

Remerciements

À Dieu, Tout puissant, pour sa divine présence, et sa bonne guidance.

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire des molécules bioactives structure et fonction de la faculté des sciences et techniques de Fès.

Au terme de ce travail, Je tiens d'abord à adresser toute ma gratitude à mon encadrant le professeur **Tazi Abdelali**, sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour son soutien, sa patience et sa disponibilité tout au long de mes années de doctorat. Sincèrement merci pour une qualité d'encadrement si sérieuse et consistante.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux honorables membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail. Que chacun trouve dans ce rapport mes profondes gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur **Ait El Cadi Mina** pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger mon travail et d'être mon rapporteur.

Mes remerciements sincères et respectueux vont également au Professeur **Mekhfi Hassane**, pour avoir accepté de consacrer du temps, examiner et juger ce travail comme rapporteur, et pour siéger dans ce jury en y apportant sa compétence et son expertise.

Je remercie vivement le Professeur **Errasfa Mourad**, pour sa participation à mon jury de thèse et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Au Professeur **Bencheikh rachid**, pour avoir accepté d'illuminer ce travail en l'ayant examiné tout en apportant ces précieuses remarques, veuillez trouver professeur l'expression de mon éternelle reconnaissance.

Je ne manque pas l'occasion de remercier le professeur **Aarab lotfi** pour l'honneur qu'il m'a fait acceptant de présider ce jury.

Je remercie également **Dr Bousfiha Amal** pour son aide précieuse et sa gentillesse.

Je remercie très sincèrement tous les doctorant(e)s du laboratoire des molécules bioactives, **Chda Alae, Azdad Ouarda, Najlae Mejrhit et Jamila Al-Akhal**, pour leurs extrêmes

gentillesse. Veuillez trouver dans quelques mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.

Que mes parents trouvent à travers cette thèse l'expression de ma profonde reconnaissance et ma gratitude éternelle pour l'amour qu'ils m'ont témoigné, le soutien indéfectible et constant et pour la confiance qu'ils m'ont accordée durant toutes ces longues années d'étude. J'espère en avoir été digne, mille fois Merci.

Enfin, pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, veuillez trouver l'expression de mes sentiments et de ma reconnaissance.

Abréviations

ADA : l'association américaine du Diabète

ADN: Acide désoxyribonucléique

ALAT: alanine aminotransférase

ALP: alkaline phosphatase

ASAT: aspartate aminotransférase

ATP: Adenosine-5'-triphosphate

AUC : Areas under the curve

CAPM : Centre Anti-Poison et de Pharmacovigilance du Maroc

DL50 : Dose létale 50

DNID: diabète non insulino-dépendant

EDTA: Éthylènediaminetétraacétique

EMC : Encephalomyocarditis

GLUT: Glucose transporter

HDL: High density lipoprotein

IDF: International Diabetes Federation/Fédération Internationale du Diabète

IRS-1: Insulin receptor substrate 1

LDL: Low density lipoprotein

LCAT: Lécithin Cholestérol Acyl Transférase

OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques

OGTT: Oral glucose tolerance test

PC: Poids corporel

PPAR γ : Peroxisome proliferator activated receptor

SCGH : Système de Classification Globalement Harmonisé

SGLT: cotransporteurs glucose sodium dépendant

STZ: Streptozotocine

TG: Triglycerides

VCM: volume corpusculaire moyen

VLDL: Very low density lipoprotein

Tableaux et figures

Listes des tableaux

Tableau 1: Classification étiologique du diabète sucré

Tableau 2: les principales plantes antidiabétiques utilisées en médecine traditionnelle Marocaine

Tableau 3: Protocole d'administration par voie orale de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*

Article 1

Table 1(Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on body weight in STZ-induced diabetic rats.

Table 2 (Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on levels of urea, creatinine, ALAT and ASAT in STZ-induced diabetic rats.

Article 2

Table 1 (Art2): Changes in the body weight of normal and diabetic rats during the experimental period of 28 d.

Table 2 (Art2): Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on levels of urea, creatinine, ALAT and ASAT in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments.

Article 3

Table 1 (Art3): Urinalysis of the male rats treated with *C. ladaniferus* for 90 days (n = 6).

Table 2 (Art3): Urinalysis of the female rats treated with *C. ladaniferus* for 90 days (n = 6).

Table 3 (Art3): Hematological parameters of males rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Table 4 (Art3): Hematological parameters of females rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract

Table 5 (Art3): Biochemical parameters of males rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Table 6 (Art3): Biochemical parameters of females rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Table 7 (Art3): Relative organs weight of males rats after 90 days of treatment with *C.ladaniferus* extract.

Table 8 (Art3): Relative organs weight of females rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Liste des figures

Figure 1: Physiopathologie du diabète de type 2

Figure 2: Voies d'action des différentes classes d'antidiabétiques oraux

Figure 3: Réabsorption rénale du glucose en présence d'une inhibition complète du cotransporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2)

Figure 4: *Cistus ladaniferus*

Figure 5: *Thymus satureoidis*

Figure 6: Protocole de préparation de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides*

Figure 7: Schéma du protocole expérimental du test de tolérance au glucose

Figure 8: Auto-analyseurs de type "Cobas Integra" et "Sysmix XS-1000i"

Figure 9: Protocole de réalisation des coupes histologiques

Figure 10: Effet inhibiteur de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* sur l' α -glucosidase. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3)

Figure 11: Effet inhibiteur de l'extrait aqueux de *Thymus satureioidis* sur l' α -glucosidase. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3).

Figure 12: Effet inhibiteur des extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioidis* sur l' α -amylase. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3).

Article 1

Figure 1 (Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on blood glucose in STZ-induced diabetic rats.

Figure 2 (Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on blood glucose in STZ-induced diabetic rats during OGTT.

Figure 3 (Art1): Effect of *C. ladaniferus* extract on total area AUCs of blood glucose.

Figure 4 (Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma total cholesterol in STZ-induced diabetic rats.

Figure 5 (Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma triglycerides in STZ-induced diabetic rats.

Figure 6 (Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma LDL-C in STZ-induced diabetic rats.

Figure 7 (Art1): Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma HDL-C in STZ-induced diabetic rats.

Article 2

Figure 1(Art2): Effect of aqueous extract of *Thymus satureioides* on fasting blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats during the experimental period of 28 d.

Figure 2 (Art2): Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats during OGTT.

Figure 3 (Art2): Effect of *Thymus satureioides* extract on total area under the curves (AUCs) of blood glucose.

Figure 4 (Art2): Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on total cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments.

Figure 5 (Art2): Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on triglycerides in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments.

Figure 6 (Art2): Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on LDL-cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments.

Figure 7 (Art2): Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on HDL-cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments.

Article 3

Figure 1 (Art3): Changes in the body weights in male mice treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the acute toxicity study. Each point represents the mean $\pm$ SD (n = 5). No significant difference.

Figure 2 (Art3): Changes in the body weights in females mice treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the acute toxicity study. Each point represents the mean $\pm$ SD (n = 5). *: P < 0.05. (one-way ANOVA by Dunnet's post-hoc test).

Figure 3 (Art3): Changes in the body weights in males rats treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the sub-chronic toxicity study. Each point represents the mean $\pm$ SD (n = 6).

Figure 4 (Art3): Changes in the body weights in females rats treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the sub-chronic toxicity study. Each point represents the mean $\pm$ SD (n = 6).

Figure 5 (Art3): Photomicrographs of stained sections of various organs in control and experimental groups treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract daily for 90 days. No significant alteration was observed in all treatment groups (x 200 magnification).

Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'étude pharmacologique des plantes médicinales d'intérêt thérapeutique, utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète.

La première partie de ce travail avait pour objectif l'évaluation expérimentale de l'activité anti-hyperglycémiant et anti-hyperlipidémiant de deux plantes médicinales (*Cistus ladaniferus* et *Thymus satureoidis*) utilisées en médecine traditionnelle pour traiter le diabète sucré. Les effets anti-hyperglycémiant et anti-hyperlipidémiant des extraits aqueux de ces deux plantes (500 mg/kg) ont été étudiés chez des rats rendus diabétiques par injection de la streptozotocine (45 mg/kg). Les résultats ont montré que l'administration orale des extraits aqueux pendant 28 jours à une dose journalière de 500 mg/kg a provoqué une diminution significative de la perte pondérale, de la concentration sérique de glucose, du cholestérol total, des triglycérides et du cholestérol LDL chez les rats diabétiques par rapport aux diabétiques témoins. Les extraits aqueux ont également entraîné une amélioration significative de la tolérance au glucose chez les rats traités pendant 28 jours. D'autre part, les extraits ont entraîné une augmentation significative du taux de cholestérol HDL et une nette amélioration de la fonction rénale et hépatique. Par ailleurs, les extraits aqueux ont montré des activités inhibitrices in vitro de l' α -glucosidase et de l' α -amylase.

La deuxième partie de l'étude a été réalisée dans le but d'évaluer la toxicité aiguë des extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureoidis* chez les souris ainsi que la toxicité sub-chronique de *Cistus ladaniferus* chez les rats. Dans l'étude de la toxicité aiguë, les souris réparties en 5 lots ont reçu par gavage des doses uniques allant de 0,5 à 5 g/kg de poids corporel (P.C) de l'extrait aqueux des deux plantes. Dans l'étude de la toxicité sub-chronique, 3 lots de 12 rats chacun ont été gavés quotidiennement pendant 90 jours avec des doses de 500, 700, 1000 mg/kg. Au cours du test de toxicité aiguë (14 jours), aucune mortalité ou signe de toxicité n'a été observé chez les souris traitées par des doses inférieures à 3 g/kg. La dose létale 50 % (DL₅₀) par voie orale a été estimée supérieure à 5 g/kg. Les analyses urinaires, hématologiques, biochimiques et histo-pathologiques réalisées à la fin de l'étude sub-chronique n'ont révélé aucune altération significative au niveau du bilan biochimique et de la morphologie des tissus des animaux traités.

En conclusion, les résultats expérimentaux obtenus ont montré que les extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureoides* n'étaient pas toxiques aux doses administrées. Par ailleurs, ces extraits ont montré des effets antidiabétiques in vivo et in vitro.

Mots clés: *Thymus satureioides*, *Cistus ladaniferus*, Diabète sucré, Streptozotocine, Activité antidiabétique, Extrait aqueux, Toxicité aiguë, Toxicité sub-chronique, α -glucosidase, α -amylase.

Abstract

In the first part of this present study, we experimentally evaluated the hypoglycemic and hypolipidemic activities of two medicinal plants (*Cistus ladaniferus*, *Thymus satureoides*) used in traditional medicine to treat diabetes mellitus. The aqueous extracts of *Cistus ladaniferus* and *Thymus satureoidis* were administered orally at the dose of 500 mg/kg body weight to diabetic rats for a period of 28 days. Diabetes was induced by single intraperitoneal injection of streptozotocin (45 mg/kg) to male albino Wistar rats. The results showed that oral administration of aqueous extracts for 28 days at a daily dose of 500 mg / kg caused a significant decrease in weight loss, serum glucose concentration, total cholesterol, triglycerides and LDL in diabetic rats compared to control diabetics. The aqueous extracts also resulted in a significant improvement in glucose tolerance in treated rats for 28 days. On the other hand, the extracts resulted in a significant increase in HDL cholesterol levels and a marked improvement in renal and hepatic function. Moreover, the aqueous extracts demonstrated interesting inhibitory activities in vitro against α -glucosidase and α -amylase.

The second part of the pharmacological study was undertaken to evaluate the acute toxicity of aqueous extracts of *Cistus ladaniferus* and *Thymus satureoidis* in mice as well as the sub-chronic toxicity of *Cistus ladaniferus* in rats. During the acute toxicity study, male and female mice were orally administrated with CL and TS aqueous extracts at single doses of 500, 1000, 2000, 3000 and 5000 mg/kg. During the sub-chronic toxicity study, the aqueous extract was administered orally at doses of 500, 700 and 1000 mg/kg daily to Wistar rats of both sexes for 90 days. During the acute toxicity test (14 days), no mortality or adverse effect was noted at the doses of 1000, 2000 and 3000 mg/kg. The median lethal dose (LD₅₀) of the extract was estimated to be more than 5000 mg/kg. In the subchronic study, the CL extract induced no mortality or treatment-related adverse effects with regard to body weight, general behavior, relative organ weights, urine, hematological, and biochemical parameters. Histopathological examination of vital organs exhibited normal architecture suggesting no morphological alterations as well .

In conclusion, the results showed that the aqueous extracts of *Cistus ladaniferus* and *Thymus satureoidis* were not toxic at the doses administered. Furthermore these extracts markedly showed significant antidiabetic effects both in vivo and in vitro.

Key words: *Thymus satureioides*, *Cistus ladaniferus*, Diabetes mellitus, Streptozotocin, Antidiabetic activity, Aqueous extract, Acute toxicity, Sub-chronic toxicity, α -glucosidase, α -amylase.

ملخص

هذا البحث يندرج في إطار الدراسة الفارماكولوجية للنباتات الطبية ذات الأهمية العلاجية ، والتي تستخدم في الطب التقليدي لعلاج مرض السكري.

يهدف الجزء الأول من هذه الدراسة إلى تقييم تجريبي للآثار المخفض لمستويات للسكر والدهون في الدم لا ثريين من النباتات الطبية *Thymus satureioides* و *Cistus ladaniferus* المستخدمة في الطب التقليدي لعلاج مرض السكري. تم دراسة التأثيرات المخفض لمستويات السكر والدهون للمستخلص المائي لهاتين النباتتين (500 ملغ / كلغ) عند فئران مصابة بداء السكري عن طريق الحقن بمادة Streptozotocine (45 ملغ / كلغ).

أظهرت النتائج المحصل عليها أن الأخطاء الفموي للمستخلص المائي لمدة 28 يوما بجرعة يومية 500 ملغ / كلغ أدى إلى خفض معنوي في فقدان الوزن، ومستوى السكر في الدم والكوليسترول الكلي والدهون الثلاثية والكوليسترول LDL الفئران المصابة بداء السكري مقارنة بالشواهد. كما أدت المستخلصات المائية إلى تحسن كبير في تحمل الجلوكوز لدى الفئران المعالجة لمدة 28 يوما. من جهة أخرى ، أدت المستخلصات إلى زيادة معنوية في مستويات الكوليسترول HDL وتحسن ملحوظ في وظيفة الكلى والكبد.

أجري الجزء الثاني من الدراسة لتقييم السمية الحادة للمستخلص المائي ل *Thymus satureioides* ، *Cistus ladaniferus* و *Thymus satureioides* لدى الفئران وكذلك السمية شبه المزمنة للمستخلص المائي *Cistus ladaniferus* لدى الفئران. في دراسة السمية الحادة ، وزعت الفئران لخمس مجموعات تلقت جرعات واحدة لكل مجموعة تتراوح من 0.5 إلى 5 غ / كغم من وزن الجسم من المستخلص المائي للنباتتين. في دراسة السمية شبه المزمنة ، تم تغذية مجموعات من 12 جرذ يوميا لمدة 90 يوما بجرعات 500 ، 700 ، 1000 ملغ / كغم للمستخلص المائي *Cistus ladaniferus*. في اختبار السمية الحادة (14 يوما) ، لم يلاحظ حدوث أي وفيات أو علامات سمية في الفئران المعالجة بجرعات تقل عن 3 جم / كجم. وقدرت الجرعة المميتة عن طريق الفم % 50 (LD50) أكبر من 5 غرام / كغم. أظهرت نتائج تحليل البول، والدم والكيمياء الحيوية والأنسجة في نهاية دراسة السمية شبه المزمنة عدم وجود تغير كبير في مستوى المعلومات البيوكيميائية و مورفولوجية الأنسجة لدى الفئران المعالجة.

في الختام ، أظهرت النتائج التجريبية التي تم الحصول عليها أن المستخلصات المائية ل *Cistus ladaniferus* و *Thymus satureioides* لم تكن سامة لدى الفئران. بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت هذه المستخلصات آثار مضاد للسكري.

الكلمات المفتاحية : *Thymus satureioides* ، *Cistus ladaniferus* ، داء السكري ، Streptozotocine ، النشاط المضاد لمرض السكري، مستخلص مائي، سمية الحادة والسمية شبه المزمنة.

Publications et communications

Publications

1-Mohamed El Kabbaoui, Alae Chda, Ouarda Azdad, Najlae Mejrhit, Lotfi Aarab, Rachid Bencheikh, Abdelali Tazi. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2016: 6(12): 1044–1049.**

2-Mohamed El Kabbaoui, Alae Chda, Ouarda Azdad, Najlae Mejrhit, Abdellah Farah, Lotfi Aarab, Rachid Bencheikh, Abdelali Tazi. Antidiabetic effect of *Thymus satureioides* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2016:8(9), 140-145.**

3-Mohamed El Kabbaoui, Alae Chda, Amal Bousfiha, Lotfi Aarab, Rachid Bencheikh, and Abdelali Tazi. Prevalence and associated risk factors of overweight and obesity among adolescents in Fes, Morocco. **Eastern Mediterranean Health Journal 2018: Vol. 24 No. 6.**

4-Mohamed El Kabbaoui, Alae Chda, Jamila El-Akhal, Ouarda Azdad, Najlae Mejrhit, Lotfi Aarab, Rachid Bencheikh, Abdelali Tazi. Acute and sub-chronic toxicity studies of the aqueous extract from leaves of *Cistus ladaniferus* L. in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology 2017: 209 (2017) 147–156.**

Communications Orales

1-Evaluation des propriétés hypoglycémiantes et hypolipidémiantes de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*. **2^{ème} Edition du Congrès International : Substances naturelles et développement durable. Faculté des Sciences de Rabat; 19 -21 , mai 2016.**

Mohamed El kabbaoui, Alae Chda, Rachid Bencheikh et Abdelali Tazi.

2-Evaluation des propriétés hypoglycémiantes et hypolipidémiantes de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*. **La première journée scientifique du doctorant en biologie de l'USMBA. Faculté des Sciences et Techniques de Fès. 13, Octobre 2015.**

El kabbaoui Mohamed, Chda Alae, Bencheikh Rachid, Tazi Abdelali.

3- El Kabbaoui Mohamed, Chda Alae, El- Akhal Jamila, Bencheikh Rachid, Tazi Abdelali
Etude de l'effet de l'extrait aqueux de *thymus satureioides* (*lamiaceae*) sur le diabète expérimental chez le rat. **la 5^{ème} Edition Internationale des Journées Jeunes Chercheurs**

de Chimie Thérapeutique 2016. Faculté Polydisciplinaire de Taza. 28 et 29 Novembre 2016.

4- Mohamed El kabbaoui, Alae Chda, Rachid Bencheikh et Abdelali Tazi.

Etude de la toxicité aiguë et sub-chronique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* (Cistaceae). **La deuxième journée scientifique du doctorant en biologie de l'USMBA. Faculté des Sciences et Techniques de Fès. 10, mai 2017.**

Communications affichées

1-Prévalence du surpoids et de l'obésité infantile dans la ville de Fès. Colloque International, **Santé, Environnement & Entreprise, 21 et 22 Novembre 2014. Mohammedia, Maroc**
Mohamed El kabbaoui, Alae Chda, Rachid Bencheikh et Abdelali Tazi.

2-Etude Epidémiologique du Surpoids et de l'Obésité Infantile dans la Ville de Fès. **1er Congrès International : Substances Naturelles & Modélisation : Applications Thérapeutique, Environnementale & Développement Durable (CISNEM Taza 2014). Faculté Polydisciplinaire de Taza, 15-16 décembre 2014. El kabbaoui Mohamed, Chda Alae, Bencheikh Rachid, Tazi Abdelali**

3-Etude de l'effet des extraits de quelques plantes médicinales sur la viabilité des îlots pancréatiques du rat en culture primaire (in vitro). **La première journée scientifique du doctorant en biologie de l'USMBA. Faculté des Sciences et Techniques de Fès. 13, Octobre 2015. El kabbaoui Mohamed, Chda Alae, Bencheikh Rachid, Tazi Abdelali.**

4- Mohamed El kabbaoui, Alae Chda, Rachid Bencheikh et Abdelali Tazi. Etude de l'effet de l'extrait aqueux de *thymus satereioides* (lamiaceae) sur le diabète expérimental chez le rat. **La deuxième journée scientifique du doctorant en biologie de l'USMBA. Faculté des Sciences et Techniques de Fès. 10, mai 2017.**

5- Mohamed El kabbaoui, Maamar Jaouhara, Abdelali Tazi. Evaluation des propriétés hypoglycémiantes et anti-oxydantes de l'extrait aqueux de *Euphorbia officinarum*. **La 3ème journée scientifique du doctorant en biologie de l'USMBA. Faculté des Sciences et Techniques de Fès. 27, juin 2017**

Sommaire

Introduction générale.....	1
1-Introduction	4
2-Classification des diabètes	5
3- Régulation physiologique de la glycémie	6
4-Physiopathologie du diabète sucré	7
4-1 Diabète de type I	7
4-2 Diabète de type II	8
5-Complications du diabète	9
6- Les thérapies du diabète	11
6-1 Diététique et hygiène de vie	11
6-2 L'insulinothérapie	12
6-3 Les traitements oraux du diabète de type 2	12
6-3-1 Les biguanides	13
6-3-2 Les glitazones	13
6-3-3 Les sulfamides hypoglycémiants	13
6-3-4 Les glinides	14
6-3-5 Les Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase	14
6-3-6 Inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose de type 2.....	14
7- La phytothérapie du diabète	15
8- Modes d'action des plantes médicinales	18
9- Principes actifs hypoglycémiants des plantes médicinales	19
9-1 Alcaloïdes	20
9-2 Polyphénols	20
9-3 Triterpènes	22
9-4 Polysaccharides	23
9-5 Polypeptides et acides aminés	23
10- Modèles animaux du diabète expérimental.....	23
10-1 Modèles animaux de diabète spontané	24
10-2 Modèles animaux de diabète induit par inoculation de virus	24
10-3 Modèles animaux de diabète induit par pancréatectomie	25
10-4 Modèles transgéniques	25
10-5 Modèles animaux de diabète induit par le régime alimentaire	25
10-6 Modèles animaux induits par des substances chimiques	26
11- Etude toxicologique des plantes médicinales	27
11-1 Toxicité aiguë (administration unique)	27
11-1-1 La dose létale 50 : DL50	27
11-1-2 Méthode d'étude de la toxicité aiguë selon la ligne directrice Européenne de l'OCDE	
code 423.	28
11-1-3 Nombre d'animaux et niveaux des doses	29
11-1-4 Observations	29
11-1-5 Poids corporel	30
11-1-6 Résultats	30
11-1-7 Observation des manifestations de la toxicité aiguë	30
11-2 Toxicité chronique	31
11-2-1 Observations	32
11-2-2 Examen Hématologique et biochimique	32
11-2-3 Examen anatomo-pathologique et histopathologie	33
12- Présentation des plantes étudiées	34
12-1 <i>Cistus ladaniferus</i>	34
12-1-1 Description	34
12-1-2 Systématique	34
12-1-3 Répartition géographique et écologie	35
12-1-4 Phytochimie de <i>Cistus Ladaniferus</i>	36
12-1-5 Usage traditionnel et Activités pharmacologiques	36
12-2 <i>Thymus satureioides</i>	37
12-2-1 Description	37

12-2-2 Systématique	38
12-2-3 Répartition géographique et écologie	39
12-2-4 Phytochimie de <i>Thymus saturioidis</i>	39
12-2-5 Usage traditionnel et activités pharmacologiques	39
Objectifs de la thèse.....	40
Matériel et Méthodes.....	41
1-Collecte des plantes	41
2-Préparation des extraits aqueux.....	42
3- Etude phytochimique	42
3-1 Dosage des polyphénols totaux	43
3-2 Dosage des flavonoïdes	44
4- Les animaux d'expérimentation	44
5- Induction du diabète	44
6- Evaluation de l'activité antidiabétique des extraits aqueux	45
6-1 Les groupes des animaux:	45
6-2 Prélèvement sanguin et mesure du poids	46
6-3 Test de tolérance au glucose	46
6-4 L'analyse des paramètres biochimiques	47
6-5 Test d'inhibition de l' α -glucosidase	47
6-6 Test d'inhibition de l' α -amylase.....	46
6-7 Analyse statistique	48
7- Etude toxicologique de l'extrait aqueux de <i>Cistus ladaniferus</i>	48
7-1 Extrait de la plante	48
7-2 Les animaux d'expérimentation	48
7-3 Etude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux de <i>Cistus ladaniferus</i>	49
7-4 Etude de la toxicité chronique	50
7-4-1 Animaux	50
7-4-2 Test de la toxicité chronique	50
7-5 Analyse statistique.....	54
Résultats et discussion	55
Chapitre I- Etude de l'activité antidiabétique des extraits aqueux de <i>Cistus ladaniferus</i> et <i>Thymus satureioides</i> chez les rats rendus diabétiques par STZ	
Introduction.....	56
Article 1	
Article 2	
Discussion	70
Chapitre II-Etude de l'activité antidiabétique des extraits aqueux <i>in vitro</i> par évaluation de leur effet sur l'inhibition de l'α-glucosidase et l'α-amylase pancréatiques	
Introduction	76
Résultat	77
Discussion	79
Chapitre III-Etude toxicologique de l'extrait aqueux de <i>Cistus ladaniferus</i>	
Introduction	81
Article 3	
Discussion	92
Discussion générale.....	96
Conclusion et perspectives.....	107
Références bibliographiques.....	109

Introduction générale

Le diabète sucré, principalement le diabète de type 2, est considéré depuis quelques années comme un des fléaux du troisième millénaire, partout dans le monde, dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement. Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon très alarmante. À l'échelle mondiale, on estime que 422 millions d'adultes vivaient avec le diabète en 2014, comparé à 108 millions en 1980 [OMS, 2016].

Au Maroc, le diabète constitue un problème de santé publique majeur. D'après une étude nationale publiée en 2016, la prévalence de cette épidémie se situe aux alentours de 13 % [Gharbi et al, 2016]. Cette pathologie exerce un impact très lourd sur les systèmes de santé à travers sa morbidité, sa mortalité et ses coûts liés aux traitements et de prise en charge. Les traitements actuels représentés essentiellement par l'insuline et antidiabétiques oraux visent à soigner et non à guérir la maladie. Selon l'OMS, l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement et le contrôle de cette maladie commence à recevoir un grand intérêt au cours de ces dernières décennies [OMS, 2000]. Les investigations pharmacologiques ont pour but la validation expérimentale des propriétés thérapeutiques, traditionnellement attribuées à ces plantes [OMS, 2013].

De nos jours, malgré les progrès spectaculaires de la thérapeutique conventionnelle, les remèdes traditionnels continuent d'être utilisés dans de nombreux pays même développés. En effet, les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indiquent que près de 80 % des populations des pays en voie de développement ont encore recours aux remèdes traditionnels [WHO, 2008]. Le domaine de la recherche en phytothérapie suscite encore un grand intérêt auprès des scientifiques [Governa et al, 2018]. De ce fait, l'OMS a élaboré une stratégie pour la médecine traditionnelle qui a pour objectif d'exploiter les possibilités offertes par cette forme de médecine en tant qu'une source de soins de santé [OMS, 2013]. Aussi, elle recommande aux pays en voie de développement d'une part de mettre au point des programmes visant l'identification, la conservation et l'intégration des plantes médicinales dans les systèmes de soins de santé et d'autre part, d'évaluer la sécurité, l'efficacité et la qualité de ces remèdes à l'aide des méthodes scientifiques [OMS, 2013].

De par sa situation géographique et la diversité de son climat, le Maroc est un pays qui possède une flore très diversifiée (environ 4200 plantes) dont 800 sont utilisées en médecine

traditionnelle [Hmamouchi, 2005]. La médecine traditionnelle continue à jouer un rôle important dans le traitement de la plupart des maladies, particulièrement dans les zones rurales où l'accès aux traitements conventionnels reste limité [Aqil and Owais, 2006]. La valorisation scientifique des plantes médicinales peut aboutir notamment à la découverte de nouveaux médicaments. Les mots clés, dans ce domaine, doivent être: efficacité, qualité et sécurité. L'étude des propriétés pharmacologiques d'une plante constitue une étape primordiale pour la valorisation. Par ailleurs, une étude phytochimique poussée et sélective permettra d'isoler des constituants chimiques purs ou plus vraisemblablement des groupes chimiques définis, susceptibles d'être responsables des activités pharmacologiques étudiées.

En outre, l'usage des plantes médicinales peut engendrer des risques de toxicité dus à l'absence d'une maîtrise d'une posologie définie et d'un mode d'emploi approprié. De ce fait, il faut avoir conscience des risques encourus lors de la médication par les plantes. Au Maroc, une centaine de cas d'intoxication par les plantes ont été signalés par l'unité d'information toxicologique du Centre Anti-Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) ces dernières années [Rhalem et al, 2010]. Plusieurs plantes toxiques ont été listées dont *Atractylis gummifera*, *Peganum harmala*, *Myrestica fragrans* et *Cannabis sativa*. Ces plantes provoquent un certain nombre de signes cliniques en particulier digestifs, cardiovasculaires et neurologiques.

Notre thèse vise la valorisation de deux plantes médicinales, *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioidis*, appartenant respectivement aux familles des Cistacées et des Lamiacées et qui sont utilisées en médecine traditionnelle Marocaine pour le traitement du diabète sucré. Cette valorisation se base sur une étude expérimentale qui comporte les objectifs suivants :

- Evaluation de l'activité antidiabétique *in vivo* des extraits aqueux de *Cistus Ladaniferus* et *Thymus satureioides* chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine.
- Etude de l'activité antidiabétique des extraits *in vitro* par évaluation de leur effets sur l'inhibition de l' α -glucosidase et l' α -amylase.
- Etude de la toxicité aiguë et sub-chronique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* chez les rats par administration orale

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1-Introduction

Le diabète est une maladie fréquente, connue depuis fort longtemps, très répandue en ce début de XXIème siècle. C'est une pathologie métabolique, caractérisée par une hyperglycémie chronique. Le diabète est une maladie incurable, mais peut néanmoins être contrôlée efficacement par les médicaments et les mesures hygiéno-diététiques **[National Diabetes Data Group, 1979]**.

Selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diagnostic du diabète peut être confirmé dans quatre situations différentes **[Alberti et Zimmet, 1998]**:

1. Présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement);
2. Glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/L (7,0 mmol/L);
3. Glycémie mesurée au hasard $\geq 2,00$ g/L (11,1 mmol/L);
4. Glycémie deux heures après ingestion de 75 g de glucose (test d'hyperglycémie provoquée orale, HGPO) $\geq 2,00$ g/L (11,1 mmol/L).

Le diabète entraîne un désordre métabolique glucidique, lipidique et protéique. Ces désordres métaboliques sont le résultat d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées, ce qui entraîne une hausse du taux de glucose sanguin.

Le diabète représente un problème majeur de santé publique partout dans le monde. La fédération internationale du diabète (IDF) a évalué à 425 millions le nombre des patients diabétiques en 2017 **[IDF Atlas, 2017]**. Selon les estimations de l'IDF, le nombre de diabétiques pourrait dépasser 600 millions à l'horizon de 2045, devenant ainsi l'une des principales causes d'invalidité et de décès dans le monde **[IDF Atlas, 2017]**. Par ailleurs, 352

millions de personnes souffrant d'intolérance au glucose ont un risque élevé de développer le diabète [IDF Atlas, 2017].

2-Classification des diabètes

La classification étiologique de l'association américaine du Diabète (ADA) et de l'OMS établie en 1997 distingue différents types de diabète qui sont regroupés dans le tableau 1 :

Tableau 1: Classification étiologique du diabète sucré [ADA, 1997]

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

3-Régulation physiologique de la glycémie

Le glucose est la molécule énergétique essentielle des cellules. Sa dégradation au cours de la respiration cellulaire permet de fournir de l'énergie sous forme de molécules d'ATP. Le glucose sanguin a deux origines: une origine exogène représentée par les apports alimentaires et une origine endogène constituée essentiellement par les réserves de glycogène hépatique et musculaire. Au niveau hépatique, le glucose peut se former également via la voie de la néoglucogenèse à partir des molécules telles que le lactate, le glycérol, et les acides aminés glucoformateurs [DeFronzo et Ferrannini, 1987; Cherrington et al, 1987; Nordlie et al, 1999].

L'insuline est l'hormone qui joue un rôle clé dans la régulation de la glycémie. Elle est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. L'insuline exerce son effet hypoglycémiant par l'inhibition de la néoglucogenèse et la stimulation de la glycogénogenèse. Ces effets stimulent le stockage du glucose sanguin par les tissus insulinosensibles (foie; muscle squelettique, et tissu adipeux). Ce transfert du glucose sanguin vers les tissus périphériques permet d'atteindre l'euglycémie qui, à son tour, inhibe la sécrétion de l'insuline déclenchée par l'hyperglycémie initiale [DeFronzo et Ferrannini, 1987; Cherrington et al, 1987; Nordlie et al, 1999].

D'autres hormones antagonistes de l'insuline telles que le glucagon, les catécholamines, les glucocorticoïdes, et les hormones thyroïdiennes interviennent également dans la régulation la glycémie. Le glucagon, sécrété par les cellules α pancréatiques, est la plus importante de ces hormones hyperglycémiantes. Il exerce son effet hyperglycémiant en stimulant la néoglucogenèse hépatique, en augmentant la glycogénolyse musculaire et hépatique, et en inhibant la glycolyse au niveau de plusieurs tissus [Nordlie et al, 1999]. Le foie joue un rôle principal dans le maintien de l'homéostasie glucidique; il est très sensible aux variations de la

glycémie, Quand celle-ci est basse, il libère le glucose dans la circulation sanguine et quand elle est élevée, il capte et stocke le glucose sous forme de glycogène [Cherrington et al, 1987; Nordlie et al, 1999].

4-Physiopathologie du diabète sucré

4-1 Diabète de type I

Le diabète de type I, également appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile, apparaît le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou chez le jeune adulte. Il se caractérise par une perte de poids, une sensation de soif et une sécrétion excessive d'urine (polyurie). La glycémie est supérieure à 2 g/l avec présence de corps cétoniques dans les urines [Atkinson & Eisenbarth et al, 2001].

Le diabète de type I représente 10 % des cas de diabète mondiaux [Daneman, 2006]. C'est une maladie auto-immune dans 90 % des cas, qui résulte d'une destruction progressive et chronique des cellules β pancréatiques. La destruction auto-immune des cellules β débute plusieurs années (5 à 10 ans voir plus) avant que les symptômes de la maladie apparaissent. La maladie apparaît lorsque il y'a destruction de 80 à 90 % des cellules β pancréatiques [Atkinson & Eisenbarth et al, 2001]. Une étiologie auto-immune est retrouvée dans 95 % des cas de diabète de type I. Les déterminants antigéniques des cellules β contre lesquels sont dirigés les anticorps sont principalement l'acide glutamique décarboxylase (GAD65) [Beakkeskov et al, 1990], un récepteur tyrosine phosphate protéine like appelé IA-2 pour «Islet antigen 2» ou encore appelé IC512 [Solemina et al, 1996] et l'insuline, IAA pour «insulin auto-antibody» [Khardori & Pauza, 2003].

4-2 Diabète de type II

Le diabète de type II ou diabète non insulino-dépendant est la forme de la maladie la plus fréquente puisqu'elle représente plus de 90 % des cas mondiaux. Ce type de diabète touche essentiellement les adultes après 40 ans **[King et al, 1998]**. Les mécanismes initiaux qui déclenchent ce type de diabète sont complexes et certainement multiples, c'est une maladie hétérogène où les facteurs génétiques et environnementaux agissent en concert **[Almind et al, 2001; Féry & Paquot, 2003]**. Les changements sociaux tels que la sédentarité, la baisse de l'activité physique et l'alimentation déséquilibrée et hypercalorique, et en conséquence l'obésité, sont des facteurs de risque qui favorisent le développement de ce type de diabète **[Peter-Riesch et al, 2002]**.

L'hyperglycémie des diabétiques de type II est la conséquence de deux grands mécanismes physiopathologiques (**Figure 1**). Le premier est l'insulino-résistance qui se définit par une diminution de la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline touchant les tissus périphériques comme le muscle, le foie et le tissu adipeux **[Féry & Paquot, 2003]**. Cette résistance découle d'une altération de la voie de signalisation de l'insuline qui toucherait notamment le nombre de récepteurs à insuline et/ou leur affinité pour l'hormone et le nombre de transporteurs membranaires dépendants de l'insuline qui permettent l'entrée du glucose dans les cellules **[Dagogo & Santiago, 1997; Féry & Paquot, 2003]**.

La mise en place de l'insulino-résistance serait liée à des hautes concentrations d'acides gras qui sont libérés par les tissus adipeux dans la circulation. Ces acides gras sont ensuite oxydés dans les tissus périphériques en Acétyl coenzyme A, en diacylglycérol et en céramides, ce qui entraîne l'augmentation d'une isoforme d'une protéine kinase C, cette kinase phosphoryle le récepteur IRS-1 sur les acides aminés sérine et thréonine, ce qui a pour conséquence d'inhiber la phosphorylation de la tyrosine qui est requise pour la libération de l'insuline. Ainsi, la

transduction des vésicules renfermant le transporteur GLUT4 est inhibée et le glucose circulant ne peut pas entrer dans les cellules [Schulman, 2000].

Le deuxième mécanisme consiste en une anomalie de l'insulino-sécrétion. Suite à l'hyperglycémie, le pancréas va s'adapter en augmentant la masse des cellules β fonctionnelles (hyperplasie des îlots) visant à produire et à libérer plus d'insuline dans la circulation. Ce qui conduit à un hyperinsulinisme qui permet dans un premier temps de maintenir une glycémie normale [Féry & Paquot, 2003]. A terme, la production d'insuline s'épuise en raison d'une glycémie de plus en plus difficile à équilibrer et par l'entrée en apoptose des cellules β , ce qui conduit à l'insulino-déficience.

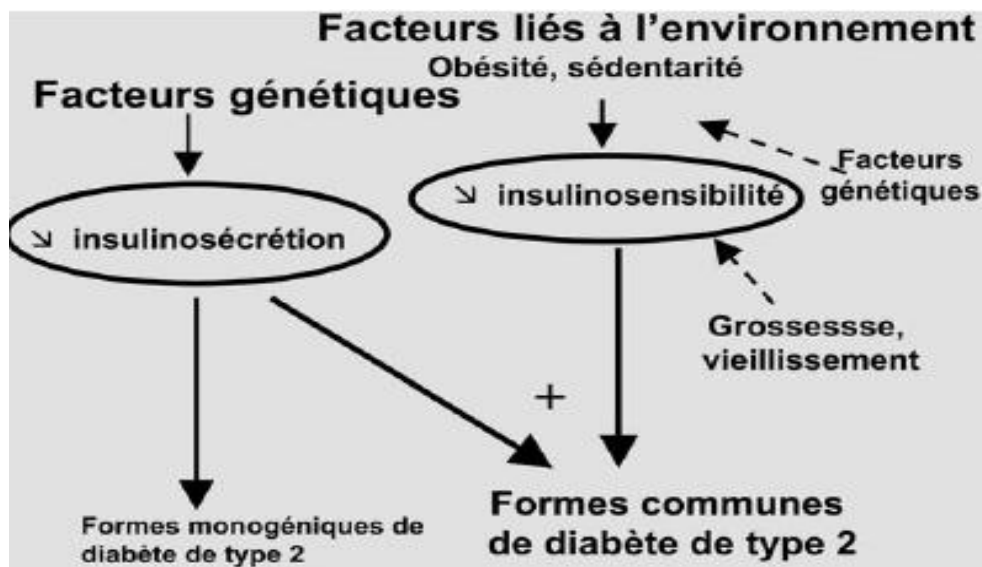


Figure 1: Physiopathologie du diabète de type 2 (Guillausseau et Laloi-Michelin, 2003)

5-Complications du diabète

Les complications du diabète sont souvent graves et sont de deux types: des complications aiguës qui sont très répandues dans le diabète de type 1 et d'autres chroniques qui se manifestent surtout chez les personnes atteintes du diabète de type 2 [Capet et al., 1999].

Les complications métaboliques aiguës du diabète comprennent l'acidocétose diabétique, le syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire et l'acidose lactique **[Orban et Ichai, 2008]**. Ces complications se produisent le plus souvent, en cas d'erreurs thérapeutiques ou d'un défaut de surveillance de la glycémie. Leur prévention est possible si l'équilibre glycémique est bien maintenu.

Les complications dégénératives apparaissent après une évolution chronique de la maladie. Ces complications se divisent en fonction du calibre des vaisseaux sanguins en macro-angiopathies et en micro-angiopathies.

Le diabète représente un facteur de risque majeur de plusieurs formes de maladies cardiovasculaires. De même, la coronopathie se développe à un âge plus jeune dans la population diabétique **[Nathan,1993]**. Le dysfonctionnement endothélial et les dyslipidémies athérogènes sont aussi associés au diabète **[Assman et al, 1999]**. Les hypothèses suggèrent que l'hyperglycémie chronique induit l'activation de plusieurs voies métaboliques au niveau des tissus sensibles au glucose, tels que la rétine, le rein et les nerfs **[Brownlee, 2001; Clark et Lee, 1995]**. Une augmentation du taux de glucose active des voies métaboliques telles que la voie d'aldose réductase, la formation des produits terminaux de glycosylation avancé (advanced glycation end products), l'activation de certaines isoformes de la protéine kinase C et une stimulation de la voie d'héxosamine. Ces altérations peuvent déclencher l'œdème, l'ischémie, la néovascularisation de la rétine provoquée par l'hypoxie, la protéinurie, l'expansion de la matrice mésangiale, la sclérose glomérulaire du rein et la dégénération multifocale des axones des nerfs périphériques **[Brownlee, 2001]**. Ces perturbations sont à l'origine de l'apparition des pathologies telles que la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. En outre, les complications liées au diabète sont souvent associées à un stress oxydant non contrôlé, qui résulte d'une production excessive de radicaux libres **[Ceriello, 2006]**.

L'activité des radicaux libres peut induire la peroxydation lipidique qui, par la suite, stimule la glycation des protéines, l'inactivation des enzymes antioxydantes et l'altération de la structure et la fonction des biomembranes, jouant ainsi un rôle crucial dans les complications à long terme du diabète **[Ceriello, 2006]**. En parallèle, les défenses antioxydantes sont souvent abaissées chez les diabétiques, aggravant ainsi le stress oxydant **[Boynes JW, 1991]**.

6- Thérapies du diabète

Le traitement du diabète a pour but d'éviter ou de retarder les complications aiguës et chroniques liées à l'évolution de la maladie en contrôlant la glycémie et en évitant l'hyperinsulinisme. Le traitement médicamenteux à lui seul n'est pas suffisant, des mesures hygiéno-diététiques sont également nécessaires, notamment une activité physique régulière et une alimentation équilibrée.

6-1 Diététique et hygiène de vie

Le contrôle du diabète repose en premier lieu sur le contrôle de l'alimentation ainsi que la pratique régulière de l'activité physique. La prise en charge des patients diabétiques doit commencer par des mesures nutritionnelles. Dans le diabète de type 1, elle permet de standardiser les quantités de glucides qui seront apportées à chaque repas pour ne faire varier que les quantités d'insuline **[Hayes et al, 2008]**. Dans le diabète de type 2, elle a pour but de limiter les facteurs nutritionnels favorisant l'insulinorésistance. Les mesures diététiques ont pour objectifs de réduire les épisodes d'hyperglycémie qui représentent un facteur de complications microangiopathiques, ainsi que la diminution de l'influence des facteurs alimentaires qui favorisent l'athérosclérose.

La pratique d'une activité régulière et adaptée aux possibilités de chaque patient (au moins trente minutes par jour d'activité physique d'intensité modérée, comme la marche) permet

d'améliorer le contrôle glycémique par une augmentation de la sensibilité à l'insuline. La pratique de l'exercice physique associée à une prise en charge diététique retarde la survenue et la progression des complications chroniques du diabète. Lorsque les mesures hygiéno-diététiques ne suffisent pas à contrôler la glycémie, l'introduction d'un traitement médicamenteux devient nécessaire [Hayes et al, 2008].

6-2 Insulinothérapie

L'insulinothérapie est destinée principalement aux patients diabétiques de type 1 mais aussi aux patients diabétiques de type 2. Le pancréas étant incapable de produire l'insuline dans le cas du diabète de type 1, la survie des malades dépend entièrement d'injection quotidienne de cette hormone, d'où son nom de diabète insulino-dépendant. Les personnes atteintes du diabète de type 2 peuvent avoir recours à l'insuline lorsque les mesures hygiéno-diététiques et les antidiabétiques oraux ne permettent pas d'atteindre l'équilibre glycémique. Le recours définitif à l'insulinothérapie devient obligatoire en cas de contre indications à la poursuite du traitement par les antidiabétiques oraux (insuffisance rénale, hépatique...) [Bosquet et Hartemann-Heurtier, 2004].

6-3 Traitements oraux du diabète de type 2

Lorsque les règles hygiéno-diététiques ne sont pas suivies ou insuffisantes, un traitement médicamenteux peut devenir nécessaire. Les médicaments antidiabétiques agissent par différents mécanismes d'actions: diminution de l'absorption de glucose, augmentation de la sécrétion de l'insuline ou augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline, [Krentz et al, 2005]. Plusieurs familles d'antidiabétiques oraux existent (**Figure 2**). Dans le cas du diabète de type II, une insulinothérapie est parfois nécessaire en complément du traitement oral, surtout après quelques années d'évolution de la maladie quand le malade devient insulino-nécessitant. En général, il existe 5 classes d'antidiabétiques oraux :

6-3-1 Biguanides

La metformine est le seul représentant de la famille des biguanides. Elle agit principalement au niveau du foie en augmentant la sensibilité des tissus à l'insuline et en diminuant la production hépatique de glucose par inhibition de la néoglucogenèse. Elle possède aussi un effet anti-lipolytique en inhibant la synthèse des acides gras libres. La metformine augmente également la captation de glucose par le muscle et les adipocytes en stimulant, d'une part, la translocation ou la synthèse des transporteurs du glucose (Glut1 et Glut4) et, d'autre part, en favorisant la synthèse de glycogène [Schäfer, 1983].

6-3-2 Glitazones (pioglitazones, rosiglitazones)

Les glitazones constituent une classe d'hypoglycémiants oraux apparues au début des années 2000 et sont représentés par la rosiglitazone et la pioglitazone. Ces molécules stimulent les récepteurs nucléaires PPAR γ . Il en résulte une induction de la différenciation adipocytaire, une augmentation du stockage des acides gras libres dans les tissus adipeux et une sécrétion plus importante d'adiponectine, et moindre d'adipokines. Ces effets pharmacologiques augmentent l'utilisation périphérique de glucose (sensibilité à l'insuline) et réduisent l'accumulation d'acides gras libres dans les tissus [Bailey, 2000].

6-3-3 Sulfamides hypoglycémiants (Les sulfonylurées)

Les sulfonylurées agissent au niveau du canal potassique ATP dépendant (KATP), dans les cellules β du pancréas. Ces molécules inhibent ces canaux potassiques, ce qui modifie le potentiel de repos de la cellule, induisant une augmentation de calcium intracellulaire qui stimule la sécrétion d'insuline. Les sulfonylurées sont donc uniquement efficaces dans le cas où une fonction résiduelle des cellules β est présente [Skillman & Feldman, 1981].

6-3-4 Glinides:

Cette famille d'hypoglycémiants est représentée par la répaglinide et la natéglinide. Les glinides sont différents structurellement des sulfonylurées, mais agissent par le même mécanisme d'action dans des sites différents. Ils se caractérisent par leur très grande affinité vis-à-vis de leurs récepteurs et se détachent très rapidement de leur site de liaison. Ceci permet une stimulation plus rapide de la sécrétion d'insuline pendant un temps plus court [Wolffenbuttel et al, 1993; Schrand et al, 2000].

6-3-5 Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase

Ces molécules inhibent de façon réversible les α -glucosidases intestinales qui hydrolysent les polysaccharides, oligosaccharides et disaccharides en monosaccharides. Ils ralentissent ainsi l'absorption intestinale des glucides et diminuent l'hyperglycémie postprandiale, mais leur effet sur le contrôle de la glycémie à jeun est modéré par rapport aux autres hypoglycémiants oraux. Ces médicaments sont utilisés le plus souvent pour contrôler les hyperglycémies fonctionnelles postprandiales [Lardinois et al, 1983].

6-3-6 Inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2)

Ces molécules constituent une nouvelle classe d'antidiabétiques oraux. Elles induisent une glycosurie en inhibant la réabsorption du glucose et du sodium au niveau du tube contourné proximal du néphron (**figure 3**). Leur action hypoglycémiante, dépendante à la fois de la glycémie initiale et du débit de filtration glomérulaire. En outre, ils réduisent également la pression artérielle (PA) systolique et diastolique et le poids [Halimi, 2015].

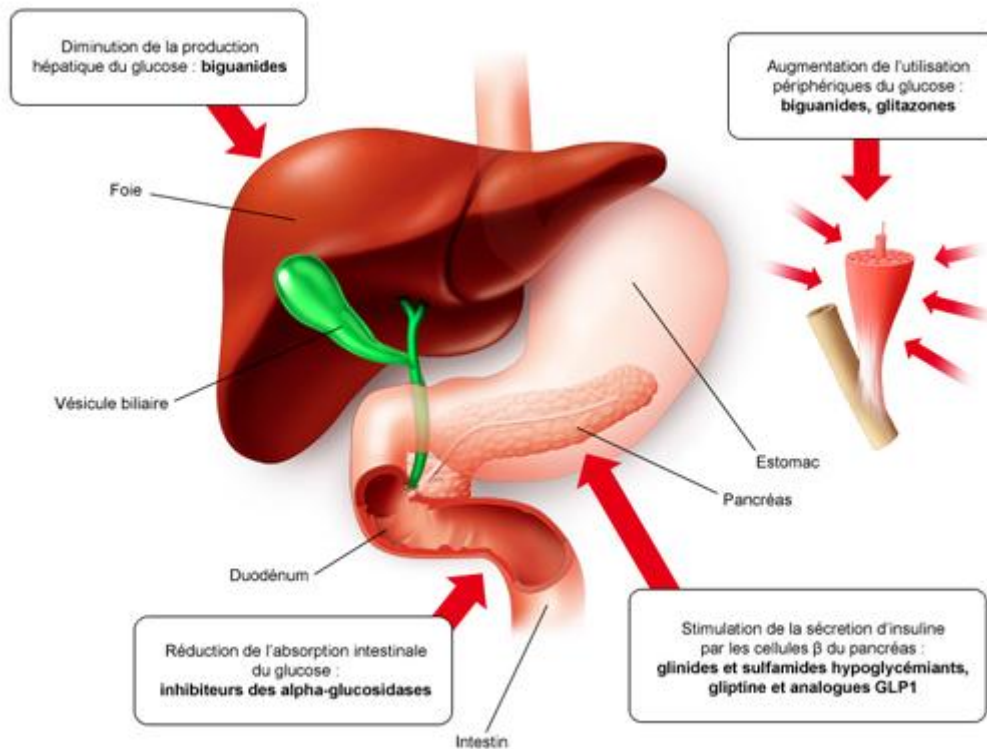


Figure 2: Voies d'action des différentes classes d'antidiabétiques oraux [Diabète sucré. Harrison Principes de Médecine Interne, Flammarion médecine (16^{ème} édition)].

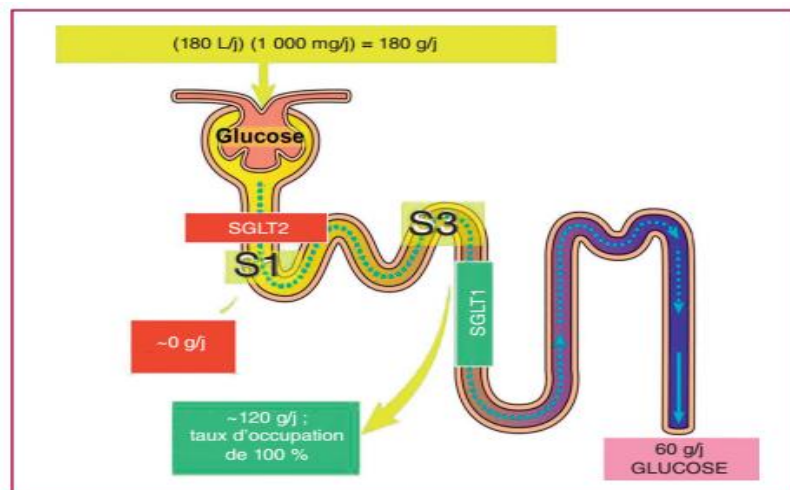


Figure 3: Réabsorption rénale du glucose en présence d'une inhibition complète du cotransporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2) [Halimi, 2015].

7- Phytothérapie du diabète

Depuis des temps immémoriaux, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales ont été le principal, voire l'unique recours de la médecine. Pour traiter certaines maladies aiguës et

chroniques, la phytothérapie est encore employée de manière alternative ou parallèle **[Governa et al, 2018]**.

Selon l'organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 80 % de la population mondiale surtout dans les pays en développement, utilisent essentiellement des remèdes traditionnels à base de plantes pour leurs besoins de santé et de soins primaires **[WHO, 2008]**. Au 21^{ème} siècle, malgré les avancées de la chimie de synthèse, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays industrialisés sont extraits à partir des plantes **[Newman et al., 2000]**.

Plusieurs enquêtes ethno-pharmacologiques et ethnobotaniques ont été menées à travers le monde pour recenser les plantes antidiabétiques utilisées dans les différentes pharmacopées traditionnelles. Ces enquêtes ont identifié plus de 1123 espèces expérimentées contre le diabète. Ces plantes représentent 725 genres et 183 familles **[Bailey et Day, 1989; Marles et Farnsworth, 1995]**.

Au Maroc, les plantes médicinales n'ont jamais été totalement abandonnées et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante. Les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement de plusieurs maladies, y compris le diabète, mais ces remèdes traditionnels restent limités aux patients et aux herboristes. L'évaluation de l'effet antidiabétique de ces plantes et la recherche de nouveaux principes actifs est une voie prometteuse de recherche de nouveaux médicaments antidiabétiques.

Au Maroc, plusieurs enquêtes ethno-pharmacologiques ont été réalisées afin d'évaluer l'importance de l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète. Ces enquêtes ont couvert la totalité du Royaume **[Bellakhdar; 1991]**, ou les différentes régions pouvant présenter diverses composantes socioéconomiques du pays: Maroc oriental et central **[Jouad et al, 2001; Marzouki et al, 2000; Ziyyat et al, 1997]**, nord du Maroc (Taounate)

[El-Hilaly et al, 2003] et Sud-est (Tafilalet) [Eddouks et al, 2007]. Le tableau 2 regroupe une liste non exhaustive des plantes antidiabétiques utilisées en médecine traditionnelle Marocaine, et dont l'activité antidiabétique a été évaluée expérimentalement sur des modèles animaux.

Tableau 2: Principales plantes antidiabétiques utilisées en médecine traditionnelle Marocaine

Non scientifique	Nom vernaculaire	Partie utilisée	Modèle animal d'étude	Référence
<i>Ajuga iva</i>	Chendgora	Partie aérienne	STZ	[El Hilaly et al, 2002]
<i>Ammi visnaga</i>	Bachnikha	Fruit	STZ	[Jouad et al, 2002]
<i>Ammoïdes pusilla</i>	Nounoukha	Partie aérienne	STZ	[Bnouham et al, 2010]
<i>Anabasis aretioides</i>	Sella	Partie aérienne	STZ	[Farid et al, 2017]
<i>Arbutus unedo</i>	Sasnou	racines	STZ	[Bnouham et al, 2010]
<i>Buxus sempervirens</i>	Baks	Feuilles	STZ	[Ajbli et al, 2017]
<i>Calamintha officinalis</i>	Menta	Partie aérienne	STZ	[Lemhadri et al, 2004]
<i>Capparis spinosa</i>	Kebbar	Fruit	STZ	[Eddouks et al, 2004]
<i>Carum carvi</i>	Karwiya	graines	STZ	[Eddouks et al, 2004]
<i>Chamaemelum nobile</i>	Baboungue	Partie aérienne	STZ	[Eddouks et al, 2005]
<i>Coriandrum sativum</i>	Kasbour	Partie aérienne	Meriones shawi (DT2)	[Aissaoui et al, 2011]
<i>Eucalyptus globulus</i>	Kalitous	Feuilles	STZ	[Eddouks et al, 2004]
<i>Fraxinus excelsior</i>	L'ssane l'ousfour	graines	STZ	[Eddouks et al, 2004]
<i>Globularia alypum</i>	Ain Larneb	Feuilles	Alloxan	[Jouad et al, 2002]
<i>Inula viscosa</i>	Trehla	Partie aérienne	STZ	[Zeggwagh et al, 2006]
<i>Lepidium sativum</i>	Hab arrachad	graines	STZ	[Eddouks et al, 2005]
<i>Ocimum basilicum</i>	Lahbak albaldi	Partie aérienne	STZ	[Zeggwagh et al, 2007]

<i>Origanum vulgare</i>	Zaatar	Feuilles	STZ	[Lemhadri et al, 2004]
<i>Retama raetam</i>	R'tm	Feuilles	STZ	[Maghrani et al, 2003]
<i>Rubus fruticosus</i>	Toute chaouki	Feuilles	STZ	[Jouad et al, 2002]
<i>Ruta Montana</i>	Fijel	Partie aérienne	STZ	[Omar Farid et al, 2017]
<i>Silybum marianum</i>	Chouk J'mal	Partie aérienne	STZ	[Eddouks et al, 2004]
<i>Spergularia purpurea</i>	Zahrat arrimal	Partie aérienne	STZ	[Jouad et al, 2000]
<i>Tamarix articulata</i>	El aadba	Partie aérienne	STZ	[Hebi et al, 2017]
<i>Thymelaea hirsuta</i>	Matnan	Partie aérienne	STZ	[Bnouham et al, 2012]
<i>Triticum repens</i>	N'jm L'bouri	Feuilles	STZ	[Eddouks et al, 2005]
<i>Urtica dioica</i>	Harrigua	Partie aérienne	Alloxan	[Bnouham et al, 2003]
<i>Zygophyllum gaetulum</i>	Aggaya	Partie aérienne	Alloxan	[Jaouhari et al, 2000]

8- Modes d'action des plantes médicinales

Les études pharmacologiques ont permis d'élucider plusieurs mécanismes d'action des plantes médicinales ayant un effet antidiabétique. Les plantes médicinales ou leurs extraits utilisés dans le traitement du diabète peuvent agir par différents mécanismes en raison de la présence d'une grande variété de classes chimiques et de constituants hypoglycémiantes [Jarald et al., 2008; Kashikar et Kotkar, 2011; Singh et al., 2012]. Parmi ces mécanismes, on cite:

- stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β et/ou induction également de leur régénération ou en mimant l'action de l'insuline.
- stimulation des cellules β par l'apport d'éléments nécessaires à leur fonctionnement (Cu^{++} , Mg^{++} , Ca^{++}), et également par la revitalisation et/ou l'hyperplasie de ces cellules.

- diminution de la sécrétion du glucagon en induisant une diminution de l'absorption intestinale du glucose et/ou une augmentation de l'utilisation périphérique du glucose.
- régulation de l'activité des enzymes hépatiques en stimulant la glycogénogenèse et/ou l'inhibition de la glycogénolyse.
- action inhibitrice sur les enzymes digestives telles que l' α -amylase et l' α -glucosidase, ce qui réduit la dégradation de l'amidon et des oligosaccharides, par conséquent, elles agissent par une réduction de l'absorption du glucose au niveau intestinal.
- modification des mécanismes de réabsorption rénale du glucose au niveau du tube contourné proximal, ce qui a été démontré pour la phloridzine [Ehrenkranz et al., 2005].
- inhibition des transporteurs du glucose au niveau de la barrière intestinale limitant ainsi l'absorption intestinale du glucose, ou par stimulation de la captation du glucose par les adipocytes ou les cellules musculaires.

9- Principes actifs antidiabétiques des plantes médicinales

Les métabolites naturellement présents dans la plante sont les principes actifs qui lui confèrent son activité thérapeutique. Ces métabolites secondaires sont souvent présents en quantité extrêmement faible. Les plantes constituent une source inépuisable de substances pharmacologiques (alcaloïdes, polyphénols, terpènes, polysaccharides, etc.) qui confèrent des propriétés pharmacologiques appréciables. Ainsi, sur 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, plus de 11 % sont exclusivement produits à partir des plantes médicinales [Rates, 2001].

9-1 Alcaloïdes

Plusieurs alcaloïdes isolés à partir des plantes médicinales ont montré une action hypoglycémiante. Les alcaloïdes isolés de *Tinospora cordifolia* tels que la palmatine, la jatrorrhizine et la magnoflorine stimulent la sécrétion d'insuline et inhibent la néoglucogenèse *in vitro* [Patel et al, 2012]. La berbérine, un autre alcaloïde extrait de *Tinospora cordifolia*, possède une activité hypoglycémiante *in vitro* sur les cellules caco-2. Son mécanisme d'action est dû en partie à l'inhibition de l' α -glucosidase et à la diminution du transport du glucose à travers la barrière intestinale [Pan et al., 2003]. Les alcaloïdes totaux isolés à partir de *Catharanthus roseus* tels que: la catharanthine, la vindoline et la vindolinine ont montré aussi un effet hypoglycémiant *in vitro* [Tiong et al, 2013] et *in vivo* chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine [Zhang et al, 2016]. Il a été démontré que les composés suivants: l'harmane, le norharmane, le pinoline et les beta-carbolines possèdent une action insulinosécrétrice par l'activation de l'imidazoline I3, site de fixation au niveau des cellules β pancréatiques humaines [Cooper et al, 2003]. Ces composés stimulent la sécrétion d'insuline à partir des îlots de Langerhans isolés en se fixant sur le récepteur imidazoline I3, entraînant une augmentation du calcium intracellulaire et une stimulation de la sécrétion d'insuline [Cooper et al, 2003].

9-2 Polyphénols

Diverses études expérimentales ont mis en évidence l'activité hypoglycémiante de certains polyphénols [Hanhineva et al, 2010; Kim et al, 2016]. Il a été rapporté que l'administration d'acide caféique ou isoférulique par voie intraveineuse entraîne une diminution de la glycémie au cours du test de tolérance au glucose chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (diabète de type 1) ou chez les rats génétiquement insulino dépendants (diabète de type 2) [Hsu et al., 2000; Liu et al., 1999]. Par ailleurs, l'acide 4-hydroxybenzoïque et les

anthocyanes administrés oralement réduisent le pic de glycémie chez les rats soumis à une charge de glucose ou à un régime riche en maltose [Peungvicha et al., 1998; Matsui et al., 2002; Sabu et al., 2002].

Des études suggèrent que les polyphénols pourraient agir par l'inhibition des glucosidases ou des transporteurs de glucose au niveau de la barrière intestinale, ce qui réduirait ainsi l'absorption intestinale du glucose [Matsui et al., 2007]. Il a été démontré que les flavonoïdes empêchent l'entrée du glucose en inhibant ses transporteurs GLUT 1, GLUT 2 et SGLT 1 [Martin et al., 2003, Kwon et al, 2007; Kobayashi et al, 2000].

D'autre part, des études suggèrent que les polyphénols exercent leur effet hypoglycémiant par augmentation de la captation du glucose par les tissus périphériques. Ainsi, des cellules musculaires (C2C12), ou des hépatocytes résistants à l'insuline (FL83B) mises en culture en présence d'acide caféique ou d'acide cinnamique ont montré une augmentation de l'absorption du glucose [Cheng et Liu, 2000; Huang et al, 2009]. La quercétine et le kaempférol isolés à partir de *Euonymus alatus* stimulent la captation du glucose par les adipocytes (3T3-L1) [Fang et al, 2008].

L'acide férulique, à des doses faibles, réduit de façon significative l'hyperglycémie chez les souris rendues diabétiques par la streptozotocine (le diabète de type 1) et chez les souris KK-Ay (diabète de type 2) [Ohnishi et al., 2004]. Des composés amides dérivés de l'acide férulique ont montré un effet stimulant de sécrétion d'insuline *in vitro* chez des cellules RIN-5F pancréatiques du rat [Nomura et al., 2003].

La quercétine administrée par voie intrapéritonéale réduit la glycémie des rats diabétiques. Elle diminue également le taux de glucose sanguin chez des rats diabétiques soumis à une charge de glucose [Vessal et al., 2003]. La quercétine réduit significativement les taux de cholestérol et des triglycérides plasmatiques et augmente l'activité des glucokinases

hépatiques probablement par l'augmentation de la sécrétion d'insuline, à partir des îlots pancréatiques des rats diabétiques [Vessal et al., 2003].

L'activité antihyperglycémiant des proanthocyanidines est due à leur effet insulinomimétique d'une part et d'autre part à l'augmentation de l'utilisation du glucose au niveau des cellules insulinosensitives *in vitro* [Pinent et al., 2004].

La naringénine a montré également un effet hypoglycémiant chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine [Annadurai et al., 2012]. Elle stimule également l'absorption du glucose par les cellules musculaires *in vitro* [Zygmunt et al., 2010]. L'épicatéchine, isolé à partir de *Cassia fistula*, possède un effet «insuline-like» [Daisy et al., 2010]. Cette molécule peut aussi protéger les cellules β des effets toxiques de la streptozotocine [Kim et al., 2003].

9-3 Triterpènes

Les triterpènes sont des molécules bioactives présentes naturellement dans plusieurs plantes ayant montré diverses activités pharmacologiques [Nazaruk and Borzym-Kluczyk, 2015]. Divers triterpènes isolés à partir des plantes telles que *Fagus hayatae*, *Euclea undulate* et *Lagerstroemia speciosa* ont montré des effets inhibiteurs de l' α -glucosidase [Lai et al. 2012, Deutschländer et al. 2011, Hou et al., 2009]. Les triterpènes isolés à partir de *Protium heptaphyllum* tels que α -amyrin, β -amyrin, l'acide oléanolique et l'acide maslinique ont montré un effet hypoglycémiant chez différents modèles animaux de diabète [Santos et al, 2012; Wang et al, 2011; Liu et al, 2007]. Des études *in vitro* ont montré que des triterpènes isolés à partir de *Momordica charantia* stimulent la sécrétion d'insuline et la translocation des récepteurs GLUT4 au niveau membranaire [Keller et al, 2011; Tan et al, 2008].

9-4 Polysaccharides

Divers polysaccharides isolés à partir de *Taxus cuspidata*, *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia streptacantha* ont montré un effet antihyperglycémiant chez les rats rendus diabétiques par la STZ et l'alloxane [Alarcon-Aguilar et al, 2003; Zhang et al; 2012]. Un polysaccharide isolé à partir du fruit de *Cucurbita moschata* inhibe de façon non compétitive l' α -glucosidase [Song et al, 2012]. Un autre polysaccharide isolé à partir du potiron (*Cucurbita maxima*) a montré une activité antihyperglycémiant chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane [Quanhong et al., 2005]. Son mécanisme d'action est dû en partie à la stimulation de la sécrétion d'insuline [Quanhong et al., 2005].

9-5 Polypeptides et acides aminés

Certaines de ces molécules exercent des effets hypoglycémians qui peuvent être bénéfiques dans le traitement du diabète. Parmi ces peptides, on peut citer le peptide (MC2-1-5) isolé à partir de *Momordica charantia* [Yuan et al, 2008], le glycopeptide isolé du ginseng [Wang et al, 2003] et S-allyl cysteine sulfoxide isolé à partir d'*Allium sativum* [Saravanan et al, 2009].

Cette liste des composés de divers groupes chimiques présentée ci-dessus n'est pas exhaustive, les plantes médicinales renferment d'autres molécules qui peuvent également avoir une activité hypoglycémiant.

10- Modèles animaux du diabète expérimental

Afin d'étudier l'étiologie du diabète et en raison de la gravité de ses complications métaboliques et dégénératives, l'utilisation de modèles expérimentaux s'avère nécessaire d'une part pour la compréhension de la genèse et des complications de cette pathologie et d'autre part pour tester des substances et des nouveaux principes actifs pouvant avoir un effet sur ces désordres. Durant ces dernières années, plusieurs modèles de diabète expérimental ont été mis

au point, notamment chez le rat et la souris. L'induction du diabète chez les modèles animaux se fait soit spontanément, soit par induction chirurgicale, chimique, ou encore par sélection ou par génie génétique. Dans la section suivante, quelques modèles seront brièvement présentés [Cefalu, 2006; Shafrir & Sima, 2003].

10-1 Modèles animaux de diabète spontané

La plupart de ces modèles sont étudiés pour leur spontanéité à développer un diabète de type II [Shafrir, 1992 ; Shafrir & Sima, 2003; Flatt et al, 1990]. Il s'agit de:

- La souris ob/ob: La maladie se transmet selon un mode autosomal récessif, l'hyperphagie secondaire à une déficience en leptine provoque une hyperinsulinémie et l'hyperglycémie apparaît secondairement à l'insulino-résistance.
- La souris obèse "yellow mice": Le mode autosomal de transmission est dominant, l'obésité et l'hyperinsulinémie sont liées à une hypertrophie des adipocytes; une intolérance au glucose induit une hyperglycémie postprandiale.
- La souris NZO (New Zealand Obese) : La maladie est de type polygénique, la souris est obèse et présente une légère hyperglycémie et une hyperinsulinémie.
- La souris KK (japonaise) diabétique: l'hyperphagie et l'obésité modérée chez la souris provoque l'apparition du diabète.

10-2 Modèles animaux de diabète induit par inoculation de virus

L'exemple le plus connu est l'infection de la souris par le virus EMC (Encephalomyocarditis). Ce virus détruit les cellules β entraînant l'apparition du diabète. L'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule β hôte provoque une perturbation des fonctions de ces cellules et notamment de la synthèse et de la sécrétion d'insuline [Utsugi et al, 1992].

10-3 Modèles animaux de diabète induit par pancréatectomie

La méthode de pancréatectomie chirurgicale réalisée chez le rat permet une ablation de 90% du pancréas endocrine. L'hyperglycémie apparaît 6 à 7 semaines après la pancréatectomie. Les animaux présentent aussi une intolérance au glucose [Rossetti et al, 1987].

10-4 Modèles transgéniques

Des modèles animaux de diabète peuvent aussi être obtenus par des techniques de génie génétique. Le modèle le plus utilisé est le rat Zucker. Il présente une obésité, une insulino-résistance, une hyperinsulinémie, une hyperlipidémie mais une glycémie normale. Son pancréas est hypertrophique, hyperplasique et hypersécrétoire [Peterson et al, 1990].

10-5 Modèles animaux de diabète induit par le régime alimentaire

Ces modèles ont permis de mettre en évidence le rôle de l'alimentation hypercalorique associée à un manque d'activité physique dans la genèse du diabète.

- La souris Spiny (*Acomys chirinus*). Cet animal vit dans les régions désertiques et semi-désertiques autour du bassin méditerranéen. Un régime de laboratoire riche en sucrose provoque chez cette souris une réduction des enzymes de la glycolyse, une réduction de la lipogenèse qui entraîne une hyperlipidémie, une intolérance au glucose, et une hyperinsulinémie, mais ne provoque pas d'hyperglycémie ni d'obésité.

Un régime riche en lipides induit une obésité, une hyperinsulinémie, une augmentation du glucagon plasmatique, une intolérance au glucose, avec une hyperglycémie mais n'affecte pas la sécrétion d'insuline [Rabinovitch et al, al. 1975].

- Le rat des sables (*Psammomys obesus*). Dans son milieu naturel, cet animal se nourrit de plantes salées pauvres en calories. Ces animaux deviennent obèses et développent un diabète

de type II à partir du 3^{ème} mois lorsqu'ils sont soumis à un régime standard de laboratoire associé à une réduction de leur l'activité **[Shafrir et al. 1993]**.

10-6 Modèles animaux induits par des substances chimiques

Les substances les plus utilisées sont l'alloxane et la streptozotocine. L'action cytotoxique de ces deux agents diabétogènes vis-à-vis des cellules β fait intervenir des espèces réactives de l'oxygène, mais les mécanismes d'actions de ces deux molécules sont différents **[Wilson et al., 1984]**.

L'acide dialurique, produit de la dégradation de l'alloxane exerce une activité cytotoxique sur les cellules β par la génération d'un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes. Ces radicaux provoquent la destruction rapide des cellules β **[Wilson et al., 1984]**.

La streptozotocine induit un diabète chez l'animal non prédisposé. Les mécanismes impliqués dans la destruction des cellules β ne sont toujours pas déterminés de façon précise. Certains chercheurs suggèrent une réaction auto-immune à médiation cellulaire, d'autres en faveur d'une toxicité directe provoquant l'insulite. L'un des mécanismes suggéré est l'altération de la structure de l'ADN par la streptozotocine, cette dernière traverse la membrane des cellules β via le transporteur GLUT 2 et provoque l'alkylation de l'ADN. Cet effet induit l'activation de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et la libération de l'oxyde nitrique. La nécrose cellulaire qui en résulte entraîne la destruction des cellules β **[Agarwal et al., 1980]**.

Le diabète est une maladie qui possède des traits pathologiques complexes et diversifiés. Ce qui explique la diversité des modèles expérimentaux disponibles pour l'étude de la genèse de cette pathologie. La mise au point de ces modèles a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie du diabète, notamment dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques **[Cefalu, 2006; Sima et Shafrir, 2001]**.

11- Etude toxicologique des plantes médicinales

Malgré l'utilisation généralisée des plantes médicinales pour les soins de santé dans les pays en développement, peu de données scientifiques concernant leur toxicité et leurs effets indésirables sont disponibles [Saad et al., 2006]. En fait, plusieurs études ont signalé que certaines plantes médicinales peuvent causer plusieurs formes de toxicité et effets nocifs. Ainsi, pour assurer la sécurité des plantes à usage thérapeutique, les études toxicologiques chez l'animal sont nécessaires pour prévoir les risques de toxicité et fournir des informations préliminaires pour sélectionner des doses thérapeutiques sûres chez l'Homme [Neergheen-Bhujun et al, 2013].

L'étude toxicologique a pour but de s'assurer de l'innocuité des plantes médicinales. Par ailleurs, elle doit aussi permettre la sélection des doses thérapeutiques et sans risques de toxicité.

La toxicité d'une substance peut être évaluée soit par l'étude de sa toxicité aiguë après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité chronique après administration répétée de la substance.

11-1 Toxicité aiguë (administration unique)

L'étude de la toxicité aiguë permet de déterminer la dose qui tue 50 % des animaux d'expérience ainsi que la dose maximale sans effet toxique.

11-1-1 La dose létale 50 : DL50

La dose létale 50 % (DL50) correspond à la dose de la substance qui provoque la mort de la moitié des animaux d'un lot homogène, dans un délai généralement court, fixé au minimum à sept jours et au maximum à quatorze jours. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien: mort ou survie des animaux.

La DL50 permet de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une substance, elle s'exprime en milligrammes de matière active par kilogramme de poids corporel de l'animal (mg/kg); plus ce chiffre est faible, plus la substance est toxique.

Différentes méthodes peuvent être employées pour l'étude de la toxicité aiguë d'une substance chimique; Méthode de Dragstedt et Lang ; Méthode de Karber et Behrens ; Méthode de Miller et Tainter; Méthode de Trevan; Méthode de Litchfield et Wilcoxon; Méthode selon la ligne directrice européenne de l'OCDE code 423. Parmi ces méthodes on décrit ci-dessus, la méthode de la ligne directrice européenne de l'OCDE code 423.

11-1-2 Méthode d'étude de la toxicité aiguë selon la ligne directrice Européenne de l'OCDE code 423.

La méthode de toxicité aiguë décrite dans la Ligne directrice Européenne code 423 est une méthode utilisant des animaux d'un seul sexe par étape [OCDE, 2001a]. La toxicité aiguë de la substance d'essai est évaluée selon la mortalité et/ou l'état moribond des animaux et nécessite en moyenne deux à quatre étapes d'expérimentation. Des doses prédéterminées sont utilisées dans cette méthode et les données obtenues permettent de classer la substance étudiée dans le Système de Classification Globalement Harmonisé (SCGH) de substances entraînant de la toxicité aiguë [OCDE, 2001b]. La détermination d'une valeur précise de la DL50 n'est pas visée par cette méthode. Son principal objectif vise à déterminer dans quel intervalle de doses la substance doit être considérée létale. Toutes les informations disponibles sur la substance d'essai et qui peuvent être utiles dans le choix de la dose initiale à administrer doivent être rassemblées avant de procéder à l'expérimentation. Ces données contiendront la nature et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques et les résultats obtenus dans tout autre essai de toxicité *in vitro* et *in vivo*. Les différentes doses de la substance sont administrées aux différents lots d'animaux dans un processus séquentiel.

L'absence ou l'apparition de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante. Ainsi, selon les résultats obtenus soit on procède à l'arrêt de l'essai ou à l'administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à un autre groupe d'animaux.

11-1-3 Nombre d'animaux et niveaux des doses

Pour chaque étape d'expérimentation, au moins trois animaux d'un seul sexe sont utilisés. La dose initiale choisie est celle pour laquelle on peut s'attendre à observer de la mortalité parmi quelques-uns des animaux traités. L'intervalle de temps entre l'administration des différentes doses est déterminé par le moment du début, la durée et la sévérité des effets toxiques observés. L'administration de la dose suivante ne doit être réalisée que lorsqu'on obtient la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu.

11-1-4 Observations

L'observation des animaux d'essai doit être réalisée au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures après le traitement. Une attention particulière est nécessaire pendant les premières 4 heures et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance.

Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

11-1-5 Poids corporel

La mesure du poids individuel de chaque animal doit être réalisée peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et ensuite une fois par jour. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées.

11-1-6 Présentation des résultats

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant pour chaque groupe d'essai:

- le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou tués pour des raisons humanitaires.
- pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques apparus chez les animaux et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité et les résultats de l'autopsie.

11-1-7 Calcul de la dose létale 50 : DL50

La détermination de la DL50 au cours des essais de la toxicité aiguë d'une substance permet l'évaluation du degré de sa toxicité selon l'échelle de Classification Globalement Harmonisée des substances chimiques [OCDE, 2001b]. La détermination de la DL50 se fait pour tout médicament nouveau, elle permet de caractériser le médicament par son degré de toxicité et d'évaluer les précautions à prendre lors de son usage en thérapeutique. Les substances chimiques sont classées suivant leur DL50 en 5 catégories:

$DL50 \leq 1 \text{ mg/kg}$	considérées comme très hautement toxiques
$1 \text{ mg} \leq DL50 \leq 50 \text{ mg/kg}$	hautement toxiques
$50 \text{ mg} \leq DL50 \leq 500 \text{ mg}$	moyennement toxiques
$500 \text{ mg} \leq DL50 \leq 1000 \text{ mg}$	faiblement toxiques ;
$1000 \text{ mg} \leq DL50 \leq 5000 \text{ mg}$	très faiblement toxiques.

11-2 Toxicité sub-chronique

L'étude de la toxicité sub-chronique permet la caractérisation du profil toxicologique d'une substance chez une espèce de Mammifère, à la suite d'une exposition prolongée et répétée. L'étude doit permettre la détection de la toxicité générale comprenant les effets neurologiques, physiologiques, biochimiques et hématologiques, ainsi que les effets morphologiques liés à l'exposition. La toxicité chronique désigne les effets qui apparaissent chez un animal de laboratoire à la suite d'une administration répétée d'un xénobiotique. C'est la toxicité qui apparaît après une période relativement longue. Les essais de toxicité chronique permettent de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques provoquées par administration répétée et d'établir leur apparition en fonction de la posologie.

La substance d'essai peut être administrée à travers trois voies principales qui sont l'ingestion orale, la pénétration cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des propriétés physiques et chimiques de la substance à tester. En principe, la voie d'administration doit tenir compte de celles prévues pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption.

Le choix des doses peut se baser sur les données des études de la toxicité aiguë qui peuvent permettre la sélection de trois niveaux de dose provoquant :

- Pour la dose forte des effets toxiques appréciables ;
- Pour la dose intermédiaire des effets toxiques minimales afin d'avoir si possible une relation dose-effets ;
- Pour la dose faible aucun effet toxique (mais l'effet pharmacodynamique ou thérapeutique souhaité), afin de pouvoir évaluer le niveau de dose sans effets.

11-2-1 Observations

Un examen clinique soigneux doit être pratiqué au moins une fois par jour. Des observations supplémentaires doivent être faites chaque jour en prenant des mesures appropriées pour réduire la perte d'animaux pour l'étude, par exemple en autopsiant ou en réfrigérant les animaux trouvés morts et en isolant ou en sacrifiant les animaux affaiblis ou moribonds. Il y a lieu de procéder à des observations minutieuses non seulement pour détecter l'apparition et la progression des effets toxiques, mais aussi pour minimiser les pertes dues aux maladies.

Les manifestations cliniques, en particulier neurologiques et oculaires, ainsi que la mortalité doivent être relevées pour tous les animaux. La date d'apparition et la progression des signes toxiques, y compris les tumeurs suspectées doivent être enregistrées.

Chaque animal sera pesé au moins une fois par semaine durant la période d'essai. La prise de nourriture sera déterminée hebdomadairement, sauf si l'état de santé ou les variations de poids corporel nécessitent d'autres dispositions.

11-2-2 Examens hématologique et biochimique

A la fin de la période d'essai, l'examen hématologique suivant est réalisé sur des prises de sang effectuées en cours d'essai, le cas échéant : hématoците, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes et des leucocytes, formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps de coagulation.

Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur chaque animal juste avant son sacrifice ou au cours de celui-ci. Il est recommandé de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang. Les analyses effectuées sur le plasma ou le sérum devraient inclure le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, l'azote uréique du sang, la créatinine, les concentrations totales de protéines et d'albumine et plus de deux enzymes indicatrices des effets

hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyle transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase). Des mesures d'enzymes supplémentaires (d'origine hépatique ou autre) et des acides biliaires, susceptibles de fournir des informations utiles dans certaines circonstances, peuvent également être incluses.

11-2-3 Examens anatomo-pathologique et histopathologique

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et les organes conservés des animaux appartenant au moins au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Une description complète de toutes les lésions visibles découvertes doit être réalisée à la suite de l'examen microscopique.

12-Présentation des plantes étudiées

En se basant sur les données des enquêtes enthno-pharmacologiques recensant les plantes antidiabétiques utilisées en médecine traditionnelle Marocaine, nous avons sélectionné deux plantes médicinales dont l'effet antidiabétique n'a pas été évalué expérimentalement: **le ciste ladanifère (*Cistus ladaniferus*)** et **le thym à feuille de sarriette (*Thymus satureioides*)** [Marzouki, 2003, Tahraoui et al, 2007]. Ces plantes sont successivement présentées à partir des données de la littérature.

12-1 *Cistus ladaniferus*

12-1-1 Description

C'est un arbuste très odorant, pouvant mesurer 60 cm à 2,50 m de hauteur, à rameaux glutineux. Les feuilles sont sessiles, ou courtement pétiolées, linéaires à lancéolées, allongées, et glabres en dessus, tomenteuses blanchâtres en dessous. Les fleurs sont blanches, très grandes, de 5-8 cm de diamètre, solitaires, courtement pédonculées, à pétales souvent ornés d'une tâche pourpre à la base; calice à 3 sépales; étamines très nombreuses; style très court; fruit en capsule à dix loges. La floraison s'effectue entre avril-juin.

12-1-2 Systématique



Figure 4: *Cistus ladaniferus*

La classification botanique place *Cistus ladaniferus* dans:

- **Règne:** Plantae
- **Sous-règne:** Tracheobionta
- **Division:** Magnoliophyta
- **Embranchement:** Angiospermae
- **Sous-embranchement:** Dicotylédones
- **Ordre:** Pariétales
- **Famille:** Cistacées
- **Genre:** *Cistus*
- **Espèce:** *Cistus ladaniferus*

L'espèce *Cistus ladaniferus* est connue sous le nom vernaculaire français "Ciste ladanifère" ou "ciste à gomme", Arabe (Marocain) "Touzzalt" ou "Argale".

12-1-3 Répartition géographique et écologie

Les Cistacées sont des arbustes aromatiques qui poussent souvent dans les régions aérées, ensoleillées et sur des sols sablonneux ou calcaires. Le genre *Cistus* comprend 16 espèces, qui sont particulièrement prédominantes dans la région méditerranéenne [Talavera et al., 1993]. Le ciste ladanifère ou ciste à gomme est une plante pérenne qui pousse principalement sur des sols calcaires et siliceux, avec des pH qui varient entre 3,6 et 6,2 et un taux en matière organique situé dans un intervalle de 0,46 à 6,96% [Demetzos et Loukis, 1995]; [Nunez-Olivera et al., 1996].

Le ciste ladanifère croît généralement en peuplements abondants dans les forêts claires de chêne vert ou de chêne liège dans des bioclimats subhumides et humides; variantes chaude et tempérée de 0 à 1500 m d'altitude, sur des sols calcaires, siliceux et gréseux superficiels. L'aire de répartition du ciste ladanifère couvre la France méditerranéenne, la péninsule

ibérique, l'Algérie occidentale et le Maroc. Cette espèce calcifuge est très répandue dans le Rif Marocain.

13-1-4 Phytochimie de *Cistus Ladaniferus*

Des études phytochimiques sur cette plante ont montré qu'elle est riche en composés phénoliques et contient une teneur importante en flavonoïdes [Barrajón-Catalán et al., 2011; Fernández-Arroyo et al., 2010]. Plusieurs groupes de composants phénoliques ont été identifiés, tels que l'acide ellagique et ses dérivés (punicalagin isomers, cornusiin B, ellagic acid-7-xyloside, and methylated ellagic acid-7-xyloside), Hexahydroxydiphenoyl et ses dérivés (hexahydroxydiphenoyl-D-glucoside, pédonculagine), Les acides phénoliques (acide gallic, isomères de glucogalline, glucoside de gentisoil, l'urralenneoside, la mirciaphenone B) et les flavonoïdes (quercétine diglycosides, méthyléther et Diméthyléther kaempferol, apigénine). Les feuilles de cette plante produisent également une oléorésine parfumée avec une forte odeur aromatique, le labdanum, qui est très appréciée dans l'industrie des parfums [Guimarães et al., 2009]. Des études ont rapporté que cette résine est très riche en polyphénols [Gomes et al., 2005; Robles et al., 2003].

12-1-5 Usage traditionnel et activités pharmacologiques

Cistus ladaniferus et d'autres espèces de Cistacées sont généralement utilisées en médecine traditionnelle dans la région méditerranéenne pour le traitement de plusieurs maladies cutanées, contre la diarrhée et comme agent anti-inflammatoire [Attaguile et al., 2000]. Au Maroc, cette plante est connue localement sous le nom de "Touzzalt" au nord ou "Argale" dans d'autres régions [Bellakhdar et al., 1991]. En médecine traditionnelle marocaine, le décocté des parties aériennes de cette plante est utilisé comme antidiarrhéique, antiacide, antidiabétique et antispasmodique [Bnouham et al., 2002; Merzouki et al., 2000].

Des études pharmacologiques ont montré que cette plante possède diverses activités biologiques. L'extrait aqueux a montré des activités anti-inflammatoire et analgésique chez les rats [El Hamsas et al., 2016]. Il a été démontré que cet extrait réduit également la pression artérielle systémique chez les rats hypertendus et induit un effet vasodilatateur sur l'aorte isolée du rat [Belmokhtar et al., 2009]. Il exerce aussi un effet antispasmodique sur le jéjunum isolé des rongeurs [Aziz et al., 2006]. De plus, l'extrait aqueux possède des propriétés anti-agrégantes plaquettaires [Mekhfi et al., 2004]. L'extrait phénolique de *Cistus ladaniferus* a également montré une activité antifongique contre plusieurs espèces de *Candida* [Barros et al., 2013]. Par ailleurs, les études *in vitro* ont démontré l'activité antioxydante des extraits de *Cistus ladaniferus* [Amensour et al., 2010; Barrajon-Catalan et al., 2010]. Les extraits aqueux et organiques de la plante ont montré une activité antibactérienne contre des bactéries Gram-positives [Barrajon-Catalan et al., 2010; Ferreira et al., 2012]. Enfin, des études ont rapporté également une activité cytotoxique contre plusieurs cellules cancéreuses humaines [Andrade et Al., 2009; Barrajon-Catalan et al., 2010].

12-2 *Thymus satureioides*

12-2-1 Description

Le *Thymus satureioides* Coss. (Figure 4) est une espèce endémique du Maroc [Bellakhdar 1997 ; Benabid, 2000]. Elle est connue sous les noms vernaculaires suivants : «izukni », « tazuknit »; en arabe «Zaitra» et en français «Thym-sarriette du Maroc».



Figure 5: *Thymus satureioides*

Le *Thymus satureioides* Coss est un arbrisseau érigé, qui peut atteindre 60 cm de hauteur, très rameux, aux feuilles spatulées, inflorescences en glomérules lâches, à la corolle rose ou rose très pâle. Il peuple les Haut-Atlas et Anti-Atlas, sous des bioclimats arides et subhumides à variantes chaudes et fraîches et au niveau des étages de végétations infra-méditerranéen et Méso-méditerranéen [Benabid, 2000 ; EL Rhaffari, 2008].

12-2-2 Systématique

- Règne : Plantae
- Sous -règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Thymus*
- Espèce : *Thymus satureioides* Coss

12-2-3 Répartition géographique et écologie

Il est rencontré dans les clairières des forêts, broussailles, matorrals des basses et moyennes montagnes jusqu'à vers 2200 m d'altitude, sur substrats calcaires siliceux et sols rocaillieux ou plus ou moins terreux mais bien drainés [Benabid, 2000]. Il peuple les Haut-Atlas et Anti-Atlas, sous des bioclimats arides et subhumides à variantes chaudes, et fraîches et au niveau des étages de végétations infra-méditerranéen et méso-méditerranéen [Benabid 2000; EL Rhaffari, 2008].

12-2-4 Phytochimie de *Thymus satureioidis*

L'analyse phytochimique de l'extrait aqueux de *Thymus satureioides* a révélé la présence des composés tels que le luteolin-7-glycoside, l'acide rosmarinique et le hesperetin [Ramchoun et al, 2012].

12-2-5 Usage traditionnel et activités pharmacologiques

Au Maroc, le décocté de *Thymus satureioides* est utilisé contre la coqueluche, la bronchite et le rhumatisme, les infections gastro-intestinales, les maladies hépatiques, les coliques, la toux, les infections de la gorge et de la bouche, les gripes, les rhumes, le coryza, et les refroidissements [Bellakhdar et al. 1991]. Il est mâché aussi contre les aphtes et les gingivites. Les feuilles séchées sont utilisées en cigarettes ou en fumigation contre le rhume et la grippe [Bellakhdar, 1997]. Le miel butiné sur ce thym (spécialité de la région de Marrakech) possède plusieurs vertus thérapeutiques [Bellakhdar, 1997]. Les études pharmacologiques ont montré que *Thymus satureioides* Coss possède des propriétés analgésique [Elhabazi et al. 2008], anti-inflammatoire [Ismaili et al, 2004], anti-oxydante [Ichrak et al. 2011; Ismaili et al. 2004], antimicrobienne [Ichrak et al. 2011; Tantaoui-Elaraki et al, 1993], anti-hémolytique [Ramchoun et al, 2015] et anti-coagulante [Khouya et al, 2015].

Objectifs de la thèse

Notre thématique de recherche s'inscrit dans le cadre de l'étude pharmacologie des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète et qui peuvent constituer une source potentielle de molécules bioactives antidiabétiques.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la valorisation de deux plantes médicinales, *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides*, appartenant respectivement aux familles des Cistacées et des Lamiacées et qui sont utilisées en médecine traditionnelle Marocaine pour le traitement du diabète sucré.

L'ensemble de ce travail est représenté en 3 chapitres:

- Evaluation de l'activité antidiabétique *in vivo* des extraits aqueux de *Cistus Ladaniferus* et *Thymus satureioides* chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine.
- Etude de leur effets sur l'activité de l' α -glucosidase et l' α -amylase pancréatiques, enzymes impliquées dans la digestion des glucides.
- Etude de la toxicité aiguë et sub-chronique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* chez les rats par administration orale.

Matériel et Méthodes

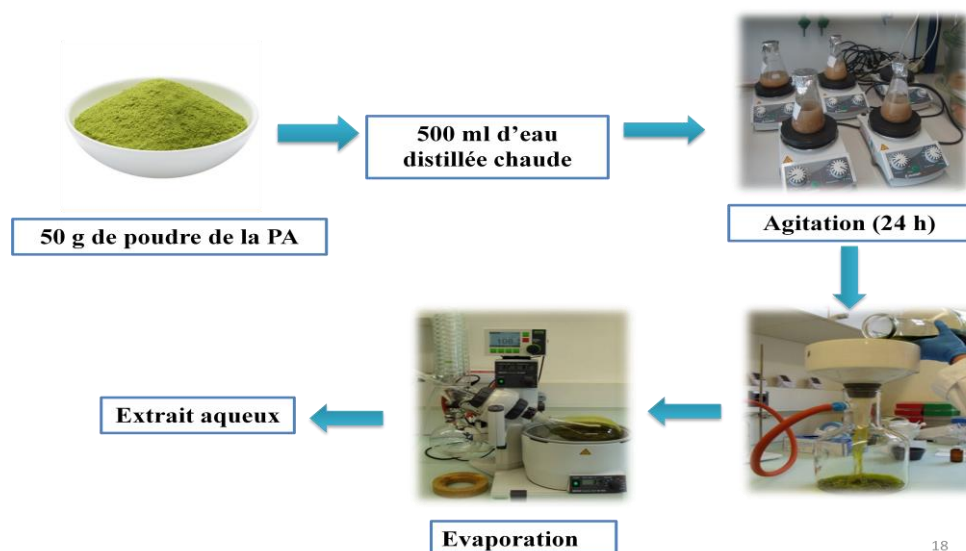
Matériel et Méthodes

1-Collecte et identification des plantes

Les parties aériennes de *Cistus ladaniferus* ont été collectées en mars 2015, au Nord du Maroc (région de Taounate). Les parties aériennes de *Thymus satureioides* ont été collectées en avril 2015, dans la région de Agadir Ida-Outanane, au sud-ouest du Maroc (Latitude: 30 °37', Longitude: 9°22', Altitude: 760 m). Une identification botanique des plantes a été effectuée au sein de la faculté des Sciences et Techniques de Fès par le Professeur Derraz Khalid . Les échantillons des deux plantes ont été lavés puis séchés à l'air libre et à l'ombre pendant deux semaines. Après séchage, les plantes ont été stockées dans des boîtes hermétiquement fermées et placées dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant utilisation.

2-Préparation des extraits aqueux

L'extrait aqueux des deux plantes est préparé par infusion dans l'eau distillée bouillante à 10 %. Après broyage, 100 g de poudre de la plante ont été additionnés à 1000 ml d'eau distillée bouillante puis laissés sous agitation pendant 24 heures. Le mélange est ensuite centrifugé à 5000 tours/min pendant 10 minutes pour éliminer les débris puis filtré sur papier filtre. Le filtrat obtenu est par la suite évaporé à 50°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporateur E100). Le résidu final est conservé à -20°C dans un flacon hermétiquement fermé jusqu'à utilisation (**Figure 6**).



18

Figure 6 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides*

3- Etude phytochimique

3-1 Dosage des polyphénols totaux

Le principe du dosage des polyphénols repose sur la réduction en milieu alcalin de l'acide phosphomolybdique et de l'acide phosphotungstique présents dans le réactif de Folin Ciocalteu par les polyphénols pour donner un mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène [Singleton et Rossi, 1965]. Cette réduction se traduit par l'apparition d'une coloration bleue foncée dont l'intensité est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés. Brièvement, 0,5 ml de chaque extrait (5 mg/ml) est ajouté à 2,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau), suivi par l'addition de 2 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5 %, w/v). Le mélange est ensuite incubé au bain marie à 45 °C pendant 30 minutes et l'absorbance des mélanges a été mesurée par spectrophotomètre à 765 nm. La concentration des polyphénols totaux dans chaque extrait est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une gamme de solutions d'acide gallique (4,8-315

µg/ml) établie séparément et est exprimée en milligrammes d'équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait.

3-2 Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été quantifiés par la méthode colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) [Arvouet-Grand, 1994]. Brièvement, 1 ml de l'extrait aqueux (5 mg/ml) est ajouté à 1,5 ml de méthanol puis 100 µl de la solution d' AlCl_3 à 10%. Après 5 minutes, 0,5 ml de NaOH (1M) et 2,5 ml d'eau distillée ont été ajoutés au mélange. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 415 nm. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0-300 µg/ml) et exprimée en milligrammes d'équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait.

4- Animaux d'expérimentation

Pour l'étude de l'activité antidiabétique, des rats blancs mâles de la souche Wistar, âgés d'environ 3 mois et pesant entre 180 et 230 g ont été utilisés. Les rats sont logés dans des cages en propylène. Ils ont un libre accès à l'eau et à la nourriture «type d'aliment standard, sous forme des granules. Ils ont été traités conformément aux principes et directives du guide sur le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire des instituts américains de la santé [NIH, 2011].

5- Induction du diabète

Les rats sont mis à jeun pendant une nuit (privation de la nourriture pendant 16 heures mais pas d'eau). La streptozotocine (STZ; Sigma ST Lowis, Mo) est fraîchement préparée dans un tampon citrate de sodium (0,1M, pH 4,5). Les groupes de rats non diabétiques ont reçu par voie intrapéritonéale le même volume de tampon citrate de sodium (0,1M, pH 4,5). Le diabète

a été induit par injection intrapéritonéale de la solution de STZ à une dose de 45 mg/Kg de poids corporel. Après injection, l'eau de boisson a été éremplacée par une solution de glucose 5% pendant 24 heures afin de surmonter l'hypoglycémie induite par la libération massive d'insuline à partir des cellules β pancréatiques et qui peut être fatale pour les rats. Le diabète a été confirmé chez les rats par mesure de la glycémie à jeun à l'aide d'un glucomètre de type (On Call® Plus) 72 heures après l'injection. Les rats ayant une glycémie supérieure à 2 g/l ont été considérés comme diabétiques et retenus pour l'expérimentation.

6- Evaluation de l'activité antidiabétique des extraits aqueux

Après l'induction du diabète, l'ensemble des rats diabétiques ont été divisés en quatre groupes de six rats chacun et gardés dans les mêmes conditions. Le traitement débute 24 heures après la confirmation du diabète et dure 28 jours.

6-1 Groupes des animaux:

- **Groupe 1** (Contrôle sain): les rats reçoivent quotidiennement par gavage gastrique 1 ml/kg d'eau distillée pendant 28 jours.
- **Groupe 2** (Contrôle diabétique): les rats diabétiques reçoivent chaque jour par gavage gastrique 5 ml/kg d'eau distillée pendant 28 jours.
- **Groupe 3** (Diabétique): les rats diabétiques reçoivent quotidiennement par voie orale 500 mg/kg de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* pendant 28 jours.
- **Groupe 4** (Diabétique): les rats diabétiques reçoivent quotidiennement par voie orale 500 mg/kg de l'extrait aqueux de *Thymus satureioidis* pendant 28 jours.
- **Groupe 5** (Contrôle positif): les rats diabétiques reçoivent quotidiennement par voie orale 2,5 mg/kg de glibenclamide, antidiabétique de référence, pendant 28 jours.

6-2 Prélèvement sanguin et mesure du poids

L'évolution de la glycémie et du poids des rats est suivie de façon régulière, chaque semaine et jusqu'à la fin du traitement. Le sang est prélevé par ponction de la veine caudale latérale pour la mesure de la glycémie et le poids a été déterminé par une balance de paillasse.

6-3 Test de tolérance au glucose

A la fin de la période du traitement, les rats ont été soumis à un test de tolérance au glucose afin d'évaluer l'effet des extraits sur l'assimilation et l'utilisation du glucose par les tissus durant les semaines d'expérimentation (**Figure 7**). La tolérance au glucose chez les rats est évaluée par administration d'une charge de glucose de 2 g/kg de poids corporel. La glycémie des rats est mesurée chaque 30 minutes à l'aide d'un glucomètre (On-Call plus) pendant 2 heures (0, 30, 60, 90 and 120 min). La première mesure de la glycémie est effectuée ainsi 30 min après l'administration du glucose. Pour chaque groupe, la courbe représentant l'évolution de la glycémie (mg/dL) en fonction du temps (min) est tracée. Les aires sous la courbe AUC (Area Under curve) de l'évolution de la glycémie ont été calculées à partir de ces courbes à l'aide d'un logiciel de statistique GraphPad Prism.

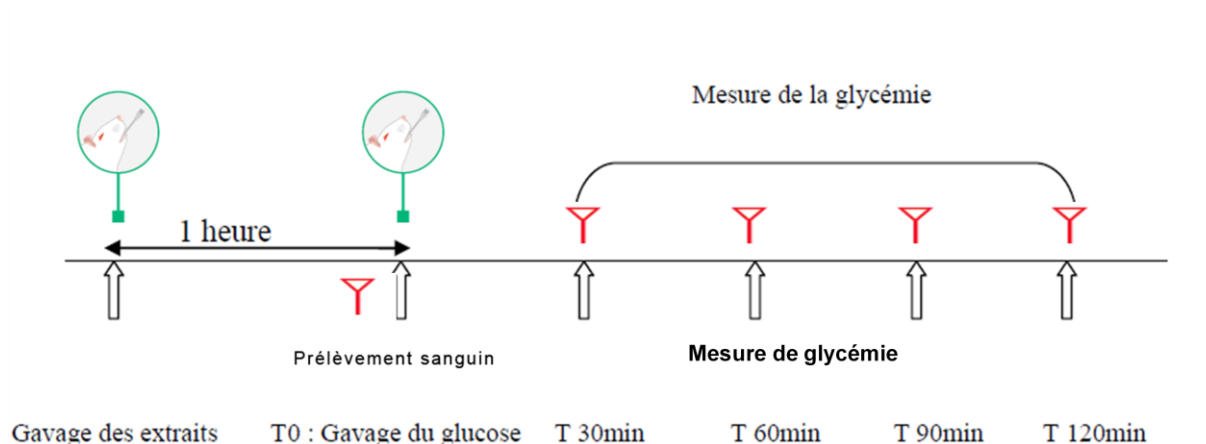


Figure 7: Schéma du protocole expérimental du test de tolérance au glucose

6-4 Analyse des paramètres biochimiques

A la fin de la période du traitement, les animaux sont mis à jeun pendant une nuit. La glycémie à jeun et le poids des rats après le dernier jour du traitement sont notés avant le sacrifice. Les rats ont été sacrifiés après anesthésie, puis les prélèvements sanguins ont été effectués sur des tubes héparinés. Le dosage des paramètres biochimiques est effectué par des méthodes enzymatiques et colorimétriques à l'aide d'un auto-analyseur de type Architect C8000” (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Les paramètres suivants ont été analysés: cholestérol total, triglycérides, HDL-cholestérol total, LDL-cholestérol total, créatinine, urée, alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT).

6-5 Test d'activité de l' α -glucosidase

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été évaluée par la méthode utilisant le substrat pNPG (4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside) [Kee et al, 2013]. Brièvement, un mélange de 150 μ L d'extrait à différentes concentrations (1,5-10-15-20-25-50-100 μ g/ml) et 100 μ L de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH= 6,7) contenant la solution d'enzyme (α -glucosidase: 0,5 U/ml) a été incubé à 37 ° C pendant 10 minutes. Après incubation, 200 μ L de la solution de pNPG (5 mM) préparée dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH = 6,7) ont été ajoutés au mélange, qui est incubé à 37 ° C pendant 30 minutes. Après incubation, 1 ml de Na₂CO₃ (0,1 M) a été ajouté et l'absorbance a été mesurée à 405 nm. L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été exprimée en pourcentage d'inhibition :

Pourcentage d'inhibition % = [(Abs Control négatif – Abs Echantillon)/ Abs Control négatif] X 100

Où Abs Echantillon: Absorbance de l'échantillon ; Abs contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif (sans extrait).

6-6 Test d'activité de l' α -amylase

L'activité inhibitrice de l' α -amylase a été évaluée selon la méthode décrite par [Hashim et al, 2013]. Brièvement, un mélange de 250 μ l d'extrait (à différentes concentrations) et 250 μ L de tampon phosphate de sodium (0,02 M, pH = 6,9) contenant l'enzyme α -amylase (0,5 mg/ mL) a été incubée à 37 °C pendant 10 min. Ensuite, 250 μ l d'amidon à 1% préparé dans du tampon phosphate de sodium (0,02 M, pH = 6,9) ont été ajoutés au mélange. Par la suite, le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C. Après 30 minutes d'incubation, 250 μ l d'acide dinitrosalicylique (DNS) ont été ajoutées au mélange réactionnel. Le mélange a été ensuite chauffé à 100 °C pendant 5 minutes, refroidi puis additionné de 2 ml d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée par spectrophotomètre à 540 nm.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculé en utilisant la formule suivante: **Pourcentage d'inhibition (I%) = $[(Ac - Acb) - (As - Abs) / (Ac - Acb)] \times 100$.**

Où As Echantillon: Absorbance de l'échantillon; Abs Echantillon: Absorbance de l'échantillon (sans enzyme); Ac contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif (sans extrait). Acb contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif (sans extrait et sans enzyme).

7- Etude toxicologique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*

7-1 Extrait de la plante

L'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* obtenu par infusion est mis en suspension dans une solution d'eau distillée jusqu'à dissolution complète.

7-2 Les animaux d'expérimentation

L'étude de la toxicité aigue est effectuée sur des souris pesant entre 20 à 30 g. Les animaux des deux sexes sont sains et les femelles non gravides. Les souris ont été préalablement mise à jeun 18 heures avant les tests de toxicité.

7-3 Etude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*

Les essais de toxicité aigue ont été réalisés selon les directives préconisés par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique [OCDE, 2001a]. Les souris ont été reparties en 6 groupes de 10 souris chacun (5 mâles et 5 femelles). Elles ont été pesées et marquées avant l'administration unique des différentes doses d'extrait. Les doses administrées, à raison d'une dose par groupe, sont les suivantes: 500, 1000, 2000, 3000, et 5000 mg/kg de poids corporel (**Tableau 3**). Le groupe contrôle reçoit de l'eau distillée. Les souris traitées ont été gardées en observation pendant 14 jours. Durant la période d'observation, les variations de poids, le taux de mortalité et toutes les modifications physique et comportementale ont été notées.

Tableau 3 : Protocole d'administration de l'extrait de *Cistus ladaniferus* par voie orale

Voie d'administration	Dose d'extrait mg/kg	souris		
		Nombre	sexe	
			male	femelle
Voie orale	500	10	5	5
	1000	10	5	5
	2000	10	5	5
	3000	10	5	5
	5000	10	5	5

7-4 Etude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*

La toxicité sub-chronique permet l'étude des effets toxiques d'une substance quelconque chez des animaux de laboratoire après administration d'une dose de façon répétée, pendant une période de 3 mois.

L'étude de la toxicité sub-chronique permet :

- D'évaluer la toxicité d'une substance administrée à plusieurs reprises, cette toxicité résulte du produit lui-même et/ou de ses métabolites.
- De mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques provoquées par l'administration répétée et établir leur apparition en fonction de la posologie.
- De définir les limites de l'innocuité expérimentale.
- D'évaluer le degré de réversibilité des effets toxiques.

L'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* est dissout dans de l'eau distillée pour obtenir les doses de 500, 700 et 1000 mg/kg, qui sont administrées par voie orale dans des volumes de 10 ml/1Kg de poids corporel des rats. Les doses utilisées sont inférieures à la DL50, et n'ont pas causé la mort des animaux lors de l'étude de la toxicité aiguë sur les souris.

7-4-1 Animaux

Les rats de souche Wistar utilisés dans cette étude ont été répartis en 4 lots de 12 rats, chaque lot est formé de 6 mâles et 6 femelles, mis séparément dans des cages en propylène (les femelles séparées des mâles). Tous les animaux avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture. Ils ont été acclimatés pendant 7 jours avant le début de l'étude. Les animaux ont été traités conformément aux principes et directives du guide sur le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire des instituts Américains de santé [NIH, 2011].

7-4-2 Test de toxicité sub-chronique

L'étude de la toxicité sub-chronique pendant 90 jours par voie orale (gavage gastrique) a été réalisée selon la ligne directrice de l'OCDE 408 (OCDE, 2001b). Les rats ont été répartis en 4 lots de 12 rats chacun (6 mâles et 6 femelles):

- **Groupe 1** (Contrôle): les rats qui ont reçu 10 ml/Kg d'eau distillée pendant 90 jours.
- **Groupe 2**: les rats qui ont reçu 500 mg/kg de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* pendant 90 jours.
- **Groupe 3**: les rats qui ont reçu 700 mg/kg de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* pendant 90 jours.
- **Groupe 4**: les rats qui ont reçu 1000 mg/kg de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* pendant 90 jours.

Pendant toute la période de traitement, l'évolution du poids corporel des rats est suivie chaque semaine et leur comportement est observé. Afin d'évaluer l'effet des extraits sur les fonctions de certains organes et sur le métabolisme des animaux, des analyses urinaires, hématologiques et biochimiques en relations avec la fonction hématologique, hépatique et rénale ont été réalisées à la fin de la période de traitement des 90 jours.

Les rats ont été mis à jeun pendant une nuit, puis sacrifiés après anesthésie. Les prélèvements sanguins ont été effectués sur des tubes EDTA pour les paramètres hématologiques, et sur tubes héparinés pour le bilan. Les tests urinaires ont été réalisés à l'aide de bandelettes urinaires. L'analyse des paramètres hématologiques est réalisée à l'aide d'un automate "Sysmix XS-1000i". Celle des paramètres biochimiques est effectuée par des méthodes enzymatiques et colorimétriques à l'aide d'un auto-analyseur de type "Cobas Integra" (**Figure 8**). Les paramètres analysés sont les suivants:

Paramètres biochimiques: glucose, cholestérol total, triglycérides, HDL-cholestérol total, LDL-cholestérol total, créatinine, urée, acide urique, alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT), alcaline phosphatase (ALP), protéines totales, albumine, bilirubine totale, sodium, potassium, calcium et chlore.

Paramètres hématologiques: taux de globules blancs, de globules rouges, de plaquettes, de la formule leucocytaire, taux de l'hémoglobine et de l'hématocrite.

Paramètres urinaires: nitrite, leucocytes, traces de sang, protéines, pH, gravité spécifique , cétones, bilirubine, urobilinogène et glucose.



Figure 8: auto-analyseurs de type "Cobas Integra" et "Sysmex XS-1000i"

Analyse anatomo-histo-pathologique

Après les prélèvements sanguins, les différents organes (cœur, poumons, foie, reins, rate, testicules, ovaires, glandes surrénales, thymus) des rats ont été prélevés, rincés dans une solution physiologique (NaCl 0,9%), puis pesés à l'aide d'une balance de précision.

Les échantillons ont été fixés dans du formol à 10 % afin d'éviter la dessiccation. Ces organes ont fait l'objet d'une analyse microscopique pour la recherche d'éventuelles lésions dues au

traitement sur ces organes. Cette analyse a été réalisée par un médecin spécialiste en anatomopathologie.

Les techniques histologiques passent par plusieurs étapes qui s'enchaînent. Le protocole utilisé dans cette étude comporte six étapes principales (**Figure 9**):

- Prélèvement des pièces et fixation chimique dans le formol dilué à 10 % qui permet la conservation de l'intégrité tissulaire par polymérisation avec les polypeptides entraînant leur insolubilité.
- Lavage, déshydratation et éclaircissement: Le lavage est réalisé dans de l'eau bidistillée, ensuite, les pièces sont déshydratées dans des bains d'alcool à teneur croissante (70, 80, 90, 100 %), puis éclaircies en mettant les pièces dans des bains de toluène pour éliminer toute trace d'alcool.
- Inclusion: les pièces sont incluses dans un bain de paraffine fondue pendant deux heures.
- Construction des blocs: Après la saturation des pièces par la paraffine fondue, on passe à l'inclusion définitive dans de petits moules en inox qui servent à donner la forme du bloc.
- Préparation des coupes et étalement sur lame: Le bloc de paraffine est collé au porte-objet puis débité en coupes minces (5 μ m) grâce à un microtome. Les coupes sont récupérées sur des lames de verre recouvertes d'un film de gélatine (liquide d'étalement). Ensuite, les lames sont séchées à l'étuve à 37°C.
- La coloration: Après déparaffinage et hydratation, les coupes sont colorées par la méthode d'éosine & ématoxiline; puis analysées au microscope optique à différents grossissements.



Figure 9: protocole de réalisation des coupes histologiques

7-5 Analyses statistiques

L'étude statistique a été réalisée à l'aide d'un logiciel de statistique GraphPad Prism. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-types pour six rats dans chaque groupe. Les données des groupes traités par les extraits et celles des groupes témoins ont été comparées par des tests statistiques (analyse de variance uni variée (one-way ANOVA) suivie du test de Dunnet). Ces tests donnent le degré de signification P où on dit que la différence :

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

Résultats et discussion

Chapitre I

Etude de l'activité antidiabétique des extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides* chez les rats rendus diabétiques par STZ

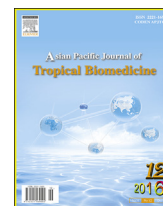
Introduction

Le diabète sucré est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique, résultante d'une carence et/ou d'une résistance à l'insuline. La Fédération Internationale du Diabète a estimé que 415 millions de personnes sont atteintes du diabète dans le monde en 2015; ce nombre pourrait s'élever à 642 millions en 2040 [IDF, 2015]. Le diabète sucré est une maladie complexe qui résulte de l'interaction de plusieurs facteurs tels que le comportement alimentaire, la prédisposition génétique et les facteurs environnementaux.

En médecine traditionnelle marocaine, de nombreuses plantes médicinales sont utilisées pour le traitement du diabète. En outre, les enquêtes ethnobotaniques ont recensé plus de 1200 plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète et/ou étudiées pour leur activité antidiabétique à travers le monde [Marles & Farnsworth, 1995].

Les études scientifiques des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète peuvent contribuer à la découverte de nouveaux médicaments antidiabétiques. L'usage des plantes médicinales pour traiter le diabète sucré a suscité un intérêt croissant ces dernières années depuis la publication des recommandations de l'OMS concernant le diabète sucré, qui encouragent la recherche de composés antidiabétiques dérivés des plantes médicinales [El-Abhar & Schaal, 2014]. Par ailleurs, l'exploitation des potentialités offertes par les remèdes à base de plantes peut contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour la prise en charge et la prévention du diabète sucré et de ses complications [El-Abhar & Schaal, 2014].

Selon les données des enquêtes ethnobotaniques réalisées au Maroc, les décoctés des feuilles de *Cistus ladaniferus* et des parties aériennes de *Thymus satureioides* sont traditionnellement utilisés pour le traitement du diabète [Merzouki et al, 2003; Tahraoui et al, 2007; Jouad et al, 2001]. Cependant, l'activité antidiabétique de ces deux plantes n'a jamais été évaluée expérimentalement. Cette première étude avait donc pour objectif d'évaluer expérimentalement les activités antidiabétiques des extraits aqueux de ces deux plantes chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine.



HOSTED BY



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtbOriginal article <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.09.005>Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* in streptozotocin-induced diabetic rats

Mohamed El Kabbaoui, Alae Chda, Ouarda Azdad, Najlae Mejrhit, Lotfi Aarab, Rachid Bencheikh, Abdelali Tazi*

Laboratory of Bioactive Molecules, Faculty of Sciences and Techniques, Sidi Mohamed Ben Abdellah University (USMBA), Fez 30000, Morocco



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 Dec 2015

Received in revised form 17

Dec, 2nd revised form 23

Dec, 3rd revised form 30

Dec 2015, 4th revised form 12

Jan 2016

Accepted 22 Mar 2016

Available online 5 Oct 2016

Keywords:

Cistus ladaniferus

Diabetes mellitus

Streptozotocin

Antidiabetic activity

Hypolipidemic activity

Glucose tolerance

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of aqueous leaf extract of *Cistus ladaniferus* (*C. ladaniferus*) on glycemic and lipidemic status in diabetic rats.**Methods:** Overnight fasted rats were injected intraperitoneally with streptozotocin (45 mg/kg) to induce experimental diabetes. The aqueous extract of the leaves of *C. ladaniferus* was administered orally at the dose of 500 mg/kg body weight to diabetic rats for a period of 28 days. Hypoglycemic effect, body weight, oral glucose tolerance, change in lipid parameters, urea, creatinine, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels of diabetic rats treated with aqueous extract were evaluated in experimental animals.**Results:** Administration of 500 mg/kg of *C. ladaniferus* extract to diabetic rats for 28 days resulted in a significant reduction in the levels of blood glucose, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, urea and creatinine. Furthermore, the extract of *C. ladaniferus* improved glucose tolerance in diabetic rats, and its antidiabetic effect was similar to the one obtained with glibenclamide. The hypolipidemic effect was demonstrated by an important decrease in plasma total cholesterol, triglycerides and low density lipoprotein-cholesterol levels.**Conclusions:** It is concluded that *C. ladaniferus* leaf extract showed an antidiabetic activity in experimental diabetes which was similar to the one obtained with glibenclamide.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by a chronic hyperglycemia, resulting from a deficiency in insulin

production by β cells or insulin cellular resistance [1]. The International Diabetes Federation estimated that 415 million people worldwide have diabetes in 2015; by 2040, this will rise to 642 million [2]. Diabetes mellitus is a complicated metabolic disease which results from the interaction of multiple factors such as behavioral, genetic predisposition and environmental risk factors.

In Morocco, many medicinal plants are used for the treatment of diabetes in folk medicine systems as well as in traditional healing practices. Furthermore, it is reported that about 1200 plants were used in traditional medicine for the treatment of diabetes and/or studied for potential antidiabetic activity worldwide [3]. Scientific studies on medicinal plants used in folk medicine to treat diabetes can contribute to the discovery of novel antidiabetic drugs, which can lead to the development of alternative therapeutic strategies [3]. In order to control all pathological complications of diabetes, there is a need of the development of new alternatives treatments derived from medicinal plant resources [3].

*Corresponding author: Abdelali Tazi, Laboratory of Bioactive Molecules, Faculty of Sciences and Techniques, Sidi Mohamed Ben Abdellah University (USMBA), P.O. Box 2202, Fez 30000, Morocco.

Tel: +212 662034202

Fax: +212 535608214

E-mail: abdelalitalazi@yahoo.fr

All experimental procedures involving animals were conducted in accordance to the guidelines on the use and care of experimental animals, published by the US National Institutes of Health (NIH) and approved by Institutional Ethical Committee of Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Morocco.

Foundation Project: Supported by University of Sidi Mohamed Ben Abdellah (USMBA), and by a grant from the National Center for Scientific and Technical Research of Morocco (CNRST) to Mohamed El Kabbaoui (Fellowship number N°: 021USMBA2014).

Peer review under responsibility of Hainan Medical University. The journal implements double-blind peer review practiced by specially invited international editorial board members.

Cistus ladaniferus (*C. ladaniferus*) (gum rockrose) is a shrub from the Cistaceae family, originated from the Mediterranean region, known locally as “Touzal” in the north of Morocco or “Argale” in other regions of Morocco [4]. This plant is widely used in traditional medicine in Northern Morocco as antidiarrhoeal and antispasmodic [5]. Previous studies reported that *C. ladaniferus* exerts different pharmacological effects such as antiaggregant effects [6], antihypertensive [7], antispasmodic [8], antioxidant [9] and cytotoxic activity against human cancer cells [10]. Essential oil and various organic extracts of this plant have been shown to exhibit antifungal and antibacterial effects [11].

According to ethnobotanical data collected in the north of Morocco, the decoction of *C. ladaniferus* leaves is traditionally used in diabetes control and treatment [12]. However, this ethnobotanical information has never been evaluated experimentally. Thus, the objective of the present investigation was to explore the hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous leaves extract of *C. ladaniferus* in diabetic rats.

2. Materials and methods

2.1. Plants material

Fresh leaves of *C. ladaniferus* (Cistaceae) were collected from Taounate region (north of Morocco) in March 2015. The plant material was taxonomically identified and authenticated and voucher specimens (No. MA-FSTF 16) were deposited in the herbarium of the Department of Biology, Faculty of Sciences and Techniques, Fes, Morocco.

2.2. Preparation of aqueous extract

The leaves of *C. ladaniferus* were washed with water, air-dried for 7 days and reduced to a coarse powder. The powder was extracted by infusion as described in Moroccan folk medicine. About 100 g of leaves powder were mixed with 1000 mL of distilled water for 1 h. The extract was filtered and evaporated under vacuum at 50 °C using a rotary evaporator. The residue (yield = 26%) was stored at –20 °C until use.

2.3. Animals

Healthy adult female and male Wistar rats weighing 180–230 g were used in the experiments. Rats were housed in polypropylene cages at the animal house of the Faculty of Sciences and Techniques (Fes, Morocco). The animals were maintained in standard environmental conditions and fed standard diet and water *ad libitum*. Recommendations of international guidelines were followed in animal experiments [13]. All experimental procedures involving animals were conducted in accordance to the guidelines on the use and care of experimental animals, published by the US National Institutes of Health (NIH) and approved by Institutional Ethical Committee of Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Morocco.

2.4. Acute toxicity

Aqueous leaf extract of *C. ladaniferus* in 500 mg/kg doses was administered to the rats orally. All animals were observed for 24 h after treatment.

2.5. Evaluation of antidiabetic activity

2.5.1. Induction of experimental diabetes

To induce experimental diabetes, a single intraperitoneal dose of 45 mg/kg body weight of streptozotocin (STZ) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was injected to rats after overnight fasting. STZ was freshly prepared in cold sodium citrate buffer (0.1 mol/L, pH 4.5). The diabetic state was confirmed by the measurement of fasted blood glucose in rats after 3 days following the injection of STZ. Only rats with glycemia higher than 2 g/L were included in experiments.

2.5.2. Experimental design

The animals were divided into four groups and each group consisted of six animals. Groups 1 and 2 served as normal and diabetic control groups, respectively and treated with distilled water (10 mL/kg). Group 3 was treated with the aqueous extract of *C. ladaniferus* at a dose of 500 mg/kg/day. Group 4 was treated with 2 mg/kg/day of a standard care drug, glibenclamide. The 500 mg/kg extract dose used in the treatment was chosen from a preliminary short-term study in our laboratory. Distilled water, glibenclamide, and plant extract were given orally by gavage as single daily treatments. The antidiabetic activity of *C. ladaniferus* extract was evaluated in treated animals in comparison to the control groups, by measuring fasting blood glucose levels and body weight on Days 1, 7, 14, 21 and 28 of the study.

2.5.3. Oral glucose tolerance test (OGTT)

In order to assess the effect of orally administered *C. ladaniferus* extract on systemic glucose homeostasis, an oral glucose tolerance test was carried out in fasted rats after 4 weeks administration of the extract. In the final day of the experiment, overnight fasted rats were loaded with glucose (2 g/kg) orally 60 min after the last dose of distilled water, glibenclamide or the extract administration. Blood samples were collected from the tail vein at 0, 30, 60, 90 and 120 min after glucose loading. Blood glucose levels (g/L) were plotted against time intervals (min), and the respective areas under the curve (AUC) were calculated. The AUCs of the curves of each group were compared and tested for statistical significance against the control diabetic group to evaluate glucose utilization by the tissues.

2.5.4. Determination of the blood glucose levels

Blood samples were collected from the tip of the tail for glycemia measurement. In this study, blood glucose concentrations (g/L) were determined at the defined time points, by means of On Call[®] Plus glucometer and blood glucose reactive test strips based on the glucose oxidase method.

2.5.5. Estimation of biochemical parameters

At the end of the 28 days experiment, the animals were sacrificed and blood samples were collected from all the four groups in tubes containing heparin. Plasma was separated for the estimation of total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), triglycerides, alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), urea and creatinine. All biochemical parameters were studied by an auto-analyzer “Architect C8000” (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

2.6. Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ SD of the indicated number of experiments. Results were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test performed using Graph Pad Prism version 6.0 for Windows. Values of P less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Acute toxicity

After oral administration of the aqueous extracts of leaves of *C. ladaniferus* 500 mg/kg doses, no mortality was recorded for all animals observed 24 h after the leaf extract administration.

3.2. Changes in body weight

Effect of *C. ladaniferus* extract on body weight is shown in Table 1. Diabetic control rats showed a progressive fall in body weight during the study period in comparison to normal control rats ($P < 0.001$). The treatment of diabetic rats with *C. ladaniferus* extract at a dose of 500 mg/kg for 28 days showed marked improvement in body weight in comparison to diabetic control group ($P < 0.01$). The effect of *C. ladaniferus* extract on body weight was comparable to that of glibenclamide.

3.3. Hypoglycemic effect of aqueous extract

The effect of *C. ladaniferus* extract administration on blood glucose level is presented in Figure 1. The fasting blood glucose level (FBG) was measured in all groups of rats on Days 1, 7, 14, 21 and 28 of the treatment. STZ-induced diabetic rats had significantly higher level of FBG compared to that of normal control rats ($P < 0.001$). Oral daily administration of *C. ladaniferus* extract produced a significant decrease in FBG level, observed from the 7th day after the treatment compared to diabetic control ($P < 0.001$). Furthermore, treatment with *C. ladaniferus* extract produced 34% fall in FBG level compared to the FBG level of diabetic control at the end of the experiment.

3.4. Oral glucose tolerance test

Figure 2 presents the changes in blood glucose levels of rats following the OGTT. Glycemia with a maximum level in normal and diabetic groups occurred 30 min after the oral glucose challenge. Administration of *C. ladaniferus* extract 60 min before glucose loading produced a significant decrease in the rise in blood glucose level at 30 min ($P < 0.001$) and 60 min ($P < 0.01$) compared to diabetic control. Treatment of diabetic

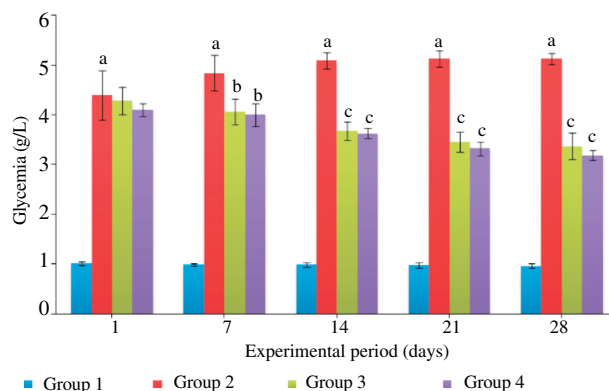


Figure 1. Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on blood glucose in STZ-induced diabetic rats. Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.001$ compared to normal control; ^b: $P < 0.01$; ^c: $P < 0.001$ compared to diabetic control.

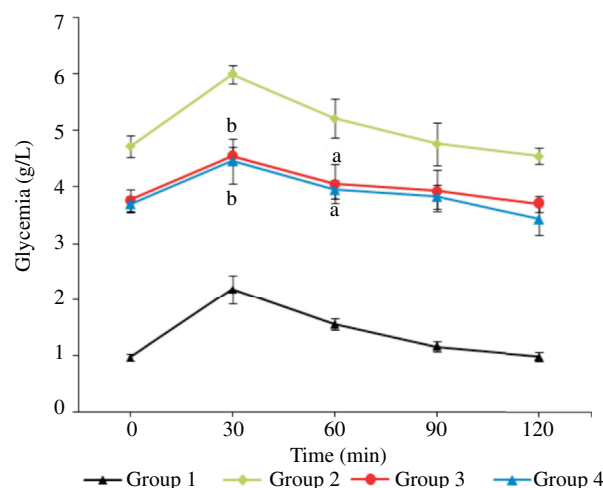


Figure 2. Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on blood glucose in STZ-induced diabetic rats during OGTT.

Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.001$ compared to diabetic control.

rats with glibenclamide and *C. ladaniferus* extract induced a significant reduction in glucose AUC relative to the diabetic control group by 15% and 12.5%, respectively (Figure 3).

3.5. Changes in lipid profile

Figures 4 and 5 show the levels of plasma total cholesterol and triglycerides of experimental animals. The plasma levels of total cholesterol and triglycerides were found to be significantly higher ($P < 0.05$) in the diabetic control animals in comparison

Table 1

Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on body weight in STZ-induced diabetic rats.

Treatment	Body weight (g)				
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Group 1	200.00 $\pm$ 20.95	197.67 $\pm$ 20.53	202.17 $\pm$ 21.31	198.00 $\pm$ 30.38	200.83 $\pm$ 31.28
Group 2	207.67 $\pm$ 19.76	187.67 $\pm$ 26.91	150.00 $\pm$ 17.34 ^a	128.67 $\pm$ 23.68 ^b	116.00 $\pm$ 21.43 ^b
Group 3	214.00 $\pm$ 11.33	200.33 $\pm$ 10.11	184.33 $\pm$ 9.07 ^d	166.33 $\pm$ 6.38 ^c	160.83 $\pm$ 5.15 ^d
Group 4	208.17 $\pm$ 6.94	202.34 $\pm$ 9.04	190.67 $\pm$ 7.45 ^d	170.17 $\pm$ 5.42 ^c	164.10 $\pm$ 5.83 ^d

Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.001$ compared to normal control; ^c: $P < 0.05$, ^d: $P < 0.01$ compared to diabetic control.

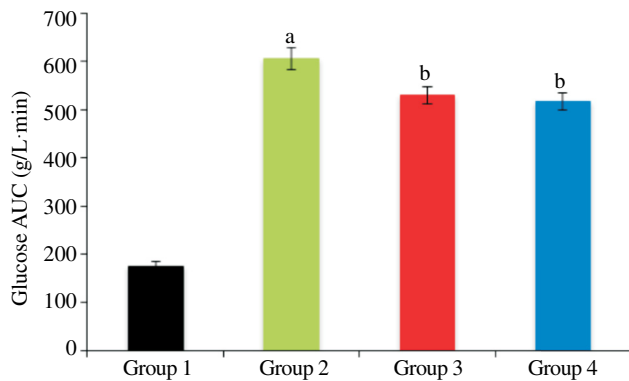


Figure 3. Effect of *C. ladaniferus* extract on total area AUCs of blood glucose. Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.001$ compared to normal control; ^b: $P < 0.01$ compared to diabetic control.

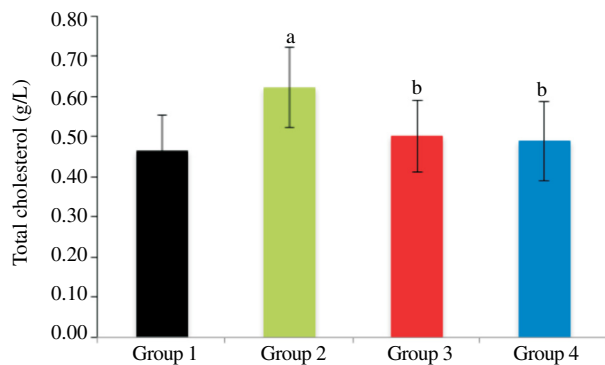


Figure 4. Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma total cholesterol in STZ-induced diabetic rats. Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.05$ compared to normal control; ^b: $P < 0.05$ compared to diabetic control.

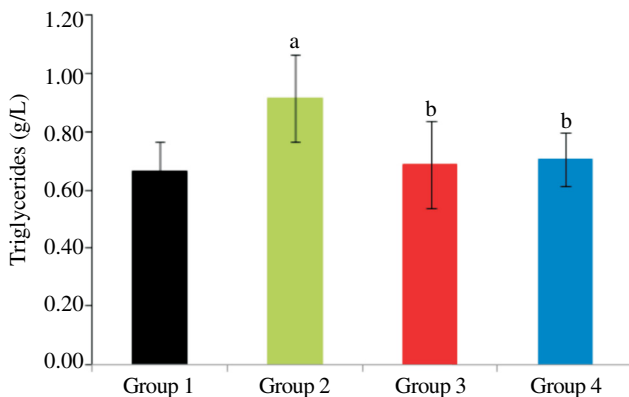


Figure 5. Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma triglycerides in STZ-induced diabetic rats. Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.05$ compared to normal control; ^b: $P < 0.05$ compared to diabetic control.

with normal control rats. The rats treated with *C. ladaniferus* extract showed a significant decrease in plasma triglycerides and total cholesterol when compared with control diabetic rats ($P < 0.05$). The leaf extract and glibenclamide showed similar effects in reducing plasma total cholesterol and triglycerides levels.

The plasma levels of LDL-C were significantly higher in the diabetic control group than in the normal control group (Figure 6). Contrariwise, the level HDL-C was significantly

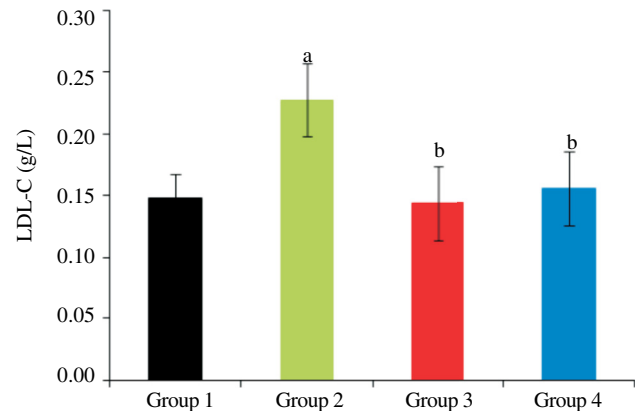


Figure 6. Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma LDL-C in STZ-induced diabetic rats. Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.05$ compared to normal control; ^b: $P < 0.05$ compared to diabetic control.

diminished in comparison with the normal control group ($P < 0.05$). A marked decrease in the level of LDL-C was observed in diabetic rats treated with glibenclamide without significant change in HDL-C level (Figure 7). The treatment with *C. ladaniferus* extract showed a significant reduction in plasma level of LDL-C by 34% ($P < 0.05$). However, the plasma level of HDL-C did not show a significant increase in comparison with diabetic control rats.

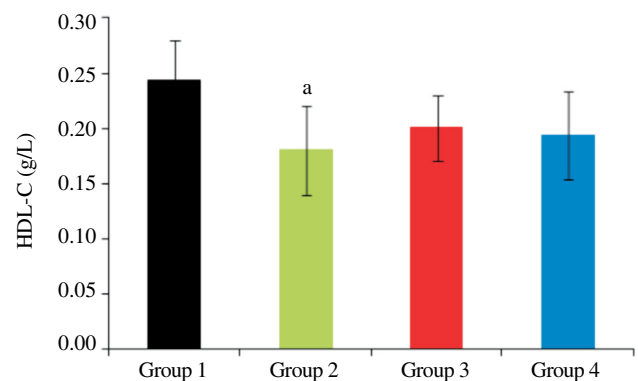


Figure 7. Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on plasma HDL-C in STZ-induced diabetic rats. Values are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^a: $P < 0.05$ compared to normal control.

3.6. Changes in transaminases, urea and creatinine levels

Table 2 shows the levels of hepatic and renal markers in normal and diabetic animals. A significant increase in the level of ASAT and ALAT was observed in diabetic control rats when compared to non-diabetic control group ($P < 0.05$). Diabetic rats treated with *C. ladaniferus* extract (500 mg/kg body weight) and glibenclamide showed a significant decrease in the levels of ASAT and ALAT in comparison to control diabetic rats ($P < 0.05$). Moreover, a significant elevation in urea and creatinine levels was observed in diabetic control rats when compared to non-diabetic control group ($P < 0.05$). Treatment with *C. ladaniferus* extract and glibenclamide for 28 days showed a significant reduction in urea and creatinine levels in the diabetic treated group in comparison with the diabetic untreated group ($P < 0.05$).

Table 2Effect of daily oral administration of the aqueous extract of *C. ladaniferus* on levels of urea, creatinine, ALAT and ASAT in STZ-induced diabetic rats.

Treatment	Hepatic markers		Renal markers	
	ALAT (IU/L)	ASAT (IU/L)	Urea (g/L)	Creatinine (mg/L)
Group 1	49.67 ± 5.89	110.20 ± 14.53	0.41 ± 0.05	5.51 ± 0.55
Group 2	125.00 ± 18.38 ^b	225.50 ± 25.40 ^c	0.66 ± 0.09 ^b	7.50 ± 1.45 ^b
Group 3	94.17 ± 17.53 ^a	171.50 ± 24.43 ^a	0.54 ± 0.09 ^a	7.02 ± 1.10 ^a
Group 4	87.51 ± 12.50 ^a	171.83 ± 15.21 ^a	0.56 ± 0.07 ^a	6.38 ± 0.86 ^a

Values are expressed as mean ± SD, *n* = 6. ^a: *P* < 0.05 compared to diabetic control; ^b: *P* < 0.05, ^c: *P* < 0.01 compared to normal control.

4. Discussion

The present data indicated that *C. ladaniferus* aqueous extract at the dose of 500 mg/kg significantly decreased blood glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL-C, urea, creatinine, ASAT and ALAT levels. Furthermore, the extract improved glucose tolerance in treated diabetic rats as compared with control diabetic rats. The aqueous extract of *C. ladaniferus* showed a comparable antidiabetic effect to glibenclamide, a standard hypoglycemic drug which is used as a standard antidiabetic agent to evaluate the antidiabetic activities in experimental diabetes studies [14,15].

Severe loss in body weight is one of the characteristics observed in STZ-induced diabetes, which was observed in the present study. Administration of *C. ladaniferus* extract and glibenclamide significantly improved the body weight loss in diabetic rats in comparison to diabetic control group. The observed decrease in body weight of diabetic control rats could be attributed to insulin deficiency, which causes degradation of structural proteins and lipids that are known to contribute to body weight [16]. The treatment with *C. ladaniferus* extract, as well as glibenclamide enhanced glucose metabolism and thus improved the body weight in diabetic rats.

The OGTT evaluates the body's capacity to metabolize glucose. A marked increase in the AUC of the glucose was observed in diabetic control rats following the glucose challenge test. This effect may be due to the reduction of glucose tissue utilization and an increased hepatic glucose production, as a result of decreased insulin secretion [17]. The administration of *C. ladaniferus* extract showed a marked diminution in the glucose AUC of diabetic rats. These results revealed that *C. ladaniferus* extract increased glucose utilization which indicates the improvement of glucose homeostasis in treated diabetic animals.

One of the associated metabolic disorders of diabetes is dyslipidemia which contributes to secondary complications of diabetes [18]. Hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia have been reported to occur in diabetic rats [19,20]. Under normal conditions, the lipolytic hormones action is activated by insulin allowing hydrolysis of triglycerides and blocks mobilization of free fatty acids [21]. Contrariwise, in the diabetic state, the activity of lipoprotein lipase is reduced due to lack of insulin resulting in hypertriglyceridemia as well as over production of LDL-C by the liver [22]. The observed diminution in plasma total cholesterol, triglycerides and LDL-C status in treated diabetic animals suggests that the extract possesses insulinotropic effect or insulinomimetic activity.

According to our results, diabetic control rats showed a significant elevation of urea and creatinine levels, which are used to evaluate renal dysfunction [23]. Administration of *C. ladaniferus* extract to diabetic rats significantly decreased

these parameters which could be attributed to the attenuation of metabolic alterations in protein and nucleic acid metabolisms which are caused by hyperglycemia in diabetic states. This finding was demonstrated in our study by improved glucose homeostasis in diabetic rats.

Previous studies have reported an increase in ASAT and ALAT activities in the diabetic state which indicates active liver damage [24]. Therefore, the increase in the activities of plasma ASAT and ALAT observed in this study could be attributed to the hepatocellular damage caused by diabetes. This finding was also demonstrated by a previous study reporting a necrotic liver in diabetic rats [25]. Oral administration of *C. ladaniferus* extract and glibenclamide for 28 days to diabetic groups decreased the activity of these enzymes in plasma. These results are in agreement with those obtained in a previous study which reported the antidiabetic effect of *Piper longum* root aqueous extract in diabetic rats [26] and indicate the hepatoprotective effect of *C. ladaniferus* against STZ-induced toxicity.

The observed antidiabetic activity of *C. ladaniferus* may be attributed to the presence of bioactive compounds such as flavonoids in the extract. The presence of flavonoids in *C. ladaniferus* has been reported previously [27,28]. It is documented that hypoglycemic activities of many medicinal plants are attributed to the presence of phenolic compounds and flavonoids [29]. Studies also reported that flavonoids have antidiabetic properties because they stimulate glucose uptake in peripheral tissues and attenuate oxidative stress during diabetic conditions [30,31]. They also exert a stimulatory effect on insulin secretion by changing Ca²⁺ concentration [32]. However, the observed antidiabetic activity may be due to synergistic effect of different classes of bioactive compounds present in *C. ladaniferus* extract.

In conclusion, aqueous leaves extract of *C. ladaniferus* was effective in decreasing blood glucose levels in STZ-induced diabetic rats. The hypolipidemic effect was demonstrated by a significant reduction in plasma lipid parameters. The present results confirm the use of this plant to treat diabetes complications. Finally, the mechanism of action, as well as the bioactive compound(s) involved in these pharmacological activities, remains to be determined in addition to toxicological studies.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by the University of Sidi Mohamed Ben Abdellah (USMBA), and by a

grant from the National Center for Scientific and Technical Research of Morocco (CNRST) to Mohamed El Kabbaoui (fellowship number N°: 021USMBA2014).

References

- [1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; **87**(1): 4–14.
- [2] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2015. [Online] Available from: www.idf.org/diabetesatlas [Accessed on 8th January, 2016]
- [3] Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995; **2**(2): 137–89.
- [4] Guzmán B, Vargas P. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2005; **37**(3): 644–60.
- [5] Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J Ethnopharmacol* 1991; **35**(2): 123–43.
- [6] Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, et al. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2004; **94**(2): 317–22.
- [7] Belmokhtar M, Bouanani NE, Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Aziz M, et al. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of aqueous extract of *Cistus ladaniferus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **389**(1): 145–9.
- [8] Aziz M, Tab N, Karim A, Mekhfi H, Bnouham M, Ziyat A, et al. Relaxant effect of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* on rodent intestinal contractions. *Fitoterapia* 2006; **77**(6): 425–8.
- [9] Zidane H, Elmiz M, Aouinti F, Tahani A, Wathelet J, Sindic M, et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco. *Afr J Biotechnol* 2013; **12**: 5314–20.
- [10] Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Saura D, Guillén E, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, et al. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2010; **48**(8): 2273–82.
- [11] Banayad N, Mennane R, Charof R, Hakiki A, Mosaddak M. Antibacterial activity of essential oil and some extracts of *Cistus ladaniferus* from Oulmes in Morocco. *J Mater Environ Sci* 2013; **4**(6): 1066–71.
- [12] Merzouki A. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine III: phytotherapy of diabetes in Chefchaouen Province (north of Morocco). *ARS Pharm* 2003; **44**(1): 59–67.
- [13] National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011.
- [14] Jain S, Bhatia G, Barik R, Kumar P, Jain A, Dixit VK. Antidiabetic activity of *Paspalum scrobiculatum* Linn. in alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2010; **127**(2): 325–8.
- [15] Ramkumar KM, Vanitha P, Uma C, Suganya N, Bhakkiyalakshmi E, Sujatha J. Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Gymnema montanum* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2011; **49**(12): 3390–4.
- [16] Stephen Irudayaraj S, Sunil C, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2012; **143**(2): 515–23.
- [17] Gupta RK, Kumar D, Chaudhary AK, Maithani M, Singh R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J Ethnopharmacol* 2012; **139**(3): 801–6.
- [18] Chehade JM, Gladysz M, Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. *Drugs* 2013; **73**(4): 327–39.
- [19] Wang L, Zhang XT, Zhang HY, Yao HY, Zhang H. Effect of *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves extract on blood glucose and plasma lipid levels in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 2010; **130**(3): 465–9.
- [20] Balamurugan R, Ignacimuthu S. Antidiabetic and hypolipidemic effect of methanol extract of *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; **1**(Suppl 1): S30–6.
- [21] Ruge T, Sukonina V, Kroupa O, Makoveichuk E, Lundgren M, Svensson MK, et al. Effects of hyperinsulinemia on lipoprotein lipase, angiopoietin-like protein 4, and glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding protein 1 in subjects with and without type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2012; **61**(5): 652–60.
- [22] Taskinen MR, Borén J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2015; **239**(2): 483–95.
- [23] Honoré SM, Cabrera WM, Genta SB, Sánchez SS. Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2012; **50**(5): 1704–15.
- [24] Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DDP, Pierre K, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2014; **151**(2): 784–90.
- [25] Arunachalam K, Parimelazhagan T. Antidiabetic activity of *Ficus amplissima* Smith. bark extract in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2013; **147**(2): 302–10.
- [26] Nabi SA, Kasetti RB, Sirasanagandla S, Tilak TK, Kumar MV, Rao CA. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Piper longum* root aqueous extract in STZ induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 2013; **13**(1): 37.
- [27] Chaves N, Escudero JC, Gutiérrez-Merino C. Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *J Chem Ecol* 1997; **23**(3): 579–603.
- [28] Chaves N, Escudero JC, Gutiérrez-Merino C. Seasonal variation of exudate of *Cistus ladanifer*. *J Chem Ecol* 1993; **19**(11): 2577–91.
- [29] Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother Res* 2013; **27**(11): 1588–96.
- [30] Eid HM, Martineau LC, Saleem A, Muhammad A, Vallerand D, Benhaddou-Andaloussi A, et al. Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Mol Nutr Food Res* 2010; **54**(7): 991–1003.
- [31] Rauter AP, Martins A, Borges C, Mota-Filipe H, Pinto R, Sepodes B, et al. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 2010; **24**(Suppl 2): S133–8.
- [32] Babujanathanam R, Kavitha P, Pandian MR. Quercitrin, a bio-flavonoid improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Fundam Clin Pharmacol* 2010; **24**(3): 357–64.

Original Article

ANTIDIABETIC EFFECT OF *THYMUS SATUREIODES* AQUEOUS EXTRACT IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

MOHAMED EL KABBAOUI¹, ALAE CHDA¹, NAJLAE MEJRHIT¹, OUARDA AZDAD¹, ABDELLAH FARAH², LOTFI AARAB¹, RACHID BENCHEIKH¹, ABDELALI TAZI^{1*}

¹Laboratory of Bioactive Molecules (LMBSF), ²Laboratory of Applied Organic Chemistry, Faculty of Sciences and Techniques, Sidi Mohamed Ben Abdellah University (USMBA), PB. 2202 Fez, Morocco
Email: abdelalitazi@yahoo.fr

Received: 06 May 2016 Revised and Accepted: 22 Jul 2016

ABSTRACT

Objective: The aerial parts of *Thymus satureioides* have been traditionally used to treat diabetes mellitus and its complications in Morocco. The aim of the present study was to investigate the antidiabetic and antihyperlipidemic effects of the aqueous extract of *Thymus satureioides* aerial parts in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats.

Methods: Experimental diabetes was induced in overnight fasted rats by intraperitoneal injection of streptozotocin (45 mg/kg). Diabetic rats were orally administered with aqueous extract of *Thymus satureioides* (500 mg/kg b.w.) for 28 d. Glibenclamide (2 mg/kg), a standard antidiabetic drug, was used as a positive control drug. Body weight and fasting blood glucose (FGB) were measured every week. Oral glucose tolerance, change in lipid parameters, urea, creatinine, aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) levels of diabetic rats were evaluated at the end of the treatment.

Results: Administration of *Thymus satureioides* aqueous extract to diabetic rats for 28 d reduced their fasting blood glucose levels significantly compared to the diabetic control rats. The extract improved body weight and glucose tolerance in diabetic rats. The antihyperlipidemic assessment of the extract revealed a decrease in plasma total cholesterol, triglycerides, LDL levels and an increase in HDL level in the plasma of treated diabetic rats. Furthermore, the biochemical liver and kidney functional tests have shown that serum biomarkers of liver and renal dysfunction were significantly reduced in treated diabetic rats.

Conclusion: The present findings suggest that *Thymus satureioides* extract has both antidiabetic and antihyperlipidemic effects in experimental diabetic rats which can be beneficial in the management of diabetes and its complications.

Keywords: *Thymus satureioides*, Diabetes mellitus, Streptozotocin, Antidiabetic activity, Antihyperlipidemic activity, Glucose tolerance

© 2016 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i9.12647>

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is one of the most common endocrine-metabolic disorders worldwide. It affects millions of people and has an incidence that is increasing at a striking rate [1]. Diabetes is considered as an alarming global health problem due to the high rate of morbidity and mortality which result from the associated macrovascular and microvascular complications such as retinopathy, neuropathy, nephropathy and cardiovascular complications [2]. Diabetes is also associated with profound alterations in the plasma lipid and lipoprotein metabolism. Diabetic dyslipidemia is characterized by elevated triglycerides, elevated LDL-cholesterol, low HDL-cholesterol and the predominance of small dense VLDL particles [3]. Recent studies have reported that some natural compounds have beneficial effects on dyslipidemia and diabetes [4]. In addition, the antihyperlipidemic activity of many medicinal plants has been reported in experimental studies [4]. Therefore, the use of natural compounds derived from medicinal plants, having the double effect of improving both glycemic and lipidemic profiles, may improve the management of diabetes and reduce cardiovascular risk in diabetic patients [5].

Medicinal plants have been used increasingly with greater advocacy for complementary and alternative medicine and continue to play an important role in the development of new drug formulations. The use of the medicinal plant to treat diabetes mellitus has gained growing interest in recent years since the recommendations made by WHO on diabetes mellitus, which encourage the search for safer and effective antidiabetic compounds derived from medicinal plants [6]. Considering the increasing prevalence of diabetes, investigations of the potentials offered by herbal medicines may contribute to the development of alternative therapeutic approaches towards the management and prevention of diabetes mellitus and its complications [7].

Thymus species constitute a group of aromatic plants of the Mediterranean flora belonging to the Lamiaceae family and are commonly used as spices and as traditional medicine remedies [8]. *Thymus satureioides* locally known as "Zaetra" or "Azoukni" is a perennial shrub endemic of Morocco [9]. The decoction and infusion of the aerial parts of this plant are used in the Moroccan folk medicine to treat various diseases such as inflammation, hypertension, digestive ailments, cough bronchitis, whooping and rheumatism [10, 11]. Pharmacological studies have reported anti-inflammatory and analgesic effects of *Thymus satureioides* in experimental animals [12, 13]. *In vitro* studies have shown that this plant possesses antioxidant [14], anti-hemolytic [15], antibacterial [16] and anticoagulant activities [17]. Furthermore, another study demonstrated the antihyperlipidemic effect of polyphenol-rich extract from *Thymus satureioides* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic rats [18]. In addition, the essential oil of this plant has been investigated for its chemical composition and antibacterial activity [19].

Ethnobotanical surveys conducted in some regions of Morocco have reported the traditional use of *Thymus satureioides* in the treatment of diabetes mellitus [20-22]. The anti-diabetic effect of this plant has never been experimentally investigated. Thus, the aim of the present study was to evaluate the antidiabetic and antihyperlipidemic activities of aqueous extract from aerial parts of *Thymus satureioides* in streptozotocin-induced diabetic rats.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

STZ, quercetin and folin-Ciocalteu reagent were purchased from Sigma-Aldrich Co (Germany). D-glucose was purchased from Farco

Chemicals, while glibenclamide was obtained from Promopharm (Morocco). Gallic acid and aluminium chloride were purchased from VWR chemicals. All other chemicals and reagents used in this study were analytical grade.

Plant material

The aerial parts of *Thymus satureioides* were collected in April 2015 in the region of Agadir Ida-Outanane (Latitude: 30 °37', Longitude: 9 °22', Altitude: 760 m), South-west of Morocco. The plant material was taxonomically identified and authenticated, and a voucher specimen (specimen number MA-FSTF 15) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, Faculty of Sciences and Techniques, Fez, Morocco.

Preparation of aqueous extract

The aerial parts of *Thymus satureioides* were washed well with water; air dried at room temperature and then reduced to a coarse powder using an electric grinder. The aqueous extract was prepared by infusion according to the traditional method used in Morocco [23]. The powder (40 g) was dissolved in 400 ml of boiling distilled water, and the mixture was homogenized for 60 min. The extract was then filtered through whatman filter paper and concentrated under vacuum at 50 °C using a rotary evaporator. The extract was kept in a sterile sample tube, under refrigerated conditions, until use for pharmacological investigations.

Determination of total phenol contents

Total phenolic contents in the aqueous extract were determined using the folin-ciocalteu reagent assay [24]. An aliquot (500 µl) of the extract (5 mg/ml) or standard solution was mixed with 2.5 ml of folin-ciocalteu reagent 10% (v/v). Thereafter, 2 ml of 7.5% Na₂CO₃ solution was added to the mixture followed by incubation at 45 °C for 15 min. The absorbance against a blank was measured at 765 nm. Gallic acid was used to prepare a standard curve (0.05–0.25 mg/ml; $y = 0.009x + 0.042$; $r^2 = 0.995$, where y is the absorbance and x is the standard concentration). The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of extract. Experiments were conducted in triplicate.

Determination of flavonoid content

The flavonoid content in the extract was measured by the aluminum chloride colorimetric method [25]. An aliquot (500 µl) of the extract (5 mg/ml) or standard solution of quercetin was mixed respectively with 1.5 ml of methanol and 100 µl of 10% AlCl₃ solution. After 5 min, 0.5 ml of 1M NaOH solution and 2.5 ml of dH₂O were added to the mixture. The solution was well mixed, and the absorbance against blank was determined at 451 nm. Quercetin was used for standard curve construction (0.05–0.3 mg/ml; $y = 0.007x + 0.104$; $r^2 = 0.995$). The results were expressed as mg quercetin equivalents (QE)/g of extract.

Animals

Wistar rats of either sex weighing 180–230 g were used in this study. They were obtained from the animal facility of the Biology Department (Faculty of Sciences and techniques, Fes, Morocco). The animals were housed in appropriate cages and had free access to water and laboratory rodent chow. Experiments procedures were carried out in accordance with the international guidelines for the care and use of laboratory animals [26]. All animal procedures were approved by the Institutional Ethical Committee of Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Morocco.

Acute toxicity

Aqueous leaf extract of *Thymus satureioides* in 500 mg/kg doses was administered to the rats orally. All animals were observed for 24 h after treatment.

Evaluation of antidiabetic activity

Induction of experimental diabetes

Experimental diabetes was induced in overnight fasted rats by an intraperitoneal injection of 45 mg/kg body weight of streptozotocin

(STZ). STZ was dissolved in freshly prepared citrate buffer (0.1 mol/l, pH 4.5). Fasting blood glucose was measured in rats 72 h after the injection. Rats with fasting blood glucose level >200 mg/dl were considered diabetic and included in the study [27].

Experimental design

The experimental rats were randomly divided into four groups of six rats each:

Group I: normal control rats, treated with distilled water.

Group II: diabetic control rats, treated with distilled water.

Group III: diabetic rats treated with *Thymus satureioides* aqueous extract (TS Aq Ext 500 mg/kg b.w.).

Group IV: diabetic rats treated with glibenclamide (2 mg/kg b.w.)

The selection of the effective dose (0.5 g/kg/day of b.w.) of *Thymus satureioides* aqueous extract was based on a prior preliminary short-term study. The plant extract and the drug glibenclamide were given in aqueous solution daily by intragastric gavage for 28 consecutive days. Body weight was recorded weekly. The fasting blood glucose (FGB) was measured on days 1, 7, 14, 21 and 28 of the treatment to evaluate the antidiabetic activity of the extract. Rats fasted for 12 h and the blood from tail vein was collected for FGB estimation using a glucometer (On Call plus®) in which its measurement principle is based on glucose oxydase method.

The oral glucose tolerance test (OGTT)

On the 28th day of treatment, the 12-h fasted animals were subjected to an oral glucose tolerance test. Fasting glycemia was measured and indicating zero time of the test. After this procedure, animals received their treatment orally and after a 60-minute interval, all groups received an oral load of glucose (2 g/kg b.w.). The blood sample was obtained by tail vein puncture at 30, 60, 90, and 120 min after glucose administration and blood glucose level (BGL) was determined at these time intervals using the On Call® Plus blood glucose monitoring system and compatible blood glucose test strips. Curves of BGL (mg/dl) versus the time intervals (min) were constructed, and total glycemic responses were calculated from respective areas under the curve (AUC) during the 120 min of the observation period.

Estimation of biochemical parameters

At the end of the experimental period, the animals were deprived of food overnight and then sacrificed by cervical decapitation following anesthesia. Blood was collected in tubes containing heparin for the estimation of lipid, renal function, and kidney function profiles parameters. Total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high-density-lipoprotein-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), urea and creatinine were determined using "Cobas Integra 400 plus" analyzer based on enzymatic/ photometric method.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism version 6.0 for Windows. The difference between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test and values of P less than 0.05 were considered statistically significant. All values are expressed as the mean ± SD.

RESULTS

Total phenol and flavonoids contents

The total phenolic content in *Thymus satureioides* extract was estimated to be equivalent to 121.05 ± 4.25 mg of gallic acid equivalent/g of plant extract, and the flavonoids content was 83.52 ± 2.12 mg of quercetin equivalent/g of plant extract.

Acute toxicity

After oral administration of the aqueous extracts of *Thymus satureioides* 500 mg/kg doses, no mortality was recorded for all

animals observed 24 h after the extract administration. There were no lethality or toxic reactions found at the dose selected until the end of the study.

Changes in body weight

The effect of aqueous extract of *Thymus satureioides* on body weight of STZ-induced diabetic rats is summarized in table 1. A progressive

decrease in body weight was observed in the untreated diabetic group throughout the experimental period compared to healthy nondiabetic animals. This decrease in body weight was very significant at the end of the fourth week ($P<0.001$). The diabetic groups treated with *Thymus satureioides* aqueous extract and glibenclamide (2 mg/kg) for 4 w showed a significant improvement in body weight compared to the diabetic control group ($P<0.01$).

Table 1: Changes in the body weight of normal and diabetic rats during the experimental period of 28 d

Treatment	Body weight (g)				
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Normal control	202.00±22.75	212.67±23.93	232.67±31.27	238.50±27.73	245.63±28.39
Diabetic control	212.14±15.44	183.45±26.91	154.34±17.54 ^{##}	127.67±12.38 ^{###}	124.10±31.73 ^{###}
Diabetic+TS Aq Ext (500 mg/kg)	218.17±10.73	207.51±10.48	193.67±8.17 ^{**}	185.35±6.58 [*]	179.33±4.55 ^{**}
Diabetic+glibenclamide (2 mg/Kg)	210.15±7.04	202.36±11.23	190.67±7.45 ^{**}	184.17±5.47 [*]	177.24±7.43 ^{**}

Values are expressed as mean±SD (n = 6 rats). ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$ compared to normal control; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ compared to diabetic control.

Effect of *Thymus satureioides* extract on glycemia in diabetic rats

The effect of repeated oral administration of *Thymus satureioides* extract (500 mg/kg per day) on fasting blood glucose levels of diabetic rats is shown in fig. 1. Fasting blood glucose was estimated on days 1, 7, 14, 21 and 28 of the treatment. At the beginning of the experiment, the FBG levels were significantly higher in the diabetic group compared to the nondiabetic control group ($P<0.001$). Four

weeks administration of *Thymus satureioides* aqueous extract resulted in a significant reduction ($p<0.001$) in FBG levels of the diabetic treated rats, starting from the 14th day of treatment, compared to the diabetic control group. This reduction was maximum in the fourth week as reaching a 23% reduction, compared to day 0 and a 32% reduction compared to the control values of the untreated diabetic group. Standard drug glibenclamide also exhibited a significant reduction in FBG levels of the treated animals in comparison with the diabetic control ($p<0.001$).

Table 2: Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on levels of urea, creatinine, ALAT and ASAT in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments

Treatment	Hepatic markers		Renal markers	
	ALAT (UI/l)	ASAT (UI/l)	Urea (g/l)	Creatinine (mg/l)
Normal control	68.37±7.15	127.5±12.5	0.43±0.06	5.28±0.65
Diabetic control	127.05±10.46 ^{##}	210.4±25.4 ^{##}	0.64±0.07 ^{##}	7.47±0.64 ^{##}
Diabetic+TS Aq ext (500 mg/kg)	87.54±15.53 [*]	159.6±12.24 [*]	0.51±0.07 [*]	6.24±0.85 [*]
Diabetic+glibenclamide (2 mg/Kg)	85.31±12.50 [*]	168.83±21.05 [*]	0.53±0.05 [*]	6.32±0.61 [*]

Values are expressed as mean±SD (n = 6 rats). ^{*} $P<0.05$ compared to diabetic control; ^{##} $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$ compared to normal control.

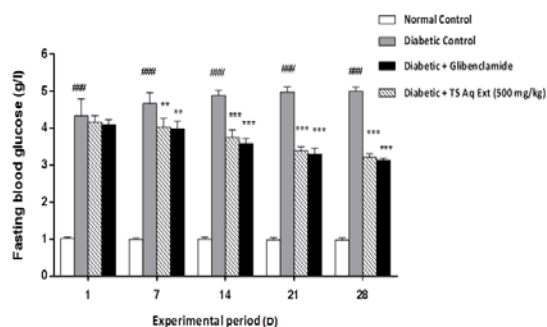


Fig. 1: Effect of aqueous extract of *Thymus satureioides* on fasting blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats during the experimental period of 28 d

Values are expressed as mean±SD (n = 6 rats). ^{###} $P<0.001$ compared to normal control, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ compared to diabetic control

Oral glucose tolerance test

The analysis of the glucose tolerance test and the comparison between the AUCs of glycemia during the 120 min period are presented in fig. 2. The blood glucose level in both normal and diabetic control rats showed a high peak value at 30 min after glucose load. Oral administration of aqueous extract as well as glibenclamide to diabetic rats induced a significant decrease in blood glucose concentrations at 30 min ($p<0.001$) and 60 ($p<0.01$) min when compared with the diabetic control rats. The AUCs of glucose

concentration in groups treated with *Thymus satureioides* extract and glibenclamide were significantly reduced by 14 % and 15 %, respectively in comparison with the diabetic control group (fig. 3).

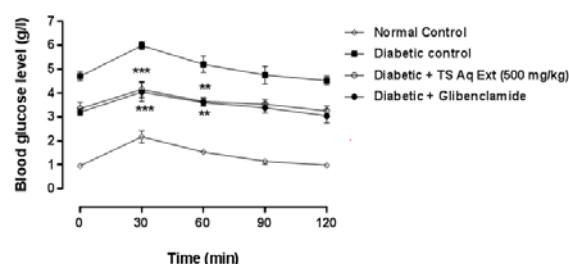


Fig. 2: Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats during OGTT

Values are expressed as mean±SD (n = 6 rats). ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ compared to diabetic control

Effect of *Thymus satureioides* extract on plasma lipid profile

Fig. 4 and 5 depict the levels of total cholesterol and triglycerides in control and experimental groups of rats. Results showed that the levels of total cholesterol and triglycerides were increased in the diabetic control group by 36 % and 38 % respectively, after 28 d of experiments, in comparison to the normal control rats ($p<0.05$). On the other hand, diabetic animals treated with glibenclamide and the aqueous extract of *Thymus satureioides* showed a significant

decrease in plasma triglycerides and total cholesterol when compared to the diabetic control rats ($p < 0.05$).

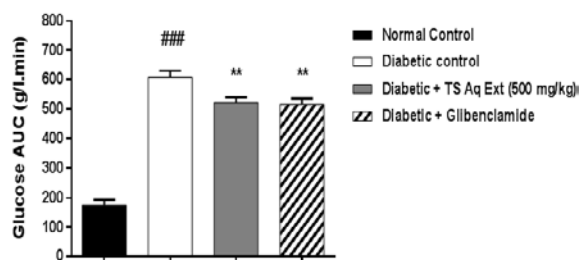


Fig. 3: Effect of *Thymus satureioides* extract on total area under the curves (AUCs) of blood glucose

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 6 rats). ### $P < 0.001$ compared to normal control, ** $P < 0.01$ compared to diabetic control

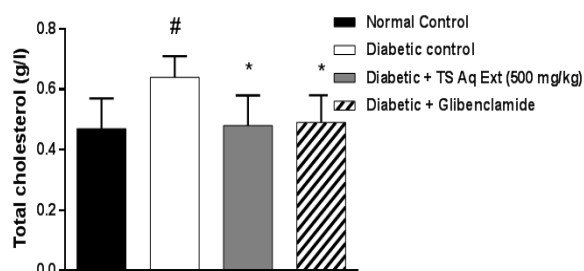


Fig. 4: Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on total cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 6 rats). # $P < 0.05$ compared to normal control, * $P < 0.05$ compared to diabetic control

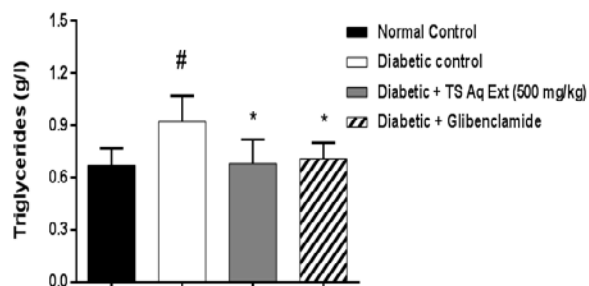


Fig. 5: Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on triglycerides in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 6 rats). # $P < 0.05$ compared to normal control, * $P < 0.05$ compared to diabetic control

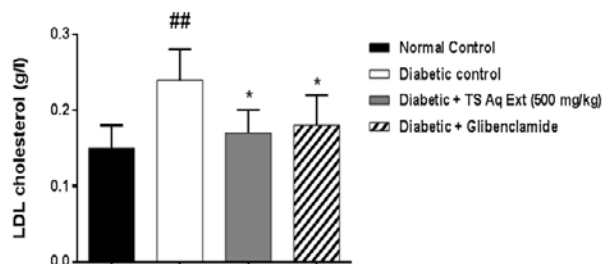


Fig. 6: Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on LDL-cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 6 rats). ## $P < 0.01$ compared to normal control, * $P < 0.05$ compared to diabetic control

The level of LDL-C was significantly higher in the diabetic control rats compared to the normal control rats ($p < 0.05$). The administration of *Thymus satureioides* extract to STZ-induced diabetic rats significantly ($p < 0.05$) decreased their plasma level of LDL-C by 30 %. Glibenclamide treated group also showed a significant reduction in LDL-C levels compared to the diabetic control group ($P < 0.05$) (fig. 6).

The HDL-C level was significantly reduced in the diabetic control group in comparison to the values of normal control rats ($p < 0.05$). The diabetic group treated with the aqueous extract of *Thymus satureioides* showed a significant increase in the level of HDL-C by 23 % when compared to the untreated diabetic rats. On the other hand, no significant change was observed in HDL-C level of glibenclamide treated group (fig. 7).

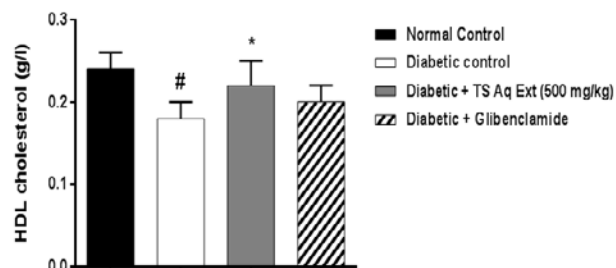


Fig. 7: Effect of the aqueous extract of *Thymus satureioides* on HDL-cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats after 28 d' experiments

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 6 rats). # $P < 0.05$ compared to normal control, * $P < 0.05$ compared to diabetic control

Effect of *Thymus satureioides* extract on hepatic and renal function markers

The levels of hepatic and renal functional markers of experimental rat groups are presented in table 2. There was a significant ($p < 0.05$) elevation in the activities of ALAT and ASAT in diabetic control rats as compared with non-diabetic control group. The administration of *Thymus satureioides* extract (500 mg/kg body w. t.) to STZ-induced diabetic rats for 28 d significantly decreased the activities of these enzymes when compared to the diabetic control rats ($p < 0.05$). Streptozotocin-induced diabetic rats displayed a significant ($p < 0.05$) increase in urea and creatinine levels after 4 w as compared to normal control group. However, treatment of diabetic rats with aqueous extracts of *Thymus satureioides* significantly reduced their creatinine and urea levels by 18 % and 16 % respectively in comparison to the diabetic group ($p < 0.05$). A significant decrease in the levels of urea and creatinine was also observed in diabetic rats treated with glibenclamide ($p < 0.05$).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, the present study represents the first assessment of the antidiabetic and antihyperlipidemic activities of the aqueous extract from aerial parts of *Thymus satureioides* on STZ induced diabetic rats. Administration of the aqueous extract of *Thymus satureioides* to diabetic rats for 4 w resulted in a significant diminution of fasting blood glucose level in respect to the untreated diabetic rats. The antidiabetic activity of the extract was similar to that obtained for glibenclamide, a standard antidiabetic drug used as a positive control in experimental diabetes studies. The effect of *Thymus satureioides* extract on glucose tolerance and tissue utilization of glucose was assessed in diabetic rats using the OGTT test which assesses the rate of tissue uptake and utilization of glucose. Diabetic rats showed a significant increase in the AUC of glucose compared to normal control rats. Impaired glucose tolerance is attributed to increased hepatic gluconeogenesis and abnormal utilization of glucose by the tissues which are caused by pancreatic dysfunction [28]. On the other hand, the significant reduction in the AUC of glucose observed in the treated group suggests that the extract is induced an increase in glucose utilization and glucose

tolerance by the body tissues in diabetic rats which indicates improved glucose homeostasis.

Diabetic rats manifested a significant reduction in body weight concomitant with hyperglycemia. Decrease in body weight of diabetic rats is attributed to the intensive catabolism of fats and structural proteins which used as an energy source due to unavailability of carbohydrates [29]. Insulin plays an important role in the regulation of protein synthesis and proteolysis in skeletal muscle. In insulin resistance or deficiency state, muscle wasting and weight loss in diabetic rats results from the excessive catabolism of protein which provides amino acids for gluconeogenesis [30]. Oral administration of *Thymus satureioides* aqueous extract and glibenclamide for 28 consecutive days to diabetic rats improved their body weight, which reflects the better control of the hyperglycemic state in these rats.

In diabetes, hyperglycemia is associated with dyslipidemia, which represents a risk factor for cardiovascular diseases [31]. The abnormally high level of serum lipids is mainly due to the uninhibited actions of lipolytic hormones on the fat depots, which are caused by the deficiency in insulin secretion or insulin sensitivity [31]. Under normal circumstances, the enzyme lipoprotein lipase is activated by insulin, which hydrolyzes triglycerides. However, in diabetic state insulin deficiency causes inactivation of lipoprotein lipase, resulting in hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia [32]. Furthermore, in the diabetic state the secretion of very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL) is stimulated by triglycerides and such increase in very low-density lipoprotein cholesterol particles increases the LDL-C particles and reduces the HDL-C level [33]. In our study, the altered serum lipid profile was found in diabetic rats. This finding is in correlation with the findings of previous studies [34, 35]. Alterations in serum lipid profile were attenuated after 4 w administration of *Thymus satureioides* aqueous extract to diabetic rats. The effect of *Thymus satureioides* extract on lipid metabolism might be directly attributable to the improvement in insulin. On the other hand, the antihyperlipidemic activity of the extract may also attribute to other lipid-lowering mechanisms, such as repressing some key enzymes involved in cholesterol and fatty acids biosynthesis. Regulation of plasma or tissue lipid levels led to a decrease in the risk of micro or macrovascular diseases and related complications [36]. Therefore, the extract could be beneficial in improving lipid metabolism, which can lead to preventing diabetes complications such as atherosclerosis and coronary heart diseases.

Elevated serum levels of ASAT and ALAT are indicative of cellular leakage and loss of functional integrity of the hepatic cell membranes implying hepatocellular damage [37]. In the present study, high serum levels of ASAT and ALAT were detected in the diabetic group in comparison with the normal control. This finding suggests possible damage to the liver caused by the injection of STZ, which is one of the characteristic changes in experimental diabetes induced by this compound. Liver damage in diabetic rats was evidenced. However, diabetic groups treated with *Thymus satureioides* aqueous extract for 28 d showed a significant reduction in the levels of ASAT and ALAT levels when compared to the untreated diabetic control. This result showed that aqueous extract exhibited hepatoprotective activity in diabetic rats by decreasing serum ASAT and ALAT levels, which consequently alleviated the damage caused by STZ. The high blood levels of urea and creatinine are considered as markers of renal damages [38]. Therefore, increased levels of urea and creatinine found in diabetic rats suggest impaired renal function. On the other hand, the administration of *Thymus satureioides* aqueous extract to the diabetic rats significantly reduced the levels of creatinine and urea. This suggests that the extract of *Thymus satureioides* may exhibit a preventive action against kidney damages in diabetic condition.

The results of the present study demonstrated that the aqueous extract of *Thymus satureioides* was rich in total polyphenols and flavonoids. These phytochemical compounds present in the aqueous extract may account for the observed pharmacological activities. Several studies have reported that polyphenols and flavonoids compounds bring their antidiabetic effect by various mechanisms,

including inhibition of α -amylase activity, stimulation of insulin secretion and increase of peripheral glucose consumption [39]. Several flavonoid-containing plants with antidiabetic potential have also shown an antihyperlipidemic effect by modulating enzymes involved in lipid metabolism [40]. Flavonoids and polyphenols have also been reported to attenuate complications associated with diabetes in liver, kidneys and blood vessels through mechanisms such as aldose reductase inhibition, advanced glycation end-products inhibition and the decrease of oxidative stress [41].

CONCLUSION

It can be concluded that the aqueous extract of *Thymus satureioides* has potential antidiabetic effect in STZ induced diabetic rats which were as effective as glibenclamide. The aqueous extract also had the potential to reduce diabetic complications by attenuating dyslipidemia and preventing liver and kidney damages. These pharmacological activities may be attributed to the presence of secondary metabolites like polyphenols and flavonoids in *Thymus satureioides* extract which have been found to be beneficial in controlling diabetes. Further investigations are needed to isolate the bioactive components of *Thymus satureioides* involved in these pharmacological activities as well as the elucidation of their mechanism of action. In addition, toxicological studies should be performed to evaluate the innocuity of this plant.

CONFLICT OF INTERESTS

We declare that we have no conflict of interest

REFERENCES

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2013;36:S67-S74.
2. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:228-36.
3. Wu L, Parhofer KG. Diabetic dyslipidemia. *Metabolism* 2014;63:1469-79.
4. Leihner A, Mündlein A, Drexel H. Phytochemicals and their impact on adipose tissue inflammation and diabetes. *Vascul Pharmacol* 2013;58:3-20.
5. Ghorbani A. Phytotherapy for diabetic dyslipidemia: evidence from clinical trials. *Clin Lipidol* 2013;8:311-9.
6. El-Abhar HS, Schaalan MF. Phytotherapy in diabetes: a review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes* 2014;5:176-97.
7. Patel DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S. Diabetes mellitus: an overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012;2:411-20.
8. Lisi A, Tedone L, Montesano V, Sarli G, Negro D. Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. *Food Chem* 2011;125:1284-6.
9. Bellakhdar J, Claiss R, Fleurentin J, Younos C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol* 1991;35:123-43.
10. El Hafian M, Benlandini N, Elyacoubi H, Zidane L, Rochdi A. Étude floristique et ethnobotanique des Plantes médicinales utilisées au niveau de la préfecture d'Agadir-Ida-Outanane (Maroc). *J Appl Biosci* 2014;81:7198-213.
11. Merzouki A, Ed-derfoufi F, Molero Mesa J. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakkir district (NW Morocco). *Fitoterapia* 2000;71:278-307.
12. Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, Ildirissi A, Camporese A, Sosa S, et al. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J Ethnopharmacol* 2004;91:31-6.
13. Elhabazi K, Ouacherif A, Laroubi A, Aboufatima R, Abbad A, Benharref A, et al. The Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satureioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. *Afr J Microbiol Res* 2008;2:262-7.
14. Orłowska M, Kowalska T, Sajewicz M, Pytlakowska K, Bartoszek M, Polak J, et al. Antioxidant activity of selected thyme (*Thymus L.*) species and study of the equivalence of different measuring methodologies. *J AOAC Int* 2015;98:876-82.

15. Ramchoun M, Sellam K, Harnafi H, Alem C, Benlyas M, Khallouki F, et al. Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus satureioides* collected from Tafilalet Region, southeast of Morocco. Asian Pac J Trop Biomed 2015;5:93-100.
16. Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez JA, Fern'andez-L'opez J. Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. Food Control 2012;27:294-9.
17. Khouya T, Ramchoun M, Hmidani A, Amrani S, Harnafi H, Benlyas M, et al. Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties. Asian Pac J Trop Biomed 2015;5:636-44.
18. Ramchoun M, Harnafi H, Alem C, B'uchele B, Simmet T, Rouis M, et al. Hypolipidemic and antioxidant effect of polyphenol-rich extracts from Moroccan thyme varieties. ESPEN J 2012;7:e119-e24.
19. El Bouzidi L, Jamali CA, Bekkouche K, Hassani L, Wohlmuth H, Leach D, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. Ind Crops Prod 2013;43:450-6.
20. Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). J Ethnopharmacol 2007;110:105-17.
21. Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). J Ethnopharmacol 2001;77:175-82.
22. Abouri M, El Mousadik A, Msanda F, Boubaker H, Saadi B, Cherifi K. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Tata Province, Morocco. Int J Med Plants Res 2012;1:99-123.
23. Lemhadri A, Hajji L, Michel JB, Eddouks M. Cholesterol, and triglycerides lowering activities of caraway fruits in normal and streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol 2006;106:321-6.
24. Aquino R, Morelli S, Lauro MR, Abdo S, Saija A, Tomaino A. Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. J Nat Prod 2001;64:1019-23.
25. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999;64:555-9.
26. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC: The National Academies Press; 2011.
27. Sangeetha MS, Priyanga S, Hemmalakshmi S, Devaki K. *In vivo* antidiabetic potential of *Cyclea peltata* in streptozotocin-induced diabetic rats. Asian J Pharm Clin Res 2015;8:103-8.
28. Abdallah HM, Farag MA, Abdel-Naim AB, Ghareib SA, Abdel-Sattar EA. Mechanistic evidence of *Viscum schimperi* (Viscaceae) antihyperglycemic activity: from a bioactivity-guided approach to comprehensive metabolite profiling. Phytother Res 2015;29:1737-43.
29. Krishnasamy R. Antioxidant and antidiabetic activity of *Tectona grandis* linn. In alloxan induced albino rats. Asian J Pharm Clin Res 2013;6:174-7.
30. Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DDP, Pierre K, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 2014;151:784-90.
31. Chehade JM, Gladysz M, Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. Drugs 2013;73:327-39.
32. Girija K, Lakshman K, Udaya C, Sabhya SG, Divya T. Anti-diabetic and anti-cholesterolemic activity of methanol extracts of three species of *Amaranthus*. Asian Pac J Trop Biomed 2011;1:133-8.
33. Karim MN, Ahmed KR, Bukht MS, Akter J, Chowdhury HA, Hossain S, et al. Pattern and predictors of dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetes Metab Syndr 2013;7:95-100.
34. Vidhya R, Emilin Renitta R. Evaluation of antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of an edible gastropod (*Achatina fulica*) in alloxan-induced diabetic mice. Asian J Pharm Clin Res 2016;9:206-11.
35. Hassan SK, El-Sammad NM, Mousa AM, Mohammed MH, Farrag AERH, Hashim ANE, et al. Antidiabetic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Asian Pac J Trop Biomed 2015;5:462-71.
36. Sakatani T, Shirayama T, Suzaki Y, Yamamoto T, Mani H, Kawasaki T, et al. The association between cholesterol and mortality in heart failure comparison between patients with and without coronary artery disease. Int Heart J 2005;46:619-29.
37. Subramanian M, Balakrishnan S, Chinnaiyan SK, Sekar VK, Chandu AN. Hepatoprotective effect of leaves of *Morinda tinctoria* Roxb. against paracetamol induced liver damage in rats. Drug Invent Today 2013;5:223-8.
38. Honoré SM, Cabrera WM, Genta SB, Sánchez SS. Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. Food Chem Toxicol 2012;50:1704-15.
39. Patel DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus an overview of its pharmacological aspects. Asian Pac J Trop Dis 2012;2:239-50.
40. Unnikrishnan MK, Veerapur V, Nayak Y, Mudgal PP, Mathew G. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoids. Polyphenols Hum Health Dis 2014;1:143-61.
41. Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. J Nutr Biochem 2013;24:1777-89.

How to cite this article

- Mohamed EL Kabbaoui, Alae Chda, Najlae Mejrhit, Ouarda Azdad, Abdellah Farah, Lotfi Aarab, Rachid Bencheikh, Abdelali Tazi. Antidiabetic effect of *thymus satureioides* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Int J Pharm Pharm Sci 2016;8(9):140-145.

Discussion

I-Etude de la toxicité aiguë chez les rats

Une étude préliminaire de la toxicité aiguë des extraits aqueux des deux plantes a été réalisée sur des rats ayant un poids de 180-230 g, et ayant subis une période de jeûne de 16 heures. L'administration des extraits a été faite par voie orale (gavage), en respectant la règle standard de gavage (1ml/100g). Après administration orale d'une dose unique d'extrait de 500 mg/kg, aucune mortalité n'a été enregistrée pour tous les animaux traités après 24 heures. D'autre part, aucune perturbation comportementale n'a été notée durant la période d'observation.

II-Etude de l'activité antidiabétique in vivo

La streptozotocine est un composé nitrosurique isolé de *Streptomyces griseus* [Vavra et al., 1959]. Cette molécule est l'une des substances chimiques utilisées pour l'induction du diabète expérimental chez les animaux de laboratoire [Agarwal, 1980]. La STZ peut provoquer une carence sévère en insuline qui résulte d'une destruction massive des cellules β pancréatiques. Les effets toxiques de cette molécule semblent être liés à une altération de la membrane plasmique des cellules β , à la fragmentation d'ADN et à une déplétion de taux de NAD⁺ cellulaire [Agarwal, 1980].

II-1 Effet sur le poids corporel

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'injection de la STZ à une dose de 45 mg/kg induit un diabète caractérisé par une perte sévère et progressive du poids corporel chez les rats diabétiques témoins par rapport aux rats normaux ($p < 0,001$) (**Tableau 1, Article 1; Tableau 1, Article 2**). Chez les rats diabétiques traités par les extraits aqueux de *Cistus ladaniferus*, *Thymus satureioides* et la glibenclamide pendant 4 semaines, la perte pondérale

était moins sévère par rapport au groupe diabétique témoin ($P < 0,01$) (**Tableau 1, Article 1; Tableau 1, Article 2**).

La perte pondérale peut être attribuée à l'atrophie musculaire et à l'inhibition de la croissance. Cette perte de poids chez les rats diabétiques est liée indirectement à **une déficience** en insuline. Ce qui a pour effet de diminuer l'absorption des acides aminés par les tissus et une diminution de la synthèse des protéines (**Stephen et al, 2012**). La perte de poids chez les animaux diabétiques peut s'expliquer par une augmentation du catabolisme lipidique et protéique, qui résulte d'un défaut d'utilisation des glucides nécessaires à la production d'énergie (**Sathishsekar and Subramanian, 2005**). En outre, la perte pondérale retrouvée dans le diabète sucré est également attribuée à l'activation de la voie de la néoglucogenèse qui entraîne une accélération du catabolisme des protéines et des graisses tissulaires pour la production du glucose (**Daisy and Jeeva Kani, 2012**). Dans cette étude, la capacité des extraits aqueux à protéger les rats diabétiques de la perte massive du poids corporel peut être due à leur capacité à améliorer l'homéostasie glycémique en réduisant les taux des lipides plasmatiques et en inhibant la voie de la néoglucogenèse [**Swanston-Flat ., 1990 ; Rajagopal & Sasikala, 2008**].

II-2 Effet anti-hyperglycémiant des extraits aqueux

La glycémie à jeun a été mesurée chez tous les groupes de rats les jours 1, 7, 14, 21 et 28 du traitement (**Figure 1, Article 1; et Figure 1, Article 2**). L'injection de la streptozotocine a provoqué une augmentation significative de la glycémie chez les groupes de rats diabétiques ($P < 0,001$) par rapport au groupe de rats sains témoins ($p < 0,001$) (**Figure 1, Article 1; et Figure 1, Article 2**). Chez le groupe diabétique témoin, la glycémie a continué de s'élever pour atteindre son maximum à la troisième semaine de traitement ($5,12 \pm 0,73$ g/l). Par contre chez les groupes de rats diabétiques, l'administration des extraits aqueux aux rats pendant les

4 semaines a provoqué une baisse significative ($P < 0,001$) de la glycémie à partir de la deuxième semaine par rapport au groupe témoin diabétique. A la fin de la période de traitement, la diminution de la glycémie était de 34 % et 32 % pour les groupes traités par les extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides*, respectivement par rapport aux valeurs du groupe diabétique témoin.

II-3 Test de tolérance au glucose par voie orale

Les résultats du test de tolérance au glucose sont présentés dans la figure 2 (**Figure 2, Article 1; et Figure 2, Article 2**). La glycémie des rats témoins et traités a atteint un pic de 30 minutes après l'administration de la charge de glucose. Un effet positif sur la réponse des rats à la charge du glucose a été noté chez les rats traités par les extraits et la glibeclamide. Chez ces deux groupes une diminution significative de la glycémie a été observée 30 ($P < 0,001$) et 60 ($P < 0,01$) minutes après l'administration de la charge de glucose (2 g/kg). Le calcul des AUC de l'évolution de la glycémie a montré une réduction significative des AUC de la glycémie chez les groupes traités par les extraits et la glibenclamide ($P < 0,01$) (**Figure 3, Article 1; et Figure 3, Article 2**).

Les résultats de ce test ont montré que les extraits peuvent induire significativement une utilisation très active du glucose par les tissus périphériques, ce qui explique l'amélioration de la tolérance des rats au glucose. Dans la présente étude, l'élévation de la tolérance des tissus au glucose provoquée par les extraits pourrait être attribuée à une augmentation du stockage du glucose au niveau du foie sous forme de glycogène. En effet, cette internalisation intense du glucose au niveau du foie chez les animaux traités par les extraits par rapport aux rats témoins peut se produire suite à une stimulation des hépatocytes [Wang et al, 1997]. La stimulation du passage du glucose sanguin vers les tissus périphériques, en l'occurrence les tissus hépatiques, est susceptible d'être médié par différentes voies incluant l'activation des

enzymes impliquées dans la glycogénogenèse, [Subash-Babu et al., 2008], l'activation des transporteurs membranaires du glucose (GLUT) et la potentialisation de l'action de l'insuline [Wang et al, 1997].

II-4 Effet sur les paramètres du profil lipidique

Le bilan lipidique est d'une importance cruciale de part son implication dans plusieurs maladies cardiovasculaires et dans le diabète [Chehade et al, 2013]. Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté une association entre les perturbations du métabolisme lipidique et le développement des complications cardiovasculaires associées au diabète [Fuster et al., 2005 ; Fenton, 2006; Sowers et al, 2001].

Les résultats du dosage des paramètres du profil lipidique chez les rats témoins et les rats diabétiques sont illustrés dans les figures 4, 5, 6 et 7 (**Articles 1 et 2**). Chez les rats diabétiques, une augmentation significative ($P < 0,001$) de la concentration sérique du cholestérol total, LDL-cholestérol et des triglycérides a été notée par rapport au groupe contrôle. Chez les rats diabétiques traités, l'administration des extraits aqueux à une dose de 500 mg/kg pendant 4 semaines a diminué significativement leurs concentrations sériques du cholestérol total, LDL-cholestérol et des triglycérides. Par ailleurs, les résultats ont aussi montré une augmentation significative des concentrations sériques du HDL-cholestérol chez les groupes traités par rapport au groupe témoin ($P < 0,05$). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs études chez des rats rendus diabétiques par la STZ [Eidi A et al., 2006 ; Sharma et al., 2008].

L'hyperlipidémie observée peut être liée à une carence en insuline qui régule l'activité de l'enzyme (HMG-coA réductase) impliquée dans la biosynthèse du cholestérol [Chen et al., 2006]. En outre, l'activité anti-hyperlipidémiant des extraits peut impliquer différents mécanismes tels que la modification du métabolisme des lipoprotéines, l'augmentation de

l'activité de l'enzyme Lécithin Cholestérol Acyl Transférase (LCAT), [Khanna et al., 2002] et la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol lié aux acides biliaires [Kritchevsky., 1978]. La diminution du taux des triglycérides peut être attribuée à l'augmentation du catabolisme des LDL par activation de la LCAT et des lipases tissulaires [Khanna et al.2002].

II-5 Evaluation des taux de transaminases, d'urée et de créatinine

Les valeurs des paramètres rénaux et hépatiques des différents groupes sont présentées dans le tableau 2 (**Articles 1 et 2**). Les taux des enzymes hépatiques ALAT et ASAT étaient significativement élevés chez les rats diabétiques témoins par rapport aux rats témoins non diabétiques ($p < 0,05$). L'administration des extraits aqueux (500 mg/kg) chez les rats diabétiques pendant 28 jours a diminué de façon significative les taux de ces enzymes hépatiques par rapport aux rats diabétiques témoins ($p < 0,05$). Les rats diabétiques ont montré également une augmentation significative des taux d'urée et de la créatinine après 4 semaines de traitement par rapport au groupe témoin normal ($p < 0,05$). Cependant, le traitement des rats diabétiques par l'extrait aqueux a réduit de manière significative leurs taux de créatinine et d'urée, par rapport aux rats diabétiques témoins ($p < 0,05$). Une diminution significative des taux d'urée et de la créatinine a été également observée chez les rats diabétiques traités par la glibenclamide ($p < 0,05$).

L'élévation des taux sanguins d'ASAT et d'ALAT chez rats diabétiques peut être interprétée comme une conséquence de la destruction des cellules hépatiques ou des changements de la perméabilité membranaire de ces cellules, indiquant une altération sévère de la fonction du foie (**Florence et al, 2014**). La réduction des taux des enzymes hépatiques chez les rats traités par les extraits pourrait être due à la présence de composés hépatoprotecteurs qui peuvent atténuer les effets toxiques de la STZ (**Florence et al, 2014**).

L'urée est le produit final du catabolisme des protéines tissulaires [Boubchir., 2002]. Une accumulation anormale de l'urée dans la circulation sanguine a été notée chez les animaux diabétiques [Honoré et al, 2012]. Cela peut être expliqué par une dégradation accélérée des protéines plasmatiques et hépatiques ou par l'augmentation de l'élimination hépatique du nitrogène sous forme d'urée. Par ailleurs, l'augmentation de l'urée sanguine à jeun peut résulter d'un dysfonctionnement rénal [Boubchir., 2002]. L'administration des extraits aux rats diabétiques a réduit significativement leur taux sanguin d'urée. Ce résultat peut refléter une action préventive contre les dommages hépatiques et rénaux.

La créatinine est issue de la dégradation de la phosphocréatine musculaire qui constitue une forme de stockage d'énergie dans les muscles. Plusieurs facteurs peuvent influencer le taux sanguin de créatinine tels que le régime alimentaire et la masse musculaire [Boubchir et al., 2002]. La concentration plasmatique de la créatinine est un paramètre clinique qui peut permettre l'évaluation de la fonction rénale chez les animaux d'expérimentation [Travlos G.S et al., 1996]. Une réduction significative de ce taux chez les rats diabétiques traités par les extraits pendant les 28 jours peut indiquer une amélioration de la fonction rénale chez les rats diabétiques ou une diminution du catabolisme de la créatine et de la phosphocréatine au niveau des muscles [Palsamy & Subramanian ., 2008].

En conclusion, les résultats obtenus suggèrent que les extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides* peuvent avoir un effet bénéfique dans le contrôle du diabète par diminution de la glycémie, des paramètres des profils lipidique, hépatique et rénal. D'un point de vue expérimental, ces résultats confirment l'effet antidiabétique des extraits chez les rats et soutiennent leur usage traditionnel comme antidiabétiques.

Chapitre II

Etude de l'activité antidiabétique des extraits *in vitro* par évaluation de leur effet sur l'activité de l' α -glucosidase et l' α -amylase pancréatiques. [Résultats non publiés]

Introduction

L'inhibition des enzymes impliquées dans la digestion des glucides complexes (tels que l' α -amylase et/ou l' α -glucosidase) est l'une des approches thérapeutiques utilisées dans la lutte contre l'hyperglycémie chez les diabétiques. Elle a pour but de retarder et de réduire la digestion et l'absorption des glucides ingérés dans le tube digestif (**Puls et al, 1977**).

L' α -glucosidase et l' α -amylase sont des enzymes qui jouent un rôle important dans le processus de digestion des glucides complexes. Par conséquent, l'inhibition de ces deux enzymes peut retarder la digestion des oligosaccharides et des disaccharides, ce qui peut réduire la vitesse d'absorption du glucose ainsi que le taux de glucose dans le plasma, aboutissant finalement à la suppression de l'hyperglycémie postprandiale (**Lebovitz, 1998**).

Par ailleurs, au cours des dernières années, de nombreuses études se sont intéressées aux molécules d'origine naturelle possédant des propriétés inhibitrices de l' α -amylase et l' α -glucosidase et qui peuvent servir au développement de nouveaux composés antidiabétiques pour le traitement du diabète (**Loizzo et al, 2008; Benalla et al, 2010; Cai et al, 2016; Trinh et al, 2016; Jiang et al, 2017; Ouassou et al, 2018**).

La présente étude est une continuité de nos travaux précédents concernant l'étude de l'activité anti-hyperglycémiant *in vivo* des extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides*. L'objectif de cette partie est de tester *in vitro* l'effet de différents extraits sur l'activité de l' α -amylase et de l' α -glucosidase pancréatiques.

Résultats

Les tests d'inhibition de l'activité de l' α -amylase et l' α -glucosidase réalisés *in vitro* montrent que les extraits exercent un effet inhibiteur variable et dose-dépendant. L'extrait de *Cistus ladaniferus* a montré un pourcentage d'inhibition plus élevé d' α -glucosidase que l'extrait de *Thymus satureioides* (**Figures 5 et 6**). A fortes concentrations de 50 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* et de 200 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux de *Thymus satureioides*, les pourcentages d'inhibition étaient d'environ 95 et 91 % respectivement (**Figures 5 et 6**). Par ailleurs, les extraits aqueux ont aussi montré une forte activité inhibitrice de l' α -amylase. A la concentration de 1 mg/ml, le pourcentage d'inhibition dépassait 90 % pour l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* et 80% pour l'extrait aqueux de *Thymus satureioides* (**Figure 7**). Ces résultats suggèrent que les extraits de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides* peuvent être bénéfiques dans la régulation de l'hyperglycémie postprandiale en inhibant l'absorption intestinale des glucides.

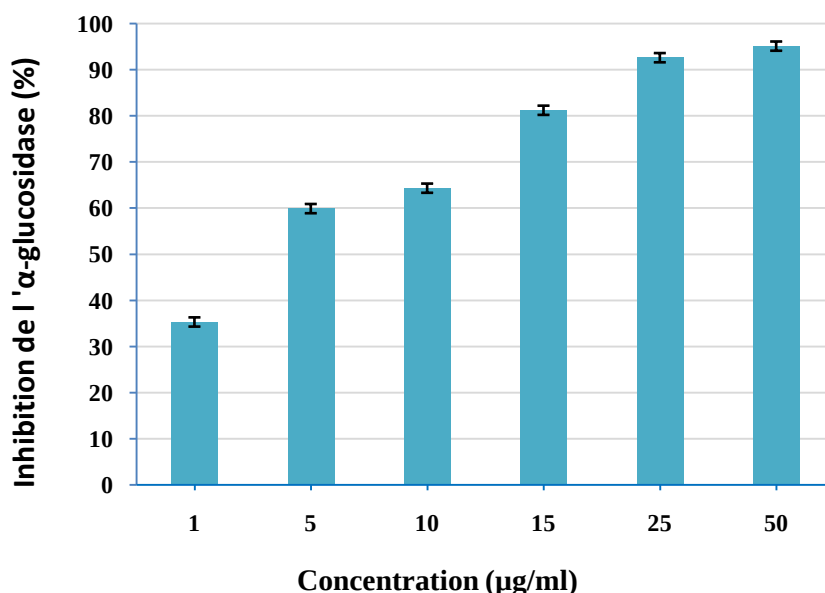


Figure 9: Effet inhibiteur de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* sur l' α -glucosidase. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3)

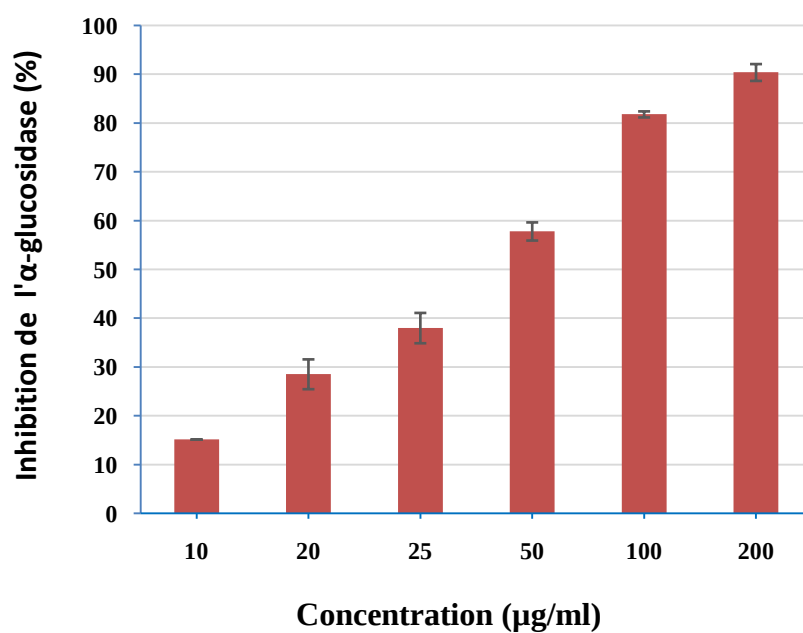


Figure 10: Effet inhibiteur de l'extrait aqueux de *Thymus satureioides* sur l' α -glucosidase. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3).

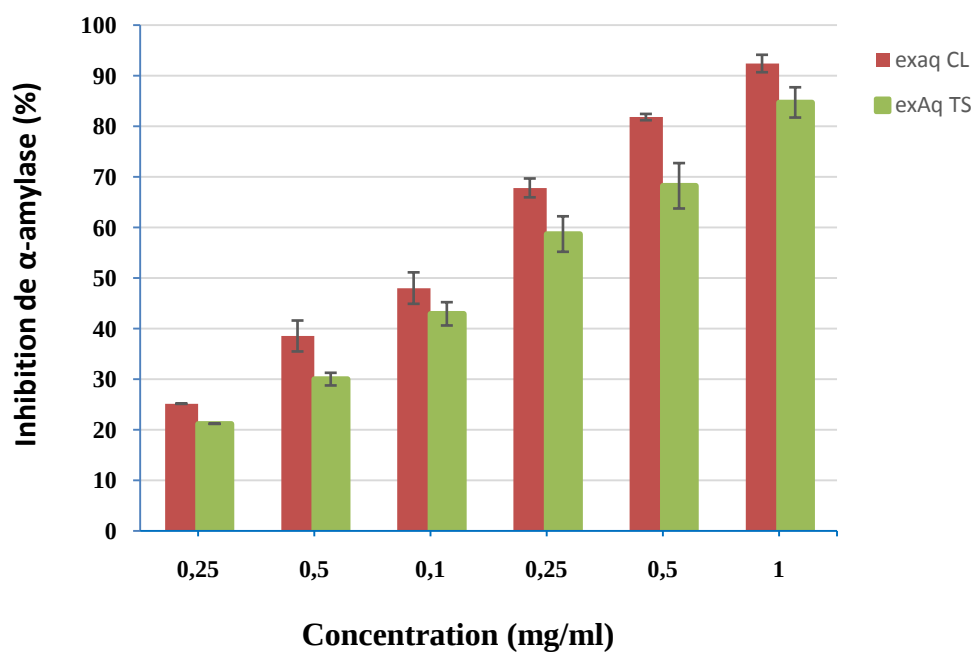


Figure 11: Effet inhibiteur des extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* (exaq CL) et *Thymus satureioides* (exaq TS) sur l' α -amylase. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3)

Discussion

Les médicaments capables d'inhiber l'activité de l' α -glucosidase et de l' α -amylase peuvent retarder la digestion des hydrates de carbone, réduisant ainsi l'hyperglycémie postprandiale **(Lebovitz, 1998)**. Ces inhibiteurs tels que l'acarbose, le voglibose et le miglitol sont largement utilisés, en monothérapie ou en association avec les sulfamides, les biguanides ou l'insuline, pour les patients atteints de diabète de type II. Cependant, ces médicaments peuvent causer plusieurs effets secondaires, tels que les troubles hépatiques, les flatulences et les crampes abdominales. En outre, certains d'entre eux peuvent augmenter l'incidence des tumeurs rénales, des lésions hépatiques et de l'hépatite aiguë **(Shobana et al., 2009)**.

Afin d'éviter les effets indésirables de ces molécules synthétiques, les études se focalisent sur l'isolement et l'identification de nouveaux inhibiteurs d' α -amylase et de l' α -glucosidase issus de ressources naturelles et ayant peu d'effets secondaires **[Odhav et al., 2010]**. Les plantes ont toujours constitué une source exemplaire de médicaments et beaucoup de principes actifs actuellement disponibles dérivent directement ou indirectement des plantes **[Odhav et al., 2010; Donga et al., 2011]**. D'autre part, plusieurs phytoconstituants inhibiteurs d' α -glucosidase, tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les anthocyanides, les glycosides et les composés phénoliques ont été identifiés **[Kumar et al., 2011]**. Les flavonoïdes naturels en tant qu'inhibiteurs d' α -glucosidase, α -amylase et réductases d'aldose, ont fait l'objet de plusieurs recherches **[Proença et al., 2017]**. Ces inhibiteurs naturels de l' α -glucosidase et de l' α -amylase provenant de sources végétales peuvent représenter une stratégie alternative et attrayante pour le contrôle de l'hyperglycémie **[Tundis et al., 2010]**.

Selon des données non exhaustives de la littérature, plusieurs plantes étudiées ont montré une activité inhibitrice des enzymes α -glucosidase et α -amylase telles que: *Cistus laurifolius*

[Orhan et al, 2013], *Juglans regia*, *Urtica dioica* [Rahimzadeh et al., 2014], *Berberis vulgaris* [Boudjelthia et al., 2017] et *Caralluma europaea* [Ouassou et al, 2018].

Par ailleurs, les résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans les extraits des deux plantes étudiées ont révélé que ces extraits contiennent des teneurs appréciables de polyphénols et de flavonoïdes. L'effet pharmacologique mis en évidence dans cette étude peut être attribuable à la teneur des extraits en polyphénols, et flavonoïdes. En effet, l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* a montré une activité inhibitrice plus importante que celle de l'extrait aqueux de *Thymus satureioides*. Ceci peut s'expliquer par la teneur élevée des composés phénoliques dans l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*. En outre, plusieurs études ont montré que ces composés peuvent être doués d'une activité inhibitrice des enzymes impliquées dans la digestion des glucides **[Obboh et al, 2012; Ademiluyi et al, 2013; Hemalatha et al, 2016; Sales et al., 2012].**

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires occupant une place importante dans le groupe des polyphénols. Plusieurs composés phénoliques sont doués d'une activité inhibitrice de l' α -amylase, et de l' α -glucosidase essentiellement les flavonoïdes, les flavonoïdes glycosides et les tritérpénoides **[Sales et al., 2012]**. Le potentiel d'inhibition des polyphénols et des flavonoïdes est corrélé avec le nombre de groupements hydroxyles (OH) dans leur cycle B **[Sales et al., 2012]**. Ces composés peuvent inhiber l' α -amylase et l' α -glucosidase par la formation de liaison hydrogènes entre leurs groupements hydroxyles et les résidus du site de fixation (actif) des enzymes. Les groupes de flavonols et flavones possèdent le pouvoir inhibiteur le plus puissant parmi les flavonoïdes **[Sales et al., 2012]**.

Chapitre III

Etude toxicologique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*

Introduction

Les plantes médicinales ont été utilisées pour le traitement de diverses maladies pendant des siècles à travers le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, environ 80 % de la population mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement, utilise encore les plantes médicinales pour leurs soins de santé [WHO, 2008].

Par ailleurs, l'usage non maîtrisé des plantes médicinales peut exposer les patients aux risques d'intoxications. Par conséquent, en réponse aux préoccupations de la santé publique concernant l'usage de ces plantes, la validation de leur innocuité par des études expérimentales est devenue une étape primordiale pour la validation de leur usage thérapeutique.

Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré expérimentalement les activités hypoglycémiantes et hypolipidémiantes de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* chez des rats diabétiques [El Kabbaoui et al., 2016]. En dépit de l'utilisation populaire de cette plante en médecine traditionnelle marocaine, aucune étude concernant son profil toxicologique n'a été réalisée.

Ainsi, afin d'obtenir des données concernant son innocuité ou ses potentiels effets toxiques, la présente étude a été réalisée afin de caractériser le profil toxicologique de l'extrait aqueux de cette plante. Cette étude toxicologique est focalisée sur la toxicité à court terme (toxicité aiguë) et à long terme (toxicité sub-chronique pendant 90 jours).



Acute and sub-chronic toxicity studies of the aqueous extract from leaves of *Cistus ladaniferus* L. in mice and rats



Mohamed El Kabbaoui, Alae Chda, Jamila El-Akhal, Ouarda Azdad, Najlae Mejrhit, Lotfi Aarab, Rachid Bencheikh, Abdelali Tazi*

Laboratory of Bioactive Molecules, Faculty of Sciences and Techniques, Sidi Mohamed Ben Abdellah University (USMBA), P.O. Box 2202, Fez 30000, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

Cistus ladaniferus
Acute toxicity
Sub-chronic toxicity
Toxicological profile

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Cistus ladaniferus* L. (*C.ladaniferus*) (Cistaceae) is an aromatic shrub native to the Mediterranean region. The leaves are widely used in traditional medicine throughout Morocco for the treatment of various diseases including, diabetes, diarrhea, inflammation, and skin ailments. However, to the best of our knowledge, no systematic study concerning its toxicity profile has been reported.

Aim of the study: The study carried out evaluates the potential toxicity of the aqueous extract from leaves of the *C.ladaniferus* (CL extract) shrub, through the method of acute and sub-chronic oral administration in mice and rats.

Materials and methods: During the acute toxicity study, male and female mice were orally administrated with CL aqueous extract at single doses of 500, 1000, 2000, 3000 and 5000 mg/kg ($n = 5/\text{group}/\text{sex}$). Abnormal behavior, toxic symptoms, weight, and death were observed for 14 consecutive days to assess the acute toxicity. During the sub-chronic toxicity study, the aqueous extract was administered orally at doses of 500, 700 and 1000 mg/kg ($n = 6/\text{group}$) daily to Wistar rats of both sexes for 90 days. The general behavior of the rats was observed daily, and their body weight was recorded weekly. A urinalysis, biochemical analysis, hematological analysis, macroscopic examination and histopathological examination of several organs were conducted at the end of the treatment period.

Results: During the acute toxicity test, when mice were administered doses of 3000 and 5000 mg/kg, the CL extract produced a 10–30% mortality rate, respectively, and induced signs of toxicity. However, no mortality or adverse effect was noted at the doses of 1000 and 2000 mg/kg. The median lethal dose (LD₅₀) of the extract was estimated to be more than 5000 mg/kg. In the subchronic study, the CL extract induced no mortality or treatment-related adverse effects with regard to body weight, general behavior, relative organ weights, urine, hematological, and biochemical parameters. Histopathological examination of vital organs showed normal architecture suggesting no morphological alterations. Moreover, the CL extracts improved lipid profile and exhibited a significant hypoglycemic effect in all doses tested in rats.

Conclusion: The results of the present study suggest that treatment with the CL extract for 13 weeks does not appear to produce significant toxicity, except at high dose. Therefore, the use of appropriate levels of the CL extract as a traditional medicine remedies should have a wide margin of safety for its therapeutic use.

1. Introduction

Traditional herbal medicines have been used to treat diseases and promote health for centuries worldwide (Yuan et al., 2016). The World Health Organization estimated that about 80% of the population, especially in developing countries, is referred to traditional herbal medicines, such as plant extracts or their derived products, for their primary health care needs (World Health Organization, 2008).

Despite the growing popularity and presumed safety of herbal

medicines, adverse effects have become a major safety issue for natural products (Han et al., 2016). Consequently, in response to public health concerns, it is important to validate the safety of traditional herbal medicines before their use. Experimental data on the toxicity profile of medicinal plants and their extracts should be obtained to increase confidence in their safety for human use and in the development of pharmaceuticals (Yuet Ping et al., 2013). Therefore, systematic evaluation of medicinal plants for potential toxicity is a necessary step for the validation of their regular therapeutic use.

* Corresponding author.

E-mail address: abdelalitazi@yahoo.fr (A. Tazi).

Cistus ladaniferus L., also commonly known as rock rose, is a shrub species belonging to the Cistaceae family. This native and widespread aromatic plant is widely distributed in the Mediterranean region (Teixeira et al., 2007). *C. ladaniferus* L. and other species of Cistaceae are commonly used as traditional medicines in Mediterranean region for the treatment of several skin ailments, as anti-diarrhoeal, and as anti-inflammatory agents (Attaguile et al., 2000). This plant is known locally as “Touzal” in the north of Morocco or “Argale” in other regions throughout Morocco (Bellakhdar et al., 1991). In Moroccan traditional medicine, the decoction of the aerial parts of this plant is used as an antidiarrhoeal, antacid, antidiabetic, and antispasmodic by the local population in northern Morocco (Bnouham et al., 2002; Merzouki et al., 2000).

Previous studies have reported various biological activities of *Cistus ladaniferus* extracts. For instance, the anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of the plant have already been studied experimentally in rats (El Youbi et al., 2016). The aqueous extract of *Cistus* leaves was found to reduce systemic blood pressure in two animal models of hypertension, (Belmokhtar et al., 2009) and exhibited antispasmodic action on rodent isolated jejunum (Aziz et al., 2006). Moreover, the aqueous extract has been found to have platelet anti-aggregant property (Mekhi et al., 2004) and vasodilator effect on isolated aortic rings (Belmokhtar et al., 2009). The phenolic extract of *C. ladaniferus* has also shown an antifungal potential against several *Candida* species (Barros et al., 2013). In vitro studies have demonstrated the antioxidant activity of *C.ladaniferus* extracts, which was investigated by several methods established for in vitro test (Amenhour et al., 2010; Barrajón-Catalán et al., 2010). Aqueous and organic extracts of *C. ladaniferus* displayed antibacterial activity against Gram-positive bacteria (Barrajón-Catalán et al., 2010; Ferreira et al., 2012). Finally, cytotoxic activity against several human cancer cells was also reported (Andrade et al., 2009; Barrajón-Catalán et al., 2010).

The phytochemical composition of *C. ladaniferus* aqueous extract has been characterized in previous studies, showing that the extract was rich in phenolic compounds (Barrajón-Catalán et al., 2011; Fernández-Arroyo et al., 2010). In these studies, several groups of phenolic components were identified, such as Ellagic acid and derivatives (punicalagin isomers, cornusin B, ellagic acid-7-xyloside, and methylated ellagic acid-7-xyloside), Hexahydroxydiphenoyl and derivatives (hexahydroxydiphenoyl-D-glucoside, pedunculagin), Phenolic acids and derivatives (gallic acid, glucogallin isomers, gentisic acid, uralleneoside, mircaphenone B), and Flavonoids (quercetin diglycosides, methyl ether and dimethylether kaempferol, apigenin).

The leaves of this plant also produce a fragrant oleoresin with a strong aromatic odor, known as *labdanum*, which is highly appreciated in the fragrance industry (Guimarães et al., 2009). Previous studies have reported the phytochemical composition of the resin and showed that it is very rich in polyphenols (Gomes et al., 2005; Robles et al., 2003). Additionally, the presence of flavonoids in the exudate has been connected to the inhibitory activity of the resin on calcium transport in skeletal muscle (Sosa et al., 2004). In folk medicine, this resin has been used from ancient times to treat, dysentery, catarrh, diarrhea, and menstruation difficulties (Barrajón-Catalán et al., 2010).

C. ladaniferus L. provides an important source of valuable bee pollen in Mediterranean countries (Ortiz, 1994). This pollen and its extract, which are rich in flavonoids, have exhibited inflammatory and antioxidant activities (Maruyama et al., 2010). Furthermore, previous studies have shown that the pollen from *C. ladaniferus* has a preventive effect on bone loss in ovariectomized and streptozotocin diabetic rats (Yamaguchi et al., 2007a, 2007b).

We have previously demonstrated the hypoglycemic and hypolipidemic activities of *C. ladaniferus* in diabetic rats (El Kabbouli et al., 2016). Despite these studies and the widespread use of this plant in Moroccan folk medicine, no study on the toxicological profile of extract from leaves has been reported. Thus, in order to obtain scientific information on its safety and potential toxicity, the present study was

performed to assess the possible toxic effects of the aqueous extract of *C.ladaniferus* leaves after acute oral administration in mice and sub-chronic oral administration in rats.

2. Material and methods

2.1. Plant material and preparation of extract

Fresh leaves of *C. ladaniferus* (Cistaceae) were harvested from the Taounate region of northern Morocco in March 2016. A voucher specimen was taxonomically identified and deposited in the herbarium of the Faculty of Sciences and Techniques, Fes, Morocco (No. MA-FSTF 16). *C. ladaniferus* leaves were washed with water, air-dried, and ground into a fine powder using a mixer. The powder was then kept in a firmly closed container until extraction.

The plant extract was prepared following the standard traditional method described in Moroccan Pharmacopoeia (Lemhadri et al., 2006). 500 g of air-dried powder from the leaves of the plant was mixed with 5 L of hot distilled water. The mixture was kept under agitation for 6 h at room temperature. Thereafter, the infusion obtained was centrifuged, and the supernatant was filtered with Whatman no1 filter paper. The filtrate was then concentrated under vacuum at 50 °C using a rotary evaporator. The extract (yield = 26% w/w of the initial powder) was stored at –20 °C until use for toxicological investigations. For oral administration, the residue was freshly reconstituted on a daily basis in distilled water to the final concentrations required prior to the experiment.

2.2. Animals

Adult Swiss albino mice and Wistar rats were used for the acute and ninety-day toxicity studies, respectively. Wistar rats were obtained from the animal colony of the Biology Department of the Faculty of Sciences and Techniques (Fes, Morocco), while Swiss albino mice were purchased from the Pasteur Institute (Casablanca, Morocco). All animals were kept in polypropylene cages (males separated from females), and acclimatized for a period of 15 days prior to the start of the experiment. They were maintained under standard laboratory conditions of regular 12 h light/12 h dark cycle and temperature (24 ± 1 °C) throughout the experimental period. They also were fed clean tap water and commercial rodent chow ad libitum during the experimental period. All experimental procedures were conducted in accordance with the NIH general guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.3. Acute oral toxicity study

The assay of acute toxicity was performed according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guideline 423 (OECD, 2001a). A total of 60 mice weighing between 27 and 37 g were randomly divided into six experimental groups of 10 mice each (5 males and 5 females per group). After fasting overnight, *C. ladaniferus* aqueous extract was administered to each treatment group at single doses of 500, 1000, 2000, 3000, 5000 mg/kg, respectively, by oral gavage. The control groups were treated with the same volume of distilled water. After dosing, all animals were observed individually for mortality and changes in general behavior during the first 30 min, then at 2, 4, 6, 10 and 24 h following treatment. Symptoms of toxicity such as hypo-activity, piloerection, breathing difficulty, tremors, and convulsion were evaluated after administration of the various extract doses. The LD 50 value was determined according to the method described by the OECD Guidelines 423 (OECD, 2001a). During the remaining experimental period, the animal observation was performed at least once per day for the post-dosing period of 14 days. Body weights were measured at the initiation of treatment, and on days 4, 7, 11 and 14 after administration. On the 14th day, the mice were sacrificed under

anesthesia, and vital organs (heart, kidneys, lung, spleen and liver) were removed for macroscopic examination.

2.4. Sub-chronic toxicity study

2.4.1. Experimental design

The sub-chronic toxicity study was carried out according to OECD Test Guidelines 408 for testing chemicals (OECD, 2008). A total of 48 male and female Wister rats weighing between 170 and 240 g were randomly divided into four groups (n = 6 males and 6 females/group). Rats in treatment groups orally received *C. ladaniferus* extract at doses of 500, 700 and 1000 mg/kg/day. The extract was administered by oral gavage at 10 mL/kg body weight on a daily basis for 90 days. Rats in control groups were administrated orally with the same volume of distilled water (vehicle). During the experimental period, the body weights of all groups were measured once a week. Animals were also visually observed for mortality, changes in behavioral patterns, changes in physical appearance, and symptoms of illness. At the end of the treatment period, all rats fasted overnight (12–16 h), and then anesthetized with urethane by intraperitoneal injection (1 mL/100 g body weight). Blood samples were collected for the measurement of hematological (EDTA-2K coated tubes) and biochemical (dry tubes) parameters. After euthanasia, the rats were sacrificed and organs were removed for necropsy, organ weight measurement, and histopathological examination.

2.4.2. Urinalysis

On the last week of the treatment period, a urine test was conducted in all rat groups. Fresh urine was collected overnight from all animals, to determine specific gravity, pH, levels of leukocytes, nitrites, protein, glucose, ketones, blood, urobilinogen, and bilirubin. Urine samples were analyzed using an automatic urine analyzer and test strips Cybow™ (DFI Co Ltd, Korea).

2.4.3. Hematology and serum biochemistry

For the hematological investigation, all animals fasted overnight but were allowed access to water ad libitum. The rats were then anesthetized, and blood samples were collected from the abdominal aorta. Whole blood was collected in EDTA tubes (containing potassium salt of ethylenediamine-tetracetic acid) and processed immediately for hematological analysis. The parameters measured were red blood cell count (RBC), hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH), white blood cell count (WBC), neutrophils (NEU), eosinophils (EOS), basophils (BASO), lymphocytes (LYM), and monocytes (MONO). platelet count (PLT). The hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (Sysmex XS-1000i).

For the measurement of biochemical parameters, dry tubes containing collected blood were centrifuged at 3000 rpm at 5 °C for 15 min to obtain the serum. Serum samples were analyzed using an automated biochemistry analyzer (Cobas Integra® 400 plus). The clinical biochemistry parameters included, total serum protein (TP), albumin (ALB), total bilirubin (T-BIL), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), uric acid (URIC), urea (UREA), creatinine (CREA), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and glucose (GLU). Very low density-cholesterol (VLDL) was calculated by the following formula: $VLDL = 0.2 \times TG$ (Wilson et al., 1981). Serum electrolytes such as calcium (Ca^{2+}), sodium (Na^+), potassium (K^+), and chloride (Cl^-) were also determined using Cobas Integra® 400 plus analyzer.

2.4.4. Necropsy and organ weight

All groups of rats were subjected to gross necropsy, which included the examination of the thoracic organs, external surface, and all of the

internal organs. Vital organs were carefully examined macroscopically for any type of abnormalities. Thereafter, various organs, including the heart, liver, kidneys, stomach, lung, spleen, adrenals, thymus, epididymis, testes, uterus, and ovaries were surgically removed, cleaned with ice-cold saline solution, placed on absorbent papers, and then weighed (absolute organ weight in grams). The relative organ weight (ROW) of each animal was then calculated as follows: $ROW = [Absolute\ organ\ weight\ (g) \div Bodyweight\ of\ rat\ on\ sacrifice\ day\ (g)] \times 100$.

2.4.5. Histopathology

The major organs (lung, heart, liver, kidney) and reproductive organs (testis and ovary) were removed for histopathological examinations. After weight measurement, the organs were quickly fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4). Following fixation, tissue specimens were dehydrated in a graded series of ethanol (70–100%), cleared in toluene, and finally enclosed in paraffin. Thereafter, 5-μm thin sections were prepared using a microtome (Leica RM2235) and stained with Haematoxylin and Eosin (H & E) prior to microscopic examination. The microscopic features of the organs of treated groups were compared with the control group, and photomicrographs were recorded.

2.5. Statistical analysis

All data are expressed as the means ± standard deviation (SD). Statistical significances between control and treated groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's post hoc test. Graph Pad Prism version 6.0 for Windows was used for statistical analysis. Data analyses from male and female groups were done separately, and the differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Acute toxicity study

In the acute toxicity study, CL leaf extract at doses lower than 2000 mg/kg did not produce any mortality or signs of toxicity in male and female mice over the observation period. Moreover, the treated groups did not show significant changes in body weight during the experimental period compared to the control group (Fig. 1). However, a dose of 3000 mg/kg seemed to be lethal and caused 10% of deaths in mice within 48–36 h, and induced the incidence of low hypoactivity in some animals. At the higher dose of 5000 mg/kg, the mortality rate increased to 30% (3/10), and clinical signs of toxicity, such as hypoactivity, asthenia, and piloerection were more pronounced in mice.

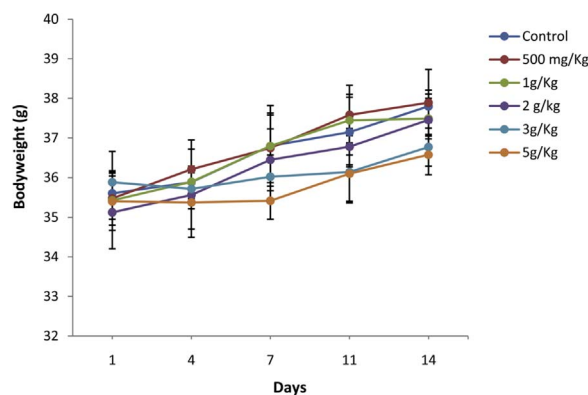


Fig. 1. Changes in the body weights in male mice treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the acute toxicity study. Each point represents the mean ± SD (n = 5). No significant difference.

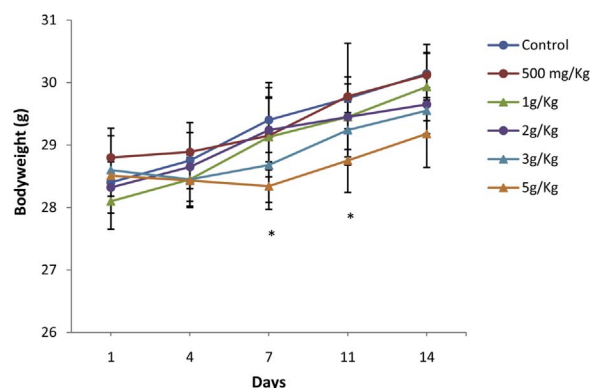


Fig. 2. Changes in the body weights in females mice treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the acute toxicity study. Each point represents the mean $\pm$ SD ($n = 5$). *: $P < 0.05$. (one-way ANOVA by Dunnett's post-hoc test).

The mice that died from high doses (3000–5000 mg/kg) of CL leaf extract also showed symptoms of respiratory failure (irregular breathing and reduction of respiratory rate), which was persistent until death. Compared to the control group, the female group treated with 5000 mg/kg of extract showed a decrease in body weight throughout the 14-day study, which was significant on days 7 and 11 (Fig. 2). No pathological findings were noted in organs during the necropsy of mice after sacrifice. The results obtained in the acute toxicity study suggest that acute administration of CL extract did not produce death in 50% of mice at the maximum dose of 5000 mg/kg. Therefore, the LD_{50} of aqueous extract could not be estimated, and was considered to be greater than 5000 mg/kg, an experimental upper limit, in the acute toxicity investigation.

3.2. Sub-chronic toxicity study

3.2.1. Clinical observations and body weight of rats

The body weights of the control and CL extract-treated groups are presented in Figs. 3 and 4. No statistically significant difference in body weight was noted between the control and treated groups for female and male rats throughout the study period. Moreover, no toxicity signs or animal deaths were observed at any dose up to the maximum of 1000 mg/kg during the 13-weeks repeated oral treatment.

3.2.2. Urinalysis

The values of the urine parameters of female and male rats are shown in Tables 1 and 2, respectively. The treatment with CL extract

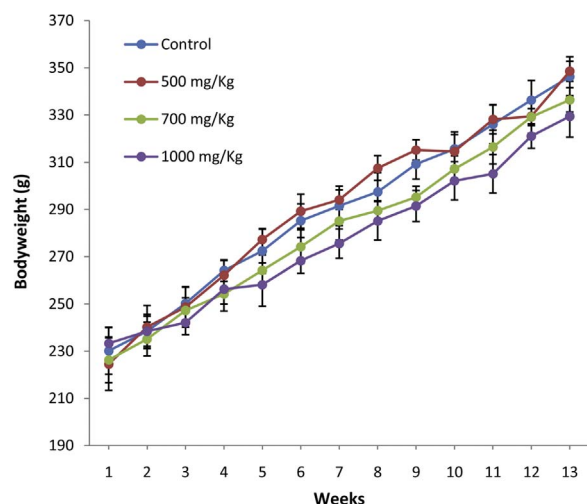


Fig. 3. Changes in the body weights in males rats treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the sub-chronic toxicity study. Each point represents the mean $\pm$ SD ($n = 6$).

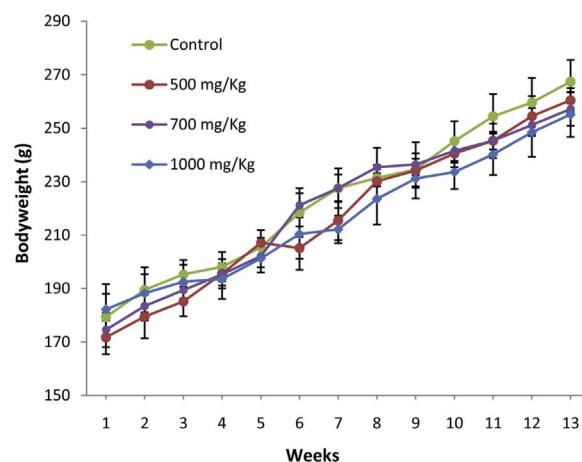


Fig. 4. Changes in the body weights in females rats treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract in the sub-chronic toxicity study. Each point represents the mean $\pm$ SD ($n = 6$).

Table 1

Urinalysis of the male rats treated with *C. ladaniferus* for 90 days ($n = 6$).

Parameters	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg BW)		
		500	700	1000
Urobilinogen (mg/dL)				
0.2	6	5	6	5
1	0	1	0	1
Glucose (mg/dL)				
Negative	6	5	6	6
± 100	0	1	0	0
Ketone bodies (mg/dL)				
Negative	5	5	4	4
+5	1	1	2	2
Occult blood (RBC/μL)				
Negative	6	6	6	6
+10	0	0	0	0
pH				
7	0	0	1	0
7.5	3	2	3	2
8	2	4	2	4
9	1	0	0	0
Bilirubin				
Negative	6	5	6	5
+ (small)	0	1	0	1
Specific gravity				
1.015–1.020	2	2	3	2
1.021–1.025	3	4	2	3
1.026–1.030	1	0	1	1
Protein (mg/dL)				
Negative	2	5	6	2
trace	4	1	0	1
+30	0	0	0	3
Color				
Yellow	5	5	4	6
Pale yellow	1	1	2	0
Nitrite				
Negative	6	6	6	6
Leukocytes (WBC/μL)				
Negative	5	6	4	5
+25	1	0	2	1

for 90 days did not produce any significant changes in the levels of various parameters (glucose, bilirubin, ketone, blood, urobilinogen, nitrite, leukocytes, specific gravity, pH, and protein) assayed in the urine of the rats, except for male rats treated with CL extract at the dose of 1000 mg/kg, which showed a marked increase in protein in a non-dose dependent manner at the end of the 90-day treatment.

3.2.3. Hematology analysis

The effect of sub-chronic oral administration of the aqueous

Table 2
Urinalysis of the female rats treated with *C. ladaniferus* for 90 days (n = 6).

Parameters	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg BW)		
		500	700	1000
Urobilinogen (mg/dL)				
0.2	6	6	4	6
1	0	0	2	0
Glucose (mg/dL)				
Negative	6	6	6	6
± 100	0	0	0	0
Ketone bodies (mg/dL)				
Negative	5	5	6	6
+5	1	1	0	0
Occult blood (RBC/μL)				
Negative	6	5	6	6
+10	0	1	0	0
pH				
7	0	3	0	0
7.5	3	1	4	2
8	2	2	2	3
9	1	0	0	1
Bilirubin				
Negative	6	6	5	6
+ (small)	0	0	1	0
Specific gravity				
1.015–1.020	2	3	3	1
1.021–1.025	3	3	2	4
1.026–1.030	1	0	1	1
Protein (mg/dL)				
Negative	6	5	6	5
trace	0	1	0	0
+30	0	0	0	1
Color				
Yellow	6	6	5	5
Pale yellow	0	0	1	1
Nitrite				
Negative	6	6	6	6
Leukocytes (WBC/μL)				
Negative	6	5	6	6
+25	0	1	0	0

extracts of *C. ladaniferus* (500, 700 and 1000 mg/kg) on the hematological parameters of female and male rats is presented in [Tables 3 and 4](#). The hematological blood analysis revealed some significant changes in both male and female rats. However, these changes did not occur simultaneously in both groups of animals and were not dose-related. For instance, a significant ($p < 0.05$) non-dose-dependent increase in WBC and PLT counts at the dose of 1000 mg/kg was noted in female groups. Furthermore, male rats treated with CL extract at the dose of

500 mg/kg showed significant ($p < 0.05$) non-dose-dependent decrease in MCV compared to the control group. Other hematological parameters were within the normal limits.

3.2.4. Clinical biochemistry analysis

[Tables 5 and 6](#) summarize the levels or activities of biochemical parameters in male and female rats. All tested doses of CL extract induced a significant reduction of total cholesterol, triglycerides, LDL, and VLDL in both groups of rats compared to the control groups. Although, CL extract induced various significant decreases ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) in fasting glucose levels of the treated rat groups, which was marked at the dose of 1000 mg/kg ($P < 0.01$). Moreover, a significant decrease ($p < 0.05$) in the activity of ALT was noted in male rats treated with 500 mg/kg of CL extract compared to the control group, while the activities of AST and ALP showed no significant changes in all treated groups. No significant differences among all groups were noted in the level of total bilirubin, total protein, and albumin. Furthermore, there were no significant variations observed in CRA, UREA, URIC, and serum electrolytes parameters (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) of CL extract treated groups of rats when compared to the control groups.

3.2.5. Absolute and relative organ weights

Data related to the absolute and relative organ weights for both male and female rats treated with CL extract are presented in [Tables 7 and 8](#). Gross examination of internal organs of both the control and treated groups including, heart, stomach, spleen, liver, thymus, lung, spleen, adrenals, kidneys, testis (males), epididymis, uterus (females), and ovaries (females) did not reveal any abnormal findings related to the administration of the extract. The absolute and relative organ weight of each organ recorded at necropsy in the treatment groups did not show a significant difference compared to the control group for either sex. A significant but non-dose-dependent increase in the absolute and relative weights of the liver was noted in female group treated with the dose of 700 mg/kg, but no variation was observed at the higher dose of 1000 mg/kg ($p > 0.05$).

3.2.6. Histopathology analysis

At the end of treatment, vital organs, including heart, liver, kidneys, lungs, testes, and ovaries were subjected to histopathological examination. The microscopic observation showed no remarkable pathological changes for all organs in CL extract treated groups compared to the control groups ([Fig. 5](#)). Therefore, no treatment-related alterations in the treated groups were revealed during the histopathological analyses.

Table 3
Hematological parameters of males rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Parameters	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg B.W)		
		500	700	1000
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	9.56 ± 0.75	9.39 ± 0.96	10.07 ± 0.78	9.19 ± 0.92
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	7.68 ± 0.34	8.11 ± 0.40	8.34 ± 0.77	8.41 ± 0.60
Hematocrit (%)	39.07 ± 2.27	42.53 ± 4.54	42.71 ± 5.58	39.86 ± 2.44
Hemoglobin (g/dL)	13.79 ± 0.84	13.74 ± 0.79	13.16 ± 0.89	14.21 ± 0.54
MCV ($\mu\text{m}^3/\text{red cell}$)	59.17 ± 2.04	52.83 ± 4.22*	56.83 ± 5.27	56.17 ± 4.88
MCH (pg/ red cell)	16.67 ± 0.82	17.17 ± 1.17	16.51 ± 0.55	16.33 ± 0.52
MCHC (g/dL)	34.48 ± 3.62	32.52 ± 2.81	33.07 ± 3.29	34.83 ± 4.21
Platelets ($10^3 \text{ cells}/\text{mm}^3$)	902.78 ± 127.14	865.92 ± 130.97	869.13 ± 106.96	853.15 ± 90.51
Lymphocytes (%)	72.51 ± 7.66	73.02 ± 5.40	71.17 ± 5.34	70.33 ± 6.71
Neutrophils (%)	24.42 ± 3.69	22.50 ± 1.61	24.92 ± 1.63	24.77 ± 2.55
Monocytes (%)	3.40 ± 2.12	3.58 ± 1.36	2.33 ± 0.82	3.23 ± 1.44
Basophils (%)	0.02 ± 0.04	0.08 ± 0.10	0.06 ± 0.10	0.02 ± 0.04
Eosinophils (%)	1.67 ± 0.82	1.73 ± 0.95	1.50 ± 0.84	1.63 ± 0.43

Values are expressed as mean ± SD, n = 6.

* $P < 0.05$. (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

Table 4Hematological parameters of females rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Parameters	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg B.W)		
		500	700	1000
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8.56 ± 0.68	9.10 ± 1.53	9.14 ± 0.99	10.74 ± 1.22**
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	8.43 ± 0.73	8.41 ± 0.64	8.16 ± 0.47	8.31 ± 0.66
Hematocrit (%)	41.02 ± 6.15	38.25 ± 2.38	38.72 ± 2.82	42.06 ± 5.29
Hemoglobin (g/dL)	13.38 ± 0.77	13.27 ± 0.59	13.22 ± 0.78	13.22 ± 0.78
MCV ($\mu\text{m}^3/\text{red cell}$)	53.12 ± 4.66	55.43 ± 4.21	52.40 ± 3.59	52.40 ± 3.59
MCH (pg/ red cell)	16.62 ± 0.53	16.40 ± 0.49	16.53 ± 0.59	16.21 ± 0.75
MCHC (g/dL)	34.02 ± 3.54	32.57 ± 3.25	32.90 ± 2.82	34.08 ± 3.11
Platelets (10^3 cells/ mm^3)	870.67 ± 51.64	883.83 ± 38.93	911.75 ± 58.91	974.17 ± 28.58**
Lymphocytes (%)	70.42 ± 4.74	71.73 ± 5.39	70.23 ± 6.27	72.51 ± 6.22
Neutrophils (%)	24.23 ± 1.69	23.22 ± 2.29	24.28 ± 1.68	23.18 ± 2.58
Monocytes (%)	3.35 ± 0.72	3.03 ± 0.84	3.60 ± 0.54	3.45 ± 0.90
Basophils (%)	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.08	0.02 ± 0.04
Eosinophils (%)	1.61 ± 0.78	1.75 ± 0.76	1.68 ± 0.80	1.70 ± 0.79

Values are expressed as mean ± SD., n = 6.

** P < 0.01. compared to control group (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

Table 5Biochemical parameters of males rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Parameters	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg B.W)		
		500	700	1000
AST (UI/L)	142.42 ± 12.13	153.03 ± 13.24	156.95 ± 15.39	145.33 ± 13.26
ALT (UI/L)	56.32 ± 6.25	44.80 ± 3.90*	46.77 ± 8.68	48.45 ± 8.83
ALP (UI/L)	189.27 ± 16.44	171.85 ± 10.04	179.37 ± 17.35	185.55 ± 23.19
Total bilirubin (mg/L)	0.52 ± 0.22	0.48 ± 0.17	0.63 ± 0.14	0.57 ± 0.14
Total proteins (g/L)	67.97 ± 4.11	70.05 ± 5.42	64.47 ± 6.38	67.05 ± 5.46
Albumin (g/L)	42.10 ± 5.39	37.27 ± 5.69	40.23 ± 3.79	38.07 ± 5.52
Total cholesterol (g/L)	0.64 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.56 ± 0.05*	0.53 ± 0.04**
Triglycerides (g/L)	0.72 ± 0.05	0.64 ± 0.04*	0.60 ± 0.04**	0.60 ± 0.04**
HDL cholesterol (g/L)	0.28 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.35 ± 0.04*	0.35 ± 0.04*
LDL cholesterol (g/L)	0.32 ± 0.04	0.27 ± 0.03*	0.24 ± 0.02**	0.24 ± 0.02**
VLDL (g/L)	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01*	0.12 ± 0.01**	0.12 ± 0.01**
Glucose (g/L)	1.10 ± 0.17	0.94 ± 0.04*	0.91 ± 0.06**	0.89 ± 0.06**
Urea (g/L)	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Creatinine (mg/L)	4.15 ± 0.90	3.78 ± 0.72	4.23 ± 0.79	4.22 ± 0.72
Uric acid (mg/L)	11.75 ± 1.54	12.17 ± 1.33	13.33 ± 0.75	12.67 ± 1.72
Na ⁺ (mmol/L)	137.75 ± 2.13	136.85 ± 1.97	135.77 ± 3.25	137.02 ± 2.07
K ⁺ (mmol/L)	5.06 ± 0.45	5.04 ± 0.66	5.20 ± 0.22	5.28 ± 50.31
Ca ²⁺ (mg/L)	99.47 ± 2.71	103.97 ± 3.36	101.18 ± 4.41	104.40 ± 5.88
Cl ⁻ (mmol/L)	97.53 ± 2.59	96.42 ± 1.82	96.78 ± 2.16	97.98 ± 2.29

Values are expressed as mean ± SD, n = 6.

Compared to control group (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

* P < 0.05 compared to control group (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

** P < 0.01 compared to control group (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

4. Discussion

Despite the widespread usage of medicinal plants for health care in developing countries, few scientific data regarding their toxicity and adverse effects are available (Saad et al., 2006). In fact, several studies reported that some medicinal plant can cause several forms of toxic effects, which can have a negative impact on human health. Thus, to ensure the safety of plant products for human use, systematic studies are needed to predict risks of toxicity, and to provide scientific information for selecting safe doses in humans (Neergheen-Bhujun, 2013). To the best of our knowledge, no study regarding the safety assessment of the aqueous leaf extract of CL has been performed. Hence, the present study was conducted to assess its toxicological profile by performing acute oral toxicity in mice for 14 days and sub-chronic oral toxicity in rats for 90 days.

The results of the acute toxicity study showed that the maximum tolerance dose (NOAEL) of CL extract was 3000 mg/kg for male mice and 2000 mg/kg for female mice. Higher doses (5000 mg/kg) induced toxic effects and mortality in animals. During the acute study, female

mice group treated with the high dose showed a significant decrease in body weight during the first week following the treatment. The high rate of mortality was noted in female group. The results suggest that female mice were more sensitive to CL extract than male mice. The observed differences in the toxicity pattern between male and female mice in acute toxicity can be explained by sex-related pharmacokinetic and pharmacodynamic differences, which characterize many drugs, and can, lead to individual differences in drug toxicity (Sakuma et al., 2009). Several factors can be implicated such drug-metabolizing enzymes (cytochrome P450), transporter proteins (P-glycoprotein), organ size, a higher percentage of body fat, and a lower glomerular filtration rate in females than males (Marzolini et al., 2004; Waxman and Holloway, 2009; Sakuma et al., 2009). In the acute study, the oral administration of CL extract up to the dose of 5000 mg/kg did not cause 50% of death in mice. Accordingly, the LD₅₀ of the extract was estimated to be more than 5000 mg/kg via the oral route. According to the globally Harmonized Classification system for chemical substances and mixtures (GSH) adopted by the OECD, the plant extract could be assigned as a class 5 drug and then, considered as a non toxic substance

Table 6Biochemical parameters of females rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Parameters	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg B.W)		
		500	700	1000
AST (UI/L)	149.12 ± 7.37	146.53 ± 7.07	151.73 ± 13.35	156.47 ± 9.48
ALT (UI/L)	53.23 ± 9.60	52.48 ± 9.52	49.75 ± 4.71	50.32 ± 5.59
ALP (UI/L)	192.07 ± 9.27	184.13 ± 15.83	176.40 ± 8.03	178.43 ± 8.40
Total bilirubin (mg/L)	0.48 ± 0.10	0.45 ± 0.10	0.48 ± 0.15	0.50 ± 0.14
Total proteins (g/L)	67.07 ± 5.75	65.75 ± 3.50	66.30 ± 4.45	69.70 ± 3.25
Albumin (g/L)	39.25 ± 5.92	43.03 ± 7.21	42.52 ± 5.08	41.50 ± 5.44
Total cholesterol (g/L)	0.62 ± 0.06	0.54 ± 0.07	0.51 ± 0.04**	0.50 ± 0.04**
Triglycerides (g/L)	0.68 ± 0.06	0.60 ± 0.04	0.57 ± 0.06*	0.54 ± 0.06**
HDL cholesterol (g/L)	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.02**
LDL cholesterol (g/L)	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.26 ± 0.04**	0.25 ± 0.04**
VLDL (g/L)	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01*	0.11 ± 0.01**
Glucose (g/L)	0.98 ± 0.14	0.82 ± 0.07*	0.79 ± 0.07**	0.79 ± 0.06**
Urea (g/L)	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02
Creatinine (mg/L)	3.9 ± 0.69	4.27 ± 0.85	4.20 ± 0.80	3.83 ± 0.98
Uric acid (mg/L)	12.72 ± 1.56	13.03 ± 1.09	12.17 ± 1.72	12.83 ± 1.94
Na ⁺ (mmol/L)	134.28 ± 1.60	135.35 ± 1.61	134.17 ± 1.21	136.07 ± 2.34
K ⁺ (mmol/L)	5.02 ± 0.38	5.38 ± 0.37	5.26 ± 0.37	5.34 ± 0.35
Ca ²⁺ (mg/L)	102.03 ± 3.34	101.07 ± 3.39	101.42 ± 3.19	102.42 ± 3.02
Cl ⁻ (mmol/L)	98.77 ± 2.40	96.95 ± 2.77	97.53 ± 2.09	96.98 ± 2.20

Values are expressed as mean ± SD, n = 6.

* P < 0.05 (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

** P < 0.01 (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

(OECD, 2001b).

The changes in general behavior and body weight are considered as critical indicators for the evaluation of early signs of toxicity caused by drugs and chemicals (Ezeja et al., 2014). In sub-chronic toxicity, no mortality was registered, and no significant changes were observed in the general behavior of the CL-treated groups in both female and male rats. The treated rats gained weight with age, and there was no significant change ($P > 0.05$) in their mean body weight compared to the control groups throughout the duration of the study. It can be concluded that the oral administration of CL extract at a dose of up to 1000 mg/kg for 90 days did not affect negatively the normal growth of rats.

Proteinuria is a urine marker that is commonly used in the diagnosis of renal dysfunction, and can indicate the occurrence of various kidney pathologies (Wolf and Ziyadeh, 2007). Urinalysis performed at the end of the sub-chronic study showed that male rats treated with 1000 mg/kg group had an increase in urine proteins, which was within normal limits. This increase in urine proteins was not noted in the female groups, and was not correlated with other kidney serum biomarkers. Thus, this variation was assumed to be toxicologically irrelevant.

Hematopoietic system is one of the most sensitive targets for toxic compounds and important index of physiological and pathological

Table 8Relative organs weight of females rats after 90 days of treatment with *C. ladaniferus* extract.

Organs	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg BW)		
		500	700	1000
Heart	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.01
Lung	0.42 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.42 ± 0.04
Liver	3.63 ± 0.26	3.81 ± 0.21	3.96 ± 0.13*	3.73 ± 0.12
Spleen	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.02
Kidneys	0.76 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.72 ± 0.06
Stomach	1.18 ± 0.23	1.26 ± 0.12	1.17 ± 0.09	1.13 ± 0.01
Adrenal glands	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.021 ± 0.002
Thymus	0.094 ± 0.014	0.102 ± 0.010	0.099 ± 0.012	0.103 ± 0.012
Ovaries	0.036 ± 0.003	0.035 ± 0.004	0.034 ± 0.005	0.034 ± 0.003
Uterus	0.313 ± 0.035	0.310 ± 0.059	0.292 ± 0.045	0.281 ± 0.050

Values are expressed as mean ± SD, n = 6.

* P < 0.05 (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

status (Liju et al., 2013). Toxicological studies reported that alterations in hematopoietic system have a higher predictive value for human toxicity when the data are extrapolated from animal investigations (Olson et al., 2000). In this study, significant alterations in WBC and

Table 7Relative organs weight of males rats after 90 days of treatment with *C.ladaniferus* extract.

Organs	Control	<i>C.ladaniferus</i> (mg/kg B.W)		
		500	700	1000
Heart	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.03
Lung	0.44 ± 0.06	0.47 ± 0.07	0.43 ± 0.02	0.46 ± 0.03
Liver	3.78 ± 0.53	3.88 ± 0.26	3.64 ± 0.25	3.89 ± 0.52
Spleen	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02
Kidneys	0.75 ± 0.05	0.74 ± 0.13	0.72 ± 0.04	0.74 ± 0.09
Stomach	1.22 ± 0.19	1.31 ± 0.19	1.24 ± 0.15	1.32 ± 0.21
Adrenal glands	0.015 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.016 ± 0.003	0.015 ± 0.002
Thymus	0.08 ± 0.01	0.077 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.077 ± 0.013
Testes	0.93 ± 0.96	0.89 ± 0.18	0.86 ± 0.04	0.906 ± 0.133
Epididymides	0.48 ± 0.07	0.46 ± 0.06	0.432 ± 0.03	0.445 ± 0.017

Values are expressed as mean ± SD, n = 6. (one-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test).

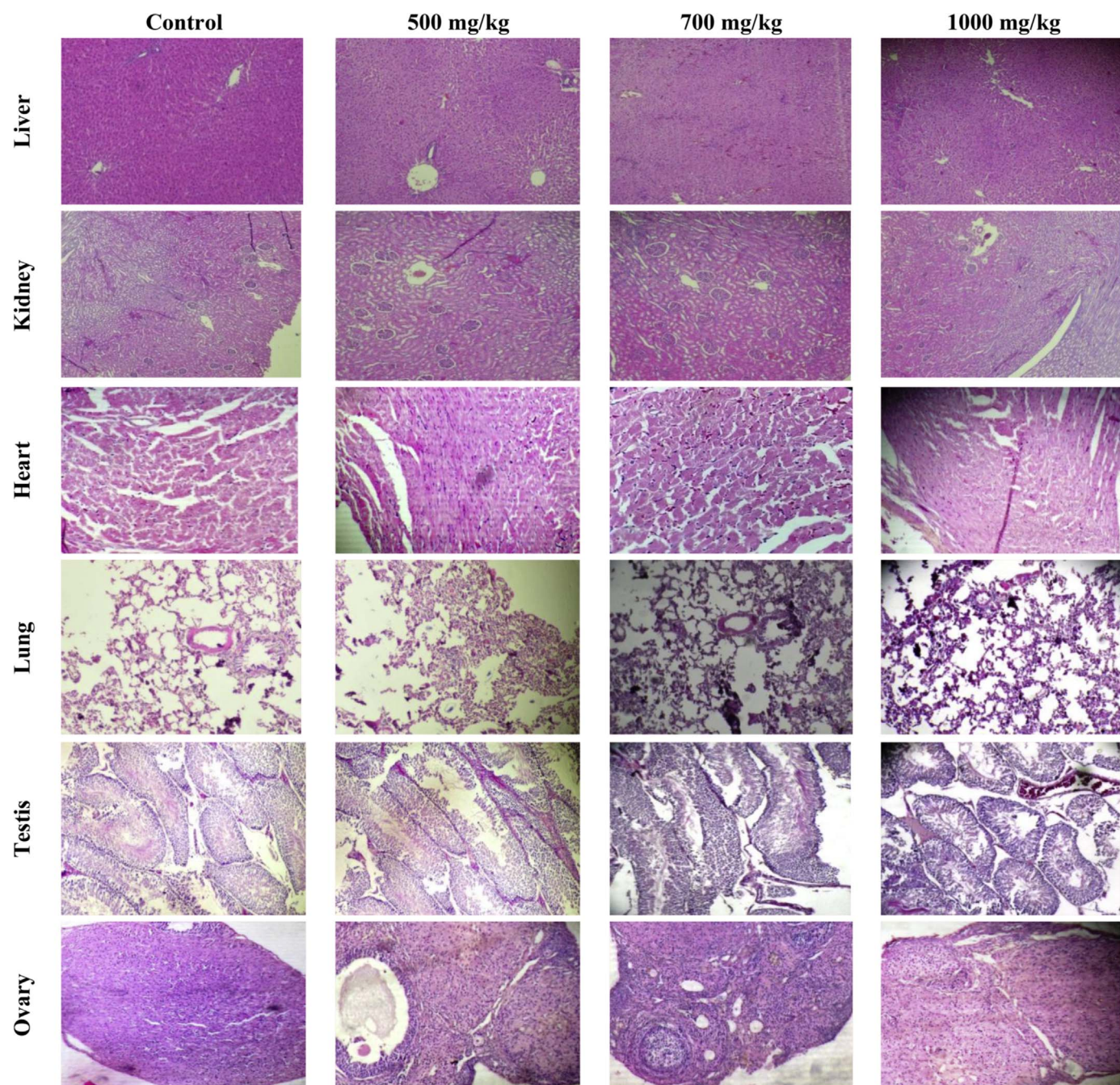


Fig. 5. Photomicrographs of stained sections of various organs in control and experimental groups treated with *Cistus ladaniferus* leaf extract daily for 90 days. No significant alteration was observed in all treatment groups (x 200 magnification).

platelet counts were observed in female rats treated with the higher dose of CL extract (1000 mg/kg). However, these changes were not dose or sex-dependent. Thus, these changes were considered as incidental, not treatment-related, and not possessing toxicological significance. The hematological analysis revealed a decrease in MCV (mean corpuscular volume) level of male rats treated with the dose of 500 mg/kg, but this change was not observed in the female groups. Thus, this difference was not considered as a toxic effect because it did not occur in both sexes, and showed no clear dose-response relationship.

In this study, when compared to the control group, the rats treated with different doses of CL extract over 90 days showed a significant decrease in blood glucose level at the end of the treatment period. The decrease in blood glucose of rats was also observed in our previous study, which showed that the aqueous extract exhibits hypoglycemic

activity in STZ-induced diabetic rats (El kabbaoui et al., 2016). Hyperlipidemia is well known as one of the major risk factors for atherosclerosis, which leads to coronary artery disease (Fuster et al., 2005). In the past few years, investigations in cardiovascular pharmacology have been particularly interested in hypolipidemic drugs derived from medicinal plants (Bahmani et al., 2015). Oral administration of CL extract to rats for 13 weeks produced a significant ($p < 0.05$) reduction in total cholesterol, triglycerides, LDL and VLDL, and an increase in HDL when compared to the control groups. These findings suggest that CL extract could be effective in improving lipid profile, which can protect against atherosclerosis, coronary heart diseases, and diabetes complications. The previous phytochemical studies showed that the CL aqueous extract contains a variety of phenolic compounds and flavonoids (Barrajón-Catalán et al., 2011; Fernández-Arroyo et al., 2010). These bioactive constituents present in the aqueous extract may

account for the observed pharmacological effects. Several studies have reported that polyphenols and flavonoids compounds bring their hypoglycemic effect through different mechanisms, including inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities, enhancement of peripheral glucose uptake, and stimulation of insulin secretion from pancreatic β cells (Huang et al., 2015; Mohan and Nandhakumar, 2014; Vinayagam and Xu, 2015; Yin et al., 2014). Several flavonoid-containing plants with hypoglycemic action have also exhibited hypolipidemic activity through the stimulation of insulin production or by modulating enzymes involved in lipid metabolism (Sung et al., 2004; Unnikrishnan et al., 2014; Vinayagam and Xu, 2015).

The liver is a vital organ that plays a central role in drug biotransformation, and its normal function is assessed by various serum biomarker enzymes (Olorunnisola et al., 2012). Increased ALT levels in the serum reflect hypertrophy and injury in liver tissues (Costa-Silva et al., 2008). The AST level, apart from being an indicator of liver dysfunction, is also used to assess muscle and heart diseases (Adeyemi et al., 2010). ALP is present mainly in the cells lining the biliary duct of the liver and used in the diagnosis of bile duct pathologies (Ramaiah, 2011). Regarding the hepatic function evaluation, the CL extract did not produce significant changes ($P > 0.05$) in serum levels of ALT, AST, and ALP, since no increase in the levels of these parameters was noted in CL-treated groups compared to the controls. This may suggest no apparent hepatotoxicity effect in rats. Interestingly, a significant decrease in the level of ALT was observed in the male group treated with 500 mg/kg of CL extract, which suggest that the extract may exhibit a potential hepato-protective effect at this dose.

Bilirubin is a breakdown product of hemoglobin, and the increase of its serum level is associated with illness such as primary biliary cirrhosis and hepatic cholestasis (Thapa and Walia, 2007). Serum total protein levels is a rough measure of protein status that can reflect major functional variations in kidney and liver functions. Abnormal levels may be associated with liver infections or chronic inflammation (Tatefuji et al., 2014). In our study, there were no significant variations in the levels of serum total protein, albumin, and bilirubin in the treated groups relative to the control groups. These results support the previous findings in hematological parameters and liver marker enzymes, which indicate that the extract may have no adverse effects on the erythropoietic system and liver.

The kidneys are a vital organ highly vulnerable to toxic compounds due to the high volume of blood flows throughout it. It filters large types of toxins, which can accumulate in the kidney tubules (Akindele et al., 2014). Urea, uric acid, and creatinine are considered as sensitive biomarkers of renal damage (Gowda et al., 2010). In this study, no significant differences ($P > 0.05$) in the levels of creatinine, urea, and uric acid were noted among CL treated groups in comparison to the controls groups. These findings may indicate that the extract at the doses tested did not induce alterations in renal function or kidney damage. This was further supported by serum electrolytes analysis, which showed no significant changes ($P > 0.05$) in CL-treated groups as compared to controls.

Change in relative weight of organs is a reliable indicator that can be used in toxicological investigations to assess toxicity caused by drugs and chemicals (Balogun et al., 2014). In this study, a significant increase in the absolute and relative weights of the liver was observed in female rats treated with the dose of 700 mg/kg. These changes could be considered as toxicologically irrelevant since no effect was observed at the higher dose, and no histopathological alterations were noted in the liver. In summary, since the main organs relative weights affected by toxins and drugs, showed no significant alterations related to the treatment, it can be said that the CL extract did not induce any obvious adverse effect on vital organs of the treated groups in the sub-acute treatment. Furthermore, the histopathology examination showed that no histopathological lesions were observed in the lungs, liver, kidneys, heart, testes and ovaries after CL extract treatment. Therefore, these

findings may indicate that the CL extract has no toxic effect on vital organs in rats.

5. Conclusion

In conclusion, sub-chronic oral administration of CL extract at a dose up to 1000 mg/kg for a period of 90 days appears to be generally safe in rats, and may not cause severe treatment-related toxicity. However, further clinical investigations are needed to confirm its safety and effectiveness in humans. Furthermore, additional pre-clinical toxicological data should be obtained and ascertained over repeated long-term studies.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by the University of Sidi Mohamed Ben Abdellah (USMBA), and by a grant from the National Center for Scientific and Technical Research of Morocco (CNRST) to Mohamed El Kabbouli (fellowship number No: 021USMBA2014).

References

- Adeyemi, O.O., Akindele, A.J., Nwumeh, K.I., 2010. Acute and subchronic toxicological assessment of *Intersocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) aqueous leaf extract. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 3, 1–11.
- Akindele, A.J., Adeneye, A.A., Salau, O.S., Sofidiya, M.O., Benebo, A.S., 2014. Dose and time-dependent sub-chronic toxicity study of hydroethanolic leaf extract of *Flabellaria paniculata* Cav. (Malpighiaceae) in rodents. *Front. Pharmacol.* 5, 78. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00078>.
- Amensour, M., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J.A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J., Fernández-López, J., 2010. Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 170–178. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-010-0168-2>.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P., 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind. Crops Prod.* 30, 165–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.01.009>.
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A., 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol. Toxicol.* 16, 83–90. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007633824948>.
- Aziz, M., Tab, N., Karim, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Ziyat, A., Melhaoui, A., Legssyer, A., 2006. Relaxant effect of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* on rodent intestinal contractions. *Fitoterapia* 77, 425–428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.015>.
- Bahmani, M., Mirhoseini, M., Shirzad, H., Sedighi, M., Shahinfard, N., Rafieian-Kopaei, M., 2015. A Review on Promising Natural Agents Effective on Hyperlipidemia. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* 20, 228–238. <http://dx.doi.org/10.1177/2156587214568457>.
- Balogun, S.O., Da Silva, I.F., Colodel, E.M., De Oliveira, R.G., Ascêncio, S.D., De Oliveira Martins, D.T., 2014. Toxicological evaluation of hydroethanolic extract of *Helicteres sacarolha* A. St.- Hil. et al. *J. Ethnopharmacol.* 157, 285–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.013>.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.1281>.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2273–2282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060>.
- Barros, L., Dueñas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Ind. Crops Prod.* 41, 41–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.038>.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C., 1991. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol.* 35, 123–143. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90064-K](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(91)90064-K).
- Belmokhtar, M., Bouanani, N.E., Ziyat, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Aziz, M., Matéo, P., Fischmeister, R., Legssyer, A., 2009. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of aqueous extract of *Cistus ladaniferus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 145–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j>

- j.bbre.2009.08.113.
- Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyat, A., 2002. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab.* 10, 33–50.
- Costa-Silva, J.H., Lima, C.R., Silva, E.J.R., Araújo, A.V., Fraga, M.C.C.A., Ribeiro, E., Ribeiro, A., Arruda, A.C., Lafayette, S.S.L., Wanderley, A.G., 2008. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. *J. Ethnopharmacol.* 116, 495–500. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.016>.
- El Hamsas, El Youbi, A., El Mansouri, L., Boukhira, S., Daoudi, A., Bousta, D., 2016. In Vivo Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of Aqueous Extract of *Cistus ladanifer* L. From Morocco. *Am. J. Ther.* 6, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1097/MJT.0000000000000419>.
- El Kabbaoui, M., Chda, A., Azdad, O., Mejrhit, N., Aarab, L., Bencheikh, R., Tazi, A., 2016. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 1044–1049. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.09.005>.
- Ezeja, M.I., Anaga, A.O., Asuzu, I.U., 2014. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 151, 1155–1164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.034>.
- Fernández-Arroyo, S., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. *Phytochem. Anal.* 21, 307–313. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.1200>.
- Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A.P., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2012. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Nat. Prod. Res.* 26, 1558–1560. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.569504>.
- Fuster, V., Eric, J., Nabel, E.G., 2005. Patho-biology of asymptomatic atherosclerosis leading to symptomatic arterothrombosis. *J. Am. Cardiol.* 46, 937–941.
- Gomes, P.B., Mata, V.G., Rodrigues, A.E., 2005. Characterization of the Portuguese-Grown *Cistus ladanifer* Essential Oil. *J. Essent. Oil Res.* 17, 160–165. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2005.9698864>.
- Gowda, S., Desai, P.B., Kulkarni, S.S., Hull, V.V., Math, A.A.K., Vernekar, S.N., 2010. Markers of renal function tests. *N. Am. J. Med. Sci.* 2, 170–173.
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A.M., Sousa, M.J., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R., 2009. Aromatic plants as a source of important phytochemicals: vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus gunnii* leaves. *Ind. Crops Prod.* 30, 427–430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.08.002>.
- Han, J.S., Lee, B.S., Han, S.R., Han, H.Y., Chung, M.K., Min, B.S., Seok, J.H., Kim, Y.B., 2016. A subchronic toxicity study of *Radix Dipsaci* water extract by oral administration in F344 rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 81, 136–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.07.017>.
- Huang, Q., Chen, L., Teng, H., Song, H., Wu, X., Xu, M., 2015. Phenolic compounds ameliorate the glucose uptake in HepG2 cells' insulin resistance via activating AMPK: anti-diabetic effect of phenolic compounds in HepG2 cells. *J. Funct. Foods* 19, 487–494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.020>.
- Lemhadri, A., Hajji, L., Michel, J.B., Eddouks, M., 2006. Cholesterol and triglycerides lowering activities of caraway fruits in normal and streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 106, 321–326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.033>.
- Liju, V.B., Jeena, K., Kuttan, R., 2013. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Food Chem. Toxicol.* 53, 52–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.027>.
- Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H., 2010. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 30. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-10-30>.
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T., Kim, R.B., 2004. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 75, 13–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clpt.2003.09.012>.
- Mekhfi, H., Haouari, M.E., Legssyer, A., Bnouham, M., Aziz, M., Atmani, F., Remmal, A., Ziyat, A., 2004. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 94, 317–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.005>.
- Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., Molero Mesa, J., 2000. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). *Fitoterapia* 71, 278–307. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00139-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00139-8).
- Mohan, S., Nandhakumar, L., 2014. Role of various flavonoids: hypotheses on novel approach to treat diabetes. *J. Med. Hypotheses Ideas* 8, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmhi.2013.06.001>.
- Neergheen-Bhujun, V.S., 2013. Underestimating the toxicological challenges associated with the use of herbal medicinal products in developing countries. *Biomed. Res. Int.* 2013, 804086. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/804086>.
- OECD, 2001a. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Test No. 423, Adopted 22nd March 1996, and Revised Method Adopted 17th December 2001, OECD, Paris.
- OECD, 2001b. Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures, OECD, Paris, Adopted 14th August 2001, (Chapter 2.1).
- OECD, 2008. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guideline for Testing of Chemicals No. TG 408, OECD, Paris.
- Olorunnisola, O., Bradley, G., Afolayan, A., 2012. Acute and sub-chronic toxicity studies of methanolic extract of *Tulbaghia violacea* rhizomes in Wistar rats. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 14934–14940. <http://dx.doi.org/10.4314/ajb.v11i83>.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A., 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32, 56–67. <http://dx.doi.org/10.1006/rtp.2000.1399>.
- Ortiz, P.L., 1994. The Cistaceae as food resources for honey bees in SW Spain. *J. Apic. Res.* 33, 136–144. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1994.11100861>.
- Ramaiah, S.K., 2011. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clin. Lab. Med.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cl.2010.10.004>.
- Robles, C., Bousquet-Mélou, A., Garzino, S., Bonin, G., 2003. Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 339–343. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00161-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00161-8).
- Saad, B., Azaiz, H., Abu-Hijleh, G., Said, O., 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence-based Complement. Altern. Med. 3, 433–439. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nel058>.
- Sakuma, T., Kawasaki, Y., Jarukamjorn, K., Nemoto, N., 2009. Sex differences of drug-metabolizing enzyme: female predominant expression of human and mouse cytochrome P450 3A isoforms. *J. Heal. Sci.* 55, 325–337. <http://dx.doi.org/10.1248/jhs.55.325>.
- Sosa, T., Chaves, N., Alias, J.C., Escudero, J.C., Henao, F., Gutiérrez-Merino, C., 2004. Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores. *J. Chem. Ecol.* 30, 1087–1101. <http://dx.doi.org/10.1023/B:JOEC.0000030265.45127.08>.
- Sung, J.H., Lee, S.-J., Park, K.H., Moon, T.W., 2004. Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A Reductase *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 428–432. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.68.428>.
- Tatefuji, T., Yanagihara, M., Fukushima, S., Hashimoto, K., 2014. Safety assessment of melingo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem. Toxicol.* 67, 230–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.030>.
- Teixeira, S., Mendes, A., Alves, A., Santos, L., 2007. Simultaneous distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. *Anal. Chim. Acta* 584, 439–446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.054>.
- Thapa, B.R., Walia, A., 2007. Liver function tests and their interpretation. *Indian J. Pediatr.* 74, 663–671. <http://dx.doi.org/10.1007/s12098-007-0118-7>.
- Unnikrishnan, M.K., Veerapur, V., Nayak, Y., Paul, P., Mathew, G., 2014. Chapter 13. Antidiabetic, Antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoids. *Polyphe. Hum. Heal. Dis.*, 143–161. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00013-X>.
- Vinayagam, R., Xu, B., 2015. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutr. Metab. (Lond.)* 12, 1–20. <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7>.
- Waxman, D.J., Holloway, M.G., 2009. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol. Pharmacol.* 76, 215–228. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.056705>.
- Wilson, P.W., Abbott, R.D., Garrison, R.J., Castelli, W.P., 1981. Estimation of very-low-density lipoprotein cholesterol from data on triglyceride concentration in plasma. *Clin. Chem.* 27, 2008–2010.
- Wolf, G., Ziyadeh, F.N., 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron - Physiol.* 106, 26–31. <http://dx.doi.org/10.1159/000101797>.
- World Health Organization, 2008. Traditional Medicine. Fact Sheet 134, 2003–2005. Archived from the Original on 28.07.08.
- Yamaguchi, M., Uchiyama, S., Nakagawa, T., 2007a. Preventive effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone loss in ovariectomized rats in vivo. *J. Heal. Sci.* 53, 571–575. <http://dx.doi.org/10.1248/jhs.53.571>.
- Yamaguchi, M., Hamamoto, R., Uchiyama, S., Ishiyama, K., Hashimoto, K., 2007b. Preventive effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone loss in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *J. Heal. Sci.* 53, 190–195. <http://dx.doi.org/10.1248/jhs.53.190>.
- Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., Kang, W., 2014. α-Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci. Hum. Wellness* 3, 136–174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G., 2016. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* 21, 559. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21050559>.
- Yuet Ping, K., Darah, I., Chen, Y., Sreeramanan, S., Sasidharan, S., 2013. Acute and subchronic toxicity study of *Euphorbia hirta* L. methanol extract in rats. *Biomed. Res. Int.*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/182064>.

Discussion

I-Toxicité aiguë chez les souris

Dans l'étude de la toxicité aiguë, l'extrait de *Cistus ladaniferus* à des doses inférieures à 2 g/Kg n'a pas entraîné de mortalité ou des signes de toxicité chez les souris mâles et femelles au cours de la période d'observation. Le poids des souris n'a pas montré des changements significatifs au cours des 14 jours qui ont suivi le traitement par rapport au groupe témoin **(figure 1, article 3)**. Cependant, nous avons enregistré un seul cas de décès à la dose de 3 g/Kg, qui est survenu 48 heures après l'administration de cette dose. Chez les souris traitées à la dose de 3 g/Kg, nous avons noté l'apparition d'une légère hypoactivité chez quelques animaux qui a persisté quelques heures après le début du traitement.

À la dose la plus élevée de 5 g/Kg, 3 cas de décès ont été enregistrés, et des signes cliniques de toxicité, tels que l'hypoactivité, l'asthénie et la piloérection étaient plus prononcés chez les souris. De plus, chez le groupe des souris femelles, une diminution significative du poids corporel a été observée 7 jours après le traitement **(figure 2, article 3)**.

L'administration de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* à dose unique n'a pas entraîné la mort de 50 % des souris du groupe traité par la dose maximale de 5 g/kg. Par conséquent, la DL50 (Dose Létale 50%) déterminée selon la méthode de toxicité aiguë de OCDE code 423 par voie orale est supérieure à 5 g/Kg.

Toxicité sub-chronique chez les rats

Dans l'étude de la toxicité sub-chronique, 3 lots de 12 rats chacun ont été gavés quotidiennement pendant 90 jours avec des doses de 500, 700 et 1000 mg/kg de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*.

Les résultats de la toxicité sub-chronique sont présentés en trois points:

- Comportement et évolution du poids corporel des animaux ;
- Analyse des données urinaires, hématologiques et biochimiques du sang ;
- Examen histologique des organes des animaux traités.

Comportement des animaux et Evolution du poids corporel des animaux

Les résultats de l'évolution du poids corporel des groupes des rats témoins et traités par l'extrait de *Cistus ladaniferus* sont présentés dans les figures 4 et 5 (**article 3**). Aucune variation significative du poids corporel n'a été notée entre les groupes témoins et traités tout au long de la période de traitement. De plus, aucun cas de mortalité ou signe de toxicité n'a été observé chez les différents groupes de rats au cours de la période de traitement.

Analyse des données urinaires, hématologiques et biochimiques

Analyse urinaire

Les valeurs des paramètres urinaires des rats femelles et mâles sont présentées dans les tableaux 1 et 2 (**article 3**), respectivement. L'administration de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* aux rats n'a pas entraîné des changements significatifs dans les niveaux des différents paramètres (glucose, bilirubine, cétone, sang, urobilinogène, nitrite, leucocytes, densité, pH et protéine) analysés dans les urines, sauf pour les rats mâles traités à la dose de 1000 mg/kg, qui ont montré une augmentation de la protéinurie. Cependant, cette variation était non-dose dépendante et non significative par rapport au groupe témoin.

Analyse hématologique

L'effet de l'administration orale de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* (500, 700 et 1000 mg/Kg) sur les paramètres hématologiques est résumé dans les tableaux 3 et 4 (**article 3**).. L'analyse hématologique a révélé quelques changements chez les rats mâles et femelles

traités. Cependant, ces variations n'étaient pas observées chez tous les groupes traités et n'étaient pas doses dépendantes. Une augmentation significative ($p < 0,05$) et non dose-dépendante du nombre des globules blancs (leucocytes) et des plaquettes a été notée chez les rats femelles traités à la dose de 1000 mg/Kg d'extrait. De plus, les rats mâles traités à la dose de 500 mg/Kg ont montré une diminution significative ($p < 0,05$) et non dose dépendante du volume globulaire moyen (VGM) par rapport au groupe témoin.

Analyse biochimique

Les tableaux 5 et 6 (**article 3**) regroupent les résultats de l'analyse des paramètres biochimiques des différents groupes de rats mâles et femelles. Chez tous les groupes traités à différentes doses de l'extrait de *Cistus ladaniferus*, une réduction significative des taux du cholestérol total, des triglycérides, du LDL-cholestérol, et du VLDL-cholestérol a été notée chez les rats par rapport aux groupes témoins. Par ailleurs, l'extrait de *Cistus ladaniferus* a diminué de façon significative la glycémie des rats traités, cette diminution était très significative à la dose de 1000 mg/Kg ($P < 0,01$).

De plus, une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité de l'ALAT a été observée chez rats mâles traités à la dose de 500 mg/Kg d'extrait par rapport au groupe témoin, tandis que les activités des autres enzymes ASAT et ALP n'ont pas montré des variations significatives à la fin de la période de traitement. Aucune variation significative n'a été notée aux niveaux de la bilirubine totale, des protéines totales et d'albumine chez les différents groupes. Les taux de créatinine, d'urée et d'acide urique et des électrolytes sériques (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) n'ont pas montré des variations significatives chez les groupes traités avec l'extrait à différentes doses par rapport aux groupes témoins.

Examen histologique des organes des animaux traités

Les poids relatifs des organes des différents groupes sont présentés dans les tableaux 7 et 8 **(article 3)**. L'examen des organes des rats des groupes traités n'a révélé aucune altération anormale liée à l'administration de l'extrait. Les poids relatifs des organes des groupes traités n'ont montré aucune différence significative par rapport à ceux des groupes témoins. Par ailleurs, une augmentation significative mais non dose-dépendante du poids relatif du foie a été notée chez les rats femelles traités à la dose de 700 mg/Kg. Cependant, aucune variation significative n'a été observée chez le groupe traité à la dose de 1000 mg/kg ($p > 0,05$) **(tableaux 7 et 8 ; article 3)**.

À la fin de la période du traitement, les organes vitaux, y compris le coeur, le foie, les reins, les poumons, les testicules et les ovaires ont été soumis à un examen histopathologique. L'observation microscopique des tissus a montré qu'il n'y avait pas d'anomalies morphologiques provoquées par l'administration quotidienne de l'extrait de *Cistus ladaniferus* pendant les 90 jours de traitement **(figure 5, article 3)**. Par conséquent, aucune altération pathologique liée au traitement n'a été révélée chez les groupes traités à la suite de l'examen histopathologique.

Discussion générale

Le diabète sucré est un syndrome métabolique chronique résultant de l'interaction entre des facteurs héréditaires et environnementaux. Il est caractérisé par une perturbation de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline. Ce qui affecte, par conséquent, le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. En plus, il engendre des lésions au niveau du foie, des reins et des vaisseaux.

Cistus ladaniferus et *Thymus satureioides* sont des plantes médicinales rapportées dans plusieurs enquêtes comme étant des remèdes traditionnels utilisés pour traiter le diabète. La présente étude rapporte les activités anti-hyperglycémiantes et antihyperlipidémiantes des extraits aqueux de ces deux plantes chez des rats rendus diabétiques par la STZ.

L'administration des extraits aqueux de ces deux plantes à des rats diabétiques pendant 4 semaines a entraîné une diminution significative de la glycémie à jeun par rapport aux rats diabétiques non traités. L'activité antidiabétique des extraits était comparable à celle obtenue pour la glibenclamide, un antidiabétique standard utilisé comme témoin positif dans les études expérimentales sur le diabète.

L'effet des extraits sur la tolérance et l'utilisation tissulaire du glucose ont été évalués chez les rats diabétiques en utilisant le test oral de tolérance au glucose. Les rats diabétiques ont montré une augmentation significative de l'AUC de la glycémie par rapport aux rats témoins normaux. L'altération de l'homéostasie glycémique causée par un dysfonctionnement pancréatique entraîne une augmentation de la néoglucogenèse hépatique et une utilisation anormale du glucose par les tissus périphériques [Abdallah et al, 2015]. Par ailleurs, la réduction significative de l'AUC de la glycémie observée chez les groupes traités par les extraits par rapport aux rats non diabétiques suggère que les extraits induisent une

augmentation de l'utilisation du glucose par les tissus chez les rats diabétiques, ce qui indique une amélioration de l'homéostasie glycémique. Les résultats de notre étude sont similaires à ceux rapportés par plusieurs travaux sur les plantes à effet antidiabétique [Elberry et al, 2015; Eidi et al, 2007; Nabi, et al 2013; Petchi et al 2013; Mollica al 2017; Borah et al 2017].

Les rats diabétiques ont manifesté une réduction significative du poids corporel concomitante à l'hyperglycémie. La diminution du poids corporel des rats diabétiques est attribuée au catabolisme intensif des lipides et des protéines structurelles utilisées comme source d'énergie en raison de l'altération du métabolisme des glucides [Krishnasamy et al, 2013].

L'insuline joue un rôle important dans la régulation de la synthèse des protéines et la protéolyse dans le muscle squelettique. En cas d'insulino-résistance ou de déficit en insuline, il y a une augmentation du catabolisme des protéines qui fournit les acides aminés pour la gluconéogenèse [Florence et al, 2014]. Ce qui entraîne une atrophie musculaire et une perte de poids chez les rats diabétiques. Le traitement des rats diabétiques par les extraits aqueux et le glibenclamide pendant 28 jours consécutifs a diminué leur perte pondérale, ce qui reflète une amélioration de l'homéostasie du glucose.

Dans le diabète, l'hyperglycémie est associée souvent à la dyslipidémie, ce qui représente un facteur de risque des maladies cardiovasculaires [Chehade et al, 2013]. Le taux anormalement élevé des lipides sériques est principalement dû à l'inhibition des hormones lipolytiques, qui est causée par une déficience ou une diminution de la sensibilité à l'insuline [Chehade et al, 2013]. Dans les circonstances normales, l'insuline active les lipoprotéines lipases, qui hydrolysent les triglycérides. Cependant, dans l'état diabétique, la déficience en insuline provoque l'inactivation de la lipoprotéine lipase, entraînant une hypertriglycérémie et une hypercholestérolémie [Girija et al, 2011]. De plus, dans l'état diabétique, la sécrétion

des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) est stimulée par des concentrations élevées de triglycérides **[Karim et al, 2013]**. Dans notre étude, une altération des paramètres du profil lipidique sérique a été observée chez des rats diabétiques. Ces résultats sont en corrélation avec les résultats des études antérieures **[Vidhya et al, 2016; Hassan et al, 2015]**.

Les altérations du profil lipidique sérique ont été atténuées 4 semaines après l'administration des extraits aqueux aux rats diabétiques par rapport au profil lipidique des rats témoins. L'effet des extraits sur le métabolisme des lipides pourrait être attribué à l'amélioration de l'activité de l'insuline ou à une augmentation de sa sécrétion. D'autre part, l'activité antihyperlipidémiant des extraits peut être attribuée également à d'autres mécanismes, tels que l'inhibition de certaines enzymes clés impliquées dans la biosynthèse du cholestérol et des acides gras. La régulation des taux de lipides plasmatiques ou tissulaires diminue les risques des maladies cardio-vasculaires **[Sakatani et al, 2005]**. Par conséquent, les extraits pourraient être bénéfiques dans la prévention des complications du diabète telles que l'athérosclérose et les maladies coronariennes.

Les taux sériques élevés des transaminases sont des indicateurs des lésions hépatiques **[Subramanian et al, 2013]**. Dans la présente étude, des taux sériques élevés d'ASAT et d'ALAT ont été notés chez les rats diabétiques témoins par rapport aux rats non diabétiques. Ce résultat suggère des dommages hépatiques possibles causés par l'injection de STZ, qui est l'une des altérations caractéristiques du diabète expérimental induit par ce composé. Cependant, les rats diabétiques traités avec les extraits aqueux pendant 28 jours ont montré une réduction significative des niveaux d'ASAT et d'ALAT par rapport aux rats diabétiques non traités. Ce résultat a montré que l'extrait aqueux peut avoir une activité hépato-protectrice chez les rats diabétiques en atténuant les dommages causés par la STZ.

Les taux sanguins élevés d'urée et de créatinine sont considérés comme des marqueurs des dommages rénaux **[Honoré et al, 2012]**. Par conséquent, les niveaux élevés de ces deux paramètres chez les rats diabétiques suggèrent une altération de la fonction rénale. D'autre part, l'administration des extraits aqueux aux rats diabétiques a réduit significativement leurs taux de créatinine et d'urée. Ceci suggère que les extraits peuvent avoir une action préventive contre les dommages rénaux dans le diabète.

Les résultats de la présente étude ont démontré que les extraits aqueux étaient riches en polyphénols et en flavonoïdes. Ces composés phytochimiques présents dans les extraits aqueux peuvent être impliqués dans les activités pharmacologiques observées. Plusieurs études ont démontré que les polyphénols et les flavonoïdes peuvent exercer des effets antidiabétiques par divers mécanismes, tels que l'inhibition des glucosidases, la stimulation de la sécrétion d'insuline et l'augmentation de l'utilisation périphérique du glucose **[Patel et al, 2012]**. Plusieurs plantes riches en flavonoïdes ont également montré un effet antihyperlipidémiant en régulant l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides **[Unnikrishnan et al, 2014]**. Il a été également rapporté que les polyphénols et les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydantes qui peuvent atténuer les complications associées au diabète dans le foie, les reins et les vaisseaux sanguins par divers mécanismes tels que l'inhibition de l'aldose réductase, l'inhibition de la glycation avancée des protéines et par la diminution des radicaux libres dans les tissus **[Babu et al, 2013]**.

L'inhibition des enzymes impliquées dans la digestion des glucides est une stratégie incontournable pour le contrôle de la glycémie post-prandiale et des complications qu'elle engendre. L'acarbose est un médicament commercial employé dans le traitement du diabète de type 2. Cette molécule inhibe les enzymes glycosides hydrolases nécessaires à la digestion des glucides (l'alpha-glucosidase intestinale et l'alpha-amylase pancréatique). L'inhibition de ces enzymes réduit la digestion des glucides complexes au niveau de l'intestin grêle. Pour

pallier les effets secondaires associés aux inhibiteurs synthétiques des glucosidases, la recherche des substances actives d'origine naturelle est actuellement en plein essor de développement. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que les extraits aqueux peuvent inhiber significativement l' α -glucosidase et de l' α -amylase *in vitro*. Cette activité inhibitrice des extraits aqueux peut être attribuable à leur richesse en composés phénoliques notamment les flavonoïdes. Par ailleurs, ces résultats permettent aussi de confirmer l'usage de ces plantes en médecine traditionnelle, notamment dans le traitement du diabète.

Malgré l'utilisation populaire des plantes médicinales pour les soins de santé dans les pays en développement, peu de données scientifiques concernant leur toxicité et leurs effets indésirables sont disponibles [Saad et al., 2006]. En fait, plusieurs études ont rapporté des cas d'intoxications dus à l'usage des plantes médicinales. Les études de toxicologie animale constituent une étape préalable et indispensable à la vérification de l'innocuité des plantes médicinales ou des médicaments. Ces études permettront de prévoir les risques de toxicité et de fournir des données préliminaires pour la sélection des doses sûres en thérapeutique. Elles ne permettent certes pas d'éliminer tout risque de toxicité chez l'Homme, mais elles contribuent, généralement, à écarter les risques majeurs [Neergheen-Bhujun, 2013].

La toxicité aigue est une étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques pouvant résulter d'une administration unique de la substance à tester. Elle permet de déterminer les effets nocifs majeurs qui apparaissent chez l'animal à court terme. La toxicité chronique est une étude où la substance testée est administrée chaque jour, à faibles doses pendant plusieurs semaines (subchronique) ou même plusieurs mois (chronique). Elle permet de déceler les effets toxiques dont l'apparition est en général progressive, parce qu'ils résultent de la répétition d'effets toxiques quotidiens, très modérés sur tel ou tel organisme. Il résulte de cette toxicité chronique des altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques.

La présente étude a été menée pour évaluer la toxicité aiguë et sub-chronique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* par voie orale. Les résultats de l'étude de toxicité aiguë ont montré que la dose maximale d'extrait tolérée était de 3000 mg/Kg pour les souris mâles et 2000 mg/Kg pour les souris femelles. Une dose plus élevée (5000 mg/kg) induit des effets toxiques et de la mortalité chez une partie des animaux.

Au cours de l'étude de la toxicité aiguë, le groupe de souris femelles traité à la dose élevée a montré une diminution significative du poids corporel pendant la première semaine d'observation. Le taux de mortalité le plus élevé a été noté chez le groupe des souris femelles. Les résultats suggèrent que les souris femelles étaient plus sensibles à l'extrait de *Cistus ladaniferus* que les souris mâles. Les différences observées dans le profil de toxicité aiguë entre les mâles et les femelles peuvent s'expliquer par les variations des paramètres pharmacocinétiques liées au sexe et les paramètres pharmacodynamiques qui caractérisent de nombreux médicaments et qui peuvent conduire à des différences individuelles de toxicité médicamenteuse [Sakuma et al., 2009]. Plusieurs facteurs pharmacocinétiques peuvent être impliqués dans le métabolisme des médicaments tels que les enzymes (cytochrome P450), les protéines de transport transmembranaire (P-glycoprotéine), la taille des organes, le pourcentage plus élevé de graisse corporelle, et le faible taux de filtration glomérulaire chez les femelles que chez les mâles [Marzolini et al., 2004; Waxman et Holloway, 2009; Sakuma et al., 2009].

Dans l'étude de la toxicité aiguë, l'administration de l'extrait de *Cistus ladaniferus* jusqu'à la dose de 5000 mg/Kg n'a pas causé 50 % de mortalité chez les souris. La DL₅₀ de l'extrait est estimée supérieure à 5000 mg/Kg par voie orale. Selon le système mondial de classification harmonisé des substances chimiques (SCGH) adopté par l'OCDE, l'extrait de *Cistus ladaniferus* pourrait être classé dans la catégorie 5 des substances non ou faiblement toxiques [OCDE, 2001b].

Les changements du comportement général et le poids corporel des animaux sont considérés comme des indicateurs importants pour l'évaluation des signes primaires de toxicité causés par un médicament ou un produit chimique [Ezeja et al., 2014]. Dans l'étude de la toxicité sub-chronique aucune mortalité n'a été notée, et aucun changement dans le comportement général des rats traités par l'extrait de *Cistus ladaniferus* n'a été observé. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de variations significatives ($P > 0,05$) dans le poids corporel des rats traités par rapport aux rats témoins tout au long de la durée de l'étude. On peut conclure que l'administration orale de l'extrait de *Cistus ladaniferus* à une dose allant jusqu'à 1 g/kg pendant 90 jours n'a pas affecté la croissance normale des rats.

La protéinurie est un marqueur urinaire utilisé dans l'évaluation de la fonction rénale [Wolf et Ziyadeh, 2007]. L'analyse urinaire réalisée à la fin de l'étude sub-chronique a montré que les rats mâles traités à la dose de 1000 mg/kg d'extrait avaient une augmentation du taux des protéines urinaires, qui était dans les limites normales. Cette augmentation des protéines dans les urines n'était pas notée chez les groupes des rats femelles et n'était pas corrélée avec d'autres biomarqueurs rénaux. Ainsi, cette variation était considérée comme non liée au traitement par l'extrait.

Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus exposées aux substances toxiques. Il est aussi un marqueur important du statut physiologique et pathologique chez l'Homme et l'animal [Liju et al., 2013]. Dans cette étude, une augmentation significative du nombre des leucocytes et des plaquettes sanguines a été observée chez les rats femelles traités à la dose de 1 g/kg par rapport au groupe témoin. Cependant, ces variations n'étaient pas dose-dépendantes. Ainsi, elles ont été considérées comme non liées au traitement. L'analyse hématologique a révélé une diminution du VGM (volume corpusculaire moyen) des rats mâles traités à la dose de 500 mg/kg. Cependant, cette différence n'a pas été considérée

comme un effet toxique car elle n'a pas été observée chez les rats femelles et n'était pas dose-dépendante.

En outre, les rats traités avec différentes doses d'extrait de *Cistus ladaniferus* pendant 90 jours ont montré une diminution significative de la glycémie à la fin de la période de traitement par rapport au groupe témoin. Cette diminution de la glycémie a été également observée dans notre étude précédente, qui a montré que l'extrait aqueux possédait une activité anti-hyperglycémiant chez les rats rendus diabétiques par la STZ [El kabbaoui et al., 2016].

L'hyperlipidémie est l'un des principaux facteurs de risque de l'athérosclérose, qui conduit aux maladies coronariennes [Fuster et al., 2005]. L'administration orale de l'extrait aqueux aux rats pendant 13 semaines a entraîné une réduction significative ($p < 0,05$) du cholestérol total, des triglycérides, du LDL-cholestérol et du VLDL-cholestérol et une augmentation du HDL-cholestérol par rapport aux rats témoins. Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* pourrait être bénéfique dans la protection contre les complications du diabète telles que l'athérosclérose et les maladies coronariennes.

Les études phytochimiques ont montré que l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* contient une variété de composés phénoliques et flavonoïdes [Barrajón-Catalán et al., 2011; Fernández-Arroyo et al., 2010]. Les constituants bioactifs présents dans l'extrait aqueux de cette plante tels que les polyphénols peuvent être responsables des effets pharmacologiques observés. Plusieurs études ont montré que les polyphénols et les flavonoïdes peuvent exercer un effet hypoglycémiant par différents mécanismes, tels que l'inhibition des activités de l' α -amylase et de l' α -glucosidase, l'augmentation de l'absorption du glucose et la stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β pancréatiques [Huang et al., 2015; Mohan et Nandhakumar, 2014; Vinayagam et Xu, 2015; Yin et al., 2014]. Les plantes hypoglycémiantes contiennent des flavonoïdes qui peuvent exercer également une activité

hypolipidémiant par la stimulation de la production d'insuline ou par la régulation des activités des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides [Sung et al., 2004; Unnikrishnan et al., 2014; Vinayagam et Xu, 2015].

Le foie est un organe vital qui joue un rôle central dans la biotransformation des médicaments, et sa fonction est évaluée par le dosage de diverses enzymes sériques [Olorunnisola et al., 2012]. Les niveaux élevés d'ALAT dans le sérum indiquent une hypertrophie et des lésions des tissus hépatiques [Costa-Silva et al., 2008]. Le niveau d'ASAT, en plus d'être un indicateur de la fonction hépatique, est également utilisé pour le diagnostic des maladies musculaires et cardiaques [Adeyemi et al., 2010]. L'ALP est présente principalement dans les cellules qui tapissent le canal biliaire du foie et utilisée dans le diagnostic des pathologies de la voie biliaire [Ramaiah, 2011].

En ce qui concerne l'évaluation de la fonction hépatique, l'extrait de *Cistus ladaniferus* n'a pas produit des changements significatifs ($P > 0,05$) aux niveaux des taux sériques d'ALAT, d'ASAT et d'ALP, chez les groupes traités par rapport aux groupes témoins. Ces résultats peuvent suggérer l'absence d'effets hépatotoxiques apparents chez les rats. Par ailleurs, une diminution significative du taux d'ALAT a été observée chez le groupe des rats mâles traités à la dose de 500 mg/kg d'extrait, ce qui suggère que l'extrait peut avoir un effet hépatoprotecteur potentiel à cette dose. La bilirubine est un produit de dégradation de l'hémoglobine et l'augmentation de son niveau sérique est associée à des maladies telles la cirrhose et la cholestase hépatique [Thapa et Walia, 2007]. Les niveaux de protéines totales dans le sérum peuvent refléter des variations fonctionnelles majeures dans le foie et le rein. Des niveaux sériques anormaux de protéines peuvent être associés à des infections hépatiques ou à une inflammation chronique [Tatefuji et al., 2014]. Dans notre étude, il n'y avait pas de variations significatives dans les niveaux de protéines totales, d'albumine et de bilirubine chez les groupes traités par rapport aux groupes témoins. Ces résultats sont en corrélation avec les

résultats des paramètres hématologiques et des enzymes hépatiques, qui ont montré que l'extrait n'a pas d'effets toxiques sur le système érythropoïétique et le foie.

Le rein est un organe vital très vulnérable aux composés toxiques en raison du volume élevé de flux sanguin qui le traverse. Il filtre plusieurs types de toxines, qui peuvent s'accumuler dans les tubules rénaux [Akindele et al., 2014]. L'urée, l'acide urique et la créatinine sont considérés comme des biomarqueurs sensibles de la fonction rénale [Gowda et al., 2010].

Dans cette étude, aucune différence significative n'a été notée ($P > 0,05$) dans les niveaux de créatinine, d'urée et d'acide urique chez les groupes traités par l'extrait par rapport aux groupes contrôles. Ces résultats suggèrent que l'extrait aux doses testées n'a pas provoqué d'altérations de la fonction rénale. Cela a été noté aussi pour les électrolytes sériques, qui n'ont montré aucune variation significative ($P > 0,05$) chez les groupes traités par rapport aux contrôles.

Les variations du poids relatif des organes sont des indicateurs fiables qui peuvent être utilisés dans les études toxicologiques pour évaluer la toxicité causée par les médicaments et les produits chimiques [Balogun et al., 2014]. Dans cette étude, une augmentation des poids absolu et relatif du foie a été observée chez les rats femelles traités à la dose de 700 mg/kg. Ces changements peuvent être considérés comme insignifiants car aucune variation n'a été observée à la dose la plus élevée, et aucune altération histopathologique n'a été notée dans le foie.

Puisque les poids relatifs des principaux organes affectés par les toxines et les médicaments, n'ont pas subi des changements significatifs liés au traitement, on peut conclure que l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* n'a induit aucune altération significative aux niveaux des organes vitaux des rats traités. De plus, l'examen histopathologique n'a montré aucune lésion structurale significative au niveau des différents tissus analysés (cœur, poumons, foie, reins,

ovaires et testicules). Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* n'a eu aucun effet toxique chez des rats.

Conclusion et perspectives

Ce travail avait pour objectif de valoriser deux plantes médicinales, *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides*, appartenant respectivement aux familles des Cistacées et des Lamiacées et qui sont utilisées en médecine traditionnelle Marocaine pour le traitement du diabète sucré.

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué les activités anti-hyperglycémiantes et anti-hyperlipidémiantes des extraits aqueux de *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureioides* chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine. Les résultats obtenus ont permis de souligner les effets bénéfiques de l'administration des extraits aqueux de ces deux plantes sur la baisse de la glycémie, des paramètres du profil lipidique, rénaux et hépatiques. L'activité antidiabétique de ces deux extraits aqueux était comparable à celle obtenue avec la glibenclamide, utilisée comme antidiabétique de référence.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié le profil toxicologique de l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus*. Dans le test de toxicité aiguë, aucune mortalité ou signe de toxicité n'a été observé chez les souris traitées à des doses inférieures à 3 g/kg. La dose létale 50% (DL50) par voie orale a été estimée supérieure à 5 g/kg. Dans la toxicité sub-chronique, l'extrait a été administré aux rats par voie orale pendant 90 jours. Les analyses urinaires, hématologiques et biochimiques réalisées à la fin de l'étude n'ont révélé aucune altération significative chez les animaux traités par les 3 doses de l'extrait. Par ailleurs, l'examen histopathologique de plusieurs organes vitaux a montré qu'il n'y avait pas d'anomalies morphologiques provoquées par l'administration quotidienne des extraits de *Cistus ladaniferus* pendant les 90 jours de traitement. En conclusion, les résultats obtenus suggèrent que l'extrait aqueux *Cistus ladaniferus* peut être considéré comme étant relativement non toxique aux doses pharmacologiques testées chez les rats.

Les extraits aqueux ont montré une activité inhibitrice des enzymes (α -amylase et α -glucosidase) impliquées dans le catabolisme des glucides. Cet effet inhibiteur est probablement lié à la présence des composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits de ces plantes. Toutefois, il serait souhaitable d'approfondir notre étude en s'intéressant notamment à:

- L'identification et à la caractérisation chimique des composés présents dans les différents extraits et qui peuvent être responsables de l'effet antidiabétique *in vitro*.
- L'élucidation du mécanisme d'action en réalisant une cinétique (détermination des paramètres cinétiques) pour déterminer le type d'interaction enzyme-extrait;
- La comparaison des résultats avec ceux obtenus pour un inhibiteur des glucosidases de référence tel que l'acarbose.

Finalement, il ressort du présent travail que *Cistus ladaniferus* et *Thymus satureoidis* sont des plantes très intéressantes et riches en possibilités thérapeutiques. Les résultats de cette étude permettront d'ouvrir de futures perspectives expérimentales qui peuvent permettre d'identifier et d'isoler les molécules impliquées dans l'effet hypoglycémiant, hypolipidémiant et d'avancer vers une meilleure connaissance du (des) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans les effets pharmacologiques observés. En perspective, des études plus poussées ciblant un fractionnement bioguidé des extraits aqueux pour purifier les composés chimiques, caractériser leurs structures puis procéder aux essais pharmacologiques sont envisagées.

Références bibliographiques

Références

A

Abdallah HM, Farag MA, Abdel-Naim AB, Ghareib SA, Abdel-Sattar EA. Mechanistic evidence of *Viscum schimperi* (Viscaceae) antihyperglycemic activity: from a bioactivity-guided approach to comprehensive metabolite profiling. *Phytother Res* 2015;29:1737-43.

Ademiluyi, A. O., & Oboh, G. (2013). Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(3), 305-309.

Adeyemi, O.O., Akindele, A.J., Nwumeh, K.I., 2010. Acute and subchronic toxicological assessment of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) aqueous leaf extract. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 3, 1–11.

Aissaoui, A., Zizi, S., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2011). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Coriandrum sativum* L. in Meriones shawi rats. *Journal of ethnopharmacology*, 137(1), 652-661.

Akindele, A.J., Adeneye, A.A., Salau, O.S., Sofidiya, M.O., Benebo, A.S., 2014. Dose and time-dependent sub-chronic toxicity study of hydroethanolic leaf extract of *Flabellaria paniculata* Cav. (Malpighiaceae) in rodents. *Front. Pharmacol.* 5, 78.

Alarcon-Aguilar, F. J., Valdes-Arzate, A., Santiago Xolalpa-molina, T. B., Jimenez-estrada, M., Hern, E., & Roman-ramos, R. (2003). Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*.

Almind K, Doria A, Kahn CR (2001). Putting the genes for type II diabetes on the map. *Nat Med*, 7 (3) : 277 - 276.

Amensour, M., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J.A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J., Fernández-López, J., 2010. Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 170–178.

American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 7: 1183–97.

Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P., 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind. Crops Prod.* 30, 165–167.

Annadurai, T., Muralidharan, A. R., Joseph, T., Hsu, M. J., Thomas, P. A., & Geraldine, P. (2012). Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 68(3), 307-318.

Aqil F., Owais M. (2006). In: *Modern Phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs*. Wiley-VCH. Verlag Germany, pp 59-79.

- Agarwal, M. K. (1980). Streptozotocin: mechanisms of action. *FEBS letters*, 120(1), 1-3.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B. Pourrat Legret, A. P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Pharmacie de Belgique* 1994; 49 (6): 462-468.
- Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B. and Mancini, M. (1999). Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, pp.1819-1824.
- Atkinson, M. A., & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, 358(9277), 221-229.
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A., 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol. Toxicol.* 16, 83–90.
- Aziz, M., Tab, N., Karim, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Ziyyat, A., Melhaoui, A., Legssyer, A., 2006. Relaxant effect of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* on rodent intestinal contractions. *Fitoterapia* 77, 425–428.

B

- Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* 2013;24:1777-89.
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olsen H, De Camilli P (1990). Identification of 64K autoantigen in insulin-independent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347(6289): 151-6.
- Bailey C.J., Day C., 1989. Traditional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care*; 12:553-564.
- Bailey, C. J. (2000). Rosiglitazone and pioglitazone: two new thiazolidinediones. *Practical Diabetes International*, 17(5), 135-137.
- Balogun, S.O., Da Silva, I.F., Colodel, E.M., De Oliveira, R.G., Ascêncio, S.D., De Oliveira Martins, D.T., 2014. Toxicological evaluation of hydroethanolic extract of *Helicteres sacarolha* A. St.- Hil. et al.. *J. Ethnopharmacol.* 157, 285–291.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2273–2282.

Barros, L., Dueñas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Ind. Crops Prod.* 41, 41–45.

Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C., 1991. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol.* 35, 123–143.

Bellekhdar J. 1997. Pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaire, Paris, Edit. Ibis Press, 764 p.

Belmokhtar, M., Bouanani, N.E., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Aziz, M., Matéo, P., Fischmeister, R., Legssyer, A., 2009. Antihypertensive and endotheliumdependent vasodilator effects of aqueous extract of *Cistus ladaniferus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 145–149.

Benalla, W., Bellahcen, S., & Bnouham, M. (2010). Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current diabetes reviews*, 6(4), 247-254.

Benabid A. 2000. «Flore et écosystèmes du Maroc », Évaluation et préservation de la biodiversité. Ibis Press, Paris, p. 360.

Borah, M., & Das, S. (2017). Antidiabetic, antihyperlipidemic, and antioxidant activities of *Musa balbisiana* Colla. in Type 1 diabetic rats. *Indian journal of pharmacology*, 49(1), 71.

Boubchir, M. A. (2002). *Biochimie de néphrologie* (p. 320). ISBN-00-789-23: 320.

Boudjelthia, K., Hammadi, K., Kouidri, M., & Djebli, N. (2017). Evaluation of antidiabetic activity of two plants *Berberis vulgaris* and *Zygophyllum geslini*. *J. Phys. Chem. Biophys.* 7, 236.

Bnouham, M., Benalla, W., Bellahcen, S., Hakkou, Z., Ziyyat, A., Mekhfi, H., ... & Legssyer, A. (2012). Antidiabetic and antihypertensive effect of a polyphenol-rich fraction of *Thymelaea hirsuta* L. in a model of neonatal streptozotocin-diabetic and NG-nitro-l-arginine methyl ester-hypertensive rats. *Journal of diabetes*, 4(3), 307-313.

Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyyat, A., 2002. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab.* 10, 33–50.

Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Ziyyat, A., Aziz, M., Legssyer, A., & Mekhfi, H. (2010). Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Human & experimental toxicology*, 29(10), 865-871.

Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M., & Legssyer, A. (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74(7), 677-681.

Bosquet F., Hartemann-Heurtier A, 2004. Insulinothérapie dans le diabète de type2. *EMC Endocrinologie*; 1 : 55–65.

Boynes, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40, 405-411.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.

C

Cai, W., Yu, L., Zhang, Y., Feng, L., Kong, S., Tan, H., ... & Huang, C. (2016). Extracts of *Coreopsis tinctoria* Nutt. flower exhibit antidiabetic effects via the inhibition of α -glucosidase activity. *Journal of diabetes research*, 2016.

Capet F., Debaillie R., Tafforeau J., Van-Oyen H., 1999. Situation Actuelle et Eléments pour le développement d'une Politique de Santé : diabète épidémiologie. *CROSP* ; 19 (1-12) : 27-28.

Cefalu, D. and William, T. (2006). Animal Models of Type 2 Diabetes: Clinical Presentation and Pathophysiological Relevance to the Human Condition. *ILAR Journal* 47, pp. 186-198

Cehade JM, Gladysz M, Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. *Drugs* 2013;73:327-39.

Cheng, J. T., & Liu, I. M. (2000). Stimulatory effect of caffeic acid on α 1A-adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C 2 C 12 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 362(2), 122-127.

Chen, C. W., & Cheng, H. H. (2006). A rice bran oil diet increases LDL-receptor and HMG-CoA reductase mRNA expressions and insulin sensitivity in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes. *The Journal of nutrition*, 136(6), 1472-1476.

Cehade JM, Gladysz M, Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. *Drugs* 2013;73:327-39.

Cherrington, A. D., Stevenson, R. W., Steiner, K. E., Davis, M. A., Myers, S. R., Adkins, B. A., ... & Williams, P. E. (1987). Insulin, glucagon, and glucose as regulators of hepatic glucose uptake and production in vivo. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 3(1), 307-332.

Ceriello, P. A. (2006). Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocrine Practice*, 12(Supplement 1), 60-62.

Clark, CM Jr. and Lee, DA. (1995). Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 332, pp. 1210-7.

Cooper, E. J., Hudson, A. L., Parker, C. A., & Morgan, N. G. (2003). Effects of the β -carbolines, harmine and pinoline, on insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *European journal of pharmacology*, 482(1), 189-196.

Costa-Silva, J.H., Lima, C.R., Silva, E.J.R., Araújo, A.V., Fraga, M.C.C.A., Ribeiro, E., Ribeiro, A., Arruda, A.C., Lafayette, S.S.L., Wanderley, A.G., 2008. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. J. Ethnopharmacol. 116, 495–500.

D

Dagogo-Jack S, Santiago JV (1997). Physiopathology of type 2 diabetes and modes of action of therapeutic interventions. Arch intern med, 157:1802 - 1817.

Daisy, P., Balasubramanian, K., Rajalakshmi, M., Eliza, J., & Selvaraj, J. (2010). Insulin mimetic impact of Catechin isolated from *Cassia fistula* on the glucose oxidation and molecular mechanisms of glucose uptake on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Phytomedicine, 17(1), 28-36.

Daisy, P., & Kani, F. G. J. (2012). Evaluation of antidiabetic activity of various extracts of *Cassia auriculata* Linn. bark on streptozotocin-induced diabetic wistar rats. Int J Pharm pharm sci, 4(4), 312-318.

Daneman D. Type 1 diabetes. Lancet, 2006, 367(9513) : 847-58.

DeFronzo, R. A., & Ferrannini, E. (1987). Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 3(2), 415-459.

Demetzos, C., Loukis, A., Spiliotis, V., Zoakis, N., Stratigakis, N., & Katerinopoulos, H. E. (1995). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Cistus creticus* L. Journal of essential oil research, 7(4), 407-410.

Deutschländer MS, Lall N, Van de Venter M, Hussein AA (2011) Hypoglycemic evaluation of a new triterpene and other compounds isolated from *Euclea undulata* Thunb. var. myrtina (Ebenaceae) root bark. J Ethnopharmacol 133:1091–1095.

Donga, J. J., Surani, V. S., Sailor, G. U., Chauhan, S. P., & Seth, A. K. (2011). A systematic review on natural medicine used for therapy of diabetes mellitus of some Indian medicinal plants. Pharm Sci Monit, 2(1), 36-72.

E

Eddouks M, Ouahidi ML, Farid O, Moufid A, Khalidi A, Lemhadri A (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. Phytothérapie, 5 : 194 - 203.

Eddouks, M., & Ajebli, M. (2017). *Buxus sempervirens* L improves streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. Cardiovascular & hematological disorders drug targets.

Eddouks, M., Lemhadri, A., & Michel, J. B. (2004). Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. Journal of ethnopharmacology, 94(1), 143-148.

- Eddouks, M., Lemhadri, A., Zeggwagh, N. A., & Michel, J. B. (2005). Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes research and clinical practice*, 67(3), 189-195.
- Eddouks, M., Maghrani, M., & Michel, J. B. (2005). Hypoglycaemic effect of *Triticum repens* P. Beauv. in normal and diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 102(2), 228-232.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Zeggwagh, N. A., & Michel, J. B. (2005). Study of the hypoglycaemic activity of *Lepidium sativum* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 391-395.
- Eidi, A., Eidi, M., & Esmaeili, E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 13(9-10), 624-629.
- Eidi, A., Eidi, M., & Sokhteh, M. (2007). Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) seeds on serum parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research*, 27(11), 728-733
- Ehrenkranz, J. R., Lewis, N. G., Ronald Kahn, C., & Roth, J. (2005). Phlorizin: a review. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 21(1), 31-38.
- El-Abhar HS, Schaalán MF. Phytotherapy in diabetes: a review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes* 2014;5:176-97.
- Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., Gabr, S. A., Nagy, A. A., & Abdel-Sattar, E. (2015). Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of diabetes mellitus*, 3(1), 37-44.
- El Hamsas, El Youbi, A., El Mansouri, L., Boukhira, S., Daoudi, A., Boust, D., 2016. In Vivo Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of Aqueous Extract of *Cistus ladanifer* L. From Morocco. *Am. J. Ther.* 6, 1–6.
- El Hilaly, J., & Lyoussi, B. (2002). Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(2), 109-113.
- El Kabbaoui, M., Chda, A., Azdad, O., Mejrhit, N., Aarab, L., Bencheikh, R., Tazi, A., 2016. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 1044–1049.
- EL Rhaffari L. 2008. Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia, Equipe Environnement et Santé.
- Elhabazi K, Ouacherif A, Laroubi A, Aboufatima R, Abbad A, Benharref A, et al. the Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satureioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. *Afr J Microbiol Res* 2008;2:262-7.

El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate provine (Northern Morocco). J Ethnopharmacol 86: 149-58

Ezeja, M.I., Anaga, A.O., Asuzu, I.U., 2014. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. J. Ethnopharmacol. 151, 1155–1164

F

Fang, X. K., Gao, J., & Zhu, D. N. (2008). Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. Life sciences, 82(11), 615-622.

Farid, O., Hebi, M., Ajbli, M., Hidani, A. E., & Eddouks, M. (2017). Antidiabetic effect of *Ruta montana* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology, 28(3), 275-282.

Fernández-Arroyo, S., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Seguera-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. Phytochem. Anal. 21, 307–313

Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A.P., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2012. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. Nat. Prod. Res. 26, 1558–1560.

Féry F, and Paquot N (2003). Etiopathogénie et physiopathologie du diabète de type 2. La revue de médecine interne, 24 : 730 - 737.

Flatt, P. R., Bailey, C. J., Kwasowski, P., & Swanston-flat, S. K. (1990). obese hyperglycaemic (ob/ob) syndrome in mice. Diabetes Research, 13, 23-28.

Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DDP, Pierre K, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 2014;151:784–90.

Fenton, W. S., & Stover, E. S. (2006). Mood disorders: cardiovascular and diabetes comorbidity. Current Opinion in Psychiatry, 19(4), 421-427.

Fuster, V., Eric, J., Nabel, E.G., 2005. Pathno-biology of asymptomatic atherosclerosis leading to symptomatic atherosclerosis. J. Am. Cardiol. 46, 937–941.

G

Gharbi, M. B., Elseviers, M., Zamd, M., Alaoui, A. B., Benahadi, N., Trabelssi, E. H., ... & De Broe, M. E. (2016). Chronic kidney disease, hypertension, diabetes, and obesity in the adult population of Morocco: how to avoid “over”-and “under”-diagnosis of CKD. Kidney international, 89(6), 1363-1371.

Girija K, Lakshman K, Udaya C, Sabhya SG, Divya T. Anti-diabetic and anti-cholesterolemic activity of methanol extracts of three species of *Amaranthus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011;1:133-8.

Gomes, P.B., Mata, V.G., Rodrigues, A.E., 2005. Characterization of the Portuguese- Grown *Cistus ladanifer* Essential Oil. *J. Essent. Oil Res.* 17, 160–165.

Governa, P., Baini, G., Borgonetti, V., Cettolin, G., Giachetti, D., Magnano, A. R., ... & Biagi, M. (2018). Phytotherapy in the Management of Diabetes: A Review. *Molecules*, 23(1), 105.

Gowda, S., Desai, P.B., Kulkarni, S.S., Hull, V.V., Math, A.A.K., Vernekar, S.N., 2010. Markers of renal function tests. *N. Am. J. Med. Sci.* 2, 170–17.

Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A.M., Sousa, M.J., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R., 2009. Aromatic plants as a source of important phytochemicals: vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus gunnii* leaves. *Ind. Crops Prod.* 30, 427–430.

Guillausseau, P. J., & Laloi-Michelin, M. (2003). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *La Revue de medecine interne*, 24(11), 730-737.

H

Halimi, J. M. (2015). Inhibiteurs du SGLT2: mécanisme d'action, effets rénaux et effets sur la pression artérielle. *Médecine des maladies Métaboliques*, 9(1), S26-S29.

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1365-1402.

Hasani-Ranjbar, S., & Larijani, B. (2015). Medicinal plants as potential new target drugs in endocrine disorders-review article. *Iranian Journal of Public Health*, 43(1), 24-34.

Hassan SK, El-Sammad NM, Mousa AM, Mohammed MH, Farrag AERH, Hashim ANE, et al. Antidiabetic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea Martius* leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015;5:462-71.

Hayes, C., & Kriska, A. (2008). Role of physical activity in diabetes management and prevention. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(4), S19-S23.

Hebi, M., Farid, O., Ajebli, M., & Eddouks, M. (2017). Potent antihyperglycemic and hypoglycemic effect of *Tamarix articulata* Vahl. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 230-239.

Hemalatha, P., Bomzan, D. P., Rao, B. S., & Sreerama, Y. N. (2016). Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activities. *Food chemistry*, 199, 330-33.

Hmamouchi M., (2005). Stratégie de conservation, de valorisation et de développement des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. Congrès International sur les Plantes Médicinales 16-19 Mars. Errachidia. p. 9.

Honoré SM, Cabrera WM, Genta SB, Sánchez SS. Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2012;50:1704-15.

Hou W, Li Y, Zhang Q, Wei X, Peng A, Chen L, Wei Y (2009) Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as α -glucosidase inhibitors. *Phytother Res* 23:614–618.

Hsu, F. L., Chen, Y. C., & Cheng, J. T. (2000). Caffeic acid as active principle from the fruit of *xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta medica*, 66(03), 228-230.

Huang, D. W., Shen, S. C., & Wu, J. S. B. (2009). Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(17), 7687-7692.

Huang, Q., Chen, L., Teng, H., Song, H., Wu, X., Xu, M., 2015. Phenolic compounds ameliorate the glucose uptake in HepG2 cells' insulin resistance via activating AMPK: anti-diabetic effect of phenolic compounds in HepG2 cells. *J. Funct. Foods* 19, 487–494.

I

Ichrak, G., Rim, B., Loubna, A. S., Khalid, O., Abderrahmane, R., & Said, E. M. (2011). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oils from *Thymus satureioides* and *Thymus pallidus*. *Natural product communications*, 6(10), 1507-1510.

International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2015. [Online] Available from: www.idf.org/diabetesatlas [Accessed on 8th January, 2016]

International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. Brussels: International Diabetes Federation; 2017.

Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, Ildrissi A, Camporese A, Sosa S, et al. In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J Ethnopharmacol* 2004;91:31-6.

J

Jaouhari, J. T., Lazrek, H. B., & Jana, M. (2000). The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 69(1), 17-20.

Jarald E., Joshi S.B., Jain D.C., 2008. Diabetes and herbal medicine. *Iranian Journal of Pharmacology and therapeutics*; 7: 97-106.

Jiang, P., Xiong, J., Wang, F., Grace, M. H., Lila, M. A., & Xu, R. (2017). -Amylase and Glucosidase Inhibitory Activities of Phenolic Extracts from *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* Bark. *Journal of Chemistry*, 2017.

Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, et al. (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez- Boulemane). *J Ethnopharmacol* 77(2-3): 175-82.

Jouad, H., Eddouks, M., Lacaille-Dubois, M. A., & Lyoussi, B. (2000). Hypoglycaemic effect of *Spergularia purpurea* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1), 169-177.

Jouad, H., Maghrani, M., & Eddouks, M. (2002). Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3), 351-356.

Jouad, H., Maghrani, M., & Eddouks, M. (2002). Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Ammi visnaga* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of herbal pharmacotherapy*, 2(4), 19-29.

Jouad, H., Maghrani, M., Hassani, R. A. E., & Eddouks, M. (2004). Hypoglycemic activity of aqueous extract of *Eucalyptus globulus* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 10(4), 19-28.

K

Karim MN, Ahmed KR, Bukht MS, Akter J, Chowdhury HA, Hossain S, et al. Pattern and predictors of dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr* 2013;7:95-100.

Kashikar V.S., Kotkar T., 2011. Indigenous remedies for diabetes mellitus. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 3 (3): 22-29.

Kee K. T., M. Koh, L. X. Oong, and K. Ng, “Screening culinary herbs for antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities,” *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 48, no. 9, pp. 1884–1891, 2013

Keller AC, Ma J, Kavalier A, He K, Brillantes A-MB, Kennelly EJ (2011) Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro. *Phytomedicine* 19:32–37.

Khanna, A. K., Rizvi, F., & Chander, R. (2002). Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1), 19-22.

Khadori R, Pauza ME, (2003). Type 1 Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Advances in Therapy. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 23(4): 106-119.

Khouya T, Ramchoun M, Hmidani A, Amrani S, Harnafi H, Benlyas M, et al. Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015;5:636-44.

Kim, M. J., Ryu, G. R., Chung, J. S., Sim, S. S., Rhie, D. J., Yoon, S. H., ... & Jo, Y. H. (2003). Protective effects of epicatechin against the toxic effects of streptozotocin on rat pancreatic islets: in vivo and in vitro. *Pancreas*, 26(3), 292-299.

Kim, Y., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2016). Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*, 8(1), 17.

King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1996, 25(2): 255-70.

Kobayashi, Y., Suzuki, M., Satsu, H., Arai, S., Hara, Y., Suzuki, K., ... & Shimizu, M. (2000). Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5618-5623.

Krentz, A. J., & Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents. *Drugs*, 65(3), 385-411.

Krishnasamy R. Antioxidant and antidiabetic activity of *Tectona grandis* linn. In alloxan induced albino rats. *Asian J Pharm Clin Res* 2013;6:174-7

Kritchevsky, D. (1978). Fiber, lipids, and atherosclerosis. *The American journal of clinical nutrition*, 31(10), S65-S74.

Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011). α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 19.

Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C. P., Lee, J. H., Kruhlak, M., & Levine, M. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *The FASEB Journal*, 21(2), 366-377.

L

Lai Y-C, Chen C-K, Tsai S-F, Lee S-S (2012) Triterpenes as α -glucosidase inhibitors from *Fagus hayatae*. *Phytochemistry* 74:206–211.

Lardinois, C. K., Greenfield, M. S., Schwartz, H. C., Vreman, H. J., & Reaven, G. M. (1984). Acarbose treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of internal medicine*, 144(2), 345-347.

Lebovitz, H. E. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 26(3), 539-551.

Lebovitz, H. E. (1998). α -Glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes. *Diabetes Rev*, 6, 132-145.

Lemhadri, A., Zeggwagh, N. A., Maghrani, M., Jouad, H., & Eddouks, M. (2004). Anti-hyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *Journal of ethnopharmacology*, 92(2), 251-256.

Lemhadri, A., Zeggwagh, N. A., Maghrani, M., Jouad, H., Michel, J. B., & Eddouks, M. (2004). Hypoglycaemic effect of *Calamintha officinalis* Moench. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(6), 795-799.

Liju, V.B., Jeena, K., Kuttan, R., 2013. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food Chem. Toxicol.* 53, 52–61.

Liu J, Sun H, Duan W, Mu D, Zhang L (2007) Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol Pharm Bull* 30:2075–2078.

Liu, I. M., Chi, T. C., Hsu, F. L., Chen, C. F., & Cheng, J. T. (1999). Isoferulic acid as active principle from the rhizoma of *Cimicifuga dahurica* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta medica*, 65(08), 712-714.

Loizzo, M. R., Saab, A. M., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Piccolo, V., ... & Menichini, F. (2008). In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 119(1), 109-116.

M

Maghrani, M., Lemhadri, A., Jouad, H., Michel, J. B., & Eddouks, M. (2003). Effect of the desert plant *Retama raetam* on glycaemia in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 87(1), 21-25.

Maghrani, M., Zeggwagh, N. A., Lemhadri, A., El Amraoui, M., Michel, J. B., & Eddouks, M. (2004). Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, 91(2), 309-316.

Marles R.J., Farnsworth N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 13-189.

Martin, H. J., Kornmann, F., & Fuhrmann, G. F. (2003). The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. *Chemico-biological interactions*, 146(3), 225-235.

Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T., Kim, R.B., 2004. Polymorphisms in human MDR1 (Pglycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 75, 13–33.

Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2002). Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the α -glucosidase inhibitory action. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25), 7244-7248.

Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A., Tamaya, K., Miyata, Y., ... & Matsumoto, K. (2007). α -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 99-105.

Mekhf, H., Haouari, M.E., Legssyer, A., Bnouham, M., Aziz, M., Atmani, F., Remmal, A., Ziyat, A., 2004. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 94, 317–322.

Merzouki A, Ed-Derfour F, Morelo-Mesa J (2000). Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lkbir district (NW Morocco). *Fitoterapia* 71: 278-307.

Merzouki A. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine III: phytotherapy of diabetes in Chefchaouen Province (north of Morocco). *ARS Pharm* 2003; 44(1): 59-67.

Merzouki, A. (2003). Contribution to the Knowledge of Rifian traditional medicine III: Phytotherapy of Diabetes in Chefchaouen province (North of Morocco).

Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., Molero Mesa, J., 2000. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). *Fitoterapia* 71, 278–307.

Mohan, S., Nandhakumar, L., 2014. Role of various flavonoids: hypotheses on novel approach to treat diabetes. *J. Med. Hypotheses Ideas* 8, 1–6.

Mollica, A., Zengin, G., Locatelli, M., Stefanucci, A., Mocan, A., Macedonio, G., ... & Olaniyan, M. (2017). Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic properties of *Capparis spinosa* L.: in vivo and in vitro evaluation of its nutraceutical potential. *Journal of Functional Foods*, 35, 32-42.

N

Nabi, S. A., Kasetti, R. B., Sirasanagandla, S., Tilak, T. K., Kumar, M. V. J., & Rao, C. A. (2013). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Piper longum* root aqueous extract in STZ induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 37.

Nathan, DM. (1993). Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 328, pp. 1676-1685. *Nature*, 13, pp. 813-820.

National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011.

National Diabetes Data Group. (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28(12), 1039-1057.

Nazaruk, J., & Borzym-Kluczyk, M. (2015). The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochemistry Reviews*, 14(4), 675-690.

Neergheen-Bhujun, V.S., 2013. Underestimating the toxicological challenges associated with the use of herbal medicinal products in developing countries. *Biomed. Res. Int.* 2013, 804086.

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, 17(3), 215-234.

Nomura, E., Kashiwada, A., Hosoda, A., Nakamura, K., Morishita, H., Tsuno, T., & Taniguchi, H. (2003). Synthesis of amide compounds of ferulic acid, and their stimulatory effects on insulin secretion in vitro. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(17), 3807-3813.

Nordlie, R. C., Foster, J. D., & Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual review of nutrition*, 19(1), 379-406.

Núñez-Olivera, E., Martínez-Abaigar, J. C. E. J., & Escudero, J. C. (1996). Adaptability of leaves of *Cistus ladanifer* to widely varying environmental conditions. *Functional Ecology*, 636-646.

O

Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Akinyemi, A. J., Henle, T., Saliu, J. A., & Schwarzenbolz, U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) in vitro. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 450-458.

Odhav, B ; Kandasamy, T ; Khumalo, N ; Baijnath, H. 2010. Screening of African traditional vegetables for their alpha-amylase inhibitory effect. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(14): 1502-1507.

OECD, 2001a. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Test No. 423, Adopted 22nd March 1996, and Revised Method Adopted 17th December 2001, OECD, Paris.

OECD, 2001b. Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures, OECD, Paris, Adopted 14th August 2001, (Chapter 2.1).

Ohnishi, M., Matuo, T., Tsuno, T., Hosoda, A., Nomura, E., Taniguchi, H., ... & Morishita, H. (2004). Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice. *Biofactors*, 21(1-4), 315-319.

Olorunnisola, O., Bradley, G., Afolayan, A., 2012. Acute and sub-chronic toxicity studies of methanolic extract of *Tulbaghia violacea* rhizomes in Wistar rats. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 14934–14940.

Omar Farid, F Khallouki, lhoussaine Hajji, Mohamed Eddouks*. (2017). Aqueous Extract of *Anabasis aretioides* Ameliorates Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Rats. The Natural Products Journal Volume 7 , 2017.

OMS, 2000; Organisation mondiale de la Santé: OMS, 2000: Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. [<https://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4929f/s4929f.pdf>].

OMS, 2013; Organisation mondiale de la Santé: OMS, 2013: Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle. [<https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201fr/s21201fr.pdf>].

OMS, 2016; Organisation mondiale de la Santé: OMS, 2016, Rapport mondiale sur le diabète [<http://www.who.int/diabetes/global-report/fr/>].

Orban J.C., Ichai C., 2008. Complications métaboliques aiguës du diabète. Réanimation ; 17 : 761- 767.

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

Ouassou, H., Zahidi, T., Bouknana, S., Bouhrim, M., Mekhfi, H., Ziyat, A., ... & Bnouham, M. (2018). Inhibition of α -Glucosidase, Intestinal Glucose Absorption, and Antidiabetic Properties by *Caralluma europaea*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

P

Palsamy, P., & Subramanian, S. (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(9), 598-605

Pan, G. Y., Huang, Z. J., Wang, G. J., Fawcett, J. P., Liu, X. D., Zhao, X. C., ... & Xie, Y. Y. (2003). The antihyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta Medica*, 69(07), 632-636.

Patel DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus an overview of its pharmacological aspects. *Asian Pac J Trop Dis* 2012;2:239-50.

Patel, M. B., & Mishra, S. (2011). Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia*. *Phytomedicine*, 18(12), 1045-1052.

Peterson, R. G., Shaw, W. N., Neel, M. A., Little, L. A., & Eichberg, J. (1990). Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR Journal*, 32(3), 16-19.

Petchi, R. R., Parasuraman, S., & Vijaya, C. (2013). Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of an ethanolic extract of the whole plant of *Tridax procumbens* (Linn.) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of basic and clinical pharmacy*, 4(4), 88.

Peungvicha, P., Temsiririrkkul, R., Prasain, J. K., Tezuka, Y., Kadota, S., Thirawarapan, S. S., & Watanabe, H. (1998). 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. *Journal of ethnopharmacology*, 62(1), 79-84.

Pinent, M., Blay, M., Blade, M. C., Salvado, M. J., Arola, L., & Ardevol, A. (2004). Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*, 145(11), 4985-4990.

Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F., Sousa, J. L., Tomé, S. M., ... & Fernandes, E. (2017). α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 1216-1228.

Puls, W., Keup, U., Krause, H. P., Thomas, G., & Hoffmeister, F. (1977). Glucosidase inhibition. *Naturwissenschaften*, 64(10), 536-537.

Q

Quanhong, L. I., Caili, F., Yukui, R., Guanghui, H., & Tongyi, C. (2005). Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 60(1), 13-16.

R

Rabinovitch, A., Gutzeit, A., Renold, A. E., & Cerasi, E. (1975). Insulin secretion in the spiny mouse (*Acomys cahirinus*): Dose and time kinetic studies with glucose in vivo and in vitro. *Diabetes*, 24(12), 1094-1100.

Rahimzadeh, M., Jahanshahi, S., Moein, S., & Moein, M. R. (2014). Evaluation of alpha-amylase inhibition by *Urtica dioica* and *Juglans regia* extracts. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(6), 465.

Rajagopal, K., & Sasikala, K. (2008). Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rats. *Singapore medical journal*, 49(2), 137.

Ramaiah, S.K., 2011. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clin. Lab. Med.*

Ramchoun M, Sellam K, Harnafi H, Alem C, Benlyas M, Khallouki F, et al. Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus satureioides* collected from Tafilalet Region, southeast of Morocco. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015;5:93-100.

Ramchoun, M., Harnafi, H., Alem, C., Büchele, B., Simmet, T., Rouis, M., ... & Amrani, S. (2012). Hypolipidemic and antioxidant effect of polyphenol-rich extracts from Moroccan thyme varieties. *e-SPEN Journal*, 7(3), e119-e124.

Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613.

Rhalem N, KHattabi A, Soulaymani A, Ouammi L Soulaymani B R. Etude rétrospective des intoxications par les plantes au Maroc: Expérience du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (1980-2008), Toxicologie Maroc, 2010, 5 : 5-8.

Robles, C., Bousquet-Mélou, A., Garzino, S., Bonin, G., 2003. Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. Biochem. Syst. Ecol. 31, 339–343.

Rossetti, L., Shulman, G. I., Zawulich, W., & DeFronzo, R. A. (1987). Effect of chronic hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats. The Journal of clinical investigation, 80(4), 1037-1044.

S

Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, O., 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence-based Complement. Altern. Med. 3, 433–439.

Sabu, M. C., Smitha, K., & Kuttan, R. (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. Journal of ethnopharmacology, 83(1), 109-116.

Sakatani T, Shirayama T, Suzaki Y, Yamamoto T, Mani H, Kawasaki T, et al. The association between cholesterol and mortality in heart failure comparison between patients with and without coronary artery disease. Int Heart J 2005;46:619-29.

Sakuma, T., Kawasaki, Y., Jarukamjorn, K., Nemoto, N., 2009. Sex differences of drugmetabolizing enzyme: female predominant expression of human and mouse cytochrome P450 3A isoforms. J. Heal. Sci. 55, 325–337.

Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 15(1), 141-183.

Santos FA, Frota JT, Arruda BR, de Melo TS, da Silva AA, Brito GA, Chaves MH, Rao VS (2012) Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of a, b-amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. Lipids Health Dis 11:98.

Saravanan, G., Ponmurugan, P., Kumar, G. P. S., & Rajarajan, T. (2009). Antidiabetic properties of S-allyl cysteine, a garlic component on streptozotocin-induced diabetes in rats. J Appl Biomed, 7, 151-9.

Sathishsekar, D., & Subramanian, S. (2005). Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. Asia Pacific journal of clinical nutrition, 14(2), 153.

Schäfer, G. (1983). Biguanides. A review of history, pharmacodynamics and therapy. Diabete & métabolisme, 9(2), 148-163.

Schrand, L. M., & Spanheimer, R. G. (2000). Nateglinide: a new member of the meglitinide family for postprandial glucose control in type 2 diabetes. Formulary, 35(10), 798.

- Shafrir, E. (1992). Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes/metabolism reviews*, 8(3), 179-208.
- Shafrir, E., & Gutman, A. (1993). *Psammomys obesus* of the Jerusalem colony: a model for nutritionally induced, non-insulin-dependent diabetes. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 4(1-2), 83-100.
- Shafrir, E., & Sima, A. A. (2003). *Animal models in diabetes: a primer* (Vol. 2). CRC Press.
- Sharma, B., Balomajumder, C., & Roy, P. (2008). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food and chemical toxicology*, 46(7), 2376-2383.
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115(4), 1268-1273.
- Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 171-176.
- Singh U., Singh S., Kochhar A., 2012. Therapeutic potential of antidiabetic nutraceuticals. *Phytopharmacology*; 2(1) 144-169.
- Singleton V. L, Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol.Vitic* 1965, 16:144- 158.
- Skillman, T. G., & Feldman, J. M. (1981). The pharmacology of sulfonylureas. *The American journal of medicine*, 70(2), 361-372.
- Solimena M, Dirx R, Hermel JM, Pleasic-Williams S, Shapiro JA, Caron L, Rabin DU (1996). ICA512, an autoantigen of type 1 diabetes, is in intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J*, 15(9): 2102-2114.
- Song, Y., Zhang, Y., Zhou, T., Zhang, H., Hu, X., & Li, Q. (2012). A preliminary study of monosaccharide composition and α -glucosidase inhibitory effect of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*) fruit. *International journal of food science & technology*, 47(2), 357-361.
- Sowers, J. R., Epstein, M., & Frohlich, E. D. (2001). Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*, 37(4), 1053-1059.
- Stephen Irudayaraj S, Sunil C, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2012; 143(2): 515-23.
- Subash-Babu, P., Ignacimuthu, S., & Agastian, P. (2008). Insulin secretagogue effect of *Ichnocarpus frutescence* leaf extract in experimental diabetes: a dose-dependent study. *Chemico-biological interactions*, 172(2), 159-171.

Subramanian M, Balakrishnan S, Chinnaiyan SK, Sekar VK, Chandu AN. Hepatoprotective effect of leaves of *Morinda tinctoria* Roxb. against paracetamol induced liver damage in rats. Drug Invent Today 2013;5:223–8.

Sung, J.H., Lee, S.-J., Park, K.H., Moon, T.W., 2004. Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A Reductase in vitro. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 428–432.

T

Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). J Ethnopharmacol 2007;110:105-17.

Talavera, S., Gibbs, P. E., & Herrera, J. (1993). Reproductive biology of *Cistus ladanifer* (Cistaceae). Plant Systematics and Evolution, 186(3-4), 123-134.

Tan M-J, Ye J-M, Turner N, Hohnen-Behrens C, Ke C-Q, Tang C-P, Chen T, Weiss C-H, Gesing E-R, Rowland A, James DE, Ye Y (2008) Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. Chem Biol 15:263–273.

Tantaoui-Elaraki, A., Lattaoui, N., Errifi, A., & Benjilali, B. (1993). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. Journal of Essential Oil Research, 5(1), 45-53.

Tatefuji, T., Yanagihara, M., Fukushima, S., Hashimoto, K., 2014. Safety assessment of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract: acute and subchronic toxicity studies. Food Chem. Toxicol. 67, 230–235.

Thapa, B.R., Walia, A., 2007. Liver function tests and their interpretation. Indian J. Pediatr. 74, 663–671.

Tiong, S. H., Looi, C. Y., Hazni, H., Arya, A., Paydar, M., Wong, W. F., ... & Awang, K. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Molecules, 18(8), 9770-9784.

Travlos, G. S., Morris, R. W., Elwell, M. R., Duke, A., Rosenblum, S., & Thompson, M. B. (1996). Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. Toxicology, 107(1), 17-29.

Trinh, B. T., Staerk, D., & Jäger, A. K. (2016). Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. Journal of ethnopharmacology, 186, 189-195.

Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. Mini reviews in medicinal chemistry, 10(4), 315-331.

U

Unnikrishnan MK, Veerapur V, Nayak Y, Mudgal PP, Mathew G. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoids. *Polyphenols Hum Health Dis* 2014;1:143-61.

Utsugi, T., Kanda, T., Tajima, Y., Tomono, S., Suzuki, T., Murata, K., ... & Kawazu, S. (1992). A new animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by the NDK25 variant of encephalomyocarditis virus. *Diabetes research (Edinburgh, Scotland)*, 20(4), 109-119.

V

Vessal, M., Hemmati, M., & Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(3), 357-364.

Vavra, J. J., Deboer, C., Dietz, A., Hanka, L. J., & Sokolski, W. T. (1959). Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiotics annual*, 7, 230-235.

Vidhya R, Emilin Renitta R. Evaluation of antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of an edible gastropod (*Achatina fulica*) in alloxan-induced diabetic mice. *Asian J Pharm Clin Res* 2016;9:206-11.

Vinayagam, R., Xu, B., 2015. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutr. Metab. (Lond.)*. 12, 1–20.

W

Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM. 1997. Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol* . Dec; 19 (3): 241-8.

Wang X, Li Y-L, Wu H, Liu J-Z, Hu J-X, Liao N, Peng J, Cao P-P, Liang X, Hai C-X (2011) Antidiabetic effect of oleanolic acid: a promising use of a traditional pharmacological agent. *Phytother Res* 25:1031–1040.

Wang, B. X., Zhou, Q. L., Yang, M., Wang, Y., Cui, Z. Y., Liu, Y. Q., & Ikejima, T. (2003). Hypoglycemic mechanism of ginseng glycopeptide. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(1), 61-66.

Waxman, D.J., Holloway, M.G., 2009. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol. Pharmacol.* 76, 215–228.

Wilson, G. L., Patton, N. J., McCord, J. M., Mullins, D. W., & Mossman, B. T. (1984). Mechanisms of streptozotocin-and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia*, 27(6), 587-591.

Wolf, G., Ziyadeh, F.N., 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron - Physiol.* 106, 26–31.

Wolffenbuttel, B. H. R., Nijst, L., Sels, J. P. J. E., Menheere, P. P. C. A., Müller, P. G., & Kruseman, A. N. (1993). Effects of a new oral hypoglycaemic agent, repaglinide, on metabolic control in sulphonylurea-treated patients with NIDDM. *European journal of clinical pharmacology*, 45(2), 113-116.

World Health Organization, 2008. Traditional Medicine. Fact Sheet 134, 2003–2005. Archived from the Original on 28.07.08.

y

Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., Kang, W., 2014. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci. Hum. Wellness* 3, 136–174.

Yuan, X., Gu, X., & Tang, J. (2008). Purification and characterisation of a hypoglycemic peptide from *Momordica Charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. *Food chemistry*, 111(2), 415-420.

z

Zeggwagh, N. A., Ouahidi, M. L., Lemhadri, A., & Eddouks, M. (2006). Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 108(2), 223-227.

Zeggwagh, N. A., Sulpice, T., & Eddouks, M. (2007). Anti-hyperglycaemic and hypolipidemic effects of *Ocimum basilicum* aqueous extract in diabetic rats. *Am J Pharmacol Toxicol*, 2(3), 123-9.

Zhang, D., Meng, H., & Yang, H. S. (2012). Antidiabetic activity of *Taxus cuspidata* polysaccharides in streptozotocin-induced diabetic mice. *International journal of biological macromolecules*, 50(3), 720-724.

Zhang, L., Wei, G., Liu, Y., Zu, Y., Gai, Q., & Yang, L. (2016). Antihyperglycemic and antioxidant activities of total alkaloids from *Catharanthus roseus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of forestry research*, 27(1), 167-174.

Ziyyat A, Legssyer H, Mekhfi A, et al. (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in Oriental Morocco. *J Ethnopharmacol* 58: 45-54.

Zygmunt, K., Faubert, B., MacNeil, J., & Tsiani, E. (2010). Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochemical and biophysical research communications*, 398(2), 178-183.