

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Science Biologique
Option : Biochimie Appliquée



Réf:.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de la toxicité aigue et de l'activité
antidiabétique des alcaloïdes nortropaniques
de *Hyoscyamus albus***

Présenté par :

M^{elle} SACI SOUAAD et M^{elle} TOUGUIT DAMIA

Soutenu le : **10 juin 2015**

Devant le jury composé de :

M ^r HAMOUM M.	MAB, UAMB	President
M ^{me} BEDJOU F.	Professeur, UAMB	Encadreur
M ^{me} ZEMOURI N.	MAA, UAMB	Examinatrice
M ^{elle} BOURBABA L.	Doctorante, UAMB	Invitée

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Nous tenons, tout d'abord, à remercier Dieu Miséricordieux de nous avoir donné la force d'achever ce travail.

Nous tenons également à remercier notre promotrice Pr. BEDJOU Fatiha pour nous avoir guidée, soutenue et encouragée tout au long de notre travail. Nous lui témoignons l'expression de notre reconnaissance.

A notre Co-promotrice M^{elle} BOUREBABA Lynda, pour son attention, sa simplicité, sa sympathie et sa générosité scientifique.

Nos remerciements vont également aux membres du jury, pour avoir accepté de juger notre travail : Mr HAMOUM M. pour l'honneur qu'il nous fait d'avoir accepté de présider le jury ;

Mme ZEMMOURI N. pour l'honneur qu'elle nous fait d'examiner notre mémoire.

Merci au Dr. OUKIL N. pour nous avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Au personnel de l'animalerie : SAIDA et Mr MONKOU pour leur aide précieuse

Au Dr. GHIDOUCHE A. qui nous a apporté son aide pour la réalisation de l'étude histopathologique.

Nous tenons aussi à remercier le Dr. CHEBOUT I. maître assistante hospitalo-universitaire en anatomie pathologie du CHU de Bejaia et les techniciennes Hana, Nasima et Khokha du laboratoire d'histopathologie de l'hôpital FRANTZ FANON de BEJAIA pour le temps qu'elles nous ont consacré lors de la réalisation des coupes histologiques

Nos remerciements s'adressent également au Dr. SAYAH de nous avoir permis d'effectuer nos analyses biochimiques.

Et que ces lignes soient le témoignage de notre sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents pour tout ce qu'il ont fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour leurs encouragements, sacrifice, aide et leurs conseils.

Une dédicace particulière à mon mari Athmane, que je remercie pour son soutien, sa présence et sa patience.

Mes chers sœur et frère «Yassmine et Youba» ma fierté à qui je souhaite la réussite.

Mon grand-père et Mes grands-mères.

Mes oncles, anges gardiens, ainsi que leurs épouses. Toutes mes cousines et cousins « Younes, Anis, malika, Laurianne, Naim, Badry, Ghiles, Anais, et Rayane ».

Ma chère tante Karima qui m'a toujours soutenue ainsi que son époux,

Mes beaux-parents, beaux-frères et belles sœurs.

Ma chère binôme Souaad et sa famille.

Toute la promotion Biochimie appliquée 2015.

Damia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents pour tout ce qu'il ont fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour leurs encouragements, sacrifice, aide et leurs conseils.

Mes chers sœur et frère «Fazia, Wissam et Yacine» ma fierté à qui je souhaite la réussite.

Mon grand-père et Ma grand-mères.

Mes oncles, anges gardiens, ainsi que leurs épouses. Toutes mes cousines et cousins «Rahim, Nabil, Massi, Bahi, Azedine, Amine, Kais, Halima et Ania».

Ma chère binôme Damia et sa famille.

Toute la promotion Biochimie appliquée 2015.

Souaad

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La plante <i>Hyoscyamus albus</i>	3
Figure 2 : Structures chimiques des principaux alcaloïdes tropaniques.....	5
Figure 3 :Structure de quelques calystégines.....	8
Figure 4 :Biosynthèse des calystégines.....	9
Figure 5 :Structure chimiquede la stréptozotocine.....	16
Figure 6 :Mécanisme d'action de la stréptozotocine dans la cellule β pancréatique.....	17
Figure 7 : structure chimique de l'alloxane.....	18
Figure 8 : <i>Hyoscyamus albus</i> (original).....	19
Figure 9: Elevage des souris <i>Mus musculus</i> au ssein de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie.....	20
Figure 10: Administration de la solution d'extrait par gavage intra-gastrique.....	22
Figure 11: Prélèvement du matériel biologique.....	23
Figure 12: Etapes de l'inclusion par l'automat.....	24
Figure 13: Préparation des blocs d'inclusion.....	25
Figure 14 : Lames contenant les tissus collés avec les lamelles par l'Eukitt.....	25
Figure 15: Injection de la stréptozotocine par voie intrapéritonéale.....	26
Figure 16 : Mesure de la glycémie par la veine latérale de la queue de la souris.....	27
Figure 17 : variation du poids corporel des souris durant le test de la toxicité aigüe.....	30
Figure 18 : Evolution des paramètres suivit (A : aliment consommé; B : eau consommé).....	31
Figure 19: Photographie des coupes histologique du foie (GX40).....	34
Figure 20 : Photographie des coupes histologique du rein (GX40).....	35
Figure 21 : Evolution de la glycémie chez les souris diabétiques.....	36
Figure 22 : Evolution pondérale des souris durant 20 jours de traitement.....	38
Figure 23 : Quantité de nourriture consommée par les souris durant les 20 jours du traitement.....	39
Figure 24 : Quantité d'eau consommée par les souris durant les 20 jours du test.....	40
Figure 25 : effet des calystégines sur le taux du cholestérol, triglycéride, HDL et LDL plasmatiques.....	41
Figure 26: Coupes histologiques des pancréas observées sous microscope optique (Gx10)...	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :Classification taxonomique de <i>Hyoscyamus albus</i>	04
Tableau II : Noms vernaculaires d' <i>Hyoscyamus albus</i> L.....	04
Tableau III : Quelques plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète	14
Tableau IV : Mortalité après administration d'une dose unique de l'extrait de calystégines. .	29
TABLEAU V : Classe de toxicité selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1980).....	29
Tableau VI : Résultats de l'analyse des paramètres biochimiques sériques.....	32

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction..... 1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- Matériel végétal « *Hyoscyamus albus* »..... 2

I.1.1- Généralités sur les solanacées..... 2

I.1.2- Le genre *Hyoscyamus*..... 2

I.1.3- *Hyoscyamus albus*..... 2

I.1.4- Description de *Hyoscyamus albus*..... 3

I.1.5- Classification botanique de *Hyoscyamus albus* L.....
..... **Erreur ! Signet non défini.**

I.1.6- Noms vernaculaires de *Hyoscyamus albus* L.....
..... **Erreur ! Signet non défini.**

I.1.7- Composition phytochimie de *Hyoscyamus albus* L.....
..... **Erreur ! Signet non défini.**

I.1.7.1- Les alcaloïdes tropaniques..... 5

I.1.7.2- Calystégines..... 5

I.1.7.3- Flavonoïdes.....
..... **Erreur ! Signet non défini.**

I.1.7.4- Autres composants de *Hyoscyamus albus*..... 6

I.1.8- Données pharmacologiques..... 6

I.2- Alcaloïdes nortropaniques..... 7

I.2.1- Définition des calystégines..... 7

I.2.2- Structure..... 7

I.2.2- Biosynthèse et propriétés physico-chimiques..... 8

I.2.3- Méthode d'extraction des calystégines..... 9

I.2.3- Propriétés biologiques.....	10
I.3- Généralité sur le diabète.....	11
I.3.1-Définition.....	11
I.3.2- Classification du diabète sucré.....	11
I.3.2.1- Diabète de type 1.....	11
I.3.2.2- Diabète de type 2.....	11
I.3.2.3-Diabète spécifique.....	11
I.3.2.4-Diabète gestationnel.....	12
I.3.3-Physiopathologie du diabète.....	12
I.3.3.1- Diabète de type 1.....	12
I.3.3.2- Diabète de type 2.....	12
I.3.4- Traitement du diabète.....	13
I.3.4.1- Les antidiabétiques oraux.....	13
I.3.4.2- Insulinothérapie.....	13
I.3.5- Phytothérapie du diabète.....	13
I.3.6- Model d'étude de diabète.....	14
I.3.6.1- Diabète induit par la pancreatectomie.....	15
I.3.6.2- Diabète induit par le régime alimentaire.....	15
I.3.6.3- Diabète induit par inoculation de virus.....	15
I.3.6.4- Diabète induit par des substances chimiques.....	15
I.3.6.4.1- Diabète induit par la streptozotocine.....	16
I.3.6.4.2- Diabète induit par l'alloxane.....	17

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1- Matériel.....	19
II.1.1- Matériel végétal.....	19
II.1.2- Matériel animal.....	19
II.2- Méthodes.....	20

II.2.1- Préparation des extraits des graines de <i>Hyoscyamus albus</i>	20
II.2.2- Préparation des extraits brut.....	20
II.2.3- Purification des calystégines totaux.....	21
II.2.3.1- Purification sur colonne échangeuse de cation Amberlite 120B, H ⁺	21
II.2.3.2- Purification sur colonne DOWEX 1X2, CL ⁻	21
II.2.4- Test de toxicité aigue des calystégines.....	21
II.2.4.1- Répartition des souris	21
II.2.4.2- Administration des extraits.....	22
II.2.4.3- Observations et report des résultats.....	22
II.2.4.4- Examens toxicologiques.....	22
II.2.4.5- Examen biochimique.....	23
II.2.4.6- Réalisation des coupes histologiques.....	23
II.2.5- Effet des alcaloïdes nortropaniques de <i>Hyoscyamus albus</i> sur le diabète induit par la stréptozotocine.....	26
II.2.5.1- Induction du diabète.....	26
II.2.6- Traitement des souris diabétiques.....	26
II.2.6.1- Constitution des lots du test.....	26
II.2.6.2- Administration des extraits.....	27
II.2.6.3- Paramètres suivit.....	27

III- RESULTAT ET DISCUSSION

III.1 -Evaluation de la toxicité aigue	29
III.1.1-Suivi de la mortalité	29
III. 1.2 -Evolution pondérale.....	30
III.1.3-Evolution de la quantité de nourriture et le volume d'eau consommés.....	31
III.1.4-Suivi des fonctions hépatique et rénal	32
III.1.5 -Etude histopatologique.....	33
III.1.5.1-Histologie hépatique.....	33

III.1.5.2-Histologie rénales.....	34
III.2-Activité antidiabétique.....	36
III.2.1- Evolution de la glycémie.....	36
III.2.2- Variation de poids corporel.....	38
III.2.3- Quantité de nourriture consommée.....	39
III.2.4- Evolution de la consommation en eau.....	39
III.2.5- Effet des extraits sur le profil lipidique.....	41
III.6-Etude histologique du pancréas.....	43
Conclusion et perspectives.....	45
Référence bibliographiques	46
Annexes	

Introduction

Le diabète sucré est une maladie qui progresse de façon inquiétante dans le monde. En Algérie, il représente un problème de santé publique, sa prévalence se situerait entre 8 et 12 % selon différentes études épidémiologiques ; il y représente, par ailleurs, la quatrième cause de décès (**Chami et al., 2015**).

Les plantes qui ont fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinone ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antidiabétique. Peu d'espèces végétales sont connues et seul une minorité, d'entre elles est explorée chimiquement (**UNEP_WCMC, 2002**).

La phytothérapie du diabète a été longtemps très empirique et il existe toute une série de plantes utilisées en médecine traditionnelle contre le diabète de type 2. Les études en laboratoire montrent souvent des extraits de plantes agissant sur l'hyperglycémie, ou sur un diabète provoqué chez l'animal par la streptozotocine ou l'alloxane (**Goetz, 2007**).

Les remèdes traditionnels utilisés sont, souvent, un mélange des plantes dont la connaissance et les impératifs de préparation, de dosage et de consommation ne sont pas bien maîtrisés. Ainsi les plantes peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables ou toxiques (**Bruneton, 2009**).

Il est donc indispensable d'identifier les composés chimiques présents dans ces plantes et de déterminer la dose à respecter lors de l'utilisation afin d'éviter toute altération ou atteinte fonctionnelle humaine ou animale, car mal dosées, les extraits de plantes peuvent présenter des effets secondaires plus ou moins néfastes.

Hyoscyamus albus est une plante médicinale qui appartient à la famille des solanacées connue pour ces effets bénéfiques (antinévralgique, antispasmodiques et analgésiques...) (**Gaillard et al; 2001; Begum et al., 2010**).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules à partir de *Hyoscyamus albus* pour le traitement du diabète. A cet effet nous nous sommes fixés comme objectif de tester la toxicité des extraits de cette plante riche en alcaloïdes nortropaniques *in vivo*, avant d'évaluer son potentiel antidiabétique sur un modèle de diabète de type II induit chez les souris albinos par la streptozotocine.

Chapitre I

Etude bibliographique

I.1- MATERIEL VEGETAL « *Hyoscyamus albus* »

I.1.1-GENERALITES SUR LES SOLANACEES

Les plantes de la famille des solanacées appartiennent à la division des angiospermes renommées aujourd'hui magnoliophyta. Plusieurs représentants de cette famille figurent parmi les végétaux les plus consommés : pomme de terre, tomate, aubergine, et tabac en particulier. On les rencontre aussi bien dans les zones tropicales que tempérées, avec de nombreuses espèces originaires d'Amérique du sud et importées dans nos régions (**Jouzier, 2005**).

Cette famille appartient au deuxième groupe végétal des tubiflores qui comporte 6 familles de 2000 espèces comprenant de nombreuses plantes toxiques et renfermant des drogues importantes. Elles présentent quelques caractères communs : ce sont des herbes, des sous-arbrisseaux ou des arbustes à feuilles alternes, simples, à fleurs régulières. Les fruits sont des capsules (*datura*, *jusquiame*, *tabac*) ou des baies charnues (*belladone*, *piments*, *solanum* divers, *withania*) renfermant de très nombreuses graines (**Jouzier, 2005;Gaulè et al., 2004; Hammiche et al., 2013**).

I.1.2- LE GENRE *HYOSCYAMUS*

Hyoscyamus appartient à la famille des solanacées, qui comporte une vingtaine d'espèces réparties dans le bassin méditerranéen, l'Afrique du Nord et l'Asie occidentale (**Jouzier, 2005;Goullé et al., 2004**). Les espèces du genre *Hyoscyamus* sont des plantes médicinales importantes, représentées par trois principales espèces : *Hyoscyamus muticus*, *Hyoscyamus niger* et *Hyoscyamus albus*. Et elles sont très riches en alcaloïdes tropaniques, principalement la *hyoscyamine* et la *scopolamine* (**Mahfouze et Ottai, 2011;Nejadhabibvash et al., 2012**).

I.1.3- *HYOSCYAMUSALBUS*

Hyoscyamus albus est une plante endémique qui pousse dans les régions méditerranéennes (**Kadi et Yahia, 2007**).

Le terme de "jusquiame" est un emprunt du latin *hyoscyamos*, *hyoscyamum* et du grec *hyoskyamos*, *hyos*signifiant « porc » et *kyamos* désignant « la fève ». La jusquiame est donc surnommée « fève aux porcs » (**Couplan, 2012**).

I.1.4- DESCRIPTION DE *HYOSCYAMUS ALBUS*

La jusquiame blanche représenté dans la figure 1 est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, qui mesure de 30 à 90 cm de hauteur, à port dressé, des feuilles de 5 à 10 cm de long, larges, ovales, collantes et de couleur vert clair. Au printemps, la floraison, donne des fleurs de 1 à 3 cm de long, bilabiées, irrégulièrement lobées, de couleur vert pâle (**Goullé et al., 2004**). Le fruit, en forme de tulipe, est une capsule fermée par un opercule ; ce type de capsule, qui se retrouve chez les autres jusquiames, porte le nom de pyxide. Elle renferme plusieurs centaines de graines, très petites (1mm), réniformes, à surface réticulée (**Hammiche et al., 2013**).



Figure 1 : la plante *Hyoscyamus albus* (**Eich, 2008**).

I.1.5- CLASSIFICATION BOTANIQUE DE *HYOSCYAMUS ALBUS L.*

La classification botanique de la plante *Hyoscyamus albus L.* est présentée dans le tableau suivant I.

Tableau I : Classification taxonomique de *Hyoscyamus albus* (Quézel et Santa, 1963).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Ordre	Solanales
Famille	Solanaceae
Genre	<i>Hyoscyamus</i>
Espèce	<i>Hyoscyamus albus</i>

I.1.6- NOMS VERNACULAIRES DE *HYOSCYAMUSALBUS L.*

Les noms vernaculaires de *Hyoscyamus albus* sont représentés dans le tableau II.

Tableau II : Noms vernaculaires de *Hyoscyamus albus L.* (Eich, 2008; Hammiche et al., 2013).

Noms scientifique	Nom français	Nom anglais	Nom arabe	Nom berbère
<i>Hyoscyamus albus</i>	Jusquiame blanche	White henbane	Bou narjuf Bou rendjouf Houbail Sikran	Tesker

I.1.7- COMPOSITIONPHYTOCHIMIE DE *HYOSCYAMUS ALBUS L.*

La plante, jusquiame blanche est utilisée en médecine traditionnelle car elle renferme de nombreux principes actifs végétaux, elle est caractérisée du point de vue phytochimique par sa richesse en alcaloïdes (0.2 à 0.5 % dans la plante entière), des flavonoïdes, et d'autres composants (Goullé et al., 2004).

I.1.7.1- Les alcaloïdes tropaniques : les alcaloïdes tropaniques sont des esters d'alcools tropaniques et d'acides de structure variables, aliphatiques ou aromatiques (**Bruneton, 2009**).

Toutes les parties de la plante renferment des alcaloïdes tropaniques et sont donc potentiellement dangereuses. Il faut cependant remarquer que la teneur en alcaloïdes de la plante reste faible, les racines en contiennent 0,15 à 0,18%, les feuilles : environ 0,10%, les tiges : 0,02%, et les graines : 0,10% (**Pudersell, 2006**).

Les principaux alcaloïdes de cette plante se présentent surtout sous forme de L-hyoscyamine et d'atropine (figure 2), ces deux molécules ne représentent que 67% des alcaloïdes totaux de la plante sèche, alors que la scopolamine atteint les 30 % (**Goullé et al., 2004**).

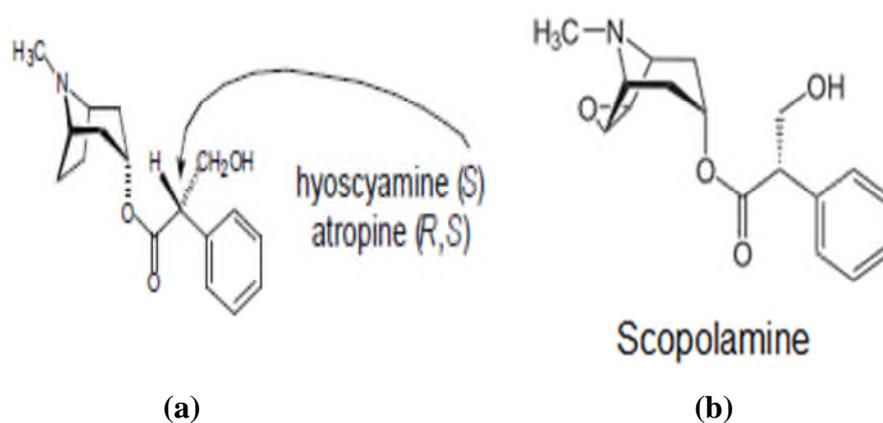


Figure 2 : Structures chimiques des principaux alcaloïdes tropaniques : atropine et hyoscyamine (a), scopolamine (b) de la jusquiame blanche (**Mateus et al., 2000**).

I.1.7.2- Calystégines : les calystégines sont un nouveau groupe d'alcaloïdes nortropaniques hydroxylés non estérifiés qui comportent 3, 4 ou 5 groupes hydroxyles, qui ont été isolés pour la première fois dans l'espèce *Calystegia sepium*, et retrouvés en grandes concentrations dans la famille des Solanacées (**Csuk et al., 2008; Drager, 2002**). Les feuilles de la jusquiame blanche contiennent les calystégines de type A₃ 47 µg/g, B₁ (40 µg/g), B₂ (75 µg/g), B₃ (48 µg/g) et calystégine N₁, détecté pour la première fois dans cette espèce (**Bekkouche et al., 2001**).

I.1.7.3- Flavonoïdes : les flavonoïdes forment une sous-classe de polyphénols, ce sont des métabolites secondaires responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits. Ils peuvent aussi participer à la résistance des végétaux aux maladies (**Bruneton, 2009**).

Le type de flavonoïdes que contient la jusquiame blanche sont les flavonoglycosides qui incluent la quercitine, la spireoside, l'hyperoside, et la rutine ainsi que les flavonoïdes aglycones qui comporte la quercetine et le kaempferole (**Pudersell, 2006**).

I.1.7.4- Autres composants de *Hyoscyamus albus* : en plus des alcaloïdes et des flavonoïdes la plante est très riche en matières minérales (15 à 20 %) (**Brueton, 2009**). Elle renferme aussi d'autres métabolites secondaires qui sont : la choline, du mucilage et les bases volatiles : la tétraméthylputrescine qui est responsable de l'odeur nauséabonde de la jusquiame (**Chouhan, 1999; Pudersell, 2006; Bruneton, 2009**).

I.1.8- DONNEES PHARMACOLOGIQUES

La jusquiame est utilisée pour ses propriétés médicinales depuis des millénaires, elle est encore utilisée pour ses vertus thérapeutiques surtout en homéopathie (**Goullé et al., 2004**). Elle est employée en tant que sédatrice du système nerveux central, antinévralgique, dans la maladie de Parkinson et pour ses propriétés antispasmodiques ou analgésiques (baume tranquille), anti-inflammatoire, antihelminthique, fébrifuge et anti-tumorale. L'action parasympatholytique est faible tandis que la forte teneur en scopolamine amène une action narcotique et hallucinogène importante. La scopolamine fut utilisée pendant la deuxième guerre mondiale sous la forme d'un sérum de vérité (**Gaillard et al., 2001; Begum et al., 2010**).

L'extrait méthanolique des feuilles ont montré deux activités : analgésique qui peut être directe en agissant sur le blocage des nocicepteurs ou bien sur l'inhibition de la synthèse et/ou la libération de médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, et la deuxième activité est antipyrétique elle peut être liée à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines dans l'hypothalamus (**Benhouda et Yahia, 2014**).

Les graines de la jusquiame sont utilisées contre les douleurs dentaires, en plaçant les graines dans la carie (**Lamendin, 2011**).

Les calystégines sont des inhibiteurs compétitifs de divers glycosidases vraisemblablement à cause de leurs structures similaires à celles des hydrates de carbone, et sont considérés comme étant d'excellents candidats pour le traitement de diverses maladies telles que le cancer, le diabète et les infections virales (**Csuk et al., 2008; Asano et al., 1997**).

I.2- ALCALOÏDES NORTROPANIQUES

I.2.1- DEFINITION DES CALYSTEGINES

Les pipéridines polyhydroxylées, les pyrrolidines polyhydroxylées, les indolizidines et les pyrrolizidines constituaient les 4 familles structurales de composés aminés connus, représentant ainsi la famille des iminosucres : des mimes de sucres où l'atome d'oxygène endocyclique est remplacé par un atome d'azote (**Molyneux et al., 2002**). Une cinquième catégorie est venue s'ajouter à la famille de ces glycomimétiques avec la découverte des calystégines (**Asano et al., 1997**). Les premières calystégines ont été détectées dans la belladone (*Atropa belladonna*). C'est en 1988 que les premières calystégines ont été isolées à partir d'extraits de racines de *Calystegia sepium*, origine de leur nom (**Biastoff et Drager, 2007; Drager et al., 1994**).

Les polyhydroxyles nortropanes sont des molécules qui ont été isolées chez les solanacées, les erythroxyllacées, les convolvulacées, les moracées et les brassicacées. Elles sont caractérisées par la présence d'un hydroxyle en C-1 pouvant ainsi être tri, tétra ou pentahydroxylés (calystégines A, B, ou C) (**Asano et al., 1997**). Dans le cas des solanacées, elles ont été isolées dans le genre *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Scopolia*, *Solanum* et *Physalis* ainsi que dans des fruits alimentaires (calystégines B₂ : piment, tomate) (**Bruneton, 2009 et Thomas et al., 2005**).

I.2.2- STRUCTURE

Les premiers composés isolés furent les calystégines A₃, B₁ et B₂, alcaloïdes de type nortropane polyhydroxylés, possédant 3 ou 4 groupements hydroxyles dans des positions variées (Figure 5) (**Eich, 2008**), la structure de 15 calystégines a été élucidée, 5 trihydroxynortropane (A₃, A₅-A₈), 6 tétrahydroxyls (B₁, B₆), et 2 dérivés de pentahydroxyls (C₁, C₂) (figure 05) (**Thomas et al., 2005**).

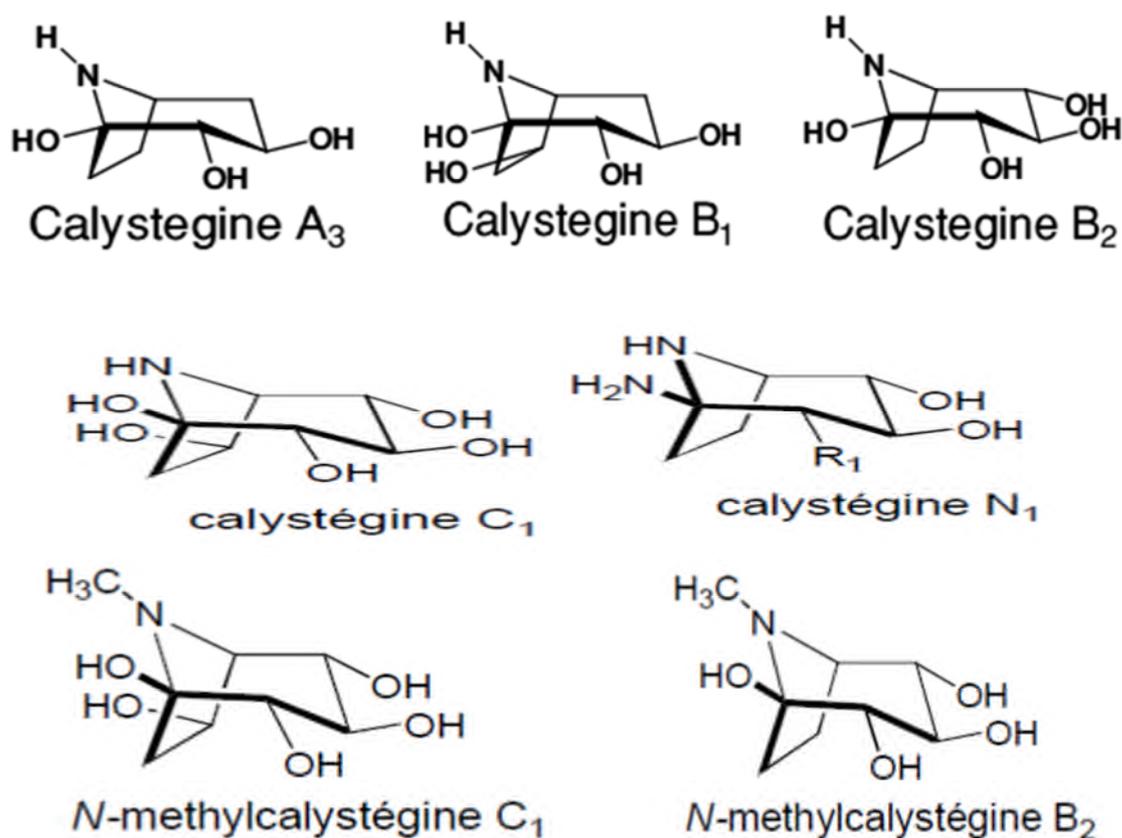


Figure 3 : Structure de quelques calystégines (Thomas *et al.*; 2005).

I.2.2- BIOSYNTHESE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES :

La biosynthèse des calystégines se ferait via la voie biosynthétique d'alcaloïdes tropaniques (Drager, 2006). Le point de départ de la biosynthèse des calystégines serait la tropinone, et la biosynthèse de cette dernière, à partir de la putrescine (figure 6) est bien connue. La fonction cétone de la tropinone est réduite pour conduire, soit à la tropine qui est incorporée dans l'hyoscyamine, soit à la pseudotropinone qui serait ensuite incorporée dans les calystégines (Scholl *et al.*, 2001). Deux tropinones réductases ont été isolées TR I, isolée des racines de *Datura stramonium* qui synthétise la tropine et TR II, isolée d'*Atropa belladonna* qui synthétise la pseudotropine. Les étapes de biosynthèse qui conduiraient aux calystégines à partir de la pseudotropine sont actuellement à l'étude. Elles comporteraient des oxydations spécifiques du squelette tropane et afin de donner la fonction hémiaminalique et une déméthylation pour accéder au squelette des calystégines (Biastoff et Drager 2007; Scholl *et al.*, 2003).

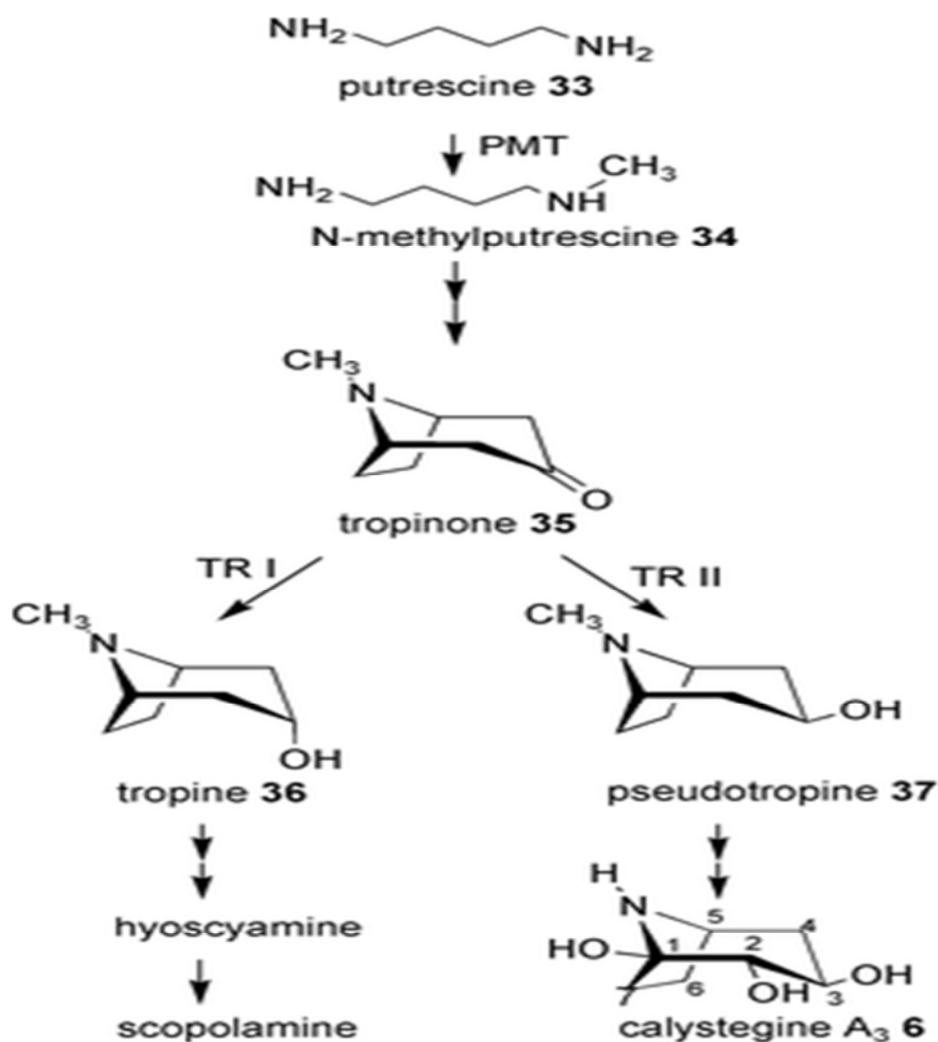


Figure 4 : Biosynthèse de calystégines (Scholl *et al.*, 2003).

I.2.3- METHODE D'EXTRACTION DES CALYSTEGINES

Lescalystégines sont synthétisés à des concentrations très faibles et ils ont été négligés pendant une si longue période, de plus ce sont des alcaloïdes polyhydroxylés, fortement hydrosoluble ne pouvant pas être isolés par les techniques de séparation d'alcaloïde qui utilisent des méthodes d'acide-base avec des solvants organiques peu polaires (Drager, 2002), donc compte tenu de leur caractère hydrophile et de leur basicité, les calystégines sont purifiées à partir d'extraits aqueux sur des résines échangeuses d'ions (Molyneux *et al.*, 2005; Biastoff et Drager 2007).

La première description rapporte que les extraits de racines de *Calystegia sepium* sont soumis à une chromatographie échangeuse de cations pour obtenir un enrichissement en alcaloïdes basique. Les amino-acides sont éliminés par addition de souche B6 806 d'*Agrobacterium tumefaciens*

faciens. La purification finale se fait toujours par HPLC sur une colonne aminée (Molyneux et al., 2005).

I.2.3- PROPRIETES BIOLOGIQUES

Les calystégines sont des molécules naturelles qui ont fait l'objet de beaucoup de recherches sur le plan des activités biochimiques et applications thérapeutiques (Biastoff et Drager 2007).

Les calystégines, comme les autres alcaloïdes monosaccharides mimétiques, inhibent les glycosidases grâce à la similitude des parties pyrannes des substrats naturels (Cordell, 2013). Le mode d'inhibition des glycosidases est compétitif pour la plupart des alcaloïdes polyhydroxylées y compris les calystégines. La présence d'un groupement OH en C2 du squelette nortropane est l'élément de structure minimal exigé pour l'inhibition (Biastoff et Drager 2007).

Les premiers essais, ont été faits en utilisant des calystégines extraites des racines de *Convolvulus arvensis* purifiés par Chromatographie échangeuse d'ions. Elles ont montré une activité significative à β -glucosidase et α -galactosidase, mais aucune inhibition pour l'amyloglucosidase, la β -galactosidase, α ou β -mannosidase, α -fucosidase et β -xylosidase. D'autres expériences avec des calystégines purs isolés de *Calystegia sepium* ont confirmé ces résultats, calystégine A₃ est un bon inhibiteur de la β -glucosidase mais seulement un faible inhibiteur de l' α -galactosidase, et une mixture de calystégine B₁ (27%) et B₂ (73%), sont de puissant inhibiteur de ses mêmes enzymes. Ces premiers résultats ont ensuite été confirmés par les calystégines B₁ et B₂ pures (Molyneux et al., 2005).

Selon Biastoff et Drager (2007), d'autres activités thérapeutiques pourraient attribuées aux calystégines, à savoir :

- L'effet antidiabétique et antiviral.
- L'activité anti-allelopathique, la plante sécrète des substances anti-allelopathique dans le but d'inhiber la croissance des autres plantes.
- L'activité répulsive vis-à-vis des insectes.
- L'activité anti-nématode.

I.3-GENERALITES SUR LE DIABETE

I.3.1-DEFINITION

Le diabète sucré est une affection chronique avec une prévalence au niveau mondial estimée à environ 175 millions de personnes en 2000 et des projections pour 2030 d'environ 360 millions d'individus touchés. Il est caractérisé par une hyperglycémie résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (**Eddouks et al, 2007; Garianiet al., 2014**). L'OMS le définit par une glycémie supérieure à 1,26 g/L (7mmol/L) caractéristique à jeun, confirmée par deux prises de sang.

I.3.2- CLASSIFICATION DE DIABETE SUCRE

La classification des diabètes est fondée depuis 1997 sur la physiopathologie des différentes formes cliniques et génétiques de la maladie, et non plus sur le traitement reçu (**Guillausseau et al, 2003**). En fonction de son étiologie, on distingue le diabète de type 1, le diabète de type 2 et autres types « spécifique » ou « secondaire » (**Ndomouet al, 2014**).

I.3.2.1-DIABETE DE TYPE 1

Le diabète de type 1, appelé autrefois diabète juvénile, ou encore diabète insulino-dépendant, résulte d'un processus auto-immun sélectif entraînant une inflammation (insulite), puis une destruction des cellules bêta pancréatiques. Il représente environ 15% de tous les diabètes sucrés (**Geenen, 2004**).

I.3.2.2-DIABETE DE TYPE 2

Le diabète de type 2 est une maladie hétérogène, non auto-immune, caractérisé par une insulino-résistance dominante associée à une insulino-pénie relative, ou une diminution prédominante de l'insulino-sécrétion associée ou non à une insulino-résistance (**Bysschaert, 2006 ; Drouin et al., 1999**).

I.3.2.3-DIABETE SPECIFIQUE

Ensemble hétérogène d'affections du pancréas, d'endocrinopathie, de diabète médicamenteux ou chimique, et d'affections génétiques, en particulier au niveau de la cellule β (**Rodier, 2001**).

I.3.2.4-DIABETE GESTATIONNEL

Le diabète gestationnel est un trouble de la tolérance glucidique, de gravité variable, apparaissent le plus souvent entre la 24^{ème} et la 28^{ème} semaine de grossesse. Il est identifié chez 4% à 7% des femmes enceintes et est associé à des complications maternelles et fœtales. Il disparaît après l'accouchement (**Bysschaert, 2006**).

I.3.3- PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE

I.3.3.1-DIABETE DE TYPE 1

Le diabète sucré de type 1 est dû à une atteinte de nature auto-immune des cellules β des îlots pancréatiques. Lorsque l'hyperglycémie est cliniquement manifeste, l'atteinte touche déjà 80% des cellules β (**Spinass et Lehmann, 2001**).

Les mécanismes moléculaires initiaux qui conduisent à la réaction auto-immune ne sont toujours pas entièrement identifiés (**Giudicelli et Cattani, 2001**). La destruction des cellules β par un processus auto-immun est authentifiée par la présence d'anticorps anticellules d'îlots, anti-insuline, anti-glutamate décarboxylase (GAD) et anti-tyrosine phosphatase IA-2 et IA 2 b (**Spinass et Lehmann, 2001**).

I.3.3.2-DIABETE DE TYPE 2

Le diabète de type 2 représente 80 à 90% de l'ensemble des diabètes sucrés. Il pose un réel problème de santé publique, car sa prévalence augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de l'obésité dans les populations industrialisées (**Busch-brafin et Pinget, 2001**).

Le diabète de type 2 est une maladie de l'homéostasie du glucose, qui se caractérise par deux anomalies majeures: une perturbation de la sécrétion des hormones pancréatiques, et une perturbation des effets de l'insuline sur ses tissus cibles (insulinorésistance). Les anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles se traduisent par une diminution du captage de glucose par les muscles et par une augmentation de la production hépatique de glucose. Elles sont liées à des défauts multiples dans les mécanismes de signalisation par le récepteur de l'insuline et dans des étapes régulatrices du métabolisme du glucose. Ces défauts «post-récepteurs» sont amplifiés par la présence d'une concentration augmentée d'acides gras libres. En effet, les concentrations élevées d'acides gras libres plasmatiques contribuent à la

diminution de l'utilisation musculaire de glucose et à l'augmentation de la production hépatique (**Girard, 2003**).

I.3.4-TRAITEMENT DU DIABETE

Le traitement du diabète inclut l'exercice physique, les médicaments hypoglycémifiants oraux et, dans certains cas, l'administration de l'insuline exogène.

I.3.4.1- LES ANTIDIABETIQUES ORAUX

Les sulfamides, les biguanides, les thiazolidinediones et les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase sont les principales classes des antidiabétiques oraux disponibles pour le traitement des patients atteints de diabète de type 2. Ils agissent soit en stimulant la libération d'insuline, soit en réduisant la libération hépatique du glucose et/ou en améliorant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques (**Bormetal., 2012**). Leurs effets secondaires ne sont pas préoccupants mais restent très inconfortables ; essentiellement troubles intestinaux (diarrhées, inconfort abdominal) (**Halimi et al., 2009**).

I.3.4.2- Insulinothérapie

Le traitement du diabète repose sur l'insulinothérapie visant à reproduire le mieux possible l'insulinosécrétion physiologique grâce aux injections sous-cutanées d'insuline ou à une perfusion continue sous-cutanée par pompe portable (**Grimaldi et al., 2000**). L'insuline n'est pas le traitement idéal du diabète non insulino-dépendant car si elle permet de baisser les glycémies en favorisant le transport et le métabolisme du glucose intramusculaire, elle facilite la prise de poids en stimulant la lipogenèse et aussi elle provoque une hypoglycémie sévère (**Halbron, 2014**).

I.3.5-PHYTOTHERAPIE DU DIABETE

Depuis les temps anciens, le remède végétal a été largement utilisé pour aider à soigner le diabète ; plus de 1200 plantes différentes, ont été décrites comme un traitement traditionnel du diabète (**Eddouks et al., 2007**). Parmi toutes les plantes testées *in vitro*, 80% sont potentiellement antidiabétiques (**Oubrétal., 1997**). Dans d'autres cas, certaines plantes médicinales hypoglycémifiantes induisent la régénération des cellules β pancréatiques (**Kanter et al., 2003**).

Le tableau n° III énumère les plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète à travers le monde :

Tableau III : Plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète (Eddouks *et al.*, 2007)

Nom scientifique	Nom commun	Parties utilisées et méthodes de préparation
<i>. Allumcepa</i>	.Oignon cultivé	.Bulbe à l'état cru.
<i>.Amygdaluscommunis</i>	.Ail cultivé	.bulbe à l'état cru.
<i>.Brassicaoleracea</i>	.Le chou	.Parties aériennes.
<i>.Citrus bigardia</i>	.Oranger	.Fruits, fleurs en décoction.
<i>.Citrus limon</i>	.Limettier	.Fruits, fleurs en décoction.
<i>.Cynarascolymus</i>	.Artichaut	.Racines et capitules en décoction.
<i>.Eucalyptus globulus</i>	.Eucalyptus	. Fruits, fleurs en décoction.
<i>.Ficus carica</i>	.Figuier	.Fruits en décoction.
<i>.Glycine max</i>	.Soja	.Graine en décoction.
<i>.Morus nigra</i>	.Mûrier noir	.Fruits, feuilles en infusion ou en décoction.
<i>.Nigellasativa</i>	.Graine de nigelle	.Graine en décoction.
<i>.Oleaeuropea</i>	.Olivier	.Feuilles en décoction.
<i>.Punicagranatum</i>	.Grenadier	.Péricarpe en décoction.
<i>.Rubusfruticosus</i>	. Mûrier sauvage (ronce)	
<i>.Zingiber officinale</i>	.Gingembre	.Rhizomes en infusion.

I.3.6- MODELES D'ETUDES DE DIABETE

Afin d'étudier l'étiologie du diabète, l'utilisation de modèles expérimentaux est requis pour faciliter la compréhension de cette maladie complexe et diversifiée. L'installation du diabète chez les modèles animaux peut se faire de différentes façons, soit spontanément, soit par induction chirurgicale, chimique, endocrine, ou par sélection ou génie génétique. Selon la technique employée, on induira un diabète de type 1 ou type 2 (Masiello, 2006).

I.3.6.1- DIABETE INDUIT PAR PANCREATECTOMIE

Pancréatectomie chirurgicale, cette technique d'induction permet de réaliser une ablation de 90% du pancréas endocrine, en effet les animaux pancréatectomisés partiellement ou totalement, sont utilisés pour l'étude de l'hyperglycémie, et les différentes conséquences qui en résultent, ainsi que le développement des complications du diabète (**Harada et Makino, 1984**).

I.3.6.2- DIABETE INDUIT PAR LE REGIME ALIMENTAIRE

Ce modèle permet la mise en évidence du rôle de la consommation hypercalorique et de l'âge associés à un manque d'activité physique. La souris *spiny* (*Acomyscahirinus*) et le rat (*Psammomysobeus*) sont des modèles animaux très utilisés dans l'étude de l'obésité et de diabète de type 2 induit par la nourriture. Un excès de nourriture riche en énergie induit chez la souris *Spiny* une destruction des cellules β pancréatiques (**Cefalu, 2006**).

I.3.6.3- DIABETE INDUIT PAR INOCULATION DE VIRUS

Certaines infections virales peuvent engendrer un diabète aussi bien chez l'homme que chez l'animal. L'exemple le plus connu est l'infection de la souris par le virus EMC (Encephalomyocarditis). Ce virus entraîne un diabète en pénétrant dans la cellule β . L'ADN viral s'intégrant au génome de la cellule β hôte, provoque une altération des fonctions de ces cellules et notamment de la synthèse et de la sécrétion d'insuline (**Mordes et al., 2004**).

I.3.6.4- DIABETE INDUIT PAR DES SUBSTANCES CHIMIQUES

L'induction du diabète expérimental chez les rongeurs, se fait par des substances chimiques qui détruisent les cellules β pancréatiques, c'est la plus pratiquée car elle est simple à réaliser et la majorité des études qui sont publiées dans le stade ethnopharmacologie entre les années 1996 et 2006 ont employé ce modèle (**Etuk, 2010**). Les substances chimiques les plus utilisées, pour introduire un diabète chez ces rongeurs, sont la streptozotocine et l'alloxane (**Szkudelski, 2001**).

I.3.6.4.1- DIABETE INDUIT PAR LA STREPTOZOTOCINE

- Définition

La Stréptozotocine ou streptozocine ou Izoslation ou Zanosar (STZ) est un dérivé synthétique de nitrosamide glucopyranose isolé à partir de produits fermentaires de *Streptomyces achromogenes* qui est classiquement un antibiotique et anti-tumoral utilisé dans certains pays en chimiothérapie du cancer (Etuk, 2010). Sélectivement toxique pour les cellules β des îlots pancréatiques, la STZ est utilisée dans l'étude du diabète tout en induisant les deux types de la maladie, le diabète de type 1 et le diabète de type 2 (Bennet et Pegg, 1981).

- Structure

La stréptozotocine (STZ) [2-deoxy-2(3-méthyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose (C₈H₁₅N₃O₇) est un composé de nitrosamideméthylnitrosourea (MNU) lié au carbone C2 d'un D-glucose (Palsamy et Subramanian, 2008).

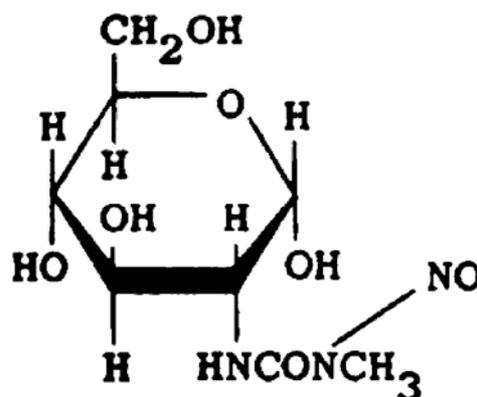


Figure 5 : structure chimique de la stréptozotocine (Bolzán et Bianchi, 2002)

- Action de la stréptozotocine sur la cellule β pancréatique

La STZ est captée par la cellule β pancréatique via le transporteur de glucose GLUT2 (Szkudelski, 2001). Elle exerce sa toxicité grâce à une activité d'alkylation de l'ADN. La glycosylation des protéines est un facteur délétère supplémentaire. L'ADP ribosylation est alors sur-stimulée, ce qui entraîne une baisse de NAD⁺ cellulaire, du stock d'ATP conduisant à la mort des cellules bêta pancréatiques (Wattizet *al.*, 2012).

La STZ induit également la formation de radicaux libres qui contribuent dans la destruction des cellules β pancréatiques ; après leurs formation, ces molécules agissent en synergie avec la STZ pour générer un dommage au niveau de l'ADN (Pavana *et al.*, 2007).

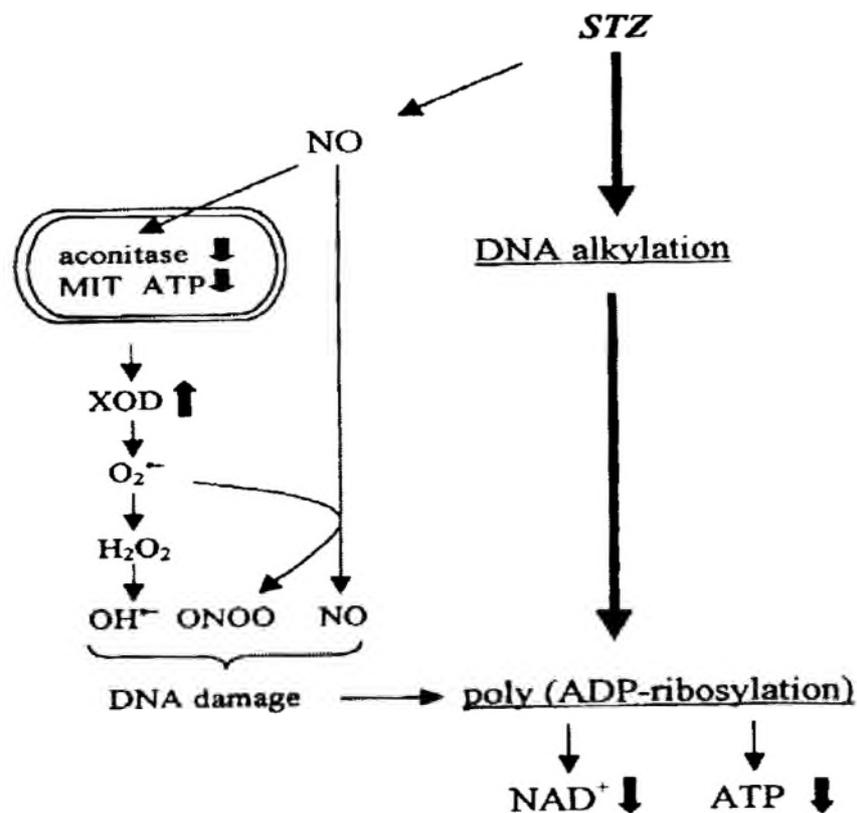


Figure 6 : Mécanisme d'action de la streptozotocine dans la cellule β pancréatique (Szkudelski, 2001)

I.3.6.4.2- DIBETE INDUIT PAR L'ALLOXANE

- Définition

L'alloxane est un dérivé pyrimidique (acide urique) qui a été synthétisé en 1838 Wohler. Il a été considéré comme un médicament provoquant une nécrose dans les cellules β en 1940 (Naoakietal., 2012).

- Structure

L'alloxane (2,4,5,6-tetraoxypérimidine), est utilisé dans l'induction du diabète de type 1 chez les modèles animaux (souris, rats,...) (Sandler et Swenne 1983).

- **Fonction**

L'alloxane exerce une action cytotoxique préférentiellement sur les cellules β pancréatiques, il s'accumule rapidement sur les cellules hépatiques et pancréatiques, mais lentement dans les cellules musculaires (Malaisse et al., 1982). Les effets cytotoxiques de l'alloxane sont dus à son produit de réaction réduit, l'acide dialurique, et à la production des espèces oxygénées réactives (EOR) (Wattiz et al., 2012).

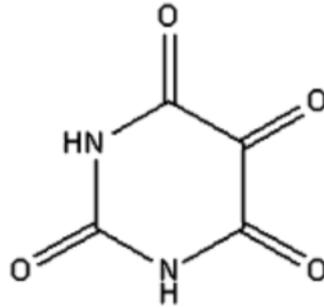


Figure 7 : structure chimique de l'alloxane (Lenzen, 2008)

Chapitre II

Materiel et Méthodes

II- MATERIEL ET METHODES

Ce travail consiste à étudier la toxicité et de l'activité antidiabétique des calystégines, alcaloïdes extrait des graines de *Hyoscyamus albus*.

II.1-MATERIEL

II.1.1-MATERIEL VEGETAL

Les graines de *Hyoscyamus albus* (Figure 1) ont été récoltées au mois d'aout 2014 dans la région d'Ihitoucen-Bouzugue, wilaya de Tizi-Ouzou située à environ 80km de la wilaya de Bejaia, puis séchés à l'étuve pendant 48h à 40°C. Un broyage à l'aide d'un broyeur électrique a ensuite été effectué et la poudre obtenue a été stockée dans des bocaux en verre hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Un échantillon de la plante entière a été récolté dans la même région et identifié au niveau du laboratoire de physiologie végétale et d'écologie de l'université de Bejaïa en se référant à la flore algérienne de **Quezel et Santa (1963)** (figure 8).

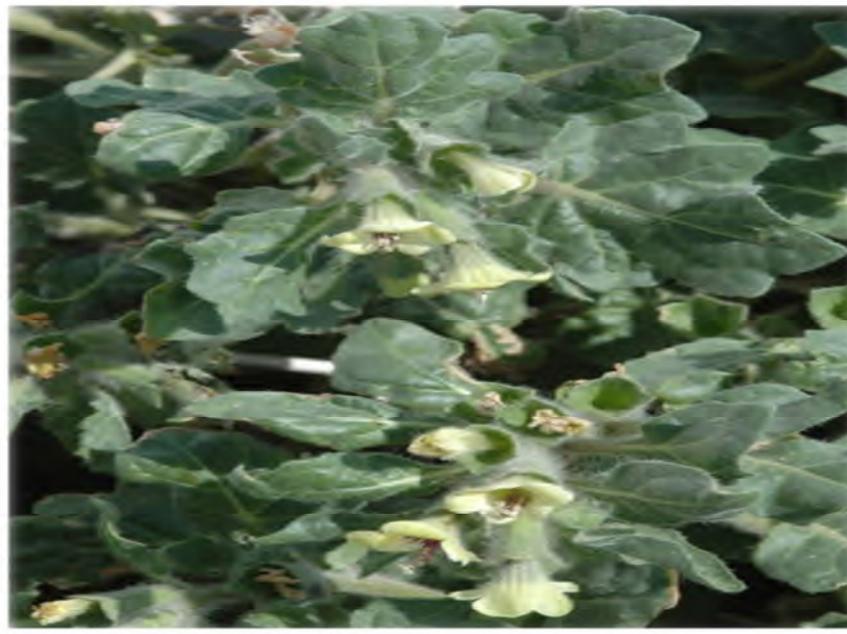


Figure 8 : *Hyoscyamus albus* (Original).

II.1.3- MATERIEL ANIMAL

Cette étude a été réalisée à l'université de Bejaia sur des souris femelles albinos *Mus musculus* pour la toxicité et des souris mâles albinos *Mus musculus* pour l'activité antidiabétique, dont le poids varie entre 20 et 25g, obtenues auprès de la faculté de médecine

de l'université de Constantine. Les souris ont été élevées dans l'animalerie de la faculté de biologie de l'université de Bejaia (figure 9), dans des cages standard. Durant toute la période de l'étude, les animaux ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture, l'aliment provient du Complexe Agro-Alimentaire d'EL-Kseur (annexe n°1).

La température de l'animalerie varie entre 18 et 23°C. Les souris ont subi un cycle obscurité/lumière de 12h. La litière utilisée est la sciure, elle a été renouvelée deux à trois fois par semaine pour tous les groupes d'animaux.



Figure 9 : Elevage des souris albinos *Mus musculus* au sein de l'animalerie de la faculté de biologie de l'université de Bejaia.

II.2- METHODES

II.2.1-PREPARATION DES EXTRAITS DES GRAINES DE *HYOSCYAMUSALBUS*

Lors de cette étude une extraction sélective avec un solvant organique a été entreprise selon la méthode de **Bekouche et al, 2001**. Elle est basée sur le degré de solubilité des calystégines dans les solvants organiques.

II.2.1.2- PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT

100g de poudre de graines de *Hyoscyamus albus* délipidée par de l'éther de pétrole ont été soumis à trois macérations successives de 24h chacune, sous agitation. Les macérations ont été réalisées trois fois dans un mélange de méthanol/eau avec un rapport de (50/50 : v/v).

Après filtration des trois macéras à l'aide du papier filtre wattman, ces derniers ont été mis à évaporation dans une étuve à une température de 40°C pendant 24h.

II.2.3-PURIFICATION DES CALYSTEGINES TOTAUX

La purification des alcaloïdes nortropaniques des graines de *Hyoscyamus albus* a été effectuée par chromatographie échangeuse d'ions de l'extrait brut préalablement préparé.

II.2.3.1-PURIFICATION SUR COLONNE ECHANGEUSE DE CATIONS AMBERLITE120B, H⁺

Un volume de 0.5ml de l'extrait brut a été déposé sur la colonne, après 1heure un lavage avec 200ml d'eau distillée a été fait pour pouvoir éliminer les autres contaminants, et l'élution a été faite avec 150ml de NH₄OH à 4N, après élution l'éluât est mis à sécher à l'étuve pendant 24heurs.

II.2.3.2-PURIFICATION SUR COLONNE DOWEX 1X2, CL⁻

Un volume de 0.3ml d'extrait obtenu à partir de la première purification est déposé sur la colonne, puis laissé échanger pendant 1heure. Comme les alcaloïdes d'intérêt sont des molécules hydrosolubles donc l'élution a été faite avec de l'eau distillée (150ml).

L'éluât qui en résulte a été filtré puis séché à l'étuve à 40°C pendant 24heures. Une fois sec l'extrait d'alcaloïdes obtenu avec un rendement de **0.32%** a été conservé au réfrigérateur à l'abri de la lumière et de l'humidité.

II.2.4-TEST DE TOXICITE AIGÛE DES CALYSTEGINES

Les essais de toxicité aigüe permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court (de 1 à 14 jours) après l'administration d'une substance (ici les calystéginés totaux des graines de la jusquiame blanche), à une dose unique. Les principaux effets recherchés sont : les signes cliniques, les modifications pathologiques visibles à l'œil nu ainsi que la létalité (mortalité).

II.2.4.1-REPARTITION DES SOURIS

L'évaluation de la toxicité aigüe des calystéginés de *Hyoscyamus albus* a été réalisée en se référant aux directives de l'OCDE G N°423.

Des souris femelles SWISS albinos pesant entre 20 à 25g ont été réparties en lots de 06 souris selon l'homogénéité de leurs poids, logés dans des cages standard, à température ambiante avec une alimentation modérée et libre accès à l'eau.

II.2.4.2-ADMINISTRATION DES EXTRAITS

Après avoir soumis les souris à un jeûne de 12 heures, l'administration intra-gastrique a été réalisée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique, à raison de 0.5 ml de solutions d'extrait, contenant la dose appropriée pour chaque souris (Figure 10).

Les calystégines ont été solubilisés dans de l'eau physiologique (NaCl 0.9%) et administrés à chaque lot comme suit :

- Lot n°1 : dose 5mg/kg.
- Lot n°2 : dose 20mg/kg.
- Lot n°3 : dose 50mg/kg.
- Lot n°4 : dose 300mg/kg.
- Lot n°5 : dose 2000mg/kg.
- Lot n°6 : groupe contrôle, eau physiologique.



Figure 10 : Administration de la solution par gavage gastrique.

II.2.4.3-OBSERVATIONS ET REPORT DES RESULTATS

Chaque souris du test a été observée individuellement durant les 4 premières heures qui ont suivi l'administration, puis quotidiennement 2 fois par jour pendant 14 jours.

Les mortalités ainsi que les éventuels signes d'intoxication (convulsions, tremblements, asthénie, somnolence...) ont été recherchés ; les souris pesées quotidiennement et la consommation de nourriture et hydrique mesurées pendant les 14 jours du test.

II.2.4.4- EXAMENS TOXICOLOGIQUES

Au 15^{ème} jour du test, trois souris choisis aléatoirement dans chaque lot ont été sacrifiées, le sang est recueilli dans des tubes héparinés pour la réalisation du bilan hépatique et rénal ; puis

disséqué pour la récupération du foie et des reins dans le but de réaliser des examens histopathologiques (Figure 11).



Figure 11 : Prélèvement du matériel biologique

(A) Récupération du sang des souris ; (B) Dissection des souris.

II.2.4.5-EXAMEN BIOCHIMIQUE

Les analyses biochimiques ont été réalisées au niveau du laboratoire privé d'analyses de biologie médicale dans la wilaya de Bouira à l'aide d'un appareil automatique de type cobalt intégral et de réactifs du type Roche. Les paramètres dosés sont Aspartate Amino Transférase (TGO), Glutamate Pyruvate Transaminase(TGP), La phosphatase alcaline (PAL), Gamma Glutamyl Transpeptidase (GGT) et la bilirubine, les différents protocoles suivis sont résumés dans l'annexe n°2.

II.2.4.6-REALISATION DES COUPES HISTOLOGIQUES

La réalisation des coupes histologiques a été effectuée au niveau du laboratoire central d'anatomie pathologique à l'Hôpital universitaire de Bejaia.

- **Fixation**

Elle consiste à figer les structures des organites cellulaires tout en conservant les constituants cellulaires et tissulaires dans un état proche du vivant. L'agent fixateur solidifie le gel protéique qui circule entre les mailles du réseau membranaire limitant le hyaloplasme et les organites. Les organes récupérés ont été lavés avec de l'eau physiologique, et immédiatement immergés dans un liquide fixateur qui est le formol (10%) dont le volume est environ 10 fois le volume de l'organe afin d'éviter leurs dégradation et obtenir une rigidité tissulaire suffisante. Les organes ont été coupés et les pièces obtenues ont été placés dans des cassettes en plastique numérotées et bien identifiées pour chaque groupe.

- **Lavage déshydratation et éclaircissement (Inclusion)**

Avant de procéder à la déshydratation, les pièces fixées ont été lavées à l'eau courante pendant 30 minutes ou plus, afin d'éliminer l'excès de fixateur. Les pièces fixées et lavées sont ensuite placées dans l'automate constitué de 12 cylindres, réparties en : 6 cylindres d'alcool (éthanol 100°) pour déshydrater les échantillons (étape de déshydratation), 4 cylindres de xylène pour les purifier d'alcool (étape d'éclaircissement) et 2 cylindres de paraffine pour éliminer le xylène, la durée de chaque bain est de 1h30 (Figure 12).



Figure 12 : Les étapes d'inclusion par l'automate (CHU de Bejaia, 2014).

- **Enrobage à la paraffine et confection des bloques**

Une fois les coupes réalisées, les cassettes ont été immergées dans deux bains successifs de paraffine liquide pour que cette dernière s'infilte dans les échantillons. Ainsi elles sont protégées contre l'humidité et le dessèchement. (Figure 13). Après leur enrobage, les cassettes ont été incubées à basse température jusqu'à refroidissement de la paraffine. Le refroidissement permet l'obtention d'un bloc pour chaque prélèvement. La coupe du bloc de paraffine au microtome permet de réaliser une coupe très fine de 3 à 5 μm d'épaisseur pour chaque prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires. La coupe est déposée et collée sur une lame en verre puis on laisse sécher à l'étuve.

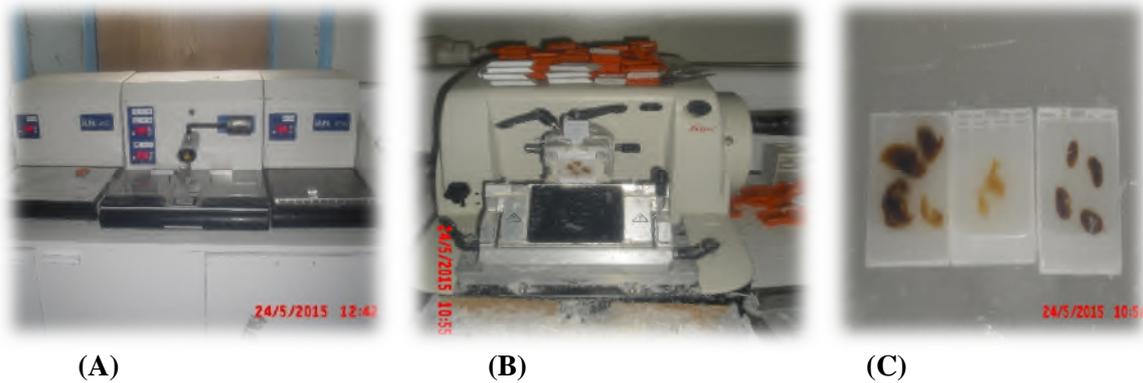


Figure 13 : préparation des blocs d'inclusion

(a) Distributeur de paraffine, (b) Réalisation des coupes au microtome LEICA RM 2145, (c) blocs de paraffine contenant les tissus coupés (CHU Bejaia, 2014).

- **Déparaffinage et coloration**

Les lames ont été baignées dans 02 bains successifs de Xylène pendant 5 min chacun, suivi de 02 bains successifs d'éthanol à 90% pendant 3mn chacun, puis rincées à l'eau.

Les lames ont été ensuite mises dans un bain d'hématoxyline pendant 3 min (pour la coloration des noyaux), suivi d'un bain d'éosine pendant 5 min (pour la coloration du cytoplasme), et rincée dans deux bains successifs d'éthanol à 90%, puis laissée sécher.

- **Visualisation microscopique**

La visualisation microscopique a été réalisée à l'aide de l'Eukitt une colle biologique qui permet de coller la lame et la lamelle, ce montage permet la conservation ultérieure des coupes colorées.

L'observation a été effectuée à l'aide d'un microscope optique à des grossissements de 10 et 40 fois. La prise des photos a été effectuée avec un appareil photos numérique (Sony 12.1 MEGA PIXELS).

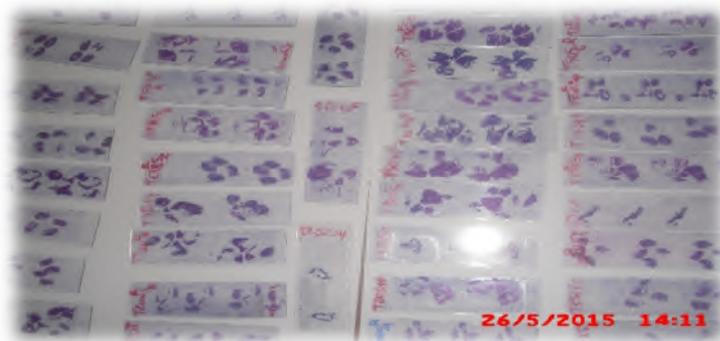


Figure 14 : Lame contenant les tissus collés avec les lamelles par l'Eukitt.

II.2.5- EFFET DES ALCALOÏDES NORTROPANIQUES DE *HYOSYAMUSALBUS* SUR LE DIABÈTE INDUIT PAR LA STREPTOZOTOCINE

II.2.5.1-INDUCTION DU DIABÈTE

Afin d'induire un diabète expérimental avec une glycémie modérée similaire au diabète de type II la STZ a été dissoute dans un tampon citrate (0.1M, pH 4.5) et immédiatement injectée aux souris par voie intra-péritonéale (figure15) à une dose de 130mg/kg de poids corporel.

La glycémie a été mesurée après 72 heures suite à l'injection de la STZ, et les souris présentant une glycémie égale ou supérieure à 2g/l sont considérées comme étant diabétiques et sont sélectionnées pour la suite de l'étude.



Figure 15 : injection de la streptozotocine par voie intrapéritonéale.

II.2.6.1-TRAITEMENT DES SOURIS DIABÉTIQUES

Pour tester l'effet hypoglycémiant de l'extrait de *Hyosyamus albus* sur les souris rendues diabétiques par la STZ, nous avons suivi la méthode suivante :

II.2.6.1.1-CONSTITUTION DES LOTS DU TEST

Les souris diabétiques sont réparties en 5 lots de 06 souris chacun selon l'homogénéité de leurs glycémies et de leurs poids comme suit :

- Lot n°1: Souris diabétiques traitées par les calystégines (Cal-10mg).
- Lot n°2: Souris diabétiques traitées par les calystégines (Cal-20mg).
- Lot n°3: Souris diabétiques traitées par le glibenclamide (Gli).
- Lot n°4 : Souris diabétiques non traitées (DNT).
- Lot n°5 : Souris normal non traitées (NNT).

II.2.6.1.2-ADMINISTRATION DES EXTRAITS

L'étude de l'effet antidiabétique qui a duré 20 jours, a été réalisée en administrant quotidiennement par voie intra-gastrique un volume de 0.5 ml de solution d'extrait, contenant la dose appropriée.

Les différentes doses d'extraits utilisés ont été solubilisées dans de l'eau physiologique (NaCl 0.9%), et les souris diabétiques ont été traitées comme suit :

- Les souris diabétiques traitées par les calystégines ont reçu des doses de 10 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour pour chaque lot.
- Souris diabétique traitées par le glibenclamide ont reçu une dose de 20 mg/kg/jour.
- Souris diabétique non traitées et les souris normal non traitées ont reçu uniquement de l'eau physiologique (véhicule).

II.2.6.1.3- PARAMETRES SUIVIS

- **Mesure de la glycémie**

Au cours de la période de 20 jours, la glycémie a été mesurée à jeun tous les cinq jours à partir de la veine latérale de la queue des souris (figure 16), en utilisant un glucomètre On Call Plus.



Figure 16 : mesure de la glycémie par la veine latérale de la queue de la souris.

- **Suivi du comportement alimentaire et du poids corporel**

Au cours de l'étude, la variation de la consommation en aliment, en eau et du poids corporel de chaque souris du test a été suivie quotidiennement durant les 20 jours.

- **Bilans biochimiques et analyses Histopathologique**

A la fin de l'étude, trois souris choisies aléatoirement dans chaque lot ont été sacrifiées, le sang est récupéré pour le dosage du Cholestérol total, HDL, LDL et des Triglycérides (annexe n°2), et les pancréas ont été fixés dans du formol à 10% pour une étude histopathologique, la méthode suivie pour l'étude histologique est la même que précédemment citée dans l'étude toxicologique.

Chapitre III
Résultats
et
Discussion

III- RESULTATS ET DISCUSSION

III.1-EVALUATION DE LA TOXICITE AIGUE

III.1.1-SUIVI DE LA MORTALITE

La toxicité aiguë a pour but la détermination de la DL50 (dose létale à 50%), elle correspond à la dose capable de tuer, dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience dans une même espèce animale. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses du tout ou rien : mort ou survie des animaux (**Le Blanc, 2010**). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV.

Tableau IV :Mortalité après administration d'une dose unique de l'extrait de calystégines.

Solution préparée	Nombre De Mortalité
Cal-5 mg/kg	0/6
Cal-20 mg/kg	0/6
Cal-50 mg/kg	0/6
Cal-300 mg/kg	0/6
Cal-2000 mg/kg	0/6
Eau Physiologique	0/6

Aucune mortalité, ni signe clinique n'ont été observés suite à l'administration des différentes doses de calystégines (5, 20, 50, 300,2000 mg/kg). Si l'administration de la dose limite correspondant à 2g/kg a permis l'obtention d'une moyenne de mortalité de 0/6. Dans ce cas, la DL50 est une valeur supérieure à la dose employée (2g/kg). D'après le tableau V de **Hodge et Sterner (1980)** nos extraits sont considérés comme étant faiblement toxiques sous réserve de tester des concentrations plus élevés.

TABLEAU V : Classe de toxicité selon l'échelle de toxicité de **Hodge et Sterner (1980)**.

Classe de toxicité	DL50 mg/kg	Doses pour un enfant de 12,5 kg
Extrêmement toxique	< 1	8 mg (le fait d'en goûter)
Très toxique	1 à 50	500 mg (l'équivalent d'une petite gorgée)
Moyennement toxique	50 à 500	5 g (l'équivalent d'une cuillerée à café)
Faiblement toxique	500 à 5 000	60 g (l'équivalent d'un coquetier)
Pratiquement non toxique	5 000 à 15 000	180 g
Relativement sans danger	> 15 000	> 180 g

III.1.2-EVOLUTION PONDERALE :

L'un des paramètres auquel nous nous sommes intéressés durant notre travail, est l'évolution pondérale des souris étudiées. Ce paramètre est en relation directe avec la toxicité. En effet l'apparition d'une toxicité s'accompagne souvent d'un amaigrissement. La figure 17 montre l'évolution du poids corporel des souris pendant la période expérimentale.

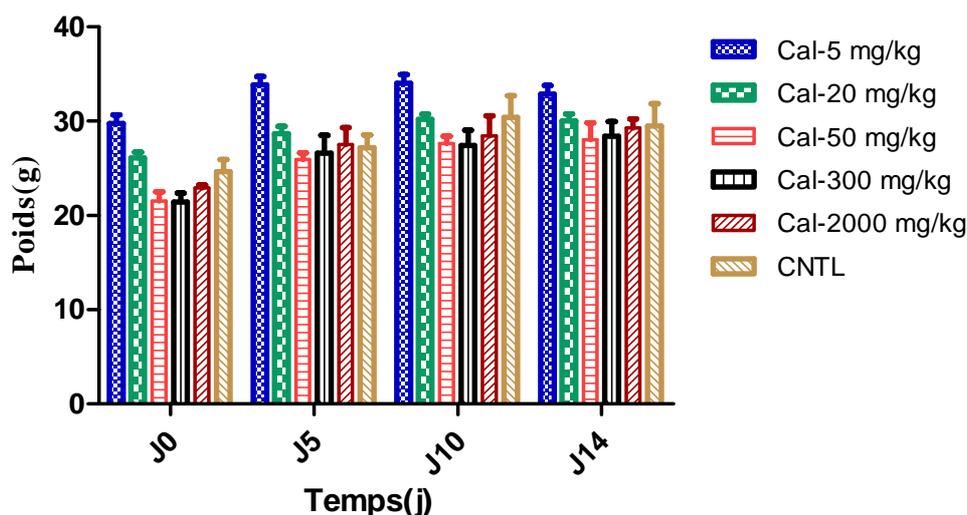


Figure 17 : variation du poids corporel des souris durant le test de la toxicité aigüe.

Cal-5mg/kg=souris traités par les calystégines (**5mg/kg**); **Cal-20mg/kg**=souris traités par les calystégines (**20mg/kg**); **Cal-50mg/kg**=souris traités par les calystégines (**50mg/kg**); **Cal-300mg/kg**=souris traités par les calystégines (**300mg/kg**); **Cal-2000mg/kg**=souris traités par les calystégines (**2000mg/kg**); **CNTL**=souris contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne±écartype.

Une vue d'ensemble des histogrammes de la figure 17 nous indique une légère augmentation du poids corporel moyen pour chaque lot dans la période J₀ à J₅ et par la suite une stabilisation de ces poids jusqu'à la fin du test (J₅ à J₁₄).

Etant donné que les fluctuations du poids corporel des souris ont été minimes pour les lots traités par les calystégines et également pour le lot témoin, celle-ci ne peuvent donc pas être considérées comme effet toxique mais seraient plutôt attribuées à un léger stress induit par les conditions expérimentales.

III.1.3-EVOLUTION DE LA QUANTITE DE NOURRITURE ET LE VOLUME D'EAU CONSOMMES

La quantité de nourriture et le volume d'eau consommés sont représentés sur la figure 18.

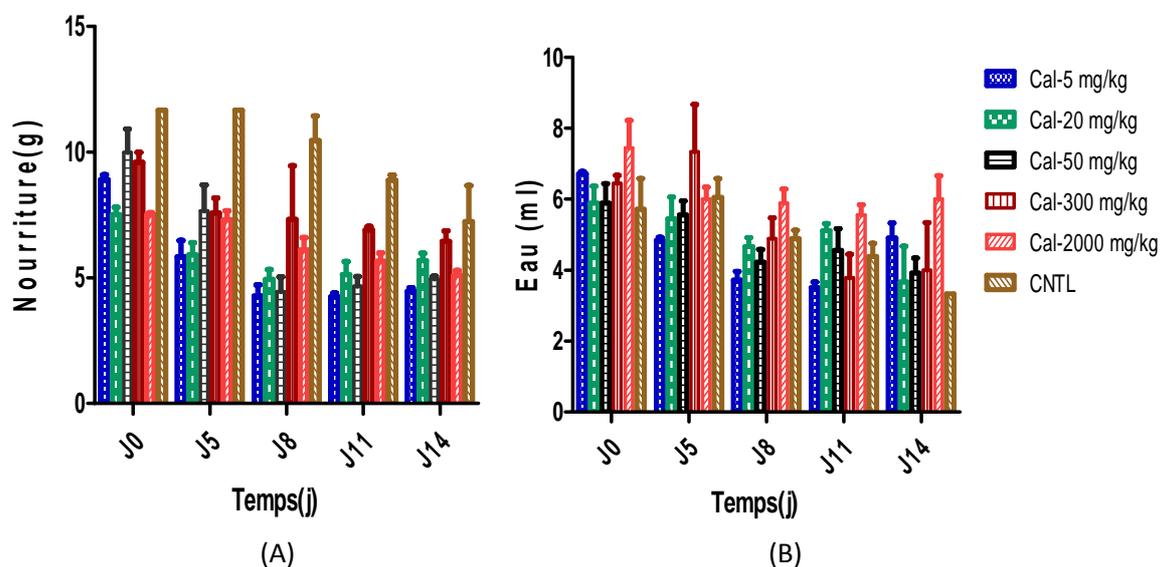


Figure 18 : Evolution des paramètres suivis (A : aliment consommé; B : eau consommé).

Cal-5mg/kg=souris traités par les calystégines (5mg/kg); **Cal-20mg/kg**=souris traités par les calystégines (20mg/kg); **Cal-50mg/kg**=souris traités par les calystégines (50mg/kg); **Cal-300mg/kg**=souris traités par les calystégines (300mg/kg); **Cal-2000mg/kg**=souris traités par les calystégines (2000mg/kg); **CNTL**=souris contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne±écartype.

Les résultats montrent une diminution de la quantité de nourriture et d'eau consommés pour chaque lot traitées dans la période allant de J₀ à J₈ et par la suite une stabilisation jusqu'à la fin du test (de J₈ à J₁₄).

La diminution de la quantité de nourriture consommée par les souris traitées peut être due à l'effet énergétique des calystégines qui sont des iminosucres (structure d'un hydrate de carbone).

III.1.4-SUIVI DES FONCTIONS HEPATIQUE ET RENAL

Tableau V : Résultats de l'analyse des paramètres biochimiques sériques.

	Lot control	Lot 5mg/kg	Lot 20mg/kg	Lot 50mg/kg	Lot 300mg/kg	Lot 2000mg/kg
Urée (g/l)	0.53±0.04	0.35±0.02	0.45±0.08	0.43±0.07	0.48±0.07	0.44±0.04
Créatinine(mg/l)	< 3.8	<3.8	< 3.8	< 3.8	<3.8	< 3.8
TGO (UI/L)	229.33±29.72	149.33±5.95	168.63±9.89	152.6±19	163.73±16.04	234.2±23.77
TGP (UI/L)	53±5.56	42.03±3.68	50.16±6.7	40.96±2.1	45±4.3	42.73±1.36
PAL (UI/L)	162.66±27.08	142.86±23.4	130.9±14.4	200±25.9	141.73±7.63	133.9±20.5

La plus grande partie des composés toxiques, y compris les métabolites secondaires des plantes médicinales, s'accumulent dans le foie où ils sont détoxifiés (Reichl, 2004). De ce fait, une étude de la fonction hépatique peut donc s'avérer utile dans l'évaluation des effets toxiques des plantes médicinales sur le foie. La TGO, la TGP et la PAL sont les principaux enzymes utilisés dans le but d'évaluer l'état de la fonction hépatique (Wallace et Meyer, 2010). En général, la TGO et la TGP sont des enzymes d'origine mitochondriale et cytoplasmique. Ainsi, toute nécrose cellulaire, destruction du parenchyme hépatique ou augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes peut mener à l'écoulement de ces enzymes dans la circulation sanguine et donc à l'augmentation de leurs taux sériques (Adeneye et al., 2006 ; Jodynis-Liebert et al., 2010). D'autre part, la PAL est une enzyme ubiquitaire, en particulier dans le foie, les voies biliaires, les reins, l'os et le placenta, où elle est très concentrée. son augmentation dans la circulation indique généralement la présence d'une obstruction des canaux biliaires intra-hépatiques, d'une cirrhose biliaire primitive ou d'une désorganisation de l'architecture hépatique (Akhtar et al., 2012).

Le bilan rénal sert à dépister un éventuel dysfonctionnement du rein. Il comprend en première approche quelques examens biochimiques nécessaires qui seront complétés par des analyses des urines et des examens morphologiques (Timbrell, 2000).

La créatinine représente le marqueur biologique majeur de l'altération rénal (Jodynis-Liebert et al., 2010). C'est un produit de la dégradation non enzymatique de la créatine, un composé protéique contenu dans le tissu musculaire, et elle est strictement éliminée par les reins. Ainsi, le changement dans leur niveau sérique est un indicateur fiable des troubles concernant la filtration glomérulaire et le dysfonctionnement rénal (Mukinda et Eagles, 2010). De ce fait, l'absence du changement dans le taux sérique de la créatinine mène à suggérer que l'extrait brut n'a pas d'effet direct sur la filtration glomérulaire (Lüllmann et al., 1998).

Le traitement de la toxicité aiguë pendant deux semaines par l'extrait de graines de calystégines de *Hyoscyamus albus* n'a pas influencé sur les taux sériques des transaminases (TGO et TGP) et PAL. Ceci est également le cas pour l'urée et la créatinine (Tableau V).

Globalement, l'absence de tout changement dans les paramètres étudiés indique que l'extrait des calystégines n'a pas d'effet sur la perméabilité membranaire cellulaire et le métabolisme hépatique et rénal (Jodynis-Liebert *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2010).

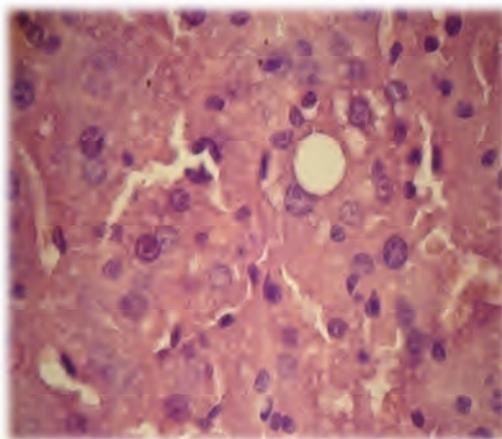
III.1.5-ETUDE HISTOPATOLOGIQUE

Cette partie de l'étude de la toxicité aiguë s'avère être la plus importante, et son résultat est le plus rassurant concernant la toxicité de l'extrait administré aux souris à des doses différentes. L'observation des coupes histologiques des foies et des reins révèle tous changements structurels à l'échelle cellulaire, donc atteinte de l'organe en question par la substance toxique.

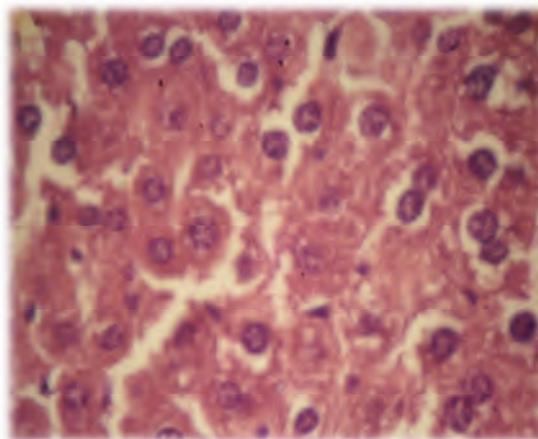
III.1.5.1-HISTOLOGIE HEPATIQUE

La figure (A) représente une coupe histologique du foie d'une souris du lot témoin (normal). Et nous pouvons constater, que le foie de ces souris présente un aspect normal sans aucune modification, présentant un parenchyme d'architecture lobé.

Les figures (b, c, d, e, f) montrent les coupes histologiques du foie des souris traitées par les différentes doses de calystégines et présentent un aspect similaire à celui des souris témoins avec un parenchyme et des cellules d'architecture normale.



(A)



(B)

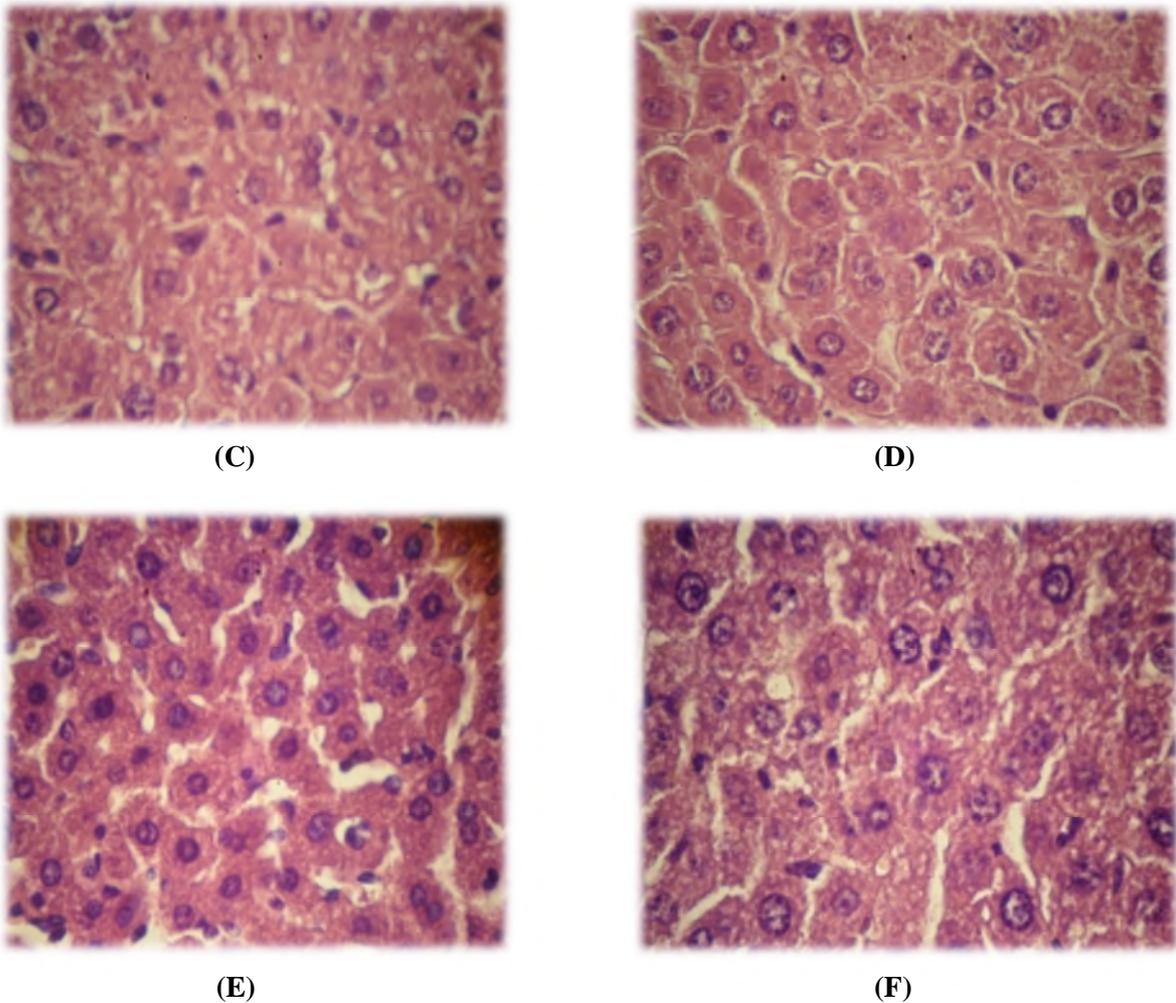


Figure 19: Photographie des coupes histologique du foie (Gx40)

A : foie des souris normal ; **B** : foie des souris traités par les calystégines (5mg/kg) ; **C** : foie des souris traités par les calystégines (20 mg/kg) ; **D** : foie des souris traités par les calystégines (50mg/kg) ; **E** : foie des souris traités par les calystégines (300mg/kg) ; **F** : foie des souris traités par les calystégines (2000mg/kg).

III.1.5.2-HISTOLOGIE RENALE

Les figures (g, h, i, j, k et l) montrent le résultat des coupes histologiques réalisées sur les différents groupes de souris. Nous constatons que les reins des souris témoins (g) présentent une architecture normale, et les reins des souris traitées par les différentes doses de l'extrait de *Hyoscyamus albus* ne présentent pas de modifications ni d'altération au niveau du parenchyme rénal en comparant avec les souris du groupe témoin.

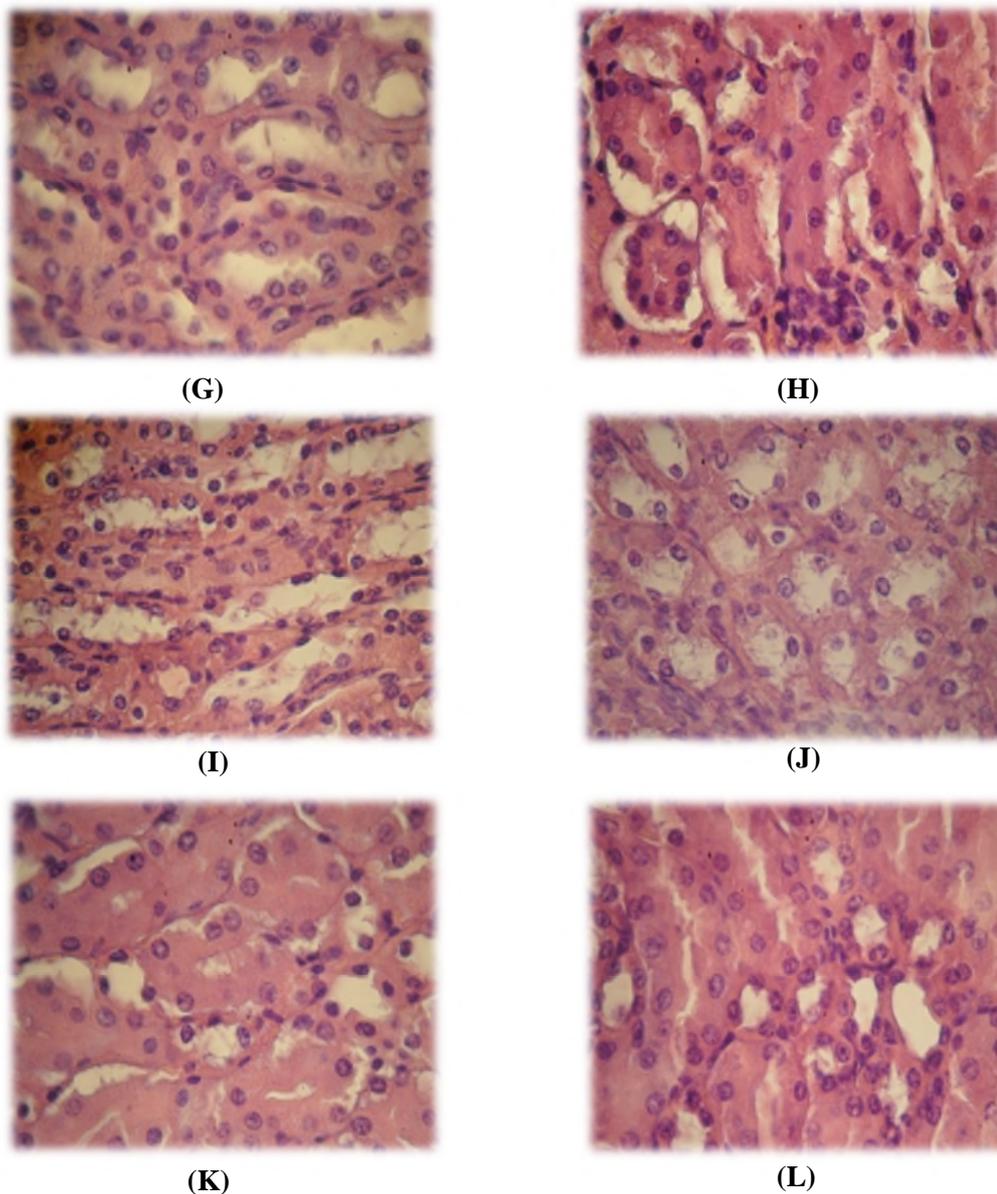


Figure 20 : Photographie des coupes histologique du rein (Gx40)

G : rein des souris normal ; **H** : rein des souris traités par les calystégines (5mg/kg) ; **I** : rein des souris traités par les calystégines (20 mg/kg) ; **J** : rein des souris traités par les calystégines (50mg/kg) ; **K** : rein des souris traités par les calystégines (300mg/kg) ; **L** : rein des souris traités par les calystégines (2000mg/kg).

L'examen microscopique des foies et des reins traités par les différentes doses de l'extrait de calystégines de *Hyoscyamus albus* ne montre aucun changement significatif de l'architecture des parenchymes et des cellules. Ainsi, aucun signe de mort cellulaire ou de lésions tissulaire n'a été détecté. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors des différents dosages biochimiques effectués qui viennent confirmer qu'aucune atteinte tissulaire ou cellulaire n'a affecté les organes étudiés.

De manière générale, nous pouvons conclure que les calystégines de *Hyoscyamus albus* ne présentent pas de toxicité à court terme et que la DL₅₀ (Dose létale à 50%) est supérieure à 2000mg/kg.

III.2- ACTIVITE ANTIDIABETIQUE

III.2.1- EVOLUTION DE LA GLYCEMIE

Les résultats de l'effet antidiabétique de l'extrait des graines de *Hyoscyamus albus* sur des souris diabétiques durant 20 jours de traitement à des doses quotidiennes de 10 et 20 mg/kg/jour de poids corporel sont illustrés par la figure 21.

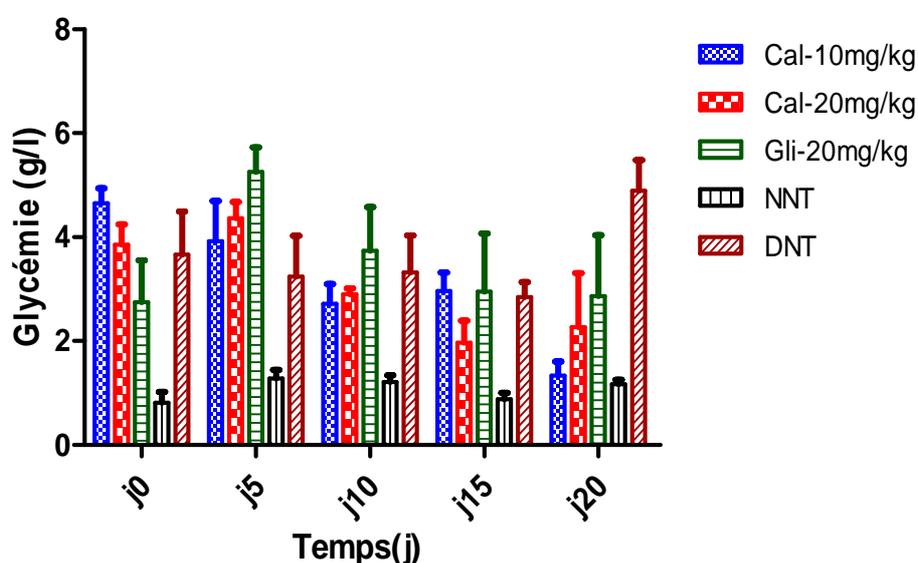


Figure 21 : Evolution de la glycémie chez les souris diabétiques

NNT : souris normal non traités; DNT : diabétiques non traités; Gli : diabétiques traités par Glibenclamide (20mg/kg); Cal-10mg/kg : diabétiques traités par les calystégines (10mg/kg); Cal-20mg/kg : diabétiques traités par les calystégines (20mg/kg).

L'analyse des résultats montre une diminution progressive de la glycémie chez les souris diabétiques traitées par l'extrait des graines de *Hyoscyamus albus*.

L'administration de 10mg et 20mg/kg/jour d'alcaloïde a permis une baisse de la glycémie à jeun de 4.65g/l à 1.33g/l et de 3.85 g/l à 2.27g/l respectivement au bout de 20 jours de traitement.

En revanche, les souris traitées par le standard Glibenclamide (Gli) à 20mg/kg ont présenté des concentrations plasmatiques en glucose largement supérieures à celles des souris traitées par l'extrait de la jusquiame. Ainsi 10 jours après le début du traitement les glycémies

enregistré pour chaque lot étaient de l'ordre de $3.73 \pm 0.84 \text{g/l}$ pour le Gli à 20mg/kg contre seulement $2.9 \pm 0.11 \text{g/l}$ pour l'extrait de calystégines à la même dose. Les souris diabétiques non traitées avaient quant à elles une glycémie moyenne de $3.31 \pm 0.71 \text{g/l}$.

Les calystégines sont des alcaloïdes polyhydroxylés aussi connues sous le nom d'imminosucres, et de part leur analogie structurale avec les hydrates de carbone, ces molécules sont d'excellents inhibiteurs de divers glycosidases (**Asano et al., 2000**).

Les glucides complexes alimentaires sont segmentés en oligosaccharides et en disaccharides par les amylases pancréatiques dans le duodénum. Les oligosaccharides et les disaccharides doivent ensuite être dégradés en monosaccharides par les enzymes qui interviennent au niveau de la bordure en brosse intestinale, les alpha-glucosidases, pour leur absorption par les anthérocytes du jéjunum (**Cheng et al., 2004**).

Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase ralentissent ainsi l'absorption intestinale des hydrates de carbone en changeant le site d'absorption des sucres vers la partie distale de l'intestin grêle ou vers le colon ou bien comme dans le cas des alcaloïdes nortropaniques par inhibition compétitive de ces enzymes. Suite à ce processus, l'entrée du glucose dans la circulation systémique est retardée et les cellules pancréatiques bénéficient desuffisamment de temps pour augmenter la sécrétion d'insuline en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose dans le plasma (**Van de laar et al., 2005**).

Ainsi, selon **Asano et al. (1997)** les calystégines sont d'excellents inhibiteurs de glucosidases avec des IC_{50} variant de 3 à $50 \mu\text{M}$ pour la β -glucosidase humaine et de 140 à $410 \mu\text{M}$ pour l' α -glucosidase humaine.

La Fagomine est un analogue polyhydroxylé de pipéridine et un iminosucre naturel, qui a des effets inhibiteurs sur les α et β -glucosidases des mammifères (**Padro et al, 2010**). Des études réalisées par **Jiang et al, (2014)** ont prouvé que la fagomine est un puissant anti-hyperglycémiant chez les souris rendues diabétiques par la streptozocine, en effet il s'est avéré que cette molécule possédait un effet potentialisant et stimulant sur la libération de l'insuline.

D'autre part, l'isofagomine (isomère de la fagomine), réduit la production basal du glucose hépatique par inhibition des enzymes impliqués (phosphoenolpyruvate carboxykinase et fructose 1,6-biphosphatase) et aurait un effet répresseur sur l'action du glucagon (hormone antagoniste à l'insuline) (**Jakobsen et al., 2001**).

Cette même molécule pourrait réduire la dégradation du glycogène par inhibition des deux enzymes catalysant cette réaction : glycogène phosphorylase et amylo-1,6-glucosidase (Kuriyama *et al.*, 2008).

De ce fait compte tenu de la similitude structurale entre les calystégines et la fagomine (immunosucres polyhydroxylés), ainsi que le partage d'une même activité inhibitrice sur les glucosidases nous pouvons supposer que l'effet hypoglycémiant des calystégines de *Hyoscyamus albus* pourrait faire intervenir au moins un des mécanismes cité précédemment.

III.2.2- VARIATION DU POIDS CORPOREL

Le poids est l'un des plus importants paramètres qui nous renseigne sur l'apparition et l'évolution du diabète à cause de sa relation directe avec le métabolisme lipidique. Pour cela nous avons suivi cette variation durant toute la période de traitement des souris. Les résultats sont montrés dans la figure 22.

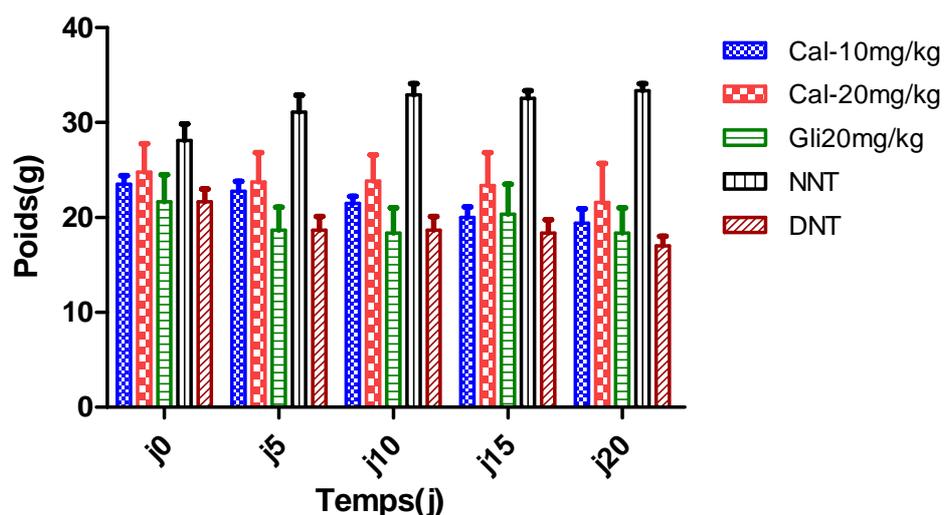


Figure 22 : Evolution pondérale des souris durant 20 jours de traitement

NNT : souris normal non traités; DNT : diabétiques non traités; Gli : diabétiques traités par Glibenclamide (20mg/kg); Cal-10mg/kg : diabétiques traités par les calystégines (10mg/kg); Cal-20mg/kg : diabétiques traités par les calystégines (20mg/kg).

D'après les résultats, on remarque que le poids des souris normales non traitées (NNT) est supérieur à celui des souris diabétiques. Une légère baisse du poids corporel moyen des souris diabétiques non traitées a été enregistré au cours des vingt jours de l'étude contrairement aux groupes ayant reçu l'extrait et le standard qui ont présenté des poids moyens relativement constants.

III.2.3-QUANTITE DE NOURRITURE CONSOMMEE

La figure 23, représente la variation quotidienne de la quantité de nourriture consommée par les différents lots de souris du test.

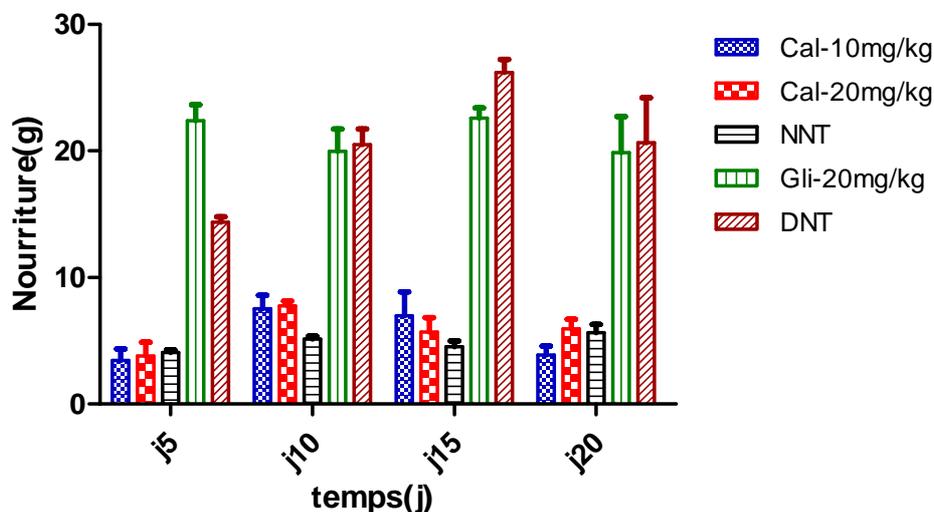


Figure 23 : Quantité de nourriture consommée par les souris durant les 20 jours du traitement.

NNT : souris normal non traités; DNT : diabétiques non traités; Gli : diabétiques traités par Glibenclamide (20mg/kg); Cal-10mg/kg : diabétiques traités par les calystéginés (10mg/kg); Cal-20mg/kg : diabétiques traités par les calystéginés (20mg/kg).

D'après cette figure la quantité de nourriture consommée durant cette étude par les souris diabétiques non traitées (DNT) et Gli 20mg/kg, est largement supérieure à celle des souris traitées par l'extrait ainsi que les souris normales.

On note également que la consommation de nourriture par les souris diabétiques traitées par les deux doses d'alcaloïdes est relativement proche de celle des souris normales.

III.2.4- EVOLUTION DE LA CONSOMMATION EN EAU

Le volume d'eau consommé durant la période de traitement est mesuré quotidiennement, il est représenté dans la figure 24.

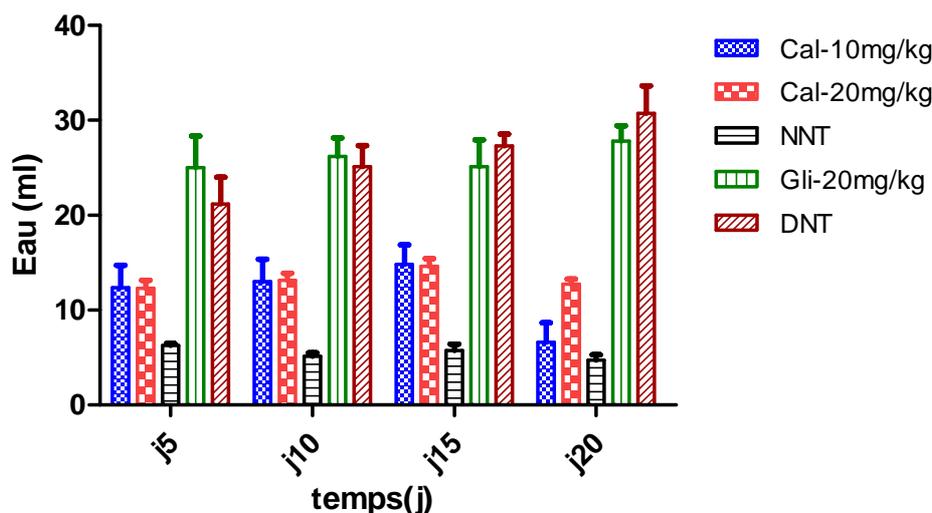


Figure 24 : Quantité d'eau consommée par les souris durant les 20 jours du test.

NNT : souris normal non traités; DNT : diabétiques non traités; Gli : diabétiques traités par Glibenclamide (20mg/kg); Cal-10mg/kg : diabétiques traités par les calystéginés (10mg/kg); Cal-20mg/kg : diabétiques traités par les calystéginés (20mg/kg).

Une vue d'ensemble des histogrammes de la figure montre que les souris diabétiques (traitées et non traitées) ont consommé une quantité d'eau largement supérieure à celle consommées par les souris normales. En revanche on remarque que les volumes d'eau consommé par les lots ayant reçu 10 et 20mg/kg de calystéginés sont considérablement inférieurs à ceux des deux lots DNT et Gli 20mg/kg.

En effet au 10^{ème} jour du test les groupes ayant reçu 10 et 20mg/kg ont consommée respectivement 13 ± 2.35 ml et 13.16 ± 0.73 ml d'eau alors que pour les deux lots DNT et Gli la consommation hydrique a atteint 25.12 ± 2.24 ml et 26.2 ± 1.97 ml.

Les paramètres auxquels nous nous sommes intéressés durant notre travail, sont l'évolution pondérale, la polyphagie et la polydipsie des souris étudiées. Ces paramètres sont en relations directe avec l'hyperglycémie (Hennen, 2001). La STZ induit un diabète caractérisé par une polyphagie et une perte sévère de poids corporel qui peut mener à plusieurs complications liées au diabète (Sarkhail et al., 2007; Yang et al., 2008). En effet, la polyphagie constitue un symptôme crucial du diabète de type II. Ce paramètre nous renseigne essentiellement sur le rétablissement de la sécrétion de l'insuline ainsi que le degré d'utilisation du glucose par les cellules (Bouglé et Annane, 2009).

L'hyperglycémie provoque une glycosurie importante d'où la sortie massive d'eau via les tubules rénaux, qui mène vers une polydipsie compensatrice (Okon et al., 2012). Le

volumed'eau consommé par les souris reflète l'efficacité de l'extrait testé, en effet la polydipsie diminue lorsque le taux normal de glucose plasmatique est rétablie.

Le déficit en insuline est la cause principal de cette perte de poids, en raison des actions qu'elle exerce sur le métabolisme lipidique (activation de la lipogenèse et inhibition de la lipolyse) et glucidique (activation de la glycolyse et inhibition de la néoglucogenèse) etcette déficience influe également sur la quantité de nourriture consommée, en effet il y a une augmentation (polyphagie) au début del'expérimentation (symptôme de diabète type 2)et aussi sur la polydipsie (**Bouglé et Annane, 2009**).Ainsi la possible action stimulante des calystégines sur la sécrétion de l'insulinepourrait expliquer la minimalisation de ces paramètres par rapport aux deux lots standard et diabétique non traités qui ont présenté une polydipsie et une polyphagie assez marqué.

III.2.5- EFFET DES EXTRAITS SUR LE PROFIL LIPIDIQUE

Les paramètres lipidiques sanguins des différents groupes ont été déterminés après 20 jours de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois dosages. Les résultats sont montrés dans la figure 25.

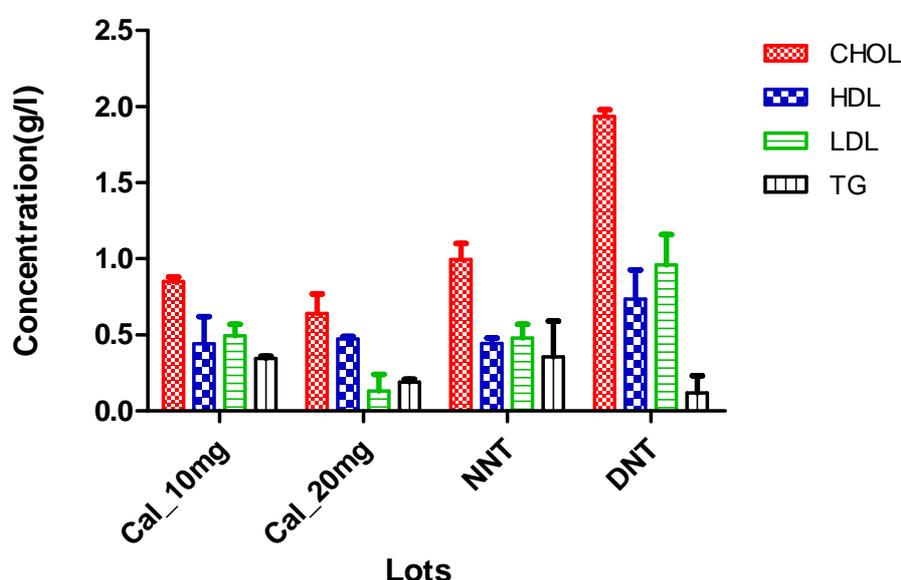


Figure 25 : effet des calystégines sur le taux du cholestérol, triglycéride, HDL et LDL plasmatiques. **CHOL** : Cholestérol; **HDL** : Lipoprotéines de haute densité; **LDL** : Lipoprotéines de basse densité; **TG** : Triglycéride; **NNT** : souris normal non traités; **DNT** : diabétiques non traités; (**20mg/kg**); **Cal-10mg/kg** : diabétiques traités par les calystégines (**10mg/kg**); **Cal-20mg/kg** : diabétiques traités par les calystégines (**20mg/kg**).

Nous remarquons d'après cette figure que les calystégines ont diminué le taux de cholestérol plasmatique d'une manière hautement significative (0.85 ± 0.03 et 0.64 ± 0.13 pour 10 et 20mg/kg respectivement) par rapport au cholestérol de groupe de souris diabétiques non traitées (1.93 ± 0.04), cette diminution est presque similaire à celle du groupe de souris NNT.

Pour les triglycérides plasmatiques on constate que leur taux chez les lots traitées avec les calystégines sont relativement bas (0.34 ± 0.01 et 0.19 ± 0.02 pour 10 et 20mg/kg respectivement), et presque semblables aux triglycérides du groupe NNT.

Le groupe de souris traitées par les alcaloïdes nortropaniques après 20 jours de traitement a présenté une diminution significative dans le taux de LDL sanguin par rapport au groupe DNT (0.95 ± 0.20), on a 0.13 ± 0.11 pour Cal 20mg/kg et pour le lot Cal 10mg/kg (0.49 ± 0.07) il est presque identique au taux de LDL du groupe NNT (0.48 ± 0.09).

Le taux de HDL sanguin pour les souris traitées aux calystégines 10 et 20 mg/kg est de 0.44 ± 0.18 et 0.47 ± 0.01 respectivement et équivalent au HDL des souris NNT (0.44 ± 0.03) et relativement bas par rapport au HDL des souris DNT qui est de 0.73 ± 0.17 .

Les anomalies lipidiques observées au cours du diabète jouent un rôle majeur dans le développement des lésions athéromateuses (**Vergès, 2007**), de ce fait il est important d'étudier le profil lipidique chez les souris diabétiques.

Dans la présente étude, les différents paramètres lipidiques (cholestérol, triglycérides, LDL et HDL) des souris diabétiques traitées par les calystégines des graines de *Hyoscyamus albu* sont été déterminés après 20 jours de traitement.

La lipidémie est l'un des paramètres biochimiques qui varie en fonction de l'état physiologique de l'individu (obésité, diabète, syndrome métabolique...), dans le cas du diabète, la mesure du taux de cholestérol, triglycérides, LDL et HDL, peut nous renseigner sur l'état du malade, car leur concentration augmente avec la diminution de l'insulinémie (**Hannen, 2001**).

D'après les résultats obtenus lors de cette étude, les calystégines diminuent le taux de cholestérol et LDL plasmatique, cela s'explique probablement par la stimulation de la sécrétion de l'insuline qui favorise le catabolisme des LDL en augmentant l'activité des LDL récepteurs localisées sur les hépatocytes (70%) et sur les autres cellules de l'organisme (30%), diminuant ainsi la libération du cholestérol libre dans le sang (**Vergès, 2007 et Patel et al.;**

2009). L'insuline agit également en activant la LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase), une enzyme responsable du transfert du cholestérol libre en cholestérol estérifié qui migre au centre de la lipoprotéine (HDL), ce qui favorise la diminution de sa concentration plasmatique (Arii *et al.*, 1997). Les calystégines pourraient aussi agir au niveau intestinal en réduisant l'absorption des acides gras et du cholestérol libre par inhibition des lipases de la cholestérol estérase pancréatique et ainsi réduire l'hyperlipidémie associée au diabète (Toma *et al.*, 2014).

III.2.6-ETUDE HISTOLOGIQUE DU PANCREAS

Les coupes histologiques des pancréas de chaque lot du test sont présentées dans la figure 26.

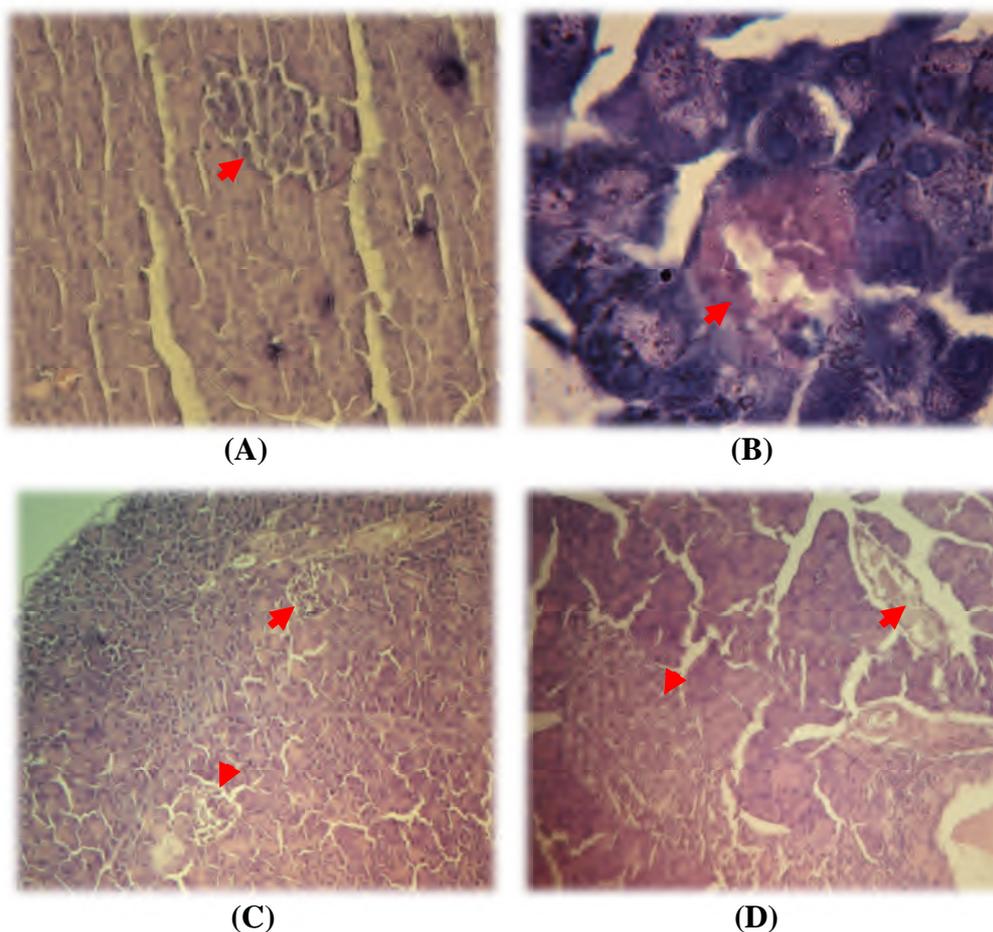


Figure 26 : Coupes histologiques des pancréas observées sous microscope optique (Gx10)

La figure (A) représente une coupe histologique du pancréas d'une souris du lot témoin (normal), on peut constater la présence d'un amas de cellules pancréatiques sécrétrices de l'insuline (cellules β de Langerhans).

La figure (B) montre l'image d'une coupe histologique du pancréas d'une souris du lot contrôle (diabétique non traité). On constate sur cette figure qu'il y'a une absence des îlots de Langerhans et la présence de certains débris cellulaires et de corps nécrotiques résultat de l'effet destructeur de la streptozotocine sur les cellules β pancréatique.

La figure (C) représente l'image d'une coupe histologique du pancréas d'une souris du lot traité par l'extrait de calystégines extraites à partir des graines de *Hyoscyamus albus* (10mg/kg/jour). On remarque la présence d'un îlot de cellules β de Langerhans qui commence à se régénérer. Cela est sûrement dû à l'effet de l'extrait administré durant la période de traitement.

La figure (D) montre l'image d'une coupe histologique toujours, du pancréas d'une souris du lot traité par l'extrait de calystégines extraites à partir des graines de *Hyoscyamus albus* (20mg/kg/jours). Sur cet échantillon, on remarque la présence de plusieurs îlots des cellules β de Langerhans qui sont en cours de croissance et de développement, ce qui signifie que la dose de 20 mg/kg/jours est à l'origine d'une régénération beaucoup plus importante par rapport à celle observée au niveau du lot traité par 10mg/kg/jours d'extrait.

Une étude récente réalisée sur la deoxynojirimycine, un alcaloïde polyhydroxylé a montré que cette molécule avait la capacité de promouvoir la régénération des îlots de Langerhans sur des cultures de cellules pancréatiques traitées par de la streptozotocine. En effet le taux de synthèse de l'insuline de ces cellules a été significativement augmenté ce qui signifie que ce type d'alcaloïdes serait responsable de la réparation des dommages cellulaires induits par la streptozotocine (Li et al., 2015).

***Conclusion
et
Perspectives***

Le traitement actuel du diabète est efficace dans la baisse de la glycémie, cependant le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas, ce qui conduit à long terme à l'émergence de complications très sérieuses. L'essor récent de la phytothérapie offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques.

L'étude de la toxicité aigüe de l'extrait de calystégines, après administration orale d'une dose unique, n'a montré aucun signe de toxicité ni sur le comportement, ni sur l'évolution pondérale, ni sur la quantité de nourriture et le volume d'eau consommés.

L'ensemble de nos résultats a permis de souligner les effets bénéfiques de l'administration de l'extrait de calystégines des graines de *Hyoscyamus albus* que ce soit dans la diminution de la glycémie ou dans le profil lipidique.

Les groupes de souris, soumises à un traitement par l'extrait de calystégines 10 et 20mg/kg des graines de *Hyoscyamus albus*, ont présenté une diminution importante de la glycémie durant la période de traitement, et une amélioration de la glycémie plus efficace que le standard Glibenclamide, Cela a été confirmé par les coupes histologiques où l'on a observé une régénération des îlots de Langerhans.

L'ensemble de nos résultats a permis aussi de souligner un effet bénéfique dans la diminution du profil lipidique de souris diabétiques traitées avec les calystégines, nos résultats ont montré que cet extrait diminue le taux du cholestérol total, LDL et des triglycérides.

Cependant, pour s'assurer de l'innocuité de l'extrait étudié, d'autres études *In-vivo* et *In-vitro* serait intéressantes à réaliser. De même, des études approfondies sur la toxicité chronique et l'administration de doses supérieures à 2g/kg, serait utiles pour pouvoir déterminer la DL50.

Il serait aussi intéressant de mener des investigations plus approfondie pour élucider certaines zones d'ombres afin d'expliquer les mécanismes par lesquels les extraits agissent sur l'hyperglycémie, et aussi une étude visant l'identification et la purification des principes actifs de cet extrait, et enfin des tests complémentaires comme le dosage de l'insuline pour démontrer le pouvoir insulino-sécréteur.

***Références
Bibliographiques***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adeneye, A., Ajagbonna, O., Adeleke, T., Bello S. (2006). Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 374-379.

Akhtar, A., Deshmukh, A., Raut, C., Somkuwar, A., Bhagat S. (2012). Prallethrin induced serum biochemical changes in Wistar rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102 : 160-168.

Arii, K., Suehiro, T., Yamamoto, M., Ito, H and Hashimoto, K. (1997). Suppression of Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity in Acute Hyperinsulinemia and Effect of Plasma Nonesterified Fatty Acid. *Metabolism*, 46 : 1166-1170.

Asano, N., Kato, A., Miyauchi, M., Kizu, H., Tomimori, T., Matsui, K., Nash, R., Molyneux, R. (1997). Specific α -galactosidase inhibitors, N-methylcalystegines Structure/activity relationships of calystegines from *Lycium chinense*. *Eur. J. Biochem*, 248 : 296-303.

Asano, N., Nash, R., Molyneux, R et Fleet, G. (2000). Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11 : 1645-1680.

Azemi, M., Mosaddegh, M., Cheraghali, A., Namjooyan, F., Drager, B. (2006). Isolation and Identification of Calystegines in Root Cultures of four *Physalis* Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 1: 69-72.

Begum, S., Saxena, B., Goyal, M., Ranjan, R., Joshi, V., Rao, C., Krishnamurthy, S., Sahai, M. (2010). Study of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of seeds of *Hyoscyamus niger* and isolation of a new coumarinolignan. *Fitoterapia*, 81 : 178–184.

Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J., Christen, F. (2001). Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry*, 58 : 455–462.

Benhouda, A., Yahia, M. (2014). Toxicity, Analgesic and Anti-pyretic Activities of Methanolic Extract from *Hyoscyamus albus* Leaves in Albinos Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (3) : 121-127.

Bennett, R.A. et Pegg, A.E. (1981). Alkylation of DNA in Rat Tissues following Administration of Streptozotocin. *Cancer Research*, 41: 2786-2790.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Biastoff, S., Drager, B. (2007).** Calystegines. In : *The alkaloids : Chemistry and biology*. Cordell, G. Academic Press, 49-102.
- Bolzán, A. et Bianchi, M. (2002).** Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research*, 512: 121-134.
- Borm, K., Lüscher, S. et Müller, B. (2012).** Premières étapes du traitement du diabète de type 2 nouvellement diagnostiqué – conseils pratiques. *Forum Med Suisse*, 12(48) : 929-935.
- Bouglé, A., Annane, D. (2009).** Les effets de l'insuline : de la cellule à l'organisme entier. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 28 : 193–199.
- Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris : Lavoisier. 1292 p.
- Busch-Brafin, M.S. et Pinget, M. (2001).** Le diabète de type 2. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25(2) : 103-114.
- Buysschaert, M. (2006).** Diabétologie clinique. De Boeck, Bruxelles. 180 p.
- Cefalu, W.T. (2006).** Animal Models of Type 2 Diabetes: Clinical Presentation and Pathophysiological Relevance to the Human Condition. *ILAR Journal*, 47(3) : 186-198.
- Chami, M., Zemmour, L., Midoun, N., Belhadj, M. (2015).** Diabète sucré du sujet âgé : la première enquête algérienne. *Épidémiologie, coûts et organisation des soins*, (9) : 210-215.
- Chauhan, N. (1999).** Medicinal and Aromatic Plants of Himachal Pradesh. New Delhi : Indus Publishing. 1294 p.
- Cordell, G. (2013).** Fifty years of alkaloid biosynthesis in Phytochemistry. *Phytochemistry*, 91 : 29–51.
- Couplan, F. (2012).** Les plantes et leurs noms : Histoires insolites. Quae, Espagne. 223 p.
- Csuk, R., Prell, E., Reibmann, S. (2008).** Total synthesis of calystegine A₇. *Tetrahedron*, 64 : 9417-9422.
- Drager, B. (2002).** Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 978 : 1–35.
- Drager, B. (2006).** Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, 67 : 327–337.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Drager, B., Funck, C., Hrhler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A., Schmidt, R. (1994).** Calystegines as a new group of tropane alkaloids in Solanaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38 : 235-240.
- Drouin, P., Blickle, J.F., Charbonnel, B., Eschwege, E., Guillausseau, P.J., Plouin, P.F., Daninos, J.M., Balarac, N. et Sauvanet, J.P. (1999).** Diagnostic et classification du diabète sucré. Les nouveaux critères. *Diabetes & Metabolism*, 25(1) : 72-83.
- Eddouks, M., Ouahidi, M.L., Farid, A., Moufid, A., Khalidi, A. et Lemhadri, A. (2007).** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, 5 : 194-203.
- Eich, E. (2008).** Solanaceae and Convolvulaceae : secondary metabolites. Berlin : Handbook. 637 p.
- Etuk, E.U. (2010).** Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biologyjournal of North America*, 1 (2): 130-134.
- Gariani, K., Philippe, J., Jornayvaz, F.R. (2014).** Bétatrophine – un nouvelle espoir dans le traitement du diabète. *Forum Med Suisse*, 14 (8) : 303-309.
- Geenen, V. (2004).** Nouvelles approche du diagnostic et de la pathogénie du diabète de type 1. *Louvain Médical*, 123 : 253-259.
- Girard, J. (2003).** Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline mécanismes de la lipotoxicité. *M/S: médecine sciences*, 19(8-9) : 827-833.
- Giudicelli, J. et Cattan, N. (2001).** Données immunologiques du diabète de type 1. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25(2) : 85-90.
- Goullé, J., Pépin, G., Dumestre Toulet, V., Lacroix, C. (2004).** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*, 16, (1) : 22-35.
- Grimaldi, A. (2000).** Diabète insulino-dépendant. *Endocrinologie-Métabolisme-Nutrition*, 50 : 1473-1484.
- Guillausseau, P.J. et Laloi-Michelin, M. (2003).** Physiopathologie du diabète de type 2. *La revue de médecine interne*, 24 : 730-737.
- Halbron, M. (2014).** Diabète et médicaments : risque iatrogène. *Endocrinologie-Nutrition*, 40 : 1-7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Halimi, S., Debaty, I. et Guedel, D. (2009).** Nouveaux traitements du diabète de type 2 : quelles stratégies thérapeutiques pour demain. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 21(8) : 397-407.
- Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M. (2013).** Solanacées. In : *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Paris : Springer. P. 237-259.
- Harada, M. et Makino, S. (1984).** Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. *Diabetologia*, 27: 604-606.
- Hennen, G. (2001).** Endocrinologie. Bruxelles : De Boeck. 520 p.
- Hodge A., Sterner J. (1980).**In Etudes de toxicité: quelques données fondamentales (A.K. DONE) TEMPO MEDICAL Afrique N°7.
- Jakobsen, P., Lundbeck, JM., Kristiansen, M., Breinholt, J., Demuth, H., Pawlas, J., Candela, MP., Andersen, B., Westergaard, N., Lundgren, K., Asano, N. (2001).** Iminosugars : potential inhibitors of liver glycogen phosphorylase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9 : 733-744.
- Jiang, F., Liu, Q., Zhao, D., Luo, C., Guo, C., Ye, W., Luo, C., Chen, H. (2014).** A concise synthesis of N-substituted fagomine derivatives and the systematic exploration of their α -glycosidase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77 : 211-222.
- Jodynys-Liebert, J., Nowicki, M., Murias, M., Adamska, T., Ewertowska, M., Kujawska, M., Piotrowska, H., Konwerska, A., Ostalska-Nowicka, D., Pernak, J. (2010).** Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyldimethyl ammonium saccharinate, in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 57: 266-273.
- Jouzier, E. (2005).** Solanacées Médicinales et Philatélie. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 144, p. 311-332.
- Kadi, K. et Yahia, A. (2007).** Effect of phyto-hormones 2,4-d and kinitin, Applications on alkaloids accumulation in *Hyoscyamus albus* L. *Sciences et Technologie*, (25) : 13-17.
- Kanter, M., Meral, I., Yener, Z., Ozbec, H. et Demir, H. (2003).** Partial regeneration /Proliferation of the β cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tohoko Journal of Experimental Medecine*, 201(4): 213-219.
- Kuriyama, C., Kamiyama, O., Ikeda, K., Sanae, F., Kato, A., Adachi, I., Imahori, T., Takahata, H., Okamoto, T., Asano, N. (2008).** In vitro inhibition of glycogen-degrading

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

enzymes and glycosidases by six-membered sugar mimics and their evaluation in cell cultures. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19 : 7330-7336.

Lamendin, H. (2011). Recueil pratique de phytothérapie buccodentaire. *Médecine buccal*, 60 : 1-10.

Le Blanc, G. (2010). Acute toxicity. In : A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 125-236.

Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51: 216-226.

Li, X., Luo, Y., Wang, L., Li, Y., Shi, Y., Cui, Y., Xue, M. (2010). Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 131: 110-115.

Li, Y., Ji, D., Zhong, S., Lin, T., Lv, Z. (2015). Hypoglycemic effect of deoxynojirimycin-polysaccharide on high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice via regulation hepatic glucose metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 225 : 70-79.

Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A. (1998). Atlas de poche de pharmacologie. 2nd ed. Médecine-Sciences, Flammarion (Paris), 32-42.

Madiello, P. (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β cell mass. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38: 873-893.

Mahfouze, S., Ottai, M. (2011). Assessment of Genetic Variability for Some *Hyoscyamus* Species Using Biochemical and Molecular Markers. *Journal of Applied Sciences Research*, 7(12) : 1752-1759.

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Sener, A. et Pipeleers, DG. (1982). Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic β cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79: 927-930.

Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen P., Oksman-Caldentey, K. (2000). Simultaneous determination of scopolamine, hyoscyamine and littorine in plants and different hairy root clones of *Hyoscyamus muticus* by micellar electrokinetic chromatography. *Phytochemistry*, 54 : 517-523.

Molyneux, R., Gardner, D., James, L., Colegat, S. (2002). Polyhydroxy alkaloids : chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 967 : 57-74.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Molyneux, R., Nash, R., Asano, N. (2005).** The Chemistry and Biological Activity of Calystegines and Related Nbtropane Alkaloids. *In :Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives.* Pelletier, S. Elsevier, 303-343.
- Mordes, J.P., Bortell, R., Blankenhorn, P.E., Rossini, A.A. et Greiner, A.D. (2004).** Rat Models of Type 1 Diabetes: Genetics, Environment, and Autoimmunity. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 45(3): 278-291.
- Mukinda, T., Eagles, F. (2010).** Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128: 236-240.
- Naoaki, S., Yoshimatsu, G., Tsuchiya, H., Egawa, S. et Unno, M. (2012).** Animal Models of Diabetes Mellitus for Islet Transplantation. *Experimental Diabetes Research*, 1-11.
- Ndomou, M., Djidjou, P.K., Ayong, M.N. et Tchigeang, C. (2014).** Evaluation de l'activité des extraits de feuilles de *Gentium africanum* et *Gentium bulchozzianum*. *Science, Technologie et Développement*, 15 : 60-65.
- Nejadhabibvash, F., Rahmani, F., Heidari, R., Jame, R. (2012).** Assessment of genetic diversity among *Hyoscyamus* genotypes based on ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4 (17), 1300-1306.
- Okon, U., Owo, D., Udokang, N., Udobang, J., Ekpenyong, C. (2012).** Oral Administration of Aqueous Leaf Extract of *Ocimum Gratissimum* Ameliorates Polyphagia, Polydipsia and Weight Loss in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2 (3) : 45-49.
- Oubré, A.Y., Carlson, T.J., King, S.R. et Reaven, G.M. (1997).** From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40: 614-617.
- Padró, M., Castillo, J., Gómez, L. (2010).** Cytotoxicity and enzymatic activity inhibition in cell lines treated with novel iminosugar derivatives. *Glycoconj J*, 27 : 277-285.
- Palsamy, P. et Subramanian, S. (2008).** Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62: 598-605.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Patel, S., Shah, R., Goyal, R. (2009).** Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effect of Dihar, a polyherbal ayurvedic formulation in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 74 : 564-570.
- Pavana, P., Sethupathy, S. et Manoharan, S. (2007).** Antihyperglycemic and antilipidoxidative effects of *tephrosia purpurea* seed extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(1): 77-83.
- Pelletier, S. (2005).** The Chemistry and Biological Activity of Calystegines and Related Nbrtropane Alkaloids. In : *Alkaloids : Chemical and Biological Perspectives*. Pelletier, W. Elsevier, 303-343.
- Pudersell, K. (2006).** Tropane Alkaloid Production and Riboflavine Excretion in the Field and Tissue Cultures of Hanbane. Tartu : Press. 89 p.
- Quézel, P. et Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. 1170 p.
- Reichl FX (2004).** Guide pratique de toxicologie. 2nd ed. DeBoeck & Larcier (Bruxelles), 4-16.
- Rodier, M. (2001).** Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire - Imageriefonctionnelle et métabolique*, 25(2) : 91-93.
- Sandler, S. et Swenne, I. (1983).** Streptozotocin, but Not Alloxan, Induced DNA Repair Synthesis in Mousse Pancreatic Islets in Vitro. *Diabetologia*, 25: 444-447.
- Schimming, T., Jenett-Siems, K., Mann, P., Tofern-Reblin, B., Milson, J., Johnson, R., Deroin, T., Austin, D., Eich, E. (2005).** Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, 66 : 469-480.
- Scholl, Y., Asano, N., Drager, B. (2001).** Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors. *Journal of Chromatography A*, 928 : 217-224.
- Scholl, Y., Schneider, B., Drager, B. (2003).** Biosynthesis of calystegines : ¹⁵N NMR and kinetics of formation in root cultures of *Calystegia sepium*. *Phytochemistry*, 62 : 325-332.
- Spinas, G.A. et Lehmann, R. (2001).** Diabète sucré : Diagnostic, classification et pathogénèse. *Forum Med Suisse*, (20) : 519-525.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res*, 50: 536-546.

Timbrell J (2000). Principles of biochemical toxicology. 3rd ed. Taylor & Francis. Inc (London), 1-390.

Toma, A., Makonnen, E., Mekonnen, Y., Debella, A et Adiskwaattana, S. (2014). Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14 : 180.

UNEP_WCMC. (2002). Biodiversity data sourcebook. United nation environment programme_ World conservation monitoring center, Cambridge, England.

Van de laar, F., Lucassen, P., Akkermans, R., Van de lisonk, E., Rutten, G., Van Well, C. (2005). α -Glucosidase Inhibitors for Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 28:166–175.

Vergès, B. (2007). Physiopathologie de la dyslipidémie du syndromemétabolique et du diabète de type 2. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21 : 9-16.

Wallace, A., Meyer, S. (2010). Hepatotoxicity. *In : A Textbook of Modern Toxicology*. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 277-290.

Watson, A., Fleet, G., Asano, N., Molyneux, R., Nash, R. (2001). Polyhydroxylated alkaloids : natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry*, 56 : 265-295.

Wattiez, A.S., Dupuis, A. et Courteix, C. (2012). Le rat STZ-diabétique : modèle adapté à l'étude de la neuropathie diabétique douloureuse. *Douleur analg*, 25 : 38-45.

Young, J. (2011). Diabète sucré de type 1 et type 2 de l'enfant et de l'adulte, complications *in : Endocrinologie diabétologie et maladies métaboliques* 2^{ème} édition, Elsevier Masson, Paris. P. 242-308.

Annexes

Annexe n°1

L'alimentation est constituée d'un mélange de son, issu de moule, maïs, tourteaux de soja, tourteaux de tournesol, carbonate de calcium, melasse, poly-vitamine, huile, oligo-éléments, sel.

Annexe n°2

1. Phosphatase alcaline

- **Principe de la méthode**

Le substrat p-nitrophenyl phosphate est hydrolysé par la phosphatase alcaline de l'échantillon, en présence d'ions de magnésium, pour former le p-nitrophenol de couleur jaune visible à 405 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline.

2. Transaminase ALAT(TGP)

- **Principe de la méthode**

L'alanine-aminotransférase (ALAT ou GPT) catalyse le transfert du groupement amino de l'alanine au 2-oxoglutarate, en formant le pyruvate et le glutamate. La concentration catalytique est déterminée en utilisant la réaction couplée de lactate-déshydrogénase (LDH), à partir de la vitesse de disparition du NADPH, mesuré à 340 nm.



La diminution dans la concentration de NADH mesurée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique de GPT(ALAT) dans l'échantillon.

3. Transaminase ASAT (TGO)

- **Principe de la méthode**

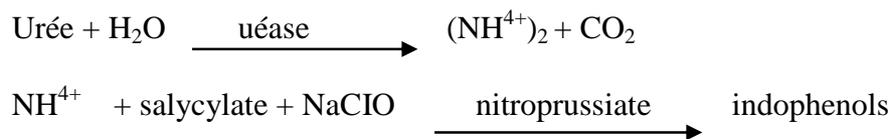
L'aspartate-aminotransférase (ASAT) catalyse le transfert du groupement amino de l'aspartate au 2-oxoglutarate, en formant l'oxaloacétate et le glutamate. La concentration catalytique est déterminée, en utilisant la réaction couplée de la malate-déshydrogénase (MDH), à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm.

La diminution dans la concentration de NADH mesurée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique de GOT(ASAT) dans l'échantillon.

4. Dosage de l'urée

- **Principe de la méthode**

L'hydrolyse enzymatique de l'urée donne l'ammonium (NH_4^+) et le dioxyde de carbone (CO_2). Les ions d'ammonium réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite de sodium (NaClO), en présence d'un catalyseur le nitroprussiate de sodium pour former un indophénol vert.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'urée présente dans l'échantillon.

5. Créatinine sanguine

- **Principe de la méthode**

La méthode est basée sur le fait que la créatinine, en milieu alcalin réagit avec l'acide picrique pour former un complexe coloré. La quantité du complexe formé est directement proportionnelle à la concentration de la créatinine.

Glossaire

GLOSSAIRE

Analgésique : variété de médicaments qui permettent d'atténuer, voire de supprimer la douleur.

Angiospermes : plantes à fleurs portant des graines à l'intérieure d'un compartiment protecteur appelé ovaire.

Anti-inflammatoire : traiter une réaction inflammatoire et les maladies qui résultent telles que les manifestations rhumatismales, les fractures, les stomatites et les lésions génitales et urinaires.

Antinévralgique : réduit ou fait disparaître la douleur liée à l'irritation d'un nerf.

Antispasmodique : calme ou neutralise des contractions involontaires des muscles. Ils sont souvent utilisés dans les spasmes digestifs, les douleurs à type de coliques hépatiques ou néphrétiques et les douleurs utérines de la femme.

Capsule : un fruit sec déhiscent contenant généralement de nombreuses graines. La capsule est issue d'un ovaire à plusieurs carpelles soudés, uni- ou pluriloculaires.

Fébrifuge : Qui a la propriété de combattre la fièvre.

Glycémie : taux de glucose dans le sang. Grâce à plusieurs mécanismes de régulation, la glycémie est maintenue sensiblement constante (autour de 1 gramme par litre) afin d'apporter aux organes et aux tissus des quantités constantes de glucose sanguin.

Herbacée : Qualifie une plante herbacée possédant au moins une de ces caractéristiques : fleur, feuille, rameau ou écaille verticillée, feuille réduite à des collerettes et placée les une au dessus des autres et sporanges groupés au sommet de la tige, une tige feuilletée d'au moins 10 cm.

Hyperglycémie : augmentation anormale de la glycémie.

L'homéopathie : une médecine non conventionnelle considérée comme pseudo-scientifique, proposée par Samuel Hahnemann en 1796.

La macération : est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide pour en extraire les composés solubles, ou bien pour qu'il absorbe de ce liquide afin d'en obtenir le parfum ou la saveur, pour le conserver ou pour qu'il s'y décompose.

Narcotique : une substance chimique capable d'induire, chez l'homme et chez l'animal, un état proche du sommeil et qui engourdit la sensibilité.

Nocicepteur : un récepteur sensoriel de la douleur qui fait naître un message nerveux lorsqu'il est stimulé.

Phytothérapie : désigne la médecine fondée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels.

Plantes médicinales : ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles.

Polydipsie : un symptôme rencontré le plus souvent en endocrinologie et caractérisé par une soif excessive avec augmentation de l'absorption de liquide, causée par la polyurie dans le cas du diabète.

Polyphagie : un désordre alimentaire qui se traduit par une faim excessive.

Polyurie : un symptôme ou une maladie caractérisée par des urines abondantes, fréquemment rencontrée dans le cas du diabète sucré.

Pyxide : un fruit sec déhiscent. C'est un type de capsule qui s'ouvre par déhiscence, le sommet de la capsule se détachant comme un couvercle (opercule), libérant les graines contenues dans le récipient basal (urne), qui peut comporter une ou plusieurs cavités.

Résumé

Le présent travail a pour objectif d'évaluer la toxicité aigüe et l'activité antidiabétique de l'extrait de calystégines de graines d'une plante médicinale. Il s'agit de *Hyoscyams albus* de la famille des solanacées ; une plante réponde dans les zones tropicales et tempérées et connu pour ces vertus thérapeutiques variées (sédatif, anti-inflammatoire, analgésique...).

L'étude de la toxicité aigüe est réalisée sur des souris femelles albinos *Mus musculus*, avec réalisation d'analyses biochimiques (bilan hépatique et rénal), et l'étude n'a révélé aucun signe de toxicité, après l'évaluation du poids corporel et l'étude histologique

L'activité antidiabétique est réalisée sur des souris male albinos *Mus musculus* rendues diabétiques par la streptozotocine. Basée essentiellement sur différents tests : la mesure de la glycémie, le profil lipidique (cholestérol, triglycéride, HDL, LDL) avec une étude histologique des pancréas pour démontrer l'effet bénéfique de l'extrait de calystégines testés. L'administration de cet extrait a montré un effet antihyperglycémique et un effet antidiabétique confirmé par la régénération des îlots de Langerhans mis en évidence par les résultats des coupes histologiques des pancréas.

Mots clés : activité antidiabétique, *Hyoscyamus albus*, streptozotocine, calystégines, hyperglycémie.

Abstract

This work aims to assess the acute toxicity and the antidiabetic activity of the seeds calystégines extract from a medicinal plant. This is *Hyoscyamus albus* the solanaceae family; a plant responded in tropical and temperate zones and known for various therapeutic properties (sedative, anti-inflammatory, analgesic ...).

The study of acute toxicity was performed on albino female mice *Mus musculus*, with performing biochemical analyzes (hepatic and renal balance sheet), and the study did not reveal any signs of toxicity after assessing body weight and histological study

The antidiabetic activity is carried out on male albino mice *Mus musculus* made diabetic with streptozotocin. Essentially based on different tests: measurement of blood glucose, lipid profile (cholesterol, triglyceride, HDL, LDL) with a histological study of the pancreas to demonstrate the beneficial effect of the extract tested calystégines. The administration of this extract showed an antihyperglycemic effect and an anti-diabetic effect confirmed by the regeneration of islets of Langerhans highlighted by the results of the histological sections of the pancreas.

Keywords: anti-diabetic activity, *Hyoscyamus albus*, Streptozotocin, calystegines, hyperglycaemia.