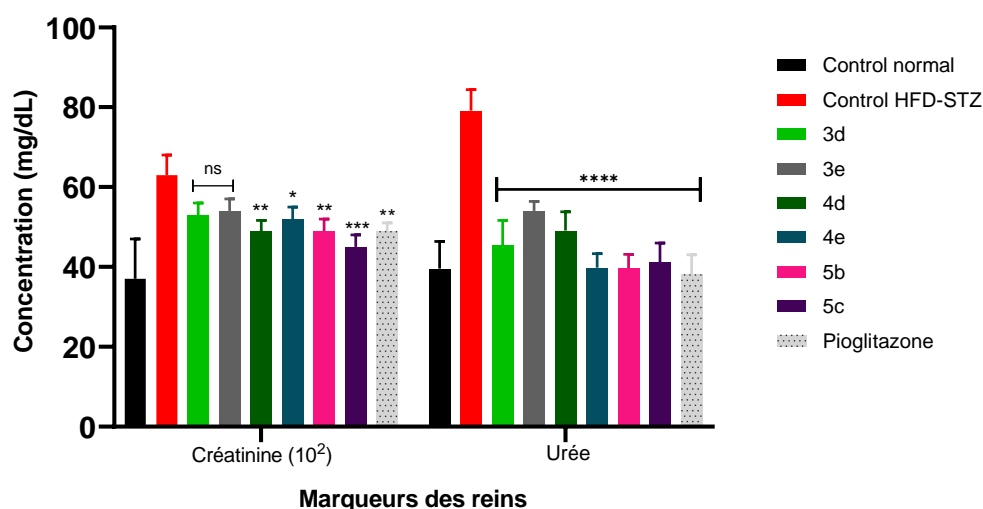


Figure 24. Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur la variation des marqueurs rénaux par rapport au souris diabétique. * à **** : significativement différentes par ANOVA avec test des plages multiples de Duncan à $p < 0,05$.

v. Effet des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dionesur la variation des paramètres hématologique

Après des administrations orales, quotidiennes du médicament standard pioglitazone et des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione (50 mg/kg) pendant une durée de 28 jours, les paramètres hématologiques ont été mesurés pour effectuer une comparaison entre le contrôle normal et le contrôle des souris diabétique (HFD/STZ). Toutes les données sont répertoriées

dans le tableaux suivant. Les numérations de GR, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC (Tab.10) des souris diabétiques du groupe HFD-STZ ont montré une diminution significative ($P < 0,05$), par rapport au cas de ceux du groupe de contrôle normal, alors que les niveaux des globules blancs a augmenté significativement ($p < 0,05$)

Tableau 10. Effets dérivés de la thiazolidine-2,4-dione **3d;3e;4d;4e;5b;5c** sur la variation des paramètres hématologique par rapport aux souris diabétiques (model HFD/STZ)

	Contrôle normal	Contrôle HFD-STZ	3d 50mg/kg/j	3e 50mg/kg/j	4d 50mg/kg/j	4e 50mg/kg/j	5b 50mg/kg/j	5c 50mg/kg/j	Pioglitazone 50mg/kg/j
GR ($10^9/\mu\text{L}$)	8,10 \pm 0,50	6,43 \pm 0,8	6,54 \pm 0,34	6,38 \pm 0,45	7,43 \pm 0,38	7,76 \pm 0,04	7,15 \pm 0,10	7,86 \pm 0,04	7,78 \pm 1,64
HCT (%)	44,27 \pm 0,64	34,85 \pm 0,84	36,76 \pm 0,05	36,50 \pm 0,76	37,12 \pm 0,71	37,28 \pm 0,78	41,28 \pm 1,30	42,37 \pm 2,41	45,68 \pm 0,81
MCV (fl)	53,28 \pm 1,60	50,78 \pm 0,56	50,30 \pm 0,23	50,31 \pm 0,22	51,30 \pm 0,32	52,80 \pm 1,48	53,2 \pm 1,48	52,67 \pm 0,52	51,30 \pm 0,28
HGB (g/L)	14,43 \pm 0,25	11,56 \pm 0,52	12,03 \pm 1,23	14,06 \pm 0,06	14,30 \pm 0,10	13,68 \pm 0,32	13,06 \pm 0,06	12,13 \pm 0,38	12,42 \pm 0,07
MCH (pg)	18,26 \pm 1,16	15,42 \pm 0,53	16 \pm 2,08	15,85 \pm 0,56	16,38 \pm 0,30	18,87 \pm 1,08	16,48 \pm 0,87	16,71 \pm 0,75	19,14 \pm 1,57
MCHC (g/dL)	31,58 \pm 1,18	29,05 \pm 0,30	29,98 \pm 0,30	29,30 \pm 1,1	30,31 \pm 1,5	29,48 \pm 0,09	30,19 \pm 0,11	32,0 \pm 1,27	29,98 \pm 0,07
GB ($10^9/\mu\text{L}$)	5,63 \pm 0,55	7,52 \pm 0,10	6,34 \pm 1,0	6,98 \pm 0,70	6,02 \pm 0,70	6,38 \pm 0,18	6,40 \pm 1,0	6,61 \pm 0,34	6,08 \pm 0,24

Le diabète insulino-dépendant induit par le régime HFD et la streptozotocine peut entraîner une diminution de l'HGB (anémie). Les paramètres MCV, MCH, MCV, globules rouges ont été également réduit de manière significative. Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée dans le taux des MCHC entre les deux groupes. Les souris des groupes traités à des doses de 50 mg/kg/jour ont montré une amélioration significative de la numération des globules rouges pour le dérivé **5c** (18,19%), et le taux d'HCT pour le dérivé **5c** et le produit pioglitazone ($P < 0,05$) en comparaison avec le groupe des souris diabétique. Les souris des groupes traités avec les produits **4d**, **4e** et la pioglitazone ont significativement minimisé l'augmentation des niveaux du taux des globules blancs 19,94%, 15,16% et 19,15% respectivement (Fig.25).

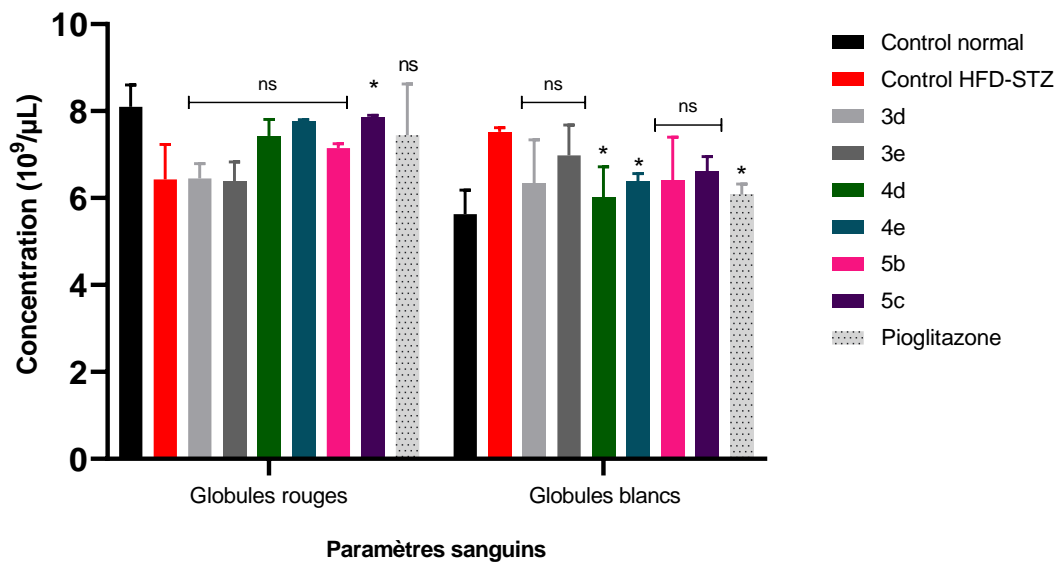


Figure 25. Comparaison de l'effet des dérivés **3d;3e;4d;4e;5b;5c** et la pioglitazone sur la variation des paramètres hématologiques (GR et GB) par rapport au souris diabétique. * à **** : significativement différentes par ANOVA avec test des plages multiples de Duncan à $p < 0,05$.

vi. Analyse histologique du foie, reins et pancréas des souris diabétique (HFD/STZ) traité par des dérivés synthétisés de Thiazolidine-2,4-dione

Afin d'étudier les effets du médicament standard pioglitazone et des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione (50 mg/kg) sur les changements histologiques des tissus du foie, pancréas, et des tissus rénaux sur des souris diabétique (induit par régime hypercalorique et une dose du streptozotocine), nous avons observé les changements structurels dans chaque tissu avec une coloration H&E. Dans les tissus hépatiques normaux, on observe une architecture ordonnée, des bordures cellulaires bien disposées, des lobules hépatiques et des hépatocytes volumineux avec des noyaux centraux ronds et clairs. Conformément aux changements observés dans la teneur en triglycérides, cholestérol et LDL-c, la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des coupes de foie a montré une plus grande accumulation de gouttelettes lipidiques hépatiques dans le groupe des souris diabétique (HFD/STZ) par rapport au souris témoins. Les coupes du foie des souris diabétiques ont montré aussi des vacuolisations cytoplasmiques, et une petite quantité d'infiltration de cellules inflammatoires dans la zone portale et les lobules.

Ce changement de structure pathologique a été empêché voir inversé par l'administration des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione et de la pioglitazone, et les lésions pathologiques ont été nettement ou partiellement atténuées. Il a également été observé que les groupes traités par **3d**, **3e**, **4d** ont également montré une diminution significative de la dégénérescence des hépatocytes et des accumulations de graisse. Cependant, l'administration de différentes des **4e**, **5b**, **5c** et la pioglitazone montrés une inversion de manière significative la formation de graisse

et la dégénérescence hépatique induites par les lésions hépatiques associées au HFD/STZ (Fig.26).

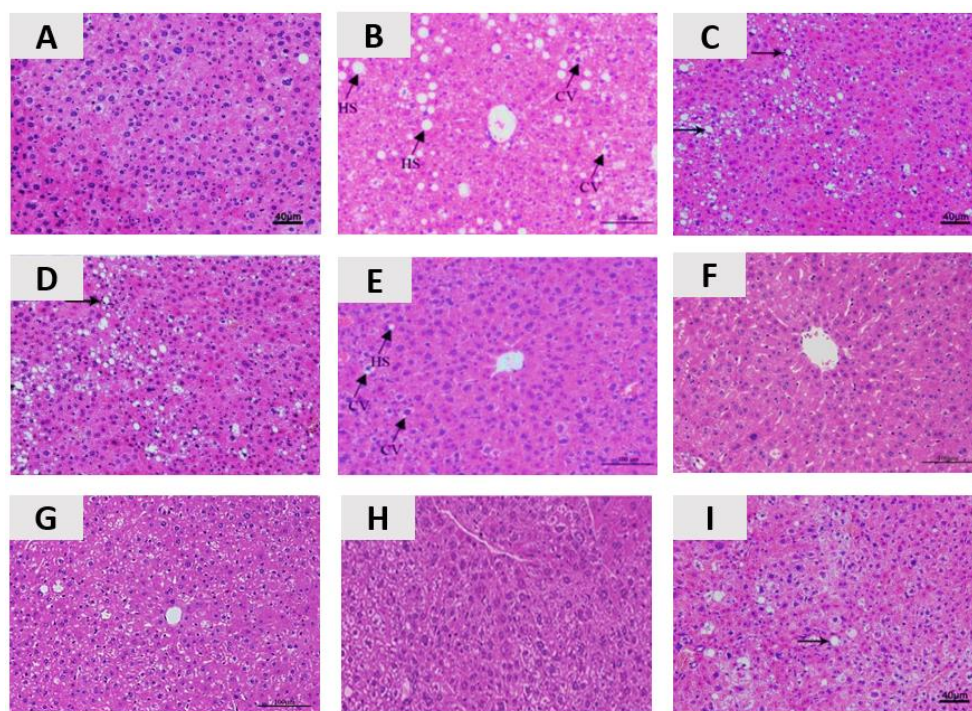


Figure 26. Effets sur l'histologie du foie de souris diabétiques induits par HFD/STZ colorées avec HE ($\times 200$). (A) Des sections de tissu hépatique des souris normal ; (B) Des sections de tissu hépatique des souris diabétique (HFD/STZ); (C) Des sections de tissu hépatique des souris diabétique traités par la pioglitazone ; (D-I) Des sections de tissu hépatique des souris diabétique traités par **3d;3e;4d;4e;5b;5c**. La barre d'échelle est de 50 μm . HS : accumulation lipidique.

Dans l'examen histopathologique des tissus des reins par la coloration H&E, les tubules rénaux présentaient une dégénérescence et une nécrose sévères, une dilatation glomérulaire, un épaissement de la paroi vasculaire, un détachement des cellules épithéliales tubulaires avec une condensation des noyaux et une inflammation interstitielle chez les souris diabétiques (HFD/STZ) par rapport aux souris témoins. La supplémentation en standard pioglitazone et des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dionea empêché de manière significative la détérioration des reins des souris diabétiques, après 28 jours de traitement, avec un taux plus faible d'épaississement de la membrane basale glomérulaire et de la prolifération mésangiale, ainsi que moins des lésions de l'infiltrat inflammatoire par rapport aux reins des souris du groupe HFD/STZ. Pour les dérivés **5b**, **5c** et la pioglitazone, l'expansion de la matrice mésangiale des souris des groupes traités par la dose 50 mg/kg avait un taux de diminution plus élevé. Ces résultats confirment ce qui est obtenu dans l'analyse quantitative des marqueurs rénaux. Par conséquent, selon les indicateurs histopathologiques et biochimiques, les résultats montrent que le traitement par les dérivés synthétisés peut empêcher les changements structurels rénaux chez les souris atteintes de néphropathie diabétique (Fig.27).

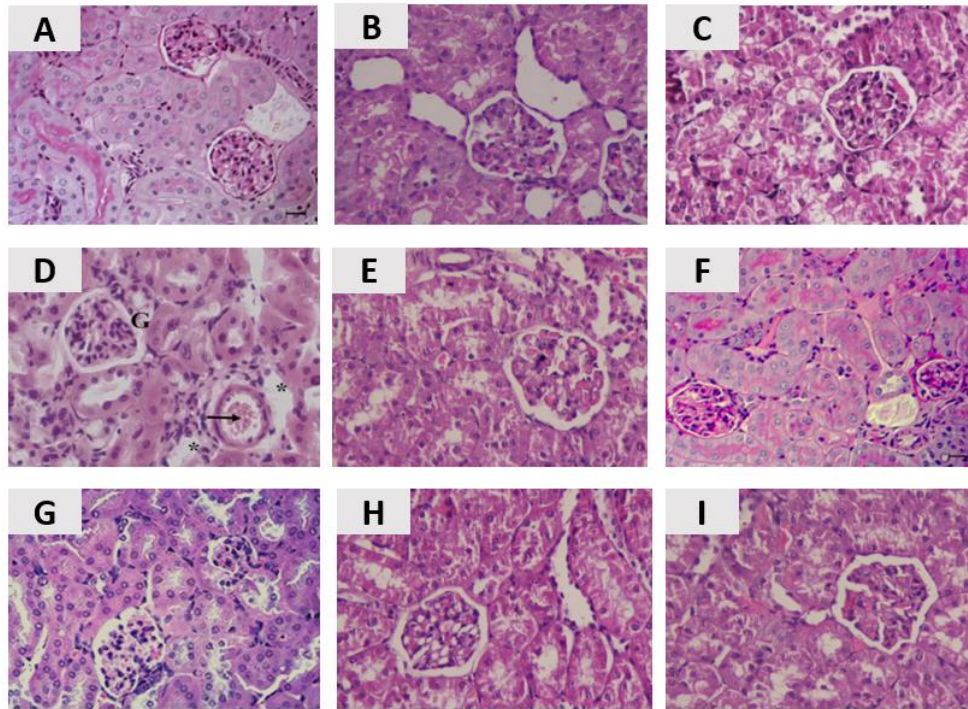


Figure 27. Effets sur l'histologie des reins de souris diabétiques induits par HFD/STZ colorées avec HE ($\times 200$). (A) Des sections de tissu hépatique des souris normal ; (B) Des sections de tissu hépatique des souris diabétique (HFD/STZ); (C) Des sections de tissu hépatique des souris diabétique traités par la pioglitazone ; (D-I) Des sections de tissu hépatique des souris diabétique traités par **3d;3e;4d;4e;5b;5c** . La barre d'échelle est de 100 μm .

Un examen histologique des tissus des îlots pancréatiques des souris expérimentales a été effectué pour observer les changements structurels dans chaque tissu avec une coloration H&E. Les îlots pancréatiques des souris normaux présentaient une architecture normale avec des cellules rondes ou ovales aux limites claires. En revanche, les îlots des souris diabétiques traités par l'HFD/STZ présentaient une perturbation pancréatique grave et une vacuolisation, ainsi qu'une réduction de la taille des îlots et une diminution relative du nombre de cellules β . Cette diminution du nombre d'îlots était accompagnée d'une morphologie irrégulière des îlots et d'une atrophie par rapport au groupe témoin diabétique. La gravité de ces changements a diminué chez les souris traitées par les dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dione (**3d;3e;4d;4e;5b;5c**) et de la pioglitazone à une dose de 50 mg/kg, et a empêché la perte d'îlots, les dommages structurels et l'atrophie. Le nombre de cellules β dans les îlots pancréatiques des souris diabétiques a augmenté de manière significative après le traitement par la pioglitazone et les dérivés testés, tandis que **3d** et **3e** n'ont eu aucun effet significatif sur la masse des cellules β des petits îlots pancréatiques (Fig.28).

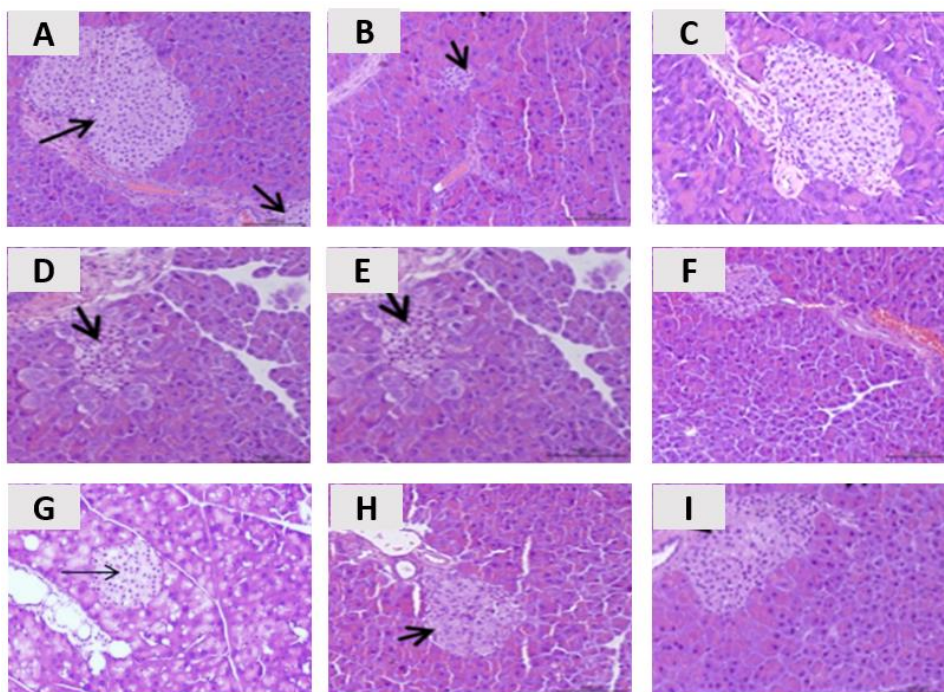


Figure 28. Effets sur l'histologie du pancréas de souris diabétiques induits par HFD/STZ colorées avec HE ($\times 200$). (A) Des sections de tissu pancréatique des souris normal ; (B) Des sections de tissu pancréatique des souris diabétique (HFD/STZ); (C) Des sections de tissu pancréatique des souris diabétique traités par la pioglitazone ; (D-I) Des sections de tissu pancréatique des souris diabétique traités par **3d;3e;4d;4e;5b;5c** . La barre d'échelle est de 50 μ m. \rightarrow : îlots pancréatiques/ cellules β .

vii. Effets des dérivés synthétisés de la thiazolidine-2,4-dionesur les activités SOD, CAT et la teneur en MDA

Bien que les mécanismes moléculaires du diabète et de ses complications restent flous, de plus en plus de preuves suggèrent que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans le développement du diabète et de ses complications (Rendra et al., 2019). Des preuves cliniques abondantes ont démontré que le diabète est étroitement corrélé au stress oxydatif, entraînant une production accrue de ROS ou une réduction du système de défense antioxydant. Le résultat (Tab.11) a montré que le régime hypercalorique HFD en combinaison avec une injection intrapéritonéale par STZ a augmenté les niveaux de MDA hépatique (49,75%), rénale (55,32%) et pancréatique (61,27%) dans le groupe modèle par rapport au groupe témoin ($P < 0,05$). Le traitement avec 50 mg/kg de chaque dérivé était prononcé sur ces paramètres, et a inhibé l'augmentation du niveau de MDA par rapport par rapport au groupe diabétique HFD/STZ ($P < 0,05$). Après le traitement par les produits **5b**, **5c** et la molécule standard de la pioglitazone, la teneur en MDA dans le pancréas, le foie et les reins des souris diabétiques étaient significativement inférieure avec des pourcentages entre 41,7% à 27,91% par rapport aux teneur en MDA obtenus chez les souris du groupe diabétique ($p < 0,05$).

Tableau 11. Effets de la thiazolidine-2,4-dione sur différents marqueurs antioxydant (MDA), pancréatiques, rénale et hépatiques chez les souris diabétiques traités (**3d;3e;4d;4e;5b;5c**).

	MDA (mM/g tissue)		
	Foie	Reins	Pancréas
Contrôle normal	6,12 ± 0,23	3,65 ± 0,65	4,14 ± 0,04
Contrôle HFD-STZ	12,18 ± 1,84	8,17 ± 0,90	10,69 ± 0,49
3d	8,83 ± 1,04	7,22 ± 0,33	6,78 ± 0,03
3e	9,80 ± 0,58	6,10 ± 0,20	6,34 ± 0,05
4d	8,19 ± 0,05	6,80 ± 0,75	6,02 ± 0,42
4e	8,47 ± 0,60	5,76 ± 0,78	6,72 ± 0,23
5b	7,50 ± 0,40	5,18 ± 0,71	5,89 ± 0,25
5c	7,10 ± 0,13	5,61 ± 0,63	6,06 ± 0,10
Pioglitazone	8,78 ± 0,69	5,38 ± 0,58	6,20 ± 0,19

L'enzyme SOD, en tant qu'une protéine antioxydant endogène, est capable d'éliminer la toxicité des radicaux libres et de protéger les cellules contre les traumatismes. Comme le montre le tableau (Tab.12), par rapport au groupe des souris témoins, les taux de SOD dans le foie, reins et pancréas étaient significativement diminués dans le groupe des souris diabétiques HFD/STZ ($P < 0,05$), avec 11,27%, 39,28% et 38,88%, respectivement. Après 4 semaines de traitement par chaque dérivé Thiazolidine-2,4-dione (50 mg/kg), les teneurs de SOD dans les différents organes chez les souris diabétiques ont été significativement augmentées.

Tableau 12. Effets de la thiazolidine-2,4-dione sur différents marqueurs antioxydant (SOD), pancréatiques, rénale et hépatiques chez les souris diabétiques traités (**3d;3e;4d;4e;5b;5c**).

	SOD (UI/mg protéine)		
	Foie	Reins	Pancréas
Contrôle normal	20,48 ± 1,36	25,20 ± 1,83	24,41 ± 1,38
Contrôle HFD-STZ	18,17 ± 1,73	15,30 ± 1,63	14,92 ± 1,46
3d	18,23 ± 1,43	20,91 ± 1,95	23,63 ± 1,72
3e	18,44 ± 1,49	24,08 ± 1,49	20,43 ± 1,16
4d	18,98 ± 0,86	19,41 ± 1,91	19,38 ± 0,98
4e	19,22 ± 1,46	18,15 ± 1,43	17,20 ± 1,52
5b	20,87 ± 0,77	14,12 ± 2,04	14,82 ± 1,28
5c	20,03 ± 1,41	15,24 ± 2,112	16,16 ± 1,51
Pioglitazone	19,10 ± 0,78	16,16 ± 1,67	15,16 ± 0,84

La CAT est une enzyme présente dans presque tous les organismes vivants. Elle catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Les résultats, montrent que par rapport au groupe des souris témoins, les taux de l'enzyme Catalase dans le foie, reins et pancréas ont significativement diminués dans le groupe des souris diabétiques HFD/STZ ($P < 0,05$), avec 54,10%, 41,46% et 62,16%, respectivement. Comme le montre le tableau (Tab.13), lorsqu'elles ont été traitées avec chaque dérivé Thiazolidine-2,4-dione à une dose de 50 mg/kg, les activités CAT dans le foie, reins et pancréas des souris diabétiques traités étaient remarquablement plus élevées que celles du groupe diabétique du groupe HFD/STZ.

Tableau 13. Effets de la thiazolidine-2,4-dione sur différents marqueurs antioxydant (CAT), pancréatiques, rénale et hépatiques chez les souris diabétiques traités (**3d;3e;4d;4e;5b;5c**).

	CAT (UI/mg protéine)		
	Foie	Reins	Pancréas
Contrôle normal	6,10 ± 0,18	3,20 ± 0,17	2,96 ± 0,91
Contrôle HFD-STZ	2,80 ± 0,37	1,87 ± 0,03	1,12 ± 0,31
3d	4,55 ± 0,86	2,48 ± 0,05	1,57 ± 0,07
3e	4,30 ± 0,29	2,56 ± 0,10	1,36 ± 0,14
4d	4,40 ± 0,65	2,79 ± 0,28	2,15 ± 0,50
4e	5,16 ± 0,78	2,10 ± 0,02	1,90 ± 0,11
5b	5,98 ± 0,96	2,82 ± 0,13	2,11 ± 0,08
5c	6,28 ± 0,85	2,15 ± 0,11	1,96 ± 0,04
Pioglitazone	6,78 ± 0,61	3,45 ± 0,20	2,30 ± 0,17

Conclusion générale

L'objectif de la présente étude est d'évaluer de manière exhaustive le potentiel pharmacologique d'une classe de dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione nouvellement synthétisés à améliorer le contrôle glycémique, en abaissant les taux de glycémie et lipidémie à jeun et postprandiaux, influençant favorablement la sensibilité à l'insuline et aussi la fonction des cellules β pancréatiques. Nous avons constaté que la présence de substituants Br ou Cl sur le phényle de la fraction 5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione-isoxazoline favorise l'interruption ou le ralentissement de l'hyperglycémie postprandiale en retardant l'absorption du glucose par l'inhibition des enzymes hydrolysant les polysaccharide, l' α -amylase et l' α -glucosidase. La contribution du groupement halogène a permis d'augmenter l'affinité de liaison avec les sites de liaisons des deux enzymes, par la favorisation des interactions hydrophobes et électrostatiques avec les résidus aminés des deux enzymes. Avant de procéder à l'investigation pharmacologique, nous avons montré que les molécules sélectionnées **3d;3e;4d;4e;5b;5c** n'ont pas montré une toxicité aiguë par voie orale, ni des effets indésirables suite à une administration d'une dose unique de chaque dérivé, pour une durée de 14 jours, avec une DL_{50} supérieur à 2000 mg/kg. D'après plusieurs recherches, le noyau TZD pourrait être une caractéristique structurelle importante dans l'hépatotoxicité des glitazones. En outre, les modifications structurelles ont permis de réduire ou d'éliminé la cytotoxicité pour les cellules HepG2. Ces conclusions sont en accord avec les résultats obtenus dans ce travail, où on a suggéré que les dérivés synthétisés ne contribuent pas de manière substantielle à la perte de viabilité ni à la déformation des cellules HepG2 hépatiques, par rapport au produit **3d** et la pioglitazone. L'absence de toxicité peut appuyer l'hypothèse selon laquelle le cycle TZD joue un rôle dans la toxicité, alors que la N-alkylation et l'addition du cycle isoxazoline ont joué un rôle dans l'atténuation de l'effet hépatotoxique envers les cellules hépatiques à des concentrations au-delà de 200 μ M après 72h d'exposition.

Plusieurs études ont montré que les souris nourries au HFD développent une résistance à l'insuline, en revanche, la streptozotocine est connue pour dévaster spécifiquement les cellules β du pancréas. Par conséquent, l'utilisation d'une faible dose de STZ avec un régime riche en graisses imite presque les qualités métaboliques du diabète chez les rongeurs. Ce modèle a été utilisé pour évaluer l'impact des dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione. L'hyperglycémie observé chez les souris diabétiques HFD/STZ a été progressivement supprimé dans tous les groupes traités par les TZD synthétisés et le pioglitazone. La diminution observée des niveaux de glucose sanguin après le traitement avec 120 min (OSTT) et 28 jours peut suggérer les propriétés antihyperglycémiques et hypoglycémique *in vivo*. Cette propriété peut être rendue au mécanisme de suppression de l'hyperglycémie postprandiale par l'inhibition des enzymes intestinales α -glucosidase et α -amylase, seul ou en combinaison avec d'autres mécanismes tel,

la modulation des proliférateurs PPAR. Le pouvoir antihyperglycémique des TZD testé a permis d'avoir une diminution de la résistance à l'insuline et une amélioration de la tolérance au glucose, comme le montrent les résultats du test OSTT. L'amélioration de l'homéostasie du glucose a permis la protection de la fonction, la masse et l'architecture des cellules β du pancréas altéré, ce qui permet une conservation de la sensibilité à l'insuline plasmatique, expliquant la modulation des taux de lipides par l'activation d'une enzyme lipoprotéine-lipase qui décompose les triglycérides en acides gras et en glycérol.

L'intervention pharmacologique par les différents dérivés a permis d'ajuster les perturbations dyslipidémiques, par la modulation de l'absorption accrue de TG sous forme de chylomicrons et/ou d'une diminution de l'absorption des TG dans les tissus périphériques. Le traitement par une dose de 50 mg/kg a permis de moduler l'hypercholestérolémie peut être par la diminution de l'absorption du cholestérol au niveau de l'intestin grêle suite à la prise de HFD et/ou à une conservation du métabolisme du cholestérol, expliqué par la diminution des taux élevés de cholestérol et l'augmentation des concentrations d'HDL-c par rapport aux groupes des souris diabétiques HFD/STZ. La régulation des paramètres lipidiques par les TZD pourrait être le résultat d'une diminution du taux de glycation accrue des lipoprotéines riches en cholestérol (LDL-c).

Le foie et les reins sont les organes clés impliqués dans presque toutes les voies biochimiques et à la régulation de l'homéostasie dans l'organisme. En accord avec certains nombres d'études, le développement de l'hyperglycémie et de l'hyperlipidémie dans le modèle HFD/STZ entraînerait des dommages aux hépatocytes et à la structure glomérulaire, augmentant par ceci les taux des enzymes endogènes dans le sang, telles que l'ALT, l'AST, la créatinine et l'urée sériques, et induisant une insuffisance hépatique et rénale. L'administration de dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione et la pioglitazone à une dose de 50 mg/kg a amélioré la fonction hépatique et rénale en diminuant les taux sériques d'AST, d'ALT, de créatinine et d'urée chez des souris du groupe HFD/STZ, et supprimant par conséquent les dommages et les nécroses des cellules du foie et rein. Ces résultats montrent que les TZD synthétisés ont des effets protecteurs sur les fonctions hépatiques et rénales. Actuellement, de plus en plus de preuves indiquent que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans le processus de développement du diabète et de ses complications. Dans cette étude nous avons également montré qu'il existe une association étroite entre la progression du diabète et le stress oxydatif, qui favorise le processus du diabète lorsque les niveaux des ROS augmentent ou que des dommages oxydatifs se produisent, avec une augmentation remarquable des niveaux de MDA sérique, avec une baisse de l'activité de l'enzyme SOD et CAT. Les résultats montrent que le traitement par les TZD diminue les taux des radicaux libres issues de la peroxydation lipidique, ainsi qu'une

restauration des capacité antioxydante, expliqué par la diminution des taux du MDA alors que l'activité de la SOD et de la CAT a augmenté par rapport à celle du groupe des souris diabétique HFD/STZ. L'effet antioxydant des TZD a permis une protection cellules β pancréatiques contre un dysfonction induit par les taux élevés des ROS. En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que les TZD synthétisés ont des effets significatifs sur les profils glycémiques et lipidiques et améliore la sensibilité à l'insuline via la suppression de l'hyperglycémie chez les souris diabétique HFD/STZ. Aucun effet hépatotoxique et néphrotoxique n'a été observé après 28 jours de traitement de traitement par les TZD à des doses de 50 mg/kg. Les traitements ont permis une protection des cellules β pancréatiques améliorant par ceci la sensibilité à l'insuline.

Référence bibliographique

- Abdi, A., Jalilian, M., Sarbarzeh, P. A., & Vlaisavljevic, Z. (2020). Diabetes and COVID-19: A systematic review on the current evidences. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 166, 108347. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2020.108347>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aghamohammadzadeh, N., Niafar, M., Dalir Abdolahinia, E., Najafipour, F., Mohamadzadeh Gharebaghi, S., Adabi, K., Dalir Abdolahinia, E., & Ahadi, H. (2015). The effect of pioglitazone on weight, lipid profile and liver enzymes in type 2 diabetic patients. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 6(2), 56–60. <https://doi.org/10.1177/2042018815574229>
- Agrawal, R., Jain, P., & N. Dikshit, S. (2012). Balaglitazone: A Second Generation Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Gamma (γ) Agonist. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(2), 87–97. <https://doi.org/10.2174/138955712798995048>
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine* 2013 19:5, 19(5), 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>
- Ajjan, R. A., & Grant, P. J. (2008). The cardiovascular safety of rosiglitazone. <https://doi.org/10.1517/14740338.7.4.367>, 7(4), 367–376. <https://doi.org/10.1517/14740338.7.4.367>
- Alipourfard, I., Datukishvili, N., & Mikeladze, D. (2019). TNF- α downregulation modifies insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in metabolic signaling of diabetic insulin-resistant hepatocytes. *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3560819>
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(2), 195–201. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTI770>
- Ashraf, J., Mughal, E. U., Sadiq, A., Naeem, N., Muhammad, S. A., Qousain, T., Zafar, M. N., Khan, B. A., & Anees, M. (2020). Design and synthesis of new flavonols as dual α -amylase and α -glucosidase inhibitors: Structure-activity relationship, drug-likeness, in vitro and in silico studies. *Journal of Molecular Structure*, 1218, 128458. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2020.128458>
- Azoulay, L., Yin, H., Fillion, K. B., Assayag, J., Majdan, A., Pollak, M. N., & Suissa, S. (2012). The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *BMJ*, 344(7862). <https://doi.org/10.1136/BMJ.E3645>
- Bao, S., Wu, Y. L., Wang, X., Han, S., Cho, S. B., Ao, W., & Nan, J. X. (2020). Agriophyllum oligosaccharides ameliorate hepatic injury in type 2 diabetic db/db mice targeting INS-R/IRS-2/PI3K/AKT/PPAR- γ /Glut4 signal pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 257, 112863. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112863>
- Barish, G. D., Narkar, V. A., & Evans, R. M. (2006). PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 590–597. <https://doi.org/10.1172/JCI27955>
- Baron, M., Maillet, J., Huyvaert, M., Dechaume, A., Boutry, R., Loisel, H., Durand, E., Toussaint, B., Vaillant, E., Philippe, J., Thomas, J., Ghulam, A., Franc, S., Charpentier, G., Borys, J. M., Lévy-Marchal, C., Tauber, M., Scharfmann, R., Weill, J., ... Bonnefond, A. (2019). Loss-of-function mutations in MRAP2 are pathogenic in hyperphagic obesity with hyperglycemia and hypertension. *Nature Medicine* 2019 25:11, 25(11), 1733–1738. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0622-0>
- Battaglia, S., Maguire, O., & Campbell, M. J. (2010). Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *International Journal of Cancer*, 126(11), 2511–2519. <https://doi.org/10.1002/IJC.25181>

- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *44*(1), 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Biondo, L. A., Teixeira, A. A. S., de O. S. Ferreira, K. C., & Neto, J. C. R. (2020). Pharmacological Strategies for Insulin Sensitivity in Obesity and Cancer: Thiazolidinediones and Metformin. *Current Pharmaceutical Design*, *26*(9), 932–945. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200122124116>
- Blind, E., Dunder, K., de Graeff, P. A., & Abadie, E. (2010). Rosiglitazone: a European regulatory perspective. *Diabetologia* *2010* *54*:2, *54*(2), 213–218. <https://doi.org/10.1007/S00125-010-1992-5>
- Booth, A., Magnuson, A., & Foster, M. (2014). Detrimental and protective fat: Body fat distribution and its relation to metabolic disease. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *17*(1), 13–27. <https://doi.org/10.1515/HMBCI-2014-0009/XML>
- Botham, P. A. (2004). Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in Vitro*, *18*(2), 227–230. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00143-7)
- Bourg, C. A., & Phillips, B. B. (2012). Rosiglitazona, riesgo de isquemia miocárdica, y acciones regulatorias recientes. *Annals of Pharmacotherapy*, *46*(2), 282–289. <https://doi.org/10.1345/aph.1Q400>
- Braissant, O., Fougelle, F., Scotto, C., Dauça, M., & Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, *137*(1), 354–366. <https://doi.org/10.1210/ENDO.137.1.8536636>
- Bruce, N. J., Ganotra, G. K., Kokh, D. B., Sadiq, S. K., & Wade, R. C. (2018). New approaches for computing ligand–receptor binding kinetics. *Current Opinion in Structural Biology*, *49*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2017.10.001>
- Chadha, N., Bahia, M. S., Kaur, M., & Silakari, O. (2015). Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*(13), 2953–2974. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2015.03.071>
- Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P., & Rastinejad, F. (2008). Structure of the intact PPAR- γ –RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature* *2008* *456*:7220, *456*(7220), 350–356. <https://doi.org/10.1038/nature07413>
- Chenafa, H., Mesli, F., Daoud, I., Achiri, R., Ghalem, S., & Neghra, A. (2021). In silico design of enzyme α -amylase and α -glucosidase inhibitors using molecular docking, molecular dynamic, conceptual DFT investigation and pharmacophore modelling. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1882340>
- Chinetti, G., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation Research* *2000* *49*:10, *49*(10), 497–505. <https://doi.org/10.1007/S000110050622>
- Chiu, C. Y., Hsu, W. H., Liu, H. K., Liu, S. H., & Lin, Y. L. (2018). Prepared Rehmanniae Radix oligosaccharide regulates postprandial and diabetic blood glucose in mice. *Journal of Functional Foods*, *41*, 210–215. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.12.031>
- Ciaraldi, T. P., Aroda, V., Mudaliar, S. R., & Henry, R. R. (2013). Inflammatory cytokines and chemokines, skeletal muscle and polycystic ovary syndrome: Effects of pioglitazone and metformin treatment. *Metabolism*, *62*(11), 1587–1596. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2013.07.004>
- Colca, J. R., McDonald, W. G., & Kletzien, R. F. (2014). Mitochondrial target of thiazolidinediones. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *16*(11), 1048–1054. <https://doi.org/10.1111/DOM.12308>
- Corona, J. C., & Duchon, M. R. (2016). PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *100*, 153–163. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.06.023>

- Correia-Santos, A. M., Suzuki, A., Anjos, J. S., Rêgo, T. S., Almeida, K. C. L., & Boaventura, G. T. (2012). Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. *Medicina (Ribeirão Preto)*, *45*(4), 436–444. <https://doi.org/10.11606/ISSN.2176-7262.V45I4P436-444>
- Costa, J. M., & Almeida Neto, A. F. de. (2020). Ultrasound-assisted electrodeposition and synthesis of alloys and composite materials: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *68*, 105193. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2020.105193>
- Cousins, K. R. (2011). Computer Review of ChemDraw Ultra 12.0. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(21), 8388. <https://doi.org/10.1021/JA204075S>
- Dammone, G., Karaz, S., Lukjanenko, L., Winkler, C., Sizzano, F., Jacot, G., Migliavacca, E., Palini, A., Desvergne, B., Gilardi, F., & Feige, J. N. (2018). PPAR γ Controls Ectopic Adipogenesis and Cross-Talks with Myogenesis During Skeletal Muscle Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 2044*, *19*(7), 2044. <https://doi.org/10.3390/IJMS19072044>
- Das, S., & Chakrabarti, R. (2005). Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus: Present Therapies and New Drug Targets. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *5*(11), 1019–1034. <https://doi.org/10.2174/138955705774575273>
- Davidson, M. A., Mattison, D. R., Azoulay, L., & Krewski, D. (2017). Thiazolidinedione drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus: past, present and future. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *48*(1), 52–108. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1351420>
- DeFronzo, R. A., Inzucchi, S., Abdul-Ghani, M., & Nissen, S. E. (2019). Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *16*(2), 133–143. <https://doi.org/10.1177/1479164118825376>
- de Magalhães, D. A., Kume, W. T., Correia, F. S., Queiroz, T. S., Allebrandt Neto, E. W., dos Santos, M. P., Kawashita, N. H., & de França, S. A. (2019). High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *91*(1), 20180314. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180314>
- Dhanavade, M. J., Parulekar, R. S., Kamble, S. A., & Sonawane, K. D. (2015). Molecular modeling approach to explore the role of cathepsin B from *Hordeum vulgare* in the degradation of A β peptides. *Molecular BioSystems*, *12*(1), 162–168. <https://doi.org/10.1039/C5MB00718F>
- Dias, M. M. G., Batista, F. A. H., Tittanegro, T. H., de Oliveira, A. G., le Maire, A., Torres, F. R., Filho, H. V. R., Silveira, L. R., & Figueira, A. C. M. (2020). PPAR γ S273 Phosphorylation Modifies the Dynamics of Coregulator Proteins Recruitment. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 884. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.561256/BIBTEX>
- Doolittle, R. F. (1981). Similar Amino Acid Sequences: Chance or Common Ancestry? *Science*, *214*(4517), 149–159. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7280687>
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. (1997). [20] VERIFY3d: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, *277*, 396–404. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)77022-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77022-8)
- Fan, Y., Wang, Y., Tang, Z., Zhang, H., Qin, X., Zhu, Y., Guan, Y., Wang, X., Staels, B., Chien, S., & Wang, N. (2008). Suppression of pro-inflammatory adhesion molecules by PPAR- δ in human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *28*(2), 315–321. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.149815>
- Ferwana, M., Firwana, B., Hasan, R., Al-Mallah, M. H., Kim, S., Montori, V. M., & Murad, M. H. (2013). Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabetic Medicine*, *30*(9), 1026–1032. <https://doi.org/10.1111/DME.12144>

- Fettach, S., Mrabti, H. N., Sayah, K., Bouyahya, A., Salhi, N., Cherrah, Y., & el Abbes, F. M. (2019). Phenolic content, acute toxicity of *Ajuga iva* extracts and assessment of their antioxidant and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects. *South African Journal of Botany*, *125*, 381–385. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.08.010>
- Forman, L. M., Simmons, D. A., & Diamond, R. H. (2000). Hepatic failure in a patient taking rosiglitazone. *Annals of Internal Medicine*, *132*(2), 118–121. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-132-2-200001180-00005>
- Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., Vazquez, T., & Blomberg, B. B. (2017). Obesity induces pro-inflammatory B cells and impairs B cell function in old mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, *162*, 91–99. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2017.01.004>
- Frederick, D. M. (2001). *INVESTIGATIONS INTO THE MECHANISM OF TOXICITY OF THIAZOLIDINEDIONE (TZD) RING-CONTAINING COMPOUNDS*.
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *20*:4, *20*(4), 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Gilde, A. J., van der Lee, K. A. J. M., Willemsen, P. H. M., Chinetti, G., van der Leij, F. R., van der Vusse, G. J., Staels, B., & van Bilsen, M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circulation Research*, *92*(5), 518–524. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000060700.55247.7C>
- Gras, D., Chanez, P., Urbach, V., Vachier, I., Godard, P., & Bonnans, C. (2009). Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *296*(6), 970–978. https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.90219.2008/SUPPL_FILE/FIGS1.PDF
- Grey, A. (2007). Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporosis International* *2007* *19*:2, *19*(2), 129–137. <https://doi.org/10.1007/S00198-007-0477-Y>
- Grey, A. (2009). Thiazolidinedione-induced skeletal fragility – mechanisms and implications. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *11*(4), 275–284. <https://doi.org/10.1111/J.1463-1326.2008.00931.X>
- Grossman, S. L., & Lessem, J. (2005). Mechanisms and clinical effects of thiazolidinediones. <http://Dx.Doi.Org/10.1517/13543784.6.8.1025>, *6*(8), 1025–1040. <https://doi.org/10.1517/13543784.6.8.1025>
- Guan, G., Han, M.-Y., Guan, G., & Han, M.-Y. (2019). Functionalized Hybridization of 2D Nanomaterials. *Advanced Science*, *6*(23), 1901837. <https://doi.org/10.1002/ADVS.201901837>
- Guo, L., Chen, K., Yuan, J., Huang, P., Xu, X., Li, C., Qian, N., Qi, J., Shao, Z., Deng, L., He, C., & Xu, J. (2019). Estrogen inhibits osteoclasts formation and bone resorption via microRNA-27a targeting PPAR γ and APC. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(1), 581–594. <https://doi.org/10.1002/JCP.26788>
- Gupta, D., Kono, T., & Evans-Molina, C. (2010). The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *12*(12), 1036–1047. <https://doi.org/10.1111/J.1463-1326.2010.01299.X>
- Hafidi, Z., Yakkou, L., Guouguaou, F. E., Amghar, S., & Achouri, M. el. (2019). Aminoalcohol-based surfactants (N-(hydroxyalkyl)-N, N- dimethyl N-alkylammonium bromide): evaluation of antibacterial activity and molecular docking studies against dehydrosqualene synthase enzyme (CrtM). <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1700134>, *42*(4), 514–525. <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1700134>
- Henney, J. E. (2000). Withdrawal of Troglitazone and Cisapride. *JAMA*, *283*(17), 2228–2228. <https://doi.org/10.1001/JAMA.283.17.2228>

- Hetzel, J., Balletshofer, B., Rittig, K., Walcher, D., Kratzer, W., Hombach, V., Häring, H. U., Koenig, W., & Marx, N. (2005). Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(9), 1804–1809. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000176192.16951.9a>
- Hong, F., Xu, P., & Zhai, Y. (2018). The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 2189, 19(8), 2189. <https://doi.org/10.3390/IJMS19082189>
- Huang, B. (2009). MetaPocket: A Meta Approach to Improve Protein Ligand Binding Site Prediction. <https://Home.Liebertpub.Com/Omi>, 13(4), 325–330. <https://doi.org/10.1089/OMI.2009.0045>
- Huang, S. Y., & Zou, X. (2010). Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *International Journal of Molecular Sciences* 2010, Vol. 11, Pages 3016-3034, 11(8), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/IJMS11083016>
- Isnard, R., Legrand, L., & Pousset, F. (2021). Insuffisance cardiaque et diabète : données épidémiologiques, phénotype et impact sur le pronostic. *Médecine Des Maladies Métaboliques*, 15(3), 246–251. <https://doi.org/10.1016/J.MMM.2021.02.009>
- James, A. W. (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*, 2013, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2013/684736>
- Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene – A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46–50. <https://doi.org/10.1016/J.DSX.2014.09.015>
- Kahn, C. R. (1994). Insulin Action, Diabetogenes, and the Cause of Type II Diabetes. *Diabetes*, 43(8), 1066–1085. <https://doi.org/10.2337/DIAB.43.8.1066>
- Kahn, S. E., Haffner, S. M., Heise, M. A., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., Kravitz, B. G., Lachin, J. M., O'Neill, M. C., Zinman, B., & Viberti, G. (2006). Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy. *New England Journal of Medicine*, 355(23), 2427–2443. https://doi.org/10.1056/NEJMOA066224/SUPPL_FILE/NEJMOA066224SA1.PDF
- Kahn, S. E., Lachin, J. M., Zinman, B., Haffner, S. M., Aftring, R. P., Paul, G., Kravitz, B. G., Herman, W. H., Viberti, G., Holman, R. R., Jones, N., & O'Neill, C. (2011). Effects of Rosiglitazone, Glyburide, and Metformin on β -Cell Function and Insulin Sensitivity in ADOPT. *Diabetes*, 60(5), 1552. <https://doi.org/10.2337/DB10-1392>
- Kamata, S., Oyama, T., Saito, K., Honda, A., Yamamoto, Y., Suda, K., Ishikawa, R., Itoh, T., Watanabe, Y., Shibata, T., Uchida, K., Suematsu, M., & Ishii, I. (2020). PPAR α Ligand-Binding Domain Structures with Endogenous Fatty Acids and Fibrates. *IScience*, 23(11), 101727. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.101727>
- Karunakaran, U., Elumalai, S., Moon, J. S., & Won, K. C. (2021). Pioglitazone-induced AMPK-Glutaminase-1 prevents high glucose-induced pancreatic β -cell dysfunction by glutathione antioxidant system. *Redox Biology*, 45, 102029. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.102029>
- Kaur, R., Kumar, R., Dogra, N., Kumar, A., Yadav, A. K., & Kumar, M. (2021). Synthesis and studies of thiazolidinedione–isatin hybrids as α -glucosidase inhibitors for management of diabetes. <https://doi.org/10.4155/Fmc-2020-0022>, 13(5), 457–485. <https://doi.org/10.4155/FMC-2020-0022>
- Kee, K. T., Koh, M., Oong, L. X., & Ng, K. (2013). Screening culinary herbs for antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(9), 1884–1891. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12166>
- Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts: BI*, 5(3), 123. <https://doi.org/10.15171/BI.2015.20>

- Kim, C., Lee, H., Cho, Y. M., Kwon, O. J., Kim, W., & Lee, E. K. (2013). TNF α -induced miR-130 resulted in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation. *FEBS Letters*, *587*(23), 3853–3858. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.10.018>
- Koffarnus, R. L., Wargo, K. A., & Phillippe, H. M. (2013). Rivoglitazone: a new thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*, *47*(6), 877–885. <https://doi.org/10.1345/APH.1R754>
- Kores, K., Konc, J., & Bren, U. (2021). Mechanistic insights into side effects of troglitazone and rosiglitazone using a novel inverse molecular docking protocol. *Pharmaceutics*, *13*(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030315>
- Kuppusamy, A., Muthusamy, U., Andichetiar Thirumalaisamy, S., Varadharajan, S., Ramasamy, K., & Ramanathan, S. (2011). In vitro (α -glucosidase and α -amylase inhibition) and in vivo antidiabetic property of phytic acid (IP6) in streptozotocin- nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus (NIDDM) in rats. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, *8*(1). <https://doi.org/10.2202/1553-3840.1483>
- Larsen, P. J., Lykkegaard, K., Larsen, L. K., Fleckner, J., Sauerberg, P., Wassermann, K., & Wulff, E. M. (2008). Dissociation of antihyperglycaemic and adverse effects of partial peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ) agonist balaglitazone. *European Journal of Pharmacology*, *596*(1–3), 173–179. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2008.08.004>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, *26*(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., & IUCr. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Urn:Issn:0021-8898*, *26*(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Lazarenko, O. P., Rzonca, S. O., Suva, L. J., & Lecka-Czernik, B. (2006). Netoglitazone is a PPAR-gamma ligand with selective effects on bone and fat. *Bone*, *38*(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2005.07.008>
- Lebovitz, H. E. (2019). Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications. *Current Diabetes Reports*, *19*(12), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11892-019-1270-Y/TABLES/3>
- Lencel, P., Delplace, S., Hardouin, P., & Magne, D. (2011). TNF- α stimulates alkaline phosphatase and mineralization through PPAR γ inhibition in human osteoblasts. *Bone*, *48*(2), 242–249. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2010.09.001>
- Liao, J., Ouyang, L., Jin, Q., Zhang, J., & Luo, R. (2020). Recent advances in the oxime-participating synthesis of isoxazolines. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *18*(25), 4709–4716. <https://doi.org/10.1039/D0OB00963F>
- Li, C., Begum, A., Numao, S., Kwan, H. P., Withers, S. G., & Brayer, G. D. (2005). Acarbose rearrangement mechanism implied by the kinetic and structural analysis of human pancreatic α -amylase in complex with analogues and their elongated counterparts. *Biochemistry*, *44*(9), 3347–3357. https://doi.org/10.1021/BI048334e/ASSET/IMAGES/BI048334e.SOCIAL.JPEG_V03
- Lingvay, I., Raskin, P., & Szczepaniak, L. S. (2007). Effect of insulin–metformin combination on hepatic steatosis in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, *21*(3), 137–142. <https://doi.org/10.1016/J.JDIACOMP.2007.02.005>
- Mahalle, S. R., Netankar, P. D., Bondge, S. P., & Mane, R. A. (2008). An efficient method for Knoevenagel condensation: a facile synthesis of 5-arylidene 2,4-thiazolidinedione. <Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tgcl>, *1*(2), 103–106. <https://doi.org/10.1080/17518250802139881>

- Mahmoodi, N. M., Oveisi, M., Bakhtiari, M., Hayati, B., Shekarchi, A. A., Bagheri, A., & Rahimi, S. (2019). Environmentally friendly ultrasound-assisted synthesis of magnetic zeolitic imidazolate framework - Graphene oxide nanocomposites and pollutant removal from water. *Journal of Molecular Liquids*, 282, 115–130. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.02.139>
- Mandrup, S., & Bugge, A. (2010). Molecular mechanisms and genome-wide aspects of PPAR subtype specific transactivation. *PPAR Research*. <https://doi.org/10.1155/2010/169506>
- Marhl, M., Grubelnik, V., Magdič, M., & Markovič, R. (2020). Diabetes and metabolic syndrome as risk factors for COVID-19. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 671–677. <https://doi.org/10.1016/J.DSX.2020.05.013>
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers* 2019 5:1, 5(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
- Meerlo, J. van, Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). *Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay*. 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Meier, J. J., & Bonadonna, R. C. (2013). Role of Reduced β -Cell Mass Versus Impaired β -Cell Function in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 36(Supplement_2), S113–S119. <https://doi.org/10.2337/DCS13-2008>
- Mendoza, G., Hernández, H., Quintero, L., Sosa-Rivadeneira, M., Bernès, S., Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2005). Synthesis of N-substituted 2,4-thiazolidinediones from oxazolidinethiones. *Tetrahedron Letters*, 46(46), 7867–7870. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2005.09.116>
- Meraj, K., Mahto, M. K., Christina, N. B., Desai, N., Shahbazi, S., & Bhaskar, M. (2012). Molecular modeling, docking and ADMET studies towards development of novel Disopyramide analogs for potential inhibition of human voltage gated sodium channel proteins. *Bioinformation*, 8(23), 1139. <https://doi.org/10.6026/97320630081139>
- Min, K. W., Zhang, X., Imchen, T., & Baek, S. J. (2012). A peroxisome proliferator-activated receptor ligand MCC-555 imparts anti-proliferative response in pancreatic cancer cells by PPAR γ -independent up-regulation of KLF4. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(2), 225–232. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2012.06.014>
- Mohd Siddique, M. U., Thakur, A., Shilkar, D., Yasmin, S., Halakova, D., Kovacicova, L., Prnova, M. S., Stefek, M., Acevedo, O., Dasararaju, G., Devadasan, V., Mondal, S. K., & Jayaprakash, V. (2021). Non-carboxylic acid inhibitors of aldose reductase based on N-substituted thiazolidinedione derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 223, 113630. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113630>
- Mudur, G. (2002). Researchers question ethics of diabetes drug trial. *BMJ: British Medical Journal*, 325(7360), 353. <https://doi.org/10.1136/BMJ.325.7360.353/A>
- Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 12–20. <https://doi.org/10.1111/CBDD.13388>
- Najibi, S. M., Maadooliat, M., Zhou, L., Huang, J. Z., & Gao, X. (2017). Protein Structure Classification and Loop Modeling Using Multiple Ramachandran Distributions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 243–254. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2017.01.011>
- Nanjan, M. J., Mohammed, M., Prashantha Kumar, B. R., & Chandrasekar, M. J. N. (2018). Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. In *Bioorganic Chemistry* (Vol. 77, pp. 548–567). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>

- Neumann, A., Weill, A., Ricordeau, P., Fagot, J. P., Alla, F., & Allemand, H. (2012). Pioglitazone and risk of bladder cancer among diabetic patients in France: A population-based cohort study. *Diabetologia*, *55*(7), 1953–1962. <https://doi.org/10.1007/S00125-012-2538-9/TABLES/4>
- Nissen, S. E. (2010). The rise and fall of rosiglitazone. *European Heart Journal*, *31*(7), 773–776. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHQ016>
- Nissen, S. E., Nicholls, S. J., Wolski, K., Nesto, R., Kupfer, S., Perez, A., Jure, H., de Larochelière, R., Staniloae, C. S., Mavromatis, K., Saw, J., Hu, B., Lincoff, A. M., & Tuzcu, E. M. (2008). Comparison of Pioglitazone vs Glimepiride on Progression of Coronary Atherosclerosis in Patients With Type 2 Diabetes: The PERISCOPE Randomized Controlled Trial. *JAMA*, *299*(13), 1561–1573. <https://doi.org/10.1001/JAMA.299.13.1561>
- Oguntibeju, O. O. (2019). Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, *11*(3), 45. <https://doi.org/10.1155/2019/11345>
- Oyedotun, K. S., & Lemire, B. D. (2004). The Quaternary Structure of the Saccharomyces cerevisiae Succinate Dehydrogenase: HOMOLOGY MODELING, COFACTOR DOCKING, AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDIES *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 9424–9431. <https://doi.org/10.1074/JBC.M311876200>
- Pai, S. A., & Kshirsagar, N. A. (2016). Pioglitazone utilization, efficacy & safety in Indian type 2 diabetic patients: A systematic review & comparison with European Medicines Agency Assessment Report. *The Indian Journal of Medical Research*, *144*(5), 672. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_650_15
- Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G., & Glass, C. K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*, *437*(7059), 759–763. <https://doi.org/10.1038/NATURE03988>
- Peng, J., Huan, Y., Jiang, Q., Sun, S. J., Jia, C. M., & Shen, Z. F. (2014). Effects and potential mechanisms of pioglitazone on lipid metabolism in obese diabetic KKAY mice. *PPAR Research*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/538183>
- Pérez-Torres, I., Castrejón-Téllez, V., Soto, M. E., Rubio-Ruiz, M. E., Manzano-Pech, L., & Guarner-Lans, V. (2021). Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences* *2021*, Vol. 22, Page 1786, *22*(4), 1786. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041786>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *209*, 112891. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112891>
- Pouwels, K. B., & van Grootheest, K. (2012). The rosiglitazone decision process at FDA and EMA. What should we learn? *International Journal of Risk & Safety in Medicine*, *24*(2), 73–80. <https://doi.org/10.3233/JRS-2012-0559>
- Prashantha Kumar, B. R., Basu, P., Adhikary, L., & Nanjan, M. J. (2012). Efficient Conversion of N-Terminal of L-Tyrosine, DL-Phenyl Alanine, and Glycine to Substituted 2-Thioxo-thiazolidine-4-ones: A Stereospecific Synthesis. <http://Dx.Doi.Org/10.1080/00397911.2011.576322>, *42*(20), 3089–3096. <https://doi.org/10.1080/00397911.2011.576322>
- Rais, N., Ved, A., Ahmad, R., Parveen, K., Gautam, G. K., Bari, D. G., Shukla, K. S., Gaur, R., & Singh, A. P. (2021). Model of Streptozotocin-Nicotinamide Induced Type 2 Diabetes: A Comparative Review. *Current Diabetes Reviews*, *18*. <https://doi.org/10.2174/1573399818666211117123358>

- Rajapaksha, H., Bhatia, H., Wegener, K., Petrovsky, N., & Bruning, J. B. (2017). X-ray crystal structure of rivoglitazone bound to PPAR γ and PPAR subtype selectivity of TZDs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(8), 1981–1991. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2017.05.008>
- Rančić, M. P., Trišovic, N. P., Milčić, M. K., Ajaj, I. A., & Marinković, A. D. (2013). Experimental and theoretical study of substituent effect on ^{13}C NMR chemical shifts of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones. *Journal of Molecular Structure*, 1049, 59–68. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2013.06.027>
- Raskin, P., Rendell, M., Riddle, M. C., Dole, J. F., Freed, M. I., & Rosenstock, J. (2001). A Randomized Trial of Rosiglitazone Therapy in Patients With Inadequately Controlled Insulin-Treated Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 24(7), 1226–1232. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.24.7.1226>
- Reeve, W., & Barron, E. R. (2002). New syntheses of thiadiazinones, thiazolidinedione hydrazones, and hydroxythiazoles from phenyl (trichloromethyl) carbinols. *Journal of Organic Chemistry*, 40(13), 1917–1920. <https://doi.org/10.1021/JO00901A010>
- Rendra, E., Riabov, V., Mossel, D. M., Sevastyanova, T., Harmsen, M. C., & Kzhyshkowska, J. (2019). Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology*, 224(2), 242–253. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2018.11.010>
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., & Frühbeck, G. (2011). Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. *Htp://Dx.Doi.Org/10.4161/Cc.10.10.15672*, 10(10), 1548–1556. <https://doi.org/10.4161/CC.10.10.15672>
- Ryan, K. K., Li, B., Grayson, B. E., Matter, E. K., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2011). A role for central nervous system PPAR- γ in the regulation of energy balance. *Nature Medicine* 2011 17:5, 17(5), 623–626. <https://doi.org/10.1038/nm.2349>
- Rydberg, E. H., Li, C., Maurus, R., Overall, C. M., Brayer, G. D., & Withers, S. G. (2002). Mechanistic Analyses of Catalysis in Human Pancreatic α -Amylase: Detailed Kinetic and Structural Studies of Mutants of Three Conserved Carboxylic Acids†. *Biochemistry*, 41(13), 4492–4502. <https://doi.org/10.1021/BI011821Z>
- Sánchez-Solana, B., Laborda, J., & Baladrón, V. (2012). Mouse Resistin Modulates Adipogenesis and Glucose Uptake in 3T3-L1 Preadipocytes Through the ROR1 Receptor. *Molecular Endocrinology*, 26(1), 110–127. <https://doi.org/10.1210/ME.2011-1027>
- Scatena, R., Bottoni, P., Martorana, G. E., Vincenzoni, F., Botta, G., Pastore, P., & Giardina, B. (2007). Mitochondria, ciglitazone and liver: A neglected interaction in biochemical pharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 567(1–2), 50–58. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.04.017>
- Schoenberg, K. M., Perfield, K. L., Farney, J. K., Bradford, B. J., Boisclair, Y. R., & Overton, T. R. (2011). Effects of prepartum 2,4-thiazolidinedione on insulin sensitivity, plasma concentrations of tumor necrosis factor- α and leptin, and adipose tissue gene expression. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5523–5532. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-4501>
- Shao, M., Vishvanath, L., Busbuso, N. C., Hepler, C., Shan, B., Sharma, A. X., Chen, S., Yu, X., An, Y. A., Zhu, Y., Holland, W. L., & Gupta, R. K. (2018). De novo adipocyte differentiation from Pdgfr β + preadipocytes protects against pathologic visceral adipose expansion in obesity. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03196-x>
- Shen, G. S., Zhou, H. bin, Zhang, H., Chen, B., Liu, Z. P., Yuan, Y., Zhou, X. Z., & Xu, Y. J. (2018). The GDF11-FTO-PPAR γ axis controls the shift of osteoporotic MSC fate to adipocyte and inhibits bone formation during osteoporosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(12), 3644–3654. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2018.09.015>

- Siclari, J. J., & Gardner, K. H. (2021). Two steps, one ligand: How PPAR γ binds small-molecule agonists. *Structure*, 29(9), 935–936. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2021.08.005>
- Sihota, P., Yadav, R. N., Poleboina, S., Mehandia, V., Bhadada, S. K., Tikoo, K., & Kumar, N. (2020). Development of HFD-Fed/Low-Dose STZ-Treated Female Sprague-Dawley Rat Model to Investigate Diabetic Bone Fragility at Different Organization Levels. *JBMR Plus*, 4(10), e10379. <https://doi.org/10.1002/JBM4.10379>
- Singh, S., Loke, Y. K., & Furberg, C. D. (2007). Long-term Risk of Cardiovascular Events With Rosiglitazone: A Meta-analysis. *JAMA*, 298(10), 1189–1195. <https://doi.org/10.1001/JAMA.298.10.1189>
- Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*, 5(4), 349–358. <https://doi.org/10.1111/JDI.12235>
- Smith, M. T. (2003). Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 16(6), 679–687.
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, 52(4), 313–320. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2005.05.004>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 60, 273–343. <https://doi.org/10.1016/BS.PMCH.2021.01.004>
- Starner, C. I., Schafer, J. A., Heaton, A. H., & Gleason, P. P. (2015). Rosiglitazone and Pioglitazone Utilization from January 2007 Through May 2008 Associated With Five Risk-Warning Events. <https://doi.org/10.18553/Jmcp.2008.14.6.523>, 14(6), 523–531. <https://doi.org/10.18553/JMCP.2008.14.6.523>
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2012.01.006>
- Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I. P., Davies, P. J. A., & Nagy, L. (2004). Retinoid X receptors: Exploring their (patho)physiological functions. *Cell Death & Differentiation* 2004 11:2, 11(2), S126–S143. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401533>
- Tagami, T., Chen, M., Furunaga, Y., Kikuchi, A., Sadahiro, J., Lang, W., Okuyama, M., Tanaka, Y., Iwasaki, T., Yao, M., & Kimura, A. (2022). Structural insights reveal the second base catalyst of isomaltose glucohydrolase. *The FEBS Journal*, 289(4), 1118–1134. <https://doi.org/10.1111/FEBS.16237>
- Tamrakar, A. K., Maurya, C. K., & Rai, A. K. (2014). PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011 – 2014). <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2014.947268>, 24(10), 1101–1115. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.947268>
- Thari, F. Z., Tachallait, H., el Alaoui, N.-E., Talha, A., Arshad, S., Álvarez, E., Karrouchi, K., & Bougrin, K. (2020). Ultrasound-assisted one-pot green synthesis of new N- substituted-5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione-isoxazoline derivatives using NaCl/Oxone/Na₃PO₄ in aqueous media. *Ultrasonics Sonochemistry*, 68, 105222. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105222>
- Thomas, R. L., Halim, S., Gurudas, S., Sivaprasad, S., & Owens, D. R. (2019). IDF Diabetes Atlas: A review of studies utilising retinal photography on the global prevalence of diabetes related retinopathy between 2015 and 2018. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157, 107840. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2019.107840>

- Tokala, R., Bora, D., & Shankaraiah, N. (2022). Contribution of Knoevenagel Condensation Products toward the Development of Anticancer Agents: An Updated Review. *ChemMedChem*, e202100736. <https://doi.org/10.1002/CMDC.202100736>
- Truitt, K. E., Goldberg, R. B., Rosenstock, J., Chou, H. S., Merante, D., Triscari, J., & Wang, A. C. (2010). A 26-week, placebo- and pioglitazone-controlled, dose-ranging study of rivoglitazone, a novel thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 33(6), 1321–1331. <https://doi.org/10.1185/03007991003715079>
- Turner, N. A., Mughal, R. S., Warburton, P., O'Regan, D. J., Ball, S. G., & Porter, K. E. (2007). Mechanism of TNF α -induced IL-1 α , IL-1 β and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovascular Research*, 76(1), 81–90. <https://doi.org/10.1016/J.CARDIORES.2007.06.003/2/76-1-81-FIG6.GIF>
- Vlachos, D., Malisova, S., Lindberg, F. A., & Karaniki, G. (2020). Glycemic Index (GI) or Glycemic Load (GL) and Dietary Interventions for Optimizing Postprandial Hyperglycemia in Patients with T2 Diabetes: A Review. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 1561, 12(6), 1561. <https://doi.org/10.3390/NU12061561>
- Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death & Disease* 2018 9:2, 9(2), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
- Wagstaff, A. J., & Goa, K. L. (2002). Rosiglitazone: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 62(12), 1805–1837. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262120-00007>
- Wang, A. P., Li, X., Zheng, Y., Liu, B. L., Huang, G., Yan, X., Liu, Z., & Zhou, Z. (2010). Thiazolidinediones protect mouse pancreatic β -cells directly from cytokine-induced cytotoxicity through PPAR γ -dependent mechanisms. *Acta Diabetologica* 2010 50:2, 50(2), 163–173. <https://doi.org/10.1007/S00592-010-0239-8>
- Wang, F., Aleksunes, L. M., Reagan, L. A., & Vergara, C. M. (2004). Management of Rosiglitazone-Induced Edema: Two Case Reports and a Review of the Literature. *Diabetes Care*, 27(4), 505–514. <https://doi.org/10.1089/152091502760306599>
- Wan, Y. (2010). PPAR γ in bone homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(12), 722–728. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2010.08.006>
- Wei, J., Ghosh, A. K., Sargent, J. L., Komura, K., Wu, M., Huang, Q. Q., Jain, M., Whitfield, M. L., Feghali-Bostwick, C., & Varga, J. (2010). PPAR γ Downregulation by TGF β in Fibroblast and Impaired Expression and Function in Systemic Sclerosis: A Novel Mechanism for Progressive Fibrogenesis. *PLOS ONE*, 5(11), e13778. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0013778>
- Wells, R. A., & Chan, L. S. A. (2009). Cross-talk between PPARs and the partners of RXR: A molecular perspective. *PPAR Research*. <https://doi.org/10.1155/2009/925309>
- WHO. (n.d.). *Diabetes*. 2021. Retrieved April 17, 2022, from https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007a). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM290>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007b). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM290>
- Williams, L. K., Li, C., Withers, S. G., & Brayer, G. D. (2012). Order and disorder: Differential structural impacts of myricetin and ethyl caffeate on human amylase, an antidiabetic target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(12), 5453–5463. <https://doi.org/10.1021/jm301029g>

- Xi, Y., Shen, W., Ma, L., Zhao, M., Zheng, J., Bu, S., Hino, S., & Nakao, M. (2016). HMGA2 promotes adipogenesis by activating C/EBP β -mediated expression of PPAR γ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 472(4), 617–623. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.03.015>
- Yamaguchi, K., Cekanova, M., McEntee, M. F., Yoon, J. H., Fischer, S. M., Renes, I. B., van Seuning, I., & Baek, S. J. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor ligand MCC-555 suppresses intestinal polyps in ApcMin/+ mice via extracellular signal-regulated kinase and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), 2779–2787. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0173>
- Young, P. W., Buckle, D. R., Cantello, B. C. C., Chapman, H., Clapham, J. C., Coyle, P. J., Haigh, D., Hindley, R. M., Holder, J. C., Kallender, H., Latter, A. J., Lawrie, K. W. M., Mossakowska, D., Murphy, G. J., Cox, L. R., & Smith, S. A. (1998). Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(2), 751–759. <http://intl-jpet.aspetjournals.org/cgi/content/full/284/2/751>
- Zhang, L., Yuan, M., An, Z., Zhao, X., Wu, H., Li, H., Wang, Y., Sun, B., Li, H., Ding, S., Zeng, X., Chao, L., Li, P., & Wu, W. (2020). Prediction of hypertension, hyperglycemia and dyslipidemia from retinal fundus photographs via deep learning: A cross-sectional study of chronic diseases in central China. *PLOS ONE*, 15(5), e0233166. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0233166>
- Zhang, R., Li, C., Williams, L. K., Rempel, B. P., Brayer, G. D., & Withers, S. G. (2009). Directed “in situ” inhibitor elongation as a strategy to structurally characterize the covalent glycosyl-enzyme intermediate of human pancreatic α -amylase. *Biochemistry*, 48(45), 10752–10764. https://doi.org/10.1021/BI901400P/ASSET/IMAGES/BI901400P.SOCIAL.JPEG_V03
- Zheng, Y., Tian, J., Yang, W., Chen, S., Liu, D., Fang, H., Zhang, H., & Ye, X. (2020). Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase. *Food Chemistry*, 317, 126346. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.126346>
- Zhu, M., Flynt, L., Ghosh, S., Mellema, M., Banerjee, A., Williams, E., Panettieri, R. A., & Shore, S. A. (2012). Anti-inflammatory Effects of Thiazolidinediones in Human Airway Smooth Muscle Cells. <https://doi.org/10.1165/Rcmb.2009-0445OC>, 45(1), 111–119. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2009-0445OC>

Annexe

Aperçu général sur la synthèse et la caractérisation des nouvelles molécules de Thiazolidine-2,4-dione

1. Identification et caractérisation spectrale :

Des chromatographies analytiques en couche mince (TLC) : Ont été réalisées sur des plaques de gel de silice pré-revêtues (Kieselgel 60 F254, Merck, Allemagne), et les chromatogrammes ont été visualisés par irradiation aux UV (254 et 360 nm), puis par coloration à la ninhydrine, au p-anisaldéhyde ou à H₂SO₄/EtOH.

Spectroscopies RMN : Ont été enregistrées sur les produits solubilisé dans du solvant sec deutéré (DMSO ou chloroforme) sur un spectromètre Bruker AC 200, ou sur un spectromètre Bruker AC à 200 MHz ou 400 MHz pour la RMN ¹H et à 50 MHz ou 101 MHz pour la RMN ¹³C ; δ est exprimé en ppm par rapport au TMS (0 ppm) comme standard interne. Les schémas de fractionnement sont désignés comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet). Les constantes de couplage (valeurs J) sont indiquées en Hertz (Hz).

Spectres de masse (ESI-MS) : Ont été enregistrés sur un Bruker Daltonics Esquire 3000+, et les échantillons ont été dilués dans du méthanol.

Les rendements expérimentaux sont exprimés en pourcentage de produit pur isolé par rapport à la quantité de matière mise en œuvre. Les dénominations chimiques des produits de synthèse, ont été obtenues selon les règles de la nomenclature IUPAC.

2. Procédure générale pour la synthèse de la (Z)-5 arylidènethiazolidine-2,4-dione (3a-3e)

Tout d'abord, l'équipe a examiné l'étude de la réaction de condensation de Knoevenagel en utilisant le TZD 1 et différents benzaldéhyde 2 comme modèles, adsorbés sur un support minéral dans des conditions de MW sans solvant. Après optimisation des conditions de réaction, Il s'est avéré que l'Al₂O₃ basique catalyse la synthèse de 5-arylidènethiazolidine-2,4-diones (**3a-3e**) de manière efficace et d'excellents rendements (90-95%) des produits désirés ont été obtenus (*Schem.A1*). Après avoir accompli la réaction, on ajoute du CH₂Cl₂ au mélange réactionnel refroidi, puis on agite pendant 5 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite filtré sous vide et lavé avec du CH₂Cl₂ et ensuite séché par du MgSO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite (*Tab.A1*). Le solide précipité a été filtré et purifié par recristallisation dans l'éthanol pour donner le produit pures **3a** à **3e** (*Tab.A2*).

Tableau. A1. Synthèse des dérivés de 5-arylidènethiazolidine-2,4-dione (**3a-3e**)

Produits	R1	R2	Aspect	Rendement %	Point de fusion (°C)
----------	----	----	--------	-------------	----------------------

3a	H	H	Solide blanc	95	247
3b	CH ₃	H	Solide blanc	92	230
3c	F	H	Solide jaune	97	212
3d	Br	H	Solide blanc	93	246
3e	Cl	Cl	Solide blanc	89	216

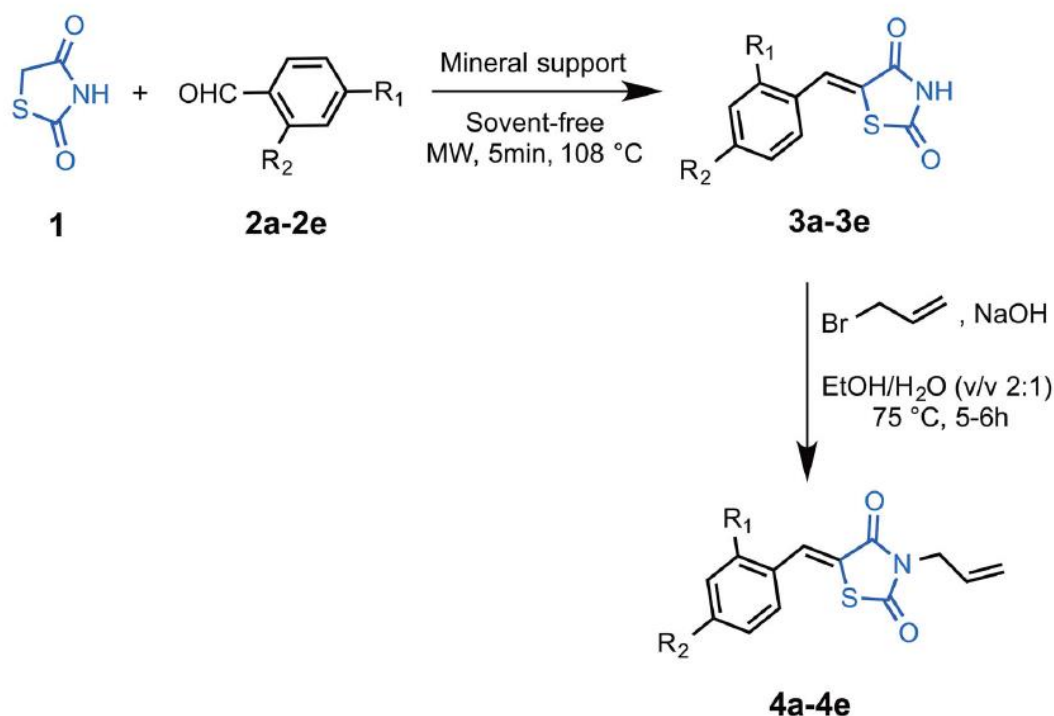


Schéma A1. Voie de synthèse pour la préparation des composés **3a** à **3e** et **4a** à **4e**

Tableau A2. Caractéristiques spectrales des dérivés de 5-arylidènethiazolidine-2,4-dione (**3a-3e**)

Produits	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	IR	MS (ESI ⁺)
	200 MHz, DMSO-d ₆ δ, ppm (J, Hz)	50 MHz, DMSO-d ₆ δ, ppm	Spectres FTIR-ATR cm ⁻¹	m/z [M+H] ⁺
3a	12.60 (1H, s, NH) 7.76 (1H, s, PhCH=C) 7.59–7.43 (5H, m, H Ar)	167.7 (C=O) 167.2 (C=O) 132.9 (CH=C) 131.6 (C-5 TZD) 130.3 (C-1 Ar) 129.9 (C-3 Ar) 129.2 (C-2 Ar) 123.4 (C-4 Ar)	3220 (NH) 2900–3009 (C-H) 1736 (C=O) 1681 (C=O)	206.1
3b	12.56 (1H, s, NH); 7.73 (1H, s, ArCH=C)	167.8 (C2=O) 167.3 (C4=O)	3188 (NH), 3044 (ArC-H)	220.2

	7.46 (2H, d, J=4.4 Hz, H Ar) 7.32 (2H, d, J=4.4 Hz, H Ar) 2.33 (3H, s, CH ₃)	140.6 (CH=C) 131.8 (C-4 Ar) 130.2 (C-1 Ar) 130.0 (C-2 Ar) 129.8 (C-3 Ar) 122.2 (C-5 TZD) 21.0 (CH ₃)	1733 (C=O) 1681 (C=O)	
3c	12.60 (1H, s, NH) 7.77 (1H, s, ArCH=C) 7.64 (2H, m, H Ar) 7.35 (2H, m, H Ar)	167.7 (C2=O) 167.3 (C4=O) 162.7 (d, 1J = 249 Hz, C-F) 132.3 (d, 3J = 8.5 Hz, C2 Ar) 130.5 (ArCH=C) 129.7 (d, 4J = 3.5 Hz, C1 Ar) 123.3 (d, J = 2.4 Hz, C-5 TZD) 116.14 (d, 2J = 22 Hz, C-2 Ar).	3132 (NH), 3042 (ArC-H) 1750 (C=O) 1689 (C=O)	224.1
3d	12.31 (1H, s, NH) 7.77 (2H, d, J=7.5 Hz, H Ar) 7.61 (2H, d, J=6.8 Hz, H Ar) 7.55 (1H, s, ArCH=C).	173.0 (C2=O) 172.4 (C4=O) 138.1 (CH=C) 136.9 (C-4 Ar) 135.5 (C-1 Ar) 135.1 (C-2 Ar) 134.4 (C-3 Ar) 128.7 (C-5 TZD)	3200 (NH) 3042 (ArC-H) 1713 (C=O) 1608 (C=O)	284.4
3e	7.99 (1H, s, ArCH=C) 7.23 (1H, d, J=2.0 Hz, H Ar) 7.18 (1H, d, J=8.5 Hz, H Ar) 7.12 (1H, dd, J=8.5, 2.0 Hz, H Ar).	166.5 (C2=O) 164.0 (C4=O) 139.4 (ArCH=C) 135.3 (C-2 Ar) 129.6 (C-1 Ar) 128.9 (C-6 Ar) 128.4 (C-3 Ar) 128.0 (C-5 Ar) 126.5 (C-4 Ar) 118.0 (C-5 TZD)	3310 (NH) 3040 (ArC-H) 1700 (C=O) 1602 (C=O)	275.1

3. Procédure générale pour la synthèse de la 3-allyl-5-arylidenthiazolidine-2,4-dione **4a-4e**

Les dérivés de la thiazolidine-2,4-dione (**4a-4e**) ont été synthétisés selon les procédures décrites précédemment (Thari et al., 2020). Un mélange de 5-arylidène-thiazolidine-2,4-dione (**3a-3e**)

(1mmol), bromure d'allyle (1,2mmol) dans EtOH/H₂O (v/v ; 2:1) (10mL) est traité avec de l'hydroxyde de sodium (1mmol). Le mélange obtenu a été agité et soumis à chauffage à 75 C pendant 5-6h. L'achèvement de la réaction a été suivi par CCM. Le mélange réactionnel a été refroidi et acidifié avec du HCl dilué (4N) (Tab.A3). Le solide précipité a ensuite été filtré et purifié par recristallisation dans l'éthanol pour donner les composés purs **4a-4e** (Tab.A4).

Tableau A3. Synthèse des dérivés de 5-arylidènethiazolidine-2,4-dione (**4a-4e**)

Produits	R1	R2	Aspect	Rendement %	Point de fusion (°C)
4a	H	H	Solide blanc	62	102
4b	CH ₃	H	Solide blanc	65	116
4c	F	H	Solide jaune	58	121
4d	Br	H	Cristaux blancs	55	146
4e	Cl	Cl	Solide jaune	60	113

Tableau A4. Caractéristiques spectrales des dérivés de 5-arylidènethiazolidine-2,4-dione (**4a-3e**)

Produits	RMN ¹ H	RMN ¹³ c	IR	MS (ESI ⁺)
	200 MHz, DMSO-d ₆ δ, ppm (J, Hz)	50 MHz, DMSO-d ₆ δ, ppm	Spectres FTIR-ATR cm ⁻¹	m/z [M+H] ⁺
4a	8.01-7.88 (m, 2H, H Ar) 7.63-7.38 (m, 3H, H Ar) 7.51 (s, 1H, ArCH=C) 6.08-5.67 (m, 1H, CH=CH ₂) 5.30 (dd, J = 13.7, 10.2 Hz, 1H, CH=CH ₂) 5.05 (dd, J = 16.5, 13.8 Hz, 1H, CH=CH ₂) 4.15 (d, J = 6.2 Hz, 2H, N-CH ₂)	172.1 (C2=O) 169.1 (C4=O) 136.1 (ArCH=C) 133.1 (C-1 Ar) 132.9 (CH=CH ₂) 130.2 (C-3 Ar) 129.7 (C-2 Ar) 129.1 (C-4 Ar) 118.1 (CH=CH ₂) 117.6 (C-5 TZD) 44.2 (NCH ₂)	3210 (NH) 3048 (ArC-H) 1731 (C=O) 1674 (C=O)	246.1
4b	7.81 (1H, s, ArCH=C) 7.34 (2H, d, J=8.2 Hz, H Ar)	167.6 (C2=O) 166.0 (C4=O)	3320 (NH), 3048 (ArC-H),	260.0 (282.0 [M+Na] ⁺)

	7.21 (2H, d, J=7.2 Hz, H Ar) 5.88–5.69 (1H, m, CH=CH2) 5.23 (1H, dd, J=12 Hz, 1.4 Hz, CH=CH2) 5.16 (1H, dd, J=5.7 Hz, 1.4 Hz, CH=CH2); 4.27 (2H, d, J=6.0 Hz, NCH2) 2.33 (3H, s, CH3)	141.3 (ArCH=C) 134.0 (C-4 Ar) 130.4 (CH=CH2) 130.3 (C-3 Ar) 130.2 (C-1 Ar) 129.9 (C-28 Ar) 120.1 (CH=CH2) 118.8 (C-5 TZD) 43.7 (NCH2) 21.5 (CH3)	1728 (C=O), 1668 (C=O)	
4c	7.80 (1H, s, ArCH=C) 7.52 – 7.35 (2H, m, H Ar) 7.24 –7.01 (2H, m, H Ar) 5.93 – 5.64 (m, CH=CH2) 5.24 (1H, dd, J =12.0, 2.0 Hz, CH=CH2) 5.17 (1H, dd, J = 6.0, 2.0 Hz, CH=CH2) 4.28 (2H, d, J = 6.0 Hz, NCH2)	167.1 (C2=O) 166.1 (C4=O) 163.4 (d, 1J = 234.5 Hz, C-F) 132.6 (-CH=C) 132.2 (d, 3J = 8.5 Hz, C-2 Ar) 130.0 (-CH=CH2) 129.5 (d, 4J = 3.4 Hz, C-1 H Ar) 121.0 (d, J = 2.5 Hz, C-5 TZD) 119.0 (-CH=CH2) 116.3 (d, 2J = 22.1 Hz, C-3 H Ar) 43.8 (NCH2)	3225 (NH) 3042 (ArC-H) 1735 (C=O) 1684 (C=O)	264.2
4d	7.76 (1H, s, ArCH=C) 7.54 (2H, d, J = 8.5 Hz, H Ar) 7.29 (2H, d, J = 8.6 Hz, H Ar) 5.92–5.66 (1H, m, CH=CH2) 5.24 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, CH=CH2) 5.17 (1H, dd, J = 5.0, 2.0 Hz, CH=CH2) 4.28 (2H, d, J = 6.0 Hz, NCH2)	166.9 (C2=O) 165.7 (C4=O) 132.5 (C-3 Ar) 132.4 (ArCH=C) 132.0 (C-1 Ar) 131.4 (CH=CH2) 130.0 (C-2 Ar) 125.0 (C-4 Ar) 122.1 (CH=CH2) 119.1 (C-5 Ar) 43.9 (NCH2)	3315 (NH) 3051 (ArC-H) 1729 (C=O) 1684 (C=O)	348.4
4e	8.09 (1H, s, ArCH=C) 7.44 (1H, d, J = 2.0 Hz, H Ar) 7.39 (1H, d, J = 8.5 Hz, H Ar) 7.29 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, HAr) 5.88–5.69 (1H, m, -CH=CH2) 5.24 (1H, dd, J = 13.0, 1.2 Hz, CH=CH2)	166.8 (C2=O) 165.2 (C4=O) 136.7 (ArCH=C) 136.6 (C-2 Ar) 130.4 (C-1 Ar) 130.3 (CH=CH2) 129.9 (C-6 Ar) 129.5 (C-3 Ar)	3290 (NH) 3033 (ArC-H) 1735 (C=O) 1678 (C=O)	313.1

5.18 (1H, dd, J = 5.8, 1.1 Hz, CH=CH2)	128.8 (C-5 Ar)		
4.30 (2H, d, J = 6.0 Hz, NCH2).	127.7 (C-4 Ar)		
	124.9 (CH=CH2)		
	119.3 (C-5 TZD)		
	44.1 (NCH2)		

4. Procédure générale pour la synthèse de la 5-(arylidène)-3-((3-(aryl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)méthylthiazolidine-2,4-dione

La solution hydro-alcoolique (EtOH/H₂O v/v, 2:1; 10mL) du dipolarophile **4a-e** (1mmol) et d'aryl-aldoxime **6** (1,2mmol) (10mL) ont été mélangé avec l'Oxone (340 mg, 1,2 équiv), le NaCl (21,5 mg, 0,8 équiv), et le Na₃PO₄ (73,1 mg, 1,5 équiv) à température ambiante (Schém.A2). Le mélange a été soumis par la suite à une sonication à 5-10 °C pendant 10 min, puis 25 °C pendant 20 min. Le mélange obtenu a été soumis à une extraction à l'acétate d'éthyle (3x20 mL), ensuite séché sur du sulfate de sodium anhydre (Tab.A5). La solution a été filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu a été purifié par recristallisation dans l'éthanol pour donner l'isoxazoline pure (Tab.A6).

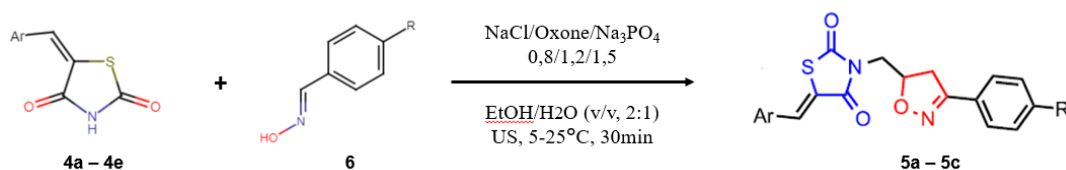


Schéma A2: Synthèse des isoxazolines **5a-c** à partir de l'oxyde d'arylnitrile et de **4a-e**

Tableau A5. Synthèse des dérivés de 5-(arylidène)-3-((3-(aryl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)méthylthiazolidine-2,4-dione (**5a-5c**)

Produits	Ar	R	Aspect	Rendement %	Point de fusion (°C)
5a	C ₆ H ₄	F	Solide blanc	90	mp > 400°C
5b	4-BrC ₆ H ₄	F	Solide blanc	88	213-215
5c	2,4-diClC ₆ H ₄	F	Solide blanc	85	212-214

Tableau A6. Caractéristiques spectrales des dérivés de 5-(arylidène)-3-((3-(aryl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)méthylthiazolidine-2,4-dione (**5a-5c**)

Produits	RMN ¹ H 200 MHz, DMSO-d ₆	RMN ¹³ C 50 MHz, DMSO-d ₆	MS (ESI ⁺) m/z [M+H] ⁺
----------	--	--	--

	δ , ppm (J, Hz)	δ , ppm	
5a	<p>7.96 (1H, s, Ar-CH=C)</p> <p>7.80 – 7.62 (4H, m, H Ar)</p> <p>7.52 – 7.23 (4H, m, H Ar)</p> <p>5.09 – 4.84 (1H, m, C5H isoxazoline)</p> <p>3.91 (1H, dd, J = 14.1, 7.7 Hz, NCH2)</p> <p>3.73 (1H, dd, J = 14.1, 5.9 Hz, NCH2)</p> <p>3.56 (1H, dd, J = 17.4, 10.5 Hz, C4Ha isoxazoline)</p> <p>3.29 (1H, dd, J = 17.4, 6.1 Hz, C4Hb isoxazoline)</p>	<p>167.2 (C2=O)</p> <p>165.5 (C4=O)</p> <p>160.5 (d, 1J = 252.8 Hz, C-F)</p> <p>155.9 (N=C)</p> <p>132.6 (-CH=C)</p> <p>132.6 (d, 3J = 8.7 Hz, C-1 Ar)</p> <p>132.1 (C-2 Ar)</p> <p>129.5 (d, 4J = 3.1 Hz, C-2 Ar)</p> <p>128.9 (d, 3J = 8.8 Hz, C-2 Ar)</p> <p>125.5 (d, 4J = 3.1 Hz, C-1 Ar)</p> <p>120.7 (d, J = 2.3 Hz, C-5 TZD)</p> <p>116.5 (d, 2J = 22.0 Hz, C-2 Ar)</p> <p>115.8 (d, 2J = 22.0 Hz, C-2 Ar)</p> <p>76.7 (C-5 isoxazoline)</p> <p>44.3 (NCH2)</p> <p>40.6 (C-4 isoxazoline)</p>	401.3
5b	<p>7.98 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar)</p> <p>7.90 (d, J = 6.3 Hz, 1H)</p> <p>7.64 (dd, J = 7.4, 5.7 Hz, 2H, Ar)</p> <p>7.51 (s, 1H, ArCH=C)</p> <p>7.27 (dd, J = 8.9, 7.5 Hz, 2H, Ar)</p> <p>4.45 – 4.31 (m, 1H, C5H isoxazoline)</p> <p>3.96 (dd, J = 12.3, 7.0 Hz, 1H, NCH2)</p> <p>3.66 (dd, J = 12.5, 7.0 Hz, 1H, -NCH2)</p> <p>3.19 (dd, J = 17.8, 7.0 Hz, 1H, C4Ha isoxazoline)</p> <p>2.75 (dd, J = 17.9, 6.9 Hz, 1H, C4Hb isoxazoline)</p>	<p>173.2 (C2=O)</p> <p>168.4 (C4=O)</p> <p>166.6 (d, 1J = 250.4 Hz, C-F)</p> <p>157.2 (-N=C)</p> <p>132.0 (C-3, C5 4-BrC6H4)</p> <p>131.8 (-CH=C)</p> <p>131.3 (C-2, C6 4-BrC6H4)</p> <p>129.5 (C-2 4-FC6H4)</p> <p>129.4 (d, 4J = 3.4 Hz, C-1 4-FC6H4)</p> <p>129.1 (C-1 4-BrC6H4)</p> <p>126.8 (C-Br)</p> <p>126.3 (d, 3J = 8.2 Hz, C-2 4-FC6H4)</p> <p>118.0 (C-5 TZD)</p> <p>116.2 (d, 2J = 22.2 Hz, C-3 4-FC6H4)</p> <p>79.8 (C-5 isoxazoline)</p> <p>46.9 (NCH2)</p> <p>42.0 (C-4 isoxazoline)</p>	483.0
5c	<p>8.11 (1H, s, ArCH=C)</p> <p>7.60 (1H, d, J = 8.7, H Ar)</p> <p>7.45 (1H, d, J = 1.8 Hz, H Ar)</p> <p>7.39 (2H, d, J = 8.4 Hz, H Ar)</p> <p>7.30 (1H, dd, J = 8.5, 1.8 Hz, H Ar)</p>	<p>168.1 (C2=O)</p> <p>166.3 (C4=O)</p> <p>161.3 (d, 1J = 251.2 Hz, C-F)</p> <p>155.4 (-N=C)</p> <p>136.7 (Ar-CH=C)</p>	451.3

7.03 (2H, d, J = 8.7 Hz, H Ar)	136.7 (C2-Cl)
5.13 – 4.94 (m, C5H isoxazoline)	130.44 (C-1 2,4-diClC6H3)
4.02 (1H, dd, J = 13.6, 7.3 Hz, NCH2)	130.15 (C-6 2,4-10 diClC6H3)
3.79 (1H, dd, J = 13.6, 5.5 Hz, NCH2)	129.5 (C-5 2,4-diClC6H3)
3.40 (1H, dd, J = 16.7, 10.3 Hz, C4Hb isoxazoline)	129.4 (C-3 2,4-diClC6H3);
3.13 (1H, dd, J = 16.7, 6.0 Hz, C4Ha isoxazoline).	28.8 (d, 3J = 8.5 Hz, C-3 4-FC6H4)
	127.7 (C-4 2,4-diClC6H3)
	125.1 (d, 4J = 3.0 Hz, C-1 4-FC6H4)
	124.4 (C-5 TZD);
	115.97 (d, 2J = 22.1 Hz, C-3 4 FC6H4)
	76.8 (C-5 isoxazoline)
	44.2 (NCH2)
	38.6 (C-4 isoxazoline)

Les structures des produits isolés ont été confirmées par les données spectrales des analyses spectroscopiques RMN ^1H , ^{13}C , Infra-rouge IR et spectrométrie de masse. Les résultats des techniques spectroscopiques obtenues ont été confirmés par la cristallographie par diffraction des rayons X.

Copies des spectres caractéristiques de RMN ^1H et RMN ^{13}C de la 5-arylidène-thiazolidine-2,4-dione.

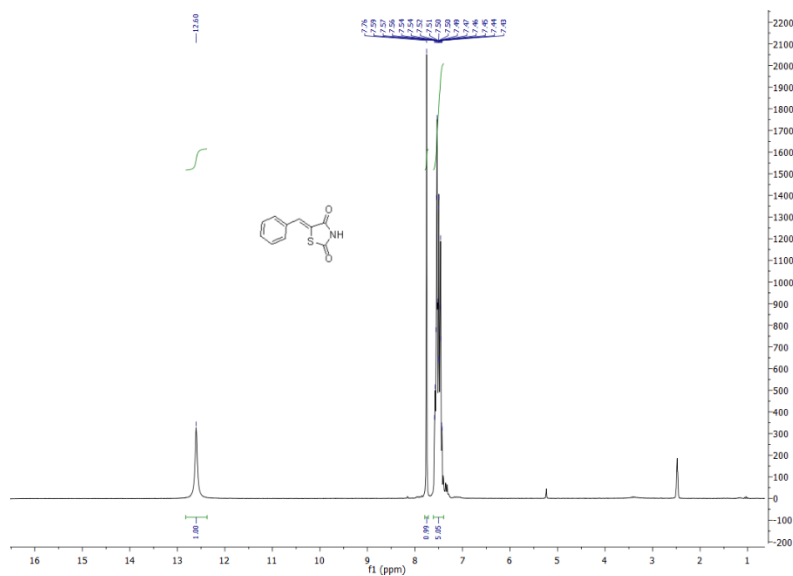


Figure A1. Spectre RMN ^1H de (**3a**)

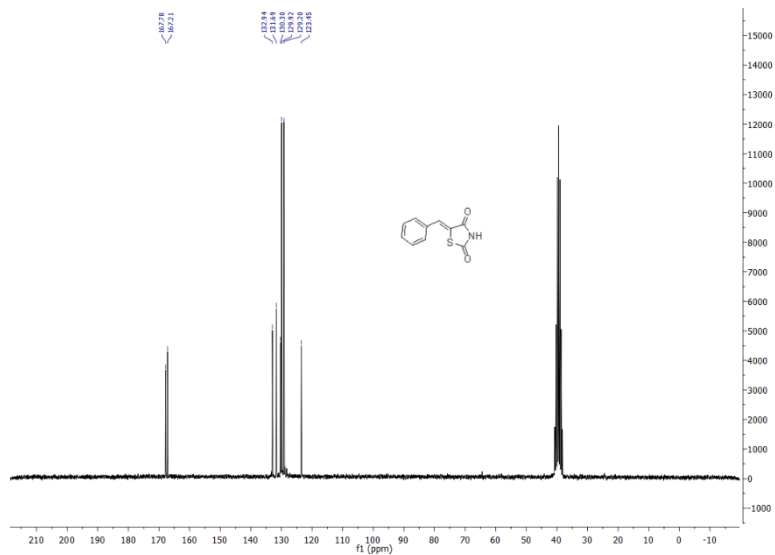


Figure A2. Spectre RMN ^{13}C de (3a)

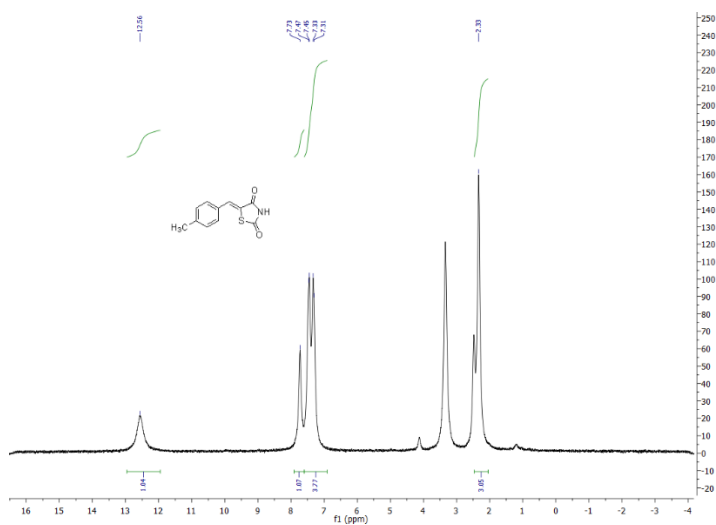


Figure A3. ^1H NMR spectrum of (3b)

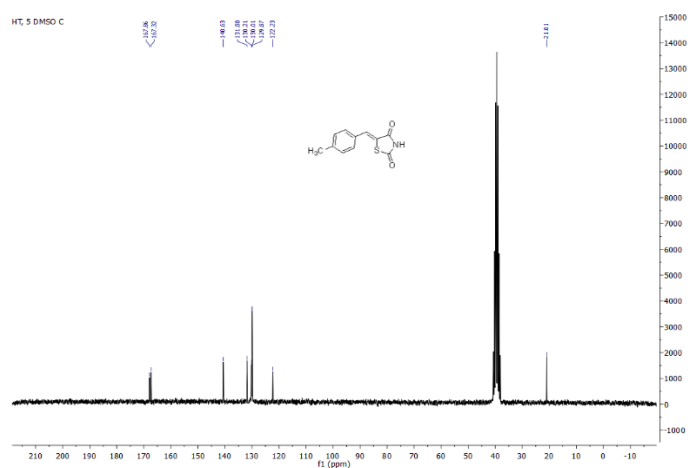


Figure A4. Spectre RMN ^{13}C de (3b)

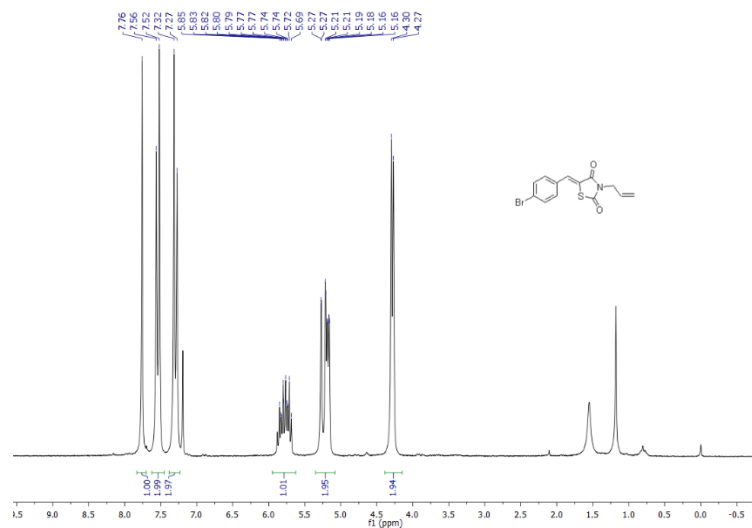


Figure A11. Spectre RMN ^1H de (**4d**)

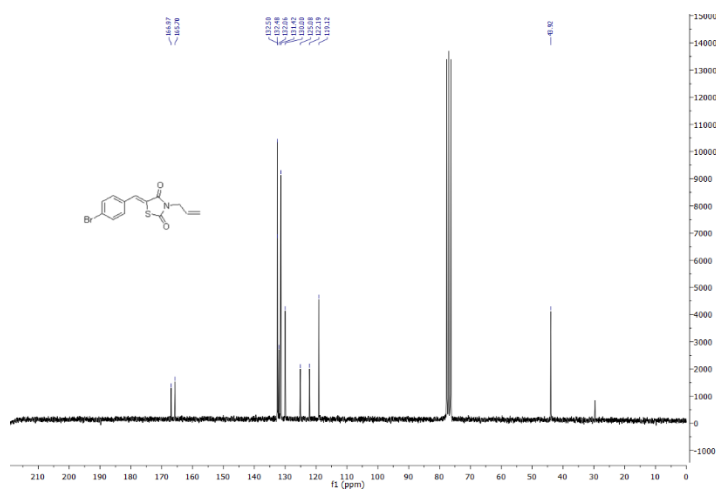


Figure A12. Spectre de RMN ^{13}C de (**4d**)

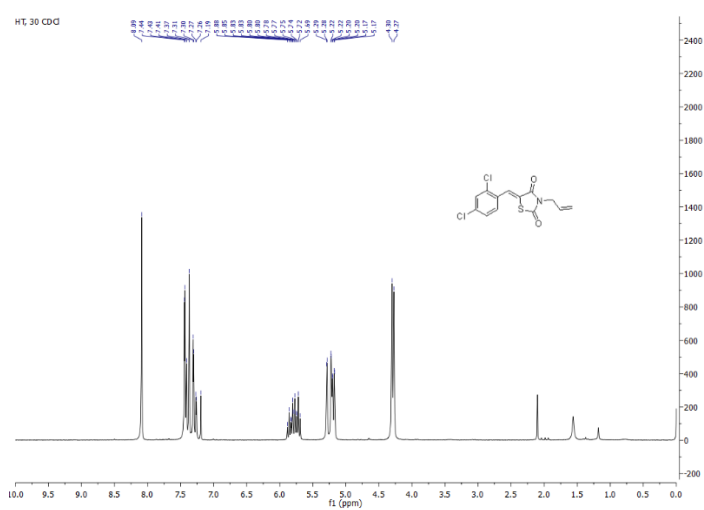


Figure A13. Spectre RMN ^1H de (**4e**)

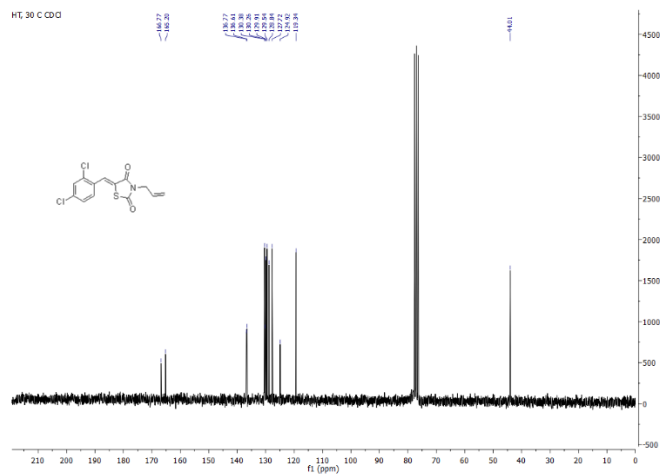


Figure A14. Spectre de RMN ^{13}C de (4e)

Copies des spectres caractéristiques de RMN ^1H et RMN ^{13}C des TZD-isoxazolines

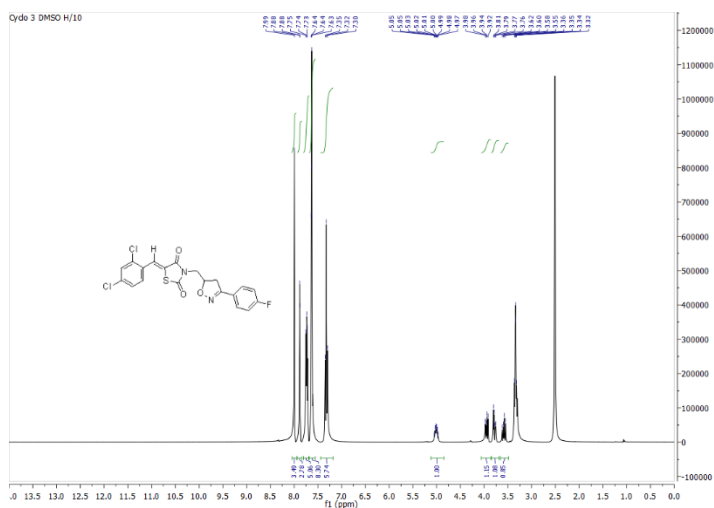


Figure A15. Spectre RMN ^1H de (5c)

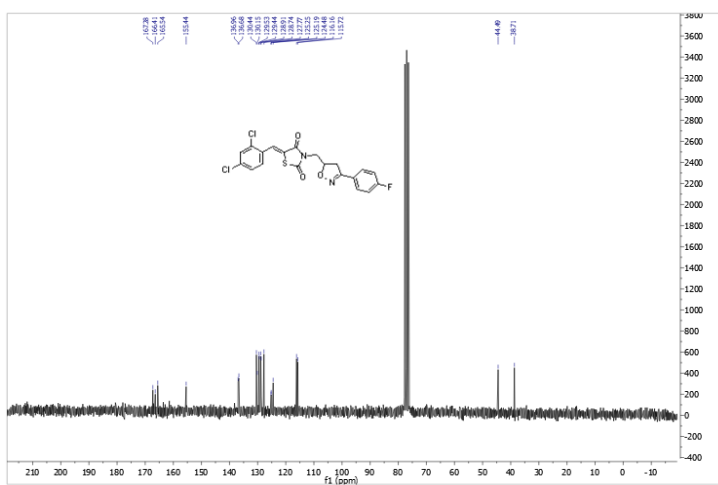


Figure A16. Spectre de RMN ^{13}C de (5e)

Copies des spectres ESI-MS caractéristiques de la 5-arylidène-thiazolidine-2,4-dione

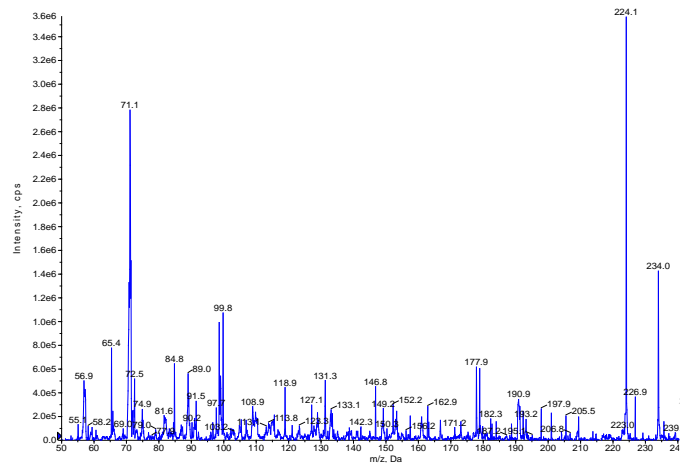


Figure A17. Spectre ESI+-MS de (**3c**)

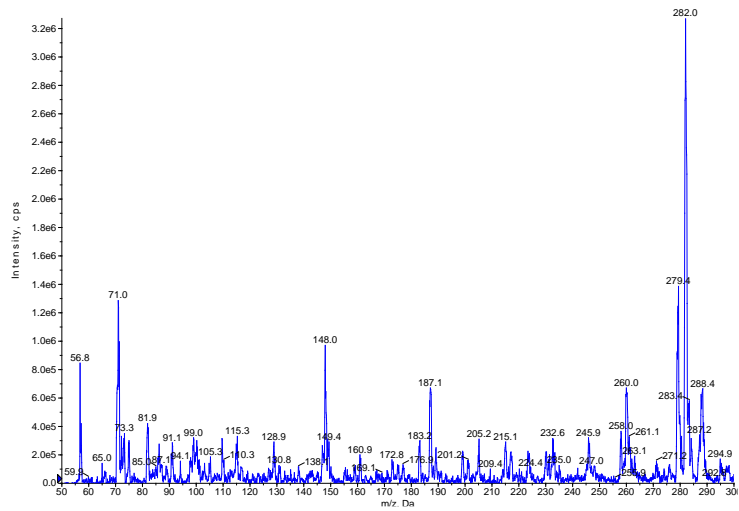


Figure A18. Spectre ESI+-MS de (**4a**)

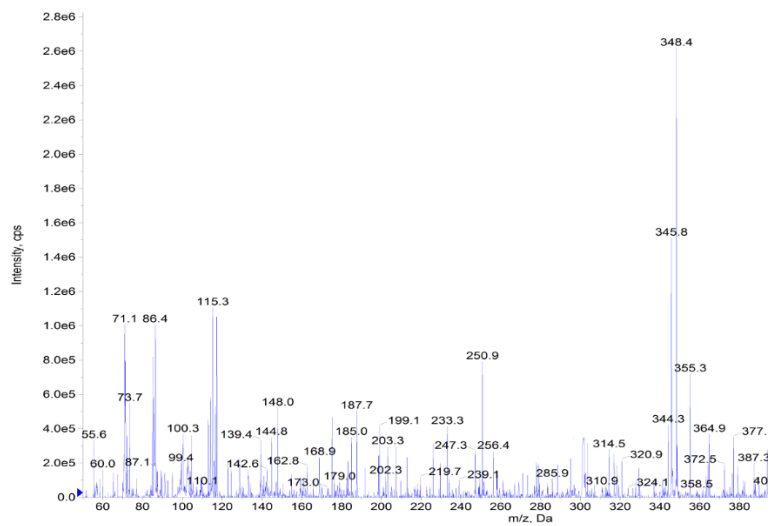


Figure A19. Spectre ESI+-MS de (**4d**)

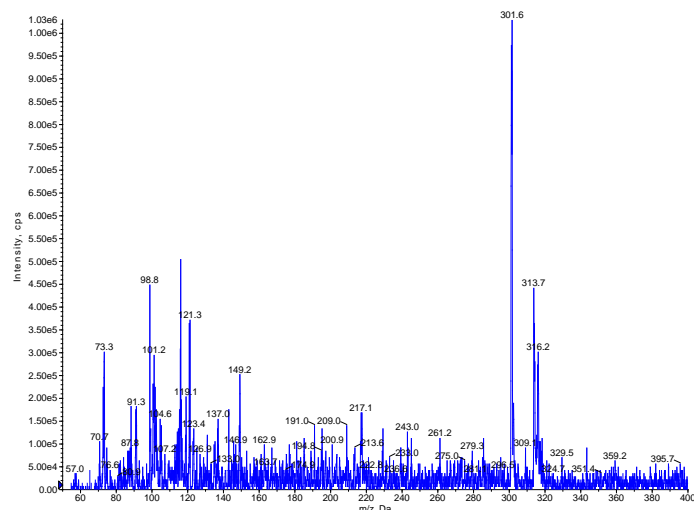


Figure A20. Spectre ESI+-MS de (**4e**)

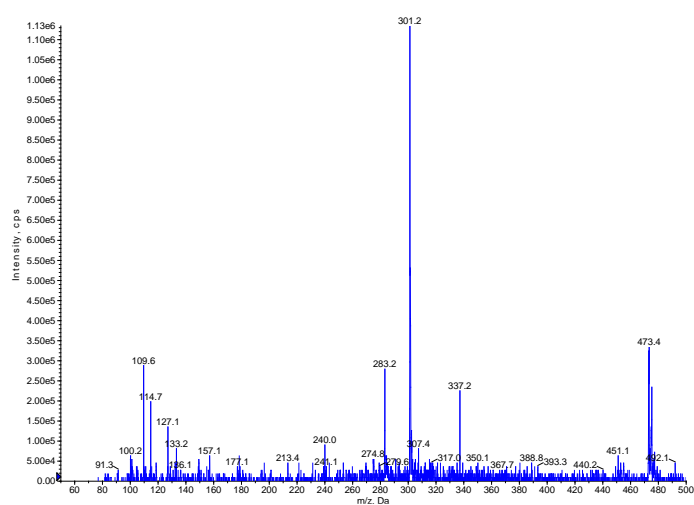


Figure A21. Spectre ESI+-MS de (**5c**)

1. Evaluation du docking moléculaire

Tableau A7. Résultats des détails des interactions et du score de docking en (kJ/mol) des ligands synthétisés pour la série **3a** à **3e** contre l'enzyme cible α -amylase.

Produits	Score d'amarrage	Ligand	Poche du récepteur	Catégorie Interactions	Distance(Å)
3a	-7.1	O(C=O)	ARG195	Hydrogen Bond	2.83541
		O(C=O)	HIS299	Hydrogen Bond	2.48143
		H(NH)	ASP300	Hydrogen Bond	2.52493
		Ring(C6)	LEU165	Hydrophobic	3.96459
		Ring(C5)	TYR62	Hydrophobic	3.96765
3b	-7.5	O(C=O)	ARG195	Hydrogen Bond	2.85611
		O(C=O)	HIS299	Hydrogen Bond	2.45409
		H(NH)	ASP300	Hydrogen Bond	2.56529
		Ring(C5)	TYR62	Hydrophobic	3.95238
		C(CH3)	TRP59	Hydrophobic	5.04666
		C(CH3)	TRP59	Hydrophobic	4.18717
Ring(C6)	LEU165	Hydrophobic	4.95242		

3c	-7.3	O(C=O)	ARG195	Hydrogen Bond	2.79224
		O(C=O)	HIS299	Hydrogen Bond	2.49571
		H(NH)	ASP300	Hydrogen Bond	2.63554
		Ring(C6)	LEU165	Hydrophobic	3.92915
		Ring(C5)	TYR62	Hydrophobic	3.98189
3d	-7.2	Ring(C5)	ASP300	Electrostatic	3.70496
		S	TRP58	Pi-Sulfur	5.74905
		S	TYR62	Pi-Sulfur	3.81625
		S	HIS299	Pi-Sulfur	5.3007
		Ring(C6)	TRP59	Hydrophobic	4.30007
		Ring(C6)	TRP59	Hydrophobic	4.88728
		Ring(C5)	TYR62	Hydrophobic	5.23954
		Br	TRP59	Hydrophobic	4.21931
		Br	TRP59	Hydrophobic	3.74643
3e	-8	O(C=O)	HIS299	Hydrogen Bond	2.38003
		H(NH)	ASP300	Hydrogen Bond	2.49795
		S	ASP197	Sulfur-X	3.2659
		Ring(C6)	LEU165	Hydrophobic	3.91364
		Ring(C5)	TYR62	Hydrophobic	3.96918
		Cl	LEU162	Hydrophobic	4.71739
		Cl	TRP59	Hydrophobic	4.94162
		Cl	TRP59	Hydrophobic	4.03657

Tableau A8. Résultats des détails des interactions et du score de docking en (kJ/mol) des ligands synthétisés pour la série (**4a** à **4e**) contre l'enzyme cible α -amylase.

Produits	Score d'amarrage	Ligand	Poche du récepteur	Catégorie Interactions	Distance(Å)
4a	-8	S	HIS305	Hydrogen Bond	2.68965
		O(C=O)	GLY306	Hydrogen Bond	3.01297
		H(CH2)	GLU233	Hydrogen Bond	2.68907
		H(CH2)	ASP300	Hydrogen Bond	3.08527
		Ring(C5)	ASP300	Electrostatic	3.50217
		S	TRP58	Pi-Sulfur	5.86397
		O(C=O)	HIS305	Pi-Sulfur	4.71381
		C(C=C)	ALA198	Hydrophobic	4.11088
		C(C=C)	LEU162	Hydrophobic	5.25624
		C(C=C)	HIS201	Hydrophobic	5.34449
Ring(C6)	LEU165	Hydrophobic	5.17414		
4b	-7.5	O(Carbonyl)	ARG195	Hydrogen Bond	2.76616
		H(CH2)	GLU233	Hydrogen Bond	2.66252
		Ring(C5)	ASP197	Electrostatic	3.9687
		S	TRP58	Pi-Sulfur	5.5271
		S	TYR62	Pi-Sulfur	3.77689
		S	HIS299	Pi-Sulfur	5.22861
		C(C=C)	LEU162	Hydrophobic	5.2245
		C(CH3)	LEU165	Hydrophobic	4.83264
		Ring(C5)	LEU165	Hydrophobic	5.17052
4c	-8	O(C=O)	ARG195	Hydrogen Bond	2.66447
		H(CH2)	GLU233	Hydrogen Bond	2.60439
		Ring(C5)	ASP197	Electrostatic	3.96059
		S	TRP58	Pi-Sulfur	5.44318
		S	TYR62	Pi-Sulfur	3.74206

		S	HIS299	Pi-Sulfur	5.20353
		Ring(C5)	TYR62	Hydrophobic	4.61768
		C(C=C)	LEU162	Hydrophobic	5.37164
		Ring(C6)	LEU165	Hydrophobic	5.22392
4d	-7.3	Ring(C6)	TRP59	Hydrophobic	4.13376
		Ring(C6)	TRP59	Hydrophobic	3.82265
		C(C=C)	ALA198	Hydrophobic	3.74543
		C(C=C)	LEU162	Hydrophobic	5.27224
		Br	TRP59	Hydrophobic	4.18253
4e	-6.8	Ring(C6)	LEU162	Hydrophobic	3.95739
		C(C=C)	LEU165	Hydrophobic	4.27445

TableauA9. Résultats des détails des interactions et du score de docking en (kJ/mol) des ligands synthétisés pour la série (**3a** à **3e**) contre l'enzyme cible α -glucosidase.

Produits	Score d'amarrage	Ligand	Poche du récepteur	Catégorie Interactions	Distance(Å)
3a	-6.3	O(C=O)	ARG552	Hydrogen Bond	1.97409
		H(NH)	ASP232	Hydrogen Bond	2.18003
		Ring(C6)	ASP568	Electrostatic	3.36955
		S	MET470	Pi-Sulfur	5.94495
		Ring(C6)	TRP432	Pi-Sulfur	5.64193
3b	-6.3	O(C=O)	ASP232	Hydrogen Bond	2.48477
		O(C=O)	ASN496	Hydrogen Bond	2.49696
		O(C=O)	SER497	Hydrogen Bond	2.6634
		Ring(C6)	ASP232	Electrostatic	4.08235
		C(CH ₃)	PHE476	Hydrophobic	4.60532
		Ring(C6)	LYS506	Hydrophobic	4.75824
		Ring(C5)	ALA231	Hydrophobic	4.84317
		Ring(C5)	ILE233	Hydrophobic	5.1237
3c	-6.3	O(C=O)	ARG552	Hydrogen Bond	1.88342
		H(NH)	ASP232	Hydrogen Bond	2.2003
		F	ASP357	Halogen	2.98576
		F	ASP357	Halogen	2.89295
		F	ASP469	Halogen	3.36572
		O(C=O)	MET470	Sulfur-X	3.30596
		Ring(C5)	ASP568	Electrostatic	3.66551
		Ring(C6)	MET470	Pi-Sulfur	5.77304
		S	TRP432	Pi-Sulfur	5.54841
3d	-6.2	O(C=O)	ARG552	Hydrogen Bond	2.13676
		Ring(C6)	ASP232	Electrostatic	3.85389
		Ring(C5)	ASP568	Electrostatic	3.38999
		S	TRP432	Pi-Sulfur	5.1095
		S	PHE601	Pi-Sulfur	5.09116
		Ring(C6)	PHE476	Hydrophobic	5.25809
		Ring(C5)	TRP432	Hydrophobic	5.28489
		Br	LYS506	Hydrophobic	4.32975
3e	-6.1	O(C=O)	ARG552	Hydrogen Bond	2.29523
		Ring(C6)	ASP232	Electrostatic	3.70874
		Ring(C5)	ASP568	Electrostatic	3.3898
		S	TRP432	Pi-Sulfur	5.29858
		S	PHE601	Pi-Sulfur	5.10977
		Ring(C5)	TRP432	Hydrophobic	5.2463

		Cl	TRP432	Hydrophobic	4.28825
		Cl	PHE476	Hydrophobic	3.97954

Tableau 10. Résultats des détails des interactions et du score de docking en (kJ/mol) des ligands synthétisés pour la série (**4a** à **4e**) contre l'enzyme cible α -glucosidase.

Produits	Score d'amarrage	Ligand	Poche du récepteur	Catégorie Interactions	Distance(Å)
				Category	
4a	-7.5	Ring(C5)	ASP568	Electrostatic	3.30089
		Ring(C6)	MET470	Pi-Sulfur	5.15779
		Ring(C6)	MET470	Pi-Sulfur	5.30669
		Ring(C5)	MET470	Pi-Sulfur	5.6995
		S	TRP432	Pi-Sulfur	5.65507
		C(C=C)	ALA234	Hydrophobic	4.06981
		C(C=C)	ALA602	Hydrophobic	4.4746
		C(C=C)	PHE236	Hydrophobic	4.88736
4b	-6.8	Ring(C6)	ASP568	Electrostatic	3.69295
		Ring(C6)	TRP432	Hydrophobic	4.96559
		C(C=C)	LYS506	Hydrophobic	3.90011
		C(C=C)	PHE476	Hydrophobic	4.89158
		C(CH3)	PHE601	Hydrophobic	5.10302
4c	-7.7	O(C=O)	ARG552	Hydrogen Bond	2.74136
		H(CH2)	ASP232	Hydrogen Bond	2.74263
		H(CH2)	ASP232	Hydrogen Bond	2.70926
		F	ASP357	Halogen	2.70359
		F	ASP469	Halogen	3.15327
		Ring(C5)	ASP568	Electrostatic	3.72285
		Ring(C6)	MET470	Pi-Sulfur	5.62496
		S	PHE601	Pi-Sulfur	5.3454
		Ring(C5)	TRP432	Hydrophobic	5.7127
		C=C	PHE476	Hydrophobic	4.15225
4d	-6.6	Ring(C6)	ASP568	Electrostatic	3.7256
		Ring(C5)	PHE476	Hydrophobic	5.16251
		Ring(C6)	TRP432	Hydrophobic	4.9641
		Ring(C6)	PHE601	Hydrophobic	5.73706
		C=C	LYS506	Hydrophobic	3.61135
		Br	TRP329	Hydrophobic	4.42954
		Br	TRP329	Hydrophobic	4.08377
		Br	TRP432	Hydrophobic	5.3273
		Br	PHE601	Hydrophobic	5.34674
4e	-6.8	Ring(C5)	ASP232	Electrostatic	3.86579
		Ring(C6)	ASP568	Electrostatic	3.52354
		Ring(C6)	MET470	Pi-Sulfur	5.09173
		Ring(C5)	PHE476	Hydrophobic	5.23761
		Ring(C5)	TRP432	Hydrophobic	5.18127
		C=C	LYS506	Hydrophobic	3.82812

Tableau A11. Résultats des détails d'interaction et score de docking en (kJ/mol) des ligands synthétisés contre les protéines modélisées α -amylase (**5a-5c**).

Compounds	Docking score	Interaction detail		
		Receptor	Ligand	Interaction Type

5a	-10.5	ARG210	F	Conventional (Fluorine)	Hydrogen Bond;Halogen	2.36954
		ARG210	F	Conventional (Fluorine)	Hydrogen Bond;Halogen	2.94343
		HIS314	F	Conventional (Fluorine)	Hydrogen Bond;Halogen	2.76916
		ASP212	F	Halogen (Fluorine)		2.96117
		ASP315	F	Halogen (Fluorine)		3.33762
		TRP74	S	Pi-Sulfur		4.341
		TYR77	Ring(C6)	Pi-Pi Stacked		4.05497
		LEU180	C(Ring5)	Alkyl		5.01374
5b	-10.2	ILE66	Ring(C6)	Pi-Alkyl		5.11364
		ASP212	F	Halogen (Fluorine)		3.18417
		ASP315	F	Halogen (Fluorine)		3.38361
		TYR77	Ring(C6)	Pi-Pi Stacked		4.41626
		LEU180	C(Ring5)	Alkyl		4.80496
5c	-10.8	ILE66	Ring(C6)	Pi-Alkyl		4.80286
		ARG210	F	Conventional (Fluorine)	Hydrogen Bond;Halogen	2.33454
		ARG210	F	Conventional (Fluorine)	Hydrogen Bond;Halogen	2.96797
		HIS314	F	Conventional (Fluorine)	Hydrogen Bond;Halogen	2.7227
		ASP212	F	Halogen (Fluorine)		3.02416
		ASP315	F	Halogen (Fluorine)		3.25913
		TRP74	S	Pi-Sulfur		4.38373
		TRP74	Ring(C6)	Pi-Pi Stacked		5.48126
		TYR77	Ring(C6)	Pi-Pi Stacked		4.06016
		TRP74	Ring(C5)	Pi-Pi Stacked		4.78828
		LEU180	C(Ring5)	Alkyl		4.99063
		ILE66	Cl	Alkyl		4.88893
VAL122	Cl	Alkyl		4.23612		
ILE66	Ring(C6)	Pi-Alkyl		5.0826		

Tableau A12. Résultats des détails d'interaction et score de docking en (kJ/mol) des ligands synthétisés contre les protéines modélisées α -glucosidase (**5a-5c**).

Compounds	Docking score	Interaction detail			
		Receptor	Ligand	Interaction Type	Distance
5a	-9.8	ASN314	O(Ring(C5))	Conventional Hydrogen Bond	1.89518
		PHE311	Ring(C6)	Pi-Pi Stacked	3.70598
		VAL316	Ring(C6)	Pi-Alkyl	5.40479
5b	-9	ASN241	O(C=O)	Conventional Hydrogen Bond	2.57328
		HIS279	O(C=O)	Conventional Hydrogen Bond	2.81274
		PHE157	Ring(C6)	Pi-Pi Stacked	4.18891
		ARG312	Br	Alkyl	3.85186
		PHE157	Br	Pi-Alkyl	3.96032
		TYR313	Br	Pi-Alkyl	5.25818
5c		ARG312	Br	Pi-Alkyl	4.25731
		ASN241	O(Ring(C5))	Conventional Hydrogen Bond	1.90374
		PRO309	C	Carbon Hydrogen Bond	3.49183

-8.2	PHE157	F	Halogen (Fluorine)	2.95684
	PHE157	Ring(C6)	Pi-Pi Stacked	4.3511
	HIS279	Ring(C5)	Pi-Pi T-shaped	5.72555
	HIS239	C(Ring5)	Pi-Alkyl	4.89761
	TRP242	Cl	Pi-Alkyl	4.50745
	TRP242	Cl	Pi-Alkyl	3.50743
	ARG312	Ring(C6)	Pi-Alkyl	4.68339

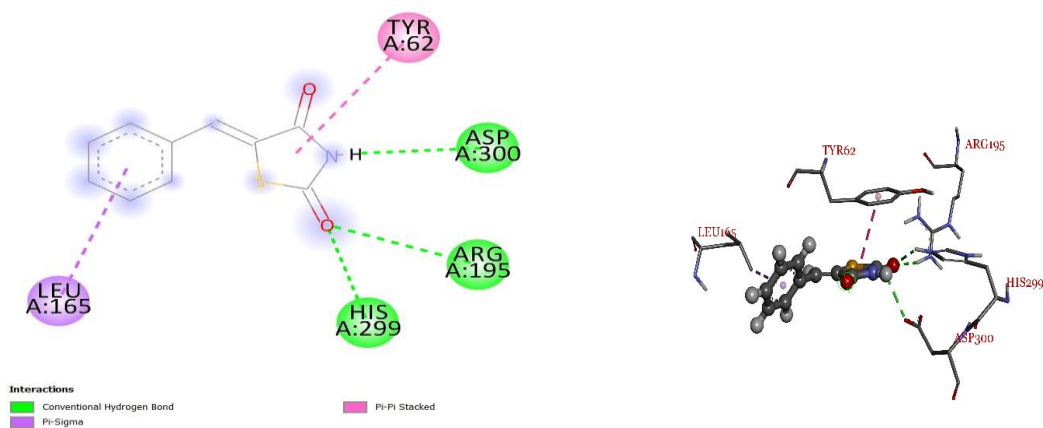


Figure A21. Interaction ligand-récepteur de **3a** avec l'enzyme cible α -amylase

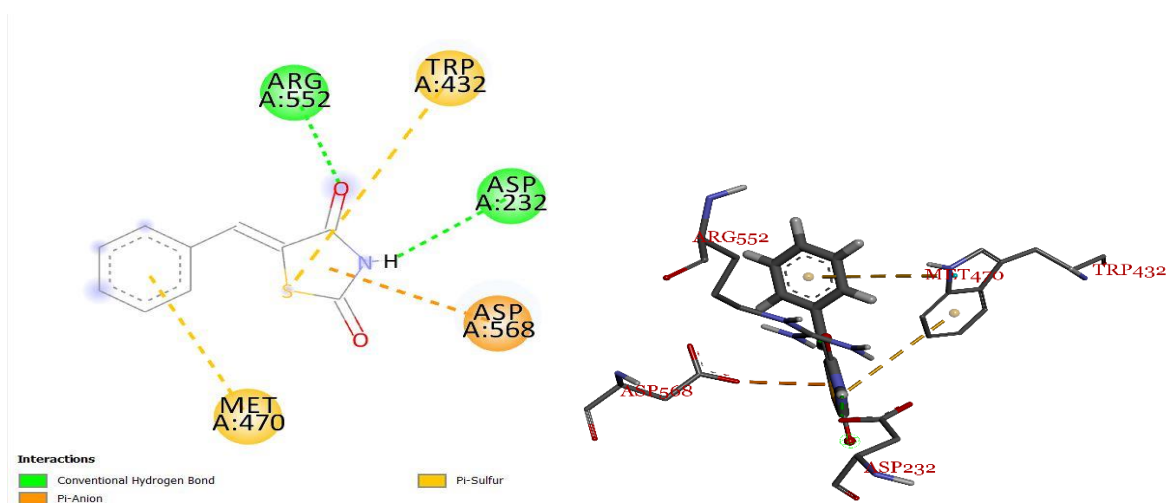


Figure A22. Interaction ligand-récepteur de **3a** avec l'enzyme cible α -glucosidase

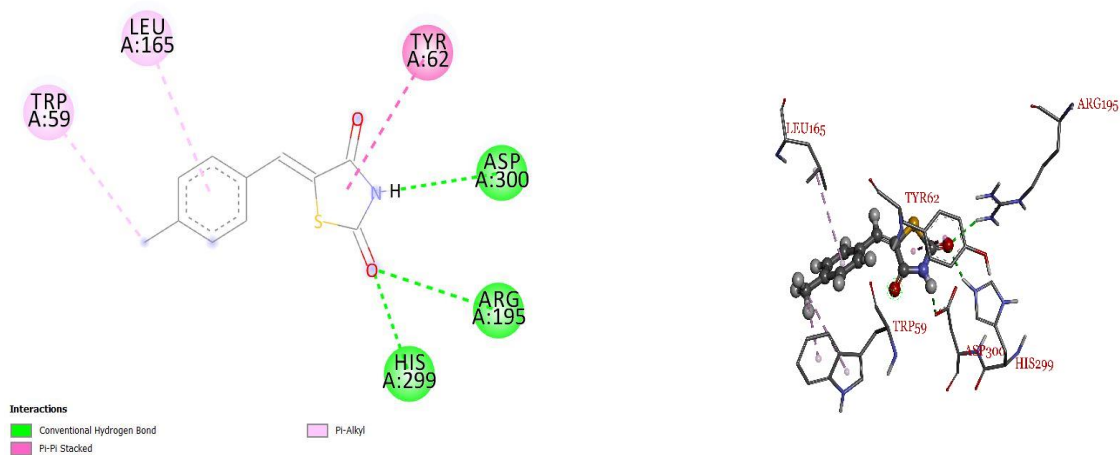


Figure A23. Interaction ligand-récepteur de **3b** avec l'enzyme cible α -amylase

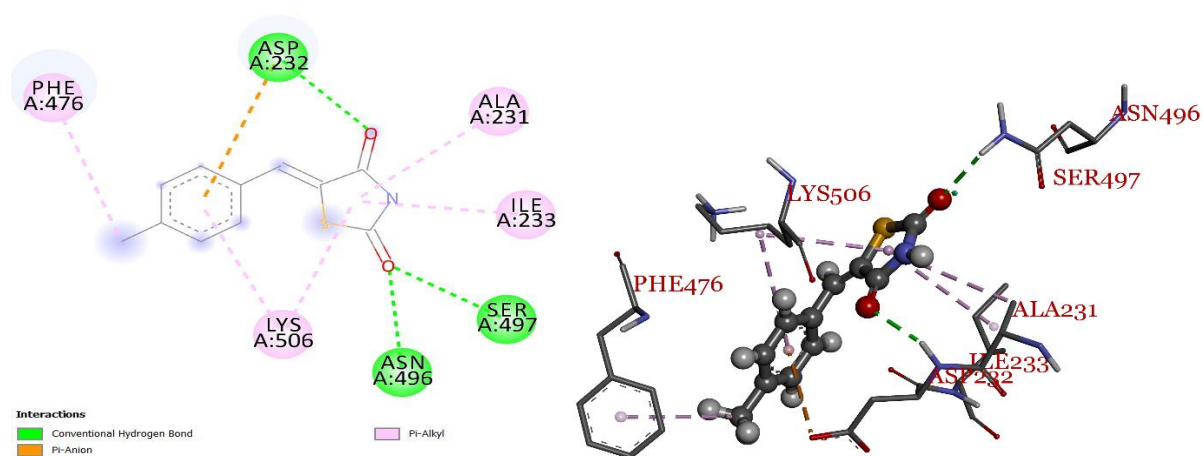


Figure A24. Interaction ligand-récepteur de **3b** avec l'enzyme cible α -glucosidase

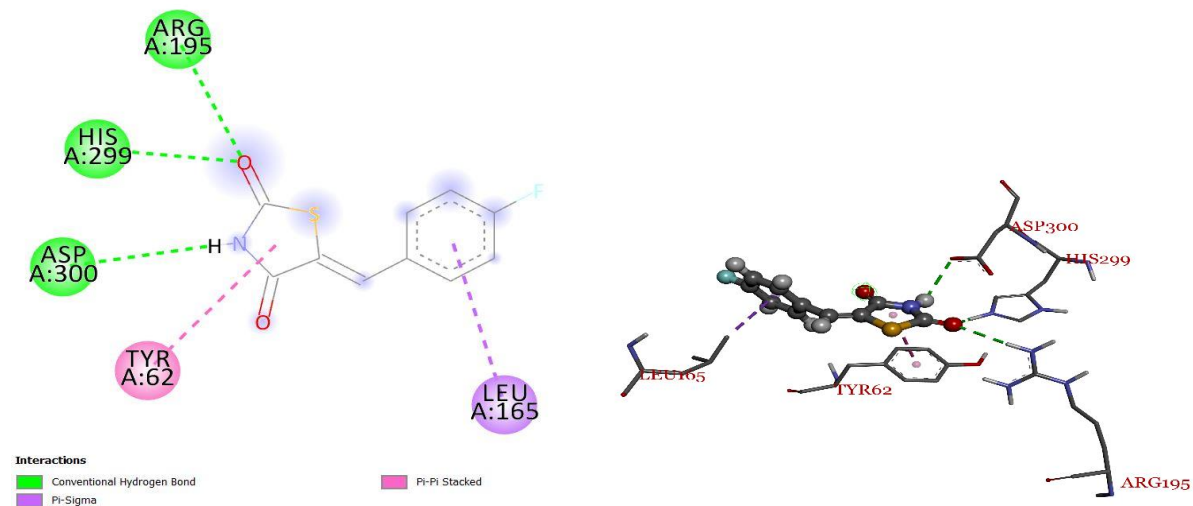


Figure A25. Interaction ligand-récepteur de **3c** avec l'enzyme cible α -amylase

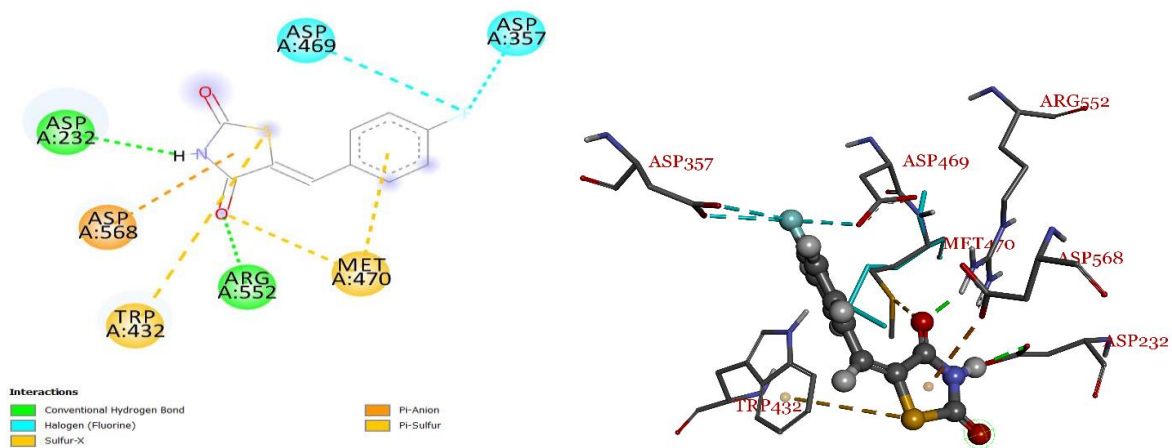


Figure A26. Interaction ligand-récepteur de **3c** avec l'enzyme cible α -glucosidase

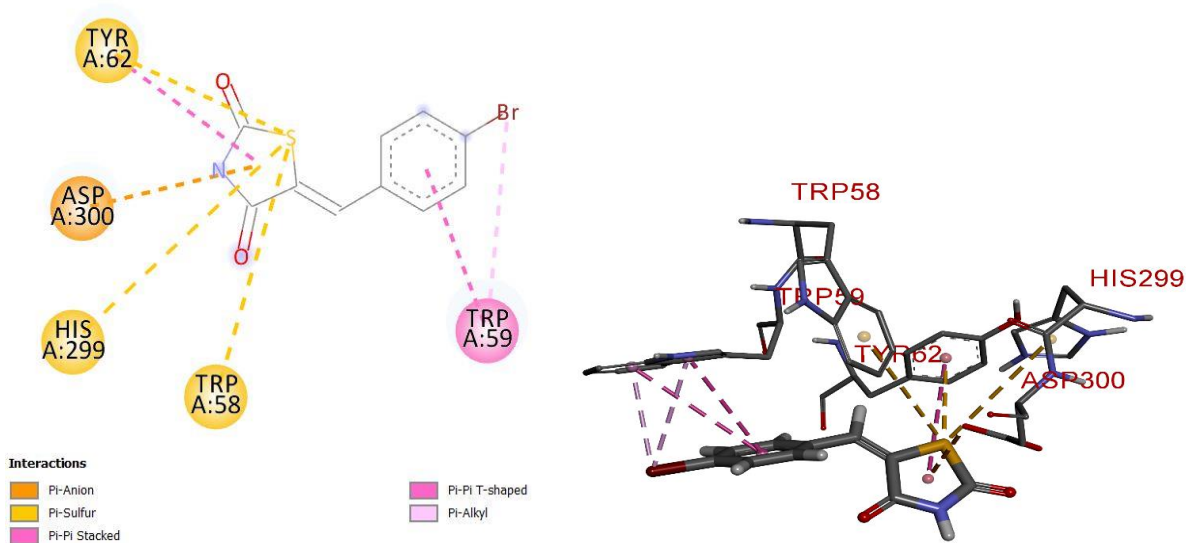


Figure A27. Interaction ligand-récepteur de **3d** avec l'enzyme cible α -amylase

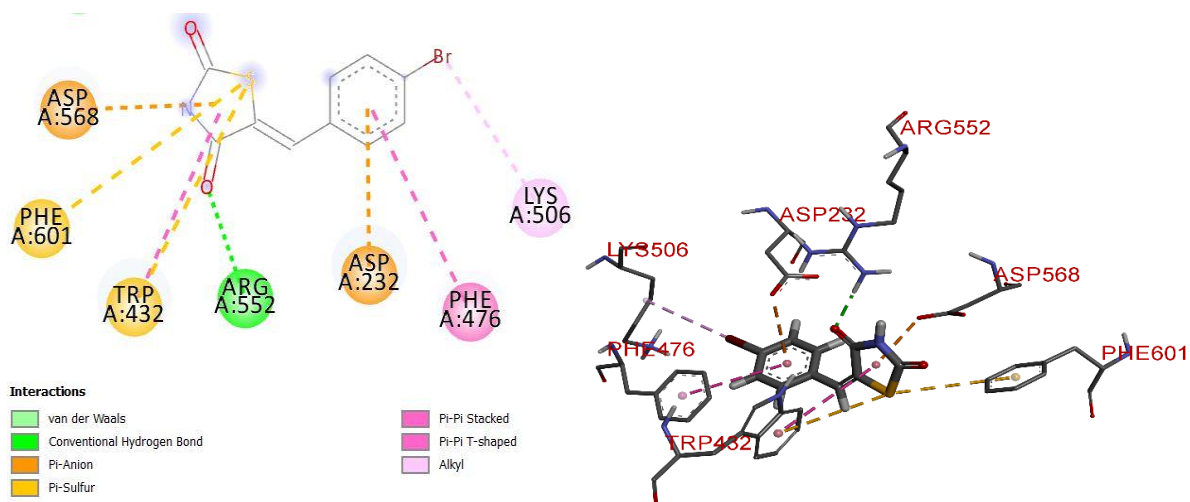


Figure A28. Interaction ligand-récepteur de **3d** avec l'enzyme cible α -glucosidase

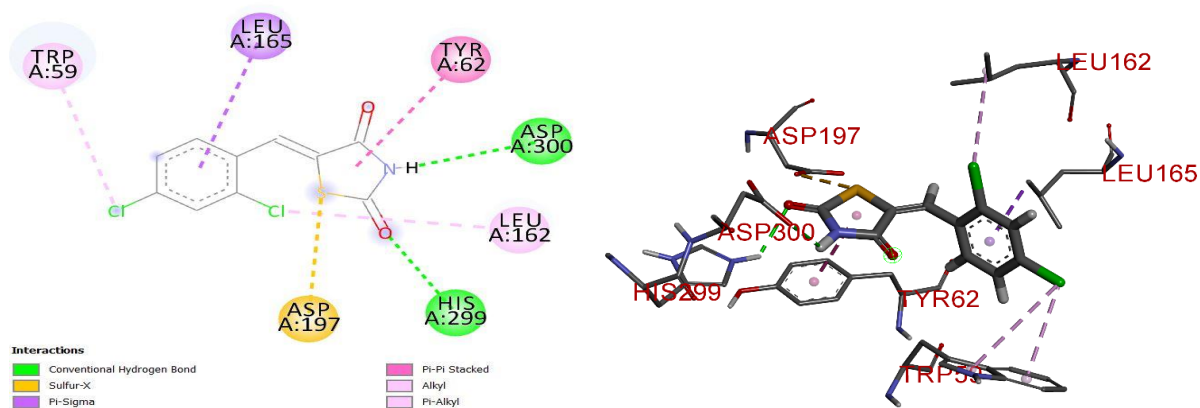


Figure A29. Interaction ligand-récepteur de **3e** avec l'enzyme cible α -amylase

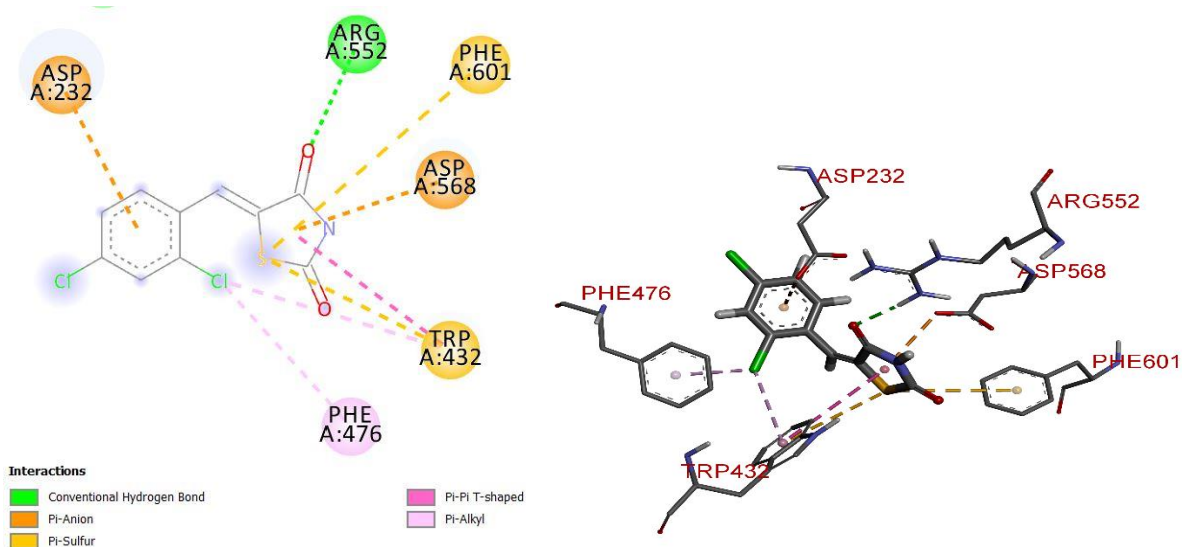


Figure A30. Interaction ligand-récepteur de **3e** avec l'enzyme cible α -glucosidase

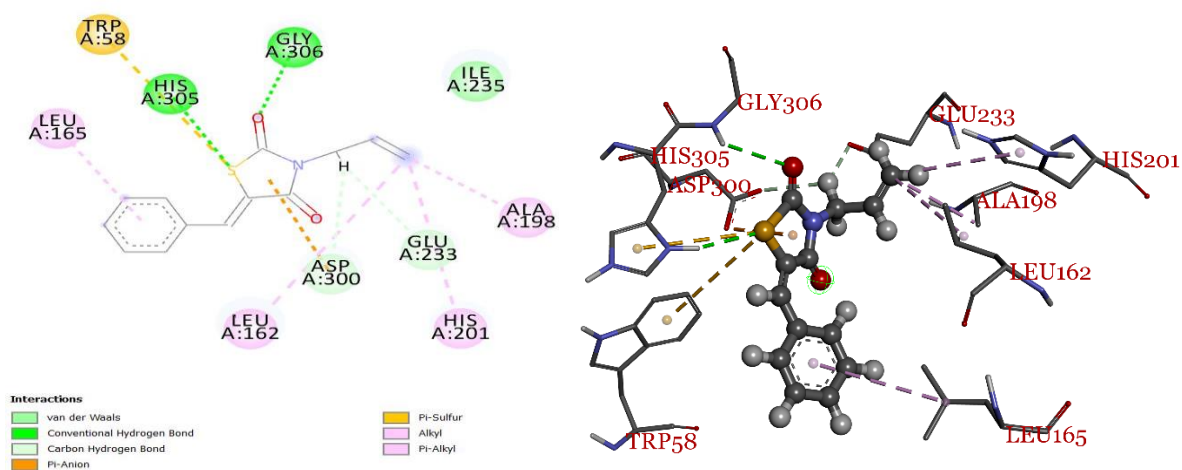


Figure A31. Interaction ligand-récepteur de **4a** avec l'enzyme cible α -amylase

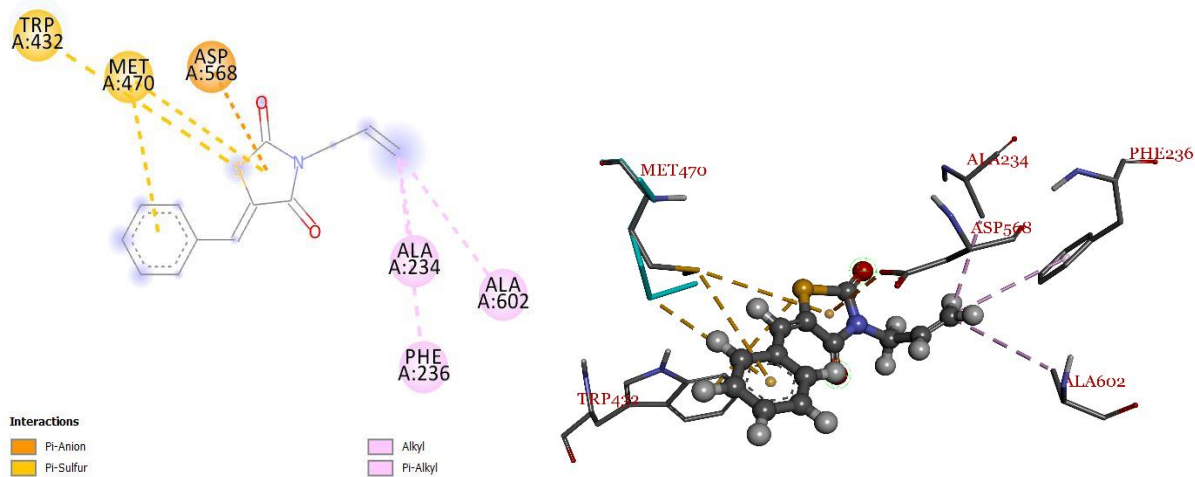


Figure A32. Interaction ligand-récepteur de **4a** avec l'enzyme cible α -glucosidase

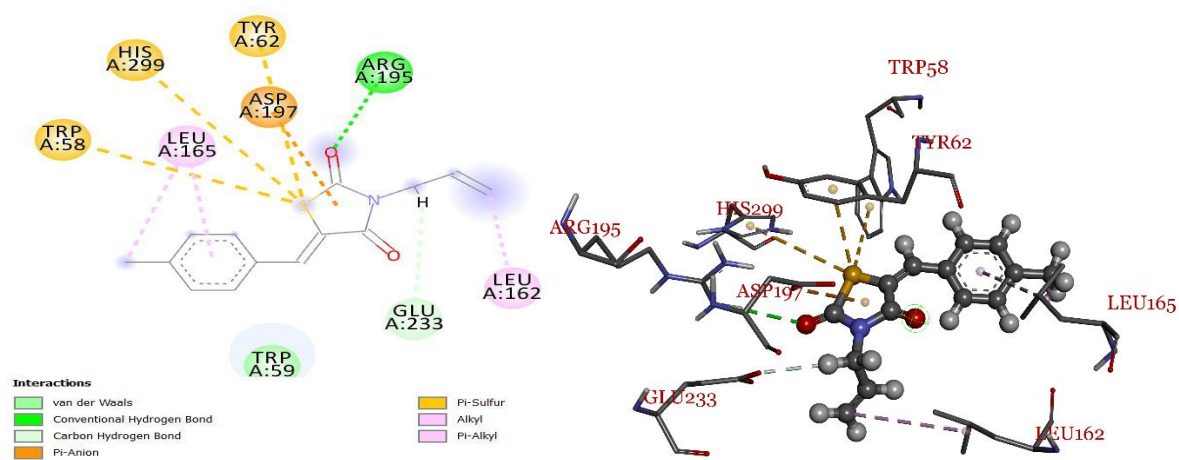


Figure A33. Interaction ligand-récepteur de **4b** avec l'enzyme cible α -amylase

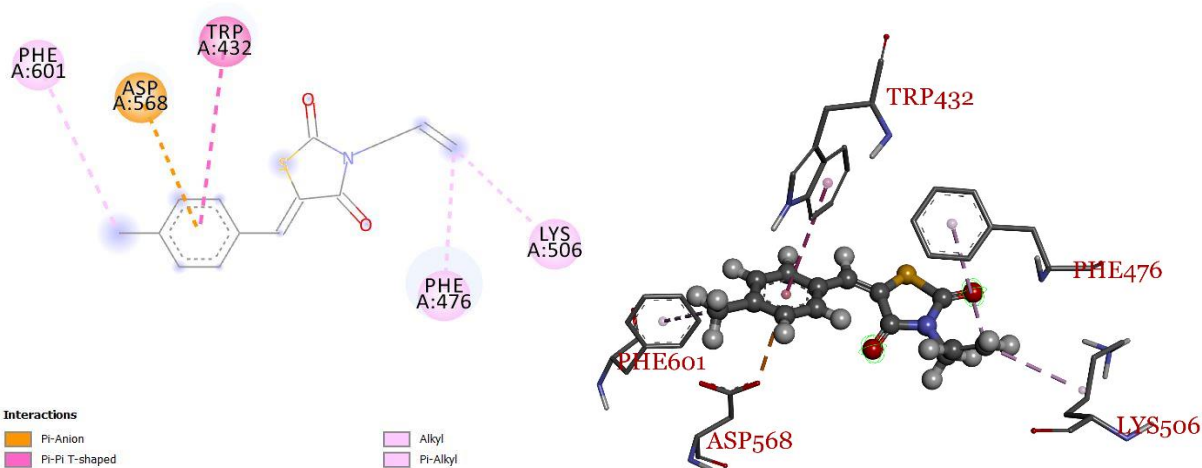


Figure A34. Interaction ligand-récepteur de **4b** avec l'enzyme cible α -glucosidase

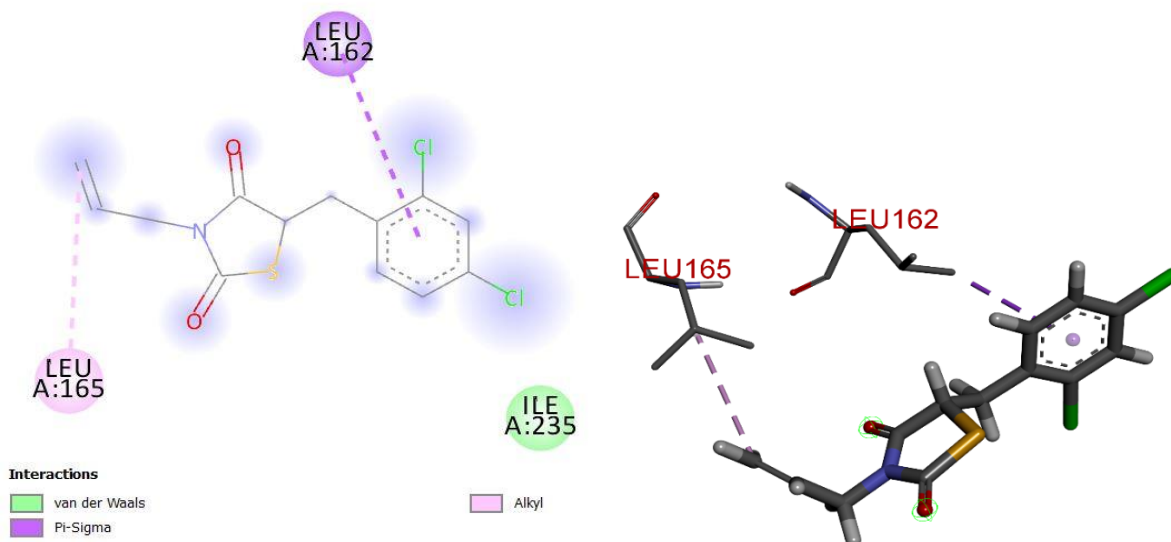


Figure A35. Interaction ligand-récepteur de **4e** avec l'enzyme cible α -amylase

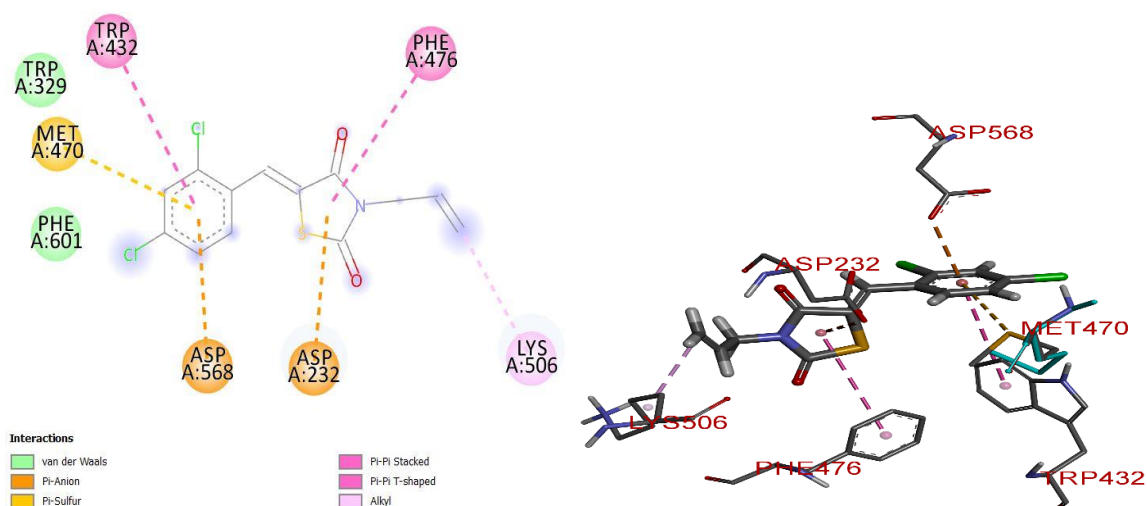


Figure A36. Interaction ligand-récepteur de **4e** avec l'enzyme cible α -glucosidase

Résumé

Les thiazolidinediones sont des agents introduit dans le traitement du diabète sucré de type 2 depuis la fin des années 1990, influençant favorablement la sensibilité à l'insuline et aussi la fonction des cellules β pancréatiques, par la fixation au récepteur nucléaire PPAR γ et l'activation de la transcription de gènes qui, entre autres, régulent la différenciation des adipocytes et l'adipogenèse ainsi que le métabolisme du glucose et des lipides. Cependant, malgré des avantages évidents en matière de contrôle de la glycémie, cette classe de médicaments est devenue obsolète en raison des préoccupations liées à leurs effets secondaires et indésirables, d'où leurs retraits des marchés internationaux. Pourtant, certaines approches rationalisées ont été utilisées pour poursuivre le développement de autres mécanismes possible cette classe d'agents antidiabétiques, pour la régulation de la glycémie postprandiale. Nous avons rapporté, dans le présent travail, par des tests *in vitro*, *in silico* et *in vivo* les effets directs des dérivés de la Thiazolidine-2,4-dione nouvellement synthétisées dans l'amélioration du contrôle glycémique, en abaissant les taux de glycémie à jeun et postprandiale. Nous avons montré que certains dérivés semblent avoir des effets différentiels sur la dyslipidémie, par la modulation des taux des paramètres lipidiques, ainsi que la protection contre les altérations induites par l'hyperglycémie chronique dans le foie, les reins et le pancréas. Nous avons constaté *in vivo*, sur un modèle de souris diabétique (HFD/STZ) que les thiazolidinediones synthétisés favorisent la régénération du système antioxydant endogène, ainsi que le maintien du nombre et la masse des cellules β pancréatique.

Mots clés : Thiazolidinedione, glitazone, diabète, hyperglycémie postprandial, hyperlipidémie, cellules β pancréatique.

Abstract

Thiazolidinediones are agents introduced in the treatment of type 2 diabetes mellitus since the late 1990s, favorably influencing insulin sensitivity and also pancreatic β -cell function, through binding to the nuclear receptor PPAR γ and activating transcription of genes that, among other things, regulate adipocyte differentiation and adipogenesis as well as glucose and lipid metabolism. However, despite clear benefits in glycemic control, this class of drugs has become obsolete due to concerns about side effects and adverse effects, resulting in their withdrawal from international markets. Yet, some streamlined approaches have been used to further develop other possible mechanisms of this class of antidiabetic agents, for the regulation of postprandial blood glucose. In the present work, we have reported *in vitro*, *in silico* and *in vivo* the direct effects of newly synthesized Thiazolidine-2,4-dione derivatives in improving glycemic control, lowering fasting and postprandial blood glucose levels. We have shown that some derivatives appear to have differential effects on dyslipidemia, by modulating the levels of lipid parameters, as well as protecting against alterations induced by chronic hyperglycemia in liver, kidney and pancreas. We found *in vivo*, in a diabetic mouse model (HFD/STZ) that synthesized thiazolidinediones promote the regeneration of the endogenous antioxidant system, as well as the maintenance of the number and mass of pancreatic β -cells.

Keywords: thiazolidinedione, glitazone, diabetes, postprandial hyperglycemia, hyperlipidemia, pancreatic β cells.

Structure de recherche: Equipe de Recherche des Analyses Biopharmaceutiques et Toxicologiques, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Maroc.