



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Etude la toxicité sub-aigüe et de l'activité antidiabétique des calystégines de *Hyoscyamus albus*

Présenté par :

Melle SAHLI SABRINA et Melle SAIDI FAIZA

Composition du jury

Mme KARA S.	MAA, UAMB	Présidente
Mme BEDJOU F.	Professeur, UAMB	Encadreur
Mme OUAHMED H.	MAA, UAMB	Examinatrice

Année Universitaire : **2015/2016**

Remerciements

Le premier remerciement va à ALLAH SOBHANAHOU WA TAALA pour la force qu'il nous a donnée afin de réaliser ce modeste travail.

Nous tenons aussi à remercier notre promotrice Pr. BEDJOU Fatiha pour sa contribution générale, sa disponibilité et sa gentillesse pour effectuer ce travail.

Nos vifs remerciements vont à M^{elle} BOUREBABA Lynda pour son attention, sa patience et sa générosité scientifique.

Nous adressons aussi nos remerciements au Dr.CHEBOUT I. maître assistant hospitalo-universitaire en anatomie pathologie au CHU de Béjaïa

Puis, nous remercions chaleureusement les techniciennes du laboratoire de médecine palier anatomie-pathologie d'Aboudaw : HAKIMA, LOUIZA et LYNDA pour leur aide et leur gentillesse.

Comme Nous remerciant tous le personnel de l'animalerie : SAIDA, SAMIA et HABIBA pour leur aide précieuse.

Nos profonds remerciements pour les membres de jury qui ont accepté d'évaluer ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chères parents pour tous leurs encouragements leurs conseils, leurs sacrifices et l'aide qu'ils m'ont offert durant mon cursus étudiantin.

Ma sœur SAMIRA et mon frère RABAH pour leurs présences, et leur grand soutien ainsi que pour leurs encouragements.

La mémoire de mon frère KARIM, Qu'Allah l'accueille dans son vaste paradis.

Tous mes oncles et tantes pour leur soutien moral et leurs instructions constructives.

Mes chère cousines qui m'ont soutenue durant ce mémoire spécialement LOULA

Ma chère amie et collègue FAIZA ainsi que sa famille.

Mes chères amis et à toute la promotion biochimie appliquée 2016.

SABRINA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de mes chères parents pour tous leurs encouragements leurs conseils, leurs sacrifices et aides qu'ils m'ont offert durant mon cursus étudiantin. Qu'Allah les accueille dans son vaste paradis.

Ma fierté et unique sœur SOUAD, que je remercie pour sa présence, son grand soutien ainsi que pour ses encouragements. Je lui souhaite la réussite.

A ma chère grande mère pour ses prières, que dieu te garde pour nous inshallah

Tous mes oncles et tantes pour leur soutien moral et leurs instructions constructives.

Mes chère cousins et cousines qui m'ont aidé pour réaliser ce mémoire.

Ma chère amie et collègue Sabrina ainsi que sa famille.

Mes chères amis et à toute la promotion biochimie appliquée 2016.

FAIZA

Liste Des Abréviations

AGL: Acide Gras Libre

AMPK : AMP-Activated Protein Kinase

CC : Corps Cétonique

D-AB1: 1, 4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Arabinitol

DID: Diabète Insulino- Dependat

DNID: Diabète Non Insulino- Dependat

EXT2 : Exostosin Glycosyltransferase 2

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GLUT 4: Glucose Transporter Type 4

HHEX : Hematopoietically-Expressed Homeobox

HLA: Human Leukocyte Antigen

HMG-COA: 3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl-Coenzyme A

IMC: Indice De Masse Corporelle

KOH: Hydroxyde De Potassium

LSD 4: Least Significant Difference 4

SEM: Standard Error of the Mean

SLC30A8 : Solute Carrier Family 30 (Zinc Transporter), Member 8

TCF7L2 : Transcription Factor 7-Like 2

UI: Unité Internationale

Znt8: Zinc Transporter 8

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la streptozotocine.....	6
Figure 2 : Structure chimique de l'Alloxane.....	7
Figure 03: <i>Hyoscyamus albus</i>	8
Figure 4 : structures de différents types de calystegines	10
Figure 5 : <i>Hyoscyamus albus</i> (photo prise sur le terrain) A :partie aérienne ;B :graines.....	12
Figure 6 : Elevage des souris et administration de l'extrait de <i>H. albus</i> par gavage	14
Figure 7 : A) recolte du sang, B) fixation de la souris, C) dissection de la souris	15
Figure 8 : Injection de l'alloxane dans la cavité intra-péritonéale	16
Figure 9 : Mesure de la glycémie (le glucomètre utilisé : One Call Plus®).....	17
Figure 10 : variation du poids corporel des souris mal (A) et femelle (B) durant le test de la toxicité sub-aiguë.	20
Figure 11 : évolution de la quantité de nourriture consommée par les males (A) et par les femelles (B)	20
Figure 12 : évaluation des poids des organes des males (A) et des femelles (B) après sacrifice des souris du test de toxicité.....	21
Figure 13 : Photomicrographies des foies à un grossissement x 100. A : souris control ; B : souris traitées avec 50 mg/kg ; C : souris traitées avec 10 mg/kg ; D : souris traitées avec 100 mg/kg.....	24
Figure 14 : Photomicrographies des reins à un grossissement x 100. A : souris contrôle ; B : souris traitées avec 10mg; C : souris traitées avec 100mg ; D : souris traitées avec 50mg.	25
Figure 15 : Photomicrographies de l'intestin à un grossissement x 400. A : souris control ; B : souris traitées avec 50mg ; C : souris traitées avec 10mg ; D : souris traitées avec 100mg.....	26
Figure 16 : Photomicrographies des pancréas. A: souris saine ; B : souris diabétique control ; C : souris traitées avec 10mg; D: souris traitées avec 20mg.....	28
Figure 17 : : Effet des calystégines sur la glycémie de souris diabétiques ayant reçu une dose de 2g/kg de glucose.....	29

Figure 18 : Histogramme démontrant le taux du glycogène hépatique chez différents lots ...31

Figure 19 : Courbe d'étalonnage du glucose.....31

Liste des tableaux

Tableau I : Taxonomie de <i>Hyosyamus ablus</i>	9
Tableau II : Nombre de mortalité des souris après 28 jours de traitement.....	19
Tableau III : Résultats du dosage des enzymes hépatiques.....	22
Tableau IV : Dosage des paramètres rénaux.....	23
Tableau V : Pourcentages des souris devenues diabétiques durant le test prophylactique	27
Tableau VI: Nombre d'îlots de Langerhans chez les souris diabétique.....	28

Table Des Matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1- Le diabète	2
I.1.1-Définition.....	2
I.1.2- Symptômes du diabète.....	2
I.1.3- Facteurs de risque du diabète.....	2
I.1.3.1- Pour le diabète de type 1.....	2
I.1.3.2- Pour le diabète de type 2.....	3
I.1.4- Impact des statines sur le développement du diabète.....	3
I.1.5- Stockage hépatique du glucose et diabète	4
I.1.6- Traitement du diabète	5
I.1.6.1- Les antidiabétiques oraux	5
I.1.6.2- L'insulinothérapie	5
I.1.6.3- Phytothérapie du diabète	5
I.1.7- Induction du diabète	5
I.1.7.1- La streptozotocine.....	6
I.1.7.2- L'alloxane.....	6
I.2- <i>Hyoscyamus albus</i>	8
I.2.1- Les solanacées	8
I.2.2- <i>Hyoscyamus albus</i>	8
I.2.1- Classification botanique de <i>Hyocyanus albus</i>	9
I.2.2-Les alcaloïdes retrouvés dans <i>Hyoscyamus albus</i>	9

I.2.4- Les activités thérapeutiques de <i>Hyoscyamus albus</i>	11
I.2.4.1- Activité antipyrétique	11
I.2.4.2- Activité analgésique	11
I.2.4.3- Activité antibactérienne	11

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1-Matériel	12
II.1.1-Le matériel végétal	12
II.1.2-Conditions d'élevage	12
II. 2 Méthodes	13
II.2.1- Préparation de l'extrait brut des graines de <i>Hyoscyamus albus</i>	13
II.2.2- Purification des calystegines totaux	13
II.2.2.1- Purification sur colonne échangeuse de cations Amberlite IR 120B, H ⁺	13
II.2.2.2- Purification sur colonne Dowex 1X2, CL ⁻	13
II.3- Test de toxicité sub-aigüe des calystegines totaux	13
II.3.1- Principe du test	13
II.2.3.2- Répartition et traitement des animaux	14
II.2.3.3- Suivi des animaux mis en expérience	14
II.4- Activité antidiabétique	15
II.4.1- Effet prophylactique sur le diabète induit par l'alloxane monohydrate	15
II.4.1.1- Le principe du test	15
II.4.1.2- Répartition et traitement des lots	16
II.4.2- Test de tolérance au glucose	16
II.4.2.1- Principe du test	16
II.4.2.2- La répartition et le traitement des souris	17
II.4.3- Effet sur le stockage du glycogène hépatique	17
II.4.3.1- Principe du test	17
II.4.3.2- La répartition et le traitement des souris	18

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- Evaluation de la toxicité sub-aiguë	19
III.1.1- Suivi de la mortalité	19
III.1.2- Evolution pondérale	19
III.1.3- Evolution de la consommation de nourriture.....	20
III.1.4- Evaluation des poids des organes	21
III.1.5- Dosage biochimiques	22
III.1.5.1- Bilan hépatique	22
III.1.5.2- Bilan rénal.....	23
III.1.6- Etude histopathologique.....	24
III.1.6.1- Histologie hépatique	24
III.1.6.2- Histologie rénale	25
III.1.6.3- Histologie intestinale	25
III.2- Evaluation de l'activité antidiabétique.....	27
III.2.1- Effet prophylactique.....	27
III.2.2- Test de tolérance au glucose	29
III.2.3- Effet des calystegines sur le stockage du glycogène hépatique	31
Conclusion et perspectives.....	33
Références bibliographiques.....	34
Annexes	

Le diabète constitue un véritable problème de santé publique. On compte environ 10 à 15 % de la population atteinte d'un diabète de type 1. Par contre, le diabète de type 2, apparaît généralement vers la quarantaine et représente 85 à 90 % des cas diabétiques (**Doupa et al., 2014**).

L'évolution de la biologie moléculaire a permis d'améliorer l'effet de la pharmacothérapie dans le traitement du diabète en associant la prise médicamenteuse à une hygiène alimentaire. (**Guillausseau et Laloi-Michelin, 2003**).

Comme autre alternative du traitement des maladies par la chimiothérapie, l'utilisation des plantes médicinales ou ce qu'on appelle la phytothérapie est en grande évolution, en raison de l'existence de métabolites secondaires dotés d'un pouvoir pharmacologique utilisable pour le traitement de diverses maladies chroniques comme le diabète (**Marles et Farnsworth, 1995**).

L'utilisation de ces métabolites secondaires à des fins curatives n'est pas dépourvue d'effets indésirables. Pour cela des études permettant de déterminer la dose efficace non toxique sont indispensables.

Hyoscyamus albus est une plante médicinale appartenant à la famille des Solanaceae réputée pour son pouvoir analgésique, antipyrétique et antibactérien. (**Goullé et al., 2004**). Comme toutes les plantes, *H. albus* est riche en métabolites primaires et secondaires. Parmi ces derniers on trouve les calystéginés qui sont des alcaloïdes nortropaniques polyhydroxylés.

Ainsi, l'objectif de ce travail est la mise en évidence de l'influence des calystéginés sur le traitement du diabète *In-vivo* sur un modèle animal qui est la souris albinos. Pour ce faire, un test de toxicité sub-aigue de 28 jours sera réalisé ; par la suite, l'effet antidiabétique des calystéginés sera recherché par l'investigation de l'activité antihyperglycémiant dans le cas d'une hyperglycémie expérimentale afin de mettre en évidence la tolérance au glucose par les tissus périphériques des souris traitées ainsi que leur effet sur le stockage du glycogène hépatique. Une étude de leur action protectrice du pancréas contre les effets induits par l'alloxane sera également envisagée afin de déterminer un éventuel effet prophylactique et donc préventif.

I.1- Le diabète**I.1.1-Définition**

Le diabète sucré est une maladie endocrinienne caractérisée par une élévation de la concentration de glucose dans le sang (> 1.26g/l). Le diabète résulte d'une diminution de la production d'insuline ou d'une résistance anormale à cette hormone qui entraîne une hausse du taux de glucose dans le sang (Cox, 2009).

On distingue deux sortes de diabètes selon son origine physiopathologique. La première résulte de la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans, par les anticorps et les cellules immunitaires, empêchant ainsi l'entrée du glucose dans les cellules aboutissant à un **diabète de type 1 également appelé insulino-dépendant ou DID**. La deuxième physiopathologie est représentée par une insulino-pénie ou une insulino-résistance qui provoquent le **diabète de type 2** autrement appelé **diabète non insulino-dépendant ou DNID** (Guillausseau et Laloi-Michelin, 2003).

I.1.2- Symptômes du diabète

Le diabète est caractérisé par plusieurs symptômes avec essentiellement (Abdulfatai et al., 2012 ; Racciah, 2004)

- Une chute brutale du poids corporel,
- Une asthénie
- Une sensation de faim intense,
- Une polydipsie qui entraîne une polyurie.

I.1.3- Facteurs de risque du diabète**I.1.3.1- Diabète de type 1**

La destruction des cellules bêta de langerhans pourrait s'expliquer par la présence d'une prédisposition génétique ou par l'influence de quelques facteurs environnementaux (Ransom, 2013).

L'apparition de la réaction auto-immune qui mène à la destruction des cellules bêta des îlots de langerhans serait liée à l'association de gènes de prédisposition et de facteurs

environnementaux. Les variants génétiques associés à cette forme de diabète sont multiples. Le plus important d'entre eux, identifié à ce jour, est localisé dans le système HLA (**Grimaud, 2000**).

Certains facteurs environnementaux tels que les virus et les facteurs nutritionnels (Exp: administration du lait de vache) seraient aussi la cause de cette réaction auto-immune (**Grimaud, 2000**).

I.1.3.2- Diabète de type 2

L'apparition de ce type de diabète est la conséquence de certains facteurs ou de la combinaison de plusieurs de ces facteurs (**Virally et al., 2007**). Parmi eux : Les facteurs génétiques qui ont un impact important dans l'apparition du diabète de type 2. Ce type de diabète se développe suite à plusieurs aberrations génétiques. Ces défauts peuvent être différents d'un cas à un autre Des chercheurs ont découvert quatre gènes qui peuvent être la cause de l'apparition du diabète non insulino-dépendant : TCF7L2, HHEX, EXT2 et SLC30A8 (**Sladek et al., 2007**).

Ces gènes sont tous exprimés dans le pancréas, où ils exercent leur activité de production de molécules essentielles pour le bon fonctionnement de cet organe. De plus ils ont un rôle dans la synthèse et la sécrétion d'insuline. Par exemple : le gène SLC30A8 produit la protéine ZnT8 qui participe au transport du zinc, ce dernier permet la fixation des molécules d'insuline dans le pancréas (**Sladek et al., 2007**).

I.1.4- Impact des statines sur le développement du diabète :

Certains médicaments pourraient engendrer le diabète suite à leurs effets secondaires. Une étude réalisée sur les statines a démontré que la prise de poids corporel (qui est l'un de ses effets secondaires et en même temps un facteur de risque du diabète) est la conséquence de l'inhibition de l'expression des gènes codant pour le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase par ces statines, conduisant à l'apparition d'une insulino-résistance (**Swerdlow, 2015**).

D'autres chercheurs ont émis la théorie que l'inhibition du HMG-CoA réductase pourrait influencer directement le développement du DNID mais aucun résultat ne confirme cette théorie (**Swerdlow, 2015**).

- **Autres facteurs de risque**

Les autres facteurs de risque impliqués dans le développement du diabète sont : l'âge, l'indice de masse corporel (IMC), les antécédents familiaux de diabète, des antécédents personnels de diabète gestationnel, l'hypertension artérielle et l'obésité (**Malek et al., 2013**).

I.1.5- Stockage hépatique du glucose et diabète :

Tous les tissus peuvent utiliser le glucose pour leurs fonctions. Certains utilisent d'autres sources d'énergie comme substrat alternatif ou préférentiel tels que les acides gras libres (AGL) et les corps cétoniques (CC). A l'état nourri, les besoins énergétiques de l'organisme sont couverts par l'apport exogène en glucose. L'organisme l'utilise immédiatement ou le met en réserve (**Jun et al., 2015**).

Le maintien de la glycémie normal nécessite des voies métaboliques qui permettent le stockage ou la libération des substrats énergétiques (**Jun et al., 2015**).Celles-ci nécessitent un contrôle hormonal qui est assuré par des hormones spécifiques. On doit souligner le rôle essentiel de l'insuline, hormone de l'état nourri, et du glucagon, hormone du jeun (**Bu-Abbas et al., 1995**). Une fois que l'insuline est dans la circulation sanguine, elle va initier des voies biologiques au niveau des tissus cibles qui sont le foie, le tissu adipeux, le muscle cardiaque et le muscle squelettique (**Buyschaert et al., 1999**).Au niveau du foie, l'insuline stimule le stockage du glucose en glycogène et inhibe l'hydrolyse du glycogène en glucose, empêchant ainsi la libération du glucose au niveau sanguin (**Jun et al., 2015**).

Chez un sujet diabétique, l'absence d'insuline ou sa présence à faible concentration, mène à une utilisation et une production du glucose endogène non corrélée au sein du foie. Cette absence inhibe la synthèse du glycogène qui est la cause d'une élévation anormale de la glycémie. Des études réalisées sur certains métabolites secondaires issus de plantes ont pu démontrer que ces molécules avaient la capacité de stimuler de manière directe la synthèse du glycogène sans faire appel à l'insuline (**Eddouks et al.,2003**).

Ces résultats ouvrent donc le champ à la recherche de molécules pouvant promouvoir le stockage du glucose en cas d'insuffisance de production ou d'absence d'insuline.

I.1.6- Traitement du diabète

Le traitement du diabète se fait généralement par la réduction du poids, le suivi d'un régime alimentaire et la pratique du sport. Mais ces derniers ne sont pas en mesure de corriger les problèmes impliqués lors de la pathogenèse du diabète. Pour cela il est nécessaire de faire appel à certaines molécules thérapeutiques pour préserver la fonction des cellules bêta et pour prévenir les complications du diabète (**Doupa et al.,2014**).

I.1.6.1- Les antidiabétiques oraux :

Parmi ces molécules on peut citer :

- **Les sulfonylurées** : font partie de la plus ancienne classe d'agents antidiabétiques oraux. Ils se fixent sur les récepteurs du sulfonylurée lié à l'unité protéique du canal K^+ ce qui provoque une exocytose de l'insuline (**Charpentier et al., 2000**).
- **Les repaglinides** : leur mécanisme d'action est le même que celui des sulfonylurées. L'effet des repaglinides sur la sécrétion d'insuline semble être glucose dépendante contrairement aux sulfonylurées. leur avantage est un léger gain de poids (**Snyder et Berns, 2004**).

I.1.6.2- L'insulinothérapie :

L'insulinothérapie est utilisée pour imiter le rôle de l'insuline dans les conditions physiologiques anormales. Le profil pharmacocinétique des molécules analogues à l'insuline est différent de celui des molécules d'insuline d'origine ce qui leur confère une durée d'action rapide ou prolongée (**Grimaldi, 2000**).

I.1.6.3- Phytothérapie du diabète :

Certaines plantes sont employées en médecine traditionnelle surtout en Europe pour leur effet sur le diabète. Parmi ces plantes on cite : *Ephédra* ; *Poterium spinosum* (**Goetz, 2007**) *Momordica charantia*, *Anacardium occidentale* (**Marles et Farnsworth, 1995**).

I.1.7- Induction du diabète

Afin de trouver des solutions pour le traitement du diabète, il est nécessaire d'avoir des modèles expérimentaux pour l'induction du diabète (**Szkudelski, 2001**). Il existe plusieurs méthodes pour induire le diabète expérimentalement, on peut citer : Des méthodes chirurgicales (pancréatectomie), par un régime alimentaire (repas riche en sucres), ou par des

méthodes chimiques en utilisant des agents diabétogènes tels que la streptozotocine ou encore l'alloxane (Szkudelski, 2001).

I.1.7.1- La streptozotocine :

La streptozotocine ou l'izostazin est un antibiotique et un anti tumorale obtenue à partir d'un bouillon fermentaire de *streptomyces achromogenes*. Elle est utilisée comme un agent chimio thérapeutique du cancer. L'une de ses propriétés est qu'elle est sélectivement cytotoxique pour la cellule bêta de Langerhans par conséquent elle provoque un diabète (Figure 1) (Szkudelski, 2001).

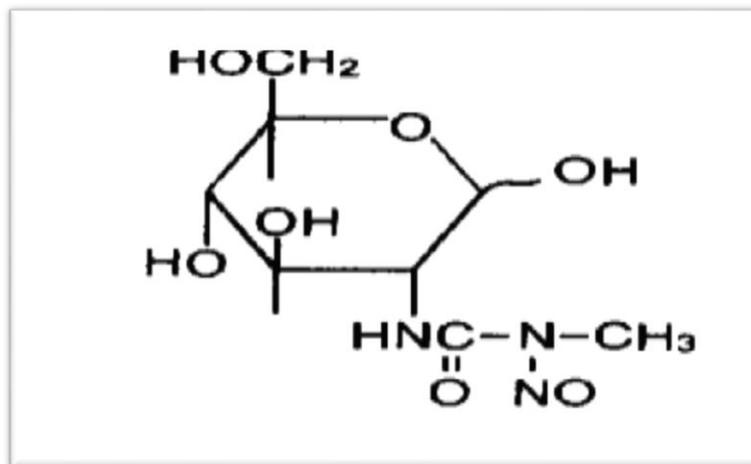


Figure 1 : Structure de la streptozotocine (Hashemi et al., 2009).

➤ Mécanisme d'action :

La streptozotocine est piégée par les récepteurs GLUT 2 des ilots de Langerhans. Une fois dans le pancréas, son pouvoir alkylant de l'ADN se déclenche, elle génère ainsi des espèces réactives de l'oxygène responsables de nombreux dégâts dont on peut énumérer la chute de l'ATP qui mène à la mort des cellules bêta pancréatiques (Szkudelski, 2001).

I.1.7.2- L'alloxane :

Une autre méthode chimique pour induire le diabète est l'utilisation de l'Alloxane qui est un composé organique dérivé de l'acide urique. Il possède une grande affinité pour l'eau existant sous forme monohydratée (Figure 2) (Lenzen, 2008).

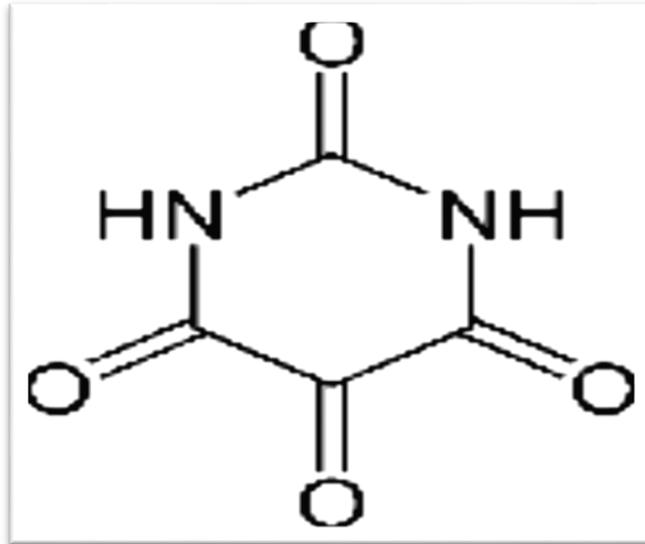


Figure 2 : Structure chimique de l'Alloxane (Lenzen, 2008).

➤ Mécanisme d'action :

L'injection de l'Alloxane par voie intra péritonéale (125 mg/Kg de poids) déclenche un diabète chez le rat (Diatewa *et al.*, 2004). Ce diabète résulte d'une nécrose de la cellule bêta du pancréas donnant ainsi une déficience insulinique chronique. Cette nécrose est due au produit de réduction de l'alloxane qui est l'acide diallurique ce dernier génère des espèces réactives de l'oxygène et provoque l'accumulation du calcium dans le cytosol (Wattiez, 2012).

I.2- *Hyoscyamus albus***I.2.1- Les solanacées**

La famille des solanacées notamment nommée les «blêmes» ou les «tristes» en raison des feuilles qui ont un aspect tombant avec des couleurs assez ternes (Spichiger et al., 2004). Elles sont retrouvées dans les zones tempérées et froides dans le monde entier. Ce sont des arbustes parfois grimpants, avec des feuilles alternes, simples, entières ou dentées (Spichiger et al., 2004). Les plantes de cette famille sont considérées comme étant toxiques, car elles sont riches en alcaloïdes tropaniques qui sont dotés d'activité hallucinogène et antispasmodique notamment dans le genre *Atropa* (Goullé et al., 2004).

I.2.2- *Hyoscyamus albus*

Parmi les diverses espèces de solanacées on trouve *Hyoscyamus albus* (Figure 3) connue aussi sous le nom de la jusquiame blanche. C'est une variété annuelle ou bisannuelle, de hauteur pouvant atteindre les 90 cm avec un port dressé, et des feuilles de couleur vert clair, larges, ovales, collantes de 5 à 10 cm de long. 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 est une capsule fermée par un opercule, qui renferme des centaines de graines à surface réticulée (Hammiche et al., 2013).



Figure 03: *Hyoscyamus albus* (Reynaud, 2002).

I.2.1- Classification botanique de *Hyocyamus albus* :

La classification botanique de *Hyocyamus albus* est présentée dans le tableau N I.

Tableau I : Taxonomie de *Hyosyamus ablus* (Quézel et Santa, 1963).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous Classe	Magnoliidae
Ordre	Solanales
Famille	Solanaceae
Genre	<i>Hyocyamus</i>
Espèce	<i>Hyocyamus albus</i>

I.2.2- Les alcaloïdes retrouvés dans *Hyosyamus albus* :

Des recherches récentes ont démontré qu'il existe une grande variété d'alcaloïdes tropaniques dans toutes les parties de cette plante. On peut citer :

La scopolamine ; l'atropine ; l'hyoscyamine qui possèdent des propriétés thérapeutiques.

Les calystegines sont une autre classe d'alcaloïdes tropaniques extraits pour la première fois de la plante *Calystegia sepium*, puis par la suite à partir des solanaceae. Ils sont aussi dotés de plusieurs activités thérapeutiques (Stegelmeier et al., 2008).

Les calystegines dérivent des polyhydroxyles heterocycliques. Ce sont des produits naturels capables d'inhiber compétitivement plusieurs glycosidases grâce à la présence du groupement

OH du carbone 2. Ils sont synthétisés à partir de la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Scholl et al., 2003).

Le point de départ de cette voie semble être la tropinone qui elle-même est issue de la putrescine. La voie de biosynthèse des calystegines n'est pas bien élucidée à ce jour. Elle comporte des réactions d'oxydations spécifiques pour donner la fonction hémiaminalique et une déméthylation pour accéder à leur squelette (scholl et al., 2003).

La distribution des calystégines et leur teneur a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) au sein des plantes suivantes : *Datura metel*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus albus*, *Mandragora autumnalis*, *Solanum sodomaeum*, *Withania somnifera*, *frutescens Withania* et *Brunfelsia nitida*. Huit sortes de calystegines ont été mises en évidence : A3, A5, B1, B2, B3, B4, C1 et N1 (Figure 4) (Bekkouche, 2001).

Dans le genre *Hyocyanus albus*, le rendement des calystegine au niveau des feuilles atteint approximativement 0.32% ; au niveau des fleurs il est de 0.27% et au niveau des graines il est plus important et atteint les 0.53% (Biastoff et Drager, 2007).

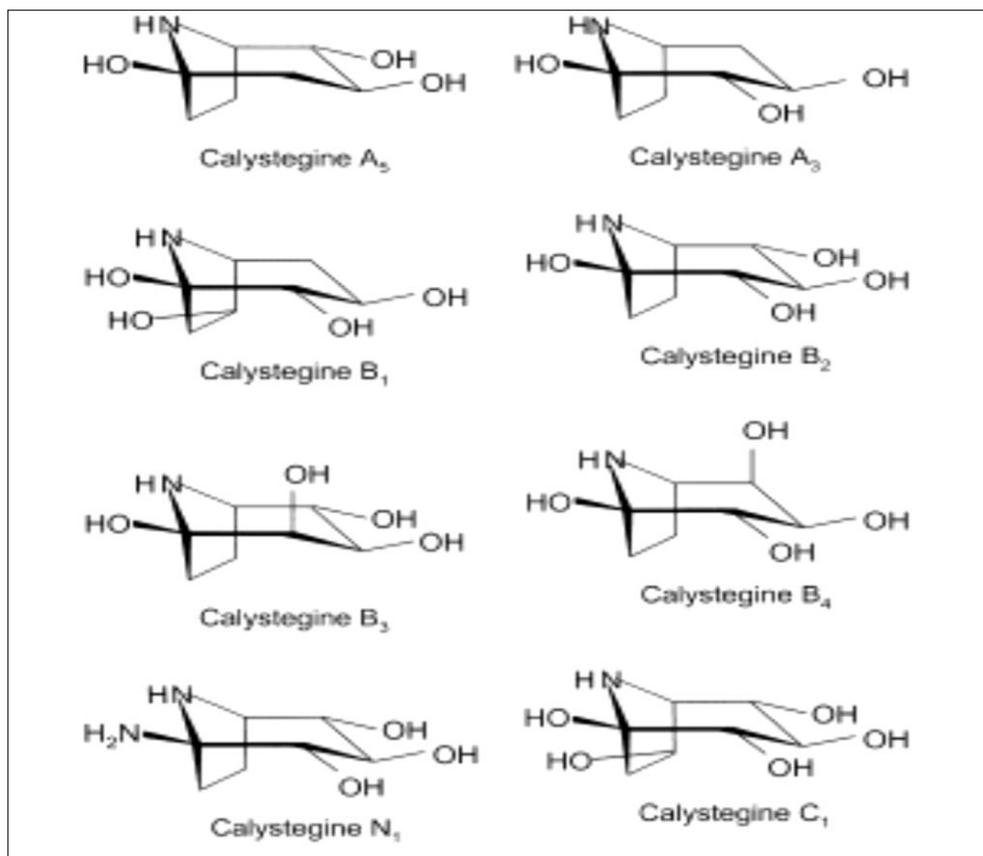


Figure 4 : structures de différents types de calystegines (Bekkouche, 2001).

I.2.4- Les activités thérapeutiques de *Hyoscyamus albus* :

Hyoscyamus albus est une des plantes médicinales qui est utilisée pour ses divers effets thérapeutiques (Goullé, 2004).

I.2.4.1- Activité antipyrétique :

L'extrait méthanolique des feuilles de *Hyoscyamus albus* exerce une activité inhibitrice des prostaglandines au niveau de l'hypothalamus ce dernier est le centre de la thermorégulation (Benhouda et Yahia, 2014).

I.2.4.2- Activité analgésique :

Cette activité pourrait être due à une action synergique de certains composants de la jusquiame blanche tels que les saponines, les alcaloïdes, les tanins condensés et les flavonoïdes (Benhouda et Yahia, 2014).

I.2.4.3- Activité antibactérienne :

La richesse de *Hyoscyamus albus* en ces métabolites lui confère une activité antibactérienne qui peut être due à l'association de chacune des actions des alcaloïdes et des polyphénols.

L'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être due à leur capacité à se complexer aux protéines extracellulaires de la paroi bactérienne (Benhouda et Yahia, 2014).

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ce travail a pour but d'étudier l'activité antidiabétique des calystégines extraites des graines de *Hyoscyamus albus*, ainsi que la toxicité pouvant être engendrée durant son administration.

II.1-Matériel**II.1.1-le matériel végétal**

Dans notre étude l'utilisation d'un extrait préalablement préparé a été faite, sa préparation a été faite comme suit :

Les graines de *Hyoscyamus albus* (Figure 5) ont été récoltées au mois d'août 2015 dans la wilaya de Tizi-Ouazou puis séchées à l'étuve pendant 48 h à 40°C. Les graines ont ensuite été broyées à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a été conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés à l'obscurité et à l'abri de l'humidité.

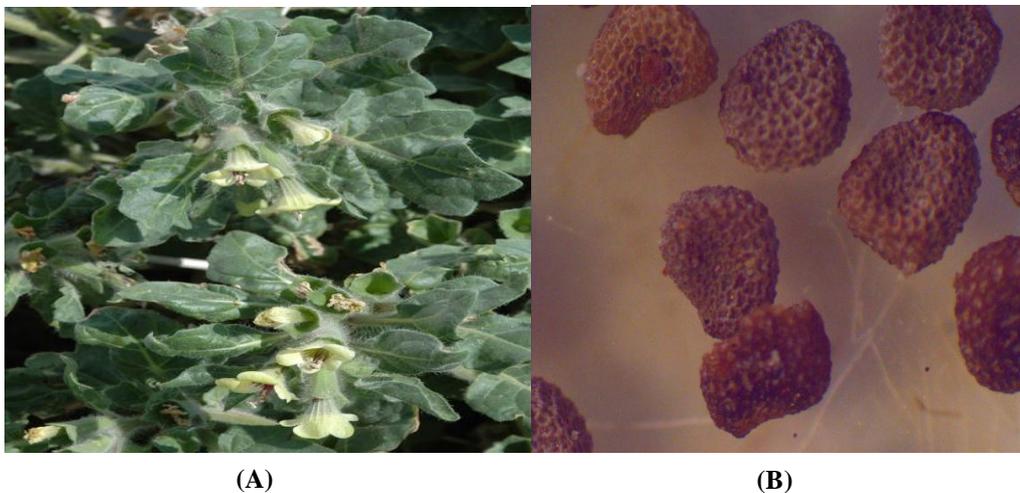


Figure 5 : *Hyoscyamus albus* (Photo prise sur le terrain). (A) : Partie aérienne, (B) : Graines

II.1.2- conditions d'élevage

Des souris mâles et femelles albinos SWISS avec un poids allant de 25 à 30g obtenus auprès de la faculté de médecine de l'université de Constantine ont été utilisées. Ces souris ont été élevées dans des cages standards à température ambiante avec libre accès à l'eau du robinet et à la nourriture en bouchon et soumises à un cycle lumineux jour/nuit.

II. 2 Méthodes

II.2.1- Préparation de l'extrait brut des graines de *Hyoscyamus albus*

La connaissance des caractères hydrosolubles des calystegines a permis d'opter pour la méthode décrite par **Bekouche et al., 2001** pour leur extraction.

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 dans un mélange de méthanol/eau avec un rapport de (50/50 ; v/v).

Après filtration des trois macéras à l'aide d'un papier filtre wattman, ces derniers ont été évaporés dans une étuve à une température de 40°C pendant 48h.

II.2.2- Purification des calystegines totaux

II.2.2.1- Purification sur colonne échangeuse de cations Amberlite IR 120B, H⁺

Un volume de 0.5ml d'extrait brut a été déposé sur la résine, après une heure la colonne a été rincée avec 200ml d'eau distillée pour pouvoir éliminer les autres contaminants, et l'élution a été faite avec 300ml de NH₄OH à 4N, l'éluat ainsi obtenu a été mis à sécher à l'étuve pendant 24heures.

II.2.2.2- Purification sur colonne Dowex 1X2, CL⁻

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

L'éluat qui en résulte a été filtré puis séché à l'étuve à 40°C pendant 24heures.

II.3- Test de toxicité subaigüe des calystéginés totaux

II.3.1- Principe du test

Ce test consiste en l'administration quotidienne d'une dose unique, d'un composé donné, pendant une période d'exposition de 28 jours, sur un modèle animal le plus souvent la souris ou le rat de laboratoire. Ces derniers sont dès lors observés chaque jour, au cours de la période d'essai, afin de déceler tout signe éventuel de toxicité ; les animaux qui meurent au cours du

test sont autopsiés et, au terme de l'essai, tous les survivants sont euthanasiés puis à leur tour autopsiés (OCDE, 2008).

II.2.3.2- Répartition et traitement des animaux :

Des souris mâles et femelles ont été réparties dans des lots de 5 souris chacun (Figure 4) comme suit :

- ✓ Lot: ayant reçu des Calystégines – 10mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu des Calystégines – 50mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu des Calystégines – 100mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu de l'eau physiologique.

Les doses de calystégines ont été préparées quotidiennement dans de l'eau physiologique puis administrées à raison de 0.5ml de solution par souris, par gavage intra-gastrique à l'aide d'une sonde de gavage (Figure 6).



Figure 6 : Elevage des souris et administration de l'extrait de *H. albus* par gavage

II.2.3.3- suivi des animaux mis en expérience

Le premier paramètre qui a été pris en compte est la mortalité des souris traitées, accompagné d'une évaluation de la consommation alimentaire quotidienne durant tout le test. Ainsi Les animaux testés ont été examinés et observés quotidiennement pour la détermination d'éventuels signes d'intoxications : Tremblements, somnolence, vomissements, diarrhée, perte du pelage, changement de la couleur du pelage, gêne respiratoire, convulsions,

salivations, perte de poids, apparition de déformations ou d'anomalies quelconques (œdème, kyste...) selon l'OCDE Guide N °407.

A la fin du test (le 29^{ème} jour), tous les animaux ont été anesthésié puis sacrifié (à jeun), le sang a été recueilli pour la réalisation d'un bilan hépatique et rénal (**Annexe 1**) et une dissection minutieuse de chaque animal a été réalisée (Figure 7) où une observation de l'anatomie générale et une pesée des organes internes ont été effectués. Le foie, les reins, les intestins, de trois souris choisies aléatoirement dans chaque lot, ont été récupérés pour une étude histopathologique (**Annexe 2**).

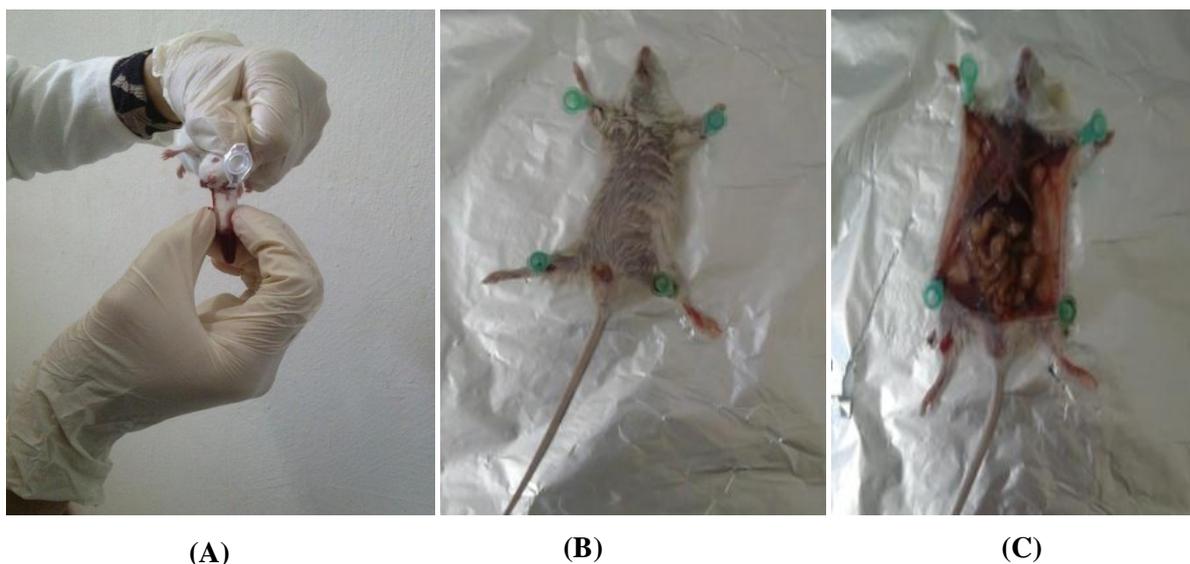


Figure 7 : (A) récolte du sang, (B) fixation de la souris, (C) dissection de la souris

II.4- Activité antidiabétique

II.4.1- Effet prophylactique sur le diabète induit par l'alloxane monohydrate

II.4.1.1- Principe du test :

Ce test est basé sur l'étude de la capacité d'une substance administrée quotidiennement, durant une période déterminée a prémunir l'apparition, la propagation, l'aggravation ou encore le degré d'incidence d'un diabète, induit expérimentalement sur un modèle animal (Nath Singh *et al.*, 2001).

II.4.1.2- Répartition et traitement des lots

Les souris ont été réparties dans des lots de 6 souris chacun en :

- ✓ Lot: ayant reçu les Calystégines – 10mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu les Calystégines – 20mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu le Glibenclamide – 20mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu l'Eau physiologique

Après répartition des souris saines dans chacun des lots respectifs, une administration quotidienne du traitement relatif à chaque lot a été réalisée et ce pendant une durée de 30 jours. Au 31^{ème} jour, les souris ont été pesées à jeun, les glycémies de tous les individus sont mesurées pour s'assurer de l'état de santé des animaux. Une solution d'Alloxane monohydrate à 120mg/kg, préparée dans de l'eau physiologique, a été injectée dans la cavité intrapéritonéale des souris des lots concernés (Figure 8). 72 heures plus tard, la glycémie de chaque souris du test a été mesurée à l'aide d'un glucomètre (Figure 9). Les pourcentages de l'incidence d'une hyperglycémie ont été calculés pour chaque lot. Dans le but de visualiser l'effet protecteur ou minimisant des alcaloïdes sur les dommages, causés par l'alloxane, les pancréas des souris, devenues diabétiques, ont été prélevés pour une étude histopathologique.



Figure 8 : Injection de l'alloxane dans la cavité intra-péritonéale

II.4.2- Test de tolérance au glucose (OGTT)**II.4.2.1- Principe :**

Le test OGTT est une méthode d'investigation métabolique qui implique des séries de mesures chronométrées du taux de glucose sanguin, avant et après administration d'une dose

massive de glucose, à des souris atteintes de troubles du métabolisme des glucides, et de déficit en insuline et traitées par la substance étudiée (Mshelia et Gadzama, 2003).

II.4.2.2- La répartition et le traitement des souris : (Herrera et al., 2011)

Des souris mâles, préalablement rendues diabétiques par l'alloxane, ont été répartis dans des lots de 5 souris chacun, et traité par différentes doses de calystégines. Le lot témoin traité par de l'eau physiologique :

- ✓ Lot: ayant reçu les Calystégines – 10mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu les Calystégines – 20mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu le Glibenclamide – 20mg/kg
- ✓ Lot: ayant reçu l'eau physiologique

Le traitement relatif à chaque lot a été administré 30 minutes avant l'administration d'une dose unique de glucose à 2g/kg de poids corporel.

La glycémie a été alors mesurée à T = 0, 30, 60, 90 et 120min après traitement en utilisant un glucomètre standard (Figure 9).



Figure 9 : Mesure de la glycémie (le glucomètre utilisé : One Call Plus)

II.4.3- Effet sur le stockage du glycogène hépatique

II.4.3.1- Principe du test :

Ce test se base sur la capacité d'un composé à stimuler la production hépatique du glycogène, après administration à doses répétées, à des souris préalablement rendues diabétiques par injection d'un agent diabétogène comme l'alloxane (Dedier, 1994).

II.4.3.2- La répartition et le traitement des souris :

Les souris ont été réparties dans des lots de 6 individus chacun et ont été traités par différentes doses de calystégines comme suit :

- ✓ Lot : ayant reçu les Calystégines – 10mg/kg
- ✓ Lot : ayant reçu les Calystégines – 20mg/kg
- ✓ Lot : ayant reçu le Glibenclamide – 20mg/kg
- ✓ Lot : Contrôle négatif ayant reçu l'eau physiologique
- ✓ Lot : Contrôle positif ayant reçu l'eau physiologique

Après induction du diabète aux souris, par injection intra-péritonéal d'une dose de 120mg/kg d'alloxane, les différents lots ont reçu leurs traitements relatifs quotidiennement pendant 10 jours. Au 11^{ème} jour, et une heure après administration du dernier traitement une dose unique de 2 g/kg de glucose a été administrée, à tous les animaux du test. Ces derniers ont été alors sacrifiés 3 heures plus tard et les foies ont été récupérés après dissection.

➤ **Extraction du glycogène (Kubrak et al., 2012)**

Trois foies choisis aléatoirement ont été homogénéisés dans du TCA à 10% (1/10, w/v) puis centrifugés à 3000g pendant 7.5min à 21°C pour précipiter les protéines. Le surnageant a été récupéré et l'éthanol lui est additionné (1:3, v/v) puis centrifugé encore une fois à 4500g durant 12min à 21°C pour précipiter le glycogène.

Le précipité de glycogène a été repris dans de l'eau distillée (0.5 :1, v/v) et incubé 20min au bain-marie en présence de KOH à 30%.

➤ **Dosage du glycogène**

500µl de solution glyco-génique finale et 1ml du réactif d'Anthrone à 0.2% préparé dans l'acide sulfurique à 94% a été incubée pendant 10min dans l'eau bouillante.

La Lecture des absorbances a été réalisée à 620nm, après refroidissement des milieux réactionnels. Une courbe d'étalonnage avec du glucose (10, 20, 30,40,50,60 mg/ml) dans les mêmes conditions a été préparé (voir CHAPITRE III).

• **Traitement statistique**

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes ± SEM et les comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel *STATISTICA 5.5* en appliquant le test de Fisher (LSD) où les différences ont été considérées comme significatives à $\alpha = 0.05$.

Le traitement statistique s'est accentué sur la recherche des différences existantes entre différents lots de souris correspondants à chaque test ; ainsi chaque lot testé a été comparé à un contrôle testé dans les mêmes conditions et l'influence de la dose d'extrait a été recherché.

III.1- Evaluation de la toxicité sub-aiguë**III.1.1- Suivi de la mortalité**

L'objectif de ce test est de déterminer le degré de toxicité des calystégines de *Hyoscyamus albus* à différentes doses répétées. L'un des paramètres crucial de cette étude est le monitoring des éventuelles mortalités des individus durant les 28 jours de l'essai. Les résultats sont donc présentés dans le tableau N°II :

Tableau II : Nombre de mortalités des souris après 28 jours de traitement.

Lots	Nombre de mortalités	
	Males	Femelles
10mg/kg	3/5	0/5
50mg/kg	1/5	0/5
100mg/kg	2/5	1/5
Contrôle	0/5	0/5

D'après les résultats obtenus on constate la mort de 2 et 3 souris traitées respectivement par des doses de 100 mg/ kg et 10 mg/kg. Une seule souris est morte dans le cas des femelles traitées par une dose de 100 mg/kg. Néanmoins, l'observation quotidienne et individuelle de chaque individu du test durant les 28 jours n'a révélé l'apparition d'aucun signe particulier d'intoxication tel que des diarrhées, des tremblements ou encore une léthargie.

III.1.2- Evolution pondérale

La présence d'une toxicité s'accompagne souvent d'une perte de poids, pour cela nous avons effectué un suivi de la variation du poids corporel des souris durant toute la période de l'essai. Les résultats sont présentés dans la Figure 10 :

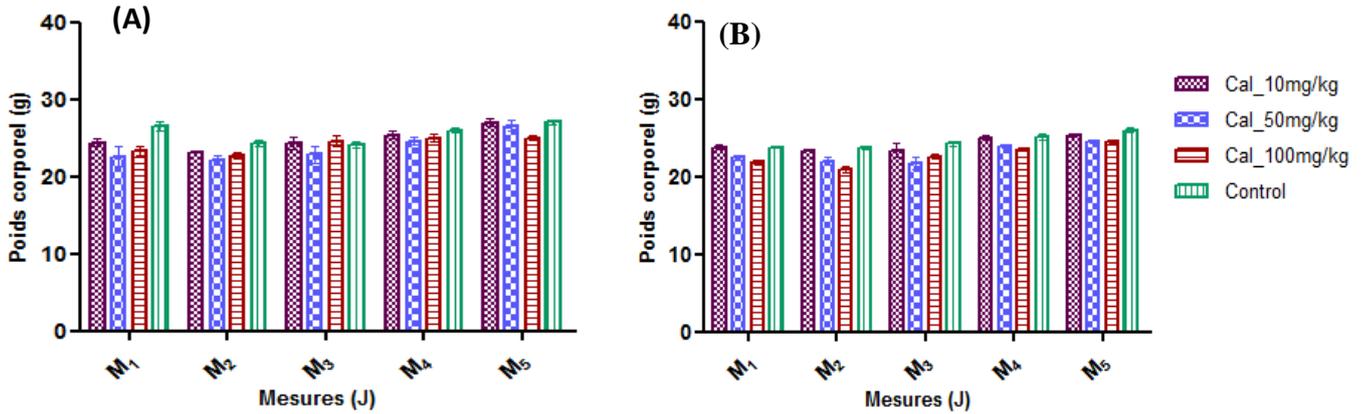


Figure 10 : variation du poids corporel des souris mâles (A) et femelles (B) durant le test de toxicité sub-aiguë.

Une vue générale des histogrammes, des poids des souris mâles et femelles, indique une légère augmentation des poids corporels de tous les lots durant toute la période de l’essai. Cette augmentation concerne même les lots contrôle ayant reçu uniquement de l’eau physiologique, ceci ne semble donc pas être une conséquence de l’administration des calystégines, mais serait plutôt dû à la physiologie même des animaux ainsi qu’aux conditions expérimentales.

III.1.3- Evolution de la consommation de nourriture

La figure 11 représente la quantité de nourriture consommée par les différents lots d’animaux traités durant les 28 jours du test

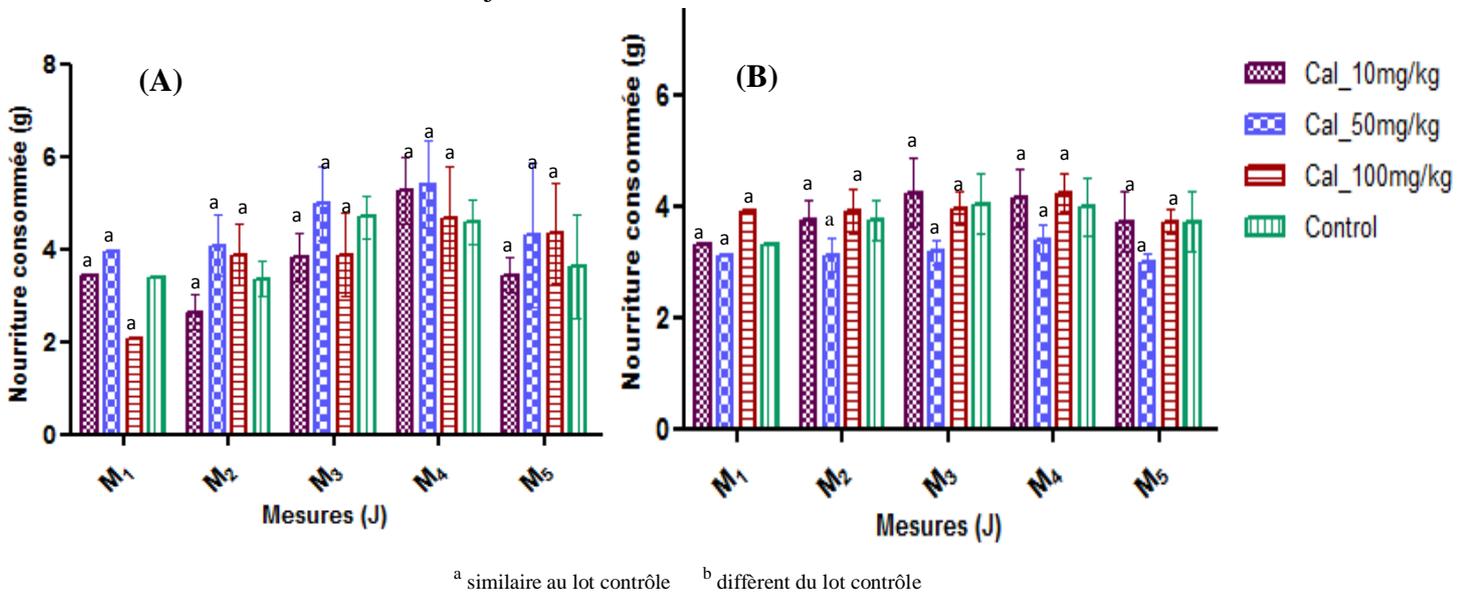


Figure 11 : Evolution de la quantité de nourriture consommée par les mâles (A) et les femelles (B).

Les différentes mesures, de la quantité de nourriture, consommée au cours des 28 jours d'exposition n'ont montré aucune différence significative, de la prise d'aliment entre les lots de souris mâles et femelles et les lots contrôle ($p < 0.05$). Ainsi, l'administration de différentes doses de calystégines à moyen terme, n'induit aucun changement du comportement alimentaire chez la souris.

III.1.4- Evaluation du poids des organes

Le suivi de ce paramètre est important car tout changement du poids d'un organe pourrait être un marqueur de toxicité (Figure 12)

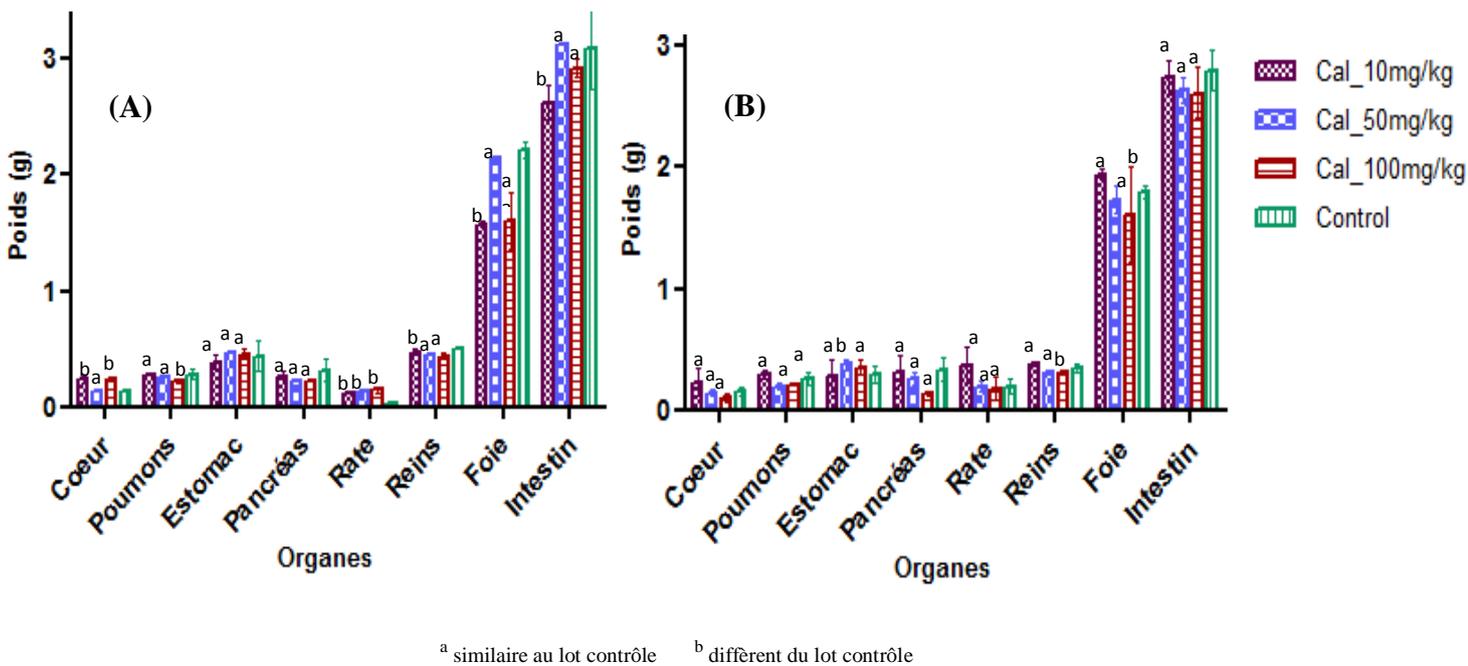


Figure 12 : Evaluation du poids des organes des mâles (A) et des femelles (B) après sacrifice des souris du test de toxicité.

L'analyse du poids des différents organes, prélevés lors de la dissection des animaux traités, a révélé l'existence de différences significatives de la masse du cœur et de la rate, pour les mâles ayant reçu 100mg/kg et 10mg/kg de calystégines ainsi que pour la masse des reins, du foie et de l'intestin pour ce dernier lot ($p < 0.05$). La même tendance est observée chez les souris femelles, où des différences ont été enregistrées concernant le poids du foie et des reins à une dose de 100mg/kg ($p < 0.05$). Les lots traités par 50 mg/kg de calystegines, ont révélé une différence significative de la masse de la rate ainsi que l'estomac chez les mâles et femelles successivement ($p < 0.05$).

La variation de la masse de certains organes internes observés peut être une conséquence directe de certaines anomalies ou maladies déjà préexistantes.

A titre d'exemple, l'hyperoxalurie primitive est une atteinte initiatrice de cardiomégalie et de splénomégalie. Ainsi certaines souris du test seraient porteuses de ce type de maladies préalablement au traitement par les calystéguines (El Ghali et al., 2014).

III.1.5- Dosage biochimiques

III.1.5.1- Bilan hépatique

Les résultats du dosage des enzymes hépatiques à partir du sérum des souris du test, sont présentés dans le tableau N°III

Tableau III : Résultats du dosage des enzymes hépatiques.

Lot	ALAT (UI/l)		ASAT (UI/l)		PAL (UI/l)	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Lot 10 mg/kg	45.7 ^a ± 5,0	48.8 ^a ± 4,9	159 ^a ± 0	281.66 ^a ± 15,3	125 ^b ± 0	21.66 ^a ± 4.3
Lot 50 mg/kg	1067 ^b ± 0	45.73 ^a ± 2,1	571 ^a ± 0	307 ^a ± 79,5	82 ^b ± 0	59.33 ^a ± 21.9
Lot 100 mg/kg	325 ^a ± 151	45.26 ^a ± 5,9	932.53 ^a ± 682,3	384,33 ^a ± 91,1	52.66 ^b ± 12,3	31.66 ^a ± 9.2
Lot contrôle	167,46 ± 52,4	51 ± 8,8	542.53 ± 302,7	303,66 ± 51,4	31 ± 0	38.33 ± 11.0

^a similaire au lot contrôle ^b différent du lot contrôle

Chez les lots mâles traités avec une dose de 10 mg/ kg le taux de PAL et des deux paramètres rénaux sont différents de ceux observés chez le lot contrôle. A une dose de 50 mg/kg le taux des enzymes hépatiques (ALAT, PAL) est significativement différent par rapport au contrôle ($p < 0.05$). A la dose de 100 mg/kg les valeurs de la PAL ainsi que l'urée

augmente par rapport au lot témoin ($p < 0.05$) contrairement au taux d'ASAT qui est comparable à celui du contrôle chez tous les lots mâles aux différentes doses.

Pour les femelles, les lots ayant reçu 10 mg/kg et 100mg/kg de calystégines n'ont présenté aucune différence pour l'ALAT et la PAL par rapport au control ($p < 0.05$). En revanche, à une dose de 50 mg/ kg les résultats montrent que les souris traitées ont des taux de PAL et ALAT similaires à ceux du contrôle.

III.1.5.2- Bilan rénal

Les valeurs des deux paramètres rénaux dosés sont présentées dans le tableau N° IV :

Tableau IV : Dosage des paramètres rénaux

Lot	UREE (g/l)		CREA (mg/l)	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Lot 10 mg/kg	0.5 ^b ±0	0.39 ^a ±0.03	0.33 ^b ±0	0.6 ^a ±0.13
Lot 50 mg/kg	0.71 ^a ±0	0.54 ^b ±0.06	0.85 ^a ±0	0.74 ^a ±0.23
Lot 100 mg/kg	0.51 ^b ±0.06	0.5 ^a ±0.02	0.50 ^a ±0.06	0.47 ^a ±0.17
Lot contrôle	0.600±0.08	0.36±0.02	0.60±0.03	1.01±0.18

^a similaire au lot contrôle ^b différent du lot contrôle

Les concentrations de l'urée et la créatine chez le lot male traité par une dose de 10 mg/kg sont différentes significativement de celles observées chez le lot contrôle ($p < 0.05$). Ces mêmes concentrations chez les mâles et femelles traitées respectivement par une dose de 50 mg/kg et 100 mg/kg sont différentes par rapport à celles observées chez le lot contrôle ceux-ci pourrait être du a une insuffisance rénale préexistante chez les souris concernées par ces perturbations (Chapados, 2004).

Les concentrations de ces différents paramètres se sont avérées plus élevées chez les différents lots mâles par rapport aux lots femelles. Ceci étant dû à la différence de la physiologie des mâles et femelles ainsi qu'à l'environnement dans lequel les souris ont été élevées.

III.1.6- Etude histopathologique

III.1.6.1- Histologie hépatique :

L'observation des foies des mâles traités et non traités avec les calystégines indique l'existence d'un parenchyme normal chez la majeure partie de ces souris. En revanche, la présence d'une petite congestion vasculaire et d'un granulome à corps étrangers ont été décelés au niveau du tissu hépatique d'une souris mâle traité par 50mg/kg de calystégines et d'une autre ayant reçu 100mg/kg d'alcaloïdes respectivement. Ces deux anomalies, étant complètement indépendante d'un éventuel effet toxique, sont plus plausiblement reliées à des états de stress, de troubles de la circulation sanguine (Charles Valla, 2003). Ou encore à une infection dans le cas du granulome (Louthrenoo., 2008).

L'analyse histopathologique des foies des souris femelles montre également un aspect général similaire entre le lot contrôle et les lots traités par les calystégines (Figure 13). En revanche plusieurs atteintes mineures ont été observées chez certains animaux de chaque lot y compris les souris contrôle. Ainsi la présence de plusieurs foyers inflammatoires, avec infiltration de polynucléaires neutrophiles, a été détectée. Ce phénomène étant probablement dû à certaines infections. D'autre part le développement de macrostéatoses a été mis en évidence et peut être relié à un apport en excès de graisses via l'aliment consommé par les souris.

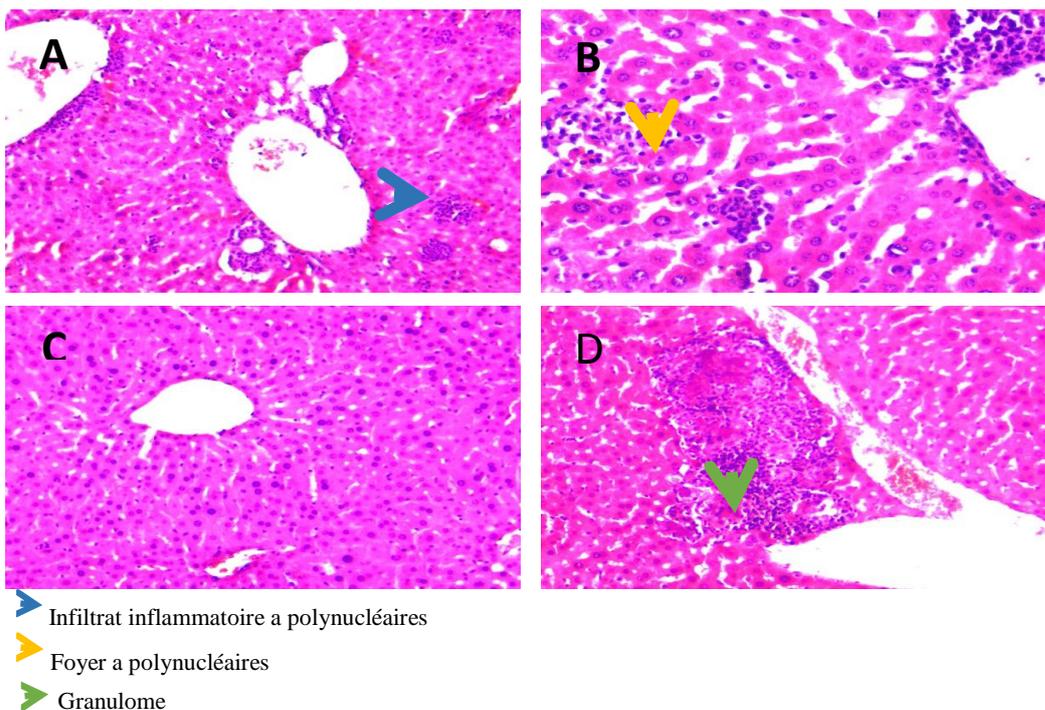


Figure 13 : Photomicrographies des foies à un grossissement x 100. A : souris contrôle ; B : souris traitées avec 50 mg/kg ; C : souris traitées avec 10 mg/kg ; D : souris traitées avec 100 mg/kg.

III.1.6.2- Histologie rénale :

L'observation du tissu rénal des souris mâles, sous microscope optique (figure 14), indique la présence d'un parenchyme normal contenant une petite congestion vasculaire chez tous les lots traités par les calystégines à différentes doses. Cette congestion est également présente chez une des souris mâle contrôle.

La présence d'inflammations discrètes à modérées a été détectée chez certaines souris femelles, des lots traités par les différentes doses de calystégines ainsi que par l'eau physiologique, les autres animaux ont présenté un parenchyme d'aspect général sain sans infiltrations ni congestions.

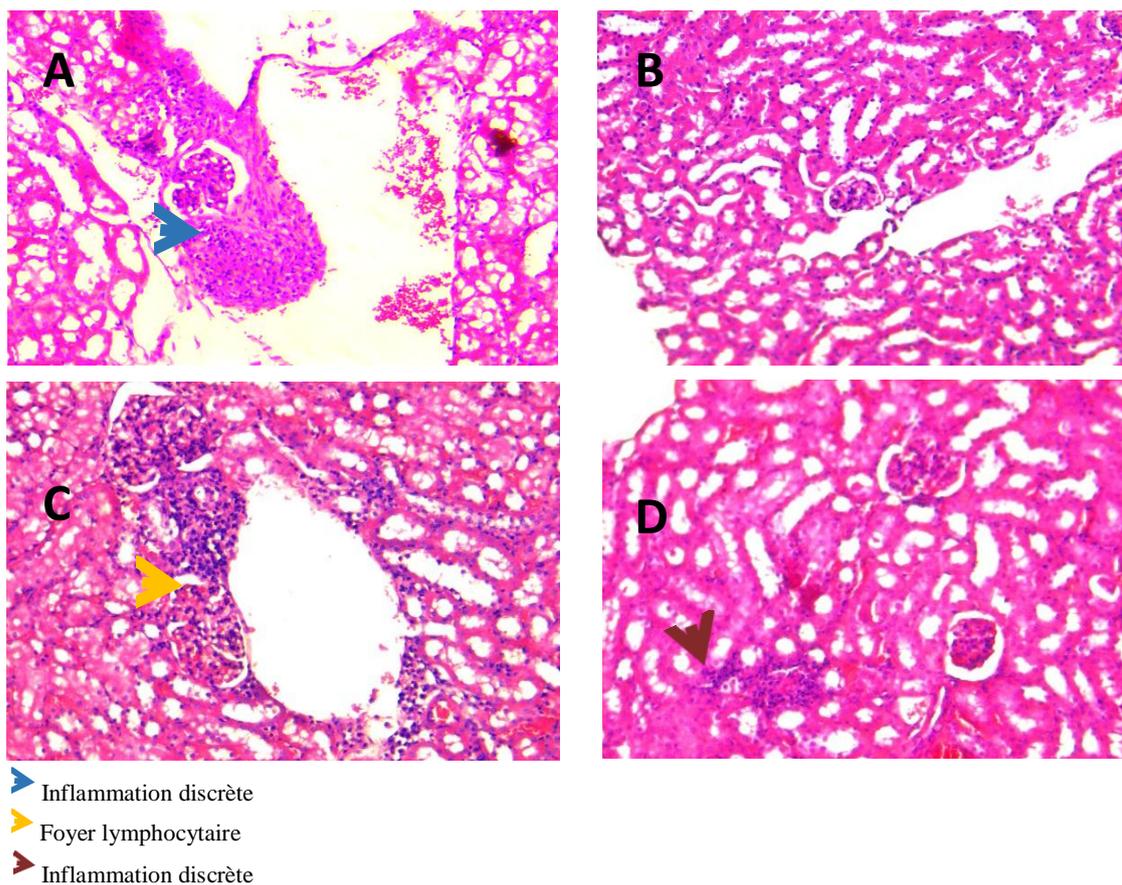


Figure 14 : Photomicrographies des reins à un grossissement x 100. A : souris contrôle ; B : souris traitées avec 10mg ; C : souris traitées avec 100mg ; D : souris traitées avec 50mg.

III.1.6.3- Histologie intestinale :

Les coupes histologiques des intestins, des souris traités avec des doses de 10mg/kg ; 50mg/kg et 100mg/kg de calystégines, ainsi que des souris des lots contrôle montrent des villosités tapissées d'un épithélium monostratifié, contenant des cellules caliciformes saines

ainsi que deux couches de tissu musculaire : circulaire interne et longitudinale externe bien délimitées (Figure 15).

Ceci indique qu'aucune toxicité n'a été induite par les calystégines au niveau de l'intestin.

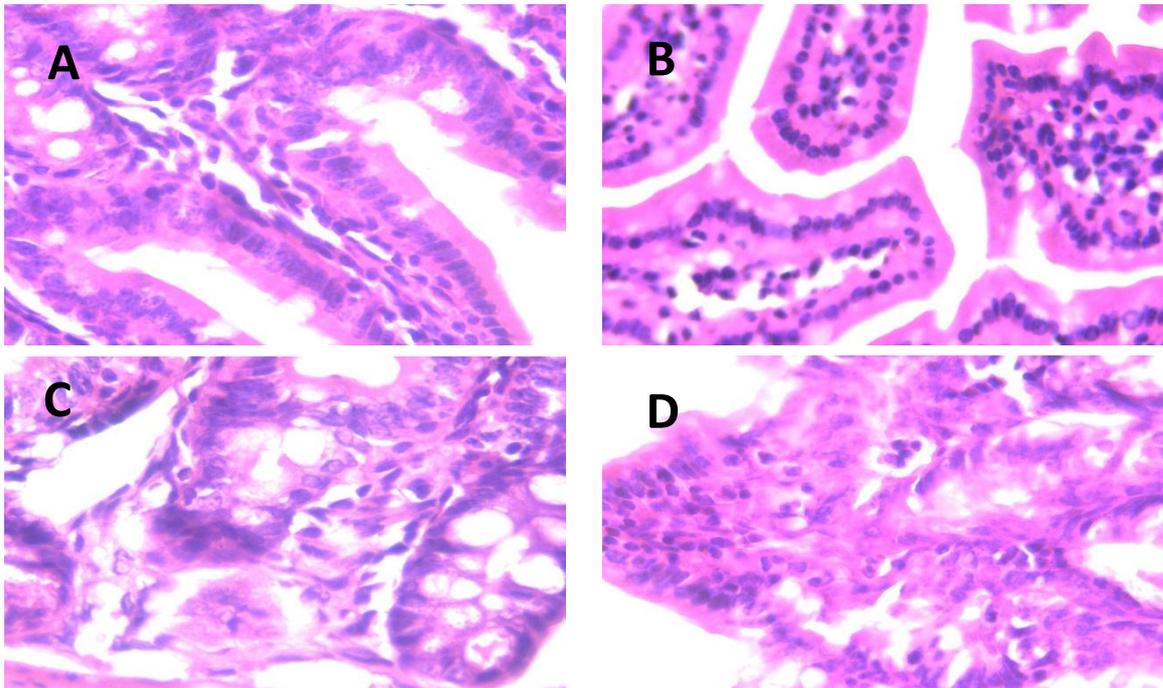


Figure 15 : Photomicrographies de l'intestin à un grossissement x 400. A : souris controle; B : souris traitées avec 50mg ; C : souris traitées avec 10mg ; D : souris traitées avec 100mg.

De manière générale, l'analyse histopathologique de tissus animaux, est une étude qui permet de visualiser l'incidence et les éventuelles anomalies induites par certaines molécules, au niveau tissulaire et cellulaire, lors d'études de toxicité. Ainsi l'absence de nécroses et de souffrances cellulaires chez toutes les souris du test de toxicité subaiguë indique que les calystégines n'exercent aucun effet sur les organes cibles : foie, reins et intestin.

La mise en évidence de certaines atteintes, chez les lots contrôles ainsi que chez les lots traités par les calystégines, peuvent être la conséquence d'une maladie chronique apparue au minimum 3 semaines avant le sacrifice et semblent donc ne pas être en relation avec l'administration répétée des calystégines.

La présence des petites inflammations ainsi que des infiltrats au niveau des reins et des foies justifie le taux élevé de certains paramètres hépatiques et rénaux, dosés chez les lots correspondants (**Pariente, 2009**). Ceci signifie que le dérèglement du bilan hépatique et rénal n'est pas dû à l'action des calystégines. De ce fait et à la lumière des résultats obtenus, les

mortalités notées lors de ce test peuvent avoir comme causes des maladies ayant les symptômes observés précédemment mais à un stade beaucoup plus avancé.

En effet, une étude réalisé par **Stegelmeier et Ses collaborateurs en 2008**, sur la toxicité des calystégines A₃ ; B₂ et C₁, ainsi que sur la castanospermine a montré que cette dernière, à dose élevée, induit des vacuolisations au niveau des reins et du foie, qui est une forme d'intoxication sévère. En revanche, ils ont pu établir que les différentes calystégines, testées jusqu'à une dose de 100mg/kg/jour, n'ont provoqué aucun changement de structures tissulaires de ces organes et n'ont eu aucun effet néfaste au niveau cellulaire ce qui rejoint donc les résultats obtenus lors de ce test et indique la non toxicité des calystégines à une dose maximale de 100mg/kg et à moyen terme.

III.2- Evaluation de l'activité antidiabétique

III.2.1- Effet prophylactique :

Le pourcentage de souris ayant développé un diabète après traitement à l'extrait pendant 30 jours, sont présentés dans le tableau N° V :

Tableau V : Pourcentages des souris devenues diabétiques durant le test prophylactique.

Lots	% de souris devenues diabétiques
10mg/kg	50%
20mg/kg	33.33%
Contrôle	66.66%

L'injection intra péritonéale de l'alloxane aux souris contrôle a provoqué le développement du diabète chez près de 66.66% des individus (Tableau V) ; l'administration de 20mg/kg de calystégines a permis la réduction de ce taux de moitié et a ainsi offert une protection contre les effets de l'agent diabétogène, de la majeure partie des souris du lot. En revanche un effet prophylactique moins prononcé a été observé à la dose de 10mg/kg où 50% des animaux traités ont développé la maladie.

Le tableau VI présente le nombre d'ilots de langerhans sains comptabilisés pour chaque souris diabétique après réalisation d'une étude histopathologique.

Tableau VI : nombre d'îlots de Langerhans sains chez les souris diabétiques.

Lots	Nombre d'îlots de Langerhans sains par souris diabétique
10mg/kg	4
20mg/kg	7
Contrôle	3

L'observation des coupes histologiques des pancréas (Figure 16) indique la présence de plus de 07 îlots de Langerhans en moyenne par souris ayant conservé toute leur intégrité cellulaire et structurale pour le lot traité par 20 mg/kg de calystégines. En revanche, seulement 4 îlots sains en moyenne par souris ont été retrouvés pour le lot ayant reçu 10mg/kg. Le lot contrôle non traité quant à lui n'a montré que 03 îlots en moyenne par souris présentant plus d'altérations.

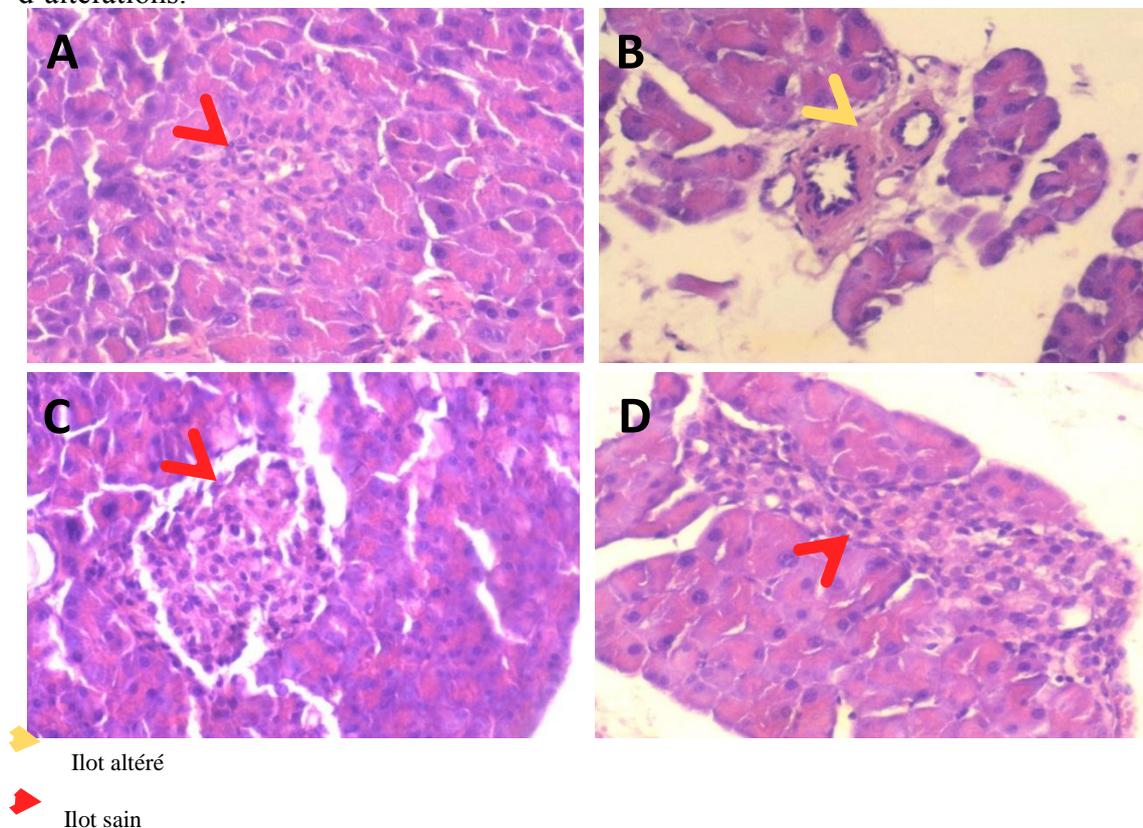


Figure 16 : Photomicrographies des pancréas. A: souris saine ; B : souris diabétique contrôle ; C : souris traitées avec 10mg; D: souris traitées avec 20mg.

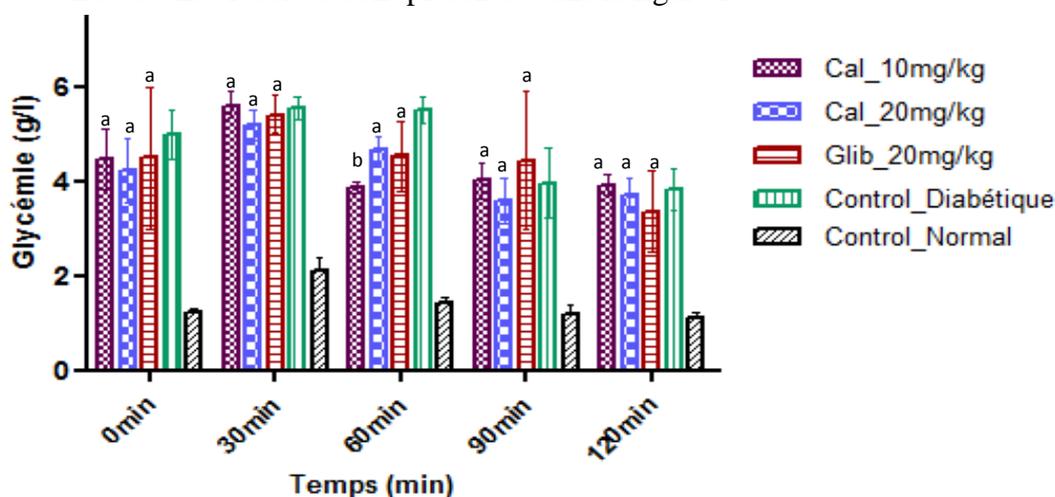
L'action protectrice observée pourrait être attribuée en partie à l'activité antioxydants des calystégines qui empêchent la génération des radicaux libres, ou qui les neutralisent après

leur génération suite à la réduction de l'alloxane par un simple don d'électrons, Les calystégines pourraient également maintenir les systèmes antioxydants a un taux normal empêchant ainsi la nécrose des cellules bêta pancréatiques (Berraaouan et al., 2015 ; Bourebaba et al., 2016).

Des études réalisées sur l'effet préventif de certaines molécules ont mis en évidence leur capacité de stimulation de la prolifération des cellules β dans le pancréas de souris (Edvel et al., 1999). Ainsi, ces résultats expérimentaux sont fondamentaux pour envisager le potentiel thérapeutique des calystégines dans l'augmentation de la masse cellulaire β des diabétiques de type II.

III.2.2- Test de tolérance au glucose

Afin de tester la capacité de l'extrait à neutraliser la quantité élevée du glucose, dans le sang en cas d'un déficit en insuline, ou de résistance envers cette hormone, un test de tolérance a été effectué. Les résultats sont présentés dans la figure 17 :



^a similaire au lot contrôle diabétique ^b différent du lot contrôle diabétique

Figure 17 : Effet des calystégines sur la glycémie de souris diabétiques ayant reçu une dose de 2g/kg de glucose.

Les valeurs de la glycémie, mesurée toutes les 30 min pour tous les lots traités ainsi que le contrôle révèle qu'à partir de la 30^{ème} minute, tous les lots ont eu une hyperglycémie ce qui est la conséquence de l'administration d'une dose massive de glucose. Au bout de 60 minutes, une diminution de cette glycémie chez tous les lots a été constatée. Ceci s'explique par l'intervention des mécanismes de la régulation de la glycémie. Le lot traité avec 10 mg/kg

a présenté un effet hypoglycémiant significativement plus important ($p < 0.05$) comparé à celui observé avec le lot traité par une dose de 20 mg/kg qui est similaire à l'effet du glibenclamide ainsi que le contrôle diabétique. A partir de la 90^{ème} minute tous les lots traités avec leurs doses respectives ont démontré une baisse de la glycémie.

L'un des mécanismes les plus connus des calystégines à diminuer la concentration du glucose dans le sang est leur capacité à inhiber les α -glucosidases au niveau de l'intestin (**Bekkouche et al., 2001**) ce qui diminue l'adsorption du glucose et par conséquent son passage vers la circulation sanguine induisant une libération plus importante d'insuline à partir des ilots de Langerhans.

L'effet hypoglycémiant pourrait aussi être la conséquence de l'activation de l'AKT (protéine kinase B), une protéine clé de la voie de signalisation de l'insuline, qui module le métabolisme du glucose et induit la translocation des récepteurs GLUT 4. Ceci prévient la résistance à l'insuline et augmente sa sensibilité autrement dit, favorise le captage du glucose par le muscle en stimulant la voie insulino-dépendant (**Gibbs et al., 1995**).

Un autre mécanisme possible est la fixation des calystégines sur des récepteurs spécifiques qui sont des protéines à sept domaines transmembranaires couplées à l'adénylate cyclase (**Thorens 1992**). Ces récepteurs sont présents dans les cellules β du pancréas, le tractus digestif, les poumons, le rein et le cerveau (**Campos et al., 1994**). Cette complexation augmente ainsi la concentration cytoplasmique de l'AMP cyclique ce qui mène à une augmentation de la sécrétion d'insuline.

III.2.3- Effet des calystégines sur le stockage du glycogène hépatique

Cet effet est illustré dans la figure 18.

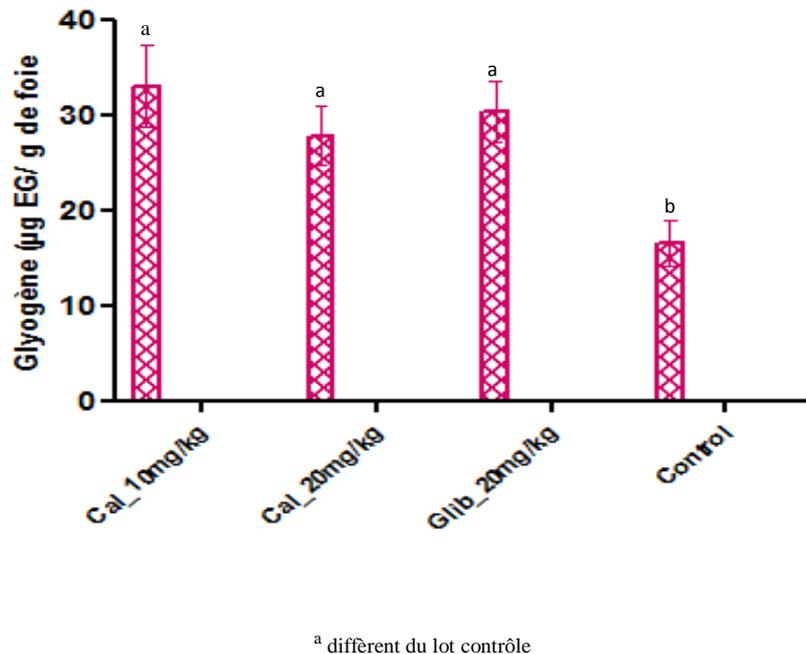


Figure 18 : Histogramme démontrant le taux du glycogène hépatique chez les différents lots

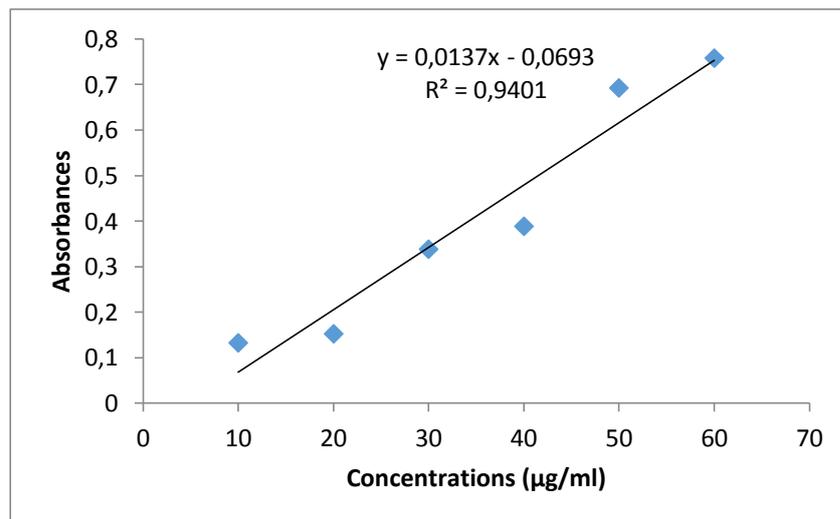


Figure 19 : courbe d'étalonnage du glucose

Les histogrammes (Figure 18) indiquent une élévation significative du taux de glycogène hépatique chez les souris diabétiques, traitées par les calystégines à une dose de 10mg/kg. Le taux est pratiquement similaire à celui observé chez les souris traitées par le

glibenclamide ($p < 0.05$). Le groupe traité avec une dose de 20 mg/kg démontre un taux de stockage moins élevé que celui des lots traités par le glibenclamide et les calystégine à 10 mg/kg mais reste plus élevé par rapport au groupe contrôle.

L'effet hypoglycémiant, observé chez le lot traité avec 10 mg/kg, est plus important que celui observé chez les souris traitées avec une dose de 20mg/kg. Ceci pourrait s'expliquer par le possible engendrement d'un encombrement stérique (**He et al., 2000**).

Plusieurs études ont démontré la capacité de certaines molécules à inhiber la glycogène phosphorylase, enzyme clé de la voie de la glycogénolyse, responsable de la production hépatique du glucose, cette action inhibitrice mène à une diminution du taux du glucose sanguin. Le 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-AB1) est un iminosucre qui a révélé un pouvoir inhibiteur potentiel de cette enzyme hépatique (**Chen et al., 2006**). La modification structurale de cet iminosucre lui confère cette activité inhibitrice. Les calystégines seraient probablement dotés de cette activité inhibitrice puisque ils sont des iminosucres polyhydroxylés (**Bekkouche et al., 2001**).

La fagomine est un des iminosucres polyhydroxylés, comme les calystégines, dépourvue d'un radical hydroxyl sur le carbone pseudo anomérique. Cette molécule a démontré un important effet inhibiteur des β - glucosidases et faible pour les α -glucosidases des mammifères ce qui prouve l'importance du groupement hydroxyle en position 2 (**Legler et al., 1984**). Ainsi la présence de ce radical hydroxyle sur le carbone 2 des calystégines ferait d'eux des molécules beaucoup plus réactives et efficaces.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le diabète est un syndrome caractérisé par une hyperglycémie chronique due à une insulinopénie et/ou à une insulino-résistance.

Les résultats obtenus dans cette étude prouvent l'efficacité antidiabétique des extraits de *Hyoscyamus albus*, en particulier, les calystégines des graines de cette plante, connue pour son utilisation à des fins thérapeutiques diverses.

Il ressort de ce travail que le traitement des souris avec les calystégines, n'affecte ni leur comportement ni leur appétit ainsi, aucun signe de toxicité à moyen terme n'a été noté.

Cet extrait pourrait être un traitement alternatif du diabète de type 2 car il a également démontré sa capacité à réduire l'incidence du diabète par plusieurs effets :

Un effet prophylactique important, remarqué sur des souris traitées par l'extrait à une dose de 20mg/kg puis rendu diabétique avec l'alloxane, qui consiste à la protection des îlots de Langerhans chez plus de la moitié des souris testé contre l'action délétère de l'alloxane. Cette dose de 20 mg/kg a révélé une action protectrice meilleure que la dose de 10 mg/kg.

Ces résultats ont aussi affirmé que les calystégines, à une dose de 10 mg/kg, exercent deux actions antidiabétiques influencent sur le stockage du glycogène hépatique par un mécanisme méconnu ce qui prévient la hausse de la concentration du glucose libre dans le sang, Ils induisent une tolérance élevée des tissus au glucose en visant différentes molécules, inhibent les α -glucosidases, et les mécanismes responsables du maintien de l'euglycémie ce qui attribue une action insulino-mimique à ces substances qui stimulent la néoglucogénèse.

Ces résultats ouvrent le champ à des investigations cliniques afin d'éclaircir certaines ambiguïtés concernant les doses efficaces des calystégines entraînant le moindre danger, les mécanismes moléculaires antidiabétiques suivi par ces molécules d'intérêts, ainsi que la détermination du type exacte des calystégines qui sont mis en jeu en caractérisant l'extrait par GC-MS.

- Abdulfatai, B.O., Olusegun, A.O. et Lateefat B.O. (2012). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal*, 27(4): 269-273.
- Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, D., Veuthey, J. et Christen, F. (2001) calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry*, 58:455-462.
- Benhouda, A. et 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.
- Benhouda, A., Yahia, M., Benhouda, D., Bousnane, N.E., Benbia, S., Hannachi, N.E. et Ghecham, A. (2014). Antimicrobial and Antioxidant activities of various extracts of Hyoscyamus albus L. and Umbilicus rupestris L. leaves. *Algerian Journal of Natural Products* 2:1 4-17
- Berraouan, A. Ziyat, A., Mekhfi, H., Legssyer, A., Aziz, M. et Bnouham M. (2015). Evaluation of Protective Effect of Cactus Pear Seed Oil (Opuntia Ficus-Indica L. MILL.) Against Alloxaninduced Diabetes in Mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(7): 532-537.
- Biastoff, S. et Drager, B. (2007). Chapter 2 Calystegines., In, The Alkaloids. Germany: Elsevier Inc. P 59.
- Bourebaba, L., Sullinib, G., Mendiolac, J.A., Bourebabaa, Y., Deghimaa, A., Oukil, N. et Bedjoua, F. (2016). In-Vivo Edema Inhibition of Hyoscyamus Albus Antioxidant Extractsrich in Calystegines. *Industrial Crops and Products*, 89: 316-322
- Bu-Abbas, A., Clifford, M.N., Ioannides, C. et Walker, R. (1995). Stimulation of rat hepatic UDP glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food chem. Toxicol*, 33(1): 27-30.
- Buyschaert, M., Vandeleene, B., Parus, I. et Hermans, M.P. (1999). Le diabète sucré d'une réalité d'aujourd'hui à un défi de demain. *Louvain Med*, 118: 189-195.
- Campos, R.V., Lee, Y.C. et Drucker, D.J. (1994). Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 134: 2156-2164.
- Chapados, C. (2004). Efficacité d'une clinique d'insuffisance rénale. *Néphrologie*, 25(5):173-177.
- Charles Valla, D. (2003). Hypoxie Hépatique Aiguë, Foie Cardiaque Congestif. *Gastroentérologie Clinique Et Biologique*, 27(5) : 33-40.

- Charpentier, G., Riveline, J.P. et Varroud-Vial, M. (2000). Management of drugs affecting blood glucose in diabetic patients with renal failure. *Diabetes Metab* 26: 73-85.
- Chen, W., Kurtz, D.A., Hamlet, T., Sim, L., Rose, D.R. et Pinto, B.M. (2006). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14: 8332-8340.
- Cox, E.M. et Elelman, D. (2009). Test for screening and diagnosis of type 2 diabetes. *Clin Diabetes*, 4(27) :132-138
- Dedier, P. (1994). Chap. 2. In : Travaux pratique de biologie. *Bordas Eds*: 54-83.
- Diatewa, M., Samba, C.B., Assah, T.C. et Abena, A.A. (2004). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal Ethnopharmacol*, 92 (2) :229-232.
- Doupa, D., Ba, M., Wele, A., Seck, S.M., Barboza, F.S., Kane, M.O., Dieye, P.M., Diallo, F.A., Gueye, L. et Sy, G.Y. (2014). Activite Hypoglycemiante De La Fraction F5 De L'extrait Total Methanolique De Feuilles De *Dialium* Guineense (Cesalpiniaceae). *Rev. Cames Sante*, 2(1) : 35-40.
- Eddouks, M., Jouad, H., Maghrani, M., Lemhadri, A. et Burcelin, R. (2003). Inhibition of endogenous glucose production accounts for hypoglycemic effect of *Spergularia purpurea* in streptozotocin mice. *Phytomedicine*, 10: 594-599
- El Ghali, Z.; Ait Lahcen, Z., Fadili, W., Kaitouni, A.I., Hakkou, M., Hamdaoui, A. et Laouad, I. (2014). Diagnostic Tardif D'une Hyperoxalurie Primitive Au Stade D'insuffisance Rénale Chronique Terminale Avec Hypoparathyroïdie Sévère. *Pan African Medical Journal*, 17:297
- Gibbs, E.M., Stock, J.L., Mccoid, S.C., Stukenbrok, H.A., Pessin, J.E. et Stevenson, R.W. (1995). Glycemic Improvement In Diabetic Db/Db Mice By Overexpression Of The Human Insulinregulatable Glucose Transporter (GLUT4). *J Clin Invest*, 4: 1512-8
- Goetz, P. (2007). Phytothérapie du diabete. *Phytotherapie clinique*, 5 : 2012-2017.
- Goullé, J., Pépin, G., Dumestre Toulet, V. et Lacroix, C. (2004). Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandagore. *Annales de toxicologie analytique*, 16(1) :22-35.
- Grimaldi, A. (2000). Diabete Insulinodependant. *Endocrinologie, Métabolisme, Nutrition*, 50 : 1473-1484.
- Grimaud, D. et Ichai, C. (2000). Anesthésie réanimation du patient diabétique. *Ed. Masson*: Nice. P 3-11 et 15-22

- Guillausseau, P.J. et Laloi-Michelin, M. (2003). Physiopathologie du diabète de type 2. *La revue de médecine interne*, 24: 730-737.
- Hammiche, V., Merad, R. et Azzouz, M. (2013). Solanacées. In : plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Paris: Springer. P 237-259.
- Hashemi M., Dostar, Y., Rohani, S., Saraji, A. et Bayat, M. (2009). Influence of Alooxanes on the Apoptosis of Pancreas B-Cells of Rat. *World Journal of Medical Sciences*, 4 (2): 70-73.
- He, L., Jagtap, Kingston, P.G., Heng-Jia, D.G.I., Orr, S., G.A. et Horwitz, S.B. (2000). A Common Pharmacophore for Taxol and the Epothilones Based on the Biological Activity of a Taxane Molecule Lacking a C-13 Side Chain. *Biochemistry*, 39 (14): 3972 -3978.
- Herrera, C., Garcia-Barrantes, P.M., Binns, F., Vargas, M., Poveda, L. et Badilla, S. (2011). Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Witheringia solanacea* in normal and alloxan-induced hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 907–910.
- Jun, L.S., Millican, R. L., Hawkins, E.D., Konkol, D.L., Showalter, A.D., Christe, M.E., Michael, M.D. et Sloop, K.W. (2015). Absence of Glucagon and Insulin Action Reveals a Role for the GLP-1 Receptor in Endogenous Glucose Production. *Diabetes*, 64: 819-827.
- Kubrak, O.I., Rovenko, B.M., Husak, V.V., Storey, J.M., Storey, K.B. et Lushchak, V. (2012). Nickel induces hyperglycemia and glycogenolysis and affects the antioxidant system in liver and white muscle of goldfish *Carassius auratus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 231–237.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51:216–226.
- Legler, G. et Jülich, E. (1984). Synthesis of 5-amino-5-deoxy-D-mannopyranose and 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol, and inhibition of alpha- and beta-D-mannosidases *Carbohydr. Res.*, 128: 61-72.
- Louthrenoo W. (2008). Rheumatic Manifestations of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Curr Opin Rheumatol*, 20 (1): 92-99.
- Malek, R., Nechadi, A., Rezig, M.F., Abdelaziz, S., Mallem, N., Bouferroum, A. et Houhou, M. (2013). Dépistage de masse du diabète de type 2 en Algérie : quels enseignements ? *Medecine des maladies Métaboliques*, 7 (6) : 557-562.

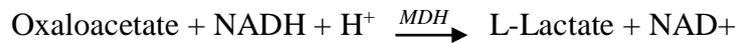
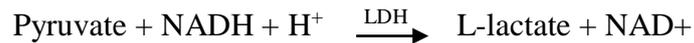
- Marles, R.J. et Farnsworth, N.R. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2 (2):137-189.
- Mshelia, D.S. et Gadzama, A.A. (2003). Oral glucose tolerance test revisited. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 6(1): 34 – 37.
- Nath Singh, S., Vats,P., Suri,S., Shyam, R., Kumria, .M.M.L., Ranganathan, S. et Sridharan, K.(2001). Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 76 : 269–277.
- OECD. 2008. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Guide 407 : étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. Paris. P14.
- Pariente, A. (2009). *Stéatopathie Métabolique : Prise En Charge*. Gastroentérologie Clinique Et Biologique, 33 : 313-324.
- 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*. P 1170.
- Raccach,D. (2004). Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC- Endocrinologie*, 1(1) : 29-42.
- Ransom, T., Goldenberg, R., Mikalachki, A., Prebtani, A.P.H. et Punthakee, Z. (2013). Réduction du risque de diabète. *Canadian Journal of Diabetes*, 37 : 377-380.
- Reynaud, J. (2002). La flore du pharmacien.solanacées. Paris : *Edition Tec et Doc*. P200.
- Scholl, Y., Schneider, B. et Drager, B. (2003). Biosynthesis of calystegines: ¹⁵N NMR and kinetics of formation in root cultures of *Calystegia sepium*. *Phytochemistry*, 62: 325–332.
- Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., Balkau, B., Heude, B., Charpentier, G., Hudson, T.J., Montpetit, A., Pshezhetsky, A.V., Prentki, M., Posner, B.I., Balding, D.J., Meyre, D., Polychronakos, C. et Froguel, P. (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 445: 881-885.
- Swerdlow, D.I., Preiss, D., Kuchenbaecker, K.B., Holmes, M.V., Engmann, J.E., Shah, T., Sofat, R., Peasey, A., Amuzu, A. et al. (2014). HMG-coenzyme a reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet*.: 385(9965):351-61.

- Snyder, R.W. et Berns, J.S. (2004) Use of insulin and oral hypoglycemic medications in patients with diabetes mellitus and advanced kidney disease. *Semin Dial*, 17: 365-70.
- Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. et Jeanmonod, D. (2004). Botanique systematique des plantes à fleurs, une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des regions tempérées et tropicales. *Ed.*, 3: 316.
- Stegelmeier, B.L., Molyneux, R.L., Asano, N., Watson, A.A. et Nash, R.J. (2008). The comparative pathology of the glycosidase inhibitors swainsonine, castanospermine, and calystegines A3, B2, and C1 in Mice. *Toxicologic Pathology*, 36: 651-659.
- Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res*, 50: 536-546.
- Thorens, B. (1992). Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 8641-8645.
- Virally, M., Blicklé, J.F., Girard, J., Halimi, S., Simon, D. et Guillausseau, P.J. (2007). Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism*, 33: 231–244.
- Wattiez, A., 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.

Annexe N°1

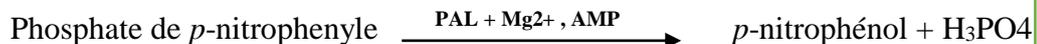
1- Dosage des transaminases (ASAT et ALAT) :

Le principe de ce dosage repose sur la déduction des concentrations de l'ASAT et l'ALAT par la mesure de l'absorbance du coenzyme NADH H⁺ à 340 nm qui disparaît lors des réactions catalysées par ces deux enzymes.



2- Dosage de la Phosphatase alcaline (PAL) :

La méthode de dosage de la phosphatase alcaline (PAL) est réalisée par l'automate VITROS 5600. À pH alcalin, l'PAL présente dans l'échantillon catalyse l'hydrolyse du phosphate de *p*-nitrophenyle en *p*-nitrophénol selon la réaction chimique :



L'absorbance du *p*-nitrophénol est mesurée par spectrophotométrie à 400nm. La vitesse de modification de la densité de réflexion est convertie en activité enzymatique.

3- Dosage de la créatinine :

Le principe de ce dosage repose sur le suivi de l'évolution du complexe rouge orangé dont la densité optique est proportionnelle à la concentration de la créatinine. Ce complexe résulte de la réaction de l'acide picrique contenu dans le réactif de dosage avec la créatinine qui est, elle, contenue dans les sérums en utilisant l'automate.

4- Dosage de l'urée

L'urée est hydrolysée par l'uréase en ammoniac et en dioxyde de carbone. L'ammoniac formé est additionné à l' α -cétoglutarate par l'action du glutamate déshydrogénase avec oxydation du NADH pour former du glutamate. Un suivi de l'absorbance à 340 nm est réalisé, la diminution de la concentration de NAD est proportionnel à la concentration de l'urée.

Tous les dosages précédemment décrits ont été réalisés à l'aide d'un automate de type *LISA 500* plus.

Annexe N° 2

Réalisation des coupes histologiques :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de médecine à ABOUDAOU palier d'anatomie pathologie en suivant les étapes suivantes :

- **Etape de fixation**

Cette étape consiste à immobiliser les organites cellulaires en conservant leur aspect et leur composition tissulaire et cellulaires dans une forme proche du vivant par des modifications simples, soit la rétraction ou le gonflement des tissus biologiques. Les organes ont été ensuite coupés et déposés dans des cassettes marquées préalablement (figure1).



Figure 1 : cassette contenant un organe coupé.

- **Etape de déshydratation et d'éclaircissement (inclusion)**

Les cassettes ont été toutes placées dans un portoir et lavées avec de l'eau courante pour éliminer l'excès de formol. Elles ont été ensuite placées dans l'automate de déshydratation Laica (figure 2) et passées d'abord par 8 bains d'éthanol à concentrations croissantes afin de déshydrater les échantillons durant 45 mn chacun, ensuite par 2 bains de xylène pour éliminer le formaldéhyde pendant 30 mn chacun, enfin par 2 bains de paraffine pour épurer le xylène pendant 1h30 chacun.



Figure 2 : Automate de deshydratation laica.

- **Etape d'enrobage par la paraffine et réalisation des coupes**

Les cassettes contenant les organes ont été immergées dans des bains de paraffine liquide (figure 3 A). Après leur enrobage, les cassettes ont été déposées sur une plaque réfrigérante pour refroidir la paraffine afin d'obtenir des blocs pour chaque prélèvement (figure 3 B).

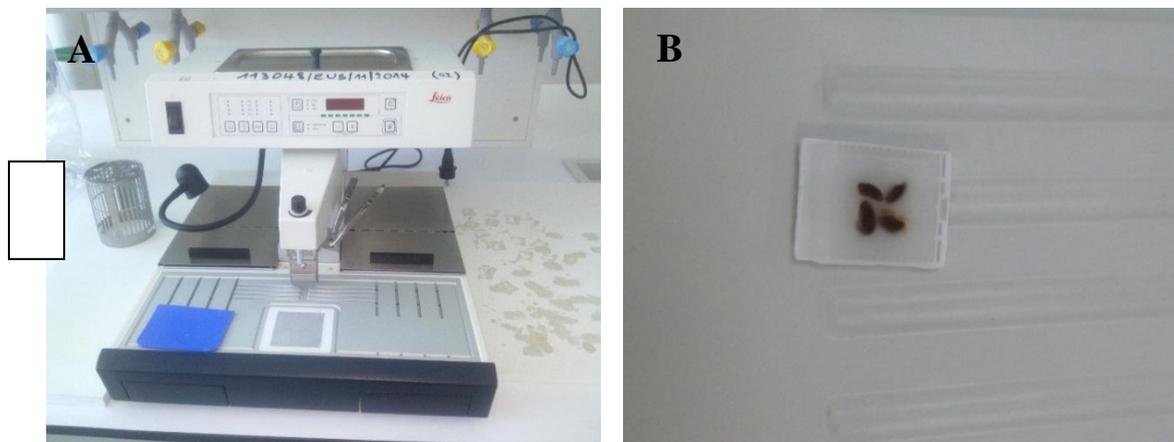


Figure 3 : A : enrobage a la paraffine liquide ; B : bloc de reins fixé.

La réalisation des coupures du bloc a été faite à l'aide d'un microtome à une épaisseur de 3 μm pour chaque prélèvement et pour éviter les superpositions cellulaires (figure 4). La coupe obtenue a été déposée sur une lame en verre puis séchée à l'étuve.



Figure 4 : coupe d'un bloc par le microtome Laica.

- **Etape de déparaffinage et de coloration**

Les lames ont été mises dans du xylène deux fois successives pendant 5 mn chacune, ensuite plongées dans deux bains successifs d'éthanol à 90 % pendant 3mn chacun enfin rincées à l'eau. Les lames ont été inondées d'hématoxyline pendant 3 min dans le but de colorer les noyaux, et d'éosine pendant 5 min pour colorer le cytoplasme. Après ce traitement un lavage à l'éthanol 90% et un séchage ont été appliqués (figure 5).

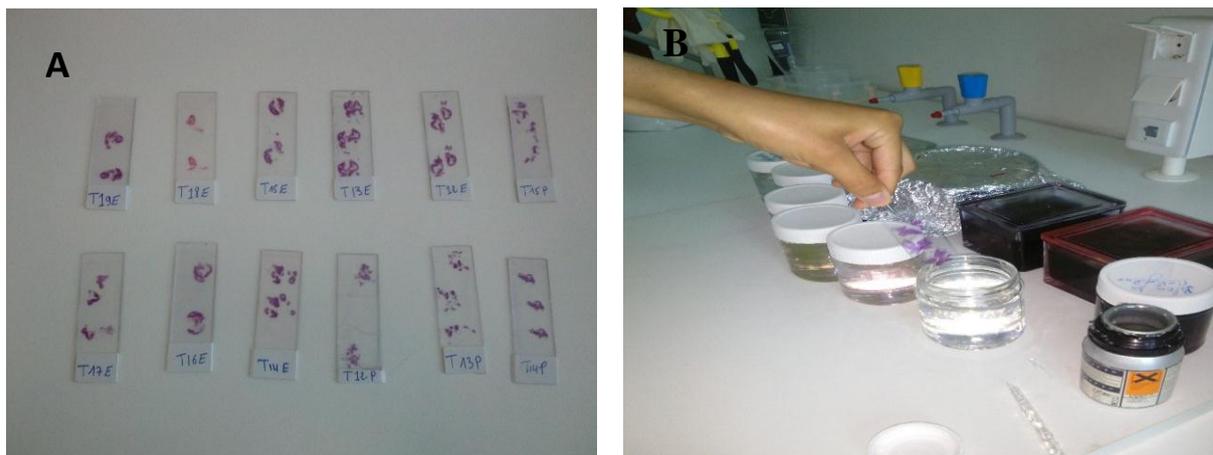


Figure 5 : A : lames montées ; B : coloration des lames.

- **Montage et visualisation microscopique**

La visualisation microscopique a été réalisée à l'aide d'une colle biologique qui est l'Eukitt, cette dernière permet de coller la lame et la lamelle nécessaire pour une conservation ultérieure des coupes colorées. L'observation a été faite en utilisant le microscope optique appareil photo intégré à différents grossissements.

Résumé

Ce travail vise à tester la toxicité sub-aigue et l'activité antidiabétique des calystégines de *H.albus* qui fait partie de la famille des solanacées connues pour leurs propriétés thérapeutiques diverses.

L'évaluation de la toxicité a été réalisée sur des souris mâles et femelles. Le suivi de tous signes d'intoxication a été effectué durant toute la période de l'essai, les coupes histologiques de quelques organes ainsi que les bilans hépatique et rénal effectués ont révélé l'innocuité de cet extrait aux différentes doses testées.

L'effet prophylactique a été étudié sur des souris *Mus musculus* ayant reçu différentes doses de calystégines par voie orale pendant 30 jours et une injection unique de 200 mg/kg d'alloxane. La dose de 20 mg/kg a présenté un effet prophylactique important en réduisant l'installation du diabète, validé par la présence d'un nombre élevé d'îlots de Langerhans sains, protégés par cet extrait, au niveau des coupes histologiques des pancréas.

L'administration d'une dose de 10 mg/kg à des souris rendues préalablement diabétiques par l'alloxane a montré un effet hypoglycémiant ainsi qu'un taux élevé de glycogène hépatique ce qui démontre l'action des calystégines sur la réduction du taux de glucose sanguin.

Mots clés : *Hyoscyamus albus* , Calystégines, Toxicité sub-aigue, prophylactique, glycogène.

Abstract

This work aims to test the sub-acute toxicity and antidiabetic activity of *H.albus* calystegines part of the solanaceae family known for their various therapeutic properties.

The toxicity assessment performed on male and female mice. The monitoring of any signs of poisoning effectuated during the entire test period, histological sections of some organs and the hepatic and renal balance sheet have proven the safety of this extract in different doses tested.

The prophylactic effect studied on mice *Mus musculus* who received various doses of calystegines orally for 30 days and a single injection of 200 mg / kg of alloxan. The dose of 20 mg / kg provided a significant prophylactic effect in reducing onset diabetes, validated by the presence of a large number of islets of Langerhans healthy, protected by this extract, in histological sections of the pancreas.

The administration of 10 mg / kg in diabetic mice showed hypoglycemic effect and a high rate of liver glycogen, which demonstrates the action of the calystegines on blood glucose level reduction.

Keywords: *Hyoscyamus albus* , Calystegines, sub-acute toxicity, prophylactic, glycogen.

ملخص

يهدف هذا العمل لاختبار النشاط الفرعي الحاد للسمية والمضاد لمرض السكر لسكرجا المستخلصة من السكران الابيض الدس ينتمي الى عائلة ظل الليل المعروف لخصائصه العلاجية المختلفة. أجري تقييم السمية على فئران ذكور وإناث، حيث تم تتبع علامات التسمم الممكنة خلال فترة الاختبار كاملة. المقاطع النسيجية لبعض الاعضاء وكذلك تقييمات الكبد والكلية أثبتت سلامة هذا المستخلص مع مختلف الجرعات المختبرة. وقد تمت دراسة تأثير وقائي على الفئران المصحفة العضلة الذين تلقوا جرعات مختلفة من سكرجا عن طريق الفم لمدة 30 يوما، ثم يتلقى حقنة واحدة من 200 ملغ / كغ من الوكسان. جرعة من 20 ملغ / كغ وفرت لها تأثير وقائي كبير في الحد من الإصابة بسكري كما تم التحقق من وجود عدد كبير من جزر لانجرهانز صحية بحميتها هذا المستخلص في الأجزاء النسيجية للبنكرياس. تم اثبات بعد المعالجة بالآلوكسان سابقا والتغذية بجرعة من 10 ملغ /كغ في الفئران السكري أظهرت تخفيض في نسبة سكر الدم ونسبة عالية من الجليكوجين المخزن في الكبد مما يدل على نشاط سكرجا لتخفيض معدل السكر في الدم.

كلمات مفتاحية: السكران الابيض، سكرجا، النشاط الفرعي الحاد للسمية، تأثير وقائي، الجليكوجين.