

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

En vue de l'obtention
du diplôme de DOCTORAT Sciences en Biochimie
Option : Biochimie appliquée

Investigation phytochimique et étude des
activités biologiques d'une variété locale de
Allium sativum L.

Présentée par
Mme DOUAOUYA. Lilia

Membres de Jury

Président	: Mr HOUHAMDI Moussa	Professeur, Université de Guelma
Directeur de thèse	: Mr. BOUZERNA Nouredine	Professeur, Université d'Annaba
Examineurs	: Mr. MESSARAH Mahfoud	Professeur, Université d'Annaba
	Mme. SOUIKI Lynda	MCA, Université de Guelma

Année universitaire : 2016-2017

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

En vue de l'obtention
du diplôme de DOCTORAT Sciences en Biochimie
Option : Biochimie appliquée

Investigation phytochimique et étude des
activités biologiques d'une variété locale de
Allium sativum L.

Présentée par
Mme DOUAOUYA. Lilia

Membres de Jury

Président	: Mr HOUHAMDI Moussa	Professeur, Université de Guelma
Directeur de thèse	: Mr. BOUZERNA Nouredine	Professeur, Université d'Annaba
Examineurs	: Mr. MESSARAH Mahfoud	Professeur, Université d'Annaba
	Mme. SOUIKI Lynda	MCA, Université de Guelma

Année universitaire : 2016-2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

Je remercie « ALLAH », tout Puissant, qui m'a permis de mener à bien ce travail.

J'exprime ma reconnaissance et ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur BOUZERNA Noureddine, mon directeur de thèse pour sa générosité, sa gentillesse, son soutien et de m'avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail, sa précieuse aide et ses encouragements ont été pour moi un solide repère et réconfort dans tous les moments.

Un grand merci à Monsieur MESSARAH Mahfoud, Professeur au département de Biochimie, qui m'a honoré en acceptant d'être président de ce jury. Hommages respectueux,

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur HOUHAMI Moussa, Professeur à l'Université de Guelma de m'avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce travail. Tout l'honneur lui en revient.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à Madame SOUIKI Lynda, Maître de conférences à l'Université de Guelma, qui a accepté de critiquer et d'analyser ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

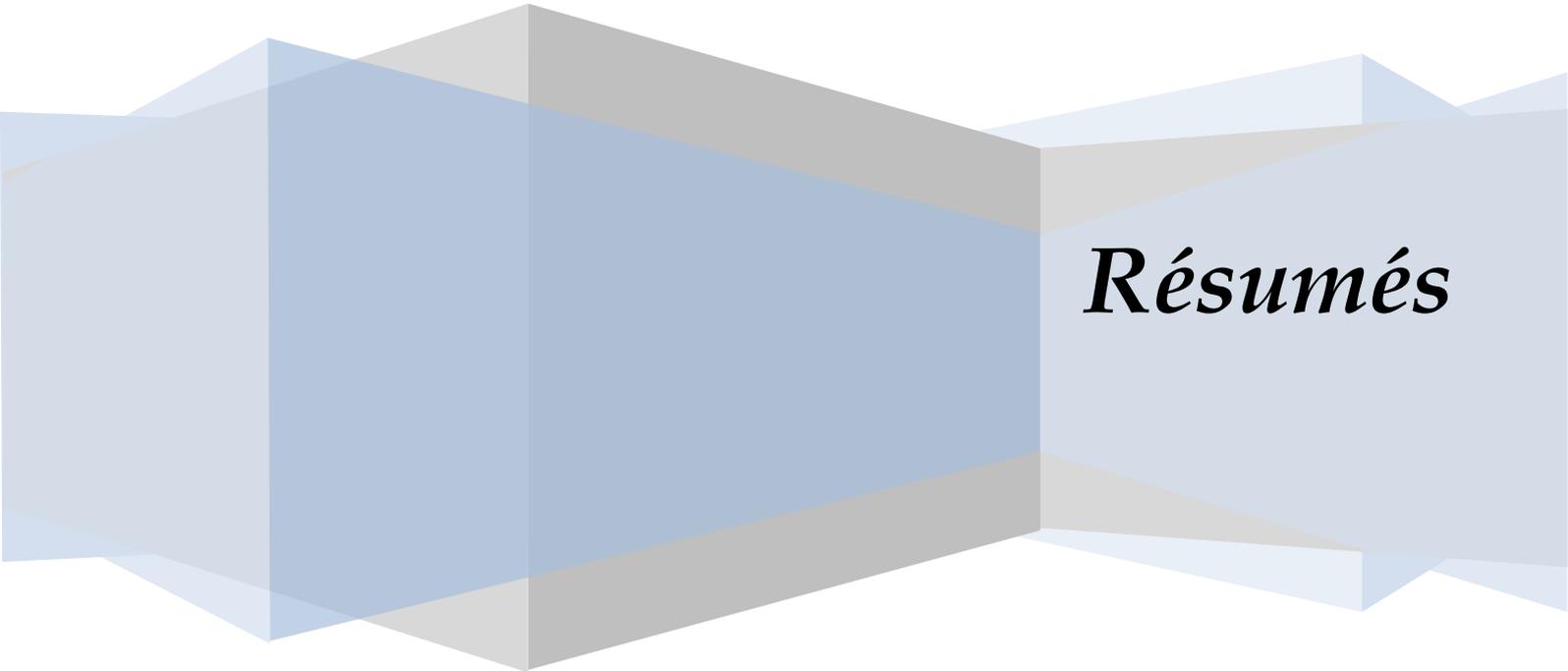
Je remercie sincèrement Monsieur TAHARA, Professeur au département de Biologie qui a bien voulu apporté ses orientations durant la réalisation de l'étude statistique et la présentation des résultats.

Mes plus vifs remerciements vont également aux personnels du service d'anatomie pathologique Hôpital IBN ROCHD Annaba; le Professeur LANKAR et le Docteur LAOUAR, pour la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques.

J'exprime également mes vifs remerciements à Monsieur Lazher TICHATI, Ingénieur au laboratoire L.B.M.A., je tiens à le remercier, pour son aide, ses conseils au quotidien et sa gestion du laboratoire.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce présent travail.

En fin, à mes très chers parents, mon mari Rachid, mes frères Azzedine et Abd El Ghani, mes nièces Sali et Amani et toute ma famille pour l'amour qu'ils m'apportent et leur soutien durant toutes mes années d'étude: Un grand merci et je vous aime énormément.



Résumés

Résumé

L'objectif de cette étude s'articule sur la recherche de l'effet antidiabétique et antioxydant d'une variété locale de l'*Allium sativum* L. chez le rat mâle Wistar adulte.

D'abord, on a réalisé une investigation phytochimique concernant la quantification des phénols totaux et des flavonoïdes à partir de l'extrait méthanolique lyophilisé d'ail et l'exploration *in vitro* du pouvoir antioxydant en utilisant trois techniques: effet scavenger du radical stable: DPPH, le piégeage du peroxyde d'hydrogène et l'inhibition de la xanthine oxydase.

L'étude biologique s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur trente cinq rats répartis en cinq lots de sept rats chacun dont 3 lots sont rendus diabétiques par l'injection intrapéritonéale de 150 mg/kg d'alloxane. L'extrait d'ail est administré chaque jour par gavage à deux groupes à deux concentrations 250mg et 500mg/kg du poids corporel. Deux lots recevant de l'eau physiologique sont utilisés comme témoins et diabétiques non traités. Simultanément, le lot restant est traité par un médicament de référence: la glibenclamide. Après trois semaines du traitement, les rats sont sacrifiés et les différents paramètres sont déterminés.

A partir de l'analyse des résultats, on a observé que les rats contrôles diabétiques ont subi une chute du poids corporel significative. L'injection de l'alloxane a provoqué également une perturbation claire du métabolisme glucidique et lipidique traduisant par une hyperglycémie, une hypercholestérolémie, et une augmentation de la teneur plasmatique en triglycérides et lipides totaux. Ceci est accompagné par une glycation de l'hémoglobine et diminution de l'insulinémie. Cependant, l'activité des transaminases (TGO, TGP), de la phosphatase alcaline (PAL) et de lactate déshydrogénase (LDH) a été augmentée. En revanche, l'activité enzymatique de l' α amylase sérique est diminuée. Le diabète a aussi perturbé le système de détoxification hépatique lié au glutathion avec augmentation du taux de MDA et depletion de l'activité de la catalase. En plus, l'histologie du pancréas a montré une nécrose au niveau des îlots de Langerhans.

Par ailleurs, le traitement des rats diabétiques par l'extrait d'ail a montré un effet antihyperglycémiant et antioxydant dose-dépendant en améliorant tous les paramètres biochimiques avec protection du tissu pancréatique des attaques radicalaires provoquées par l'alloxane.

Parallèlement, l'étude phytochimique a dévoilé que cette variété locale d'*Allium sativum* est très riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes susceptible d'exprimer l'activité anti-radicalaire prouvé *in vitro* vis-à-vis le radical libre DPPH et la capacité de neutraliser le peroxyde d'hydrogène ainsi que le pouvoir d'inhiber la xanthine oxydase.

En conclusion; l'*Allium sativum* est doué des activités antidiabétique et antioxydante remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant chez le diabétique.

Mots-clés: Activité aniradicalaire, *Allium sativum* L., diabète, Pancréas, Paramètres biochimiques, stress oxydatif.

Abstract

The objective of this study is to investigate the antidiabetic and antioxidant effect of a local variety of *Allium sativum* L. in adult male Wistar rats.

First, a phytochemical investigation was carried out on the quantification of total phenols and flavonoids from the lyophilized methanolic extract of garlic and the *in vitro* exploration of the antioxidant power using three techniques: scavenger effect of the stable radical: DPPH, trapping of hydrogen peroxide and inhibition of xanthine oxidase.

The biological study is an experimental study carried out in the laboratory on thirty-five rats divided into five groups of seven rats each, of which three groups were made diabetic by the intraperitoneal injection of 150 mg / kg of alloxane. The garlic extract is administered daily by gavage at two concentrations of 250 mg and 500 mg / kg of body weight. Two groups receiving physiological water were used as controls and untreated diabetics. Simultaneously one group is treated with a reference drug: glibenclamide. After three weeks of treatment, the rats are sacrificed and the various parameters are determined.

From the analysis of the results, it was observed that diabetic control rats experienced a significant fall in body weight. Injection of alloxane also caused clear disturbance of carbohydrate and lipid metabolism, resulting in hyperglycemia, hypercholesterolemia, and an increase in plasma triglyceride and total lipid content. This is accompanied by hemoglobin glycation and decreased insulinaemia. However, the activity of transaminases (TGO, TGP), alkaline phosphatase (PAL) and lactate dehydrogenase (LDH) was increased. In contrast, the enzymatic activity of serum α -amylase is decreased. Diabetes also disrupted the glutathione-linked liver detoxification system with increased MDA levels and depletion of catalase activity. In addition, the histology of the pancreas showed necrosis at the level of the islets of Langerhans.

Furthermore, the treatment of diabetic rats with garlic extract showed a dose-dependent antihyperglycaemic and antioxidant effect by improving all the biochemical parameters with protection of the pancreatic tissue from the radical attacks caused by the alloxane.

At the same time, the phytochemical study revealed that this local variety of *Allium sativum* is very rich in total polyphenols and flavonoids capable of expressing the anti-free radical activity proved *in vitro* to the free radical DPPH and the capacity neutralizing hydrogen peroxide and the ability to inhibit xanthine oxidase.

In conclusion; The *Allium sativum* is endowed with remarkable antidiabetic and antioxidant activities. Therefore, it can constitute a natural resource in order to alleviate the complications of oxidative stress in the diabetic.

Keywords: Anti-radical activity, *Allium sativum* L., diabetes, Pancreas, Biochemical parameters, oxidative stress.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن التأثير المضاد لمرض السكري ومضادات الأكسدة لنوع محلي من الثوم (*Allium sativum*) لدى ذكور الجرذان (Wistar) البالغة.

أولاً، قمنا بالتقييم الكيميائي النباتي المتعلق بالتقدير الكمي لإجمالي الفينولات والفلافونيدات انطلاقاً من المستخلص المثلثولي من الثوم المجفف بالتجميد ومن ثمة قمنا بالكشف المخبري للقوة المضادة للأكسدة باستخدام ثلاث تقنيات: القضاء على الجذور الثابتة DPPH، محاصرة بيروكسيد الهيدروجين وتثبيط نشاط انزيم xanthine oxydase . الدراسة البيولوجية هي دراسة تجريبية في المختبر تمت على خمسة وثلاثين جرذ مقسمة إلى خمس افواج من سبعة جرذان. لإصابتها بداء السكري تم حقن ثلاث مجموعات داخل الصفاق ب 150 ملغ / كغ من الالوكسان . مستخلص الثوم قدم يومياً لفوجين عن طريق الجرع بتركيز 250 ملغ و 500 ملغ / كغ من وزن الجسم. الفوجان اللذان قدم لهما الماء الفيزيولوجي مثلاً شواهد و مصابة بالسكري غير معالجة .في الوقت نفسه، الفوج المتبقي عومل بدواء مرجعي (Glibenclamide). بعد ثلاثة أسابيع من العلاج تم ذبح الجرذان لتحديد المعايير المختلفة.

من خلال تحليل النتائج، لاحظنا أن الحيوانات المصابة بالسكري غير المعالجة شهدت انخفاض في وزن الجسم بشكل كبير. حقن الالوكسان سبب كذلك اختلال واضح في استقلاب الجلوكوز و الدهون حيث وجدنا فرط في سكر الدم ، في الكولسترول وزيادة كبيرة للغاية في المحتوى البلازمي من الغلبريسيدات الثلاثية و من إجمالي الدهون ، كما كان هذا مصحوباً بتسكير خضاب الدم وانخفاض الأنسولين. كذلك هناك زيادة في أنشطة ناقلات الأمين (TGO, TGP) ، الفوسفاتاز القلوي و LDH. في المقابل، فإن النشاط الإنزيمي للاميلاز بالمصل تناقص .عطل السكري أيضاً نظام إزالة السموم بالكبد المتعلق بالجلوتاثيون (GSH) مع زيادة في مستويات MDA واستنزاف نشاط الكاتالاز (Catalase) . بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الدراسة التشريحية للبنكرياس تنخر في جزر Langerhans.

من جهة أخرى، علاج الجرذان المصابة بداء السكري بمستخلص الثوم أبدى تأثيراً خافضاً لسكر الدم ومضاداً للأكسدة خاضع للجرعة معتمداً على تحسين جميع المعايير البيوكيميائية و نشاط خلوي محافظ تجاه النسيج البنكرياسي من الهجمات الجذرية الناجمة عن الالوكسان.

بالموازاة مع الدراسة السابقة ، وجدت الدراسة الكيميائية أن هذا النوع المحلي من الثوم غني جداً بعديدات الفينول الكلية والفلافونويدات و المرجح أنها المسؤولة عن مكافحة الجذور الحرة المثبتة مخبرياً عن طريق تثبيط DPPH والقدرة على تحييد بيروكسيد الهيدروجين وتثبيط نشاط xanthine oxydase .

في الختام، تبين لنا أن الثوم ذو فعالية ملحوظة مضادة لداء السكري و التأكسد، و بهذا يمكن أن يشكل أداة قيمة للموارد الطبيعية للتخفيف من مضاعفات الاكسدة عند مرضى السكري.

الكلمات الدالة: *Allium sativum* L.، مرض السكري، البنكرياس، المعايير البيوكيميائية، الإجهاد التأكسدي.

TABLE DES MATIERES

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Première partie : Synthèse bibliographique

1. Diabète sucré	3
1.1. Classification de diabète.....	3
1.1.1. Diabète de type 1.....	3
1.1.2. Diabète de type 2.....	3
1.1.3. Autres types de diabètes spécifiques.....	3
1.2. Critères diagnostiques du diabète sucré.....	4
1.3. Diabète expérimental.....	5
1.3.1. Diabète induit par l'alloxane.....	5
2. Le stress oxydant	6
2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	7
2.2. Production de radicaux libres.....	7
2.3. Atteintes cellulaires.....	11
2.3.1. Peroxydation lipidique.....	11
2.3.2. Oxydation des sucres.....	13
2.3.3. Oxydation des protéines.....	14
2.3.4. Oxydation des acides nucléiques.....	14
2.4. Les systèmes de défenses antioxydantes.....	15
2.4.1. Antioxydants enzymatiques.....	16
2.4.1.1. La superoxyde dismutase (SOD).....	16
2.4.1.2. La glutathion peroxydase (GPx).....	16
2.4.1.3. La catalase (CAT).....	17
2.4.2. Systèmes non enzymatiques.....	18
2.4.2.1. Le glutathion.....	18
2.4.2.2. Vitamine E (tocophérol).....	19
2.4.2.3. Les caroténoïdes (Vitamine A).....	19
2.4.2.4. L'ubiquinol (Coenzyme Q10).....	19
2.4.2.5. Vitamine C (Acide ascorbique).....	19
2.4.2.6. Oligoéléments.....	20
2.4.2.7. Les polyphénols.....	20
3. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète	21
3.1. Auto-oxydation du glucose.....	22
3.2. Glycation et produits avancés de glycation.....	22
3.3. Activation de la protéine kinase C.....	24
3.4. Voie des polyols.....	24
3.5. Métabolisme des hexosamines.....	25

4. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité	25
5. La plante sélectionnée : <i>Allium sativum</i> L.	26
5.1. Position systématique.....	26
5.2. Description botanique.....	27
5.3. Sous espèces et variétés.....	27
5.4. Origine.....	28
5.5. Composition chimique et principes actifs.....	28
5.6. Recherches et principaux effets.....	29

Deuxième partie : Etude pratique

Chapitre I. Matériel et méthodes	31
1. Matériel végétal.....	31
2. Méthodes.....	31
2.1. Etude phytochimique.....	31
2.1.1. Dosage quantitatif.....	31
2.1.1.1. Dosage des polyphénols.....	31
2.1.1.2. Dosage des flavonoïdes.....	32
2.1.2. Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	32
2.1.2.1. Test scavenger du radical libre DPPH.....	33
2.1.2.2. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	34
2.1.2.3. Test de la xanthine oxydase.....	35
2.2. Etude biologique.....	35
2.2.1. Animaux.....	35
2.2.2. Enceinte d'élevage.....	35
2.2.3. Induction du diabète.....	36
2.2.4. Mode de traitement.....	36
2.2.5. Sacrifice et prélèvements d'organes.....	37
2.2.6. Dosages biochimiques sanguins.....	39
2.2.6.1. Dosage du glucose.....	40
2.2.6.2. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HBA1c).....	41
2.2.6.3. Dosage de l'insuline.....	41
2.2.6.4. Dosage des lipides totaux.....	42
2.2.6.5. Dosage du cholestérol.....	43
2.2.6.6. Dosage des triglycérides.....	44
2.2.6.7. Dosage des transaminases TGO/ TGP.....	45
2.2.6.8. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL).....	46
2.2.6.9. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH).....	47
2.2.6.10. Dosage de l' α amylase.....	48
2.2.7. Dosage des paramètres hépatiques du stress oxydant.....	49
2.2.7.1. Préparation de l'homogénat.....	49
2.2.7.2. Dosage des protéines hépatiques.....	49
2.2.7.3. Dosage du glutathion (GSH).....	50
2.2.7.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA).....	51
2.2.7.5. Dosage de l'activité enzymatique du catalase (CAT).....	52
2.2.8. Technique histologique.....	53
2.3. Etude statistique.....	54

Chapitre II. Résultats	55
1. Etude phytochimique.....	55
1.1. Rendement d'extraction.....	55
1.2. Analyse quantitative.....	55
1.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	55
1.2.2. Teneur en flavonoïdes.....	56
1.3. Pouvoir antioxydant <i>in vitro</i>	57
1.3.1. Test scavenger du radical libre DPPH.....	57
1.3.2. Test du piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	58
1.3.3. Test de l'inhibition de la xanthine oxydase.....	59
2. Etude biologique.....	59
2.1. Impact sur la croissance corporelle.....	59
2.2. Etude des paramètres biochimiques sanguins.....	60
2.2.1. Impact sur le profile glucidique.....	60
2.2.2. Impact sur le profile lipidique.....	62
2.3. Impact sur les paramètres enzymatiques.....	65
2.4. Etude de quelques paramètres hépatiques du stress oxydant.....	68
2.5. Etude de l'histoarchitecture du pancréas.....	70
Chapitre III. Discussion	72
Conclusion & Perspectives	82
Références bibliographiques	84
Annexes	i

Liste des communications

Publication

Douaouya, Lilia. and Bouzerna, Nouredine.(2016). Effect of garlic (*Allium sativum*. L) on biochemical parameters and histopathology of pancreas of alloxan-induced diabetic rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 8(6): 202-206.

Communication par affiche

- **Douaouya, Lilia.** et Bouzerna, Nouredine. Etude phytochimique et biologique d'une espèce locale d'ail (*Allium sativum* L.). 9-11 Octobre 2010, *Premières Journées de Chimie de Annaba – JNCA '10*.
- **Douaouya, Lilia.**, Boussekine, Samira., Bouzitouna, Amina. et Bouzerna, Nouredine. Evaluation *in vivo* de l'activité antidiabétique d'une espèce locale d'ail « *Allium sativum* L.» : Aspects biochimique et histologique. Le 28, 29 et 30 Novembre 2011. *Premier Séminaire International sur les Forêts et les Steppes des Milieux Semi-Arides à Djelfa, Algérie*.
- **Douaouya, Lilia.** et Bouzerna, Nouredine. Exploration phytochimique et étude *in vitro* du pouvoir antioxydant de l'*Allium sativum* L.. 23^{ème} *Forum international des Sciences Biologiques et de Biotechnologie* 21 - 24 mars 2012, *Yasmine Hammamet, Tunisie*.

Liste des abréviations

AA	Acide Ascorbique.
HBA1c	Hémoglobine glyquée
ADA	Association Américaine de Diabètes.
AGE	Advanced Glycated End-product (produits terminaux de glycation).
AHDP	Acide hexahydroxydiphénique.
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium.
AMM	Autorisation de mise sur le marché.
AO	Antioxydants.
BHA	Butylhydroxyanisole.
BHQ	Tétra-butylhydroquinone.
BHT	Butylhydroxytoluène.
BSA	Sérum albumine bovine
CAT	Catalase.
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
Cu/Zn-SOD	Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc.
DAG	Diacylglycérol.
D-C	Diabetic control : Contrôle Diabétique
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate.
DPPH	Diphénylpicryl-hydrazyl.
DT-250	Diabétique traité par l'extrait d' <i>Allium sativum</i> à la dose 250mg/kg P.C.
DT-500	Diabétique traité par l'extrait d' <i>Allium sativum</i> à la dose 500mg/kg P.C.
DT-GIb	Diabétique traité par la glibenclamide.
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
EAG	Equivalent Acide Gallique
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique acid.
EOA	Espèces Oxygénées Activées
EQ	Equivalent Quercétine
ERN	Espèces Réactives de l'azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène.
FeCl₃	Trichlorure de fer.
GPx	Glutathion peroxydase
GRase	Glutathion réductase
Grx	Glutarédoxine
GSH	Glutathion réduit
GSH-Px	Glutathion peroxydase.
GST	Glutathion -S- transférase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
H₂SO₄	Acide sulfurique.
HE	Hématoxyline éosine
HGPO	Hyperglycémie provoquée par voie orale
HOCl	Acide hypochloreux.
I%	Inhibition des radicaux libres en pourcentages.

I₂	Diiodé.
IC 50	Concentration inhibitrice à 50 %
L•	Radical libre lipidique
LOO•	Radical peroxyde d'acide gras
LOOH	Lipoperoxyde d'acide gras
LPO	Lipides Peroxydés
MDA	Dialdéhyde malonique ou malone-dialdéhyde
MPO	Myéloperoxydase.
Na₂SO₃	Sulfite de sodium.
N-C	Normal control : Contrôle normal
NH₄OH	Ammoniaque.
NO	Monoxyde d'azote
NOX-2	NADPH oxydase 2
•OH	Radical hydroxyle
1O₂	Oxygène singulet.
O₂•-	Radical superoxyde (anion superoxyde).
OMS	Organisation Mondiale de la Santé.
ONOOH	Nitroperoxyde.
PBS	Tampon phosphate.
PKC	Protéine Kinase C
Pp	Poids de la poudre en gramme
Prx	Peroxy rédoxine
Ps	Poids de l'extrait sec en gramme
PTG	Produits Terminaux de Glycation
RAGE	Récepteur spécifique des produits terminaux de glycation.
RL	Radicaux Libres.
Se-GPx	Glutathionperoxydase séléno-dépendante.
SOD	Superoxyde dismutase.
TBA	Thiobarbituric acid: L'acide thiobarbiturique
TCA	Trichloroacétique.
U/L	Unité internationale / Litre
XO	Xanthine oxydase

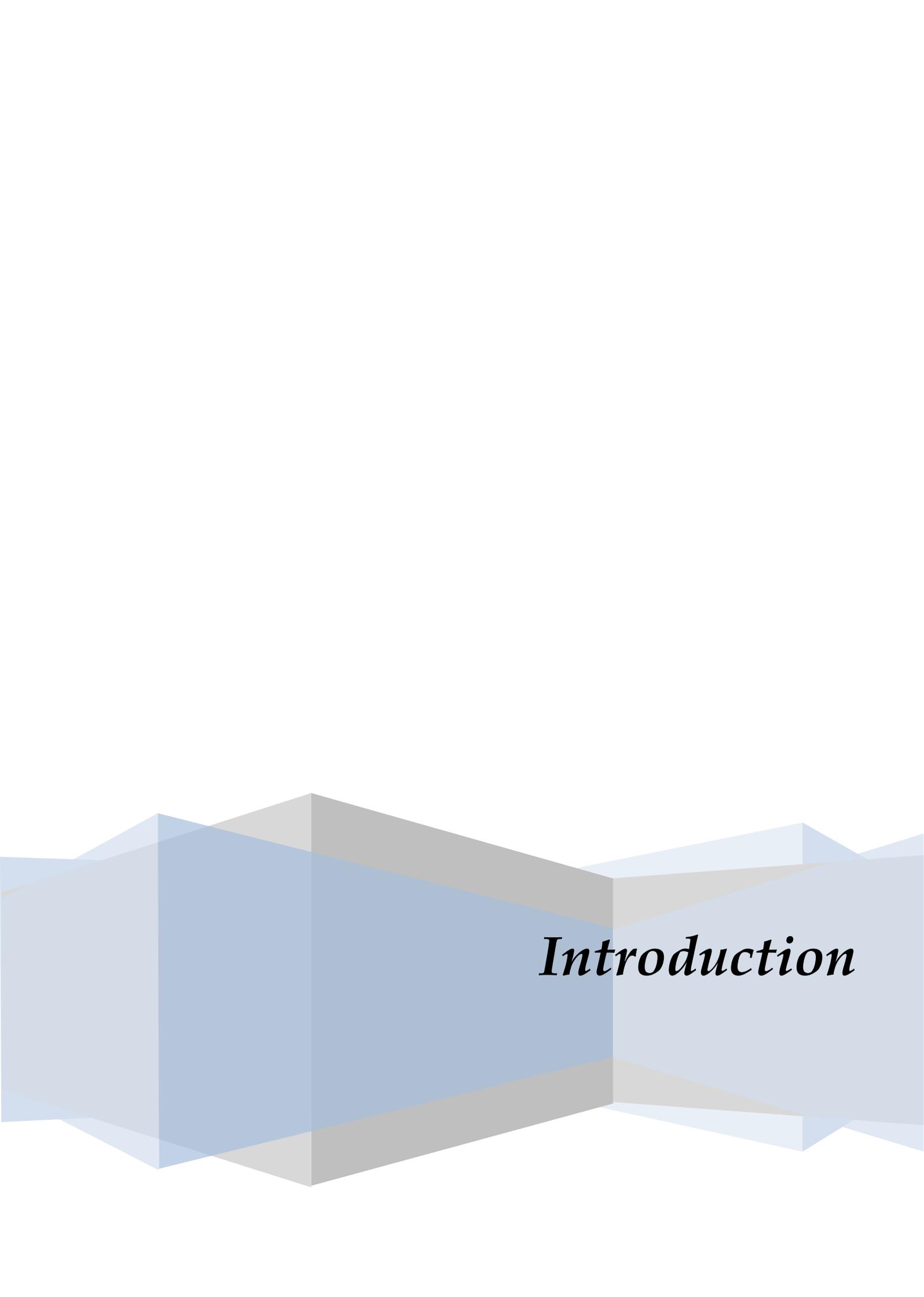
Liste des tableaux

Tableau 1. Classification étiologique des diabètes sucrés.....	04
Tableau 2. Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	08
Tableau 3. Composition de l'alimentation pour un kilogramme d'aliment (ONAB).....	35
Tableau 4. Le rendement d'extrait méthanolique de l' <i>Allium sativum</i> L.	55
Tableau 5. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait de l' <i>Allium sativum</i> L.	57
Tableau 6. Résultats du piégeage du radical libre DPPH, exprimés par la concentration inhibitrice IC50 en µg/ml.....	58
Tableau 7. Résultats du piégeage du peroxyde d'hydrogène, exprimés par la concentration inhibitrice IC50 en µg/ml.....	58
Tableau 8. Effet de l' <i>Allium sativum</i> L. sur l'activité de la xanthine oxydase en comparaison avec l'inhibiteur standard: Allopurinol à la dose 100µg/ml.....	59
Tableau 9. Variation du poids corporel PC (g) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	60
Tableau 10. Variation de la concentration sérique du glucose, l'hémoglobine glyquée et l'insuline chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	61
Tableau 11. Variation de la concentration sérique des lipides totaux, cholestérol et des triglycérides chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	63
Tableau 12. Variation de l'activité enzymatique sérique de la TGO, TGP, PAL, LDH et l'α-amylase chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	65
Tableau 13. Variation de la teneur hépatique en GSH et MDA et l'activité de la catalase chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	68

Liste des figures

Figure 1. Le mécanisme d'action de l'alloxane induisant la génération des radicaux superoxydes dans la cellule bêta du pancréas.....	06
Figure 2. La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.....	07
Figure 3. Mécanisme de production des RO.....	10
Figure 4. Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène. XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450.....	11
Figure 5. Initiation de la peroxydation lipidique.....	12
Figure 6. La propagation de la peroxydation lipidique à d'autres AGPI: réaction en chaîne..	12
Figure 7. Produits terminaux de la peroxydation lipidique.....	13
Figure 8. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	15
Figure 9. Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant.....	16
Figure 10. Relation entre l'hyperglycémie et stress oxydant.....	21
Figure 11. Production de l'anion superoxyde par la mitochondrie.....	22
Figure 12. Les voies de formation des produits de glycation avancés (AGEs).....	24
Figure 13. Contribution de la voie du polyol à la pathogenèse des complications.....	25
Figure 14. Photos de l' <i>Allium sativum</i> L.	27
Figure 15. Forme libre réduite du DPPH.....	33
Figure 16. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	38
Figure 17. Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.....	51
Figure 18. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Moyenne \pm s de trois mesures).....	56
Figure 19. Courbe d'étalonnage de la quercétine (Moyenne \pm s de trois mesures).....	56
Figure 20. Variation du poids corporel chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	60
Figure 21. Variation de la concentration sérique du glucose chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	62

Figure 22. Variation de la concentration sanguine de l'Hb glyquée chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	62
Figure 23. Variation de la concentration sérique de l'insuline chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	62
Figure 24. Variation de la teneur sérique en lipides totaux chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	64
Figure 25. Variation de la cholestérolémie chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	64
Figure 26. Variation de la concentration sérique des triglycérides chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	64
Figure 27. Variation de l'activité enzymatique sérique de la TGO chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	66
Figure 28. Variation de l'activité enzymatique sérique de la TGP chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	66
Figure 29. Variation de l'activité enzymatique sérique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	67
Figure 30. Variation de l'activité enzymatique sérique de lactate déhydrogénase (LDH) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	67
Figure 31. Variation de l'activité enzymatique sérique de l' α -amylase chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	67
Figure 32. Variation de la teneur hépatique en glutathion réduit (GSH) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	69
Figure 33. Variation de la teneur hépatique en malondialdéhyde (MDA) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	69
Figure 34. Variation de l'activité de la catalase hépatique (CAT) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	70
Figure 35. Photos des coupes histologiques du pancréas endocrine des rats N-C, D-C, DT-250, DT-500 et DT-Glb (Coloration : hématoxyline-éosine) 100 X et 400 X.....	69
Figure 36. Courbe d'étalonnage de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT/TGO).....	ii
Figure 37. Courbe d'étalonnage de l'Alanine Aminotransférase (ALAT/TGP).....	iii
Figure 38. Droite d'étalonnage du sérum albumine bovin.....	iii



Introduction

Introduction

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution comme dans le cas du diabète (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2000). Le diabète sucré est un groupe hétérogène de maladies métaboliques dont la caractéristique principale est une hyperglycémie résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (Sharma *et al.*, 2008).

La prévalence mondiale du diabète chez les adultes de plus de 18 ans est passée de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2014 (OMS, 2016) dont l'Algérie en compte 5 millions tout diabète confondu (Guermaz, 2008). Il se caractérise par une hyperglycémie résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées. Il est responsable de 9% de la mortalité totale, tuant chaque année 4 millions de malades ce qui prend les proportions d'une véritable épidémie (Ravi *et al.*, 2005).

Le traitement de cette maladie constitue une des plus grandes préoccupations scientifiques à travers le monde. Ceci est en vue de trouver de nouvelles solutions pour prévenir, voire ralentir la survenue des complications organiques et métaboliques résultantes de l'hyperglycémie chronique.

En général, tous les agents antidiabétiques (antidiabétiques oraux, insuline) ne répondent pas aux besoins des patients en tant qu'un traitement efficace et éventuellement, plusieurs accidents risquent d'être à l'origine d'un état indésirable.

Au cours du diabète le stress oxydant peut être partiellement réduit par les antioxydants. Une supplémentation par des antioxydants, tel que la vitamine C et E, a été proposée comme un traitement complémentaire (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2000). Ainsi, plusieurs métabolites secondaires isolés de plantes ont montré une activité antioxydante et une capacité de prévenir les effets toxiques du stress oxydant au cours du diabète.

Actuellement, la recherche des nouvelles substances à partir des plantes attire tous les flashes et constitue une étape substantielle dans le développement des nouveaux médicaments. Plus de 400 plantes traditionnelles utilisées pour le traitement du diabète sucré ont été enregistrées, mais seulement un petit nombre d'entre elles ont subi un enregistrement scientifique et une évaluation médicale afin de confirmer leurs efficacités. De ce fait, plusieurs phytothérapeutes à travers le monde s'intéressent à la recherche des nouvelles substances d'origine végétale pouvant avoir ce secret.

En s'appuyant sur cette vision, Il devient indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer de nouveaux médicaments accessibles à tous, obtenus à partir des plantes locales, de formulations aisées et peu coûteuses.

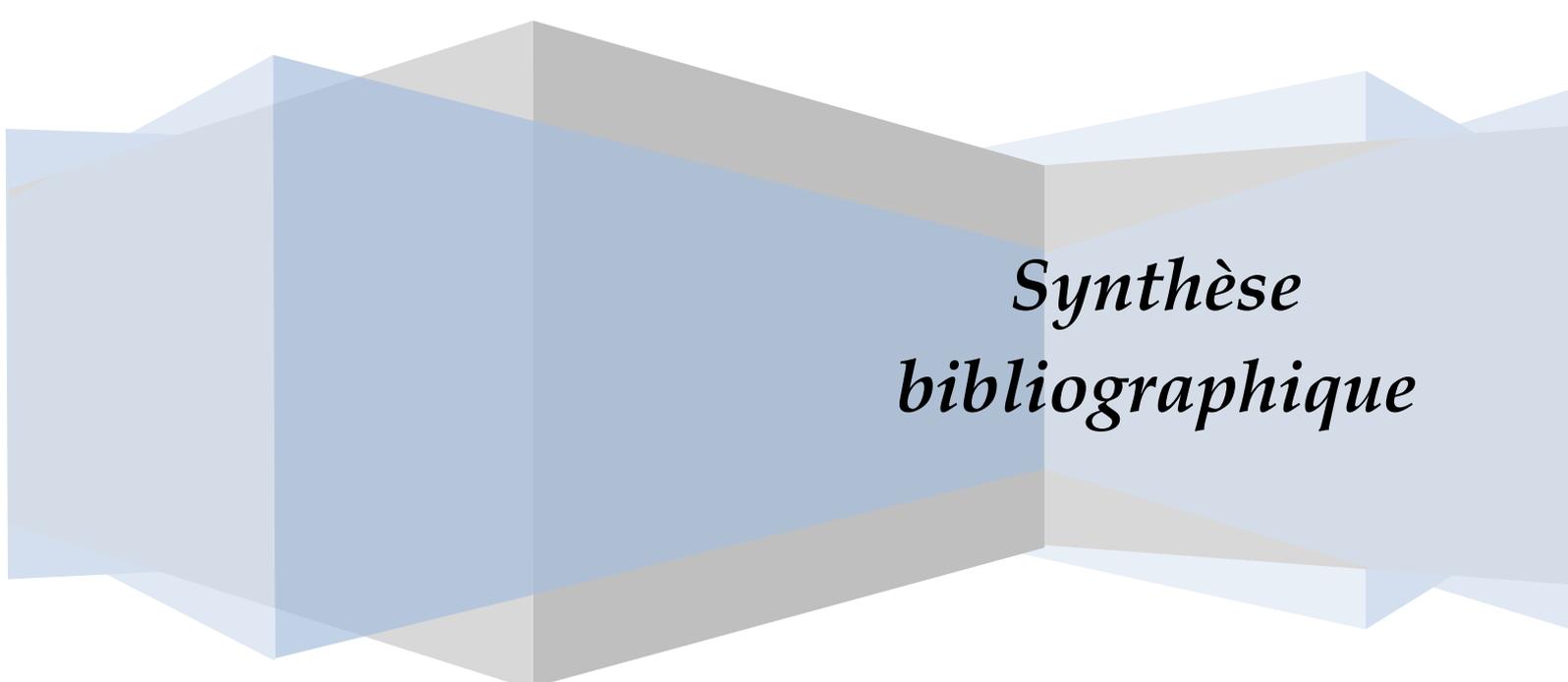
L'ail est une liliacée utilisée dans l'alimentation et les préparations médicinales depuis l'antiquité. Ses molécules biologiquement actives lui confèrent plusieurs vertus thérapeutiques. C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à entreprendre ce travail qui est subdivisé en deux parties essentielles; initié par une synthèse bibliographique consacrée a une revue non exhaustive du diabète sucré, stress oxydant, mécanismes impliqués dans la genèse des radicaux libres dans le diabète, expose la plante médicinale choisie «*Allium sativum L.*» et élucide sa composition en principes actifs et leurs activités biologiques.

La partie pratique consiste d'abord à une étude de la phytochimie quantitative de l'extrait méthanolique lyophilisé d'ail par le dosage des polyphénols et les flavonoïdes ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'activité antiradicalaire via l'effet scavenger du DPPH, neutralisation du peroxyde d'hydrogène et l'inhibition de la xanthine oxydase.

La seconde section s'articule sur la recherche d'éventuels effets antidiabétique et antioxydant de cette variété locale d'*Allium sativum L.* chez le rat mâle Wistar en évaluant les aspects suivants:

- Etude de la variation du poids corporel.
- Dosage des paramètres biochimiques.
- Appréciation des capacités de détoxification hépatique à travers le dosage du GSH, MDA et l'activité du catalase.
- Etude histologique du pancréas endocrine.

Et en fin on discute les résultats obtenus dans cette étude.



*Synthèse
bibliographique*

1. Diabète sucré

Le diabète constitue sans aucun doute l'une des maladies prépondérantes de ce siècle, le terme diabète sucré (diabetes mellitus) décrit une perturbation métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique accompagnée d'une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique (Genin, 2005). Le nombre des personnes atteintes de diabète est passé de 108 millions en 1980 à 422 millions en 2014 (OMS, 2016). L'OMS prévoit qu'en 2030, le diabète sera la septième cause de décès dans le monde (Mathers *et al.*, 2006). Un régime alimentaire sain, l'activité physique, les médicaments, le dépistage régulier et le traitement des complications permettent de traiter le diabète et d'éviter ou de retarder les conséquences qu'il peut avoir (OMS, 2016).

1.1. Classification de diabète

1.1.1. Diabète de type 1

Chez les mammifères dont l'homme, le diabète sucré de type 1 ou diabète du jeune est une maladie auto-immune conduisant à la destruction des îlots de Langerhans produisant l'insuline (Atkinson *et al.*, 1994) par des lymphocytes T et par des auto-anticorps détectés chez 80 à 90% des patients humains diagnostiqués. Chez l'homme, plusieurs gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité ont été incriminés dans la détermination génétique de la maladie. Primitivement considérés comme de moindre importance, les paramètres environnementaux sont actuellement étudiés avec autant d'intérêt que les facteurs génétiques (Wong *et al.*, 1999).

1.1.2. Diabètes de type 2

Le diabète de type 2 souvent appelé à tort diabète de l'adulte résulterait primitivement d'un dysfonctionnement des cellules bêta produisant l'insuline, le tout associé à des causes d'insulino-résistance. Les principaux paramètres induisant un diabète de type 2 sont l'obésité, la résistance à l'insuline et l'hyperlipémie. L'obésité diminue l'affinité de l'insuline vis-à-vis de ses récepteurs et réduit ses effets au niveau post-récepteur (Racchah, 2004).

1.1.3. Autres types de diabètes spécifiques

Les autres types de diabètes spécifiques sont regroupés dans le tableau 1 selon la nouvelle classification étiologique du diabète sucré établit par des experts de l'ALFEDIAM (1999).

Tableau 1. Classification étiologique des diabètes sucrés

<p>I- Diabète de type 1 : (Destruction des cellules B, conduisant habituellement à une carence en insuline absolue) A- D'origine immunologique. B- Idiopathique</p> <p>II- Diabète de type 2 : (Spectre variable, d'une résistance à l'action de l'insuline prédominante avec déficit insulinosécrétoire relatif à in déficit insulinosécrétoire prédominant avec résistance à l'action de l'insuline.)</p> <p>III- Autres types de diabètes spécifiques :</p> <p>A- Défauts génétiques de la fonction des cellules B. 1- Chromosome 12, HNF-1 (anciennement MODY3) 2- Chromosome 7, glucokinase (anciennement MODY2) 3- Chromosome 20, HNF-4 (anciennement MODY1) 4- Mutation de l'ADN mitochondrial 5- Autres</p> <p>B- Défaut génétique de l'action de l'insuline 1- Insulinorésistance de type A. 2- Lepréchaunisme 3- Syndrome de Rabson-Mendenhall 4- Diabète lipoathrophique 5- Autres.</p> <p>C- Diabètes pancréatiques (exocrines) 1- Pancréatites 2- Traumatisme/ pancréatectomie 3- Cancer du pancréas 4- Mucoviscidose 5- Hémochromatose 6- Pancréatite fibrocalculeuse</p> <p>D- Endocrinopathies 1- Acromégalie 2- Syndrome de Cushing 3- Glucagonome</p>	<p>4- Phéochromocytome 5- Hyperthyroïdie 6- Somatostatine 7- Hyperaldostérisme primaire 8- Autres</p> <p>E- Diabètes induits par des médicaments ou des toxiques 1- Vacor (raticide) 2- Pentamidine 3- Acide nicotinique 4- Glucocorticoïdes 5- Hormones thyroïdiennes 6- Diazoscide 7- Agoniste B- adrénergiques 8- Diurétiques thiazidiques 9- Diphenylhydantoïne 10- Interféron α 11- Autres</p> <p>F- Diabète d'origine infectieuse 1- Rubéole congénitale 2- Cytomégalovirus 3- Autres</p> <p>G- Formes rares d'origine auto-immune 1- Syndrome de l'homme raide 2- Anticorps anti-récepteur de l'insuline 3- Autres</p> <p>H- Autres syndromes d'origines génétiques parfois associés au diabète 1- Trisomie 21. 2- Syndrome de klinefelter 3- Syndrome de Turner 4- Syndrome de Wolfram 5- Ataxie de Friedreich 6- Chorée de Huntington. 7- Porphyrie 8- Dystrophie myotonique 9- Syndrome de Prader- Willi. 10-Autres</p> <p>IV- Diabète gestationnel</p>
--	--

1.2. Critères diagnostiques de diabète sucré

D'après l'Américan Diabetes Association (ADA) et l'OMS (2016), le diagnostic du diabète et les troubles de la glycorégulation peuvent être établis de trois façons différentes, qui en l'absence d'une hyperglycémie évidente devront être confirmées par une deuxième mesure :

- Symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement inexplicable, somnolence voire coma) et glycémie quelle que soit l'heure $\geq 2.00\text{g/L}$ ($11,1\text{m mol/L}$)
- Glycémie à jeun $\geq 1,26\text{g/L}$ ($7,00\text{m mol/L}$)
- Glycémie $\geq 2\text{g/L}$ ($11,1\text{m mol/L}$) à la deuxième heure de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)

1.3. Diabète expérimental

Afin d'étudier l'étiologie du diabète et en raison de la gravité de ses nombreuses répercussions métaboliques et dégénératives, l'utilisation des modèles expérimentaux, qui sont utilisés depuis plusieurs décennies, représente autant de voies d'accès de la compréhension de la genèse et les complications de cette pathologie. Les modèles animaux du diabète peuvent être soit spontanés, soit provoqués chirurgicalement, chimiquement, immunologiquement ou par sélection ou génie génétique (Cheta, 1998).

1.3.1. Diabète induit par l'alloxane

L'alloxane (2, 4, 5,6- tetra- oxypyrimidine ; 5,6 – dioxyuracil) est un agent exerçant une activité cytotoxique sur les cellules bêta (Lenzen and Panen, 1988). Comme le produit de sa réduction nommé acide dialurique, l'alloxane établit un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes (Fig. 1). Associé à de fortes doses de calcium cytosolique, il provoque la destruction de la cellule bêta (Szkudelski, 2001). Cette molécule est utilisée dans plusieurs espèces afin d'induire un diabète (Rat, Chien...) et son utilisation peut être couplée à la streptozotocine (STZ), dont l'action est également cytotoxique (Anderson and Stitt, 1993).

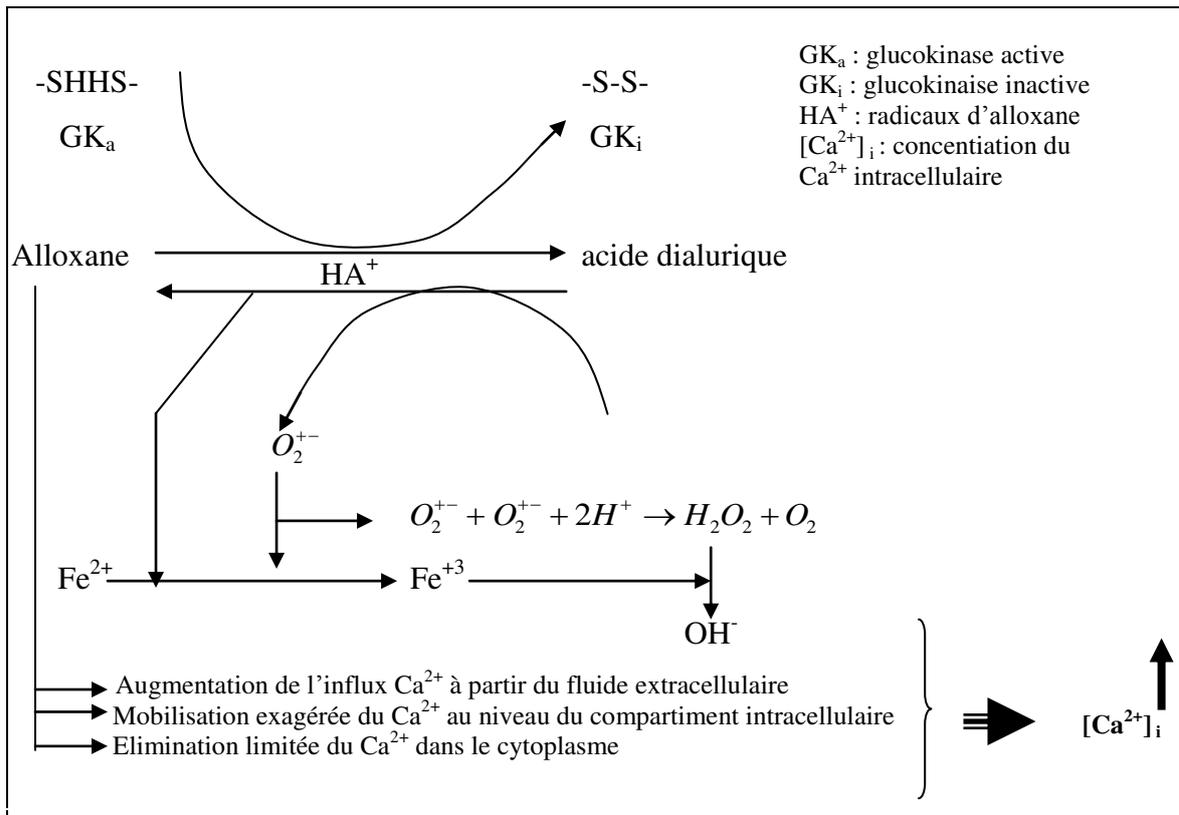


Figure 1. Le mécanisme d'action de l'alloxane induisant la génération des radicaux superoxydes dans la cellule bêta du pancréas (Szkudelski, 2001).

2. Le stress Oxydant

Des espèces réactives de l'oxygène (ERO), parmi elles les radicaux libres, sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace des défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif (Pincemail *et al.*, 2002). Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro oxydants (ERO) et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (Fig.2), (Favier, 2006).

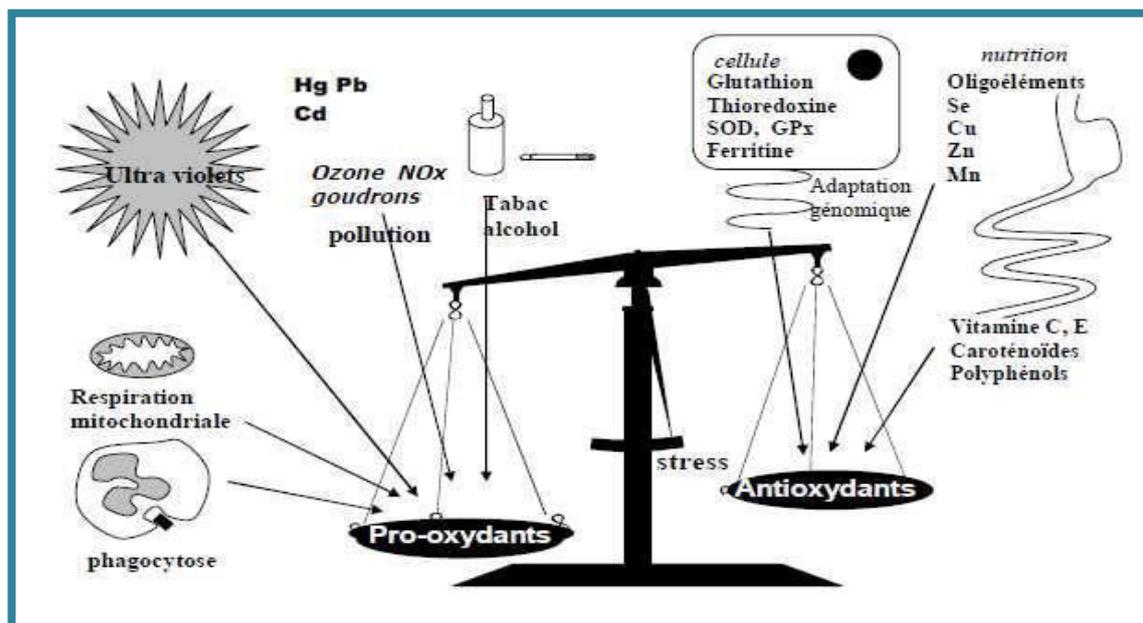


Figure 2. La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres sont des entités chimiques, molécules, morceaux de molécule, ou simple atome possédant un ou plusieurs électrons célibataires (électrons non appariés sur une orbitale), ce qui leur confère une grande réactivité. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable: il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Système redox) (Goudable *et al.*, 1997). Les principales ERO entrant dans les processus physiopathologiques humains sont regroupés dans le tableau 2.

2.2. Production de radicaux libres

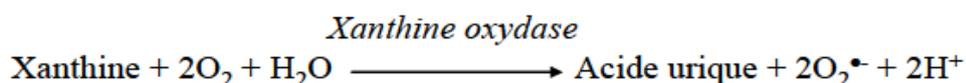
Dans l'organisme, la production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) se fait de manière continue. Ils ont un rôle essentiel à jouer dans certaines fonctions biologiques telles la phagocytose, la régulation de la croissance cellulaire et des signaux intercellulaires et la synthèse d'importants composés organiques. Toutefois, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques en engendrant de sérieuses altérations aux cellules pouvant mener à la mort cellulaire. Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en facteurs endogènes et exogènes.

Tableau 2. Les principales espèces réactives de l'oxygène.

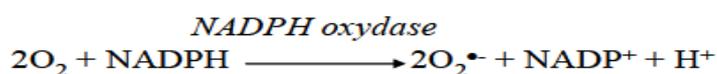
Espèces réactives	Réaction de formation	Propriétés
L'Anion Superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène: addition d'un seul électron $O_2 + 1 e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$	C'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ERO [Koechlin-Ramonatxo. C, 2006].
Le Peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2)	Produit à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysé par la <i>superoxyde dismutase</i> . [Racah. D. 2004]. $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{SOD, 2H^+} H_2O_2 + O_2$	La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) [Gardès-Albert. M et al, 2003].
Le Radical Hydroxyle (OH^{\cdot})	formé par la réaction de <i>Fenton</i> à partir d' H_2O_2 en présence de métaux de transition: L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène [Goudable. J et al, 1997]. $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + \cdot OH$	Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) est le radical le plus avide d'électron et le plus dangereux pour l'organisme [Gardès-Albert M, 2003].
Le Monoxyde d'Azote (NO)	Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O_2) d'autre part en présence de cofacteur: NADH, H^+ , réaction catalysé par les NO synthase (Nos) [Sabry. S et al, 1996].	Le NO est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques (agit sur le tonus vasculaire) [Barouki. R, 2006].
Le Peroxynitrite (ONOO \cdot)	En l'absence d'une quantité suffisante de cofacteurs ou de substrat (arginine), les NOS produisent de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) plutôt que du $NO\cdot$. L' $O_2^{\cdot-}$ produit lie le $NO\cdot$ pour former du <i>Peroxynitrite</i> [Massion. P et al, 2002]	Très réactif et sans doute responsable d'un stress oxydant, Il engendre des oxydations irréversibles et des nitrations diverses (surtouts des résidus tyrosines) [Massion. P et al, 2002]

La principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire, elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires. Il existe de nombreuses autres sources parmi lesquelles l'autooxydation des petites molécules, Les cyclooxygénases et lipooxygénases, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes. L'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson.

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet-}$.



Le NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. Il catalyse le transfert d'électrons de son substrat le NADPH à l'accepteur final l'oxygène entraînant la production d'anions superoxyde et ses dérivés de réduction : le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet.



Les enzymes NO synthases sont responsables de la synthèse de monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) à partir de la L-arginine dans les tissus des mammifères. Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite, composé extrêmement réactif et toxique. Le NO^{\bullet} et le peroxynitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés. D'autres oxydants très puissants existe qu'ils soient des radicaux libres ou non, par exemple, des oxydants chlorés (HOCl) sont libérés par les macrophages et ont une activité bactéricide importante (Fig. 3).

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de

réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS ; des ions superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

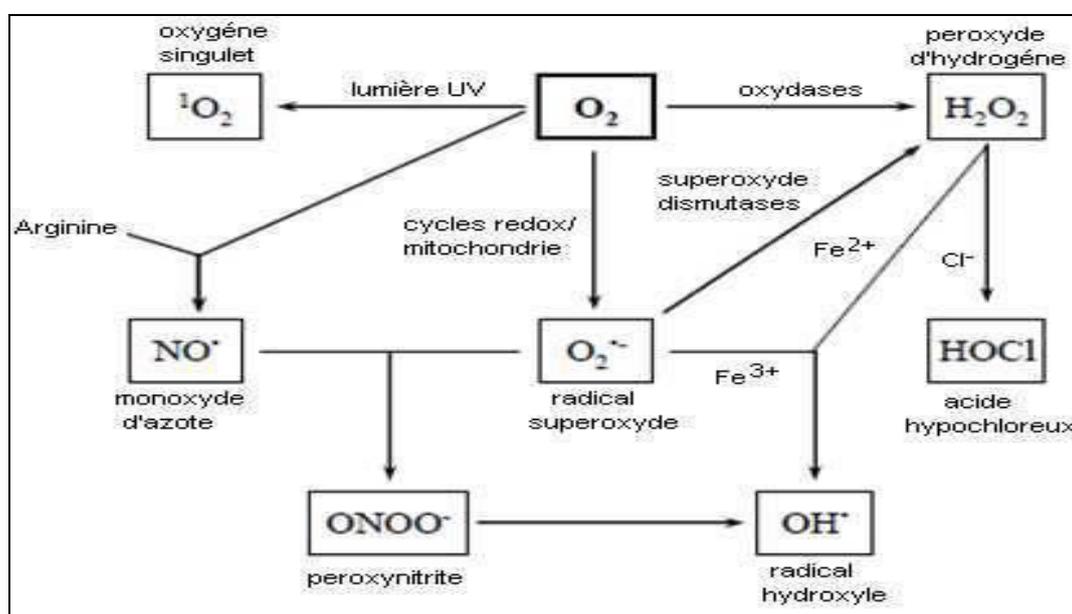
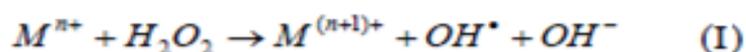


Figure 3. Mécanisme de production des ROS et RNS.

Les métaux de transition participent également au stress oxydant. Leur action conduit à la conversion d'oxydants relativement stables en des radicaux puissants à haute réactivité, suivant la réaction de Fenton (I).



Dont M représente un cation métallique au degré d'oxydation n ou $n+1$.

Les facteurs exogènes sont également très variés. Parmi: Les radiations ionisantes, ultraviolets, micro-ondes, les insecticides, antibiotiques, médicaments, les aliments riches en protéines et/ou en lipides, les polluants ; la fumée ; le SO_2 ; le NO_2 ; le O_3 ; les

hydrocarbures ; les métaux ; l'arsenic ; l'amiante ; le nickel.....etc).

La figure 4 résume les facteurs endogènes et exogènes responsables de la production des radicaux à l'origine du stress oxydatif.

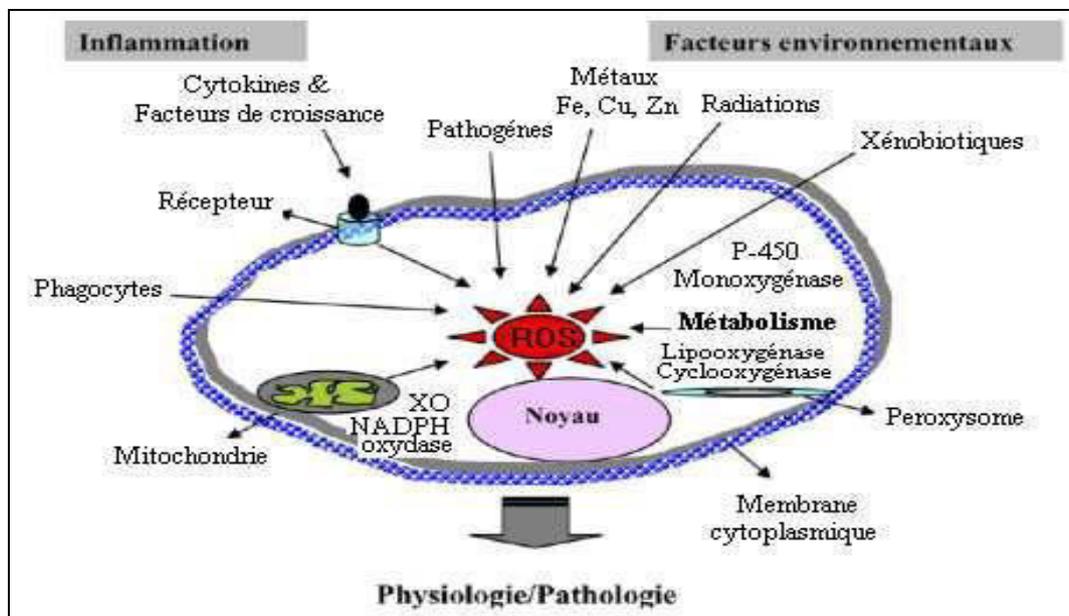


Figure 4. Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène. XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450.

2.3. Atteintes cellulaires

2.3.1. Peroxydation lipidique

Le stress oxydant concerne tous les constituants cellulaires mais ce sont les lipides qui sont les plus touchés par ce phénomène, la peroxydation des lipides résulte de l'attaque par des radicaux libres des acides gras polyinsaturés (acide linoléique, linoléique, arachidonique). Cette réaction est à l'origine de dommages tissulaires responsables de cancers, de maladies inflammatoires, du vieillissement et de lésions vasculaires comme l'athérosclérose (Racciah, 2004).

Le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons (Fig. 5), pour former un radical diène conjugué, qui en présence d'oxygène va être oxydé en radical peroxy. C'est l'étape d'initiation (Hennebelle *et al.*, 2004).

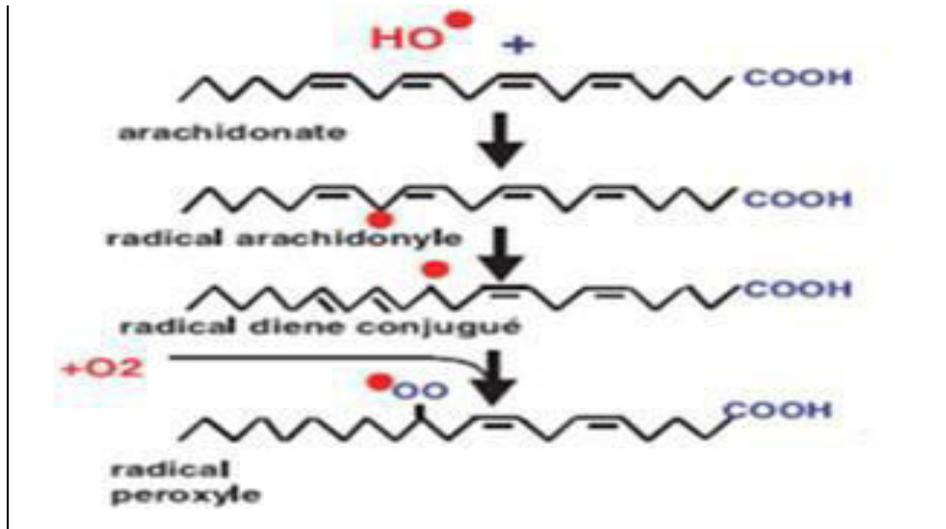


Figure 5. Initiation de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, car le radical peroxyde formé va s'attaquer à un acide gras voisin et se transformer en hydroperoxydes tandis que le 2ème acide gras rentre dans le même circuit de peroxydation pour former un nouveau radical diène conjugué qui sera oxydé par l'oxygène pour former le 2ème radical peroxy qui s'attaquera au 3ème acide gras conduisant à une réaction en chaîne (Fig. 6); c'est la propagation (Favier, 2003).

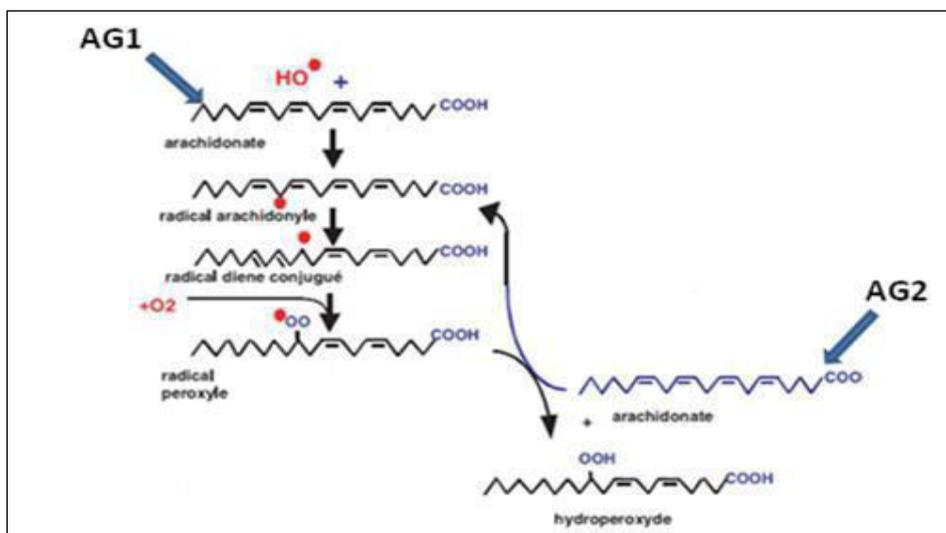


Figure 6. La propagation de la peroxydation lipidique à d'autres AGPI: réaction en chaîne (Favier, 2003).

Une partie des hydroperoxydes formés vont être réduits et neutraliser par le glutathion peroxydases, Les hydroperoxydes non réduits vont se décomposer facilement en différents produits, les plus étudiés sont les aldéhydes: malondialdéhyde (MDA), l'hydroxynonanal et les isoprostanes (Fig. 7), (Therond, 2006).

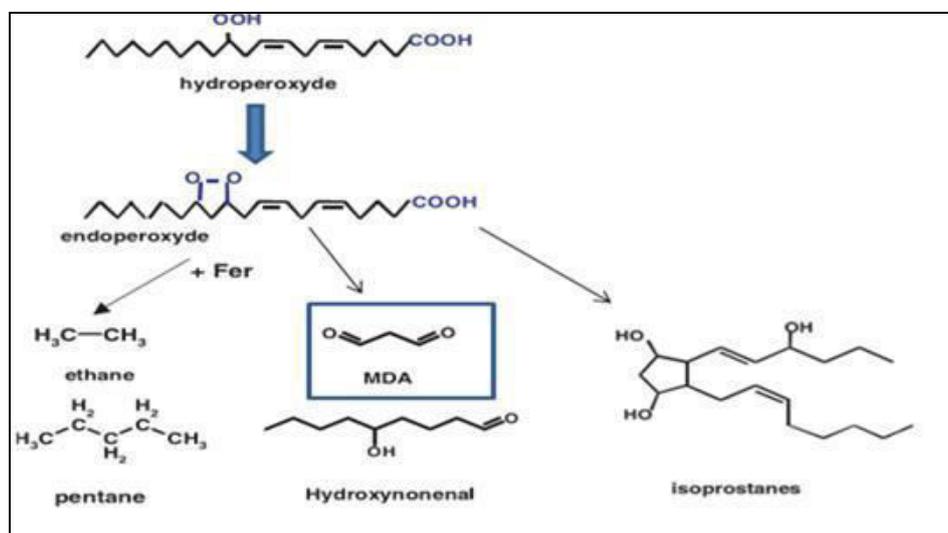


Figure 7. Produits terminaux de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des hydroperoxydes. En raison de son caractère mutagène et athérogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des hydroperoxydes (Flourie, 2006), il est considéré comme ayant une implication dans l'initiation des cancers (Cadet J, 1997). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes (oxydation des LDL) ou les phospholipides membranaires et elle est très dommageable pour les cellules tant au niveau de leur fonction que sur les propriétés de leurs membranes: altération de la fluidité membranaire, augmentation de leur perméabilité, diminution du potentiel de membrane, voire rupture (Raccach, 2004).

2.3.2. Oxydation des sucres

Les sucres sont attaqués par les ERO (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ ou des radicaux peroxydes d'AG), avec abstraction d'hydrogène au niveau d'une des liaisons CH-OH. Le radical alkyles ($\cdot C-OH$) ainsi formé se combine immédiatement avec de l'oxygène pour former un carbonyle ($C=O$) et expulser un radical hydroperoxyde ($\cdot OOH$). L'opération se

prolonge jusqu'à former un composé dicarbonylé (Spiteller, 2006). Par auto-oxydation des sucres comme le glucose forment des composés dicarbonylés (contenant deux C=O), dont les plus connus sont les glycolaldéhydes, qui pourront se lier à des protéines par réaction de Maillard et altérer les propriétés chimiques de celles-ci (Wells-Knecht *et al.*, 1995). Ceci a été démontré chez des diabétiques et a été corrélé avec la sévérité de la maladie à travers des protéines glycosylées (Glomb and Monnier, 1995).

2.3.3. Oxydation des protéines

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible des réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications, ces modifications provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans les protéines. Ces groupements carbonyles peuvent être générés soit par oxydation directe des acides aminés, soit par conjugaison avec des produits de peroxydation lipidique ou encore par glycation. Ces modifications conformationnelles induisent des pertes de fonctions et stimulent l'activité protéolytique du protéasome (Levine, 2002). Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories :

D'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique. Et d'autre part, les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidiques comme le 4-HNE. Ces changements sont-elles qui conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique, ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002).

Les protéines comportant un pont sulfhydrique sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, c'est le cas de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH) (Sen, 2001).

Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées et participent à la restauration de la fonction de ces protéines (Welch, 1992). Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide, et la synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig and Nosek, 1997).

2.3.4. Oxydation des acides nucléiques

L'ADN (ADN), qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Les radicaux $O_2^{\bullet-}$ et OH^{\bullet} provoquent des lésions de l'ADN

(Ramonatxo, 2006). Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\bullet\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine ou entraîner des cassures au niveau de la double hélice d'où le rôle mutagène des ERO (Haleng *et al.*, 2007; Duranda *et al.*, 2013).

Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique. De par leur action sur les principaux constituants moléculaires de la cellule, les ERO induisent différents signaux cellulaires susceptibles d'activer les systèmes de protéolyse et de mort cellulaire (Hartmann and Niess, 2000; Ramonatxo, 2006). La figure 8 résume les dommages de l'ADN causés par les radicaux libres.

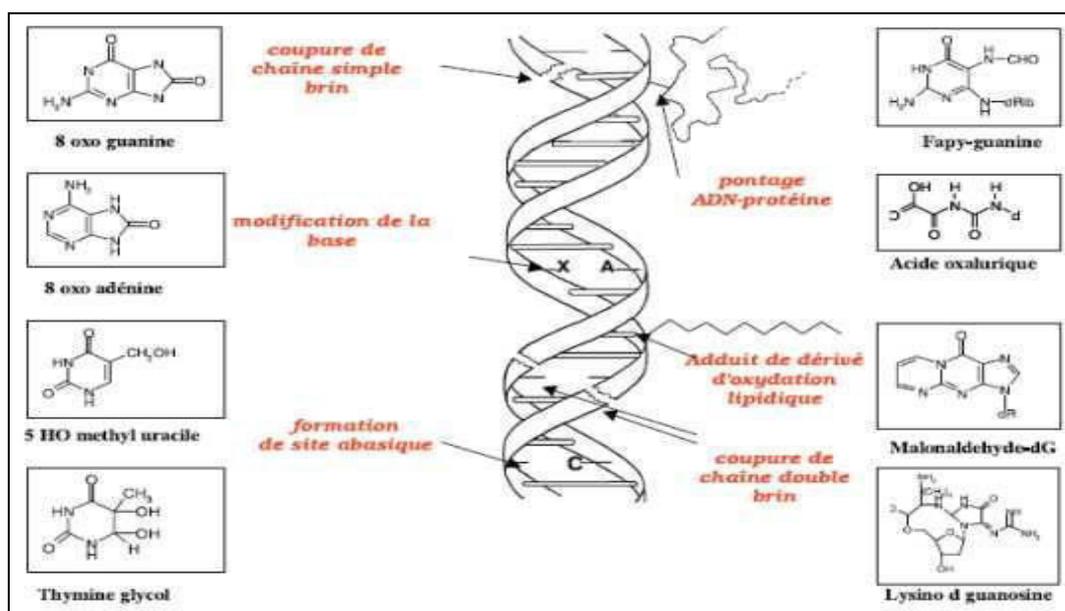


Figure 8. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

2.4. Les systèmes de défenses antioxydantes

L'organisme dispose des systèmes de protection contre les ERO. Le terme d'antioxydants est utilisé pour caractériser un ensemble de substances ou composés, de nature diverse, dont la caractéristique commune est d'être capable de s'opposer ou de contrôler l'accumulation au niveau cellulaire de radicaux libres (Herberg *et al.*, 2006).

Cette propriété leur permet d'agir directement ou indirectement en tant que moyen de défense contre le stress oxydatif dont les stratégies sont variées (Fig. 9).

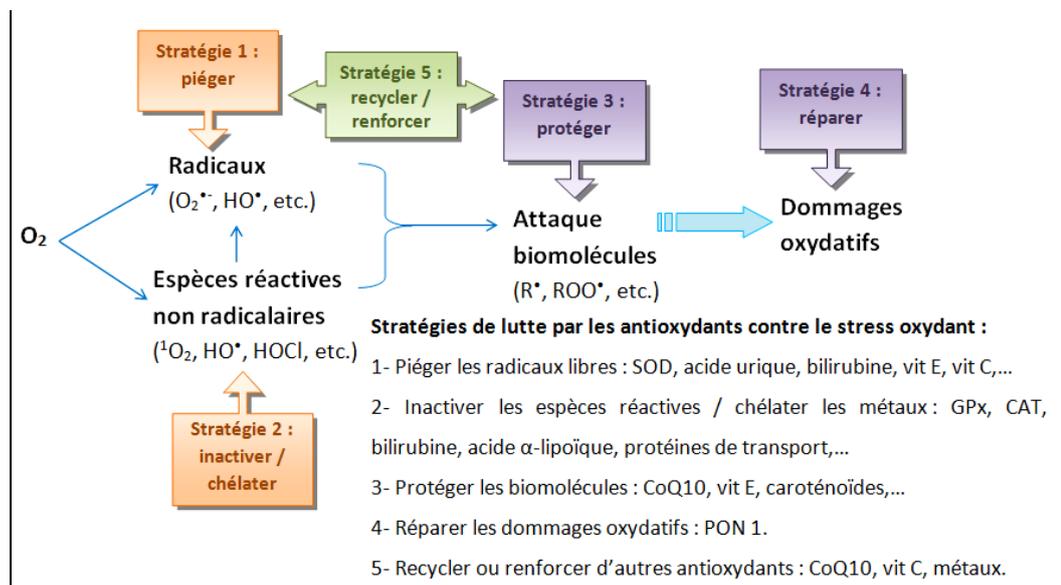


Figure 9. Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant (Grandjean, 2005).

2.4.1. Antioxydants enzymatiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. Les trois enzymes antioxydantes majeures sont les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx) et la catalase (CAT).

2.4.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

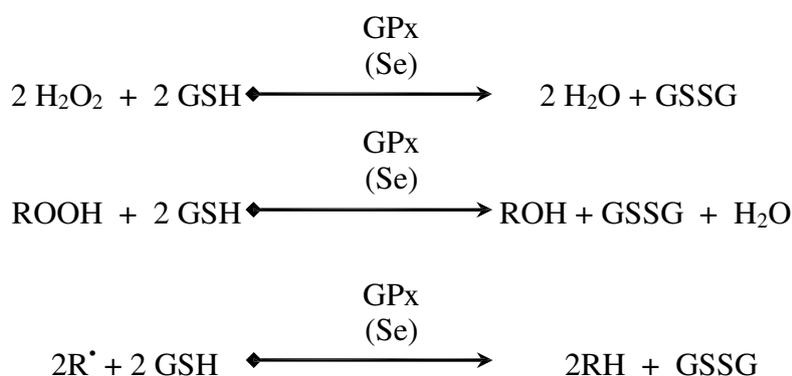
La superoxyde dismutase (EC. 1.15.1.1) est l'un des antioxydants enzymatiques intracellulaires les plus efficaces (Rahman, 2007), elle est répandue dans la nature dans les organismes eucaryotes et procaryotes. Il existe trois types de SOD à savoir, la Cu/Zn-SOD cytosolique, la Mn-SOD mitochondriale et la Cu/Zn-SOD extracellulaire (Zelko *et al.*, 2002). Ces trois types diffèrent par la nature du métal du site actif, la composition en acides aminés, les cofacteurs et d'autres caractéristiques (Rahman, 2007). Chez l'homme, les plus hauts niveaux de la superoxyde dismutase se trouvent dans le foie, la glande surrénale, les reins et la rate (Scheibmeir *et al.*, 2005). La SOD convertit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Matès, 2000).



2.4.1.2. La glutathion peroxydase (GPx)

Les glutathions peroxydases (EC 1.11.1.9) présentes dans la plupart des tissus de mammifères, sont des enzymes formées de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Elles catalysent la réduction par le glutathion réduit (GSH) du peroxyde d'hydrogène en eau et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (ROOH) en alcools et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires.

Les réactions mises en jeu sont les suivantes (Reichel, 2010) :



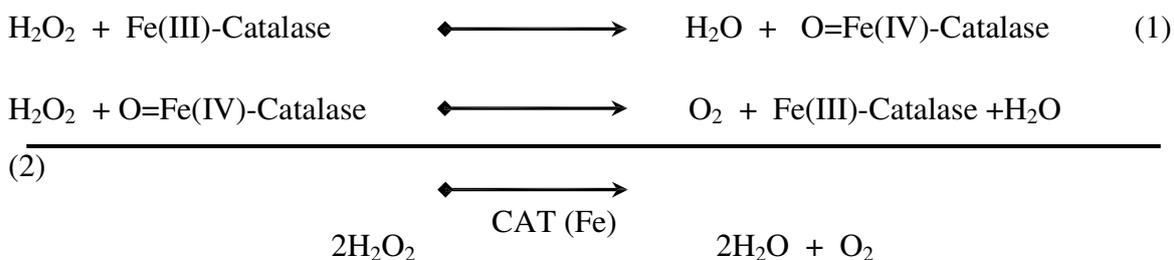
L'action des GPx dépend de la biodisponibilité en GSH, glutathion réductase (GR) et NADPH. La GR catalyse la réduction du glutathion oxydé GSSG (obtenue dans chacune des réactions précédentes) en glutathion réduit GSH à l'aide du cofacteur NADPH, provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par la glutathion-6-phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphates (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) :



On distingue 5 isoenzymes de la GPx contenant du sélénium chez les eucaryotes: la GPx1 ou c-GPx cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 ou gi-GPx gastrointestinale, la GPx3 ou p-GPx plasmatique, la GPx4 membranaire ou hydroperoxyde phospholipide glutathion peroxidase (HP-GPx) et la GPx5 ou sn-GPx épидidymaire (Comhair et Erzurum, 2002). La plus abondante est la GPx1 qui est exprimée dans la plupart des cellules.

2.4.1.3. La catalase (CAT)

La catalase (EC 1.11.1.6) est une protéine hémique, formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constituent les sites actifs de la CAT (Delattre et *al.*, 2005). Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003). Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un coupement Fe(IV)=O très oxydant; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de H₂O₂ pour donner du dioxygène. Cette réaction est illustrée par les deux demi-équations suivantes (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003):



La catalase est essentiellement présente dans les érythrocytes et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (Reichel, 2010).

2.4.2. Systèmes non enzymatiques

2.4.2.1. Le glutathion

Le glutathion ou γ -glutamyl-cystéinyl-glycine, le plus abondant thiol libre non protéique dans les cellules, existe en équilibre entre deux formes, l'une réduite (GSH), et autre oxydée (GSSG). Le glutathion constitue un acteur essentiel de la défense antioxydante dans la lutte contre le stress oxydant. La liaison γ -glutamyl ainsi que la fonction thiol du GSH lui confèrent un grand nombre de fonctions : le transport des acides aminés, la synthèse des œstrogènes, des prostaglandines, et des leucotriènes, la détoxification des métaux lourds et autres xénobiotiques par action directe ou indirecte. La forme réduite (GSH) rentre dans la détoxification en réagissant avec le (H₂O₂), (ROOH), et (\cdot OH) grâce à son pouvoir réducteur (Griffith et Mulcahy, 1999).

Le rapport GSH/GSSG est hautement régulé par le système glutathion

réductase. Cependant si le niveau de stress excède la capacité de la cellule de réduire le GSSG, le GSSG peut s'accumuler (Griffith et Mulcahy, 1999). Par conséquent le rapport (GSH/GSSG) est un indicateur dynamique du stress oxydant (Dans les cellules non stressées, 99% du glutathion est présent sous sa forme réduite GSH) (Ji *et al.*, 1992 ; Almutairi *et al.*, 2007).

2.4.2.2. Vitamine E (tocophérol)

La vitamine E est un terme générique pour tous les tocophérols et les tocotriénols, desquels existent 8 dérivatifs et dont l' α -tocophérol est le plus abondant (Shils *et al.*, 2006). La vitamine E agit directement sur une grande variété d'ERO pour former un radical peu réactif. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie principalement par la vitamine C, mais également par d'autres composés comme le GSH, la vitamine A et l'ubiquinol. La vitamine E est liposoluble et a été démontrée comme le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Shils *et al.*, 2006; Traber and Atkinson, 2007). Elle pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Lyn Patrick, 2006).

2.4.2.3. Les caroténoïdes (Vitamine A)

La vitamine A est un nom générique pour les rétinoïdes (rétinol, rétinal et acide rétinoïque) et les provitamines A ou les caroténoïdes (béta-carotène, lutéines, lycopènes,...). Le β -carotène est le principal précurseur de la vitamine A. Les autres caroténoïdes peuvent être de puissants antioxydants, mais ils sont moins connus et abondants. Les caroténoïdes piègent les molécules d'oxygène singulet formées par les radiations solaires. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont également de bons piègeurs de radicaux peroxydes. Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être détruite (Goudable et Favier, 1997).

2.4.2.4. L'ubiquinol (Coenzyme Q10)

Le coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons présent dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipoperoxydation (Powers et Jackson, 2008). Il assure également un recyclage de la vitamine E, par réduction de la forme oxydée (Ernster et Forsmark-Andree, 1993).

2.4.2.5. Vitamine C (Acide ascorbique)

La vitamine C (acide ascorbique) est l'un des principaux antioxydants

hydrosolubles, présent dans les fluides intra et extracellulaires. Ces activités biologiques viennent de son puissant potentiel réducteur, agit principalement en piégeant directement et très efficacement les radicaux superoxydes et hydroxyles, elle peut aussi recycler la vitamine E pour l'aider à prévenir l'oxydation des lipides (Packer *et al.*, 1997; Evans, 2000).

2.4.2.6. Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des éléments essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GSH-Px de sélénium (Garait, 2006).

2.4.2.7. Les polyphénols

Quantitativement, les principaux antioxydants diététiques sont les polyphénols, leurs apports alimentaires journaliers sont d'environ 1 g (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Ils sont un groupe de molécules chimiques produites par des plantes, caractérisées par la présence d'unités phénoliques dans leur structure moléculaire (Masaki, 2010). Les polyphénols comprennent une multitude de structures chimiques, à partir de molécules simples comme les acides phénoliques, aux composés hautement polymérisés, tels que les tannins condensés (Galleano *et al.*, 2010). L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement attribuable à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène et extincteurs (quencher) de l'oxygène singulet. En outre, ils peuvent également posséder des propriétés de chélation métallique (Gülçin *et al.*, 2010). La famille la plus abondante de polyphénols présents dans l'alimentation humaine, est les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont constitués de deux noyaux aromatiques, le phénol et la pyridine, reliés par trois atomes de carbone qui proviennent souvent d'un hétérocycle oxygéné (Galleano *et al.*, 2010).

Les effets protecteurs des flavonoïdes contenus dans le système biologique sont attribués à leur capacité à activer les enzymes antioxydantes, réduire les radicaux de l' α -tocophérol, inhiber les oxydases (Heim *et al.*, 2002), se lier à des molécules telles que les enzymes, les transporteurs d'hormones et l'ADN, chélater les ions métalliques de transition, catalyser le transport des électrons, et piéger les radicaux libres, y compris des anions superoxydes (Lemańska *et al.*, 2001). La bioactivité des flavonoïdes, et notamment de la quercétine qui a été très étudiée ne s'arrête pas uniquement aux

réactions piégeuses de radicaux, mais aussi aux actions anti-cancérigènes, anti-inflammatoires, anti-agrégants ou encore vasodilatateur (Erlund, 2009; Vicentini *et al.*, 2011).

3. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète

L'hyperglycémie est considérée comme l'élément initiateur des dommages tissulaires diabétiques visant notamment les cellules endothéliales des capillaires de la rétine, les cellules mésangiales des glomérules rénaux, les neurones et les cellules de Schwann des nerfs périphériques. En effet, ces cellules n'étant pas capables de maintenir constantes leurs concentrations en glucose, en condition d'hyperglycémie, il en résulte une augmentation de sa concentration intracellulaire. Le glucose est capable d'interagir avec les molécules qui l'entourent. Les effets délétères de l'hyperglycémie peuvent être expliqués par plusieurs mécanismes biochimiques (Fig.10) dont l'auto-oxydation du glucose, les produits avancés de glycation ou « Advanced Glycation End-products » (AGE), l'activation de la protéine kinase C, la voie des polyols et la voie des hexosamines (Nègre-Salvayre *et al.*, 2009).

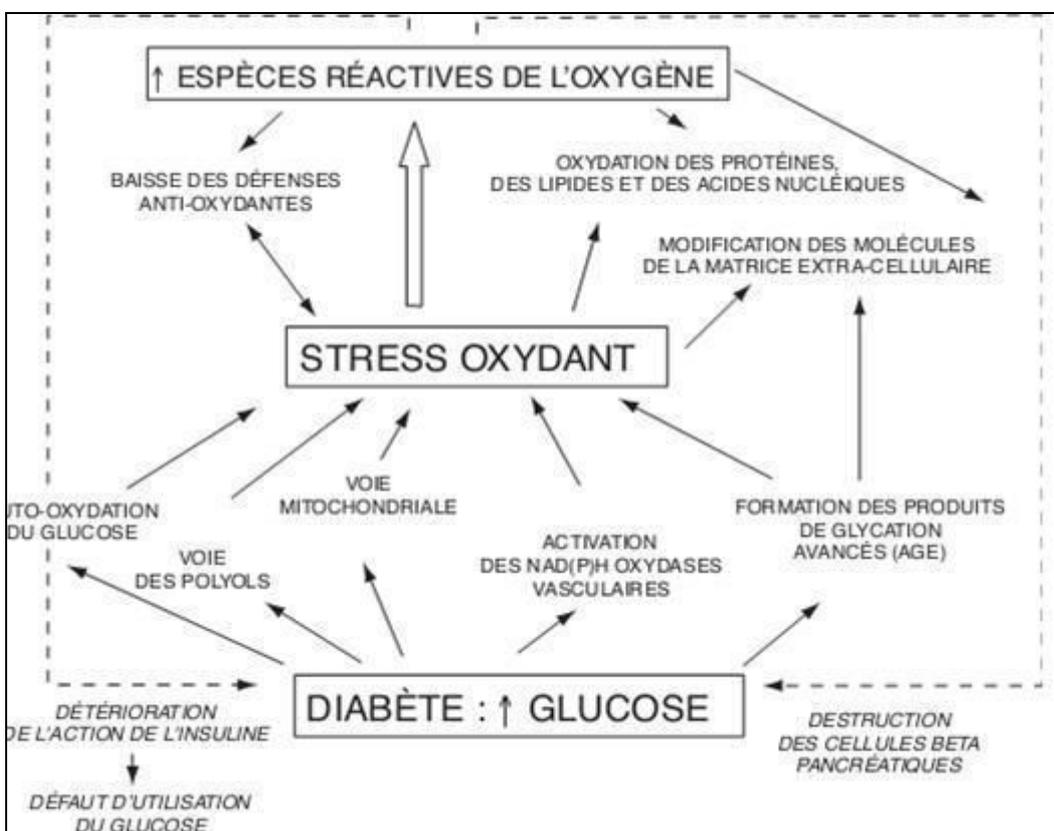


Figure 10. Relation entre l'hyperglycémie et stress oxydant (Bonnefont-Rousselot, 2004).

1.1. Auto-oxydation du glucose

La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de quatre complexes protéiques nommés I, II, III et IV. En conditions normales, lorsque le glucose est métabolisé *via* le cycle des acides tricarboxyliques, il génère des donneurs d'électrons. Le principal est le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH,H⁺), donnant des électrons au complexe I, et l'autre est le flavine adénine dinucléotide réduit (FADH₂), formé par la succinate déshydrogénase, donnant des électrons au complexe II. Les électrons ainsi récupérés sont transférés au coenzyme Q puis au complexe III, au cytochrome c, au complexe IV et finalement à l'oxygène moléculaire, ainsi réduit en eau. L'énergie de ces électrons est utilisée pour pomper des protons à travers la membrane mitochondriale via les complexes I, III et IV. Ceci génère un potentiel de membrane, utilisé par l'adénosine triphosphate (ATP) synthase pour produire de l'ATP ou par les « uncoupling protein » (UCP) pour générer de la chaleur.

Dans des conditions où les concentrations de glucose intracellulaire augmentent, une plus grande quantité de glucose est métabolisée, fournissant plus de donneurs d'électrons. Le potentiel de membrane augmente jusqu'à un seuil critique où le transfert des électrons au complexe III est bloqué (Korshunov *et al.*, 1997).

Ces derniers sont alors données à l'O₂, un à un, par le coenzyme Q conduisant à la formation d'anion superoxyde (Fig.11).

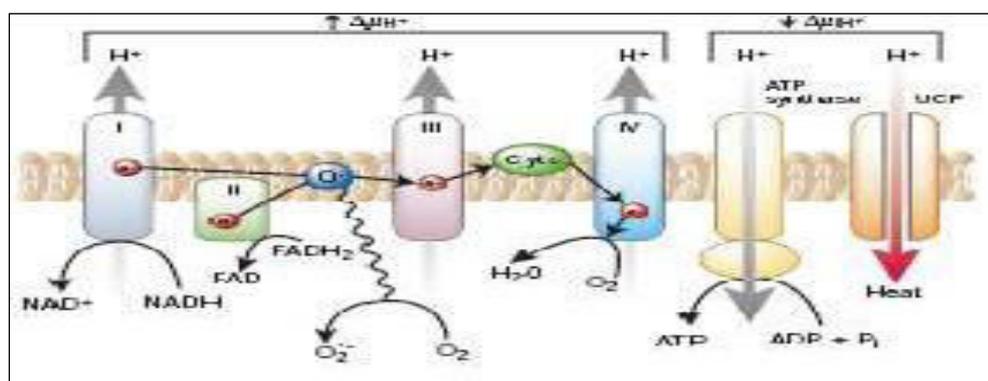


Figure 11. Production de l'anion superoxyde par la mitochondrie.

1.2. Glycation et produits avancés de glycation

La glycation des protéines est un processus de condensation non enzymatique du glucose avec des protéines pour former des adduits covalents stables (Fig.12). Il s'ensuit des altérations structurales et fonctionnelles.

Dans des conditions physiologiques, le glucose en solution existe sous deux formes en équilibre, cycle pyranose stable ou aldéhyde à chaîne ouverte (Bunn and Higgins, 1981). La réaction découverte par Maillard met en jeu le groupement aldéhyde du glucose (ou de ses dérivés comme le glycoaldéhyde ou le méthylglyoxal) et les groupements amines des protéines (lysines, hydroxylysines, arginines, histidines ou acides aminés N-terminaux), les lipides et les acides nucléiques (Shinohara *et al.*, 1998). Considéré comme précurseur d'AGE, il forme une base de Schiff réversible sur les groupements amines. Ces produits subissent ensuite un réarrangement d'Amadori conduisant à des céto-amines, bien plus stables. Ces dernières peuvent subir d'autres modifications avant de se fragmenter (ex: carboxyméthyllysine) ou de se réarranger en dicarbonyles (ex: 3- desoxyglucosone, qui peut, à son tour, réagir avec d'autres groupements amines), conduisant une famille hétérogène de composés connus sous le nom d'AGE. Ces derniers se forment dès le développement embryonnaire à un taux constant, mais lent (Hernebring *et al.*, 2006). Au cours du diabète, cette formation est largement accélérée en raison de l'hyperglycémie. Trois mécanismes semblent expliquer les dommages cellulaires.

Les précurseurs d'AGE peuvent entraîner la modification de protéines intracellulaires structurales (protéines du cytosquelette et de myéline des nerfs périphériques, protéines de la cornée et du cristallin). Les AGE peuvent alors conduire à la synthèse de certaines protéines (Brownlee, 2005).

Ils peuvent également diffuser en dehors de la cellule et modifier des molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène ou la fibronectine (Charonis *et al.*, 1990), causant des dysfonctions cellulaires.

Enfin, ces précurseurs peuvent aussi modifier des protéines circulantes du sang comme l'hémoglobine A1c (HbA1c) (Koenig *et al.*, 1976), l'albumine, les protéines membranaires érythrocytaires ou encore les apolipoprotéines B100 (Tames *et al.*, 1992). Ces protéines modifiées se lient alors à des récepteurs aux AGE (RAGE) qui induisent l'expression de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1,...), de facteurs de croissance et de molécules d'adhésion (« Vascular Cell Adhesion Protein » (VCAM)) (Li *et al.*, 1996).

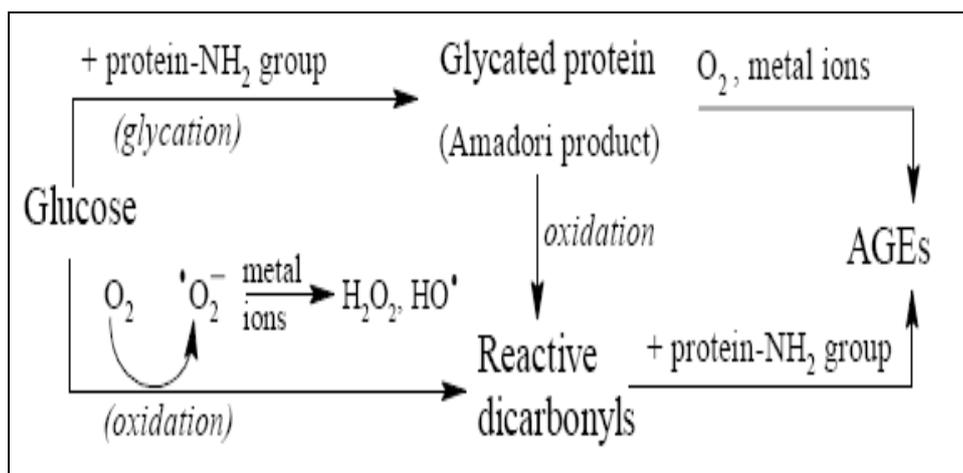


Figure 12. Les voies de formation des produits de glycation avancés (AGEs).

3.3. Activation de la protéine kinase C

Dans une autre voie, la di hydroxy acétone-phosphate (DHAP) peut être réduite en glycérol-3-phosphate et ainsi augmenter la synthèse *de novo* de diacylglycérol (DAG), qui active différentes isoformes de la PKC (β , δ et α). L'activation de la PKC a des effets sur l'expression de gènes pro-inflammatoires et augmente la production de ROS par la NADPH oxydase (Brownlee, 2005).

3.4. Voie des polyols

Dans des conditions physiologiques normales (normoglycémique), le glucose est métabolisé en glucose-6-phosphate par l'héxokinase puis dirigé soit dans la voie de la glycolyse, soit dans la voie des pentose-phosphates. Le métabolisme du glucose par la voie des polyols représente un faible pourcentage (3%) de l'utilisation totale du glucose en conditions normoglycémique (Bouldjadj, 2009). Dans le diabète, lorsque le taux du glucose augmente, l'héxokinase est alors saturée et le glucose en excès est en partie métabolisé par la voie des polyols dans les tissus insulino-indépendants (à peu près 30% du glucose), comme les reins, le tissu neuronal ou les microvaisseaux rétiniens (Gonzalez *et al.*, 1984). Sous l'effet de l'aldose réductase, le glucose est réduit en sorbitol par le NADPH. Le sorbitol est ensuite oxydé en fructose en présence de NAD⁺ par la sorbitol-déshydrogénase (Raccach, 2004). Cette voie va conduire à une déplétion intracellulaire de NADPH puisque le NADPH est nécessaire à l'activité de l'aldose réductase (Fig.13). Le déficit intracellulaire de NADPH a pour conséquence une faible régénération du glutathion réduit à partir du glutathion oxydé (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2004).

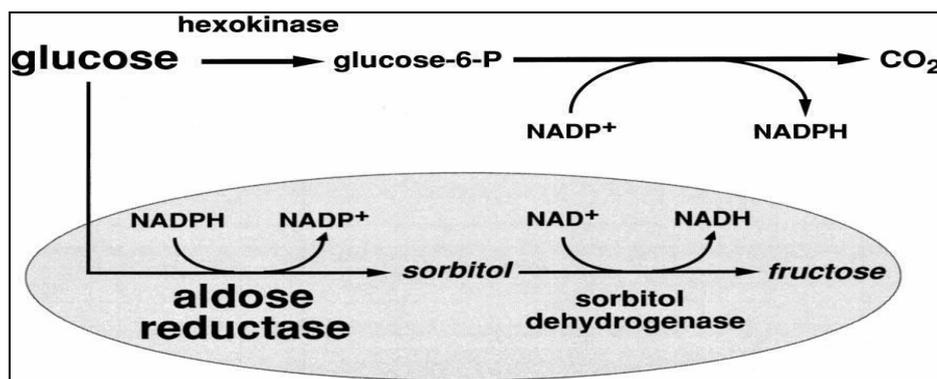


Figure 13. Contribution de la voie du polyol à la pathogénèse des complications.

3.5. Métabolisme des hexosamines

Lorsque les concentrations de glucose intracellulaire sont élevées, la majorité de ce dernier est métabolisé *via* la glycolyse. Cependant, une partie du fructose-6 phosphate est détournée de cette voie et est converti en glucosamine-6 phosphate par la glutamine fructose-6 phosphate aminotransférase. Celui-ci est ensuite converti en uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine qui va modifier différents facteurs de transcription conduisant à l'expression de gènes et à la synthèse de protéines tels que « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β) et « Plasminogen Activator Inhibitor-I » (PAI-1) (Du *et al.*, 2000).

4. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité

Généralement, tous ces agents antidiabétiques causent différents effets secondaires qui varient selon la classe et la génération du médicament (Marles et Farnsworth, 1994). Précisément, les sulfamides provoquent un état d'hypoglycémie. Cet effet est considéré comme principal (Dey *et al.*, 2002) à côté de l'hyponatrémie, l'hépatite, les atteintes hématologiques, l'éventuelle réaction dermatologique (Marles et Farnsworth, 1994) ainsi qu'un gain de poids dû à l'hyperinsulinémie (Dey *et al.*, 2002).

A cause de leurs effets secondaires très graves, certains Biguanides ont été éliminés du marché. La metformine, le biguanide le plus commercialisé dans le monde, n'est plus disponible aux Etats Unies car il provoque des états d'acidose lactique (Marles and Farnsworth, 1994), fatigues, nausées ainsi qu'une toxicité rénale (Dey *et al.*, 2002).

Similairement, les autres antidiabétiques oraux ne sont pas sans effets secondaires. L'acarbose, un médicament de la classe des inhibiteurs des alpha-glucosidases présente divers effets secondaires, principalement : les gaz, le ballonnement et la diarrhée (Dey *et*

al., 2002).

Cependant, un bon nombre de publications ont démontré que les thiazolinediones ou TZD avaient des effets délétères sur le tissu osseux dans des modèles animaux, ce que des études récentes semblent maintenant confirmer chez l'homme (Grey A, 2008).

Effectivement, tous les antidiabétiques oraux provoquent des effets secondaires néfastes pour le patient diabétique, ce qui complique le traitement et accroît la souffrance des malades.

En parallèle, la recherche de nouvelles substances à partir des plantes attire actuellement tous les regards et constitue une étape substantielle dans le développement de nouveaux médicaments.

5. La plante sélectionnée: *Allium sativum* L.

5.1. Position systématique (Callery et Emma, 1998)

Classification classique

Règne : Plantae
 Sous- Règne : Tracheobionta
 Division : Magnoliophyta
 Classe : Liliopsida
 Sous- Classe : Liliidae
 Ordre : Liliales
 Famille : Liliaceae
 Genre : *Allium*
 Espèce : *sativum* L.

Classification phylogénétique

Ordre : Asparagales
 Famille : Alliaceae

Non scientifique : *Allium sativum* L.

Nom commun : Ail, ail cultivé, ail à tige tendre, thériaque des pauvres.

Nom vernaculaire arabe : ثوم

Parties utilisés : Bulbes.

Les liliaceae sont des monocotylédones cosmopolites, comprenant plusieurs milliers d'espèces. Vivaces le plus souvent caractérisées par un rhizome ou par un bulbe, surtout dans les pays tempérés (ex : tulipe, jacinthe, muguet, oignon, ail, scille), elles sont parfois un port d'arbre ou de liane dans les pays chauds (ex : aloès, yucca, dragonnier).

Le genre *Allium* comprend plusieurs centaines d'espèces (ex : poireau, oignon, ciboule) originaire de l'hémisphère Nord (Fournier, 1999).

5.2. Description botanique

Plante pérenne herbacée, bulbeuse et vivace, rarement bisannuelle ; atteignant 25 à 70cm de hauteur, l'ail est une espèce à nombreuse feuilles engainant le bas de la tige. L'inflorescence est enveloppée d'une spathe en une seule pièce tombant assez rapidement. Les fleurs sont groupées en ombelles. Assez peu nombreuses, elles sont de couleur blanche ou rose et s'épanouissent en été (Fig. 14). Le fruit est une capsule à trois loges, mais celle-ci est rarement produite (Bruneton, J, 1999). La racine à bulbe est composée de trois à 20 bulbilles (gousses) arqués (les caïeux). On la récolte en juillet- août. L'odeur faible, se développe- forte et soufrée- dès que les tissus sont lésés (Jean-Michel Clément, 1990).



Figure 14. Photos d'*Allium sativum* L.

5.3. Sous-espèces et variétés

On distingue deux sous-espèces, qui se plantent à des époques différentes de l'année : *subsp, ophioscorodon*, plantée en automne et *subsp, sativum*, plantée au printemps. Les deux sous- espèces sont respectivement appelée « ail d'automne » et « ail de printemps ». Indépendamment de la couleur réel du bulbe, l'ail dit blanc est généralement l'ail d'automne, l'ail rose est l'ail de printemps. Le premier est planté d'octobre à décembre selon le climat. L'autre est mis en terre entre novembre et janvier. Dans les deux cas, la récolte à lieu au juin- juillet (Bruneton, 1999).

5.4. Origine

Plante cultivée mondialement comme épice, dans les zones chaudes et tempérées, originaire d'Asie Centrale. L'ail est surtout importé des pays méditerranés, mais aussi plus récemment de Chine. Sa culture est facile, puisque l'ail croit sur tous les sols, mais de préférence sur les terrains meubles ou même les sables, où les bulbes peuvent atteindre une grosseur considérable. L'ail était cultivé par les anciens Egyptiens. L'on rapporte que les bâtisseurs des pyramides en faisaient usage pour rester en bonne santé et éviter les maladies infectieuses. Le culte grec dédié à Rhéa, mère de Zeus, interdisait toute vénération à celui qui avait préalablement consommé de l'ail... Ainsi, quiconque en avait consommé était privé d'entrée au temple de Cybèle encore dénommé « Grande Déesse de Phrygie ». Les Romains par contre en faisaient cas (Max Wichd and Bbert, 2003).

5.5. Composition chimique et principes actifs

La gousse d'ail renferme des polysaccharides de réservés (des fructanes) des acides amines, des sels minéraux (potassium, soufre, fer, cuivre, magnésium...) des oligo-éléments assez rares dont du sélénium, du germanium et du tellurium, des enzymes (allinase, peroxydase, myrosinase...etc), des vitamines (A,B1, B2, C,E), des saponosides (hétérosides de furostanols : sativosides, proto- érubosides- B, etc) et est surtout connue pour ses composés soufrés responsables de la majorité des propriétés pharmacologiques (Avaoto. P et Coll, 2000).

Le constituant principal de l'ail frais non contusé est l'alliine ou sulfoxyde de S-allyl L-(+)- cystéine. Lorsque les tissus sont coupés ou broyés, l'alliine est dégradé par l'alliinase (S-alkyl-L-cystéine sulfoxyde lyase), en acide pyruvique et acide 2-propénésulférique, ce dernier étant aussitôt transformé en allicine (0,3% de la masse fraîche et à forte odeur aillée). L'oxydation à l'air de l'allicine conduit au 1,7 dithiaocta-4,5-diène, connu sous le non de désulfure de diallyle : c'est le constituant majoritaire de l'« essence » d'ail (à l'odeur également marquée) (Avaoto. P et Coll, 2000). L'analyse fine des extraits alcooliques d'ail montre également la présence des produits de condensation de l'allicine, les 6Z – et 6E- ajoènes (4,5, 9- trithiadodéca- 1,6, 11- trièn -6-S-oxyde) et de produits de cyclo-addition du propénethial (vinyl-dithiines) (Sticher. O and Dtsch, 1991). Il à été montré que beaucoup de composés identifiés en CPG dans les diverses « essences » d'ail ne sont que des artéfacts : l'analyse en HPLC des produits obtenus par simple distillation sous vide poussé et à température ambiante ne met en évidence que des

thiosulfates R-S (O) S-R' ; l'allicine (R=R'= allyl), étant nettement prépondérante (80-90%) (Bruneton. J, 1999; Max Wichd and Bbert, 2003).

5.6. Recherches et principaux effets

L'ail est une plante alimentaire très commune, un condiment commercialisé dans le monde entier mais qui possède aussi des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques fort intéressantes. Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont publié plus de 2000 recherches scientifiques et un grand nombre d'études ont été réalisées afin de mieux connaître les principes actifs de l'ail et leurs effets physiologiques. Différentes études sur des animaux ou *in vitro* ont mis en évidence une activité anticancérogène des composés actifs de l'ail (diallyl sulfide, le diallyl disulfide et l'ajoène). Ce sont principalement ces composés qui pourraient empêcher certaines cellules cancéreuses de se multiplier et ainsi protéger l'organisme contre de potentiels agents cancérogènes (Lamm D.L *et al.*, 2000; Béliveau R *et al.*, 2005). Dans certaines études, l'allicine a été proposée comme étant le principal composé actif associé à l'effet cardioprotecteur de l'ail, entre autres par sa capacité de réduire les plaques d'athérosclérose chez l'animal (Gouen A and Harats D, 2005). Par contre, lors que l'on tient compte du fait que l'allicine n'est pas absorbé dans le sang durant la consommation d'ail, il est peu probable qu'elle contribue autant que tel à l'effet sur la santé cardiovasculaire; l'allicine serait plutôt un composé transitoire rapidement transformé en d'autres composés sulfurés qui, eux, sont actifs dans l'organisme (Amagase H, 2006). L'ajoène est un composé capable d'empêcher la synthèse (formation) du cholestérol *in vitro* (Jakubowski H, 2003) et pourrait ainsi jouer un rôle dans l'effet hypocholestérolémiant attribué de l'ail.

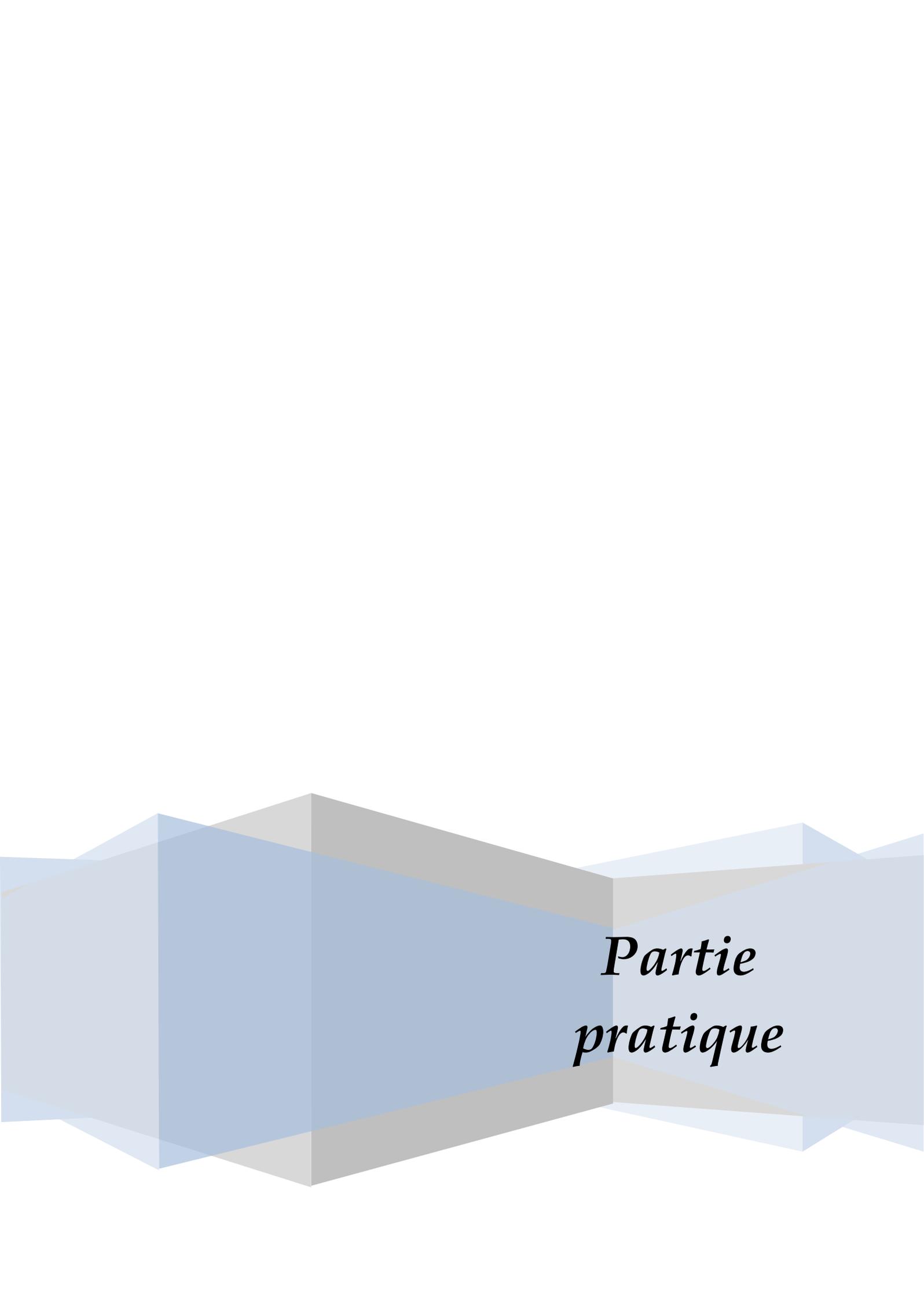
L'ail contient différents composés antioxydants tels des flavonoïdes (Miean KH and Mohamed S, 2001) et des tocophérols (Gorinstein S and Drzewiecki J, 2005), en plus des composés sulfurés qui contribueraient aussi à son activité antioxydants (Lee larungrayub N and Rattanapanone V, 2006). La consommation d'ail frais (cru ou cuit) augmente l'activité antioxydante dans le plasma chez des rats (Gorinstein S and Leantonucy H, 2006). L'ail possède une capacité antioxydante plus élevée qu'une large sélection de légumes (Cao G *et al.*, 1996; Vinson JA *et al.*, 1998).

Concernant l'hypertension artérielle, l'OMS indique que l'ail peut être utile en cas d'hypertension modérée. Plusieurs essais cliniques démontrent que l'ail peut effectivement être utile à ce chapitre (Al-Qattan KK *et al.*, 2016).

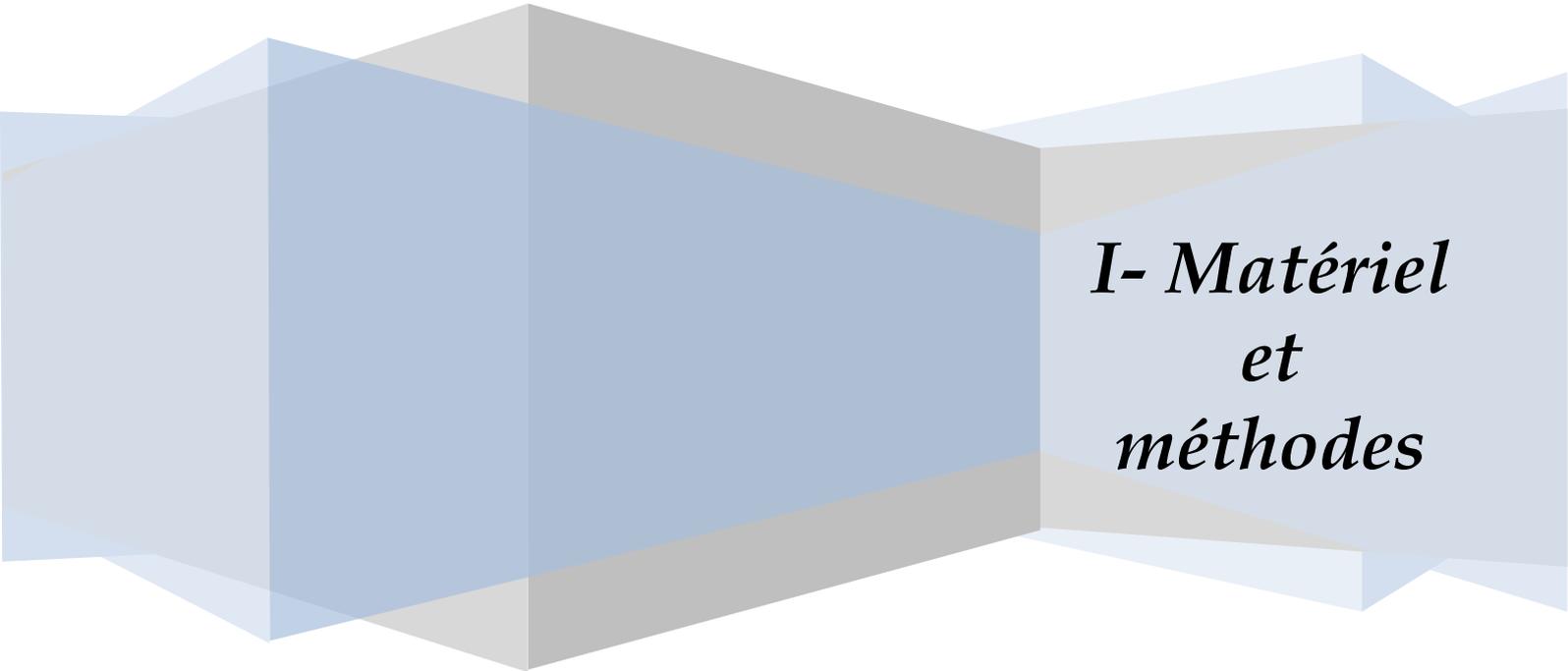
Les propriétés antibactérienne et antifongiques de l'ail sont bien connues, au cours de divers essais, l'ail a été administré des sujets souffrant de gastroentérite, de pneumonie, de gingivite, etc (Sharifi-Rad J *et al.*, 2016). Selon les résultats d'études *in vitro*, l'ail exercerait une activité antibiotique contre H. pylori (Zardast M *et al.*, 2016).

Des études cliniques plus récentes tendent à confirmer les propriétés antifongiques de l'ail en application topique contre le pied d'athlète (Ledezma E and Lopez JC, 1999).

Par ailleurs, certaines études ont démontrés l'effet antihyperglycémique de quelques extraits de l'*Allium sativum* sur le diabète expérimental induit chez le rat (Hosseini A and Hosseinzadeh H, 2015). En plus, l'administration intrapéritonéale de l'extrait aqueux de l'ail chez les rats diabétiques réduit l'activité de l'ACE; enzyme impliquée dans les complications vasculaires du diabète (Baluchenjadmogard T *et al.*, 2003; Hosseini M *et al.*, 2007).



*Partie
pratique*



*I- Matériel
et
méthodes*

I. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur une racine à bulbe d'*Allium sativum* L., cette variété locale cultivée est récoltée de la wilaya d'El-Tarf le mois de juillet en 2012 et identifiée par un botaniste de l'Université Badji Mokhtar-Annaba. La plante fraîchement récoltée est conservée à l'ombre dans un endroit sec et aéré.

2. Méthodes

2.1. Etude phytochimique

- **Pulvérisation:** La poudre est préparée en fragmentant rapidement l'ail (flocons d'environ 5 mm d'épaisseur) et en le séchant à l'ombre, ensuite un broyeur a été utilisé pour obtenir une poudre végétale fine qui a été conservée dans un flacon en verre hermétiquement fermé jusqu'à son utilisation à des fins pratiques.
- **Extraction:** L'extraction a été effectuée à froid par macération de la poudre végétale dans du méthanol en solution (70%) pendant 24 heures. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après une double filtration sur papier Watman N°01, le filtrat a été soumis à une évaporation sous vide via un rotavapeur type Laborota 4000 à la température de 50°C.
- **Lyophilisation:** Le résidu sec résultant a été ensuite solubilisé dans de l'eau distillée tiède, congelé et lyophilisé (lyophilisateur CHRIST-ALPHA 1-4). La poudre obtenue est pesée pour la détermination du rendement selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = P_s / P_p \times 100$$

Dont: **P_s** : Poids de l'extrait sec en gramme (g).

P_p : Poids de la poudre en gramme (g).

2.1.1. Dosage quantitatif

2.1.1.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode citée par (Wong *et al.*, 2006).

➤ Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Cet essai est basé principalement sur la réduction du réactif acide

phosphotungstique phosphomolybdique (reactif Folin) dans une solution alcaline (Vuorela, 2005).

Brièvement 200 µl de l'extrait et du standard (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5g/l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité et température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS) à 765 nm.

➤ Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200µg/ml) et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

2.1.1.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par Djeridane (2006) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans notre extrait.

➤ Principe

1ml d'extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance a été lue à 430 nm après 10 minutes d'incubation.

➤ Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (µg EQ/g).

2.1.2. Évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant et en pratique, plusieurs essais *in vitro* sont menés pour évaluer l'activité antioxydante avec l'échantillon d'intérêt.

Trois tests différents ont été utilisés pour évaluer *in vitro* l'activité antioxydante de l'extrait de notre variété locale d'*Allium sativum* L.: le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), test de piégeage du peroxyde d'hydrogène et le test de la xanthine oxydase.

2.1.2.1. Test scavenger du radical libre DPPH

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres en employant le radical libre stable DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

➤ Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Fig. 15) de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006). L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

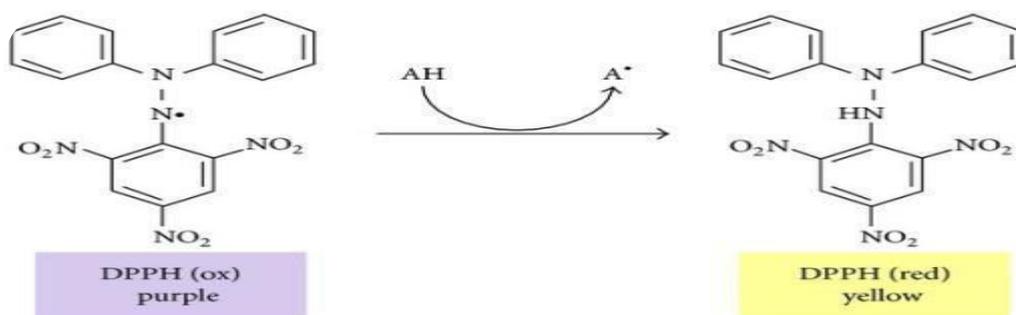


Figure 15. Forme libre réduite du DPPH (Mohammedi, 2006)

➤ Méthode

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,3 mM. Dans des tubes on introduit 30 μ l de chaque extrait (1mg/ml dans le méthanol avec des dilutions convenables) et on ajoute 1.5ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 1.5 ml de la solution méthanolique de DPPH et de 30 μ l de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

➤ L'expression des résultats

En présence d'un antioxydant, l'intensité d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (Markowicz

Bastos *et al.*, 2007). Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante (Wang *et al.*, 2002) :

Pourcentage d'inhibition =

$$[(\text{Abs Control négatif} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Control négatif}] \times 100$$

La valeur IC 50 est définie comme étant la concentration de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur), les valeurs IC 50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait testé et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (Mensor *et al.*, 2001).

2.1.2.2. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire d'oxygène et considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule (Shrinivas *et al.*, 2011).

➤ Principe

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanc (Malgalhaes *et al.*, 2008).

➤ Dosage

Une solution de 20 mM de peroxyde d'hydrogène est préparée dans le tampon phosphate (pH 7,4). Un millilitre d'extrait ou standard à différentes concentrations dans le méthanol est additionné à 2ml solution PBS. L'absorbance est lue après 10min contre un blanc sans peroxyde d'hydrogène. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard (Bumrela et Naik, 2011). Le pourcentage de piégeage (I%) est calculé par la formule suivante : **Pourcentage d'inhibition= [(Abs contrôle – Abs test) / Abs contrôle] x 100**

2.1.2.3. Test de la xanthine oxydase

➤ Principe

Cette méthode est basée sur l'inhibition de XO (xanthine oxydase) qui conduit à une diminution de la production d'acide urique, qui a été déterminée par spectrophotométrie (OSKOUEIAN *et al.*, 2011).

➤ Dosage

L'extrait (500 µL de 1 mg/ml) et allopurinol (100 µg/ml) (dans le méthanol) sont mélangés avec 1,3 ml du tampon phosphate (0,05 M, pH 7,5) et 0,2 ml de 0,2 unités/ ml de solution de xanthine oxydase. Après 10 min d'incubation à la température ambiante (25 C°), 1,5 ml de substrat de la solution de xanthine de 0,15 M est ajoutée à ce mélange. Le mélange est à nouveau incubé pendant 30 min à température ambiante (25 C°), puis l'absorbance est mesurée à 293 nm en utilisant un spectrophotomètre contre le blanc (0,5 ml de méthanol, de 1,3 ml du tampon phosphate et 0,2 ml de la xanthine oxydase). La solution de mélange de 0,5 ml de méthanol, 1,3 ml du tampon phosphate, de 0,2 ml de la xanthine oxydase et 1, 5 ml du substrat de xanthine est utilisé comme témoins (NUR Alam *et al.*, 2012).

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 1 - (\text{As}/\text{Ac}) \times 100$$

As : Absorbance de l'échantillon d'essai.

Ac : Absorbance de l'échantillon de contrôle (NUR Alam *et al.*, 2012).

2.2. Etude biologique

2.2.1. Animaux

Nous avons travaillé sur 35 rats blanc mâles *Ratus ratus* de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevage, El Kouba). A leur arrivée, ces rats pesaient entre 150 et 200g.

2.2.2. Enceinte d'élevage

Les rats sont élevés dans des cages collectives en plastique grillagées munie par une mangeoire et d'un biberon d'eau. Ces cages ont été nettoyées régulièrement et tapissées d'une litière qui est changée chaque jour. Les rats sont acclimatés pendant un moins aux conditions de l'animalerie (Département de Biochimie-Annaba) à une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, une hygrométrie de 60% et une photopériode normale. Ces animaux ont libre accès à l'eau et à la nourriture équilibrée en glucides, lipides, protéines et en vitamines (Tab. 3), (ONAB. Annaba).

Tableau 3. Composition de l'alimentation pour un kilogramme d'aliment (ONAB).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment
Mais	620
Soja	260
Phosphate	16
Calcaire	9
Cellulose	10
Minéraux	10
Vitamines	10

2.2.3. Induction du diabète

Le diabète est induit chez les rats par injection intra-péritonéale d'une solution de monohydrate d'alloxane (Sigma) dissout dans le tampon citrate (0.01 M, pH 4.5), à raison de 150 mg/kg du poids corporel (Pathak *et al.*, 2011).

Après 72h de l'injection, les rats avec la glycémie à jeun supérieure à 200 mg/dl ont été sélectionnés pour l'étude.

2.2.4. Mode du traitement

La poudre fine obtenue après pulvérisation de l'*Allium sativum* L. a été suspendue dans l'eau distillée pour obtenir l'homogénat. Deux concentrations de l'extrait ont été préparé : 0,1 mg et 0,2 mg/ ml qui correspondent respectivement à 250 mg et 500 mg / kg du poids corporel (Douaouya. L., 2009).

Dans la présente étude; 35 rats mâles (28 diabétiques et 7 normaux) ont été répartis en 5 lots de 7 rats chacun aussi homogènes que possible en fonction de leurs poids. L'extrait d'ail et la Glibenglamide ont été administrés aux rats par voie orale d'une façon quotidienne à un temps fixe (10.00h matin) pendant 21 jours (Douaouya. L., 2009).

- **Lot N-C** : Contrôle normal qui a reçu une solution physiologique (NaCl 0.9%).
- **Lot D-C** : Contrôle diabétique qui a reçu une solution physiologique (NaCl 0.9%).
- **Lot DT-250** : Diabétique traité par l'extrait d'ail à la concentration 250 mg/ kg.
- **Lot DT-500** : Diabétique traité par l'extrait d'ail à la concentration 500 mg/ kg
- **Lot DT-Glb**: Diabétique traité par un médicament de référence: la Glibenglamide à la dose de 2,5mg/kg (Kebieche. M., 2009).

Le poids corporel des rats a été pris avant et après le traitement.

2.2.5. Sacrifice et prélèvements d'organes

Après 21 jours de traitement les 5 lots ont été sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans 2 tubes, un entre eux contient l'EDTA pour le dosage de l'hémoglobine glyquée et l'autre étant sec qui subit une centrifugation 3000 tours/ min pendant 10 minutes. Une fraction du sérum obtenu est immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire d'analyse pour déterminer la glycémie et l'insulinémie, l'autre est conservé au congélateur à -20°C jusqu'au moment du dosage des paramètres biochimiques restants.

Après décapitation et dissection des rats, le pancréas est prélevé et mis dans du bouin alcoolique pour l'étude histologique, en outre le foie est maintenu au congélateur à -20°C pour le dosage des paramètres du stress.

La figure 16 schématise le protocole expérimental utilisé.

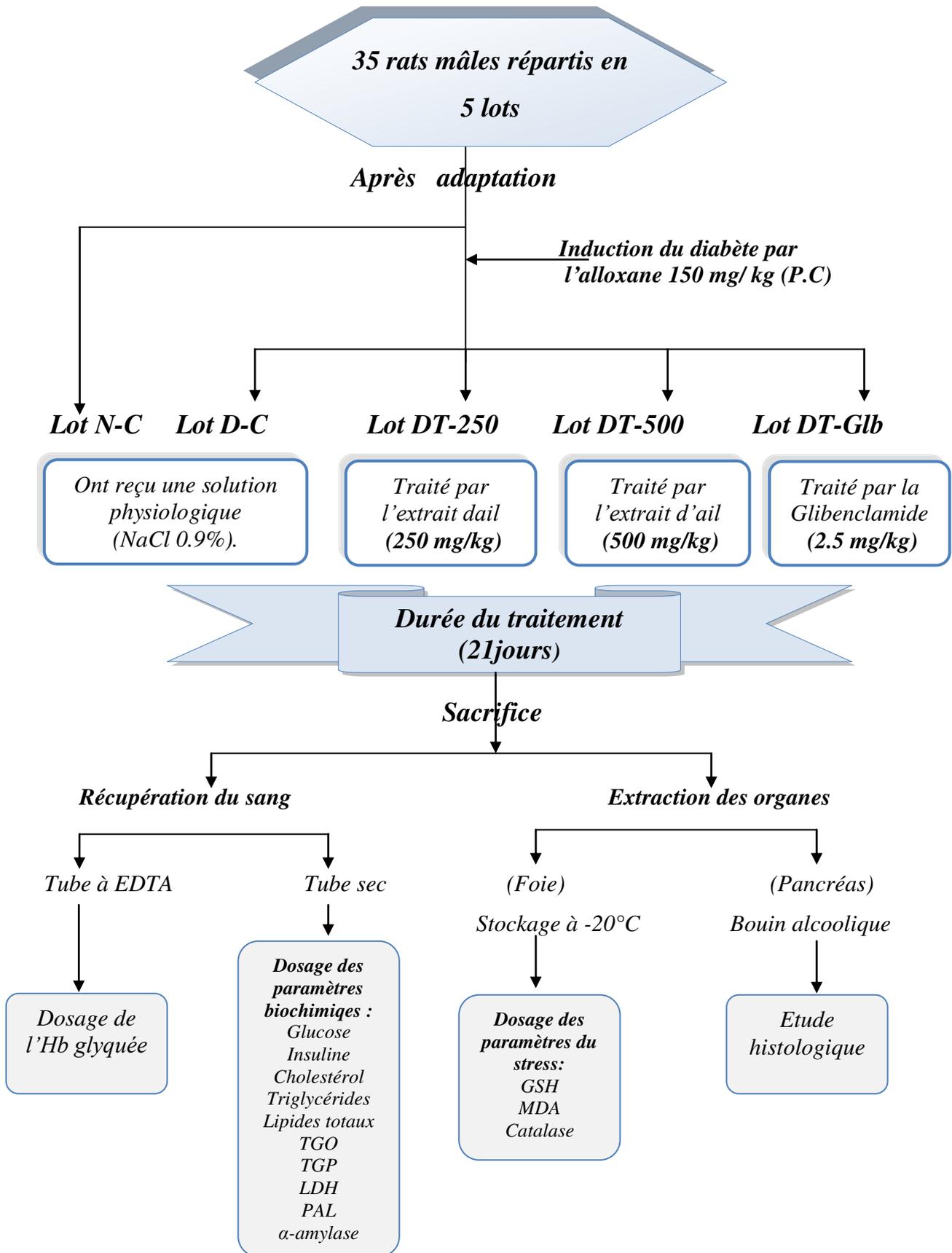


Figure 16. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2.2.6. Dosages biochimiques sanguins

2.1.6.1. Dosage du glucose : selon la fiche technique Spinreact

a. Principe

Le glucose est mesuré après une oxydation enzymatique en présence du glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit grâce à l'action catalytique d'une peroxydase, avec un phénol et la 4- amino- phénazone pour former un composé rouge violet de quinonéimine qui sert d'indicateur coloré, selon les réactions suivantes (Kaplan, 1984 ; Trinder, 1969):



b. Echantillon : Sérum

c. Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R1)	TRIS pH 7,4	92 m mol/ L
Tampon	Phénol	0,3 m mol/ L
Réactif (R2)	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	1000 U/L
	4- aminophénazone (4- AP)	2,6 m mol/ L
Etalon	Glucose	100 mg/dl

d. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

-Mélanger et incuber pendant 10 min à 37°C ;

-Lire l'absorbance optique à 500 nm de l'étalon et de l'échantillon contre le blanc dans les 30 minutes.

e. Calcul

La concentration du glucose plasmatique est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Glucose}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 100 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

2.1.6.2. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) : selon la fiche technique Spinreact**a. Principe**

Le dosage de l'hémoglobine glyquée repose sur le principe d'une chromatographie-spectrophotométrie (Bisse and Abraham, 1985) dont la résine échangeuse d'ions sert à séparer les 2 fractions de l'hémoglobine (HB A1a+b) et (AbA1c). Cette dernière est quantifiée par spectrophotomètre à 415 nm.

b. Echantillon : Sang + EDTA.

c. Les réactifs utilisés : (100 tests)

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif 1 (1x 30ml)	Biphthalate de potassium Détergent pH 5,0	50 m mol/ L
Réactif 2 (1x 240 ml)	Tampon phosphate pH 6,5 Sodium azide	48 m mol/ L 0,95 g/L
Réactif 3 (4x 450 ml)	Tampon phosphate Sodium azide	72 m mol/ L 0,95 g/L
Réactif 4 (1x 100 pièces)	Microcolonnes	/

d. Mode opératoire

- Préparation de l'hémolysât :

- Apporter les colonnes et les réactifs à la température ambiante pendant quelques minutes ;

Sang	50 µl
Réactif 1	200µl

- Mélanger bien et laisser décanter pendant 10- 15 min ;

- Préparation des colonnes :

- Enlever toujours les couvercles supérieurs des colonnes puis les couvercles inférieurs ;
- Utiliser la fin arrondie d'une pipette pour appuyer le disque supérieur jusqu'à la surface de la résine puis laisser la colonne égoutter complètement ;
 - Séparation et lecture de la fraction HbA1c
- Pipeter doucement sur le papier filtre :

Hémolysât	50 µl	Laisser la colonne s'écouler
-----------	-------	------------------------------

Réactif 1	200µl	Laisser la colonne s'écouler
-----------	-------	------------------------------

Réactif 2	2 ml	Laisser la colonne s'écouler
-----------	------	------------------------------

Réactif 3	4 ml	Collecter l'éluât (fraction HbA1c)
-----------	------	------------------------------------

- Mélanger bien et lire l'absorbance (A) de la fraction HbA1c à 415 nm contre l'eau distillé (AHbA1c).
 - Lecture de l'Hb totale
- Dans une éprouvette (16 x 160 mm) :

Réactif 3	12 ml
Hémolysât	50 µl

- Mélanger bien et lire l'absorbance (A) à 415 contre l'eau distillée (A Hb totale).

e. Calcul

$$\text{HbA1c (\%)} = A \text{ HbA1c} / (3 \times A \text{ Hb totale}) \times 100$$

2.1.6.3. Dosage de l'insuline

Le dosage est réalisé sur du sérum par la méthode « sandwich », l'analyseur cobas e 411 et la fiche technique cobas.

Dans une prise d'essai de 20 µl, l'échantillon est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique marqué au ruthénium. Il se forme un sandwich. Les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutés dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine. Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule

de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur. Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration, celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif (Sapin, 2003).

2.1.6.4. Dosage des lipides totaux : selon la fiche technique Spinreact

a. Principe

Les lipides totaux forment avec le phosphovainilline et en présence de l'acide sulfurique un complexe coloré, l'intensité de sa couleur est proportionnelle à la concentration des lipides totaux dans les échantillons (Buccolo, 1973):

b. Echantillon : Sérum

c. Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R	Phosphovainilline	235 m mol/ L
Etalon	Lipides totaux	750 mg/ dl
Réactif optionnel	Acide sulfurique	80%

d. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
H ₂ SO ₄ (ml)	2,5	2,5	2,5
Etalon (μl)	-	100	-
Echantillon (μl)	-	-	100

-Mélanger bien et incuber les tubes à essai pendant 10 min dans un bain marie à 100 °C ;

	Blanc	Etalon	Echantillon
H ₂ SO ₄ (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (μl)	-	-	50
Echantillon (μl)	-	50	-

-Lire l'absorbance (A) des échantillons à 520 nm après une incubation pendant 15 min à 37°C.

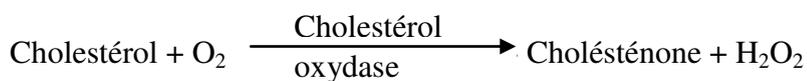
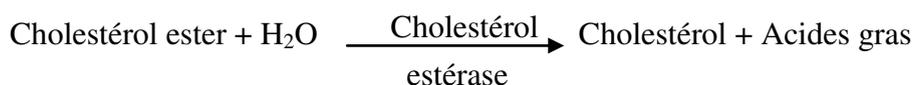
e. Calcul

$$[\text{Lipides totaux}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 750$$

2.1.6.5. Dosage du cholestérol : selon la fiche technique Spinreact

a. Principe

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon les réactions suivantes (Naito and Kaplan, 1984):



b. Echantillon : Sérum

c. Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁	PIPES pH 6,9	90 m mol/ L
Tampon	Phénol	26 m mol /L
R ₂	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
Enzymes	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4- Aminophénazone (4- AP)	0,4 m mol/ L
Étalon	Cholestérol	200 mg/ dl

- Préparation du réactif de travail (RT)

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole du réactif R1 ;
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif est stable 4 mois à 2-8°C ou 40 jours à 15-25°C.

d. Mode opératoire

		Étalon	Echantillon
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

-Mélanger et incuber les tubes pendant 10 min à la température ambiante ;

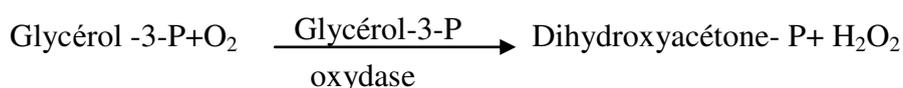
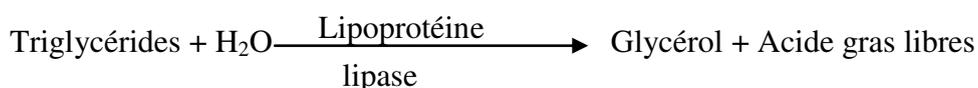
-Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc, la couleur est stable pendant une heure.

e. Calcul

$$[\text{Cholestérol}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{étalon}}} \times 200 \text{ (concentration de l'étalon).}$$

2.1.6.6. Dosage des triglycérides : selon la fiche technique Spinreact**a. Principe**

Les triglycérides sont déterminés après une hydrolyse enzymatique par les lipases. L'indicateur est une quinone formée d'après les quatre réactions suivantes (Buccolo, 1973):

**b. Echantillon : Sérum****c. Les réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁	GOOD pH 7,5	50 m mol/L
Tampon	P- chlorophénol	2 m mol/ L
R ₂	Lipoprotéine Lipase (LPL)	150000 U/L
Enzymes	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3- P- Oxydase (GPO)	2500 U/L

	Peroxydase 4-Aminophénazone (4-AP) ATP	440U/L 0,1 m mol/ L 0,1 m mol/ L
Etalon	Triglycérides	200 m mol/L

• **Préparation du réactif de travail (RT)**

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole de réactif R1 ;
- Mélanger bien la solution jusqu'à ce qu'elle devienne homogène. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à la température ambiante.

d. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

- mélanger et incuber les tubes pendant 10 min à 15-25°C.
- Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon contre le blanc à 505 nm dans les 30 minutes.

e. Calcul

$$[\text{Triglycérides}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 200$$

2.1.6.7. Dosage des transaminases TGO/ TGP : Selon la fiche technique Spinreact

a. Principe

Les transaminases TGO et TGP présentes dans le sérum catalysent le transfert du groupement amine du glutamate vers l'oxaloacétate et le pyruvate dans des réactions réversibles. L'activité de ces enzymes est proportionnelle à la quantité du pyruvate ou l'oxaloacétate formée après une réaction avec 2, 4- Dinitrophénylhydrazine (DNPH) dans un milieu alcalin (Murray, 1984; Reitman *et al.*, 1957).

b. Echantillon : Sérum

c. Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R1 a	D-L Aspartate	100 m mol/ L
Substrat du TGO	α- cétooglutarate pH 7,4	2 m mol/ L
R1 b	D-L Alanine	200 m mol/ L

Substrat du TGP	α - cétooglutarate pH 7,4	2 m mol/ L
R 2 (Révélateur)	2.4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH)	1 m mol/ L
Etalon TGO/ TGP	Etalon du pyruvate	1,2 m mol/ L
Réactif optionnel	Hydroxyde du sodium (NaOH)	0,4 N

d. Mode opératoire

	TGO	TGP
R1 a (ml)	0,5	-
R1 b (ml)	-	0,5

- Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37°C puis ajouter ;

Echantillon (μ l)	100	100
------------------------	-----	-----

- Mélanger les tubes et les revenez au bain marie pendant 30 min puis ajouter ;

R2 (ml)	0,5	0,5
---------	-----	-----

- Agiter et laisser à la température ambiante pendant 20 min ;

NaOH(ml)	5	5
----------	---	---

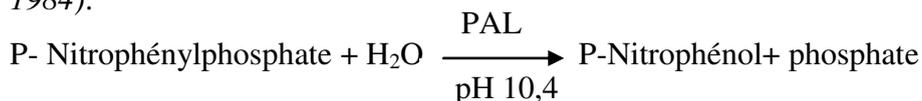
- Mélanger bien et laisser les tubes à la température ambiante pendant 5 min ;
- Enfin, lire l'absorbance initiale (A) contre l'eau distillée à 505 nm.

e. Calcul

L'absorbance obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée (Fig. 36 et 37 en annexes).

2.1.6.8. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) : selon la fiche technique Spinreact.**a. Principe**

L'activité enzymatique de la PAL est déterminée selon la réaction suivante (Wenger *et al.*, 1984):

**b. Echantillon : Sérum.**

c. Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁	-Diethanolamine (DEA) pH 10,4	1 m mol / L
Tampon	-Chlorite du magnésium	0,5 m mol/ L
R ₂	P-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10 m mol/L
Substrat		

- **Préparation du réactif de travail (RT)**

- Dissoudre un comprimé du R2 dans une fiole du R₁ ;
- Mélanger doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 5 jours à la température ambiante.

d. Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1,2
Echantillon (µl)	50

- Mélanger et incuber les tubes pendant 1 min ;
- Lire l'absorbance initiale (A) des échantillons à 405 nm avec trois répétitions (chaque 1 minute d'incubation).

e. Calcul

$$\text{Activité PAL (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 3300$$

$\Delta A / \text{min}$: la valeur moyenne des trois lectures par minute.

2.1.6.9. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH) : selon la fiche technique Spinreact.**a. Principe**

La détermination de l'activité enzymatique de LDH repose sur la réaction suivante:



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de LDH présente dans l'échantillon (Pesce, 1984).

b. Echantillon : Sérum**c. Les réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	Imidazol	65 m mol/ L

Tampon	Pyruvate	0,6 m mol/ L
R2 Substrat	NADH	0,18 m mol/ L

• **Préparation du réactif de travail (RT)**

- Dissoudre un comprimé du réactif R2 dans la fiole du réactif R1. ce réactif est stable 2 jours à 2-8°C ;

Température	25°- 30°C	37°C
Réactif de travail (ml)	3.0	3.0
Echantillon (µl)	100	50

- Mélanger bien et laisser les tubes une minute à une température 37°C ;
- Lire l'absorbance à 340 nm après 1,2 et 3 minutes d'incubation.

d. Calcul

$$25^{\circ}- 30^{\circ}\text{C} \quad \Longrightarrow \quad \text{Activité LDH (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 4925$$

$$37^{\circ}\text{C} \quad \Longrightarrow \quad \text{Activité LDH (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 9690$$

$\Delta A / \text{min}$: la valeur moyenne des trois lectures par minute.

2.1.6.10. Dosage de l' α amylase

a. Principe

L' α amylase hydrolyse la 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotrioside (CNPG3) pour libérer 2- chloro-4-nitrophénol (CNP) et 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotrioside, (CNPG2), maltotriose (G3) et glucose (G) correspondant (Ying Foo, 1998) selon la fiche technique Spinreact, et la réaction suivante :



CNP-G2: 2-Chloro-nitrophényl- α -D maltoside, **G3:** Trimaltose , **G:** Glucose

b. Echantillon : Sérum

c. Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif R1	Tampon MES pH6	50 m mol/ L
	Acétate du calcium	5 m mol/ L
	Chlorure du sodium	300 m mol/ L
	Thiocyanate du sodium	450m mol/ L
	CNP- G3	2,25 m mol/L

d. Mode opératoire

Température	37°C	
Réactif R1 (ml)	1,0	1,0
Echantillon (µl)	20	-

- Mélanger et incuber les tubes préparés pendant 1 min et lire l'absorbance initiale (A) à 405 nm puis après 1,2 et 3 min d'incubation.

e. Calcul

$$\text{Activité de l}'\alpha \text{ amylase (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 3591$$

2.1.7. Dosage des paramètres hépatiques du stress oxydant**2.1.7.1. Préparation de l'homogénat**

Un gramme du foie de chaque rat des différents lots étudiés, a été broyé et homogénéisé dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), par la suite, on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min) dont le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs conservés à -80°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

2.1.7.2. Dosage des protéines hépatiques

Le dosage des protéines est déterminé selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu dont l'apparition de la couleur bleu reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat ;
- Ajouter 5 ml de réactif de Bradford ;
- Agiter et laisser reposer 5 minutes ;
- Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (Fig. 38 en annexes).

2.1.7.3. Dosage du glutathion

Le dosage du glutathion (GSH) est réalisé selon la méthode de Weekbeker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2- nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage de glutathion est la suivante :

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat ;
- 0.2 ml de la solution d'acide salicylique (0.25%) ;
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace ;
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min ;
- Prélever 0.5 ml du surnageant ;
- Ajouter 1 ml du tampon Tris- EDTA, pH 9.6 ;
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M.
- Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:

$$\text{GSH (nmol GSH/ mg protéine)} = \frac{\text{DO} \cdot 1,525}{13,1 \cdot 0,8 \cdot 0,5 \cdot \text{mg prot}}$$

DO : Densité

1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).

1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).

13100 : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.

0.8 : Volume de l'homogénat.

0.5 : Volume du surnageant.

2.1.7.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection de MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation in vitro. Le dosage de MDA est réalisé selon la méthode de Buege and Aust (1984).

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique (Fig. 17), pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie à 530 nm.

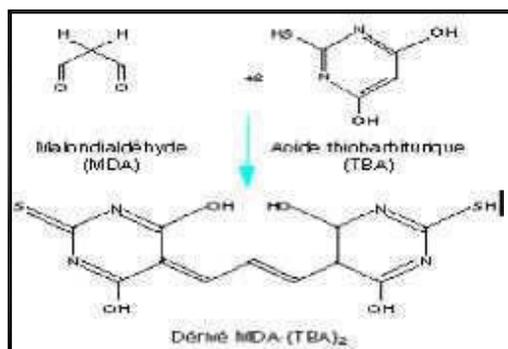


Figure 17. Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

La procédure expérimentale de dosage de MDA, est la suivante :

- Prélever 375 µl de l'homogénat ;
- Ajouter 150 µl de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) ;
- Ajouter 375 µl de solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) ;
- Vortexer et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min ;
- Prélever 400 µl de surnageant ;
- Ajouter 80 µl d'HCl 0.6 M ;
- Ajouter 320 µl de solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM) ;

- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

La densité optique a été enregistrée à $\lambda = 530$ nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L) :

$$C \text{ (n mole /mg protéine)} = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot \chi \cdot Fd}$$

- C : Concentration en n mole/mg de protéines ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 1 cm ;
- χ : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

2.1.7.5. Dosage de l'activité enzymatique du catalase (CAT)

La méthode utilisée dans le dosage de l'activité enzymatique du CAT est celle d'Aebi (1984). La CAT catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. L'activité du CAT a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H_2O_2 à une température d'incubation de 25°C.

Mode opératoire

Réactifs	Blanc (μL)	Essai (μL)
Tampon phosphate (0,1 M) pH 7,5	800	780
H_2O_2 (0,5 M)	200	200
Surnageant (S9)	-	20

La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure dont :

$$\text{L'activité de la CAT } (\mu\text{Mole } \text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protéines}) = \frac{\Delta DO}{\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd}$$

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes.
- ϵ : Coefficient d'extinction du H_2O_2 ($0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).
- L : Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1cm).
- X : Quantité des protéines en mg/ml.
- F_d : Facteur de dilution du H_2O_2 dans le tampon.

2.1.8. Technique histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital d'Ibn Rochd d'Annaba, Service d'Anatomie Pathologique, suivant la technique décrite par (Hould, 1984) dont elle comporte les étapes suivantes :

- Fixation des échantillons

Pour chaque rat, on prélève un fragment du pancréas de $0,5 \text{ cm}^3$, ces fragments sont mis directement dans du Bouin alcoolique, fixateur couramment utilisé (26 ml Formol, 7 ml acide acétique et 45 ml acide picrique de 95%). Puis ces morceaux sont retirés et coupés à l'aide du couteau tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de $1-2 \text{ cm}^2$ et une épaisseur proche de 1,5 mm. Les pièces obtenues sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

- Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus, cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100%).

- Inclusion

Les pièces anatomiques sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide, puis on procède à l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. La réalisation des coupes minces de quelques microns ($5 \mu\text{m}$ en moyenne) sont possibles grâce d'un microtome. Ces coupes sériées sont reliées entre elle sous forme des rubans ; les quels sont par la suite étalés sur des lames porte-objets, déplissés et fixés sur les lames par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

- Coloration

Selon la technique à l'hématoxyline-éosine, la coloration suit les étapes suivantes:

- ✓ Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau de robinet puis rincer à l'eau distillé ;
- ✓ Immerger dans un bain d'hématoxyline de Harris (15 min) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux) ;

- ✓ Différencier les coupes dans l'alcool acide (100 ml éthanol à 70% + 50 ml HCl) puis les rincer à l'eau de robinet ;
- ✓ Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale (100 ml d'eau distillé + 2 ml d'ammoniaque) ;
- ✓ Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 min) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme) ;
- ✓ Déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau de robinet ;

Enfin, passer à l'observation au microscope photonique, lequel est équipé d'un appareil photographique.

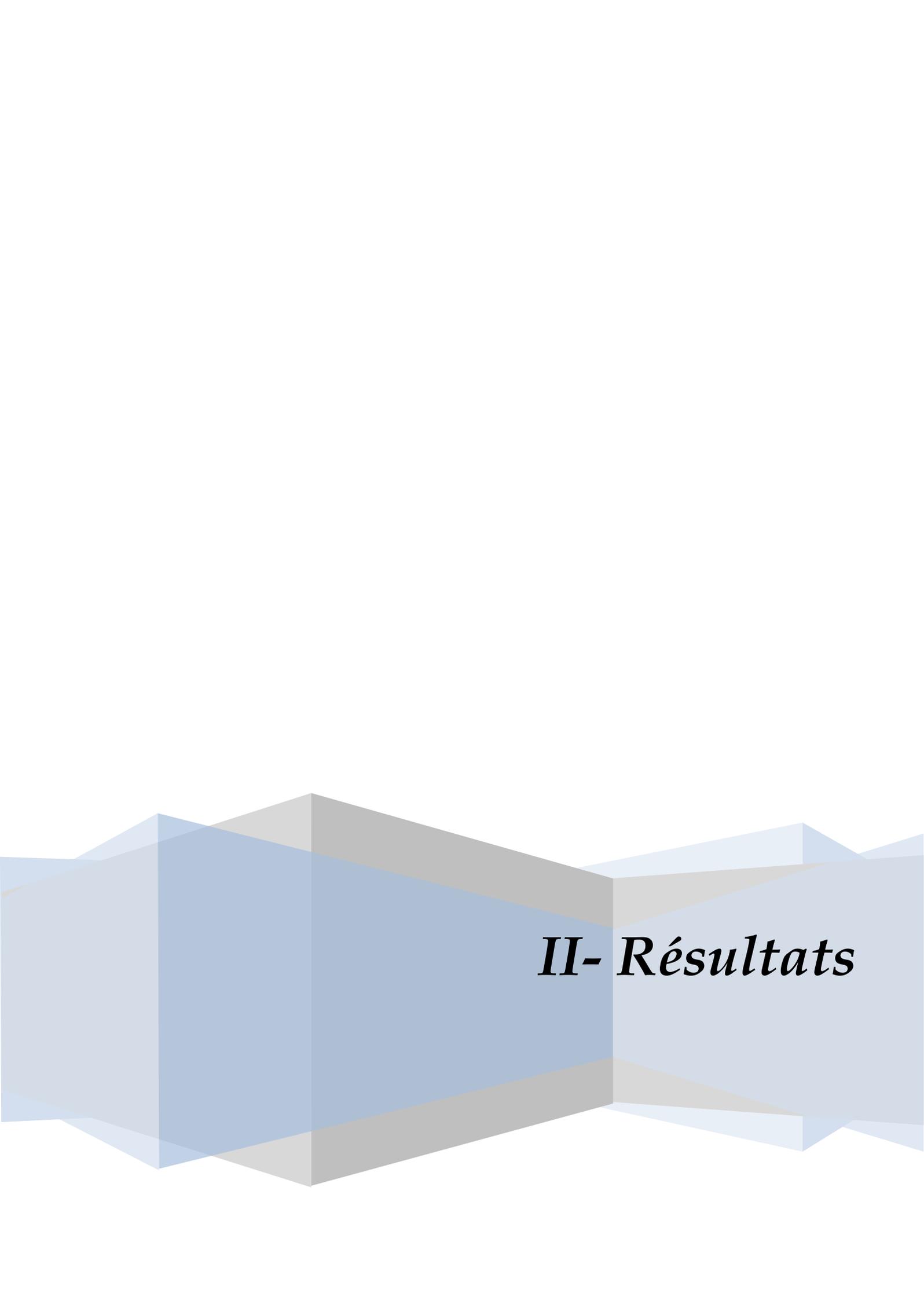
2.2. Etude statistique

A l'aide du test *t* du Student, nous avons comparé les moyennes des paramètres étudiés du lot contrôle diabétique vis-à-vis celles du lot contrôle normal.

En outre, nous avons évalué l'effet du traitement par l'extrait d'ail et la Glibenclamide sur tous les variables des lots traités par rapport au lot D-C, en appliquant en premier lieu l'analyse de la variance à un critère de classification ANOVA (comparaison inter lots) suivis par le test de Dunnett.

Les résultats sont représentés sous la forme (Moyenne \pm écart type) et les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0,05$.

Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version13.31).



II- Résultats

II. Résultats

1. Etude phytochimique

1.1. Rendement d'extraction

L'extrait méthanolique a été préparé à partir de la poudre de l'*Allium sativum* L. dont le rendement est représenté dans le tableau ci-dessus:

Tableau 4. Le rendement d'extrait méthanolique de l'*Allium sativum* L.

La plante	Le poids du matériel végétal (g)	Le poids d'extrait sec (g)	Le rendement (%)
<i>Allium sativum</i> L.	500	31.22	6.24±0.21

L'extrait méthanolique récupéré après évaporation à sec et sous pressions réduite suivis d'une lyophilisation a été pesé pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les flavonoïdes et les composés phénoliques. Le rendement exprimé en pourcentage a été déterminé par rapport à 500g de la poudre fine de l'*Allium sativum* L. subissant une extraction douce à température ambiante durant 24 heures. Selon le tableau 4, la variété locale d'ail a donné une masse en extrait sec méthanolique égale à 31.22g correspondant à un rendement de 6.24% ±0.21

1.2. Analyse quantitative

1.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations (Fig.18).

La teneur en polyphénols totaux (Tab.5) est exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

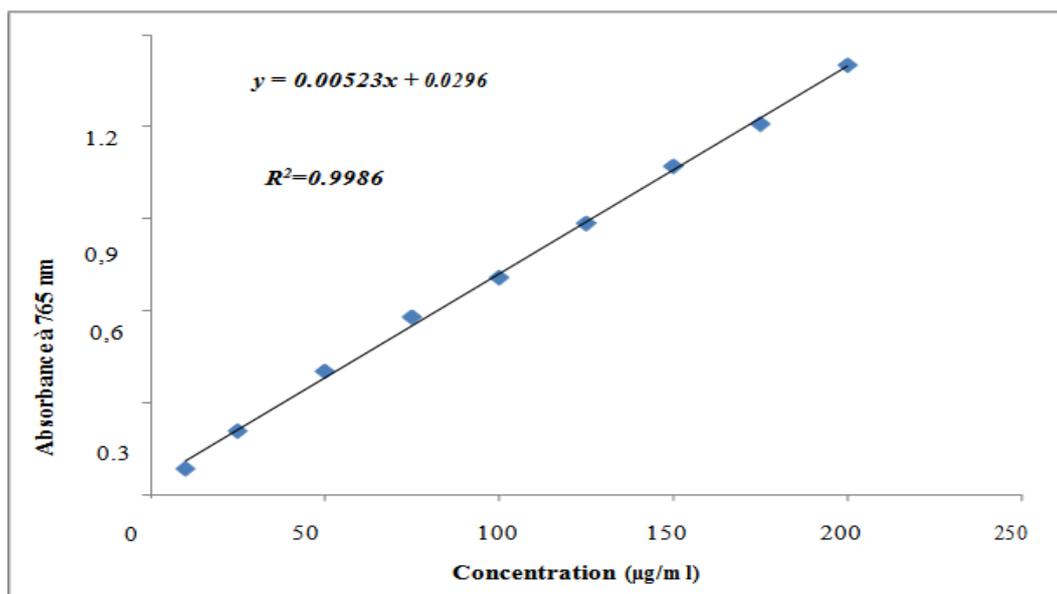


Figure 18. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Moyenne \pm s de trois mesures).

1.2.2. Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) en utilisant comme standard (la quercétine) à différentes concentrations (Fig.19).

La teneur en flavonoïdes (Tab. 5) est exprimée en microgrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/g}$ d'extrait).

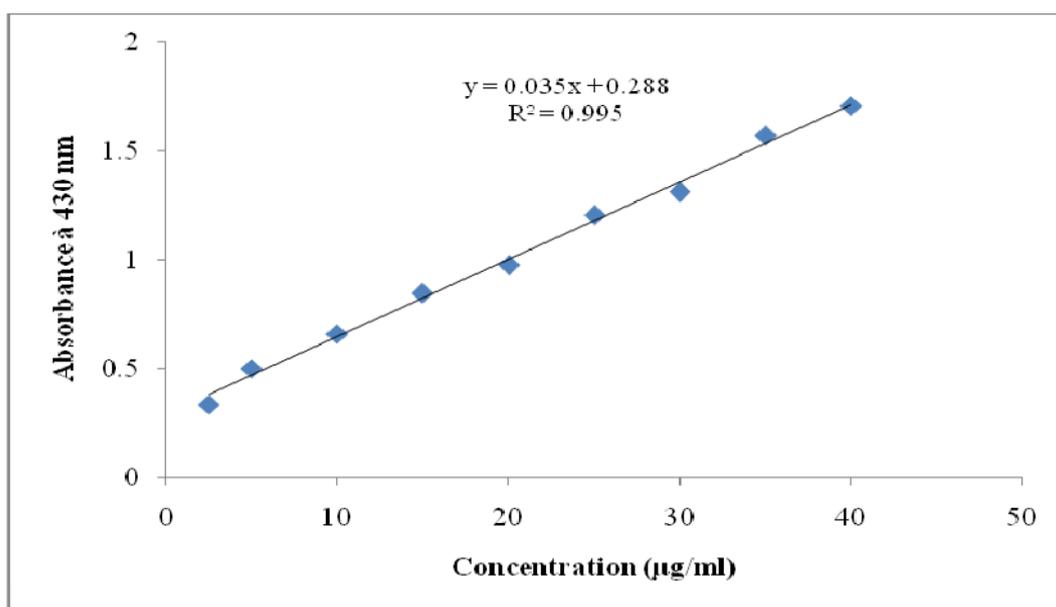


Figure 19. Courbe d'étalonnage de la quercétine (Moyenne \pm s de trois mesures).

Tableau 5. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait de l'*Allium sativum*.

<i>Plante</i>	<i>Teneur en polyphénols^(a)</i>	<i>Teneur en flavonoïdes^(b)</i>
<i>Allium sativum L.</i>	565.43 ± 18.14	37450.86 ± 903.6

(a) mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

(b) µg équivalent de la quercétine par gramme d'extrait.

La teneur en polyphénols totaux montre que l'extrait méthanolique brut contient 565.43 ± 18.14 mg EAG/g et concernant les flavonoïdes les résultats révèlent une richesse avec une teneur de 37450.86±903.6 µg équivalent de la quercétine par gramme d'extrait de l'*Allium sativum* lyophilisé.

1.3. Pouvoir antioxydant *in vitro*

Les résultats d'une méthode ne donnent que des suggestions réduites sur les propriétés antioxydantes des extraits. La combinaison de plusieurs techniques complémentaires, associant des mécanismes différents serait idéale pour une évaluation efficace et complète des potentiels antioxydants chez une ou plusieurs espèces.

1.3.1. Test scavenger du radical libre DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de l'ail vis-à-vis le radical stable DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm selon la réaction suivante :



La valeur d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) est déterminé graphiquement à partir de la courbe [% inhibition = f (Concentration)] dont une valeur faible d'IC50 indique une activité antiradicalaire puissante.

Tableau 6. Résultats du piégeage du radical libre DPPH, exprimés par la concentration inhibitrice IC50 en µg/ml.

	Extrait de l'<i>Allium sativum</i> L.	Standard Ac. ascorbique
IC50 (µg/ml)	8.526±0.4543*	4.432±0.55

* : Différence significative ($P \leq 0,05$)

L'activité antiradicalaire par la même façon est mesurée pour l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence. Ce dernier a manifesté *in vitro* une capacité très puissante sur le radical libre DPPH, justifiée par la valeur IC50 la plus réduite obtenue expérimentalement par cette méthode (4.432±0.55µg/ml). Ce standard (ac. ascorbique) demeure le piègeur le plus efficace, dirigé contre les radicaux libres dans les systèmes biologiques hydrosolubles.

Statistiquement, l'analyse comparative entre le standard et l'extrait d'ail a montré une différence significative ($p \leq 0.05$). Cela n'empêche pas qu'il est très actif et un excellent piègeur après l'acide ascorbique vu la valeur IC50 très basse obtenue expérimentalement à savoir 8.526±0.4543 µg/ml.

1.3.2. Test du piégeage du peroxyde d'hydrogène

Les résultats de l'activité antioxydante figurent dans le Tableau 7 et expriment la capacité de détoxification *in vitro* du peroxyde d'hydrogène par l'échantillon. Cette molécule très réactive est un générateur de dérivés oxygénés très toxiques tel que le radical hydroxyle.

Tableau 7. Résultats du piégeage du peroxyde d'hydrogène, exprimés par la concentration inhibitrice IC50 en µg/ml.

	Extrait de l'<i>Allium sativum</i> L.	Standard Ac. ascorbique
IC50 (µg/ml)	12.32±0.48*	4.8±0.21

* : Différence significative ($P \leq 0,05$)

Les résultats éminents révèlent une très bonne activité; l'extrait méthanolique brut de la variété locale d'ail a la capacité de neutraliser le peroxyde d'hydrogène dont il a donné une valeur IC50 égale à 12.32±0.48 µg/ml supérieure et différente

statistiquement ($p \leq 0.05$) à celle obtenue par l'acide ascorbique avec $4.8 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$.

1.3.3. Test de l'inhibition de la xanthine oxydase

L'effet de l'extrait lyophilisé d'*Allium sativum* sur l'activité de la xanthine oxydase est présenté dans le tableau 8.

Tableau 8. Effet de l'*Allium sativum* sur l'activité de la xanthine oxydase en comparaison avec l'inhibiteur standard: Allopurinol à la dose $100 \mu\text{g/ml}$.

	Extrait De l' <i>Allium sativum</i> L.	Standard Allopurinol
Pourcentage d'inhibition (%)	65.38	66.41

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase à la dose de $100 \mu\text{g/ml}$, en comparaison avec l'inhibiteur de référence : allopurinol. Ce dernier a démontré une excellente activité inhibitrice (66.41%).

L'extrait méthanolique brut est capable d'inhiber la xanthine oxydase avec la même efficacité (65.3%) remarquée par le standard ($p \leq 0.05$). Cet extrait contient des substances antioxydantes potentiellement inhibitrices, agissant directement sur la xanthine oxydase, inhibant ainsi d'une façon très efficace la formation de l'acide urique et les radicaux libres.

2. Etude biologique

2.1. Impact sur la croissance corporelle

Nos résultats révèlent une perte très hautement significative ($P \leq 0.001$) du poids corporel chez le lot diabétique non traité (-80.38%) par rapport au groupe contrôle normal, tandis qu'on constate que le traitement par l'extrait d'ail à la concentration 250 mg/Kg a amélioré la croissance pondérale en comparaison avec le lot contrôle diabétique (+58.79), mais cette amélioration reste statistiquement non significative. En revanche, les lots diabétiques traités par la dose 500 mg/Kg et le médicament de référence (glibenclamide) montrent un gain du poids corporel très hautement significatif avec des taux de 83.53% et 83.75% respectivement en comparant aux rats diabétiques contrôles (voir Tab.9 et Fig.20).

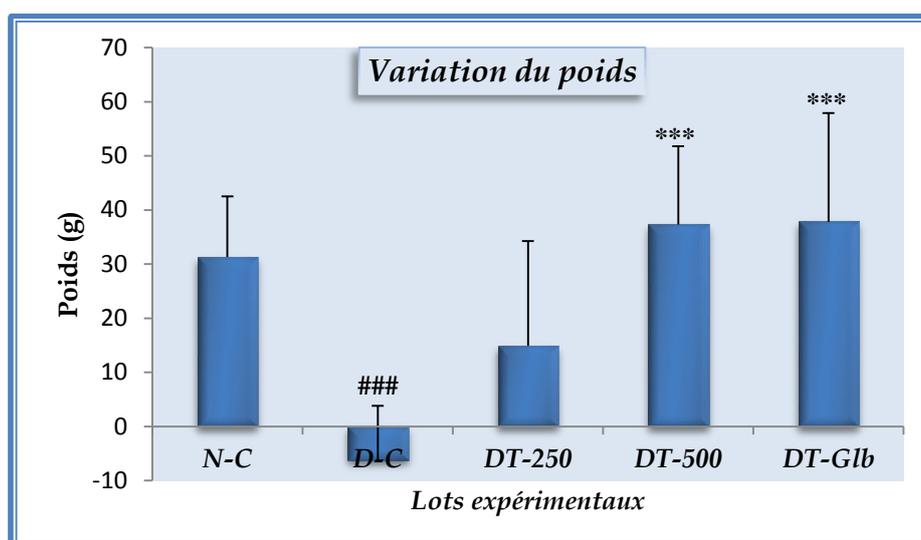
Tableau 9. Variation du poids corporel PC (g) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	N-C	D-C	DT-250	DT-500	DT-Glb
Poids initial (g)	221,1 ±11,18	223,1±39,6	217,7±24,6	219±40,2	223,1±29,5
Variation du poids (g)	+31.3±11.2	-06.14± 9.92 ^{###}	+14,9±19,37	+37.3± 14.5 ^{***}	+37.8± 20.1 ^{***}
%		-80.38%	+58.79	+83.53	+83.75

Différence significative comparant au N-C : ^{###} $p \leq 0,001$.

Différence significative comparant au D-C : ^{***} $P \leq 0,001$.

P: Seuil de signification.

**Figure 20.** Variation du poids corporel chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

2.2. Etude des paramètres biochimiques sanguins

2.2.1. Impact sur le profil glucidique

Tableau 10. Variation de la concentration sérique du glucose, l'hémoglobine glyquée et l'insuline chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	N-C	D-C	DT-250	DT-500	DT-Glb
Glucose (mg/dl)	116.10± 11.1	408.48± 10.2 ^{###}	284.8± 85.63 ^{**}	166.4± 63.8 ^{***}	116.4± 63.8 ^{***}
%		+71.57	-30.27	-59.26	-71.5
Hb A1c %	2.23±0.5	3.72± 0.47 ^{###}	2.53± 0.53 ^{**}	2.11±0.89 ^{***}	2.13± 0.65 ^{***}
%		+40.05	-31.98	-43.27	-42.74
Insuline (μU/ml)	13.65± 4.32	5.69± 2.75 ^{###}	9.16± 2.56 ^{**}	12.06±5.05 ^{***}	13.96± 4.06 ^{***}
%		-58.31	+37.88	+52.81	+59.24

Différence significative comparant au N-C : ^{###} $p \leq 0,001$.

Différence significative comparant au D-C: ^{**} $P \leq 0,01$; ^{***} $P \leq 0,001$.

P: Seuil de signification.

D'après le tableau 10 et les figures 21,22 et 23, une variation importante a été enregistré pour les paramètres du profil glucidique étudiés dont l'injection des rats par l'alloxane à raison de 150 mg/Kg du poids corporel provoque une hyperglycémie très hautement significative (+71.57%), associée à une remarquable glycation de l'hémoglobine (+40.05%), tandis qu'une chute de la teneur plasmatique de l'insuline (-58.31%) a été signalé chez les rats contrôles diabétiques comparant aux ceux normaux.

Par ailleurs, on constate par rapport au lot contrôle diabétique, une amélioration hautement significative ($p < 0.01$) de la concentration du glucose (-30.27%), de l'Hb glyquée (-31.98%) et de l'insulinémie (+37.88%) chez les rats traités par l'*Allium sativum* à la dose 250mg/kg. Cette amélioration est statistiquement très hautement significative ($p < 0.001$) chez le groupe traité par la dose 500mg/kg du poids corporel. Ces derniers résultats sont comparables à ceux obtenus chez le lot traité par la glibenclamide.

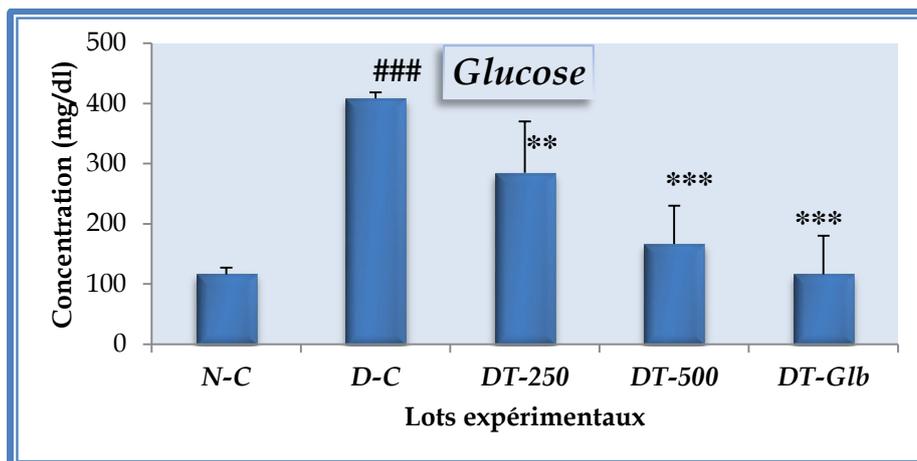


Figure 21. Variation de la concentration sérique du glucose chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

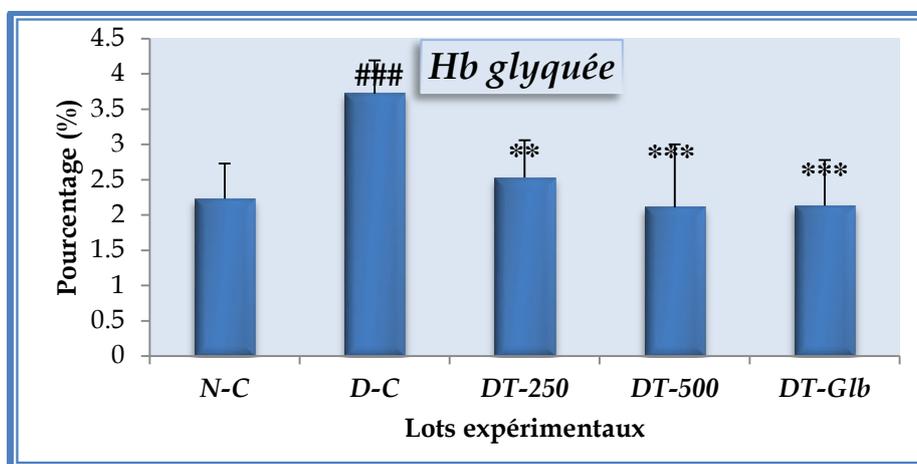


Figure 22. Variation de la concentration sanguine de l'Hb glyquée chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

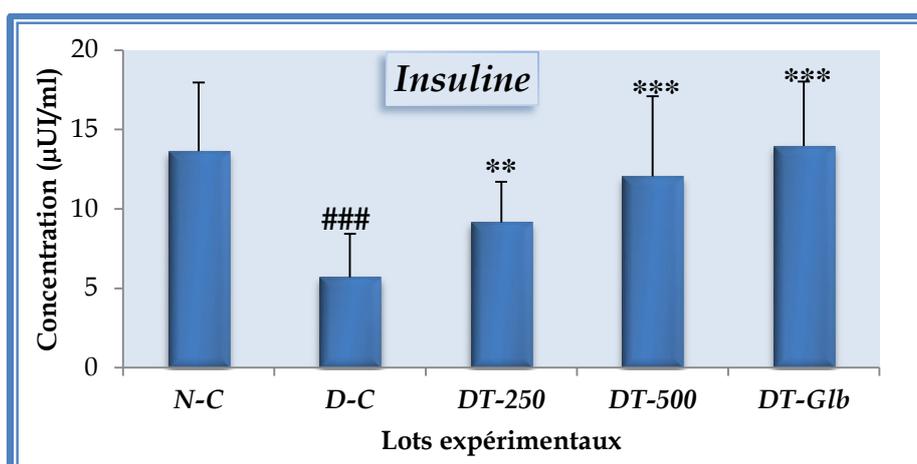


Figure 23. Variation de la concentration sérique de l'insuline chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

2.2.2. Impact sur le profil lipidique

Tableau 11. Variation de la concentration sérique des lipides totaux, cholestérol et des triglycérides chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	N-C	D-C	DT-250	DT-500	DT-Glb
Lipides totaux (mg/dl)	334.9± 75.1	753±130 ^{###}	588±80,1 ^{**}	480.6± 102 ^{***}	380.3±92 ^{***}
%		+55.52	-21.91	-36.17	-49.49
Cholestérol (mg/dl)	77.61± 4.39	105.69± 11.63 ^{###}	88.61± 12.72 [*]	79.89± 6.29 ^{***}	76.59± 7.19 ^{***}
%		+26.56	-16.16	-24.41	-27.53
Triglycérides (mg/dl)	75.2± 18.25	114.61± 16.13 ^{##}	65.75± 18.85 ^{***}	40.96± 14.22 ^{***}	70.91± 14.82 ^{***}
%		+34.38	-42.63	-64.26	-38.12

Différence significative comparant au N-C : ^{##} $p \leq 0,01$; ^{###} $p \leq 0,001$.

Différence significative comparant au D-C: ^{*} $P \leq 0,05$; ^{**} $P \leq 0,01$; ^{***} $P \leq 0,001$.

P: Seuil de signification.

Les résultats figurés dans le tableau 11, illustrent une augmentation des lipides totaux et du cholestérol avec une différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le lot contrôle diabétique par rapport à celui normal avec +55.52% et +26.56% respectivement, hautement significative ($p \leq 0,01$) pour la teneur en triglycérides.

En revanche, l'administration orale de l'extrait d'ail à raison de 250 mg/ kg du poids corporel aux rats diabétique pendant 21 jours du traitement fait diminué très significativement la concentration sérique des lipides par rapport aux rats diabétiques non traités (-21.91%), alors que la dose 500 mg/ kg et le médicament de référence montrent une diminution très hautement significative correspondant respectivement à -36.17% et -49.49% (Fig. 24).

Notons aussi, que la cholestérolémie des rats traités subissent une diminution significative pour la dose 250 mg/ kg et très hautement significative pour celle de 500 mg/kg du poids corporel et la glibenclamide par rapport au contrôle diabétique (Fig. 25).

D'après le tableau 11 et la figure 26, la teneur plasmatique en triglycérides chez les rats traités par l'extrait d'ail diminue d'une façon très hautement significative ($p \leq 0,001$) pour les deux doses utilisées par rapport aux rats diabétiques dont la concentration 500mg/kg a donné une réduction importante (-64.26%) comparant au lot traité par le médicament de référence: la glibenclamide (-38.12%).

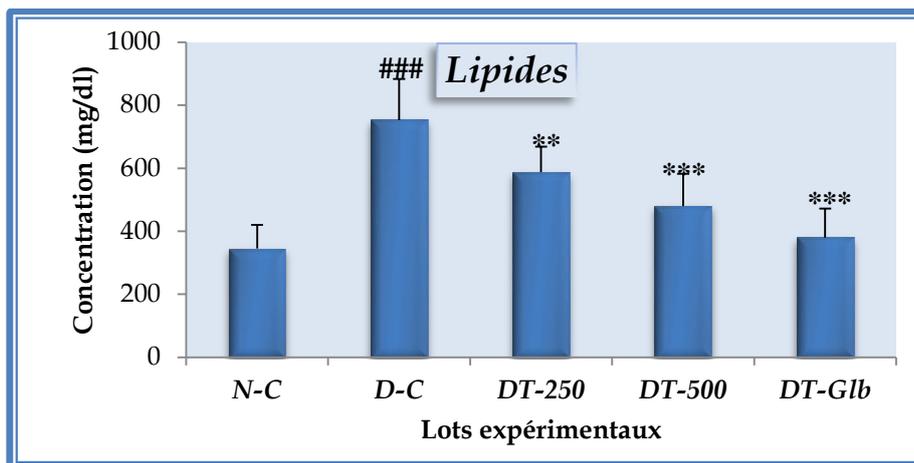


Figure 24. Variation de la teneur sérique en lipides totaux chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

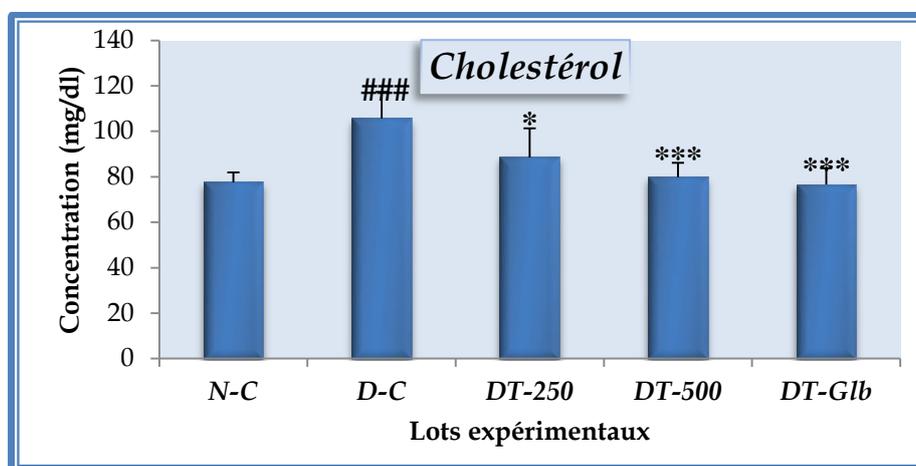


Figure 25. Variation de la cholestérolémie chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

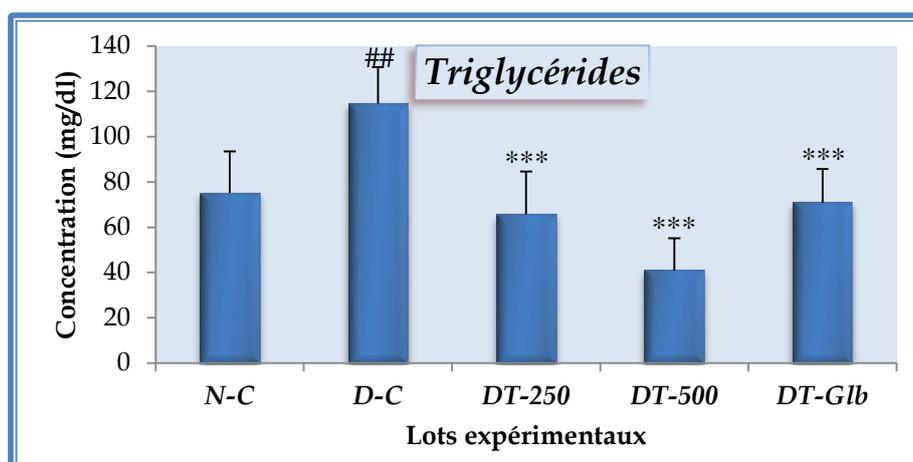


Figure 26. Variation de la concentration sérique des triglycérides chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

2.2.3. Impact sur les paramètres enzymatiques

Tableau 12. Variation de l'activité enzymatique sérique de la TGO, TGP, PAL, LDH et l' α -amylase chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	N-C	D-C	DT-250	DT-500	DT-Glb
TGO (U/L)	31.48±5.2	45.4 ^{##} ±10.8	37.73±6.58	29.76 ^{**} ± 3.93	29.56 ^{**} ± 3.13
%		+30.66	-16.89	-34.44	-34.88
TGP (U/L)	25.99±5.3 2	35.73 ^{##} ±5.6	32.39±3.92	26.38 ^{**} ± 4.29	24.33 ^{**} ± 3.19
%		+27.26	-9.34	-26.16	-31.9
PAL (U/L)	283.1±32. 9	610±46.7 ^{###}	373.3±119 [*] **	243±95.1 ^{***}	199.2±75 ^{***}
%		+53.59	-38.8	-60.16	-67.34
LDH (U/L)	1419±110	1970±273 ^{###}	1252± 352 ^{***}	1295± 235 ^{***}	1315± 135 ^{***}
%		+27.96	-36.44	-34.26	-33.24
α -Amylase (U/L)	629.29± 45.2	254± 19.7 ^{###}	330.4±24.8	486.8 ^{***} ± 31.2	401.12 ^{**} ± 18.5
%		-59.63	+23.12	+47.82	+36.67

Différence significative comparant au N-C : ^{##} $p \leq 0,01$; ^{###} $p \leq 0,001$.

Différence significative comparant au D-C: ^{*} $P \leq 0,01$; ^{***} $P \leq 0,001$.

P: Seuil de signification.

Les résultats obtenus révèlent une augmentation des transaminases (TGO, TGP) avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) suite à l'injection de l'alloxane chez les rats avec (+30.66% et +27.26%) respectivement. Le traitement, par la dose 500mg/kg d'*Allium sativum* et la glibenclamide, a restauré l'activité des transaminases d'une façon hautement significative (Tab 12, Figs 27 et 28).

Autre part, le tableau 12, les figures 29 et 30 montrent que l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et de lactate déshydrogénase des rats contrôles diabétiques a augmenté d'une manière très hautement significative par rapport aux rats témoins correspondant respectivement à (+53.59% et +27.96%), tandis que les rats traités par l'extrait et le médicament subissent une réduction très hautement significative ($p \leq 0.001$) de l'activité du PAL et LDH en comparant aux rats diabétiques non traités.

La figure 31 illustre une diminution de l'amyplasémie avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez le lot diabétique par rapport à celui normal (-59.63%). Or, on a enregistré une augmentation très hautement significative pour l'activité de l' α amylase sérique chez le lot traité par l'extrait d'ail à raison de 500 mg/kg en comparaison avec le lot D-C. Néanmoins cette différence est hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les rats traités par le médicament de référence.

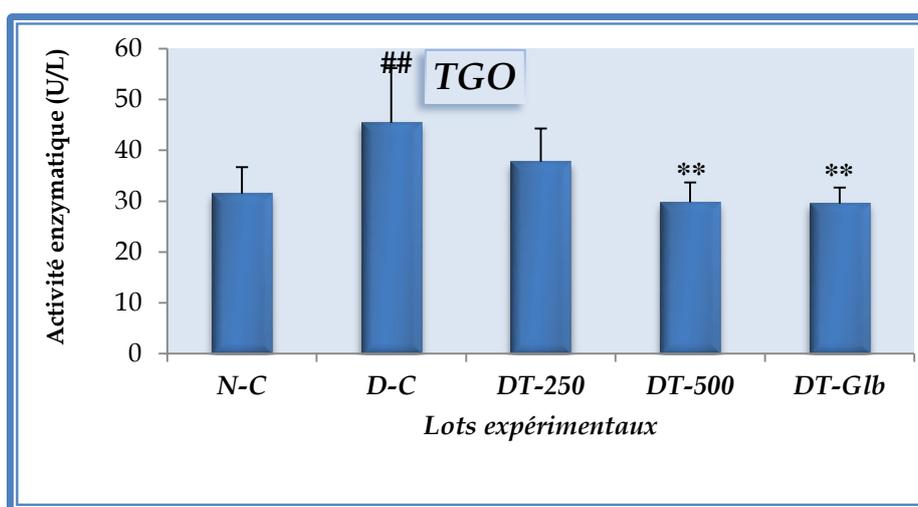


Figure 27. Variation de l'activité enzymatique sérique de la TGO chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

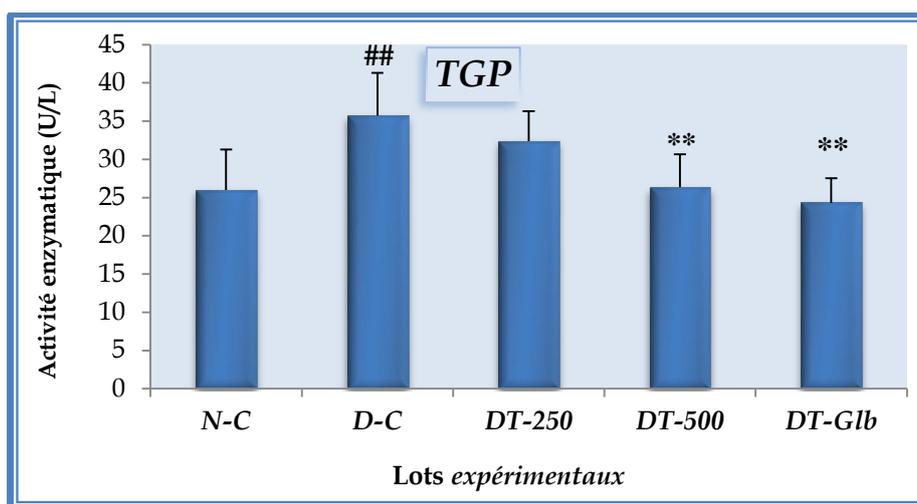


Figure 28. Variation de l'activité enzymatique sérique de la TGP chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

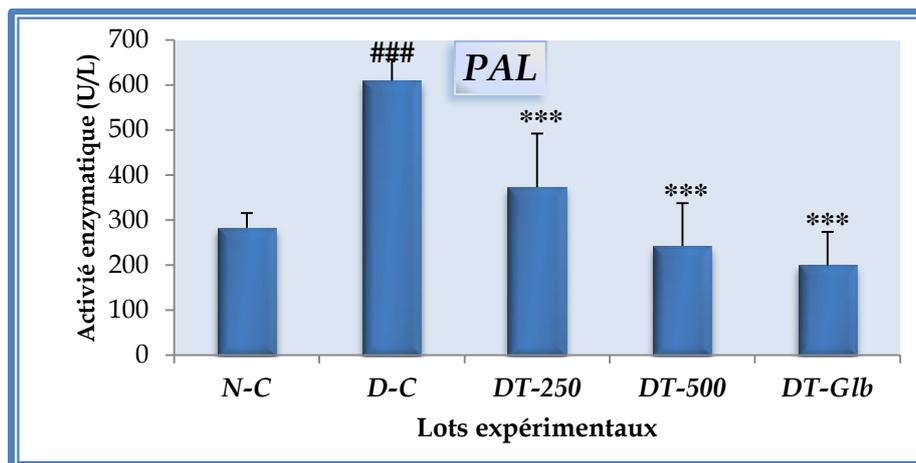


Figure 29. Variation de l'activité enzymatique sérique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

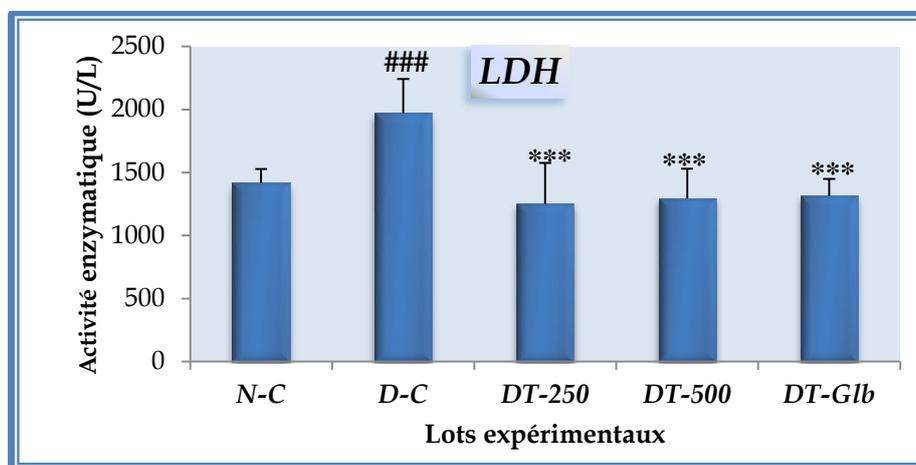


Figure 30. Variation de l'activité enzymatique sérique de lactate dehydrogénase (LDH) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

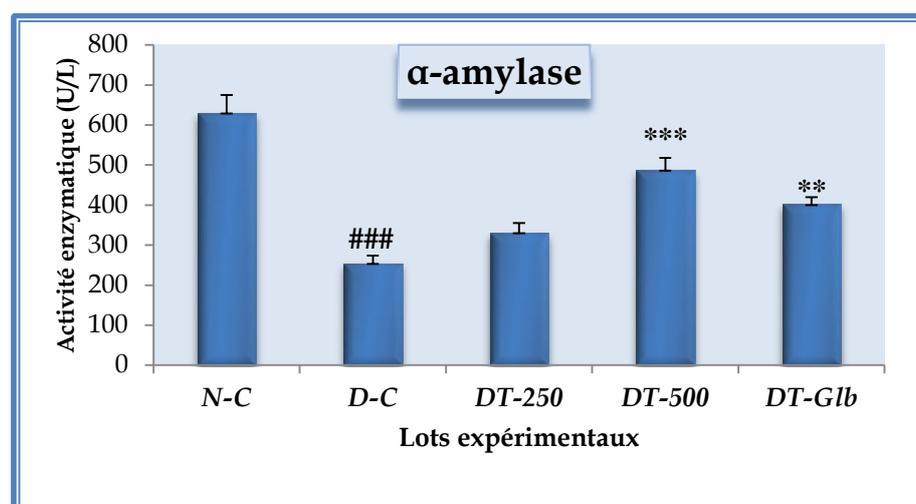


Figure 31. Variation de l'activité enzymatique sérique de l'α-amylase chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

2.3. Etude de quelques paramètres hépatiques du stress oxydant

Les paramètres du stress oxydant, soit non enzymatiques à savoir la teneur hépatique en glutathion réduit (GSH) et celle en malondialdéhyde (MDA), soit l'activité de l'enzyme antioxydante: la catalase (CAT) sont présentés dans le tableau ci-dessus.

Tableau 13. Variation de la teneur hépatique en GSH et MDA et l'activité de la catalase chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	N-C	D-C	DT-250	DT-500	DT-Glb
GSH (n mole / mg prot)	122.4± 17.8	94.2± 11.4 ^{##}	149.3± 13.7 ^{***}	186.6± 21.1 ^{***}	145.6± 11.1 ^{***}
%		-23.03	+36.9	+49.51	+35.3
MDA (n mole / mg prot)	0.286± 0.003	0.502± 0.01 ^{###}	0.39±0.02 [*]	0.3± 0.017 ^{***}	0.361±0.02 [*]
%		+43.02	-22.31	-40.23	-28.08
Activité de la CAT (µmole H ₂ O ₂ / min/mg prot)	55.81±1.2	29.17± 1.02 ^{###}	34.71± 0.92 [*]	40.02± 1.34 ^{***}	35.91±1.5 [*]
%		-47.73	+15.96	+27.11	+18.76

Différence significative comparant au N-C : ^{##} $p \leq 0,01$; ^{###} $p \leq 0,001$.

Différence significative comparant au D-C: ^{*} $P \leq 0,05$; ^{***} $P \leq 0,001$.

P: Seuil de signification.

L'induction du diabète chez les rats provoque une déplétion hautement significative ($p \leq 0.01$) de la teneur cellulaire en glutathion dans le foie (-23.03%). En revanche, chez les rats traités par l'extrait de l'*Allium sativum* ainsi que la glibenclamide, on marque une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) en glutathion comparativement avec le groupe contrôle diabétique, surtout chez les rats recevant la dose 500mg/kg P.C, le taux de GSH a été bien restauré (+49.51%), (Tab. 13 et Fig. 32).

L'interprétation du tableau 13 et la figure 33 indique une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux hépatique de malondialdéhyde (+43.02%) chez le groupe diabétique comparé au groupe témoin. En contrepartie, on remarque une diminution significative ($p \leq 0.05$) de la teneur en MDA à savoir (-22.31%) chez le lot traité par la concentration d'ail 250mg/kg et (-28.08%) chez le lot recevant la glibenclamide par

rapport au lot diabétique non traité (D-C). Néanmoins, la diminution enregistrée du taux hépatique de MDA chez les rats traitant par l'extrait de l'*Allium sativum* à 500mg/kg est très hautement significative ($p \leq 0.001$) avec moins de -40.23%.

D'après les résultats obtenus (Tab. 13 et Fig. 34), on observe une diminution (-47.73%) statistiquement très hautement significative ($p \leq 0.001$) de l'activité de la catalase hépatique chez le lot diabétique par rapport au lot témoin. Nos résultats révèlent que l'administration orale, de l'extrait d'ail à 250mg/kg et le médicament standard, aux rats diabétiques pendant 21 jours induit une augmentation d'une manière, significative correspondant respectivement à (+15.96% et +18.76%), et très hautement significative (+27.11%) chez le groupe traité par la concentration 500mg/kg du poids corporel d'extrait d'ail en comparaison avec le groupe diabétique non traité.

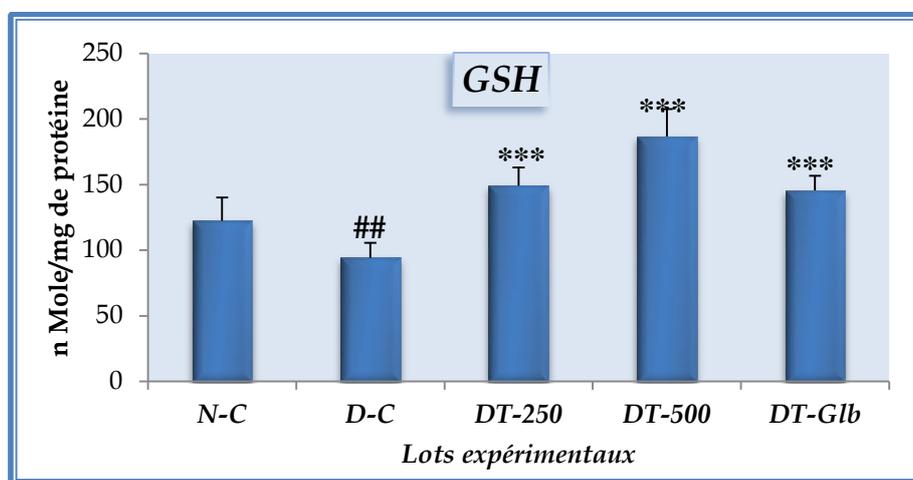


Figure 32. Variation de la teneur hépatique en glutathion réduit (GSH) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

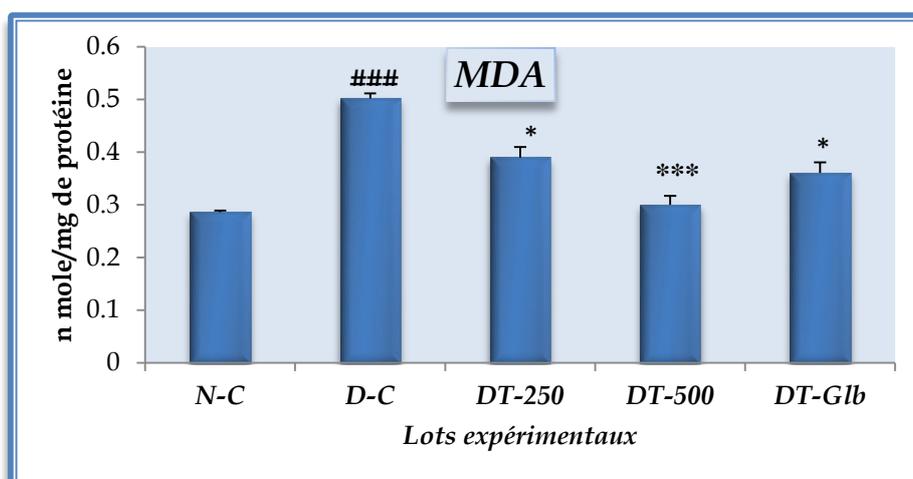


Figure 33. Variation de la teneur hépatique en malondialdéhyde (MDA) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

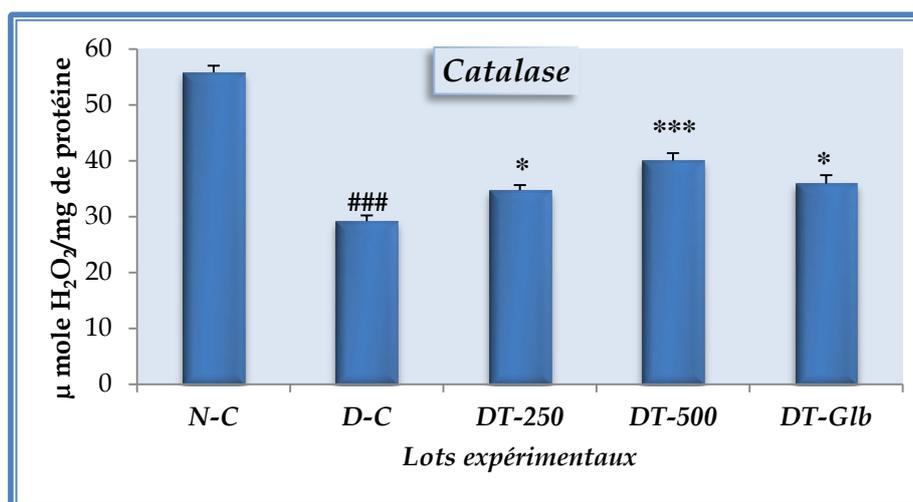


Figure 34. Variation de l'activité catalitique hépatique (CAT) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

2.4. Etude de l'histoarchitecture du pancréas

Les observations microscopiques des coupes du pancréas coloré à l'hématoxyline-éosine du rat contrôle normal (N-C) montre la présence de quelques îlots de Langerhans (Gr.100x), alors que la vue détaillée (Gr.400x) montrant la forme bien limitée et la taille d'un îlot. Tandis que, l'étude histologique du pancréas du rat diabétique contrôle (D-C) montre une diminution du nombre des îlots de Langerhans par champ microscopique dont ceux présents sont en voie de dégénérescence (Gr.400x).

L'histologie pancréatique du rat diabétique traité par la dose 500 mg/kg de l'extrait d'ail ainsi que celui recevant la glibenclamide est presque semblable à celle du rat (N-C) par la distribution et la forme des îlots de Langerhans (Fig. 35).

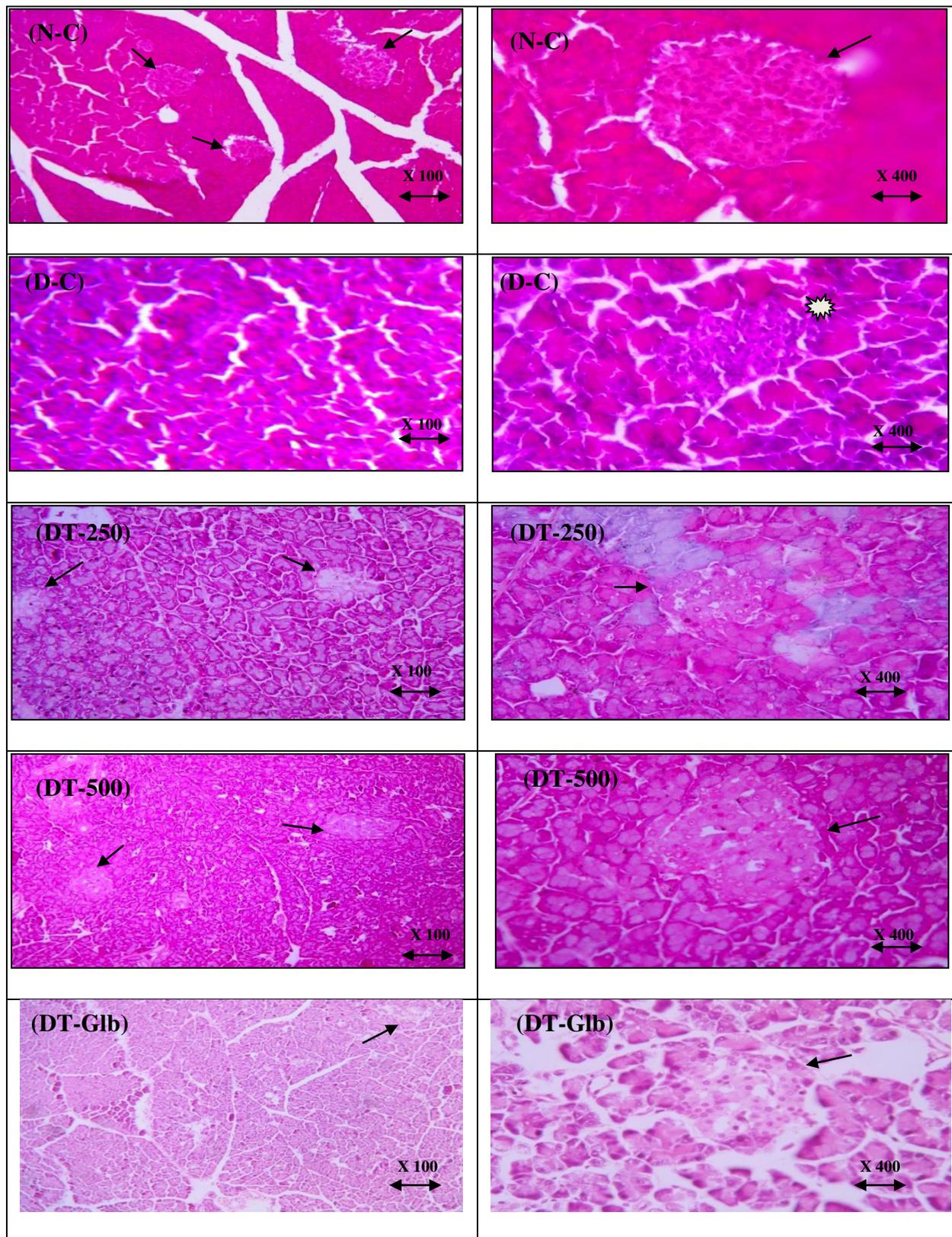
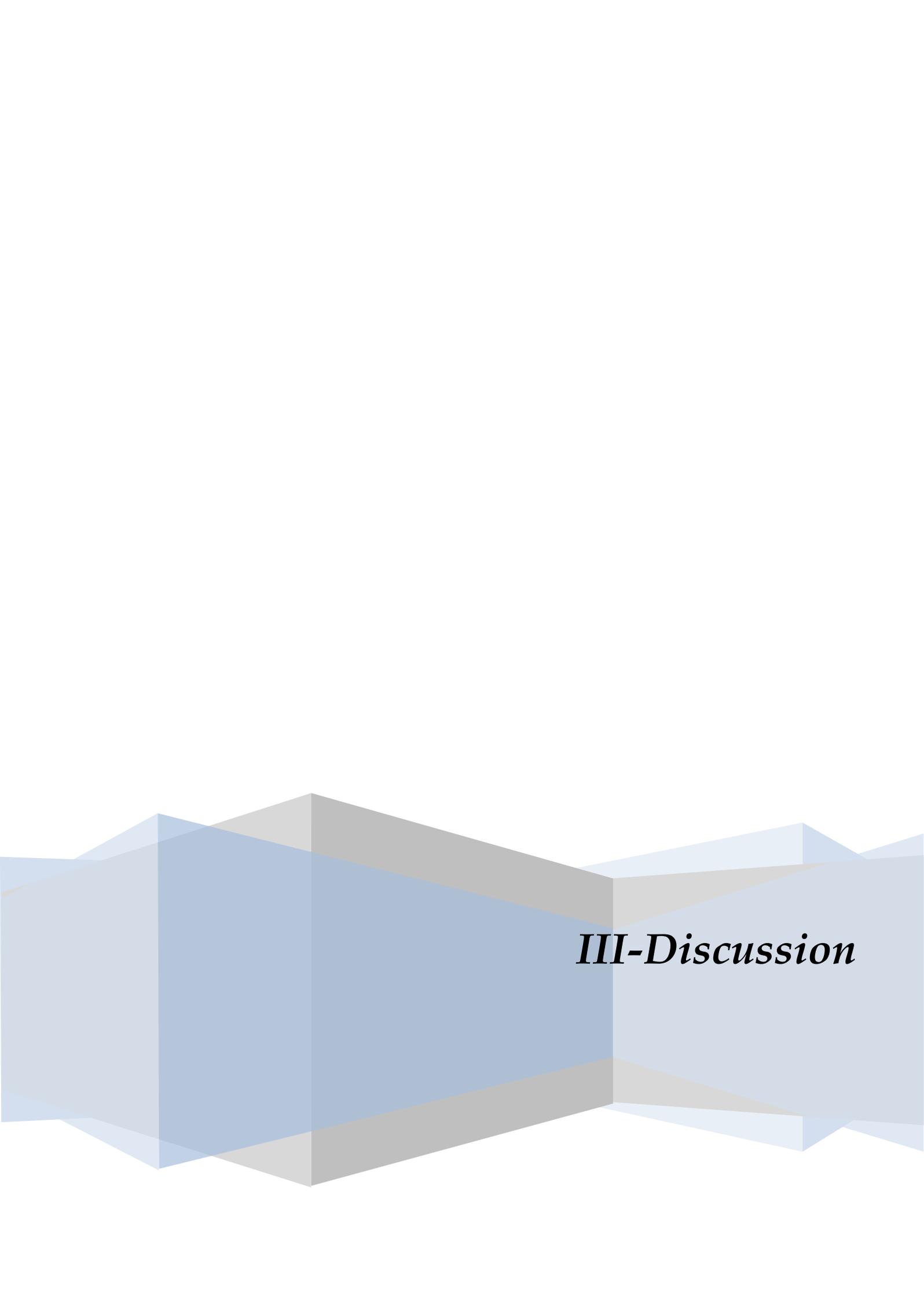


Figure 35. Photos des coupes histologiques du pancréas endocrine des rats N-C, D-C,

DT-250, DT-500 et DT-Glb (Coloration : hématoxyline-éosine) 100 X et 400 X.

➔ : Îlots de Langerhans ⚡ : Îlot nécrotique (en voie de dégénérescence).



III-Discussion

Discussion

L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques.

De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des secrets des plantes médicinales dont la présente étude qui est consacrée à la recherche d'éventuels effets antioxydants et antidiabétiques à partir d'une variété locale de l'*Allium sativum* L.

Le potentiel d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants phytochimiques. Ils sont produits comme métabolites secondaires, en réponse au stress environnemental ou pour assurer un mécanisme de défense aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux. Un grand nombre d'effets biologiques sont raccordés à ces composés. Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes dont la majorité des effets pharmacologiques des plantes est dû à ces substances (Beta *et al.*, 2005).

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. L'eau, les mélanges aqueux de l'éthanol, du méthanol et de l'acétone sont généralement utilisés pour l'extraction (Turkmen *et al.*, 2007). La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé. Le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (Falleh *et al.*, 2008); dont le méthanol aqueux 70% est deux fois plus efficace que le méthanol pur (Vuorela, 2005).

L'opération de l'extraction du matériel végétal de l'*Allium sativum* L. à l'aide du solvant polaire (hydroalcoolique) méthanol-eau (7/3) a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut de 31.22 g correspondant à un rendement de 6.24%±0.21. Car la macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (Yrjönen, 2004). Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de matière générale, en effet, le rendement n'est pas relatif; il varie en fonction de la localisation géographique de l'espèce végétale, le degré de maturité, la génétique, le climat, la période de récolte, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant

utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (Yrjönen, 2004).

La phytochimie quantitative a révélé des taux notables en polyphénols et flavonoïdes. La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et les nourritures (Abdel-Hameed, 2009). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisuthisakul *et al.*, 2008).

Généralement, toutes les plantes de la famille des liliaceae sont connues pour leurs composés phénoliques (Nuutila *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2013). Ceci est en accordance avec nos résultats avec une teneur remarquable à savoir 565.43 ± 18.14 mg EAG/g d'extrait de l'*Allium sativum* lyophilisé.

La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant comme standard la quercétine et la teneur en flavonoïdes est exprimée en $\mu\text{g EQ/g}$ d'extrait avec une valeur de 37450.86 ± 903.6 . Le groupe des composés phénoliques est l'un des groupes ubiquitaires le plus largement distribués chez les végétaux et les antioxydants extraits des plantes sont en majeure partie des composés phénoliques dont les flavonoïdes, les tannins et les acides phénols (Pobłocka-Olech *et al.*, 2016).

Plusieurs méthodes sont utilisées expérimentalement pour la détermination *in vitro* de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6 sulphonate) et DPPH⁺ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (Georgieva *et al.*, 2010).

Le DPPH est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. Dans cet essai les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphenyl picryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (Ardestani *et al.*, 2007). Le degré de décoloration exprime le potentiel de piégeage de l'antioxydant. Les

terpèneoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et les tannins sont considérés comme des substances potentiellement antioxydantes. Ce pendant, la présence de ces substances indique que notre extrait est doté d'une activité antioxydante. Les piègeurs les plus efficaces du radical libre DPPH sont ceux possédant les valeurs IC₅₀ les plus basses (Markowicz *et al.*, 2007). Ce qui marque ces résultats que la variété locale d'*Allium sativum* a montré un bon pouvoir de neutralisation du radical DPPH traduit par une concentration inhibitrice égale à 8.526 ± 0.4543 $\mu\text{g/ml}$.

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006; Kouri *et al.*, 2007). Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997). L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy (Heim *et al.*, 2002).

Le peroxyde d'hydrogène; cette molécule qui n'est pas vraiment très réactive, peut devenir très toxique pour nos cellules en augmentant le taux de l'espèce oxygénée potentiellement toxique par sa haute réactivité, le radical hydroxyl. Cette petite molécule est capable d'inactiver directement des enzymes par oxydation des groupements thiols (-SH). Un haut potentiel antioxydant est attribué à l'extrait d'ail lyophilisé avec un pouvoir neutralisant du peroxyde d'hydrogène résumant en IC 50% égale à 12.32 ± 0.48 $\mu\text{g/ml}$. Il peut être expliqué par le fait que les substances contenues dans cette fraction réagissent directement et très rapidement avec le peroxyde d'hydrogène. L'activité antioxydante dépend des interactions entre les différents antioxydants (Mohammedi, 2013).

L'activité antioxydante est relayée par une multitude de voies d'action parmi lesquelles figure l'inhibition d'enzymes pro-oxydantes telle que la xanthine oxydase responsable de la conversion de la xanthine par oxydation en acide urique. Cette enzyme est aussi une source biologique importante d'espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde, qui sont impliquées dans beaucoup de processus pathologiques, le cas des lésions d'ischémie-reperfusion, les inflammations, athéroscléroses, cancer et le vieillissement. La xanthine oxydase est la cible privilégiée dans les interventions pharmacologiques dans le cas d'une hyperuricémie ou la goutte. L'allopurinol utilisé dans notre étude comme contrôle positif, est le seul inhibiteur de la XO utilisé en clinique jusqu'à ce jour pour contrôler la production de l'acide urique dans la maladie de la goutte et l'hyperuricémie (Klinenberg *et al.*, 1965; Rundles, 1966). Nous avons utilisé un système enzymatique pour évaluer la capacité de notre

extrait à inhiber la génération des radicaux libres, c'est le système xanthine/ xanthine oxydase. Il s'agit alors soit, d'une séquestration des radicaux libres générés, soit d'une inhibition de l'enzyme responsable (Boumerfeg *et al.*, 2009). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase à la dose de 100 µg/ml dont l'extrait méthanolique brut a démontré une excellente activité inhibitrice (65.3%) comparable à celle de l'inhibiteur de référence : allopurinol avec un taux de 66.41%. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différentes plantes sur l'activité de la XO (Ferraz Filha *et al.*, 2006; Umamaheswari *et al.*, 2007).

En outre; en ce qui concerne l'étude biologique qui s'articule sur la recherche d'éventuel effet antidiabétique de cette variété locale et son impact sur le statut antioxydant chez le rat Wistar, la voie d'administration du traitement choisie est la voie orale par ce que c'est une voie d'administration physiologique, elle offre certain nombre de critères, d'efficacité et de commodité. De plus elle ne nécessite aucun matériel particulier. De point de vue pharmacologique, la voie orale est la plus couramment utilisée (70 à 80% des médicaments sont administrés *per os*). Cette voie est, généralement, bien acceptée par les patients (Bourin *et al.*, 1999).

Plusieurs techniques sont couramment utilisées afin de produire, chez l'animal, un état comparable au diabète sucré, en vue de le mieux comprendre ou de trouver de nouvelle thérapie. Cette pathologie est une maladie métabolique chronique qui touche 5 à 7% de la population mondiale (Singh and Kakkar, 2009; Zhou *et al.*, 2009). Le diabète sucré peut être induit chez une variété large d'espèces animales par différentes techniques dont l'injection de l'alloxane qui est abondamment utilisée (Anderson *et al.*, 1993; Szkudelski, 2001). Cet agent diabétogène entraîne un effet cytotoxique sélectif des cellules β des îlots de Langerhans par le biais de la génération des radicaux superoxyde (Hincu *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007). Bien étudié, son impact sur le métabolisme des hydrocarbures, l'alloxane provoque une altération du métabolisme glucidique, lipidique et protéique due à la défaillance en insuline (Liu *et al.*, 2007).

Dans notre expérimentation, nous avons injecté une monodose de 150 mg/kg d'alloxane par voie intrapéritonéale et une glycémie supérieure à 400 mg/dl était notée. Le diabète induit par cette substance a, également, entraîné chez les rats une polyphagie, polydipsie et une polyurie. Ces signes observés chez l'animal confirment l'installation du diabète sucré.

Dans nos conditions expérimentales, On a enregistré un déficit pondéral chez les rats contrôles diabétiques (D-C). Cet effet est dû au manque d'insuline qui conduit à la dégradation des protéines structurales qui sont connues par leur contribution au poids

corporel (Rajkumar *et al.*, 1991; Vats *et al.*, 2004). Tandis que, l'administration orale de l'extrait d'ail a induit une augmentation remarquable du gain du poids surtout chez le lot traité par la dose 500mg/kg, ce qui est en accord avec le résultat obtenu par Abd El Latif A et ses collaborateurs (2014).

Après le traitement des rats alloxaniques par l'extrait de l'*Allium sativum* pendant trois semaines et après leur sacrifice; l'analyse des résultats a montré une diminution significative de la concentration sérique du glucose chez les rats traités aux doses 250mg et 500mg/kg du poids corporel par rapport aux rats (D-C), notons que l'effet antihyperglycémique obtenu est dose-dépendant. L'effet antidabétique est confirmé dans des travaux effectués sur des rats par El-Demerdash *et al.*, (2005) et Eidi *et al.*, (2006), sur des souris par Kumar *et al.*, (1999), et même sur des lapins par Jain *et al.*, (1975). Plusieurs études ont montré que cet effet peut être attribué aux composés de type allicine (Sheela *et al.*, 1992; Modak *et al.*, 2007). Augusti and Sheela, (1996) ont montré que l'alliine ou S-allyl cysteine sulfoxide (SACS), est un composé soufré qui a stimulé *in vitro* la sécrétion de l'insuline à partir des cellules bêta isolés d'un rat normal. Cependant, dans notre cas l'effet antihyperglycémique de la variété locale d'*Allium sativum* est lié à sa fonction cytoprotectrice des cellules β des îlots de Langerhans du tissu pancréatique vis-à-vis les attaques radicalaires provoquées par l'alloxane; ce qui est justifié amplement par la constatation au niveau des coupes histologiques du pancréas endocrine conduisant à la libération de l'insuline prouvée *in vivo* par nos résultats.

Par ailleurs, l'investigation phytochimique quantitative montre que notre extrait constitue un ensemble riche en polyphénols et flavonoïdes où chacun de ces principes actifs aurait pu induire l'effet observé. Cependant, il est rapporté que les flavonoïdes constituent les principes actifs de la plus part des plantes médicinales ayant une activité antidiabétique (Wollenweber, 1988; Adeneye *et al.*, 2007).

Dans la présente étude, une élévation très claire de la teneur sanguine en hémoglobine glyquée est constatée chez les rats diabétiques par rapport aux contrôles normaux (40.05%), dont la glycation non enzymatique désigne la fixation lente et irréversible de glucose sur les groupements aminés libres des protéines. Dans l'HbA1c, la réaction est caractérisée par la fixation de glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes β de l'hémoglobine A. L'hémoglobine A, qui représente plus de 95% de l'hémoglobine adulte, subit une réaction non enzymatique de glycation pour former l'hémoglobine A1 dont la quantité est proportionnelle au niveau de glycémie et à la durée de vie des globules rouges (ADA., 2010 ; Zendjabil,

2015). L'intérêt de l'HbA1c, comme marqueur rétrospectif de l'équilibre glycémique chez le patient diabétique, n'est plus à démontrer. L'HbA1c est un reflet cumulatif de la glycémie moyenne des quatre à six semaines (jusqu'à trois mois) qui précèdent le dosage et est utilisé en pratique courante pour évaluer de façon rétrospective l'efficacité du traitement (Henzen, 2011). A ce titre et dans nos conditions expérimentales, l'administration orale de l'extrait d'ail a baissé l'hyperglycémie et par conséquent le taux sanguin de l'Hb1c a diminué. Ceci est en concordance avec d'autres études précédentes (Nabi *et al.*, 2013; Prasanna *et al.*, 2016).

Les résultats de notre expérimentation suggèrent une augmentation bien claire de la concentration sérique du profil lipidique chez les rats diabétiques. Cette augmentation peut s'expliquer par la dégradation intense des composés lipidiques des tissus adipeux pour assurer l'énergie nécessaire aux fonctions vitales de l'organisme (Belhekar *et al.*, 2013). Le traitement des rats diabétiques par l'extrait d'ail et notamment la dose 500mg/kg a diminué considérablement la cholestérolémie, la lipidémie et le taux sérique des triglycérides chez les rats diabétiques. Ce constat est en accord étroit avec celle d'autres études menées sur des animaux qui indiquent que l'ail frais, l'essence et la protéine d'ail isolée peuvent en effet offrir une protection contre les troubles cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose en améliorant les profils lipidiques, y compris l'inhibition de la synthèse hépatique du cholestérol, des acides gras ainsi que l'agrégation plaquettaire *in vitro* (Yeh *et al.*, 1994; Mathew *et al.*, 1996; Lanzotti; 2006; Thomson, 2006). En outre, l'activité hypocholestérolémiant de l'ail est probablement due aux certains constituants qui peuvent agir comme inhibiteurs de certains enzymes telles que l'hydroxy méthyl glutaryl-CoA réductase qui participe à la synthèse du cholestérol. Cette idée est confirmée *in vitro* sur une culture primaire des hépatocytes par Gebhardt et Beck, (1996).

En ce qui concerne les paramètres enzymatiques, nous avons remarqué une augmentation significative de l'activité des transaminases (TGO et TGP) dans le sérum des rats contrôles diabétiques par rapport à celle des contrôles normaux. Ceci est expliqué par l'effet hépato toxique de l'alloxane (Barbosa, 2006). De plus, l'augmentation des transaminases est due à l'accumulation des acides aminés comme l'alanine le glutamate dans le sérum provenant de la dégradation des composés protéiques du corps. De ce fait, ces acides aminés peuvent se transformer sous l'action des transaminases sériques en composés carboxyliques tel que α -cétoglutarate et l'acide pyruvique. Ce qui implique alors une forte activité enzymatique de TGO et TGP. En revanche, le traitement des rats diabétiques par

l'extrait d'*Allium sativum* a rétablit les valeurs à la normale. Ces résultats sont en coïncidence avec d'autres études (Ohaeri , 2001; El-Demerdash *et al.*, 2005 et Eidi *et al.*,2006).

L'augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et de lactate déshydrogénase chez le lot D-C confirme l'atteinte du tissu hépatique. Cette augmentation peut être due principalement à la fuite de ces enzymes du cytosol du foie dans la circulation sanguine (Navarro *et al.*, 1993). Cependant, l'administration de l'extrait d'ail pendant 21 jours consécutifs a restauré les activités de ces enzymes à leurs niveaux normaux. Une explication possible de l'action de l'ail sur l'activité des transaminases, de LDH ainsi que celle de la PAL dans le sérum est que le traitement peut inhiber le dommage du foie induit par l'alloxane.

Pour l' α amylase sérique, nos résultats ont montré une diminution très claire de l'activité enzymatique de cette enzyme chez les rats alloxaniques par rapport à ceux normaux (Navarro *et al.*, 1993). Ceci est en accord avec une autre constatation qui a montré que l' α amylase pancréatique subit également une diminution chez les rats diabétiques (Liu *et al.*, 2007). On peut expliquer cette diminution par la diminution de la synthèse protéique dans le foie, la nécrose au niveau du pancréas induit par l'alloxane et par conséquent le blocage des enzymes pancréatiques (Hincu *et al.*, 2006). De plus la peroxydation lipidique joue un rôle majeure dans l'inhibition de plusieurs enzymes (Luke *et al.*, 1993). Au contraire, après le traitement des rats diabétiques par l'extrait de l'*Allium sativum*, on a constaté une amélioration significative de l'activité enzymatique de l' α amylase. Cette amélioration peut s'expliquer par l'effet cytoprotecteur qui a subit l'ail vis-à-vis les populations cellulaires du pancréas.

Le stress oxydant est augmenté dans les différents tissus à la fois dans le cas de diabète expérimentale ou pour les patients diabétiques, l'hyperglycémie induit une production prolongée des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire et ceux-ci prolongent le gradient électrochimique des protons générés dans la chaîne mitochondrielle menant à une surproduction d'anion superoxyde , qui est l'une des espèces réactives de l'oxygène qui peut endommager les cellules dans de nombreuses voies à travers le stress oxydatif, en l'absence d'une compensation appropriée de la réponse des réseaux antioxydants endogènes des cellules, le système est débordé, entraînant un déséquilibre d'oxydo-réduction, ce qui aggrave encore la situation (Korshunov *et al.* ,1997). Les espèces réactives de l'oxygène générés lors de l'hyperglycémie causent principalement des dommages de l'ADN, des

protéines et des lipides. Au cours de diabète l'hyperglycémie provoque la génération des radicaux libres via multiples mécanismes ; auto-oxydation de glucose, glycation non enzymatique, la voie des polyols et la réduction de la défense anti-oxydante (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2000).

Il n'est pas douteux que l'organisme humain s'efforce de maintenir l'homéostasie en inhibant l'effet nuisible d'origine endogène (métabolites actifs des hormones) et/ou exogène (métabolites toxiques des xénobiotiques), le système de défense endogène lié au glutathion est considéré comme un moyen très efficace pour combattre les dommages et les dysfonctionnements causés (Soon *et al.*, 2002). Nos résultats révèlent une diminution hautement significative de la teneur hépatique en glutathion après l'injection de l'alloxane chez les rats (Orhan *et al.*, 2006, Vadde *et al.*, 2008). Ceci confirme que dans les conditions d'hyperglycémie; le glucose est utilisé par la voie des polyols en consommant le NADPH indispensable dans la régénération des molécules de glutathion par le GSH réductase (West, 2000). Il a été suggéré également que la baisse du taux du GSH hépatique pourrait être le résultat de la diminution de sa synthèse et/ou sa dégradation massive par le stress oxydatif chez le diabétique. L'extrait d'*Allium sativum* maintient voire améliorer le niveau du GSH hépatique qui est bénéfique pour réduire les radicaux libres générés au cours du diabète (Lapolla *et al.*, 1993). Cet résultat peut être expliqué par la richesse de l'ail en sélénium d'une part (Ip *et al.*, 1996 and 1997; Yang *et al.*, 1997), et par ses principes actifs (alliine, allicine et composés soufrés) qui sont doués d'une activité antioxydante élucidée *in vitro* et *in vivo* d'autre part (Prasad *et al.*, 1995; Banerjee *et al.*, 2002; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2007).

Les MDA sont des sous-produits de la peroxydation des phospholipides de la membrane et sont principalement des peroxydes instables et leur concentration accrue est donc indicative de la peroxydation lipidique (Zhang *et al.*, 2003) et de l'échec du mécanisme de défense de l'antioxydant, qui est sensé inhiber la production de radicaux libres. Ces produits d'oxydation lipidiques peuvent être utilisés comme marqueurs dans le suivi de pathologie (Signorini *et al.*, 2013) ou de traitement (Hockenberry *et al.*, 2013).

Au niveau cellulaire, les MDA peuvent réagir avec le groupe amino libre des protéines, les phospholipides et les acides nucléiques menant à la modification de la structure, se traduisant par la mort cellulaire (Pandey and Rizvi, 2010). Dans la présente étude, le taux hépatique de MDA chez les rats diabétiques est significativement augmenté par rapport aux rats témoins (Uma and Ishwarlal, 2008). Cette augmentation peut être due à la diminution des antioxydants enzymatique et non enzymatique (Ramesh and Pugalendi, 2006) comme l'acide

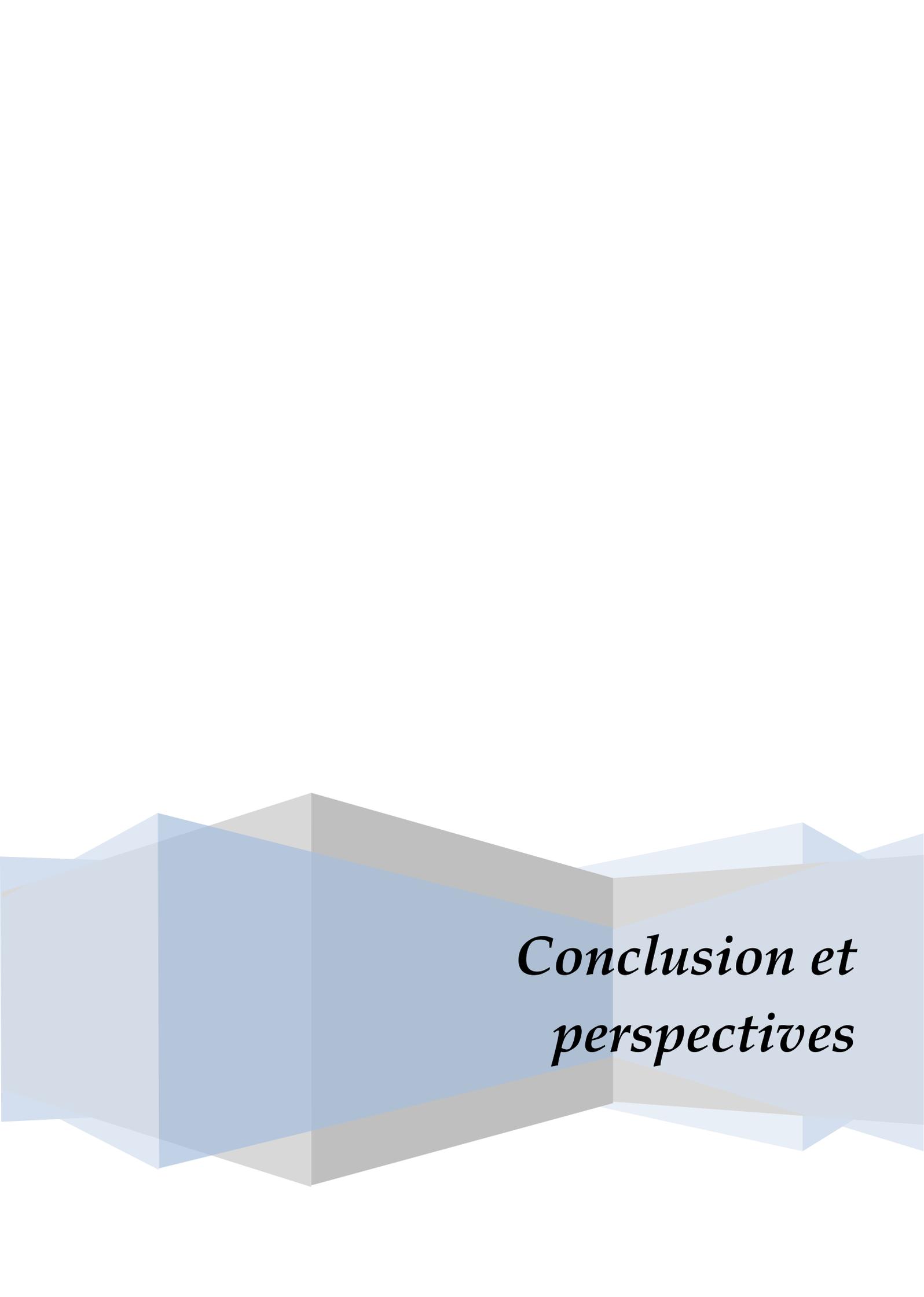
ascorbique et le tocophérol qui jouent un rôle coopératif très importants dans l'inhibition du phénomène de la peroxydation des lipides et la formation de ses produits dangereux au niveau cellulaire (Vertuani *et al.*, 2004). On note, après le gavage journalier des rats diabétiques par l'extrait d'ail, une diminution significative de la teneur hépatique en MDA. Ceci est en coïncidence avec d'autres études récentes (Baluchnejadmojarad *et al.*, 2016; Thomson *et al.*, 2016 ; Ziamajidi *et al.*, 2017).

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus mais sont particulièrement abondantes dans les globules rouges et les peroxyosomes hépatiques. Les catalases catabolisent les peroxydes d'hydrogènes en eau et en oxygène moléculaire (Mates *et al.*, 1999). L'étude de l'activité enzymatique de la catalase révèle une diminution significative au niveau du foie des rats après une injection d'une seule dose d'alloxane expliquée par l'augmentation des radicaux superoxydes générés par cet agent diabétogène. Il est amplement connu que l'anion superoxyde inactive la catalase, enzyme qui participe à la détoxification du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, l'augmentation de l'activité de la SOD pourrait indirectement jouer un rôle important dans l'activité de la catalase (Sathishsekar and Subramanian, 2005). La diminution de l'activité de la CAT pourrait être résultat de l'inactivation de l'enzyme par l'anion superoxyde, par sa glycation ou par les deux mécanismes en même temps. Cela explique aussi l'incapacité de la SOD de protéger la CAT (Kakkar *et al.*, 1998).

Dans notre étude, on a constaté qu'un traitement de trois semaines par un extrait d'*Allium sativum* à la dose 500mg/kg a provoqué une augmentation significative de l'activité hépatique de la CAT (+27.11 %) chez les rats rendus diabétiques par rapport aux rats contrôles diabétiques. Cette augmentation laisse penser que cette défense oxydante pourrait être réactivée par des principes actifs présents dans l'extrait, qui ont pu provoquer une augmentation de la capacité de détoxification par l'amélioration de la capture des radicaux libres.

En ce qui concerne l'étude histologique; le pancréas des rats rendus diabétiques présente des îlots nécrotiques avec une destruction des populations cellulaires, notamment les cellules β . Ceci est dû, mentionné précédemment, à l'effet cytotoxique de l'alloxane qui se comporte comme un agent relatif d'inhibition enzymatique ayant des conséquences négatives sur la sécrétion exocrine pancréatique, procès accompagné par un diabète typique dû à la défection apparue de la sécrétion insulinique (Hincu *et al.*, 2006). En revanche, l'histologie pancréatique des rats traités par l'extrait d'ail à la concentration 500 mg/kg du poids corporel est comparable à celle des rats normaux par la distribution et la forme intacte des îlots de Langerhans. Il est donc constatable que l'*Allium sativum* possède des effets préventifs sur la

dépréciation du pancréas. Cette conclusion trouve son utilité également dans une étude dont ils ont prouvé l'efficacité de cet extrait sur la protection du tissu cardiaque dans le stress oxydatif (Banerjee *et al.*, 2002). En outre, Kaur et ses collaborateurs (2016), ont confirmé la capacité de l'*Allium sativum* et le resveratrol d'atténuer les complications du stress oxydant notamment la pancréato-toxicité chez le rat diabétique.



*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. En Algérie, la médecine traditionnelle est largement répandue et tient une place majeure dans le traitement du diabète. Sachant que le diabète constitue un véritable fléau en Algérie, le nombre d'études en matière de recherche de nouvelles molécules capable de prévenir ou même de retarder l'apparition des complications liées au diabète, reste très limité.

Ce document a porté dans un premier temps à la détermination de la phytochimie quantitative de l'extrait méthanolique lyophilisé d'une variété locale de l'*Allium sativum* L. ainsi que l'évaluation *in vitro* de son activité antiradiacalaire. Dans un deuxième temps, on a permis de souligner *in vivo* l'effet antidiabétique et antioxydant de cette variété chez le rat Wistar et à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que:

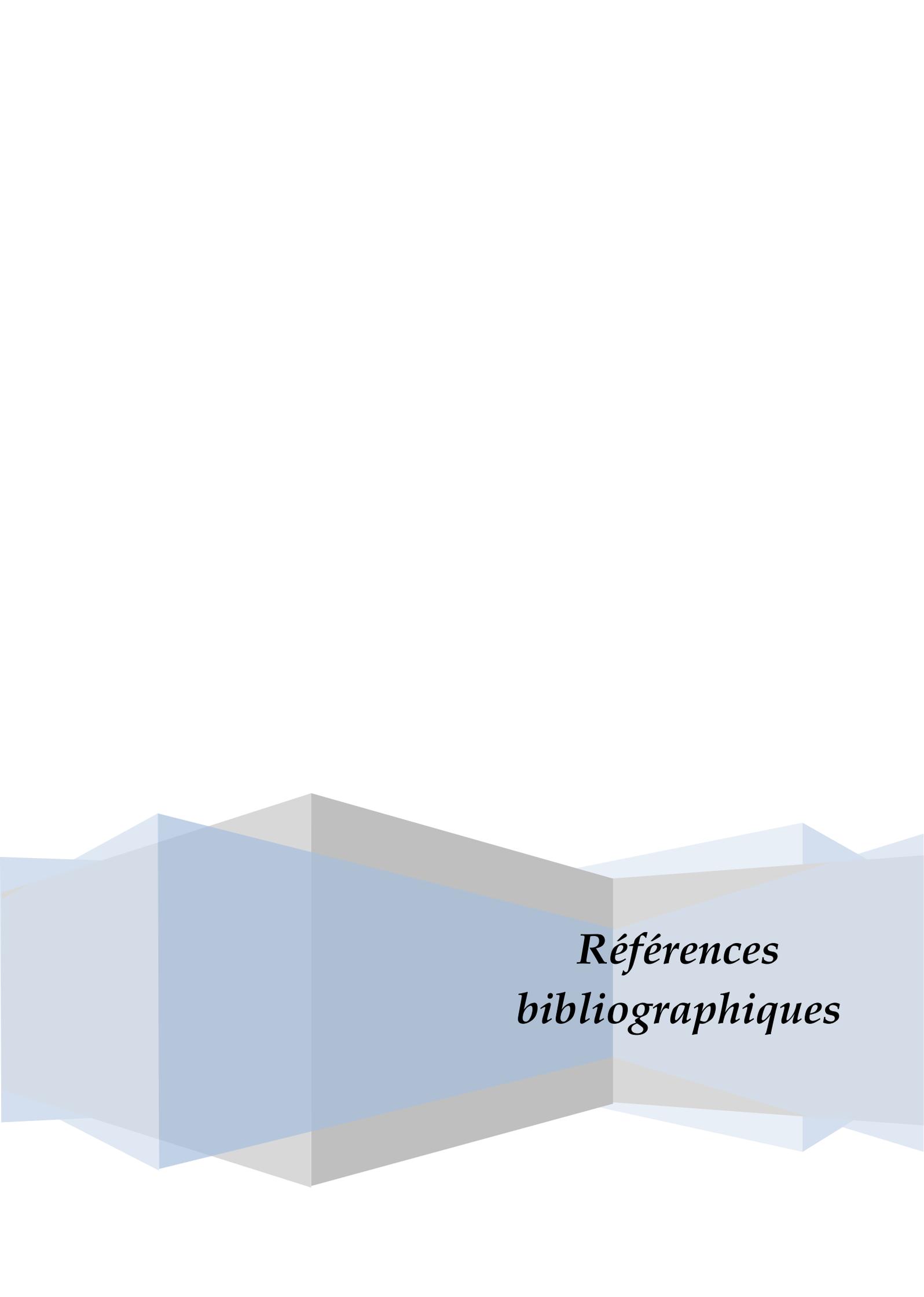
- L'investigation phytochimique quantitative a dévoilé que cette variété locale d'ail est riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes.
- Notre plante est douée d'une activité anti-radicalaire prouvée *in vitro* en utilisant trois techniques: effet scavenger du radical stable (DPPH), le piégeage du peroxyde d'hydrogène et l'inhibition de la xanthine oxydase.
- L'injection intrapéritonéale de l'alloxane à 150 mg/kg de poids corporel chez les rats mâles adultes a induit des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique, processus accompagné par un déficit pondéral remarquable. Ceci est accompagné par une déplétion du statut antioxydant du foie. Le diabète alloxanique a provoqué également des altérations histologiques du pancréas révélées par la dégénérescence des îlots de Langerhans et la mort cellulaire par nécrose dus aux radicaux libres générés.
- Le gavage régulier des rats diabétiques par l'extrait d'ail à raison de 250 mg et 500 mg/kg pendant 21 jours a maintenu voire amélioré la croissance pondérale. Elle a montré un effet anti-hyperglycémiant dose-dépendant et réduit par conséquent la glycation de l'hémoglobine.
- En ce qui concerne le bilan lipidique (cholestérolémie, triglycéridémie et lipédimie); le traitement par l'homogénat de l'*Allium sativum* a rétabli les valeurs aux normes et a restauré en parallèle l'activité des transaminases (TGO et TGP), du lactate

déshydrogénase (LDH) et de la phosphatase alcaline (PAL), par contre il augmente l'activité de l' α -amylase.

- *L'Allium sativum* par son action antioxydant a permis de diminuer la peroxydation lipidique et renforcer la défense antioxydante via l'augmentation de la teneur du glutathion réduit (GSH) et l'activité de la catalase.
- De plus, notre variété d'ail a montré un remarquable effet cytoprotecteur du pancréas contre les radicaux superoxydes générés par l'alloxane en préservant la capacité de la sécrétion de l'insuline.

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur:

- ↪ L'isolement et l'identification des composés actifs par RMN et HPLC pour augmenter l'efficacité de l'extrait.
- ↪ Etude immunohistochimique du pancréas.
- ↪ Appréciation de l'activité antioxydante de cette variété de *Allium sativum* L. à travers l'analyse de tous les éléments de la cascade enzymatique du système de détoxification.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Abd El Latif, A., El Bialy Bel, S., Mahboub, H.D., Abd Eldaim, M.A.(2014). *Moringa oleifera* leaf extract ameliorates alloxan-induced diabetes in rats by regeneration of β cells and reduction of pyruvate carboxylase expression. *Biochem. Cell. Biol.* 92(5):413-9.

Abdel-Hameed, E.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food. Chem.* 114: 1271-1277.

Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P and Ayodele, O.W.(2007). Hypoglycemic and antidiabetic activities on the stem bark aqueous and ethanol extracts of *Musanga cecropioides* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia.* 78: 502–505.

Aebi, H.(1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121-6.

Al-Mutairi, D.A., Craik, J.D., Batinic-Haberle, I., Benov, L.T.(2007). Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc meta N- methylpyridylporphyrin. *Free radical research.* 41: 89-96.

Al-Qattan, K.K., Thomson, M., Jayasree, D., Ali, M.(2016). Garlic attenuates plasma and kidney ace-1 and angii modulations in early streptozotocin-induced diabetic rats: Renal clearance and blood pressure implications. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 8142394.

Amagase, H.(2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* 3:716S-25S.

American Diabetes Association.(2010). Diabetes nutrition recommendations for health care institutions (Position Statement). *Diabetes Care.* 27(Suppl1): 55–57.

American Diabetes Association.(2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 34 (Suppl.1): 62-9.

Anderson, H.R and Stitt, A.W.(1993). Induction of alloxan / streptozotocin diabetes in dogs: A revised experimental technique .*Lab. Anim.* 27: 281-285.

Anderson, H.R. and Stitt, A.W.(1993). Induction of alloxan / streptozotocin diabetes in dogs: a revised experimental technique. *Lab. Anim.* 27: 281-285.

Ardestani, A., Yazdanparast, R.(2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food. Chem.* 104: 21-29.

Atkinson, M.A. and Maclaren, N.K. (1994).The pathogenesis of insulin–dependant diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 331:1428-1436.

Augusti, K.T and Sheela, C.G.(1996). Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia.* 52: 115–120.

Avaoto, P. and coll.(2000). *Phytomédecine.* 7:239-243.

B

Baluchnejadmojarad, T. and Rghani, M.(2003). Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 85: 139-144.

Baluchnejadmojarad, T., Kiasalari, Z., Afshin-Majd, S., Ghasemi, Z., Roghani, M.(2016). S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *Eur. J. Pharmacol.* 794: 69-76.

Banerjee, S.K., Dinda, A.K., Manchanda, S.C and Maulik, S.K.(2002). Chronic garlic administration protects heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury. *BMC. Phamacol.* 2: 2-16

Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Wandracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G and Nogueira, W.(2006). Diphenyl diselenide reduce temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*. 163: 230-238.

Barouki, R.(2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine sciences*. 22(3): 266-272.

Belhekar, S.N., Chaudhari, P.D., Saryawanshi, J.S., Mali, K.K., Pandhare, R.B.(2013). Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of *Thespesia populnea* fruit pulp extracts on alloxan-induced diabetic rats. *Indian. J. Pharm. Sci.* 75(2): 217-21.

Béliveau, R. et Gingras, D.(2005). Les aliments contre le cancer. La prévention et le traitement du cancer par l'alimentation .Ed du Trécarré. Canada.

Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E. and Sapirstein, H.D.(2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal. Chem.* 82 : 390-393.

Bisse, E. and Abraham, E.C.(1985). *J. Chromatolog.* 344: 81-91.

Bondet, V., Williams, W.B. and Berse,t C.(1997). Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie*. 30: 609-615.

Bonnefont-Rousselot, D., Bastard, J.P., Jaudon, M.C., Delattre, J.(2000). Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes & Metabolism (Paris)*. 26 : 163-176.

Bonnefont-Rousselot, D., Théron P., Beaudoux, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J. (2001). Aging and oxidative stress. Which potential markers? *Ann. Biol. Clin.* 59(4): 453-459.

Bonnefont-Rousselot, D., Théron P., Delattre, J.L.(2003). Radicaux libres et antioxydants. En : Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. *Biochimie pathologique*. Flammarion, Paris. 317.

Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J.L., Thérond, P., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J. (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 62: 147-157.

Bouldjadj, R. (2009). Étude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba asso* chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par streptozotocine. Thèse de magister, Sciences de la Nature et de la Vie. *Constantine*.

Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Seddik, K. and Arrar, L.(2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis L* root extracts. *Phytotherapy Research*. 23: 283-288.

Bourin, M. and Jolliet, P.(1999). Pharmacologie générale et pratique. Ed ellipse, Paris. 142.

Bradford, M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinbinding. *Anal. Biochem*. 72: 248–254.

Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 54: 1615-1625.

Bruneton, J.(1999). Pharmacognosie/ Phytochimie/ Plantes médicinales. Tec & Doc. Paris. 207-211.

Buccolo, G.(1973). Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin. Chem*. 19(5): 476-482.

Buege, J.A., Aust, S.D.(1984). Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol*. 105: 302-310.

Bumrela, S., Naik, S.(2011). Identification of β -carotene and β -sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthus patulus* (Jacq) nees and their role in antimicrobial and antioxidant activity. *International journal of phytomedicine*. (3): 207.

Bunn, H. F., and Higgins, P. J. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*. 213: 222-224.

C

Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J.L.(1997). Oxidative damage to DNA: Formation measurement and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 31: 1-87.

Callery and Emma.(1998). Le grand Livre des herbes « le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes ». Koineman cologne. 128.

Cao, G., Sofic, T. and Prior, R.L.(1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food. Chem*. 44: 426-31.

Charonis, A. S., Reger, L. A., Dege, J. E., Kouzi-Koliakos, K., Furcht, L. T., Wohlhueter, R. M., and Tsilibary, E. C.(1990). Laminin alterations after *in vitro* nonenzymatic glycosylation. *Diabetes*. 39: 807-814.

Chauddhry, J., Ghosh, N.N., Roy, K and Chandra, R.(2007). Antihyperglycemic effect of a new thiazolidinedione analogue and its role in ameliorating oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 80: 1135-1142.

Chen, S., Shen, X., Cheng, S., Li, P., Du, J., Yanxia, C., Huanwen, M.(2013). Evaluation of garlic cultivars for polyphenolic content and antioxidant properties. *PLoS ONE*. 8(11): 79730.

Cheta, D.(1998). Animal models of type I (insulin-dependant) diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*11: 11-19.

Colas, R., Pruneta-Deloche, V., Guichardant, M., Luquain-Costaz, C., Cugnet-Anceau, C., Moret, M., Vidal, H., Moulin, P., Lagarde, M., Calzada, C.(2010). Increased lipid peroxidation in LDL from type-2 diabetic patients. *Lipids*. 45(8): 723-31.

Comhair, S.A.A., Erzurum, S.C.(2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283(2): 246-255.

D

Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D.(2005). Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition Tec & Doc éditions médicales internationales. Paris. 405.

Dey lucey, M.D., Anoja, S., Attele, DDS., Chun-Su Yuan, M.D.(2002). Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review*. 7(1): 45-53.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Maamri, S., Djireb, F., Stocker, P.(2006). Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* 21(6): 719-26.

Douaouya, L.(2009). Contribution à l'étude de l'effet de l'ail « *Allium sativum L.* » sur le diabète expérimental induit chez le rat mâle Wistar: Aspect biochimique et histologique. Mémoire de Magister. Annaba.

Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M.(2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 97: 12222-12226.

Ducors, and Favier, A.(2004). Métabolisme du sélénium. *EMC-Endocrinologie*. 1(1): 19-28.

Duranda, D., Damonb, M. and Gobert, M.(2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente: Principes généraux. *Cahiers de nutrition et de diététique*. 48: 218-224.

E

Eidi, A., Eidi, M and Esmaili, E.(2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum*) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 13(9-10): 624-9.

El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I and Abou El-Naga, N.I.(2005). Biochemical study on the hypoglycaemic effects of onion and garlic in alloxan- induced diabetic rats. *Food. Chem. Toxicol.* 43(1):57-63.

Erlund, I.(2004). Review of the flavonoides quercetin, hesperetin and naringenin: Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research*. 24(10): 851-874.

Ernster, L., Forsmark-Andree, P.(1993). Ubiquinol: An endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.* 71: 60-65.

Essig, D.A., Nosek, T.M.(1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: A dual function of reactive oxygen species. *Can. J. Appl. Physiol.* 22: 409-428.

Evans, W.J.(2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 647-652.

F

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. and Abdelly, C.(2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus L* organs and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 372-379.

Favier, A. (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Bio. Clin.* 55(1): 9-16.

Favier, A.(2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108- 115.

Ferraz Filha, Z.S., Vitolo, I.F., Fietto, L.G., Lombardi, J.A. and Saúde-Guimarães, D.A. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (Arnica). *Journal of Ethnopharmacology*. 107: 79-82.

Flourie, F., Arab, K., Rossary, A., Steghens, J.P.(2006). Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation *in vitro* initiée par le radical °OH. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 21: 229–233.

Fournier, P. (1999). Plantes médicinales et vénéneuses de France. *Connaissance et Mémoires Européennes*. 49-53.

G

Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., Fraga, C.G.(2010). Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 501(1): 23-30.

Garait, B.(2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de Doctorat,

Sciences-technologie-sante. Grenoble.

Gardès-Albert, M., Bonne font-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D.(2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?, L'actualité chimique. 91-95.

Gargouri, M., Magné, C., El Feki, A.(2016). Hyperglycemia, oxidative stress, liver damage and dysfunction in alloxan-induced diabetic rat are prevented by *Spirulina* supplementation. Nutr. Res. 36(11): 1255-1268.

Gebhardt, R. and Beck, H.(1996). Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. Lipids. 31: 1269-76.

Genin, G. (2005). Les Syndromes en médecine clinique, biologie, imagerie. Sauramps médical. 380-385.

Glomb, M.A., Monnier, V.M.(1995). Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. Biol. Chem. 270 (17): 10017-10026.

Gokce, G. and Haznedaroglu, M. Z.(2008). Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of *Posidonia oceanica* extract. Journal of Ethnopharmacology. 115: 122-130.

Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A.(2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41: 1220-1234.

González, R.G.P., Barnett, J., Aguayo, H.M., Cheng, L.T., Chylack, J.(1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. Diabetes. 33: 196-199.

Gorinstein, S. and Drzewiecki, J.(2005). Comparative of the bioactive compounds and antioxidants potentials of fresh and cooked Polish, Ukrainian and Israeli garlic. J. Agric. Food. Chem. 53(7): 2726-32.

Gorinstein, S. and Leontonucy, H.(2006). Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in the cholesterol-fed rats. Life. Sci. 78(6): 955-63.

Goudable, J., Favier, A.(1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants, Nutr. Clin. Métabol. 11: 115-20.

Gouen, A. and Harats, D.(2005). The atherogenic effect of allicin: Possible mode of action. Pathobiology. 72(6): 325-34.

Grey, A.(2008). Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. Osteoporos. Int. 19:129-37.

Griffith, O.W., Mulcahy, R.T.(1999). The enzymes of glutathione synthesis: Gammaglutamyl cysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 73: 209-267.

Gülçin, İ., Huyutb, Z., Elmastaşç, M.Y., Aboul-Enein, H.(2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian. J. Chem.* 3(1): 43–53.

H

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O. (2007). Le stress oxidant. *Rev. Med. Liege.* 62(10): 628-638.

Ham, A.J., Liebler, D.C.(1995). Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria. *Biochemistry.* 34: 5754–5761.

Hartmann, A. and Niess, A.M.(2000). Oxidative DNA damage in exercise. Amsterdam: Elsevier. 195-217.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.(2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13(10): 572-584.

Hennebelle, T., Sahpaz, T., Bailleul, F.(2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.* 1: 3-6.

Henzen, C.(2011). Mesures du HbA1c pour le diagnostic du diabète sucré prise de position de la SSED/SGED. *Forum Med Suisse.* 11:233.

Herberg, S., Czernichow, S. and Galan, P.(2006). Antioxydants et prévention des maladies chroniques: Synthèse des principaux résultats de l'étude SU.VI.MAX. *Sang Thrombose Vaisseaux.* 18(6): 325-30.

Hernebring, M., Brolén, G., Aguilaniu, H., Semb, H., Nyström, T.(2006). Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 16 :103(20): 7700-5.

Hincu, M., Pantea, S., Anca, M., Coman, E.M and Mehedinti, T.(2006). L'effet de l'alloxane sur l'histologie du tissu pancréatique. *Fascicula XVII, Anul V.*

Hockenberry, M. J., Taylor, O. A., Gundy, P. M., Ross, A. K., Pasvogel, A., Montgomery, D., Ribbeck, P., Mc Carthy, K. and Moore, I.(2013). F₂-Isoprostanes: A measure of oxidative stress in children receiving treatment for leukemia. *Biological Research For Nursing.* 16(3): 303-309.

Hosseini, A., Hosseinzadeh, H.(2015). A review on the effects of *Allium sativum* (Garlic) in metabolic syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* 38(11): 1147-57.

Hosseini, M. and Shafiee, M.(2007). Garlic extract reduces serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity in non diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology.*14: 109-112.

Hould, R.(1984).Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed Maloine. 19-21 and 225-227.

I

Ip, C. and Lisk, D.J.(1996). The attributes of selenium-enriched garlic in cancer prevention. *Adv. Exp. Med. Biol.* 401: 179-87.

Ip, C. and Lisk, D.J.(1997). Modulation of phase I and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes by selenium-enriched garlic in rats. *Nutr. Cancer.* 28: 184-8.

J

Jain, N. and Sharma, M.(2003). Broad spectrum antimycotic drug for the treatment of ringworm infection *in* human beings. *Current Science.* 85: 37-44.

Jain, R.C. and Vyas, C.R.(1975). Garlic in alloxan-induced diabetic rabbits. *American Journal of Clinical Nutrition.* 28: 684–685.

Jakubowski, H.(2003). On the health benefits of *Allium sp.* *Nutrition.* 19(2): 167-8.

Jean–Michel, Clément. (1990). Larousse Agricole. 39-40.

Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, E.W.(1992). Glutathione and antioxidant enzymes iskeletal muscle: Effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* 73: 1854-1859.

K

Kaplan, A.(1984). Lipids. *Clin Chem.* The C.V. mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 918-919.

Kaplan, L.A.(1984). Glucose. Kaplan A *et al* .*Clin chem.* The C.V. mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1032-1036.

Kaur, G., Padiya, R., Adela, R., Putcha, U.K., Reddy, G.S., Reddy, B.R., Kumar, K.P., Chakravarty, S., Banerjee, S.K.(2016). Garlic and resveratrol attenuate diabetic complications, loss of β -cells, pancreatic and hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Front. Pharmacol.* 7: 360.

Kebieche, M.(2009). Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine, Thèse de Doctorat. Jijel.

Klinenberg, J.R., Goldfinger, S.E., Seegmiller, J.E.(1965). The effectiveness of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout. *Ann. Intern. Med.* 62: 639-47.

Koehlin-Ramonatxo, C.(2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* 20: 165-177.

Koenig, R.J., Peterson, C.M., Kilo, C., Cerami, A., and Williamson, J.R.(1976). Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes.* 25: 230-232.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS. Lett.* 416: 15-18.

Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H. and Oreopoulou, V.(2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 8: 155-162.

Kumar, G.R and Reddy, K.P.(1999). Reduced nociceptive responses in mice with alloxan induced hyperglycemia after garlic (*Allium sativum*) treatment. *Indian Journal of Experimental Biology.* 37: 662-666.

L

Lamm, D.L and Riggs, D.R.(2000). The potential application of *Allium sativum* (garlic) for the treatment of bladder cancer. *Urol. Clin. North. Am.* 27(1):157-62.

Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr. A.* 1112(1-2): 3-22.

Lapolla, A. and Fedele, D.(1993). Oxidative stress and diabetes: Role in the development of chronic complications. *Minerva. Endocrinol.* 18: 99-103.

Ledezma, E. and Lopez, J.C.(1999). Ajoène in the topical short-term treatment of tinea cruris and tinea corporis in humans: Randomized comparative study with terbinafine. *Arzneimittelforschung.* 49(6): 544-7.

Lee larungrayub, N. and Rattanapanone, V.(2006). Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition.* 22(3): 266-74.

Lemańska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zieliński, R., Soffers, A.E., Rietjens, I.M.(2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free. Radic. Biol. Med.* 31(7): 869-81.

Lenzen, S. and Panen, V.(1988). Alloxan: History and mechanism of action. *Diabetologia.* 31: 337-342.

Levine, R.L.(2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free radic. Biol. Med.* 32: 790-796.

Li, Y. M., Mitsuhashi, T., Wojciechowicz, D., Shimizu, N., Li, J., Stitt, A., He, C., Banerjee, D., and Vlassara, H.(1996). Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relation ship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11047-11052.

Liu, Z., Li, J., Zeng, Z., Liu, M and Wang, M.(2007). The antidiabetic effects of Cysteinyl Metformin, a newly synthesized agent, in alloxan- and streptozocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions.* 173(1): 68-75.

Lopes-Lutz, D., Alviano, D., Alviono, C.S. and Kolodziejczyk, P.P.(2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. (69): 1732-38.

Luke, I., Szweda, Koji Uchidat, Lin Tsai, and Earl R. Stadtman. (1993). Inactivation of glucose 6 phosphate dehydrogenase by 4-Hydroxy-2- nonenal. *Biological chemistry*. 268: 3342-3347.

Lyn Patrick, N.D.(2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern. Med.* 11(2): 114-127.

M

Maataoui, B.S., Hmyene, A. and Hilali, S.(2006). Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. (7): 3-8.

Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P.(2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J. Food. Composition and Analysis*. 21: 229-240.

Malgalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. and Lima, J.(2008). Methodological aspects about vitro evaluation of antioxidant properties . *Analytica Chemical Acta*. (613): 1-19.

Markowicz Bastos, D.H., Saldanha, L. A., Catharino, R.R., Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I B.S., Carvalho, P.O., Eberlin, M.N.(2007). Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.

Marles, R.J., Farnsworth, N.R.(1994). Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ. Med. Plant. Res*. 6:149-187.

Masaki, H.(2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci*. 58(2) :85-90.

Massion, P., Preiser, J.C., Balligand, V.(2002). Les espèces réactives de l'azote: bénéfiques ou délétères ? *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 248-252.

Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I.(1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem*. 32: 595-603.

Matés, J.M.(2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 153(1-3): 83-104.

Mathers, C.D., Loncar D.P., Lo, S. Med.(2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. 3(11): 442.

Mathew, B.C., Daniel, R.S and Augusti, K.T.(1996). Hypolipidemic effect of garlic protein substituted for casein in diet of rats compared to those of garlic oil. *Indian J. Exp. Biol*. 34: 337-40.

Max. Wichd. et Bbert.(2003). Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 19-22.

Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitao, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S. and Leitao, S.G.(2001). Screening of Barazilan plant extracts for antioxydant isoactivite by the yse of DPPH freeradical mrrthod. Phy-tother.Res. (15): 127-30.

Miean, K.H and Mohamed, S.(2001). Flavonoid myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. J. Agric. Food. Chem. 49(6):3106-12.

Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbi, S and Devasagayam, T.P.A.(2007). Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. J. Clin. Biochem. Nutr. 40: 163–173.

Mohammedi, Z.(2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Tlemcen.

Mohammedi Z.(2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l’Algérie. Thèse de Doctorat. Tlemcen.

Murray, R.(1984). Alanine aminotransferase. Kaplan A *et al* .Clin chem. The C.V. MosbyCo. Si louis. Tronto. Princeton. 1088-1090.

Murray, R.(1984). Aspartate aminotransferase. Kaplan A *et al* .Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1112-1116.

N

Nabi, S.A., Kasetti, R.B., Sirasanagandla, S., Tilak, T.K., Kumar, M.V., Rao, C.A.(2013). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of Piper longum root aqueous extract in STZ induced diabetic rats. BMC. Complement. Altern. Med. 13: 37.

Naito, H.K., Kaplan, A.(1984). Cholesterol. Clin Chem the C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princlon. 1194-11206 and 437.

Navarro, C.M., Montilla, P.M., Martin, A., Jimenez, J and Utrilla, P.M.(1993). Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus*. Plant Medicine. 59: 312-314.

Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R., Auge, N., Pamplona, R., and Portero-Otin, M. (2009). Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. Antioxid. Redox. Signal. 11: 3071-3109.

Nur Alam, M., Bristi, N., Rafiquzzaman, M.(2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi. Pharm. J. 21(2): 143–152.

Nuutila, A.M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M., Oksman-Caldentey, K.(2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food. Chem. 81(4): 485–493.

O

Ohaeri, O.C.(2001). Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. *Bioscience and Reproduction*. 21: 19-24.

Organisation Mondiale de la Santé.(2013). Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. Genève. Report Number: WHO/NMH/MND. (13): 2.

Organisation Mondiale de la Santé.(2016). Rapport mondial sur le diabète. Genève.

Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D.D., Ergun, F and Yesilada, E.(2006). *In-vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 280-286.

Oskoueian, E., Abdullah, N., Hendra, R., Karimi, E. (2011). Bioactive compounds, antioxidant, xanthine oxidase inhibitory, tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory activities of selected agro-industrial by-products. *Int. J. Mol. Sci.* 12(12): 8610-25.

P

Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K.(1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free. Radic. Biol. Med.* 22: 359-378.

Pandey, K.B. and Rizvi, S.I.(2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3: 2-12.

Pathak, A., Sharma, V., Kumar, S., Dhawan, D.K. (2011). Supplementation of zinc mitigates the altered uptake and turnover of ⁶⁵Zn in liver and whole body of diabetic rats. *Biometals*. 24 (6): 1027-1034.

Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N and Segoviano-Murillo, S.(2007). Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food and Chemical Toxicology*. 45: 622-627.

Pérez-Jiménez, J., Arranza, S., Tabernerroa, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñib, I., Saura-Calixto, F.(2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food. Res. Int.* 41(3): 274–85.

Pesce, A.(1984). Lactate dehydrogenase. Kaplan, A. *Clin. Chem. The C.V.* 1124-117 and 438.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.(2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante, *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 233-239.

Poblocka-Olech, L., Glód, D., Żebrowska, M.E., Sznitowska, M., Krauze-Baranowska, M.(2016). TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum*. *Acta. Pharm.* 1: 66(4):543-554.

Powers, S., Jackson, M.(2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88: 1243-1276.

Prasad, K., Laxdal, V.A., Yu, M and Raney, B.L.(1995). Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol. Cell. Biochem.* 148: 183-9.

Prasanna, R., Ashraf, E.A., Essam, M.A.(2016). Chamomile and oregano extracts synergistically exhibit antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and renal protective effects in alloxan-induced diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2: 1-9.

R

Raccah, D.(2004). Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie.* 1: 29-42.

Rahman, K.(2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* 2(2): 219–36.

Ramesh,B., Pugalendi, K.V.(2006). Antioxidant role of Umbelliferone in STZ- diabetic rats. *Life Sciences.*79 :306–310.

Ramonatxo, C.(2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* 20: 165-177.

Rapport des experts de l'ALFEDIAM.(1999). Diagnostic et classification du diabète sucré, les nouveaux critères. *Diabetes & Metabolism (Paris).* 25: 72-83.

Reichel, F-X.(2010). Guide pratique de toxicologie. 2^e édition. De Boeck, Bruxelles. 202, 203 and 148.

Reitman, S. and Frankel, S.J.(1957). *Clin. Path.* 28-56.

S

Sabry, S., Dinh-Xuan, A.T.(1996). Le monoxyde d'azote: un médiateur ubiquitaire. *Arch. Pediatr.* 3: 275-277.

Sapin,R. Review.(2003). Insulin Assays: Previously known and New Analytical Features. *Clin. Lab.* 49(3-4):113-121.

Sathishsekar, D., Subramanian, S.(2005). Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 14(2): 153-8.

Sen, C.K.(2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med. Sci. Sport. Exer.* 33 (3): 368-370.

Sharifi-Rad, J., Mnayer, D., Tabanelli, G., Stojanović-Radić, Z.Z., Sharifi-Rad, M., Yousaf, Z., Vallone, L., Setzer, W.N., Iriti, M.(2016). Plants of the genus *Allium* as

antibacterial agents: From tradition to pharmacy. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 62(9): 57-68

Sharma, A., Kharb, S., Chung, S.N., Kakkar, R., Singh, G.P.(2000). Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after Vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism*. 49: 160-162.

Sheela, C.G. and Augusti, K.T.(1992). Antidiabetic effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from garlic *Allium sativum* Linn. *Indian J. Exp. Biol.* 30: 523-526.

Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J.(2006). Modern nutrition in health and disease ; dietotherapy. Tenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 582.

Shrinivas, B. and Suresh, R.N.(2011). Identification of 3-carotene and 3-sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthus patulus* (Jacq) nees and their role in antimicrobial and antioxidant activity. *International Journal of Phytomedicine*. (3): 20.

Signorini, C., De Felice, C., Durand, T., Oger, C., Galano, J. M., Leoncini, S., Pecorelli, A., Valacchi, G., Ciccoli, L. and Hayek, J.(2013). Isoprostanes and 4-hydroxy-2-nonenal: markers or mediators of disease? Focus on Rett syndrome as a model of autism spectrum disorder. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 343824.

Soon, Y.Y and Tan, B.K.H.(2002). Evaluation of the hypoglycaemic and antioxidant activities of *Morinda officinalis* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Medical Journal*. 43: 77-85.

Spiteller, G. (2006). Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases : Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology Medicine*. 41 (3): 362-387.

Sticher, O. and Dtsch.(1991). *A Poth. Ztg.* 131:403-413.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 50: 537-546.

T

Tames, F.J., Mackness, M.I., Arrol, S., Laing, I. and Durrington, P.N.(1992). Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 93: 237-244.

Therond, P.(2006). Stress oxydant Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Ann. Pharm. Fr.* 64: 383-3.

Thomson, M., Al-Qattan, K.K., Bordia, T and Muslim, A.(2006). Supplement: Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol, and triglycerides. *J. Nutr.* 136: 800-802.

Thomson, M., Al-Qattan, K.K., J S D, Ali, M.(2016). Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats. BMC Complement Altern. Med. 16: 17.

Traber, M.G., Atkinson, J.(2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Trinder, P. (1969). Ann. Clin. biochem. 6: 24-33.

Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., Oreopoulou, V.(2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC -MS/MS. Molecules. 12: 593-606.

Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S.(2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry. 99(4): 835841.

U

Uma, S. and Ishwarlal, J.(2008). Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. Nutr Rev. 66: 646-657.

Umamaheswari, M., Asok-Kumar, K., Somasundaram, A., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V. and Ravi, T.K.(2007). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. Journal of Ethnopharmacology. 109: 547-551.

V

Vadde, R. and Rama, J.(2008). Oxidative stress in non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patient. Acta Diabetol. 45: 41-46.

Vats, V., Yadav, S.P and Grover, J.K.(2004). Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. J. Ethnopharmacol. 90:155–160.

Vertuani,S., Angusti,A., Manfredini, S.(2004). The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. Curr. Pharm. Des. 10: 1677-1694.

Vicentini, F.T., SHao, Y., Fonseca, M.J., Fisher., G.J, Xu, Y.(2011). Quercetin inhibits UV radiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by supressing NF-KB. Journal of Dermatological Science. 61: 162-168.

Vinson, J.A and Hao, Y.(1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods vegetable. J. Agric. Food. Chem. 46: 3630-4.

Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., Heinonen, M.(2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. J. Agric. Food. Chem. 53(22): 8492-7.

W

Wang, S.Y., Wu, J.H., Shyur, L.F., Kuo, Y.H. and Chang, S.T.(2002). Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata Holzforschung. (5): 56.

Weckbeker, G., Cory, J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*. 40: 257-264.

Welch, W.J. (1992). Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72: 1063-1081.

Wells-Knecht, K.J., Zyzak, D.V., Litchfield, J.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W.(1995). Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*. 34 (11): 3702-3709.

Wenger, C.(1984). Alkaline phosphatase. Kaplan, A. *Clin. Chem. The C.V.* 1094-1098.

West, I.C.(2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*. 17: 171-180.

Wollenweber, E.(1988). Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular and medicinal properties. *Progress in clinical and biological research*. New York: Alan R. Liss. 45.

Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W. and Chen, F.(2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. (12): 120-30.

Wong, F.S and Karttunen, J. (1999). Identification of an MHC class-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ – specific cDNA library. *Nat Med*. 5: 1026-1031.

γ

Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N.(1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant. Physiol.* 115(4): 1405-1412.

Yamasaki, T. and Lau, B.H.(1997). Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidant injury. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 110 Suppl 1:138-141.

Yang, W., Yang, X. and Xia, Y.(1997). Active anticarcinogenic chemical components in ordinary garlic and selenium enriched garlic. *Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih*. 31: 304-6.

Yeh, Y.Y. and Yeh, S.M.(1994). Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. *Lipids*. 29: 189-93.

Ying Foo, A.(1998). Amylase measurement with 2-chloro-4-nitrophenyl maltotrioxide as substrate. *Clin. Chim.* 272: 137-147.

Yrjonen, T.(2004). Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Conference room 513 at viikki info center. Faculty of pharmacy of the University Helsinki. 64.

Z

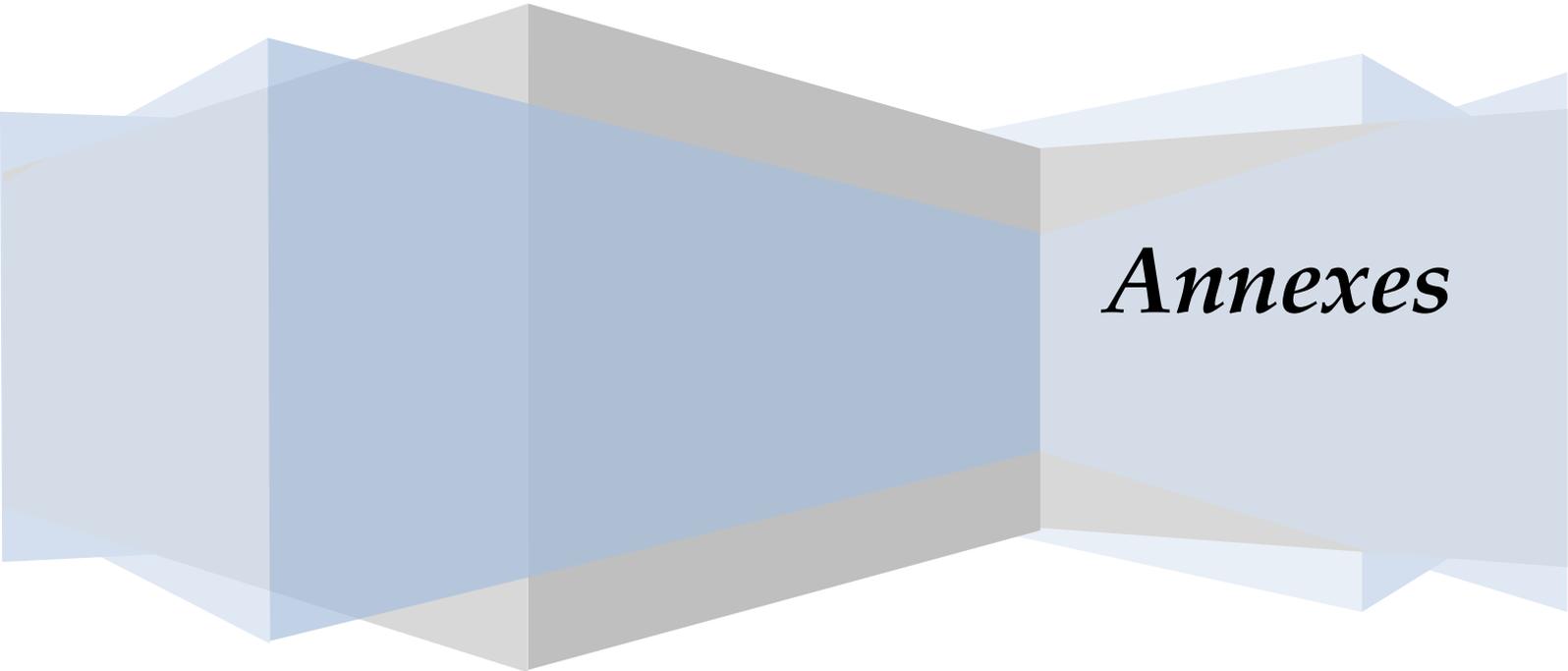
Zardast, M., Namakin, K., Esmaelian Kaho, J., Hashemi, S.S.(2016). Assessment of antibacterial effect of garlic in patients infected with *Helicobacter pylori* using urease breath test. *Avicenna. J. Phytomed.* 6(5): 495-501.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J.(2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the Cu Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free. Radic. Biol. Med.* 33(3): 337-49.

Zendjabil, M.(2015). Biological diagnosis of diabetes mellitus. *Pathol. Biol. (Paris).* S0369-8114(15): 00100-5.

Zhang, Q., Li, N., Zhou, G., Lu, X., Xu, Z. and Li, Z.(2003). *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacological Research.* 48: 151-155.

Ziamajidi, N., Nasiri, A., Abbasalipourkabir, R., Sadeghi Moheb, S.(2017). Effects of garlic extract on TNF- α expression and oxidative stress status in the kidneys of rats with STZ + nicotinamide-induced diabetes. *Pharm. Biol.* 55(1): 526-531.



Annexes

Annexes

Préparation des solutions

1) Tampon PBS : Pour 1 litre de PBS 1X

- Commencer par 800 ml d'eau distillée;
- Ajouter 8 g de NaCl (0,136 M) ;
- Ajouter 0,2 g de KCl (2mM) ;
- Ajouter 1,44 g de Na₂HPO₄ (8.1mM) ;
- Ajouter 0,24 g de KH₂PO₄ (1.46mM) ;
- Ajuster le pH à 7,4 avec HCl ;
- Ajouter de l'eau distillée à un volume total de 1 litre.

2) Dosage des protéines par la méthode de Bradford

- ❖ **BSA (1 mg/ml)** : Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.
- ❖ **Réactif de Bradford** : Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

3) Dosage du glutathion

- ❖ **Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) et pH 9,6** : Dissoudre 12,114 g Tris et 1,871 g EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6.
- ❖ **EDTA (0,02 M)** : Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750 ml d'eau distillée.
- ❖ **DTNB (0,01 M)** : Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.
- ❖ **L'acide salicylique (0,25%)** : Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

4) Dosage du MDA

- ❖ **TBS ; Tris (50mM), NaCl (150mM) et pH 7,4** : Dissoudre 8,775 g NaCl dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1L par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4.
- ❖ **TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)** : Dissoudre 20 g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution TCA 20% puis poser 1 g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud.
- ❖ **HCl 0.6 M** : Prélever 51,56 ml d'HCl et compléter le volume à 1 L par l'eau distillée.
- ❖ **Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM)** : Dissoudre 3,149 g Tris dans 1 L d'eau distillée, puis poser 17,299 g TBA et compléter le volume à 1 L par la solution Tris (26 mM).

5) Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

❖ **Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4)**

Solution A, dissoudre 6,24 g NaH_2PO_4 (2 H_2O) dans 200 ml d'eau distillée. Solution B, dissoudre 14.32 g NaH_2PO_4 (12 H_2O) dans 200 ml d'eau distillée. Mélanger 16 ml de la solution A avec 84 ml de la solution B.

6) Préparation du Bouin alcoolique (100 ml)

- ❖ 45 ml de solution d'acide picrique 1 % dans de l'éthanol (95 %) ;
- ❖ 26 ml de Formol ;
- ❖ 07 ml d'acide acétique ;
- ❖ 22 ml d'eau distillée.

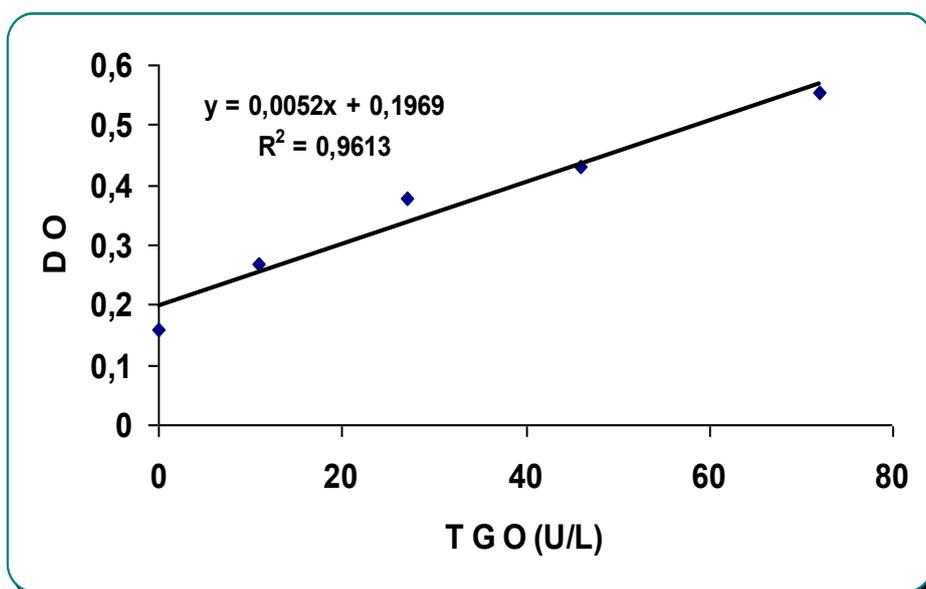
Courbes d'étalonnage

Figure 36. Courbe d'étalonnage de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT/TGO)

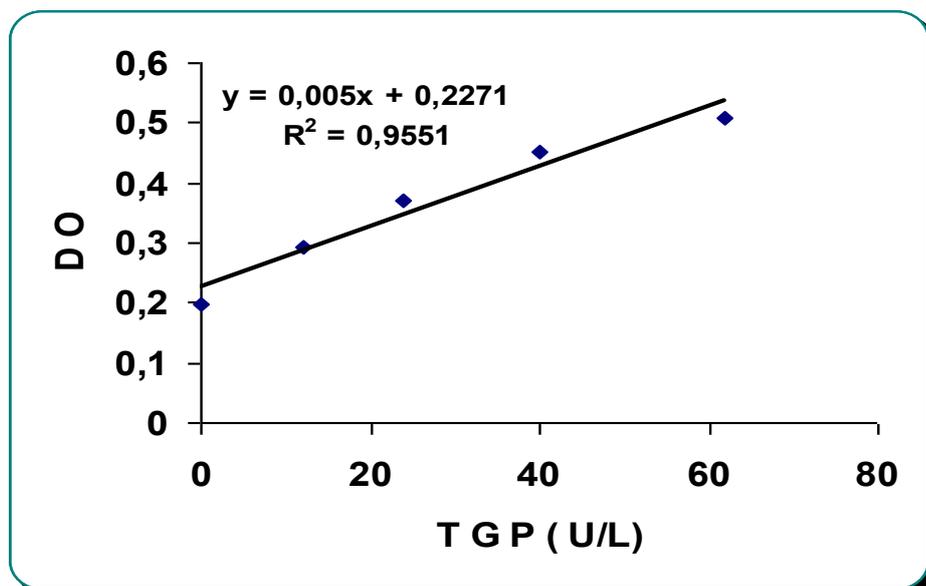


Figure 37. Courbe d'étalonnage de l'Alanine Aminotransférase (ALAT/TGP)

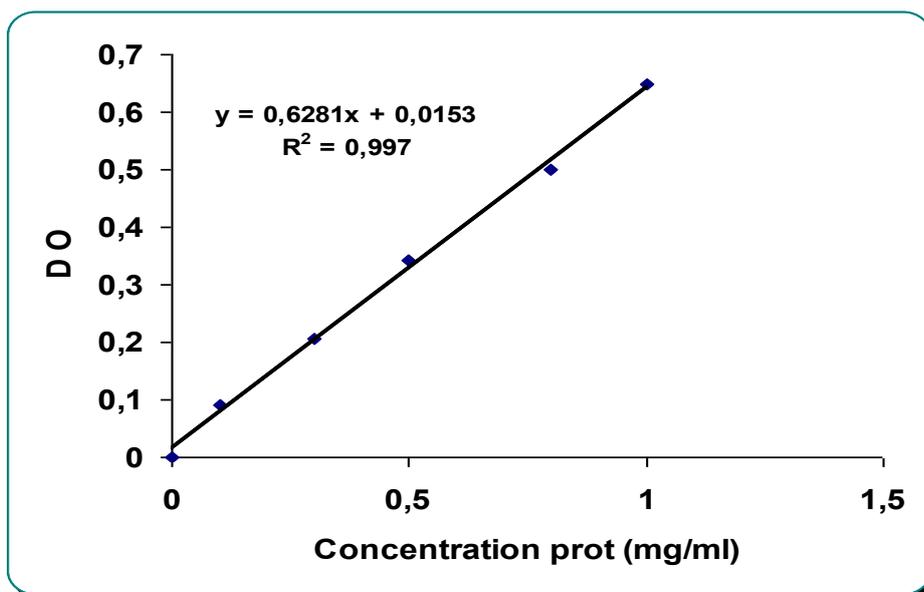


Figure 38. Droite d'étalonnage du sérum albumine bovin

EFFECT OF GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L) ON BIOCHEMICAL PARAMETERS AND HISTOPATHOLOGY OF PANCREAS OF ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RATS

LILIA DOUAOUYA^{1,2*}, NOUREDDINE BOUZERNA²

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Khenchela University, Khenchela, 40004, Algeria, ²Laboratory of Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria
Email: douaouyalilia@yahoo.fr

Received: 22 Feb 2016 Revised and Accepted: 20 Apr 2016

ABSTRACT

Objective: Garlic (*Allium sativum*. L) plays an important dietary role, as well as medicinal, for centuries. Even today the use of garlic is widespread and growing. The present study investigated the effect of garlic extract and glibenclamide on biochemical parameters, enzyme activities, and reduced glutathione (GSH) content in the liver as well as on pancreas tissue in alloxan-induced diabetic rats.

Methods: Diabetes mellitus was induced in 28 out of 35 adult male albino rats, using an intraperitoneal injection of 150 mg/kg body weight of alloxan. The diabetic rats were divided into four groups, two of which were administered orally by garlic extract (250 and 500 mg/kg) and a group composed of diabetic rats was given the standard drug, glibenclamide, orally at a dose of 2.5 mg/kg. The control rats (normal and diabetic) were fed normal saline, once daily for 21 d.

Results: Oral administration of the garlic extract significantly decreased blood glycosylated hemoglobin, serum glucose, total cholesterol, triglycerides, total lipids, glutamic oxalic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH), and alkaline phosphatase (ALP) levels, with significant increase in plasma insulin, and GSH content in liver of alloxan-diabetic rats in dose-dependent fashion which was comparable to an antidiabetic standard drug, glibenclamide, given at a dose of 2.5 mg/kg. Concurrent histological studies of the pancreas of these animals have confirmed the changes observed in biochemical parameters and proved the comparable preventive effect of garlic extract.

Conclusion: These results suggest the potential of garlic extract as a histo protective against free-radical-associated diabetes damage, preserving the ability of insulin secretion, and show a concentration-dependent antidiabetic effect.

Keywords: Garlic, Diabetes, Biochemical parameters, Glibenclamide, Pancreas, Rat

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

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is an endocrine disorder that is characterized by hyperglycemia [1]. A number of investigations, of oral anti-hyperglycemic agents from plants used in traditional medicine, have been conducted and many of the plants were found with good activity [2]. The World Health Organization (WHO) has also recommended the evaluation of the plants' effectiveness in conditions where we lack safe, modern drugs [3]. This has led to an increasing demand of research on natural antidiabetic products which produce minimal or no side effects. Garlic (*Allium sativum* L., Liliaceae) is a common spicy flavoring agent used since ancient times. Garlic has been cultivated for its characteristic flavor and medicinal properties. Although garlic has been used for centuries, and even nowadays is part of popular in many cultures, but until recently there has been little scientific support of its therapeutics and pharmacological properties. In the past decade, some protective effects of garlic have been well established by epidemiological studies and animal experiments. Elkayam, Mirelman and Peleg investigate the commercially available garlic preparations in the form of garlic oil, garlic powder, and pills are widely used for certain therapeutic purposes, including lowering blood pressure and improving lipid profile [4]. Garlic has been largely attributed to the reduction of risk factors for cardiovascular diseases and cancer [5], stimulation of immune function [6], hepatoprotection [7] and antioxidant effect [8]. In addition, garlic contains at least 33 sulfur compounds, several enzymes, 17 amino acids, and minerals such as selenium [9]. It contains a higher concentration of sulfur compounds than any other *Allium* species. The sulfur compounds are responsible both for garlic's pungent odor and many of its medicinal effects.

Therefore, the purpose of the present study is first to examine the influence of oral administration of garlic extract and glibenclamide on biochemical parameters, the activities of some enzymes in plasma, glutathione level in liver and histopathology of the pancreas in the alloxan-induced diabetic rat.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of garlic extract

Fresh garlic (*Allium Sativum* L.) was collected from North-East of Algeria (El Tarf Province), in July 2012, and identified by botanists in the herbarium of Badji Mokhtar University, Algeria. Then, the cloves were peeled, sliced, ground into a paste and a homogenate was made in distilled water. Two concentrations of the extract were prepared, 0.1 and 0.2 mg/ml, corresponding to 250 mg and 500 mg/kg body weight of the animal. Oral feeding was done within 30 min of preparation of homogenate.

Animals

Male albino Wistar rats used were 8 w old; they were procured from Pasture Institute, Algiers, Algeria, and were maintained at animal house of animal biochemistry department, Badji Mokhtar university, Annaba. The animals were divided into five groups (n=7 each) and housed in clean cages with temperature (22–24 °C), 12-h light/12-h dark cycle and relative air humidity 40–60%. Rats had free access to food and water.

Induction of diabetes

After one week of adaptation period with a nutritionally complete, rats were fasted overnight and injected intraperitoneally with a freshly prepared alloxan monohydrate solution at a dose of 150 mg/kg body weight [10]. The diagnosis of diabetes was based on hyperglycemia (blood glucose levels above 200 mg/dl) on the 3rd day after alloxan injection.

Experimental protocol

In the present experiment, 35 rats (28 diabetic and 7 normal rats) were used. The rats were randomly divided into five groups of seven males each. Garlic extract and standard drug, glibenclamide, were

fed by gavages every day at fixed time (10.00 a. m) for 3 consecutive weeks as follows:

Group N-C: Normal Control rats were administrated 1 ml of normal saline.

Group DT-250: Diabetic Treated rats were administrated garlic extract (250 mg/kg body weight).

Group DT-500: Diabetic Treated rats were administrated garlic extract (500 mg/kg body weight).

Group D-C: Diabetic Control rats were administrated 1 ml of normal saline.

Group DT-Glb Diabetic Treated rats were administrated standard drug, glibenclamide (2.5 mg/kg body weight).

After three weeks of treatment, total body weights were recorded and animals were sacrificed,

Blood collection and biochemical analyze

Blood was collected with the ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) container and used for the preparation of plasma. Blood collected without anticoagulant was used for serum separation.

-Glucose was measured in 10 µl samples of whole blood by the glucose oxidase method, using an YSI model 27 glucose analyzer and the kit constitute of phosphate buffer containing the enzymes (GOD, POD) and D-glucose (Sigma).

-Plasma insulin level was estimated with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit using human insulin as standard [11].

-Lipids, cholesterol, and triglycerides concentrations were determined using commercial test kits for lipids [12], cholesterol [13] and triglycerides [14].

-Plasma was separated and used for glycosylated hemoglobin (HbA1c) assay according to a method of Bisse and Abraham [15].

-GOT, GPT, LDH and ALP activities were also determined using commercial test kits for GOT, GPT [16], LDH [17] and alkaline phosphatase [18].

Protein estimation

The protein contents were determined according to the method of Bradford [19] by using bovine serum albumin as a standard.

Determination of reduced glutathione

The measurement of liver reduced glutathione (GSH) concentration was performed by Weckbercker and Cory method [20] using a colorimetric technique, based on the development of a yellow colour when DTNB [(5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))] is added to compounds containing sulfhydryl groups. In brief, 0.8 ml of liver supernatant was added to 0.2 ml of 0.25% sulfosalicylic acid, and then tubes were centrifuged at 1000 × g for 10 min. Supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The absorbance at 412 nm was recorded. Finally, total GSH content was expressed as n mol GSH/mg protein.

Histopathological studies

For histopathological examination, pancreas obtained by dissection was washed with isotonic saline (9g sodium chloride/1 distilled

water). It was immediately fixed in Bouin solution for 24 h, processed by using a graded ethanol series, and then embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5 µm thick slices and stained with hematoxylin and eosin (H&E) [21]. All sections were examined for histological changes as shown in fig. 1. All pictures (microphotography's) have a magnification of 400· and were performed with optic microscopy.

Statistical analysis

Data were expressed as means±SE. Data comparisons were carried out by using one-way ANOVA followed by Student's t-test to compare means between the different treated groups. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Effect of administration of garlic extract on body weight gain, serum glucose, blood glycosylated hemoglobin and plasma insulin levels:

In the present study, we observed after three weeks of treatment a significant decrease in body weight in diabetic control rats (D-C) compared to normal controls (N-C) (table1), whereas diabetic rats orally treated with 250 and 500 mg/kg of garlic extract were maintained a good phenotype in a dose-dependent fashion. Besides, the experimentally induced diabetes increased the level of serum glucose and the percentage of HbA1c compared to the (N-C) group.

However, a decrease in serum glucose and blood glycosylated hemoglobin levels coupled with significant increase in plasma insulin was maximum in the group receiving 500 mg/kg BW of garlic extract which was comparable to a standard antidiabetic drug, glibenclamide, given at a dose of 2.5 mg/kg. (table1). The antidiabetic effect induced by garlic extract, as observed, was dose-related.

Effect of administration of treatment on serum biochemical parameters and liver reduced glutathione

The biochemical parameters (table 2) such as serum lipids, triglycerides, and cholesterol in experimental groups of rats shows a significant increase in the levels of lipids, triglycerides, cholesterol in alloxan-induced diabetic rats (D-C), when compared with normal control rats (N-C). Administration of glibenclamide at dose of 2.5 mg/kg and *Allium sativum* extract to diabetic rats for 21 d resulted in the restoration of biochemical parameters levels towards near normalcy in a dose-dependent fashion.

Liver reduced glutathione concentration of diabetic control animals was lower than this of normal control rats. This alteration was restored back to near normal in diabetic rats orally treated with 250 and 500 mg/kg of raw garlic homogenate and standard drug, glibenclamide (table 02).

Effect of administration of garlic extract and glibenclamide on the activities of pathophysiological enzymes

Table 3 depicts the activities of GOT, GPT, LDH and ALP in the serum of experimental groups of rats. There was a significant increase in the activities of GOT, GPT, LDH and ALP in the serum of diabetic rats when compared with normal control rats. Daily oral administration of glibenclamide at dose of 2.5 mg/kg and *Allium sativum* extract to diabetic rats for 21 at doses of 250 and 500 mg/kg brought down these enzyme activities to near normal.

Table 1: Effect of garlic extract on body weight gain, glucose, blood glycosylated hemoglobin and plasma insulin levels after three weeks of treatment in experimental groups

Groups	Body weight gain (g)	Glucose (mg/dl) (mean±SE)	HbA1c (%)	Plasma insulin (µU/ml)
N-C	+31.3±11.2	116.10±11.1	2.23±0.5	13.65±4.32
D-C	-06.14 ^(a) ***±9.92	408.48 ^(a) ***±10.2	3.72 ^(a) ***±0.47	5.69 ^(a) ***±2.75
DT-250	+14.9±19.37	284.8 ^(b) **±85.63	2.53 ^(b) **±0.53	9.16 ^(b) **±2.56
DT-500	+37.3 ^(b) ***±14.5	166.4 ^(b) ***±63.8	2.11 ^(b) ***±0.89	12.06 ^(b) ***±5.05
DT-Glb	+37.8 ^(b) ***±20.1	116.4 ^(b) ***±63.8	2.13 ^(b) ***±0.65	13.96 ^(b) ***±4.06

N-C: Normal Control D-C: Diabetic Control DT-250: Diabetic Treated rats with garlic extract at 250 mg/kg, DT-500: Diabetic Treated rats with garlic extract at 500 mg/kg. DT-Glb Diabetic Treated rats with glibenclamide at 2.5 mg/kg, Results are expressed as mean±SE (n=7). One-way ANOVA followed by Student's t-test. ** $P \leq 0, 01$, *** $P \leq 0,001$ (a): compared to (N-C) (b): compared to (D-C).

Table 2: Effect of garlic extract and glibenclamide on serum biochemical parameters and liver reduced glutathione after three weeks of treatment in experimental groups

Groups	Lipids (mg/100 ml)	Cholesterol (mg/100 ml)(mean±SE)	Triglycerides (mg/100 ml)	Liver GSH(nM/mg prot)
N-C	334.9±75.1	77.61±4.39	75.2±18.25	122.4±17.8
D-C	753 ^{(a)***} ±130	105.69 ^{(a)***} ±11.63	114.61 ^{(a)**} ±16.13	94.2 ^{(a)**} ±11.4
DT-250	588 ^{(b)**} ±80,1	88.61 ^{(b)*} ±12.72	65.75 ^{(b)***} ±18.85	149.3 ^{(b)***} ±13.7
DT-500	480.6 ^{(b)***} ±102	79.89 ^{(b)***} ±6.29	40.96 ^{(b)***} ±14.22	186.6 ^{(b)***} ±21.1
DT-Glb	380.3 ^{(b)***} ±92	76.59 ^{(b)***} ±7.19	70.91 ^{(b)***} ±14.82	145.6 ^{(b)***} ±11.1

N-C: Normal Control D-C: Diabetic Control DT-250: Diabetic Treated rats with garlic extract at 250 mg/kg, DT-500: Diabetic Treated rats with garlic extract at 500 mg/kg. DT-Glb Diabetic Treated rats with glibenclamide at 2.5 mg/kg, Results are expressed as mean±SE (n=7). One-way ANOVA followed by Student's t-test. *P≤0, 05, **P≤0, 01, ***P≤0,001 (a): compared to (N-C) (b): compared to (D-C)

Table 3: Effect of garlic treatment on pathophysiological enzymes activities after three weeks of treatment in experimental groups

Groups	GOT (U/l)	GPT (U/l)(mean±SE)	LDH (U/l)	ALP (U/l)
N-C	31.48±5.2	25.99±5.32	1419±110	283.1±32.9
D-C	45.4 ^{(a)**} ±10.8	35.73 ^{(a)**} ±5.6	1970 ^{(a)***} ±273	610 ^{(a)***} ±46.7
DT-250	37.73±6.58	32.39±3.92	1252 ^{(b)***} ±352	373.3 ^{(b)***} ±119
DT-500	29.76 ^{(b)**} ±3.93	26.38 ^{(b)**} ±4.29	1295 ^{(b)***} ±235	243 ^{(b)***} ±95.1
DT-Glb	29.56 ^{(b)**} ±3.13	24.33 ^{(b)**} ±3.19	1315 ^{(b)***} ±135	199.2 ^{(b)***} ±75

N-C: Normal Control D-C: Diabetic Control DT-250: Diabetic Treated rats with garlic extract at 250 mg/kg, DT-500: Diabetic Treated rats with garlic extract at 500 mg/kg. DT-Glb Diabetic Treated rats with glibenclamide at 2.5 mg/kg, Results are expressed as mean±SE (n=7). One-way ANOVA followed by Student's t-test, *P≤0, 05, **P≤0, 01, ***P≤0,001 (a): compared to (N-C) (b): compared to (D-C)

Effect of garlic extracts on pancreas histopathology

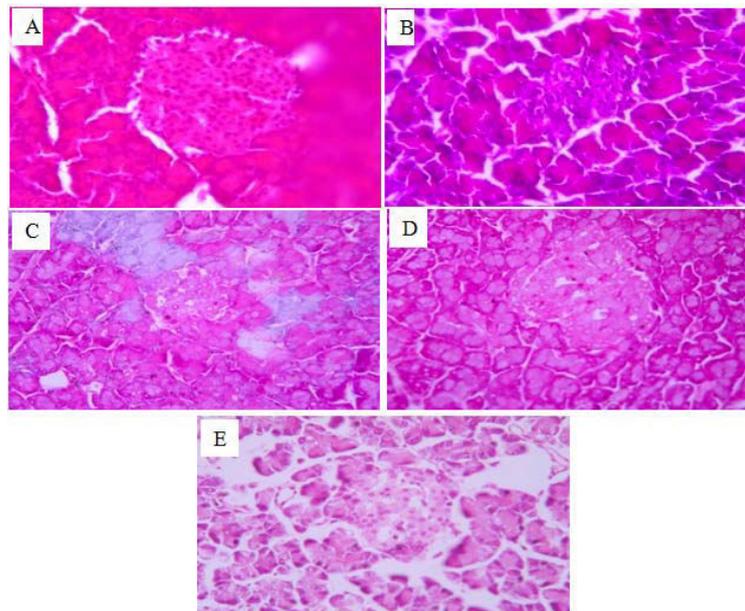


Fig. 1: Effect of garlic extract on histopathological damages in the pancreas after three weeks of treatment in experimental groups: A: Section of pancreas tissue from normal control rats (N-C) showing normal architecture. B: Section of pancreas tissue from diabetic control rats (D-C) showing degenerative vascular changes in the islets. C: Section of pancreas tissue from DT-250 group showing initial stages of regenerating islets. D: Section of pancreas tissue from DT-500 group showing apparently normal architecture. E: Section of pancreas tissue from DT-Glb group showing the apparently normal population of pancreatic islets. Optic microscopy: sections were stained using the hematoxylin-eosin method (400x)

DISCUSSION

Alloxan has been widely used for inducing type I diabetes in a variety of animals by affecting degeneration and necrosis of pancreatic β -cells [22]. The present results showed that alloxan-induction results in a decrease in body weight of diabetic rats which is possible due to catabolism of fats and protein, even though the food intake is more in diabetic rats than normal control. Due to insulin deficiency protein content is decreased in muscular tissue by proteolysis [23]. Daily oral administration of *Allium sativum* extract

to diabetic rats for 21 d at doses of 250 and 500 mg/kg significantly improves body weight in diabetic rats. The present data indicated that the garlic extract significantly decreased serum glucose in treated diabetic rats in a dose-dependent fashion as compared with diabetic control rats.

Furthermore, the observed effects of the extract on weight loss compared favorably with glibenclamide. The hypoglycemic potency of garlic has been attributed to the sulphur compounds [di (2-propenyl) disulphide and 2-propenyl propyl disulphide,

respectively] [24]. The mechanism of hypoglycemic action probably involves direct or indirect stimulation of insulin secretion [25]. Further, Augusti suggested that these disulphide compounds have the effect of sparing insulin from-SH inactivation by reacting with endogenous thiol-containing molecules such as cysteine, glutathione, and serum albumins [26]. The garlic extract might enhance glucose utilization because it significantly decreased the blood glucose level in glucose-loaded rats.

During diabetes, the excess glucose present in the blood reacts non-enzymatically with hemoglobin to form glycosylated hemoglobin (HbA1C). As a result, the rate of glycosylation is proportional to the concentration of blood glucose [27]. Hence, estimation of glycosylated hemoglobin is a well-accepted biochemical parameter useful for the diagnosis and management of the disease. The increased glycosylated hemoglobin is associated with loss of β -cell function and has been implicated in the complications of diabetes mellitus [28]. Oral administrations of *Allium sativum* tend to decrease the level of glycosylated hemoglobin by improving the blood glucose homeostasis.

Lipids play a vital role in the pathogenesis of diabetes mellitus. The most common lipid abnormalities in diabetes are hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. In our study, we have noticed elevated levels of serum lipids such as cholesterol and triglycerides in diabetic rats. The levels of increased serum lipids in diabetes represent a risk factor for coronary heart disease. Under normal circumstances, insulin activates lipoprotein lipase and hydrolyzes triglycerides [29]. Insulin increases uptake of fatty acids into adipose tissue and increases triglyceride synthesis. Moreover, insulin inhibits lipolysis. In the case of insulin deficiency, lipolysis is not inhibited, and we have increased lipolysis which finally leads to hyperlipidemia. In insulin-deficient diabetes, the concentration of serum free fatty acids is elevated as a result of free fatty acid outflow from fat depots, where the balance of the free fatty acid esterification-triglyceride lipolysis cycle is displaced in favor of lipolysis.

The administration of garlic extract significantly decreased serum triglycerides and cholesterol in diabetic rats which were comparable to a standard antidiabetic drug, glibenclamide, given at a dose of 2.5 mg/kg. In accordance with the present data, other workers have reported that administration of fresh garlic or etheric garlic extracts was shown to improve lipid profile including reduction of serum cholesterol levels [30]. Short-term experiments using primary hepatocyte cultures, which have proved useful as tools for screening the anticholesterolemic properties of garlic. With respect to the cholesterol-lowering property of garlic, it has been suggested that some constituents of garlic may act as inhibitors for some enzymes such as hydroxy methyl glutaryl-CoA reductase, which participates in cholesterol synthesis [31]. Consistent with this idea, it has been shown that *in vivo* treatment of garlic extract reduces the lipid peroxidation products [32].

Serum enzymes including GOT, GPT, LDH and ALP are used in the evaluation of hepatic disorders. An increase in these enzymes activities reflects active liver damage/inflammatory hepatocellular disorders [33]. In accordance with these findings, increase in the activities of GOT, GPT, LDH and ALP in serum may be mainly due to the leakage of these enzymes from the liver cytosol into the blood stream [34], which gives an indication on the hepatotoxic effect of alloxan. On the other hand, Daily oral administration of glibenclamide at dose of 2.5 mg/kg and *Allium sativum* extract to diabetic rats for 21 days at doses of 250 and 500 mg/kg caused reduction in the activity of these enzymes in serum compared to the mean values of the diabetic group and consequently may alleviate liver damage caused by alloxan-induced diabetes; these results were in agreement with other findings [35].

Reduced glutathione is a potent free radical scavenger. GSH within the islet of β -cell is an important factor against the progressive destruction of the β -cells following partial pancreatectomy [36]. Depletion of GSH results in enhanced lipid peroxidation. This can cause increased GSH consumption and can be correlated to increase in the level of oxidized glutathione (GSSG). Administration of garlic extract resulted in the elevation of the GSH level, which protects the cell membrane against oxidative damage by regulating the redox

status of protein in the cell membrane similar results [37]. The hepatoprotective activity of garlic extract was higher at 500 mg/kg than glibenclamide. The increase in the GSH content may protect the tissues against diabetes associated tissue injury by reducing the susceptibility to toxic radicals.

The pathological changes observed in pancreas (fig. 1) of alloxan diabetic rats may be due to the hyperglycemia and its mediated oxidative stress. *Allium sativum* extract resulted in glucose homeostasis and attenuation of oxidative stress by optimization of antioxidant status [38], which could have protected tissue damage. The histological evidence authenticated the extent of tissue injury by alloxan and the protection offered to pancreatic β -cells by garlic extract in dose-dependent fashion preserving the ability of insulin secretion [39]. These results are in agreement with those obtained by Banerjee and Dinda [40] wherever they visualized the efficiency of this garlic extract on the protection of the heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury.

The present results showed that local spices of *Allium sativum* exerted antioxidant and antihyperglycemic effects and consequently may alleviate and protect pancreas damage caused by alloxan-induced diabetes which was comparable to an standard antidiabetic drug, glibenclamide, given at a dose of 2.5 mg/kg. The effects induced by the extract, as observed were dose-related. Further, it is concluded that the plant must be considered as an excellent candidate for future studies on diabetes mellitus. In addition, comprehensive pharmacological investigations, including chronic experimental studies, should be carried out.

CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

REFERENCES

- Chandra A, Singh RK, Tewari L. Antioxidative potential of herbal hypoglycemic agents in diabetes—an overview. *SFRP. Indian Bull* 2004;3:24-6.
- Kesari AN, Kesari S, Singh SK, Gupta RK, Watal G. Studies on the glycemic and lipidemic effect of *Murraya koenigii* in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 2007;112:305-11.
- Day C. Traditional plant treatment for diabetes mellitus: pharmaceutical foods. *Britain J Nutr* 1998;80:5-6.
- Elkayam A, Mirelman D, Peleg E. The effects of alliin on weight in fructose-induced hyperinsulinemic, hyperlipidemic, hypertensive rats. *Am J Hypertension* 2003;16:1053-6.
- Thomson M, Al-Qattan KK, Bordia T, Muslim A. Supplement: significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol, and triglycerides. *J Nutr* 2006;136:800-2.
- Salman H, Bergman M, Bessler H, Punskey I, Djaldetti M. Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:589-97.
- Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision-cut rat liver slices. *Toxicology* 1999;132:215-25.
- Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, alliin, and allyl disulfide. *J Med Food* 2006;9:205-13.
- Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. *Herbal medicines: a guide for health-care professionals*. London: Pharmaceutical Press; 1996. p. 296.
- Fröde TS, Medeiros YS. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J Ethnopharmacol* 2008;115:173-83.
- Anderson L, Dinesen B, Jorgensen PN, Poulsen F, Roder MF. Enzyme immunoassay for intact human insulin in serum or plasma. *Clin Chem* 1996;38:578.
- Kaplan LA, Rubaltelli FF, Hammerman C, Vilei MT, Leiter C, Abramov A. *Lipids*. In: Kaplan LA, Pesce AJ. Eds. *Clin Chem: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company; 1984. p. 918-9.
- Trinder P. Enzymatic colorimetric method for cholesterol measurements. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24.

14. Bucco G. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem* 1973;19:476.
15. Bisse E, Abraham EC. New less temperature sensitive micro chromatographic method for the separation and quantization of glycosylated haemoglobin using a noncyanide buffer system. *J Chromatog* 1985;344:81-91.
16. Bergmeyer H, Walefeld M. Méthode cinétique pour la détermination du TGO et TGP sans phosphate de pyridoxal. *Clin Chem Acta* 1978;24:58.
17. Pesce A. Lactate dehydrogenase. Kaplan A. *Clin Chem the C. V* 1984;1117:24, 438.
18. Bowers GNJ, Mc Comb RB. A continuous spectrophotometric method for measurement the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin Chem* 1966;12:73.
19. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
20. Weakberker G, Cory JC. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depended mouse leukaemia L1210 cells *in vitro*. *Cancer Lett* 1988;40:257-64.
21. Houlot R. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed Maloine; 1984. p. 225-7.
22. Hincu M, Pantea S, Anca M, Coman EM, Mehedinti T. L'effet de l'alloxane sur l'histologie du tissu pancréatique. Fascicula XVII, Anul V; 2006.
23. Vats V, Yadav SP, Grover JK. Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J Ethnopharmacol* 2004;90:155-60.
24. Chang MLW, Johnson MA. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J Nutr* 1980;110:931-6.
25. El-Tantawy WH, Soliman ND, El-naggar D, Shafei A. Investigation of antidiabetic action of *Antidesma bunius* extract in type 1 diabetes. *Arch Physiol Biochem* 2015;121:116-22.
26. Augusti KT. Therapeutic values of onion (*Allium cepa*) and Garlic (*Allium sativum*). *Indian J Exp Biol* 1996;34:634-40.
27. Joshi DV, Patil RR, Naik SR. Hydroalcohol extract of *Trigonella foenum-graecum* seed attenuates markers of inflammation and oxidative stress while improving exocrine function in diabetic rats. *Pharm Biol* 2015;53:201-11.
28. Yates AP, Laing I. Age-related increase in haemoglobin A1c and fasting plasma glucose is accompanied by a decrease in beta cell function without a change in insulin sensitivity: evidence from a cross-sectional study of hospital personnel. *Diabetic Med* 2002;19:254-8.
29. Shirwaikar A, Rajendran K, Kumar CD, Bodla R. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2004;91:171-5.
30. Knipschild JK, Ter-Riet G. Garlic, onions and cardiovascular risk factors. A review of the evidence from human experiments. Emphasis on commercially available preparations. *Br J Clin Pharmacol* 1989;28:535-44.
31. Gebhardt R, Beck H. Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids* 1996;31:1269-76.
32. Balasenthil S, Arivazhagan S, Nagini S. Garlic enhances circulatory antioxidants during 7, 12-dimethylbenz anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J Ethnopharmacol* 2000;72:429-33.
33. Hultcrantz R, Glaumann H, Lindberg G. Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. *Scand J Gastroenterol* 1986;21:109-13.
34. Navarro CM, Montilla PM, Martin A, Jimenez J, Utrilla PM. Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus*. *Plant Med* 1993;59:312-4.
35. Eidi A, Eidi M, Esmaili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum*) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 2006;13:624-9.
36. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2013;60:328-40.
37. Inove M, Saito Y, Hirato E, Morino Y, Nagase S. Regulation of redox status of plasma proteins by metabolism and transport of glutathione and related compounds. *J Protein Chem* 1987;36:169-73.
38. Kumkrai P, Kamonwannasit S, Chudapongse N. Cytoprotective and anti-diabetic effects of *Derris reticulata* aqueous extract. *J Physiol Biochem* 2014;70:675-84.
39. El-far M, Negm A, Abd El-azim A, Wahdan M. Antioxidant therapeutic actions of medicinal phytochemicals, silymarin and silibinin, on streptozotocin diabetic rats: first novel comparative assessment of structural recoveries of histological and ultrastructural changes on islets of langerhans, β -cells, mitochondria and nucleus. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8:69-76.
40. Banerjee SK, Dinda AK, Manchanda SC, Maulik SK. Chronic garlic administration protects heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury. *BMC Pharmacol* 2002;2:2-16.