الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Republique Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعـــة باجـــي مختـــار- عنابـة
Université Badji Mokhtar Annaba

Faculté des Sciences
Département de Biologie

THESE

Présentée en vue de l'obtention d'un Diplôme de DOCTORAT en Biologie Animale

Option : NEUROSCIENCES

THEME

EFFETS MATERNELS ET POSTNATAUX DE L'INFECTION GESTATIONNELLE CHEZ DES RATTES WISTAR DIABÉTIQUES TRAITÉES À L'HESPÉRIDINE

Présentée par : M^elle^ CHOUBA Ibtissem

DIRECTEUR DE THESE : TAHRAOUI Abdelkrim Pr. Université d'Annaba

DEVANT LE JURY

Président :	OUAKID Mohamed Laïd	Pr.	Université d'Annaba
Examinateurs :	BAIRI Abdelmadjid	Pr.	Université d'Annaba
	OUALI Kheireddine	Pr.	Université d'Annaba
	TADJINE Aïcha	Pr.	Université d'El Tarf

Année Universitaire **2015-2016**

Remerciements

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.
Marcel Proust
Le temps met tout en lumière.
Thalès

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant un grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je tiens à remercier spécialement mon directeur de thèse **Professeur TAHRAOUI Abdelkrim** directeur du laboratoire de Neuroendocrinologie Appliquée, Université Badji Mokhtar qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et patience que vous m'avez accordé tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions logistiques. J'ai beaucoup apprécie travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au **Professeur OUAKID Mohamed Laïd** pour avoir accepté de présider le jury de soutenance, que vous soyez assuré de ma reconnaissance.

J'exprime mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury **Professeur BAIRI Abdelmadjid, Professeur OUALI Kheireddine et Professeur TADJINE Aïcha** d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurés de mon estime et ma profonde gratitude.

Je remercie très chaleureusement toute l'équipe de recherche du laboratoire de radiotoxicologie expérimentale LRTOX au niveau de l'institut de radioprotection et la sûreté nucléaire IRSN (Fontenay aux rose, France) pour leur accueil, leur esprit d'équipe et en particulier **Mr Maâmar Souidi**, qui m'a beaucoup aidé dans ma recherche de stage et qui a mis tout en œuvre pour que mon stage se déroule dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens à remercier vivement mon maitre de stage, **Mr Philippe Lestaevel** pour son accueil, le temps passé ensemble et le partage de son expertise au quotidien.

Je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce mémoire de fin d'études.

Je remercie également tout mes ami(e)s et mes chers collègues qui m'ont beaucoup aidé et encouragé, je leurs souhaite une très belle aventure avec mes sincères vœux de réussite.

Un très grand merci tout particulier à mon collègue **Nessaibia Issam** pour nos innombrables moments avec mes meilleurs souhaits de réussite pour sa vie professionnelle et personnelle.

Je tiens ensuite à remercier mes parents pour le soutien inconditionnel dont ils ont fait preuve depuis que mon projet professionnel est défini. Merci pour le soutien financier, moral, psychologique et matériel. Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous!

RESUME

ABSTRACT

Our problem is to evaluate the behavioral effects of infection gestational and combination diabetes - infection in pregnant rats and the protective effect of an antioxidant on neurobehavioral alterations and complications. Diabetes was induced by a single intra-peritoneal injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 60 mg / kg.

The administration of streptozotocine which is revealed, on one hand, the effects of a single STZ i.p. injection on anxiety- and depression-like behaviors, brain oxidative status and immune response in adult wistar rates, and the other hand the protective role of antioxidant (Hesperidin) on STZ-induced disorders. Behavioral tests in the open field (OF) and the elevated plus-maze (EPM) revealed that diabetic animals exhibited an anxious behavior and an alteration in locomotive and exploratory activities when compared to control.

The hesperidin, a natural flavonoid was administered orally (gavage) at a dose of 100 mg / kg. This administration reduces anxiety and reduces damage due to hyperglycemia associated with a significant decrease in the rates of reduced glutathione (GSH) and maternal liver on the other hand, by increasing the activity of glutathione S- transferase (GST) hepatic and cardiac mother, after WAS oxidative brain status showed an increase in glutathione-S-transferase (GST) activity and a decrease in reduced glutathione (GSH).

However, antioxidant hesperidin administration significantly alleviated anxious and depressive behaviors.

Key word

Diabetes, behavioral disorder, hesperidin, oxidative stress, rats Wistar

ملخص

يهدف هدا البحث إلى إيضاح المنافع العلاجية لضد مؤكسد الهسبيريدين ضد المضاعفات السلبية في السلوك العصبي عند الفئران المصابة بداء السكري حيث إن استعمال مادة الستربتوزوتوسين أدت إلى إصابة الفئران بداء السكري التجريبي عن طريق حقنه داخل الصفاق (60 مع/كغ).

الارتفاع الفائق لتركيز السكري في الدم أدى من جهة إلى التأثير على السلوك الشبه القلقي , القلق التأكسدي و الجهاز المناعي لدى الفئران الحوامل من سلالة ويستار و من جهة أخرى إلى تقييم مدى فعالية مضاد الأكسدة الهسبريدين للوقاية من الأعراض الجانبية لداء السكري .

اختبار سلوك الحيوانات الذي تم في جهازي الحقل المفتوح و المتاهة المرتفعة على شكل(+) ، تبين سلوك قلقي و اختلال حركي لدى الفئران المصابة بالسكري و الفئران المعرضة للإجهاد عند مقارنتها بالشواهد.

تحليل القدرة ضد التأكسدية أوضح من جهة، انخفاض معتبر في سعة الغلوثاثيون (GSH) المختزل في الكبد و قلب الأم و ارتفاع إنزيم الغلوثاثيون - S- ترانسفيراز (GST) في كبد و قلب الأم ، ارتفاع محسوس في نشاط إنزيم (GST) و انخفاض في تركيز (GSH) على مستوى المخ لدى الفئران الخاضعة للإجهاد.

من هذا نستنتج أن المعالجة بمضاد الأكسدة تحسن من الاضطراب في السلوك العصبي الناتج عن المرض السكري و النظام التاكسدي و تقوي الجهاز المناعي .

الكلمات المفتاحية

داء السكري, اضطراب السلوك, الهسبيريدين ,القلق التأكسدي , الفئران ويستار

RESUME

Notre problématique vise à évaluer les effets comportementaux de l'infection gestationnelle et de la combinaison diabète-infection chez des rattes gestantes et l'effet protecteur d'un anti oxydant sur les altérations et les complications neurocomportementales. Le diabète a été induit par une seule injection intra péritonéale de streptozotocine (STZ) à une dose de 60 mg/Kg.

Cette induction du diabète a pour but d'apprécier d'une part, les effets de cette exposition sur le comportement anxieux et dépressif, le statut anti-oxydant hépatique, cardiaque, cérébral et la réponse immunitaire des rattes Wistar, et d'autre part, la capacité d'un antioxydant (l'hespéridine) à restaurer les perturbations causées par la STZ. Les tests comportementaux effectués dans le champ ouvert (Open Field ; OF) et le labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus-maze ; EPM), révèlent une anxiété et une altération des activités locomotrices et exploratrices chez les femelles diabétiques et diabétiques stressées comparativement aux témoins.

L'hespéridine réduit l'anxiété et diminue les dommages liés à l'hyperglycémie associée à une diminution considérable des taux de glutathion réduit (GSH) hépatique et cardiaque maternel et d'une autre part, par l'accroissement de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) hépatique et cardiaque maternelle, après l'application du stress Water Avoidance stress (WSA). L'estimation de la capacité anti-oxydante du cerveau chez les rattes montre une augmentation de l'activité cérébrale de glutathion -S- transférase (GST) et une déplétion de la teneur en glutathion réduit (GSH) a été enregistrée.

Nos résultats indiquent la capacité de l'hespéridine de prévenir dans les troubles de comportement associés aux complications du diabète, améliore le statut antioxydant et renforce la réponse immunitaire.

Mots clés

Diabète, troubles comportementaux, hespéridine, stress oxydatif, rattes Wistar

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

N °	Figures	Pages
01	Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule β dans le diabète de type 1 (Pirot et al., 2008)	**03**
02	Hyperinsulinisme et diabète de type 2 (Auberval , 2010)	**03**
03	Balance entre les pro-oxydants (ERO) et les antioxydants (Fontaine , 2007)	**06**
04	Schéma représentant le protocole expérimental	**10**
05	Structure chimique de la streptozotocine (White FR, 1963)	**12**
06	Structure chimique de l'hespéridine (Park et al., 2008)	**13**
07	Voies possibles de l'absorption intestinale de l'hespéridine et de l'hespéritine ingérés (Kobayashi et al., 2008)	**14**
08	Illustration schématique du champ ouvert (Open Field) (Hall, 1934)	**16**
09	Illustration schématique du labyrinthe en croix sur élevé (Patin et al., 2005)	**17**
10	Water Avoidance Stress (WAS) (Santos et al., 2000)	**18**
11	Protocole expérimental 01	**24**
12	Protocole expérimental 02	**25**
13	Changement pondéral des rattes	**26**
14	Variation de la glycémie en g/l au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV),	**27**

15	Comportements des rattes gestantes témoins et traitées dans l'open Field chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle Comportements des rattes gestantes témoins et traitées dans l'open Field chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV), diabétiques traitées (DH)	**29**
16	Comportements des rattes gestantes témoins et traitées dans l'Elevated plus-maze chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV), diabétiques traitées (DH)	**31**
17	Variation de la concentration hépatique de la GSH en nmol/mg de protéine chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV), diabétiques traitées (DH)	**33**
18	Variation de l'activité hépatique de la GST en µmol/min/mg de protéines chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV), diabétiques traitées (DH)	**33**
19	Variation de la concentration cardiaque de la GSH en nmol/mg de protéines chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV), diabétiques traitées (DH)	**34**
20	Variation de l'activité cardiaque de la GST en µmol/min/mg de protéines chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV), diabétiques traitées (DH)	**35**
21	Changement pondéral des rattes témoins et stressées traitées à l'hespéridine	**36**
22	Variation de la glycémie en g/l au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule stressées (CVS), les rattes contrôle traitées stressées (CHS), les rattes diabétiques	**37**

	véhicule stressées (DVS), diabétiques traitées stressées (DHS)	
23	Comportements des rattes gestantes témoins et stressées traitées à l'hespéridine dans l'open Field chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule stressées (CVS), les rattes contrôle traitées stressées (CHS), les rattes diabétiques véhicule stressées (DVS), diabétiques traitées stressées (DHS)	**39**
24	Comportements des rattes gestantes témoins et stressées traitées à l'hespéridine dans l'Elevated plus-maze chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule stressées (CVS), les rattes contrôle traitées stressées (CHS), les rattes diabétiques véhicule stressées (DVS), diabétiques traitées stressées (DHS)	**41**
25	Variation du taux de glutathion (nmol/mg protéines) cérébral chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule stressées (CVS), les rattes contrôle traitées stressées (CHS), les rattes diabétiques véhicule stressées (DVS), diabétiques traitées stressées (DHS)	**43**
26	Variation de l'activité de la glutathion-S-transférase (nmol/min/mg protéines) au niveau du cerveau chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule stressées (CVS), les rattes contrôle traitées stressées (CHS), les rattes diabétiques véhicule stressées (DVS), diabétiques traitées stressées (DHS)	**44**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Pages
01	Identification des phases du cycle œstrien (Thierry R, 2007).	**11**
02	Les mesures hématologiques maternelles au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins et traitées à l'hespéridine	**32**
03	Les mesures hématologiques maternelles au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins et stressées traitées à l'hespéridine	**42**

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

BSA	Albumine bovine sérique (*bovin serum albumin*)
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CDNB	1-chloro-2-4-di-nitrobenzene
DRO	Dérivé réactive de l'oxygène
DTNB	5-5'dithio-bis-(2-acide nitrobenzoïque)
DO	Densité optique
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
ERO	Espèce réactive d'oxygène
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EPM	Elevated plus- maze
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transférase
HCT	Hématocrite
Hgb	Hémoglobine
HO	Radical hydroxyle
Inj.IP	Injection intrapéritonéale
MDA	Malondialdéhyde
OF	Open field
OMS	Organisation mondiale de la santé.
PLT	Plaquettes
RBC	Globules rouges
SSA	Acide sulfosalycilique
STZ	Streptozotocine
T	Témoin

TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloroacétique
TBARS	Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
VMC	Volume moyen corpusculaire
WAS	Water avoidance stress

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION …… 01

2. MATERIEL ET METHODES …… 09

2.1 Matériel biologique ……. 09

2.1.1. Animaux d'élevage …… **09**

2.1.2. Condition d'élevage …….. **09**

2.1.3. Lotissement des animaux ……... **09**

2.2. Méthodes …….. 11

2.2.1. Identification œstrale et accouplement ……... **11**

2.2.2. Traitement des animaux …… **12**

2.2.2.1. Administration de la streptozotocine …… **12**

2.2.2.2. Administration de la solution glucosée ……... **13**

2.2.3. Traitement par un antioxydant (l'hespéridine) ……..... **13**

2.2.3.1. Présentation de l'hespéridine ……..... **13**

2.2.3.2. Administration de l'hespéridine …….. **14**

2.2.4. Tests comportementaux ……...……... **15**

2.2.4.1. Test du champ ouvert (open field; OF) …….. **15**

2.2.4.2. Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus maze) ……... **16**

2.2.4.3. Application du stress Water Avoidance (WA) …….. **17**

2.2.5. Détermination du profil glycémique durant la gestation …… **18**

2.2.6. Préparation des prélèvements ……... **19**

2.2.6.1. Décapitation et prélèvement sanguin …….. **19**

2.2.6.2. Dissection et prélèvement des organes maternels …….. **19**

2.7. Hématologie …….. **19**

2.8. Dosages des paramètres du stress oxydatif …….. **20**

2.8.1. Préparation de l'homogénat …….. **20**

2.8.2. Dosage des protéines …… **20**

2.8.3. Glutathion (GSH) …….. **20**

2.8.3.1. Principe …….. **20**

2.8.3.2. Mode opératoire …….. **20**

2.8.3.3. Calcul de la concentration ……..…. **21**

2.8.4. Glutathion-S-Transférase (GST) ……..... **21**

2.8.4.1. Principe ……..…... **21**

2.8.4.2. Mode opératoire …….. **22**

2.8.4.3. Mesure de l'activité de la GST ……..…... **22**

2.9. Traitement statistique des résultats ……..…... **22**

3. RESULTATS ……..…. 26

3.1. Expérimentation 1

Effets de l'hespéridine chez les rattes diabétiques ……..... 26

3.1.1. Changement pondéral ……..…. **26**

3.1.2. La glycémie …….... **27**

3.1.3. Le comportement anxieux dans l'Open Field test …….. **28**

3.1.4. Le comportement anxieux dans l'Elevated Plus-Maze test **30**

3.1.5. Les mesures hématologiques gestationnelles **31**

3.1.6. Teneur en glutathion réduit (GSH) et en glutathion S-transférase (GST) **32**

3.1.6.1. Teneur hépatique en glutathion (GSH) **32**

3.1.6.2. Mesure de l'activité hépatique de la glutathion S-transférase (GST) **32**

3.1.6.3. Teneur cardiaque en glutathion (GSH) **34**

3.1.6.4. Mesure de l'activité cardiaque de la glutathion S-transférase (GST) **34**

3.2. Expérimentation 2

Effets de l'hespéridine chez les rattes diabétiques stressées **35**

3.2.1. Changement pondéral **35**

3.2.2. La glycémie **37**

3.2.3. Le comportement anxieux dans l'Open Field test **38**

3.2.4. Le comportement anxieux dans l'Elevated Plus-Maze test **39**

3.2.5. Les mesures hématologiques gestationnelles **41**

3.2.6. Taux de glutathion cérébral **42**

3.2.7. Activité de la glutathion-S-transférase cérébrale **43**

4. DISCUSSION **44**

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES **52**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **53**

PUBLICATIONS

COMMUNICATIONS

INTRODUCTION

Le diabète est une maladie considérée par l'OMS comme une épidémie et dont la prévalence a augmenté de façon très importante au cours de ces dernières années. (Auberval et al., 2010) Actuellement, plus de 150 millions de personnes dans le monde sont atteintes de diabète, Le diabète vient en deuxième position au classement des maladies chroniques en Algérie, dont plus de 4 millions de personnes souffrant de cette maladie dans le pays, selon les donnés du ministère de la santé. La maladie pourrait toucher 350 million de personnes dans le monde en 2030, selon système de comptage de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

Le diabète est une maladie potentiellement mortelle responsable chaque année dans le monde de près de 4 millions de décès. De plus, un mauvais équilibre du diabète est responsable de l'apparition de complications cardiovasculaires par altération des vaisseaux sanguins.

De nombreuses études suggèrent que le diabète s'accompagne d'un stress oxydant qui favorise le développement de la maladie en perturbant l'insulino-sécrétion, en favorisant l'insulino- résistance et les complications cardiovasculaires qui y sont associées. Ce stress oxydant est dû à une rupture de l'équilibre physiologique qui existe dans l'organisme entre les molécules oxydantes et les systèmes de défenses antioxydants. En plus des défenses antioxydantes présentes dans l'organisme, l'alimentation apporte de nombreux antioxydants notamment par les oligo-éléments. Ainsi, une rupture de l'équilibre alimentaire (défaillance nutritionnelle, carence, alimentation trop riche) entraîne le développement du stress oxydant par diminution des systèmes de défense.

En 1869, Paul Langerhans montre que le pancréas contient non seulement des cellules secrétant du suc pancréatique, mais un autre type de cellules dont il ignore la fonction. Ces cellules porteront plus tard son nom. Ultérieurement, les travaux de Claude Bernard sur la fonction glycogénique du foie permettront à Oscar Minkowski et Joseph Von Mehring d'établir le rôle du pancréas en 1886 à l'université de Strasbourg. En fin, l'insuline sera découverte en 1921 par Frederick Banting et Charles Best (Vivot, 2012).

Le diabète sucré est aujourd'hui considérée comme une maladie dégénérative majeure dans le monde, menaçant d'une manière croissante, la santé publique (Saha et al., 2012).

C'est un trouble métabolique caractérisé par la présence d'une hyperglycémie attribuable à un défaut de la sécrétion d'insuline et/ou de l'action de l'insuline. L'hyperglycémie chronique liée au diabète est associée à d'importantes séquelles à long terme, particulièrement à des lésions, des anomalies et une insuffisance de divers organes, surtout les reins, les yeux, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (l'Association canadienne du diabète, 2008)

Le diagnostic de diabète répond à une définition clinico-biologique : soit une glycémie veineuse aléatoire supérieure à 2 g/l et des signes cliniques (amaigrissement, soif intense, fatigue..), soit une glycémie veineuse à jeun supérieure à 1.26g/l à deux reprises (COPIL PRSP MCV, 2009).

L'insuline, la seule hormone hypoglycémiante, est sécrétée par les cellules des îlots de Langerhans du pancréas. Elle stimule l'absorption du glucose sanguin par les tissus dits insulino-dépendants (le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux) et son stockage sous forme de glycogène (glycogenèse). Dans le foie, l'insuline inhibe également les voies métaboliques de la production du glucose (la néoglucogenèse et la glycogénolyse) (Denis, 2002).

Il existe différents types de diabètes n'ayant pas tous la même origine et ne se soignant donc pas tous de la même façon. En effet, d'après l'ADA (American Diabetes Association), nous pouvons distinguer quatre grands types de diabètes (American Diabetes Association, 2012)

Le diabète de type 1 (DT1), également appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile, qui touche 10% de diabétiques à travers le monde (Gallagher et al., 2011et Daneman, 2006). Le DT1 est une maladie auto-immune se déclarant le plus souvent au cours de l'enfance ou de l'adolescence. Il est caractérisé par une baisse de la sécrétion d'insuline par le pancréas, voire une absence totale de sécrétion. Les causes d'apparition de cette maladie ne sont toujours pas claires : des chercheurs pensent qu'une prédisposition génétique à développer en bas âge une réaction auto-immune envers les cellules β des îlots de pancréatiques (Bresson D et Van Herrath M, 2007) et certains facteurs liés à l'environnement contribuent au développement du DT1 ce qui a pour conséquence la destruction de cellules β du pancréas par des anticorps (figure 01) (Gallagher et al., 2011).

D'autres pensent qu'un virus peut être à l'origine de la maladie et inciterait le système immunitaire à attaquer le pancréas. Comme les cellules du pancréas qui secrètent

normalement l'insuline sont détruites, une personne atteinte de DT1 devra recevoir de l'insuline toute sa vie, grâce à des injections quotidiennes (Lecompte, 2012).

Plusieurs disciplines biomédicales se consacrent à l'étude du diabète de type I vu la multiplicité des complications, qui englobent particulièrement des cardiopathies, des angiopathies, des néphropathies et des neuropathies, résultent de la persistance des troubles immuno-endocriniens et métaboliques subséquents (Breyer M D *et al* ., 2005 ; Ghosh S et Rodrigues B, 2006 ; Haeser A S *et al* ., 2007).

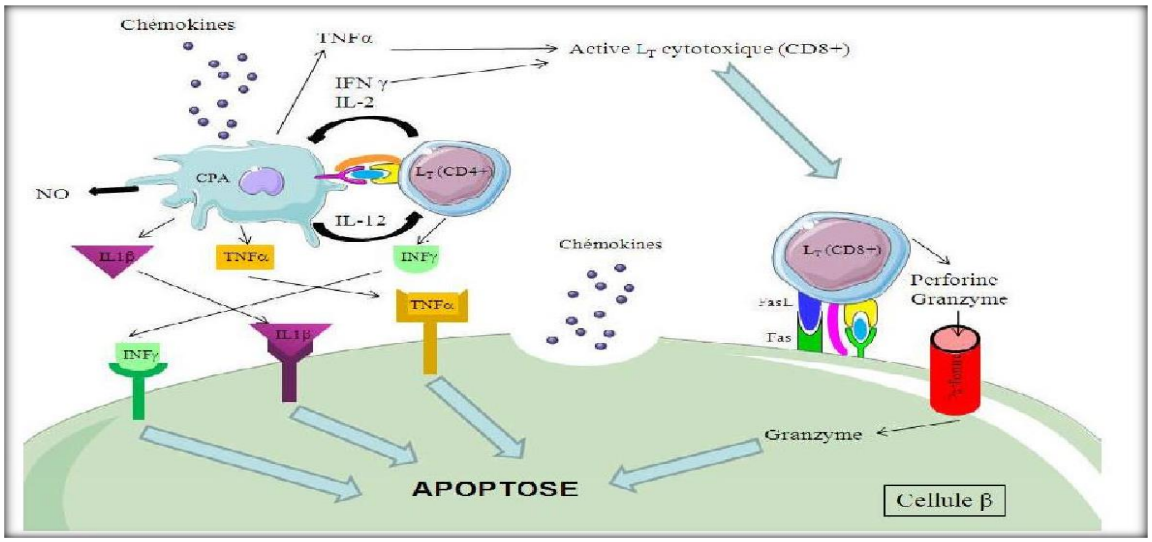


Figure 01: Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule β dans le diabète de type 1 (Pirot et al., 2008)

Au contraire, le diabète de type 2 (DT2) également appelés diabètes non-insulinodépendants ou diabètes de la maturité. En effet, c'est une pathologie qui se développe en deux étapes :

✓ Tout d'abord un état d'insulino-résistance s'installe, le pancréas devant produire toujours d'avantage d'insuline pour réguler la glycémie.

✓ Puis, après plusieurs années, vient la phase d'insulino-déficience, où le pancréas ne produit plus assez d'insuline (figure 02).

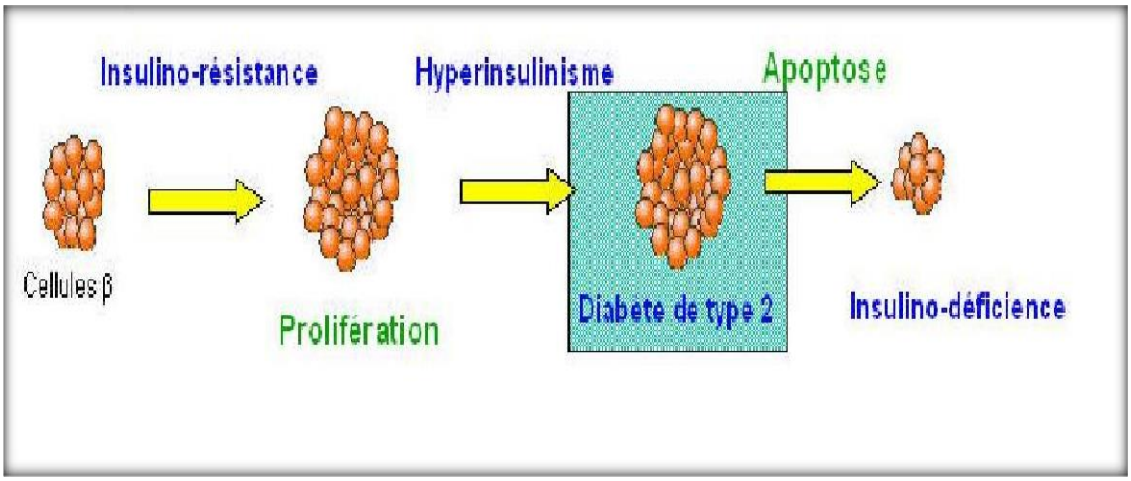


Figure 02 : Hyperinsulinisme et diabète de type 2 (Auberval, 2010).

Chez certaines femmes enceintes, suite à l'augmentation de l'insulino-résistance au cours de la grossesse, des cas de diabètes gestationnels peuvent être observés. Ces diabètes peuvent être contractés au cours du 2ème trimestre de grossesse et surviennent chez environ 4% des femmes enceintes mais, contrairement aux DT1 et DT2, ils disparaissent après l'accouchement.

Cependant, il est essentiel de surveiller les cas de diabètes gestationnels car à long terme, les femmes ayant contracté cette maladie risquent de développer un DT2 (Buchanan et al., 2012).

L'installation du diabète chez les modèles animaux se fait soit spontanément soit par induction chirurgicale, chimique, immunologique ou par sélection ou génie génétique.

L'induction du diabète expérimental chez les animaux par les substances chimiques qui détruisent sélectivement les cellules β pancréatiques est très commode et leur utilisation est simple. Les substances les plus habituelles pour induire le diabète chez le rat sont l'alloxane et le streptozotocine (McLetchie N.G.B, 2002).

Au 17ème siècle, Thomas Willis parlait d'une association de la maladie à une importante détresse psychologique, laquelle a des répercussions négatives sur l'autogestion

du diabète (Wang Z and Hoy WE 2004). Cette maladie induit un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides jusqu'à une possibilité d'un dépistage des troubles psychiatriques cliniquement significatifs. Tels que la dépression, l'anxiété et les troubles de comportements (Oldroyd *et al* ., 2005).

En 1974, Portha a établi le diabète chez le rat, par une administration de la streptozotocine, une molécule qui possède une toxicité sélective sur les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas endocrine induisant ainsi un diabète insulinodépendant (Omari *et al* ., 2010).

L'utilisation des modèles expérimentaux, essentiellement le rat et la souris représentent autant de voies d'accès dans la compréhension des déficits d'apprentissage et du comportement. Ainsi que de nombreuses autres complications physiopathologiques et troubles immuno-endocriniens attribuables au diabète (Gispen et Biessels, 2000 ; Kamal *et al* ., 2000 ; Schoenle *et al* ., 2002).

Bien qu'elle soit l'une des conséquences inévitables, l'hyperglycémie franche qui succède à l'insulino déficience serait davantage l'une des causes qui mettent à long terme la vie des individus atteints en péril. Cette menace gluco-toxique est beaucoup plus importante lorsqu'elle s'associe à la gestation en ce sens qu'elle favoriserait accessoirement une tératogénicité intrinsèque (Schwartz R et Teramo K A, 2000). A l'heure actuelle, il est consensuel que le diabète maternel gouverne de nombreux aspects tératologiques qui peuvent être à l'origine d'une morbidité périnatale (Li R *et al* ., 2007).

Les malformations s'installent généralement durant l'organogenèse, l'une des phases les plus critiques du développement embryonnaire, et se localisent préférentiellement dans certains tissus primitifs, tels que le tube neural et le mésoderme cardiaque (Reece E A *et al* ., 2005).

La notion de stress oxydant a été évoquée en 1956 par Denham Harman lorsqu'il émit l'hypothèse que le vieillissement serait dû en partie à une accumulation de dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Claeyssen, 2009). Le concept de stress oxydant fut développé par Sies et ses collaborateurs avec des termes synonymes tels que «stress pro-oxydant» ou «stress réducteur», décrivant le stress oxydant comme un débalancement entre pro- oxydant et antioxydant en faveur des premiers (figure 03) (Coste et al., 2007).

Cette notion était modifiée en se définissant comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Browne et al., 2008 ; Powers et al., 2010).

Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink et al., 2008). L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren, 2007).

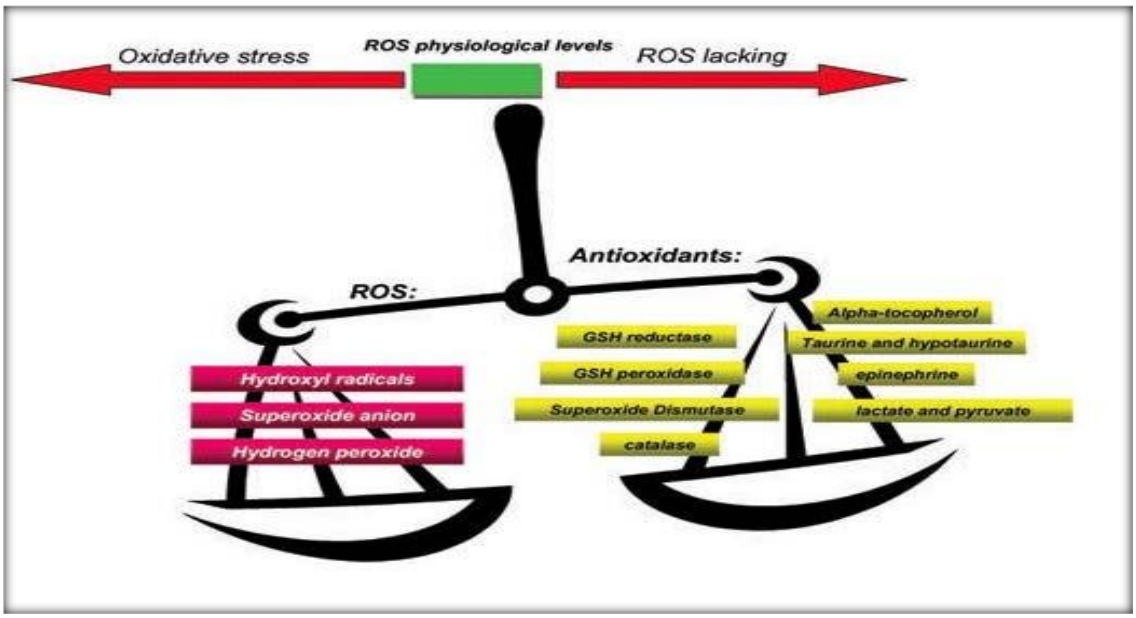


Figure 03 : Balance entre les pro-oxydants (ERO) et les antioxydants (Fontaine, 2007).

Les radicaux libres sont des composés réactifs qui ont un ou plusieurs électrons non appariés dans leur valence (Halliwell and Gutteridge, 2007). Il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple : OH) (Mac Laren 2007, Goto et al., 2008). Leur durée de vie est très courte allant de quelques millisecondes à quelques nanosecondes. Ils peuvent entraîner des lésions tissulaires en captant des électrons d'une molécule stable pour essayer d'apparier leurs propres électrons, laissant ainsi la molécule originale dans un état instable (Filaire and Toumi, 2012). Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) constituent la plus importante classe des espèces à radical libre qui soit formé dans les systèmes vivants (Finaud et al., 2006).

Les radicaux libres sont reconnus pour leur caractère ambivalent physiologique et physiopathologique (Lamprecht et al., 2004). Les effets physiologiques des ERO nécessitent de basses concentrations et contribuent à la synthèse de l'ADN, d'hormones stéroïdes, des acides biliaires, des acides gras insaturés, aux réactions dépendantes de la vitamine B12, à la biosynthèse des mitochondries, ... (Koolman and Rohm, 1999). Ils sont les médiateurs de multiples fonctions de signalisation (signaux redox) et de transcription essentielles pour le fonctionnement normal et la survie des cellules, ainsi que de la programmation de leur élimination (Kirschvink et al., 2008). Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire (Bouldjadj, 2009).

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO.

Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui se présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydro- ou liposolubles.

Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre et al., 2005).

L'intervention du stress oxydatif a été suggérée en se basant sur les épreuves scientifiques qui ont confirmé les bénéfices considérables apportés par l'administration des éléments anti-radicalaires aux mères diabétiques durant la période péri-conceptionnelle (Ornoy A, 2007). D'ailleurs l'adjonction d'antioxydants nutritionnels ou pharmacologiques a prouvé son efficacité dans la prévention des déformations (Reece E A *et al* ., 2006).

A cet égard, les diabétologues sont arrivés à l'évidence qu'un complément thérapeutique constitué par les extraits de plantes est nécessaire pour optimiser le traitement du diabète (Jin *et al* ., 2008). Les flavonoïdes sont des composés poly phénoliques hétérogènes rendant spécifiquement l'efficacité de plusieurs plantes médicinales (Pinto R M *et al* ., 2007). Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux et constituent un groupe de plus de 6000 composés ayant une origine biosynthétique commune (Winkel-Shirley B, 2002). Leurs propriétés antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules rendant compte à

l'efficacité de plusieurs plantes médicinales comme des antidiabétiques naturelles (Toumi *et al* ., 2009).

L'inclusion de ces éléments phytochimiquement actifs dans cet argument diabèto-psychologique pourrait émettre des rayons d'espoir prometteur vu l'incrimination définitive des désordres neurocomportementaux associés au diabète.

Dans le but de clarifier, d'une part la toxicité cardiaque, hépatique, cérébrale et immunitaire de la sreptozotocine et d'autres part les propriétés protectrices possibles de l'hespéridine chez les rattes de la souche Wistar contre les troubles neuropsychologiques liés aux complications gestationnelles chez des rattes diabétiques gestantes deux expérimentations séparées ont été réalisé :

- La première partie consiste à étudier les comportements ambulatoires et anxieux des rattes traitées à la streptozotocine, à travers la réalisation de deux tests largement répondus (*l'open field* et *l'elevated plus-maze*), à savoir le profil hématologique et leurs relations avec la capacité détoxifiante des cellules (hépatiques et cardiaques) et la réponse du système immunitaire, nerveux et endocrinien.

- La deuxième partie permette à tester l'effet du stress Water Avoidance Stress et d'évaluer l'action de l'hespéridine sur le comportement des rattes gestantes au cours du diabète en mesurant l'état émotionnel (dépression et anxiété) par des tests comportementaux et l'état antioxydant du cerveau des rattes traitées à la streptozotocine.

MATERIEL ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Animaux d'élevage

Le matériel biologique de base que nous avons choisi est la ratte blanche de la souche Wistar, provenant de l'Institut Pasteur d'Alger. Les rattes sont des mammifères nocturnes de l'ordre des rongeurs. La puberté survient entre 50 et 60 jours après la naissance chez les deux sexes. Une ratte en bonne santé peut vivre entre 2 ans et demi à 3 ans en fonction de la souche, des conditions environnementales et d'autres variables (Baker *et al* ., 1980). A leur arrivée, ces rattes pesaient en moyenne 180 grammes, et au moment de l'expérimentation, elles pesaient en moyenne 200± 20 grammes.

2.1.2. Condition d'élevage

Les animaux ont été élevés dans des cages en polyéthylène, tapissées d'une litière composée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tout les deux jours.

Ces animaux ont été acclimatés aux conditions de l'animalerie, à une température de 25 ± 2°C, une hygrométrie de 50% et une photopériode naturelle (printemps). La nourriture apportée aux animaux est confectionnée sous forme de bâtonnets constitués de maïs, d'orge, de lait et de compléments vitaminés (GAE : Groupe Agricole de l'Est, Bejaia). Quant à l'eau de boisson, elle est présentée dans des biberons adaptés aux cages. L'aliment et l'eau sont fournis *ad libitum*.

2.1.3. Lotissement des animaux

Après une période d'adaptation de trois semaines, nous avons choisi soixante douze (72) rattes en fonction du poids (approximativement 220 grammes) que nous avons séparées en 5 lots expérimentaux : lot témoin (T 8 rattes), lot contrôle (C) [n=16], lot diabétique (D) [n=16], lot stressé (S) [n=16] et lot diabétique stressé (DS) [n=16]. Chaque lot a été divisé en deux groupes dont huit (8) rattes reçoivent par gavage gastrique 1 ml/kg de solution saline d'NaCl 0.9 % (véhicule) et huit (8) autres rattes reçoivent par gavage gastrique 100 mg/kg d'hespéridine (antioxydant) dissoute dans la même solution d' NaCl 0.9 %.

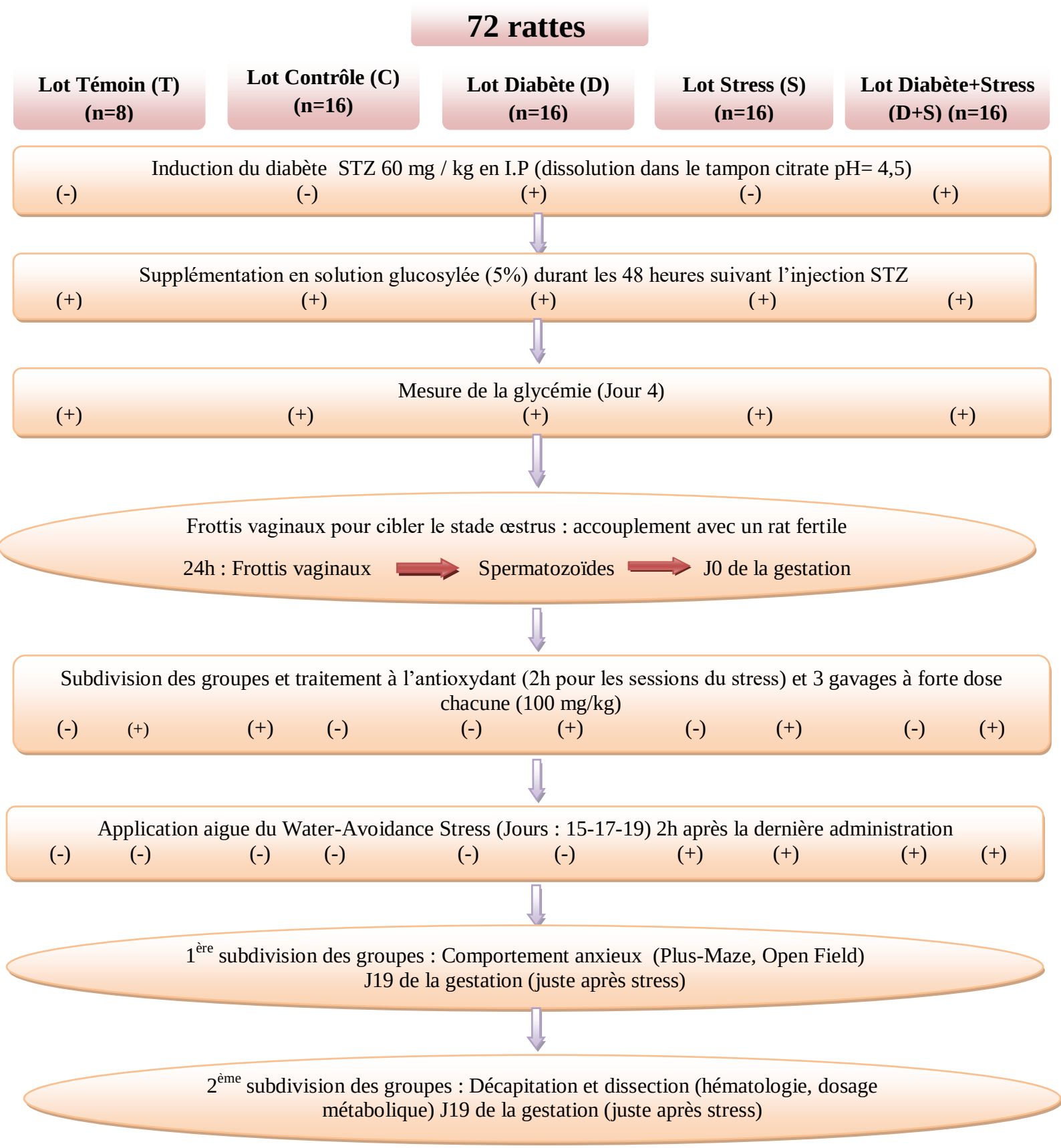


Figure 04 : Schéma représentant le protocole expérimental

2.2. Méthodes

2.2.1. Identification œstrale et accouplement

Les rattes des différents groupes ont été séparées chacune dans une cage. L'identification œstrale s'effectue par des frottis vaginaux sur toutes les femelles afin d'identifier les phases du cycle œstrien tout en estimant leur réceptivité.

La technique du frottis vaginal consiste à prélever, au moyen d'une anse métallique, le liquide visqueux retrouvé au niveau des parois du vagin de la ratte .Une fois prélevé, le frottis est étalé sur une lame pour procéder à la coloration selon la méthode d'Issac et Wurch (1966) qui consiste à appliquer quelques gouttes du bleu de méthylène sur la lame (solution alcoolique de 1‰) puis rincer à l'eau distillée. La lecture se fait au microscope [B1 series system microscopes, Motic Inc, USA], où on observe les trois types cellulaires cités ci –dessous (Tableau 01). L'identification des différentes phases du cycle œstrien s'effectue en fonction de l'abondance relative de ces types cellulaires au niveau du frottis.

Tableau 01: Identification des phases du cycle œstrien. (Thierry R, 2007).

La production cyclique par l'ovaire d'œstrogènes et de progestérones entraine des remaniements des muqueuses utérine et vaginale. L'augmentation du taux d'œstrogènes au moment de l'œstrus entraîne un accroissement de la kératinisation des cellules épithéliales du vagin. Une invasion leucocytaire de l'épithélium vaginal succède à cet état au moment du met œstrus et du di œstrus. Le frottis vaginal permet d'apprécier l'état de l'épithélium vaginal et ainsi de déterminer à quel stade du cycle se trouve la femelle.

Phase	Cellules épithéliales	Cellules kératinisées	Leucocytes
Pro œstrus	+	±	+
œstrus	+	+	-
Meta œstrus	-	+	+
Di œstrus	+	-	+

(+:abondance ± : présence - : absence ou présence rare)

Après avoir identifié les phases, des rats mâles non diabétiques ont été introduits le soir à 17 heures, indépendamment de leur poids, à raison d'un mâle par femelle pour réaliser l'accouplement. La fécondation est confirmée par la présence du bouchon muqueux dans le frottis vaginal qui correspond alors au premier jour de la gestation. La fécondation est confirmée par la présence du bouchon muqueux dans le frottis vaginal qui correspond alors au premier jour de la gestation. Chaque fois que nous découvrons une femelle fécondée, on laisse le mâle dans la cage jusqu'au troisième jour gestationnel [influence psycho-effective par la présence du partenaire pendant le développement précoce des pré-embryons].

2.2.2. Traitement des animaux

2.2.2.1. Administration de la streptozotocine

La streptozotocine (STZ) est une substance chimique soluble dans l'eau, le sérum physiologique et les solvants organiques avec un poids moléculaire de 265,2 Da. Isolée en 1956 à partir de Streptomyces utilisée pour la première fois en 1967, elle est couramment utilisée sur les modèles animaux pour l'étude du diabète (Frode *et al* ., 2008) (Figure 05). Elle est constituée d'un résidu de glucose auquel se lie, au carbone (2), un résidu nitro-urée méthylé. *In vivo*, sa demi-vie est de 5 à 15 minutes. Il est possible que l'entité glucidique de la molécule facilite son internalisation *via* les transporteurs GLUT2 membranaires des endocrinocytes β pancréatiques (White FR, 1963).

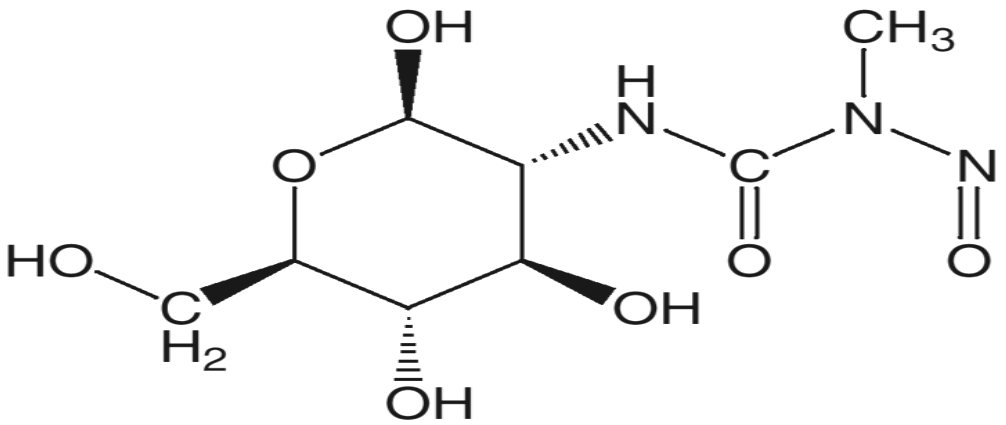


Figure 05 : Structure chimique de la streptozotocine (White F R, 1963).

L'induction du diabète dans les lots D, DH et DS s'effectuait par une seule injection intra péritonéale (Inj. IP) de STZ [Sigma ST Lowis, Mo] à une dose de 60 mg/kg de poids corporel soit un volume de 1 ml/kg. La streptozotocine a été préparé extemporanément dans du tampon citrate 0,1 M (pH 4,5). Les lots C et S recevaient une seule Inj. IP du tampon citrate.

2.2.2.2. Administration de la solution glucosée

Les bouteilles d'eau ont été remplacées par des bouteilles contenant une solution de glucose 5% pendant 48 heures afin de surmonter l'hypoglycémie induite par la STZ suite à la destruction des cellules β pancréatiques et la libération massive d'insuline, cette hypoglycémie peut être fatale pour les rats. Après 72 heures de l'injection (temps de développement du diabète), le diabète a été confirmé chez les rats par mesure de la glycosurie à jeun à l'aide des bandelettes de type *BILI-LABSTIX*®.

2.3 Traitement par antioxydant (hespéridine)

2.2.3.1. Présentation de l' hespéridine

L'hespéridine [Sigma, approx. 80%] est un flavanone glycosylé (glycoside) constitué d'un flavanone appelé *hespéritine* et d'un disaccharide nommé *rutinose.* C'est une substance solide peu hydrosoluble. Elle est cependant plus hydrosoluble que son aglycone, l'hespéritine. Sa formule moléculaire est $C_{28}H_{34}O_{15}$ et son poids moléculaire est de 610.57 Da. Son disaccharide, le rutinose, est composé de glucose et de rhamnose (6-désoxy-L-mannose) (Park *et al* ., 2008).

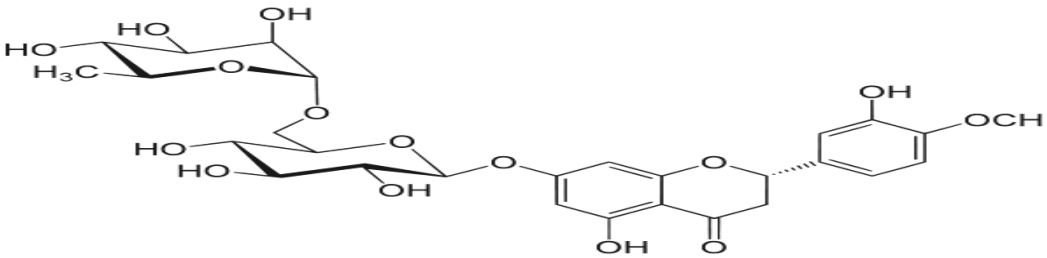


Figure 06 : Structure chimique de l'hespéridine (Park *et al* ., 2008).

La pharmacocinétique de l'hespéridine est mal connue, son absorption par l'épithélium intestinal sous forme de glycoside n'a pas été confirmée (Kobayashi *et al* ., 2008). La génine (aglycone) correspondante, hespéritine, est détectée dans le sérum après son ingestion et pourrait être formée avant ou l'absorption dont elle pourrait subir une glucuronidation soit au niveau de la paroi intestinale soit dans le foie (Nielsen *et al* ., 2006).

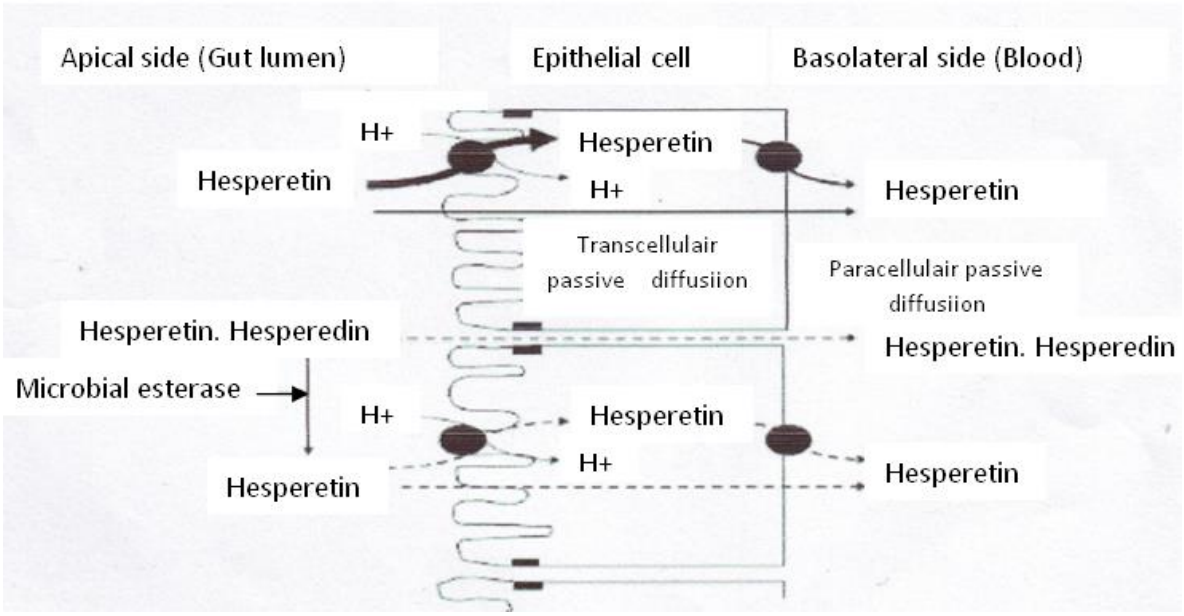


Figure 07 : Voies possibles de l'absorption intestinale de l'hespéridine et de l'hespéritine ingérés (Kobayashi *et al* ., 2008).

2.2.3.2. Administration de l' hespéridine

L'antioxydant choisi pour traiter les rats (l'hespéridine) se trouve sous forme de poudre jaunâtre. Pour préparer la dose adéquate on utilise une balance de précision afin de mesurer en fonction des poids des rats 50 mg d'hespéridine pour 1kg de rats. Les doses quantifiées sont ajoutées dans des tubes à Eppendorf pour être dissous avec 1 ml de solution saline 0.9 % par 1 kg de rats, avant l'administration il faut bien agiter les tubes jusqu'à l'obtention d'une solution blanche semi aqueuse. Le début du traitement par antioxydant ou par le véhicule d' NaCl pour les témoins commence 72 heures après l'induction du diabète soit le jour et dure 21 Jours (durée du traitement) et l'administration se fait par gavage gastrique des rats.

2.2.4. Tests comportementaux

Le comportement anxieux inné est une composante fondamentale du comportement général des rongeurs. Il se manifeste par l'attitude de l'animal à avoir peur lorsqu'il est mis, sans expérience préalable, dans un environnement non protégé. Ce comportement peut être évalué à l'aide de dispositifs expérimentaux validés dont les plus utilisés sont le labyrinthe en croix surélevé *(EPM),* le champ ouvert *(OF)* et un test d'attention, d'apprentissage et de mémorisation, water avoidance stress *(WAS)*.

2.2.4.1. Test du champ ouvert (Open Field ; OF) (Hall, 1934)

Le test de l'Open Field, initialement décrit par Hall en (1934), a été développé dans le but de mesurer les différences de réactivité émotionnelle chez le rat.

Le dispositif se compose d'une base entourée par des parapets en plexiglas dont les mesures sont respectivement de 70cm×70cm×40cm. Le plancher est sous forme de carrés de 10cm×10cm de diamètre, il a été divisé en deux zones : zone centrale et zone périphérique dont chacune est de 35cm.

Le test de champ ouvert est réalisé pendant 5mn et l'animal est placé au centre du dispositif (Sáenz *et al* ., 2006). Son déplacement permet de mesurer le nombre de carrés traversés ainsi que le temps passé dans chaque zone. De ce fait, ce test indique l'activité locomotrice et le comportement anxieux respectivement. Ce dernier est d'autant plus prononcé quand le rat passe plus de temps dans la zone périphérique. Quant à la zone centrale, son exploration représente un signe de moindre anxiété.

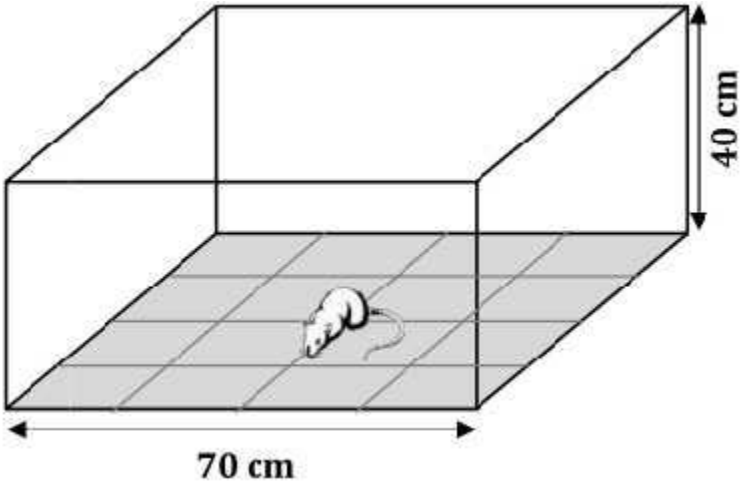


Figure 08 : Illustration schématique du champ ouvert (Open Field) (Hall, 1934).

2.2.4.2. Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus maze) (Montgomery, 1955)

Le labyrinthe en croix surélevé est utilisé pour mesurer le degré d'anxiété chez les rongeurs (Handley and Mithami, 1984).

Le labyrinthe en croix surélevé de 50cm du sol est composé de quatre bras en bois, deux bras ouverts (50×10cm) s'opposant perpendiculairement à deux bras fermés (50×10cm) avec 40cm de plexiglas haut bord. L'intersection des quatre bras (plate-forme centrale) mesurait 10cm (Montgomery, 1955 ; Roy, 2002 ; Patin *et al* ., 2005).

Le test du labyrinthe en croix surélevé est réalisé pendant 5 min en plaçant l'animal dans l'aire centrale face à un bras ouvert. Etant donné que le rat craint les espaces vides et hauts, son exploration dans les bras ouverts témoigne d'un comportement moins anxieux. A l'encontre, plus l'animal est localisé dans les bras fermés plus son comportement est désigné comme anxieux (Pellow *et al* ., 1985).

A l'issue de ce test, les paramètres suivants sont mesurés : le temps passé dans les bras ouverts, le temps passé dans les bras fermés, le nombre d'entrée dans les bras ouverts et le nombre d'entrée dans les bras fermés**.**

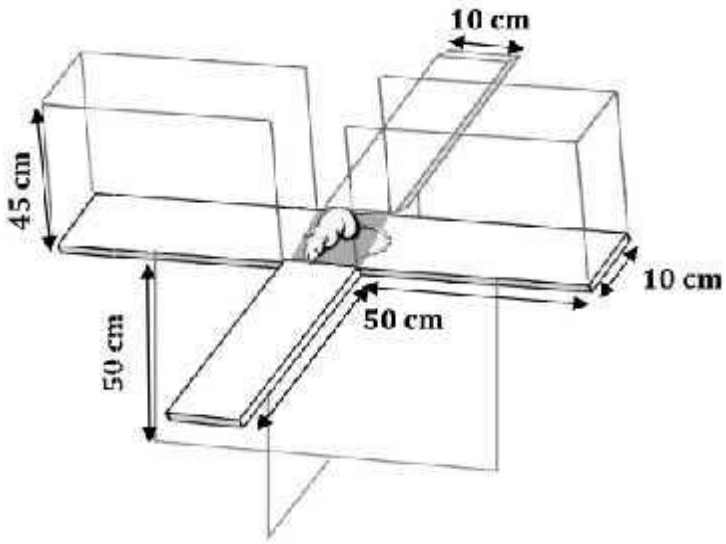


Figure 09 : Illustration schématique du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus-maze) (Patin *et al.*, 2005).

2.2.4.3. Application du stress Water Avoidance (WA) (Hiroo Amano et al., 2008)

Le modèle du stress d'évitement de l'eau que nous utilisons dans notre laboratoire est celui de (Santos et al., 2000 ; Hiroo Amano *et al* ., 2008).

Il consiste à placer les rattes pendant 1h sur la plate forme en verre (hauteur du sol, 11 cm × 7 cm de diamètre) située au milieu d'un aquarium 60 cm × 58 cm rempli d'eau qui a été régulièrement maintenue à (25°C) jusqu'à 1cm en dessous du niveau de la plate forme (figure 10).

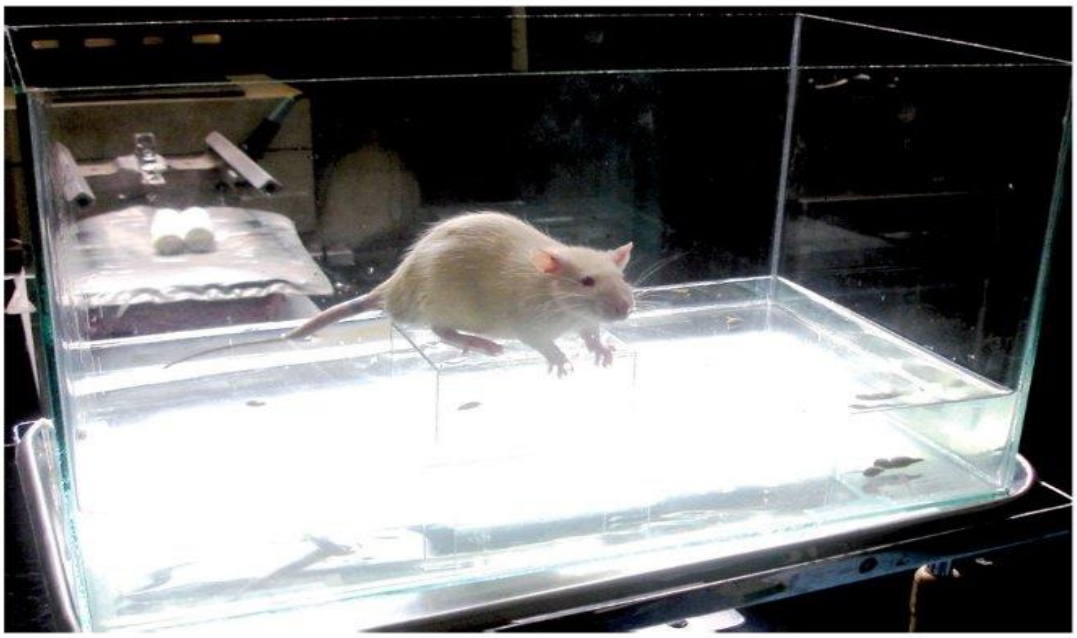


Figure 10 : Water Avoidance Stress (WAS) (Santos et al., 2000)

2.2.5. Détermination du profil glycémique durant la gestation

Au cours de la phase gestationnelle, nous procédons à la détermination du profil glycémique en deux périodes évolutives et précises chez toutes les femelles incluses dans l'étude.

Pour cette tache, nous disposons d'un glucomètre manuel [ONE TOUCH ultra ®] pour mesurer instantanément la glycémie (exprimée en g/l) à partir de la veine caudale (Hiramatsu Y *et al* ., 2002) de chaque ratte au jour gestationnel 1 et 19. Ces mesures glycémiques maternelles ont été réalisées en concordance avec la chronologie développementale de la progéniture:

- ✓ Le jour gestationnel 1 correspond au développement péri-implantatoire des pré-embryons.
- ✓ Le jour gestationnel 19 correspond au développement fœtal avancé.

Les ponctions caudales ont été effectuées délicatement afin de minimiser le stress. Chaque ratte a été maintenue sous la paume en faisant passer sa queue entre l'index et le majeur. Une coupure au bout de l'extrémité distale de la queue a été ensuite exécutée à l'aide d'une lame bistouri stérile afin d'en extraire une goutte de sang veineux, laquelle a été déposée sur une bandelette conforme à l'appareil utilisé. Une fois sectionné, le bout caudal a

été désinfecté par l'éthanol 70%, puis cautérisé jusqu'à l'arrêt définitif du saignement et traité au Madicasol ® pour une cicatrisation rapide (Joint Working Group of Refinement of the BVA/ FRAME / RSPCA/ UFAW, 1993).

2.2.6. Préparation des prélèvements

2.2.6.1. Décapitation et prélèvement sanguin

La décapitation des rattes a été exécutée au jour 19 (développement fœtal avancé) de la gestation au moyen des lames de bistouri stériles. Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés, puis directement centrifugé à 5000 tours/min pendant 25 min. le plasma obtenu a été séparé en plusieurs fractions dans des tubes Eppendorf et conservé à – 18°c pour le dosage des hormones et les paramètres biochimiques.

2.2.6.2. Dissection et prélèvement des organes maternels

Après sacrifice, l'animal a été fixé en *décubitus dorsal*, une incision a été pratiquée depuis l'orifice urogénital jusqu'au manubrium sternal (figure 08). Le foie et le cœur ont été rapidement prélevés sous glace à l'aide de pinces fines, pesés au moyen d'une balance de précision [Scaltec Instruments, Germany] puis conservés à -70°c pour le dosage des paramètres suivants : le glutathion réduit (GSH), la glutathion S-transférase (GST).
Pour chaque femelle décapitée, les fœtus ont été photographiés *in situ*, disséqués hors de l'utérus, comptés, pesés.

2.7. Hématologie

Les paramètres hématologiques (WBC- globules blancs, LYM- Lymphocytes, MONO- Monocytes, GRAN- Granulocytes, RBC- globules rouges, RDW- indice de distribution des globules rouges, Hgb- hémoglobine, HCT- hématocrite, PLT- plaquettes, PCT- plaquettocrite) ont été mesurés à l'aide d'un automate d'hématologie (PCE-210 model 2009 ; Japon).

2.8. Dosages des paramètres du stress oxydatif

2 .8.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme d'organe des rats des différents groupes étudiés a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 trous/min, 4°C, 15 min), le

surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à (- 20°C) en attendant d'effectuer le dosage des paramètres du stress oxydatif

2.8.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est déterminé selon la méthode de Bradford M (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 (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.

2.8.3. Glutathion (GSH)

2.8.3.1. Principe

La réduction de l'acide 5,5'- dithio-bis-2-nitrobenzoique (réactif d'Ellman) par les groupements thiols (-SH) du glutathion produit l'acide 2-nitro-5-mercapturique (Weekbecker G et Cory J G, 1988).

2.8.3.2. Mode opératoire

Le dosage du glutathion réduit (GSH) a été effectué selon la méthode d'Ellman (1959). 1,0 ml de surnageant a été précipité avec 1,0 ml d'acide sulfosalicylique (4%) puis incubé à 4°C pendant 1 heure. La solution est ensuite centrifugée à 1200 ×g pendant 15 min à 4°C. 1,0 ml de surnageant a été ajouté à 2,7 ml de tampon phosphate (0,1M ; pH 8,0) et 0,2 ml de DTNB (5-5'dithio-bis-(2-acide nitrobenzoïque)). L'absorption optique a été obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre à 412nm. Les résultats ont été exprimés en nmol de GSH par mg de protéines.

2.8.3.3. Calcul de la concentration

Les concentrations hépatique et cardiaque du GSH sont obtenues par la formule suivante:

[GSH] nmol/mg de protéines= (DO× 1 ×1,525) / (13100× 0,8× 0,5× [protéines])

La concentration des protéines dans chaque organe a été déterminée par la méthode de Bradford M (1976) en recourant à une courbe d'étalonnage préalablement réalisée au moyen de l'albumine bovine sérique (BSA).

- ✓ D0 : Densité optique.
- ✓ 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- ✓ 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau de 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 de surnageant.

2.8.4. Glutathion-S-Transférase (GST)

2.8.4.1. Principe

L'activité de la glutathion-S-transférase (GST) a été estimée selon la méthode d'Habig et al. (1974). Brièvement, la mesure de l'activité GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat, le CDNB (1-chloro-2-4-di-nitrobenzène) en présence du glutathion. La réaction de conjugaison entre le glutathion et le CDNB entraine la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde. Les valeurs ont été données en nmol/min/mg protéines.

2.8.4.2. Mode opératoire

	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (100 Mm ; pH 6,5)	850	830
CDNB (20 mM)	50	50
GSH (100mM)	100	100
Echantillon	-	20

Les cuves en quartz ont été incubées à 37°c durant la manipulation et la mesure de l'activité enzymatique a été accomplie aux 5 premières minutes de la réactivité.

2.8.4.3. Mesure de l'activité de la GST

L'activité a été mesurée par la formule suivante :

Activité GST (µmol/min/mg de protéines) = (Δ DO essai -Δ DO blanc) / 9,6 × [protéines]

La concentration des protéines dans chaque organe a été déterminée par la méthode de Bradford M (1976) en recourant à une courbe d'étalonnage préalablement réalisée au moyen de l'albumine bovine sérique (BSA).

- ✓ Do échant /min : Densité optique de l'échantillon /min.
- ✓ Do blanc /min : Densité optique du blanc /min.
- ✓ 9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB.

2.9. Traitement statistique des résultats

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type moyen (Moy ± SEM) (*Standard Error of the Mean*), la comparaison entre les différents groupes sont effectuées après une analyse de test t de student .

L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel MINITAB (Version 13).

Les différences sont considérées comme :

- ✓ Significatives lorsque ($p < 0.05$).
- ✓ Hautement significatives lorsque ($p<0.01$)
- ✓ Très hautement significatives lorsque ($p<0.001$). Avec p : Seuil de signification.

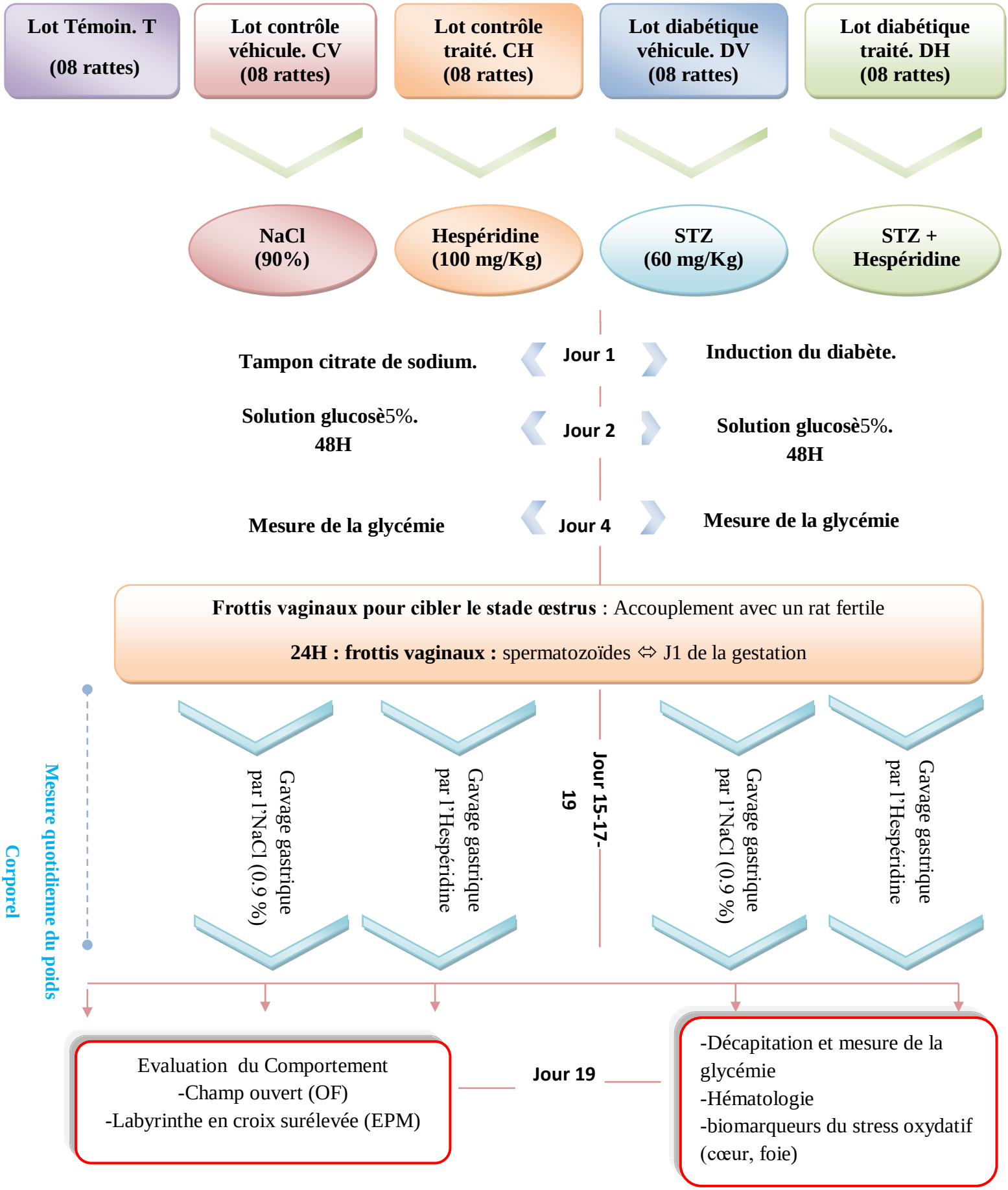


Figure 11 : Illustration schématique de l'expérimentation « 01 »

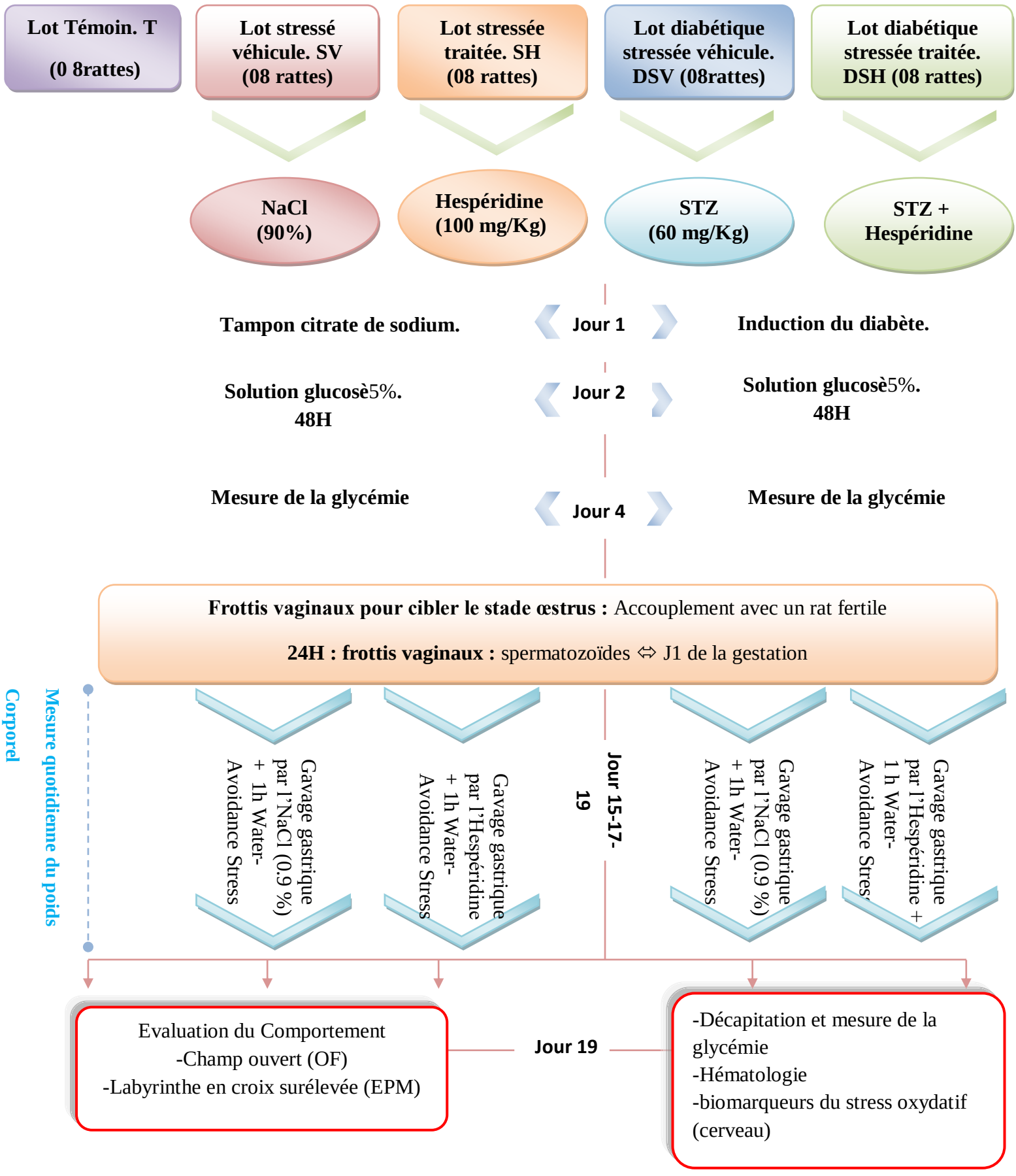


Figure 12 : Illustration schématique de l'expérimentation « 02 »

RESULTATS

3. RESULTATS

3.1. Expérimentation 1 Effets de l'hespéridine chez les rattes diabétiques

3.1.1. Changement pondéral

Au cours de l'expérimentation, le poids corporel des rattes (exprimé en grammes) des cinq lots (T, CV, CH, DV, DH) a été pris quotidiennement et présenté au jour 1, 5, 7, 11, 17 et au jour 19 (Fig.13).

Au 1^{ier} jour de la gestation, la prise du poids n'a montré aucune différence significative chez les rattes diabétiques véhicule et les rattes traitées à l'hespéridine (DH) par rapport aux rattes témoins (T) (DV : 216±6,10 ; DH : 220±9,28 vs T : 228± 5,17).

Au 19ème jour, les résultats ont montré une augmentation pondérale hautement significative (p< 0,001) chez les lots diabétiques véhicule (DV) et diabétiques traitées à l'hespéridine (DH) par rapport au lot T. Le traitement oral des rattes diabétiques à l'hespéridine (DH) a permis d'améliorer le changement du poids corporel par rapport au groupe diabétique véhicule (DV) (DV : 215±1,30 ; DH : 245±9,27 vs T : 279±2,30). En revanche, la progression du traitement jusqu'à ce stade avancé a rétabli sensiblement le poids dans le lot DH par rapport au lot D (DH : 245±9,27vs DV : 215±1,30).

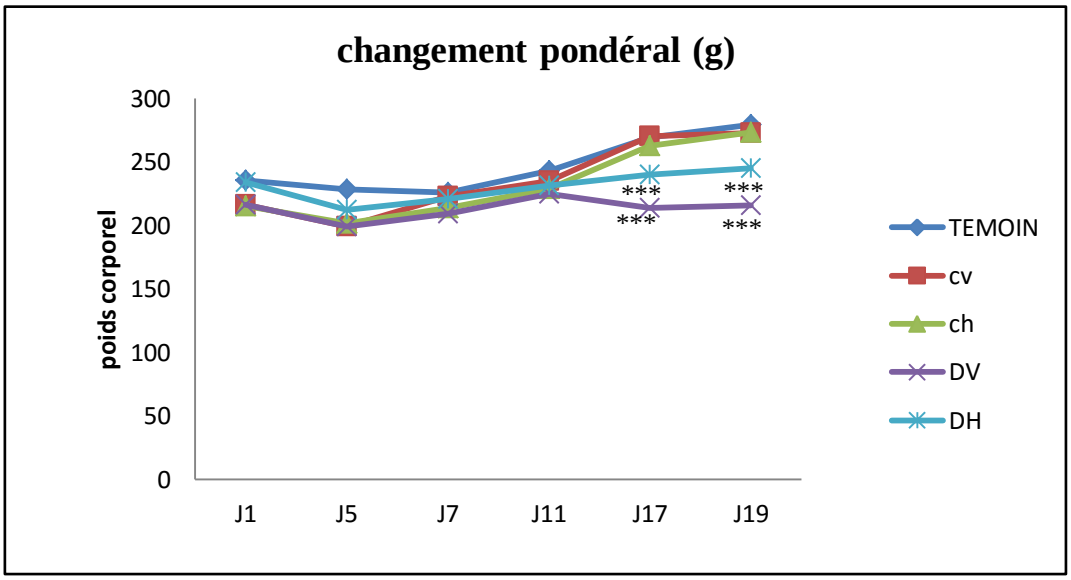


Figure 13 : Changement pondéral des rattes. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM Ns. (Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

3.1.2. La glycémie

La figure 14 montre la concentration de glucose dans le sang (g/l) avant la décapitation chez les groupes des rattes témoins, contrôle véhicule (diabétiques et diabétiques traitées).

La STZ provoque une augmentation très significative (p< 0,01) chez les deux groupes des rattes diabétiques véhicules (DV) et diabétiques traitées (DH) par rapport aux groupes deux rattes témoins, contrôle véhicule et contrôle traitées à l'hespéridine. (T : 0,904 ±0,164 vs DV : 4,204±0,999), (T : 0,904 ±0,164vs DH : 2.14± 0,652), (CV : 1,044±0,164 vs DV : 4,204±0,999), (CV : 1,044±0,164 vs DH : 2.14± 0,652). En l'occurrence, le traitement à l'hespéridine des rattes jusqu'au jour 19 a rétabli significativement la glycémie par rapport au groupe des rattes diabétiques véhicules (DV : 4,204±0,999 vs DH : 2.14± 0,652) qui reste remarquablement plus élevée que celle du témoin et contrôle.

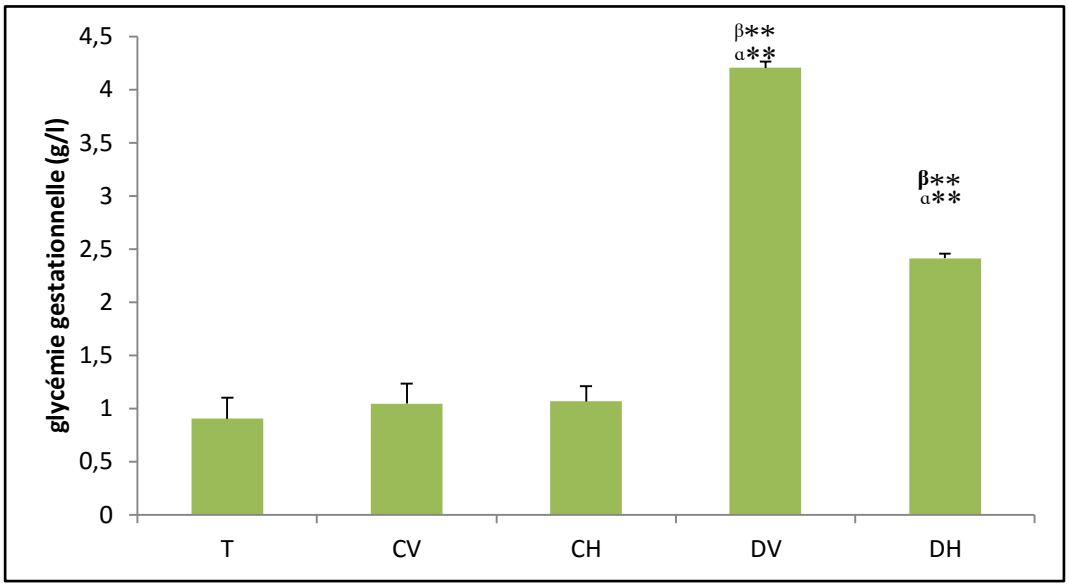


Figure 14 : Variation de la glycémie en g/l au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule (CV), les rattes contrôle traitées (CH), les rattes diabétiques véhicule (DV), diabétiques traitées (DH) (α) la comparaison avec les rattes témoins, (β) la comparaison avec les rattes contrôle véhicule.

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

3.1.3. Le comportement anxieux dans l'Open Field test

Les résultats obtenus dans la figure 15A montre que la distance parcourue par les rattes contrôle et diabétique traitée par l'hespéridine est significative ($p< 0.05$) à celui traversée par les rattes contrôle véhicule (CV : 33± 8,23 vs CH : 60± 1,69), (CV : 33± 8,23 vs DH : 45±6,5) et une diminution très significative ($p< 0,01$) chez les diabétiques véhicule (CV : 33± 8,23 vs DV :18± 4) et augmentation hautement significative des diabétique traitée à l'hespéridine ($p <0,001$) par rapport aux rattes diabétiques véhicule (DV : 18± 4 vs DH :45±6,5)

La figure 15 B montre que le groupe des rattes diabétiques et diabétiques traitées passe moins de temps dans la partie centrale du dispositif par rapport aux groupes des rattes témoin, contrôle véhicule et traitée par l'hespéridine (T : 40,4±5,16 vs DV : 10,4 ± 2,05), (T : 40,4±5,16 vs DH : 13,4± 5,23), (CV : 22,8±7,46 vs DV : 10,4 ± 2,059)
La figure 12C montre que les rattes diabétiques traitées passent moins de temps dans la périphérie que les rattes diabétiques véhicule (DV : 267,8±31,34 vs DH : 256,8±14,51) mais l'analyse statistique de ces résultats n'a révélée aucune signification.

La figure 15 D montre que le nombre de redressements a été diminué après l'induction du diabète ($p<0,01$) mais significativement amélioré avec prétraitement à l'hespéridine ($p<0,05$).

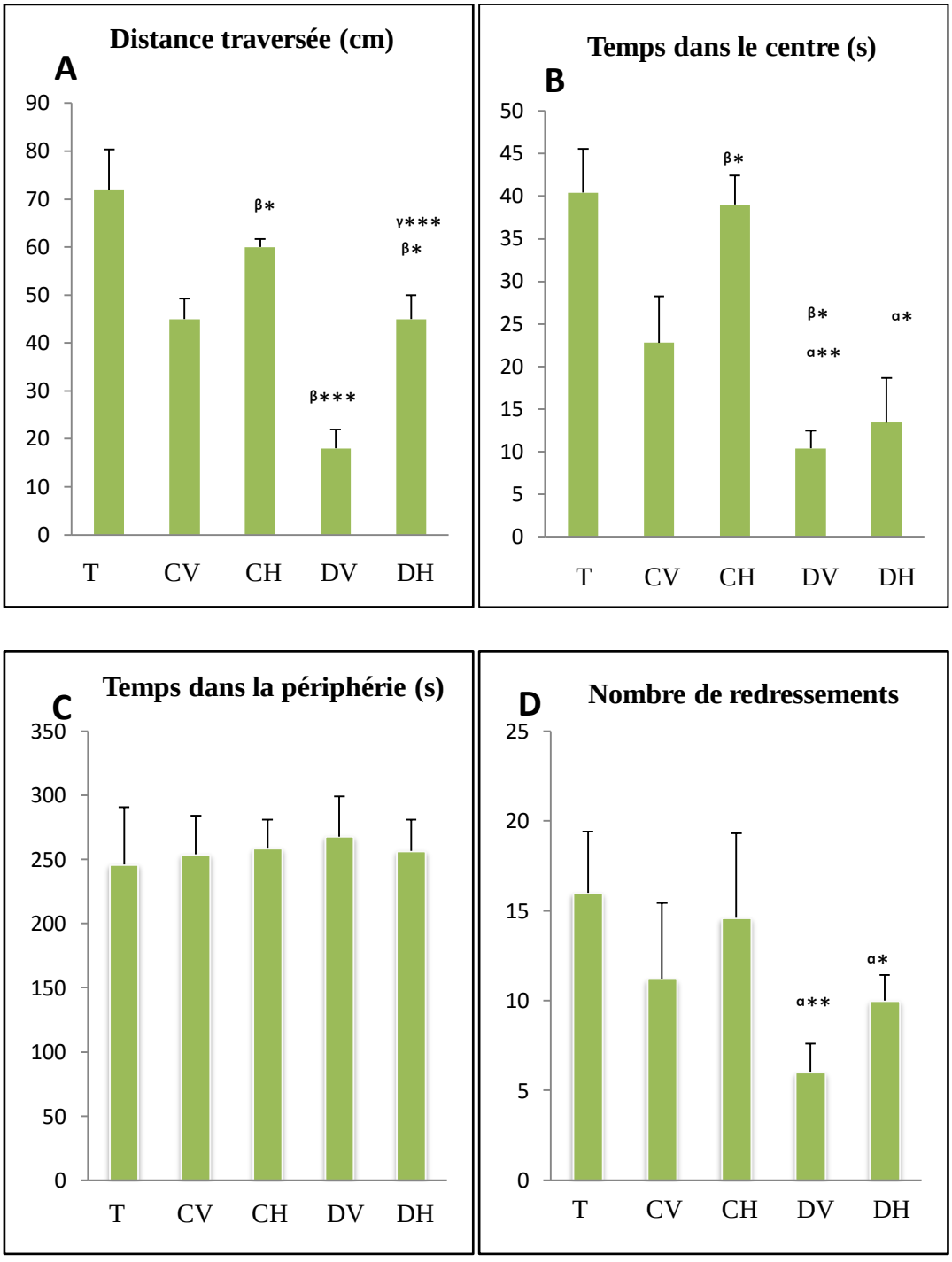
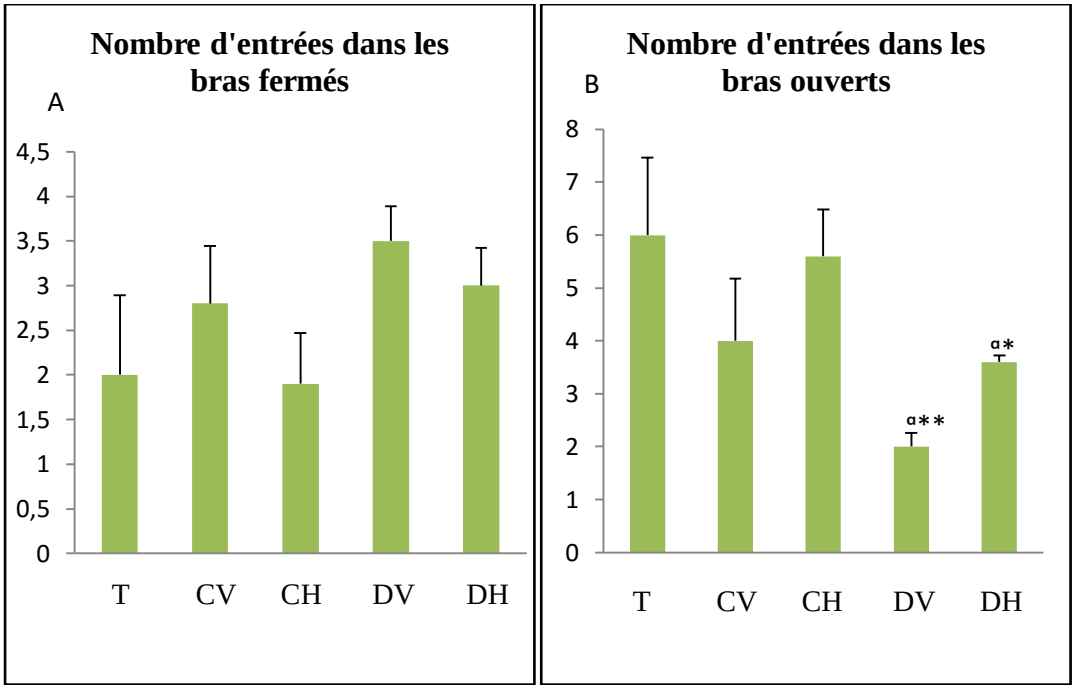


Figure 15 : Comportements des rattes gestantes témoins et traitées dans l'open Field. La distance traversée (A), le temps passé dans le centre (B), le temps passé dans la périphérie (C) et le nombre de redressement (D). (α) la comparaison avec les rattes témoin, (β) la comparaison avec les rattes contrôle véhicule et(γ) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule.

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

3.1.4. Le comportement anxieux dans l'Elevated Plus-Maze test

Dans ce test comportemental, les rattes diabétiques véhicule ont montré une élévation significative du temps passé dans les bras fermés du labyrinthe (p<0,001) avec une diminution considérable du nombre d'entrées dans les bras ouverts (p<0,01) comparativement aux témoins. Ces mesures ont été significativement améliorées chez les rattes diabétiques traitées (p<0,001) sauf le nombre d'entrées dans les bras. Le nombre d'entrées dans les bras ouverts montre une augmentation significative (p<0,05) chez le groupe des rattes diabétiques traitées par contre le nombre d'entrées dans les bras fermés ne montre aucune signification.



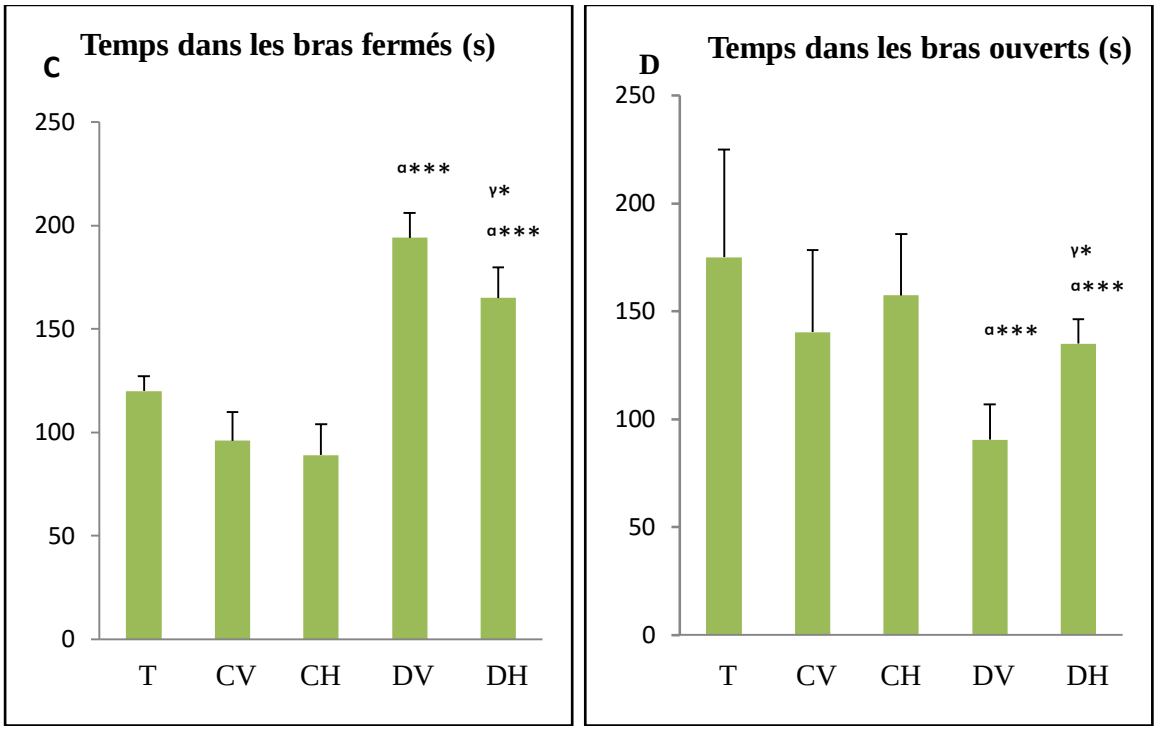


Figure 16 : Comportements des rattes gestantes témoins et traitées dans l'Elevated plus-maze. Nombres d'entrées dans les bras fermés(A), nombres d'entrées dans les bras ouverts (B), le temps passé dans les bras fermés (C) et le temps passé dans les bras ouverts (D). (α) la comparaison avec les rattes témoin, (β) la comparaison avec les rattes contrôle véhicule et(γ) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

3.1.5. Les mesures hématologiques gestationnelles

Les mesures hématologiques chez les rattes diabétiques véhicule (DV) ont indiqué une diminution significative (p<0,05) en GR, CCMH, PLT et une différence très significative en PLT (p<0,01) par rapport aux rattes témoins (T : 864± 66,35 vs DV : 456.8 ±60.6) avec une augmentation significative (p<0,05) en HgB par rapport à celui de témoins.

Chez les femelles diabétiques traitées (DH) l'analyse montre une augmentation significative (p<0,05) en HgB par rapport aux rattes témoins et en PLT par rapport aux rattes diabétiques véhicule.

Tableau 2 : Les mesures hématologiques maternelles au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins et traitées à l'hespéridine.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. (α) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule

Ns.: Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

Paramètres	Témoin	CV	CH	DV	DH
GR [×10⁶/µl]	8,32±0,51	7.25± 0.36	7.61 ± 0.79	6.68 ± 0.38 *α	8.86 ± 1.1
HgB[g/dL]	9,67± 1,2473	10.10 ± 0.92	10.22 ± 0.84	12.9 ± 0.57*α	15.05 ± 1.33*α
HCT[%]	45,17± 1,75	42.92 ± 1.72	37.58 ± 5.52	41.2 ± 5.3	55.33 ±4.91
VMC [fL]	60,32± 1,93	59.32 ± 0.78	55.9 ± 2.65	61.55 ± 5.54	62.73 ±4.33
CCMH [g/dL]	24,62± 2,65	24.13 ± 2.36	27.7 ±3.86	31.65 ± 2.8*	27.22 ± 1.53
PLT [×10³/µl]	864± 66,35	874 ± 66.8	1049.8 ± 179.7*α	456.8 ±60.6**α	687 ± 214 *α

3.1.6. Teneur en glutathion réduit (GSH) et en glutathion S-transférase (GST) chez les rattes gestantes

3.1.6.1. Teneur hépatique en glutathion (GSH) chez les rattes gestantes

Les résultats montrent une diminution hautement significative ($p < 0.001$) de la teneur hépatique en glutathion chez les rattes diabétiques véhicule et une augmentation très significative ($p < 0.01$) chez les rattes diabétiques traitées par rapport aux rattes témoins (T : 55 ±4,87 vs DV : 24 ±2,64), (T : 55 ±4,87 ± vs DH : 33 ± 9,74).

3.1.6.2. Mesure de l'activité hépatique de la glutathion S-transférase (GST) chez les rattes gestantes

Les résultats indiquent une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration hépatique en GST chez les rattes diabétiques véhicule par rapport aux rattes

témoins (T : 117,2± 6,14 vs DV : 214,4± 5,59). Cette hyperactivité est réduite chez les rattes gestantes diabétiques traitées à l'hespéridine (T : 117,2± 6,14 vs DH : 161,2± 4,81).

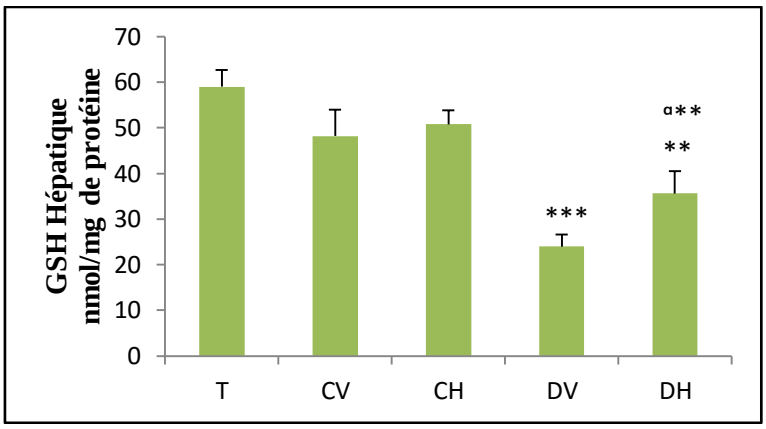


Figure 17 : Variation de la concentration hépatique du GSH en nmol/mg de protéine chez les rattes gestantes témoins T, rattes gestantes control véhicule CV, rattes gestantes control traitées à l'hespéridine CH, rattes gestantes diabétiques véhicule DV, rattes gestantes diabétiques traitées à l'hespéridine DH. (α) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule.Ns. : Différence non significa tive $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p <$ 0.01; ***$p < 0.001$

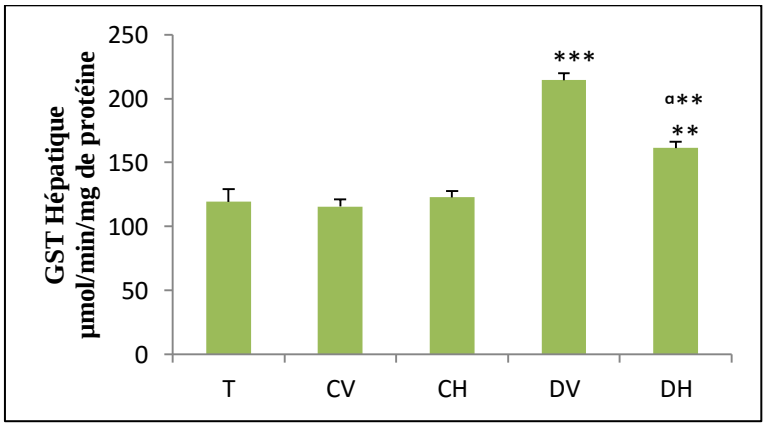


Figure 18 : Variation de l'activité hépatique de la GST en µmol/min/mg de protéines chez les rattes gestantes témoins T, rattes gestantes control véhicule CV, rattes gestantes control traitées à l'hespéridine CH, rattes gestantes diabétiques véhicule DV, rattes gestantes diabétiques traitées à l'hespéridine DH. (α) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule.

Ns. : Différence non significative *p > 0.05 ; *p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001*

3.1.6.3. Teneur cardiaque en glutathion (GSH) chez les rattes gestantes

Nos résultats montrent que la concentration en GSH cardiaque diminue chez les rattes gestantes diabétiques véhicule comparativement aux témoins. (DV : 24±2,64 vs T : 59±8,91). Cependant, le traitement des rattes diabétiques à l'hespéridine réduit significativement le taux de GSH cardiaque par rapport aux témoins et aux rattes gestantes diabétiques véhicule. (DH : 35,6±4,92 vs T : 59±8,91) (DH : 35,6±4,92 vs DV : 24±2,64).

3.1.6.4. Mesure de l'activité cardiaque de la glutathion S-transférase (GST) chez les rattes gestantes

D'après nos résultats, l'activité de la GST cardiaque chez les rattes gestantes diabétiques véhicule est élevée avec une différence hautement significative par rapport aux témoins. (DV : 129±5,62 vs T : 115±6,54), de même le traitement à l'hespéridine chez les rattes gestantes diabétiques a fait preuve d'une atténuation de cette hyperactivité enzymatique cardiaque par rapport aux rattes gestantes diabétiques véhicule mais son effet ne la réduit pas au seuil des témoins. (DH : 119±10,11 vs T : 115±6,54) (DH : 119±10,11 vs DV : 129±5,62)

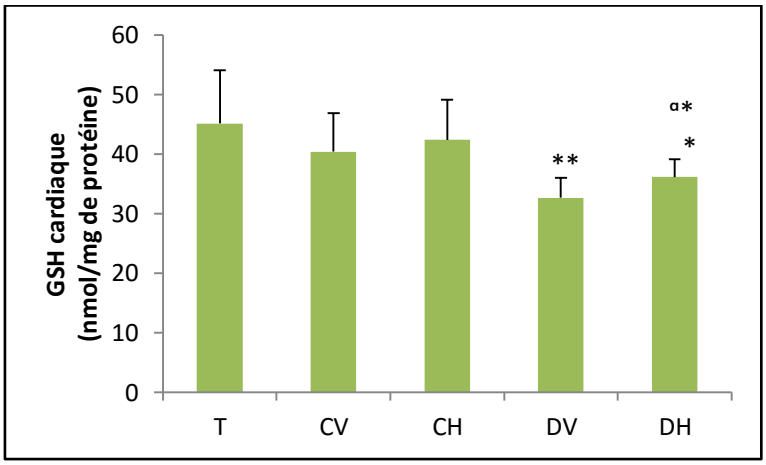


Figure 19 : Variation de la concentration cardiaque du GSH en nmol/mg de protéines chez les rattes gestantes témoins T, rattes gestantes control véhicule CV, rattes gestantes control traitées à l'hespéridine CH, rattes gestantes diabétiques véhicule DV, rattes gestantes

diabétiques traitées à l'hespéridine DH. (α) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule.

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

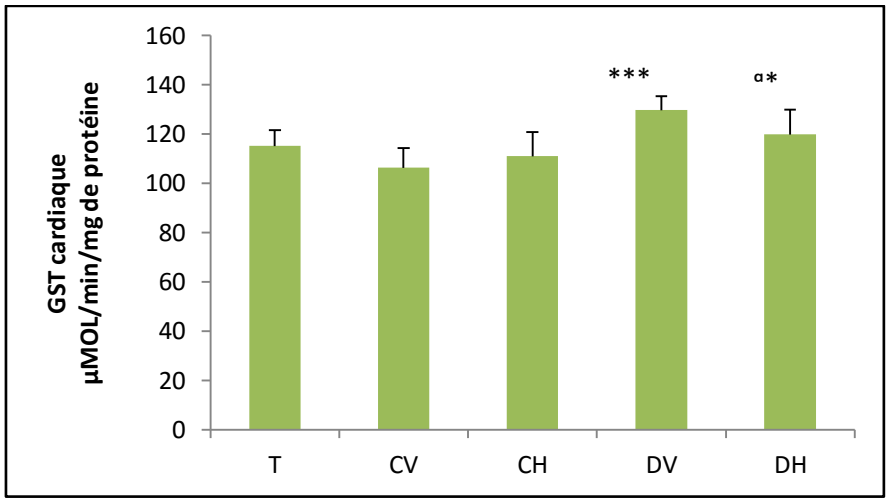


Figure 20 : Variation de l'activité cardiaque de la GST en µmol/min/mg de protéines chez les rattes gestantes témoins T, rattes gestantes control véhicule CV, rattes gestantes control traitées à l'hespéridine CH, rattes gestantes diabétiques véhicule DV, rattes gestantes diabétiques traitées à l'hespéridine DH. (α) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule

Ns. : Différence non significative *p > 0.05 ; *p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001*

3.2. Expérimentation 2 Effets de l'hespéridine chez les rattes diabétiques stressées (Water Avoidance stress ; WAS)

3.2.1. Changement pondéral

Le poids corporel des rattes gestantes stressées obtenu dans cette expérimentation (exprimé en gramme) chez les lots témoin (T), contrôle véhicule stressée (CVS), contrôle traitée stressée (CHS), diabétique véhicule stressée (DSV), diabétique traitée à l'hespéridine (DHS) a été pris quotidiennement et présenté au jour 3, 7, 17 et au jour 19 de la gestation.

- ✓ Au 3ème jour et 7ème jour de la gestation les résultats ont montré que la moyenne du poids corporel des rattes gestantes témoins (T) est supérieure à celles des rattes

gestantes stressées et des rattes gestantes stressées diabétiques. L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative (*p>0,05*) (CVS : 216,6 ±1,67 et CHS : 215,4 ± 1,43 vs T : 228± 5,17), (DVS : 217,2 ±2,96 et DHS : 222,8±1,27 vs T : 228± 5,17).

- ✓ Au 17éme jour, la streptozotocine provoque une diminution significative (*p<0,05*) du poids corporel chez les rattes gestantes stressées et les rattes gestantes stressées diabétiques par rapport aux rattes témoins (CVS : 232,9±6,5 et CHS : 229,2±5,35 vs T : 269,2± 3,27), (DVS : 224,8±2,58 et DHS : 227,6±6,76 vs T : 269,2± 3,27).

- ✓ Au 19ème jour, la prise du poids a montré une augmentation non significative chez les lots CVS et CHS par rapport au lot T (CVS : 259,4 ±8,17 et CHS : 267,3± 6,16 vs T : 280,4± 2,3) et une augmentation très significative chez le DVS (DVS : 213,8± 7,9 vs T : 280,4± 2,3) Le traitement oral des rattes diabétiques stressées traitées à l'hespéridine dans ce stade a rétablie sensiblement le poids dans le lot DHS par rapport au lot DVS et cette diminution est significative *(p>0,05)* (DHS : 241,4±5,72 vs DVS : 213,8± 7,9). (Figure 21)

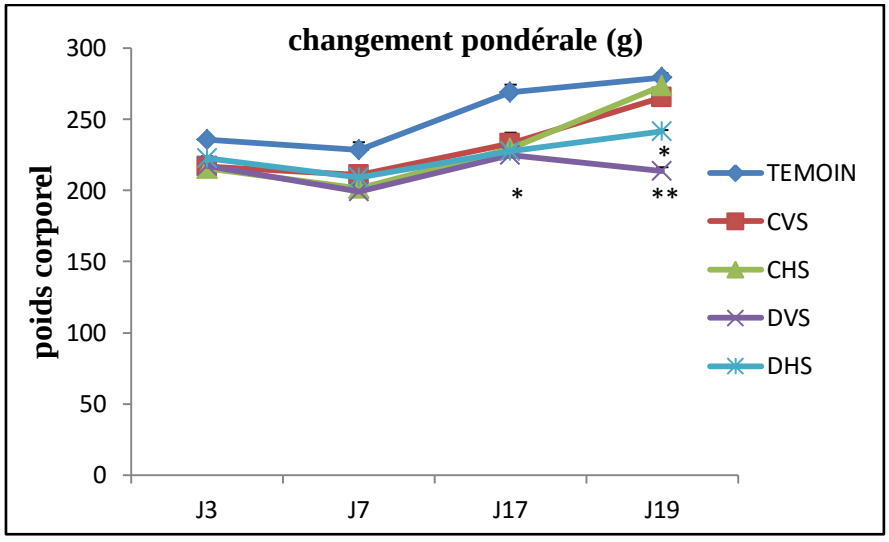


Figure 21 : Changement pondéral des rattes. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM Ns. (Différence non significative *p > 0.05 ; *p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001).*

3.2.2. La glycémie

La glycémie maternelle (exprimée en g/l) a été mesurée le 19ème jour correspondant au développement fœtal avancé.

Le prélèvement au 19ème jour a montré une augmentation glycémique hautement significative chez les lots des rattes contrôle véhicule stressées (CVS), les rattes diabétiques véhicule stressées (DVS) et diabétiques traitées stressées (DHS) par rapport au lot témoin (T). (CVS : 1,61±0,4 ; DVS : 5,56±1,63 et DHS : 4±0,69 vs T : 0,9±0,17).

Cependant, après traitement à l'antioxydant nous avons constaté une augmentation très significative de la glycémie chez le lot contrôle stressées traitées à l'hespéridine (CHS) et une augmentation hautement significative chez les lots DVS et DHS par rapport au lot CVS. (CHS : 1,08±0,41 vs CVS : 1,61±0,4).

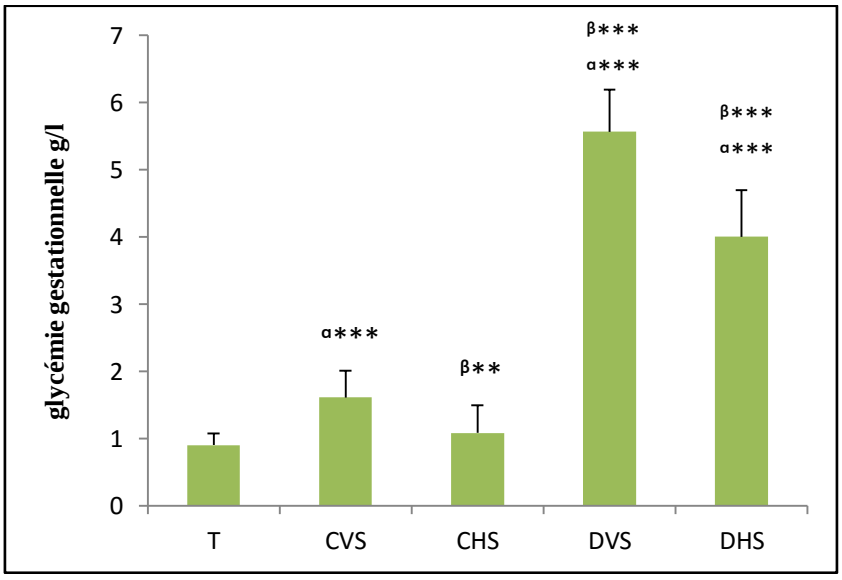


Figure 22 : Variation de la glycémie en g/l au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins (T), les rattes contrôle véhicule stressées (CVS), les rattes contrôle traitées stressées (CHS), les rattes diabétiques véhicule stressées (DVS), diabétiques traitées stressées (DHS) (α) la comparaison avec les rattes témoins, (β) la comparaison avec les rattes contrôle véhicule stressées.

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

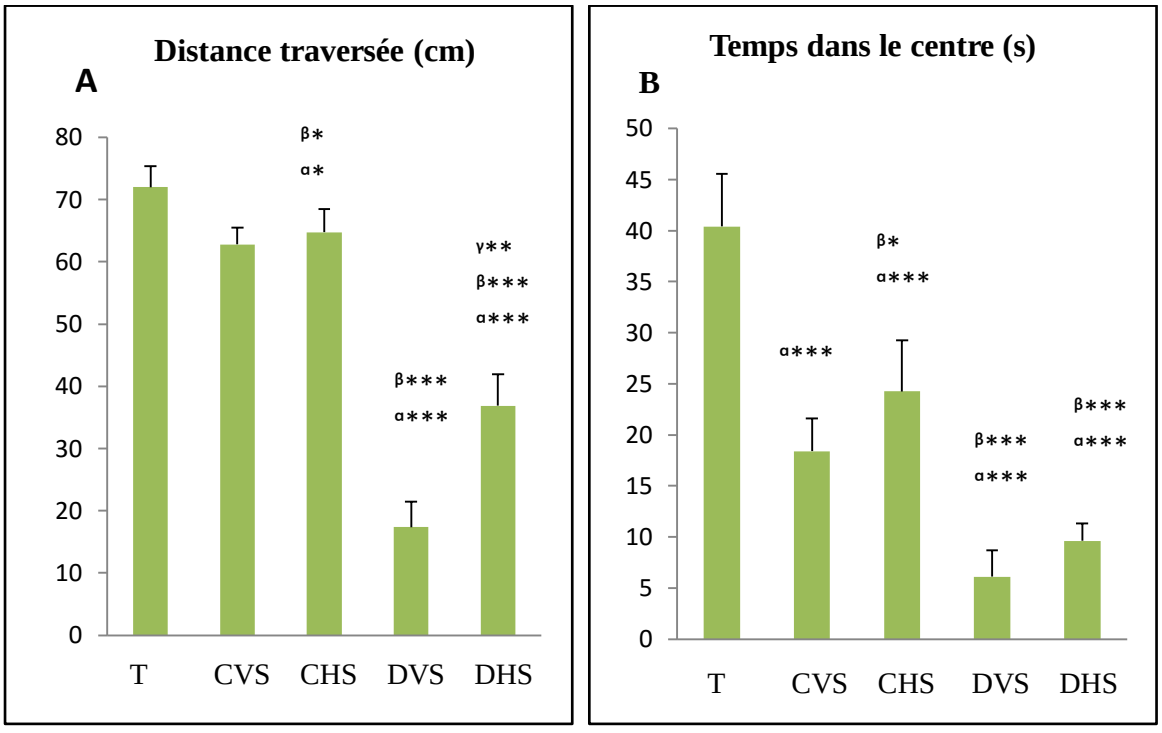
3.2.3. Le comportement anxieux dans l'Open Field test

La figure (23) résume le comportement des rattes dans l'open field.

D'après les résultats obtenus, le stress provoque une diminution hautement significative (p<0,001) de la distance traversée dans le dispositif chez le lot des femelles diabétiques stressées (DVS) et le lot des femelles diabétiques stressées traitées à l'hespéridine (DHS) par rapport aux rattes témoins (T) (Fig A), après le traitement à l'hespéridine les femelles montraient une atténuation de l'anxiété comparée à ceux recevant le véhicule. (p<0,05) (CVS : 62,8±2,75 vs CHS : 64,75± 3,76).

Cependant, nos résultats ont montré que les rattes stressées passent moins de temps dans la zone du centre (p<0,001) et plus de temps dans la zone périphérique par rapport aux témoins (p<0,001) (Fig B, C).

Le nombre de redressement a été aussi diminué après stress. (p<0,01) chez le lot DVS par rapport aux témoins et (p<0,05) comparativement aux contrôle mais significativement amélioré avec traitement à l'hespéridine (p<0,05). (Fig D)



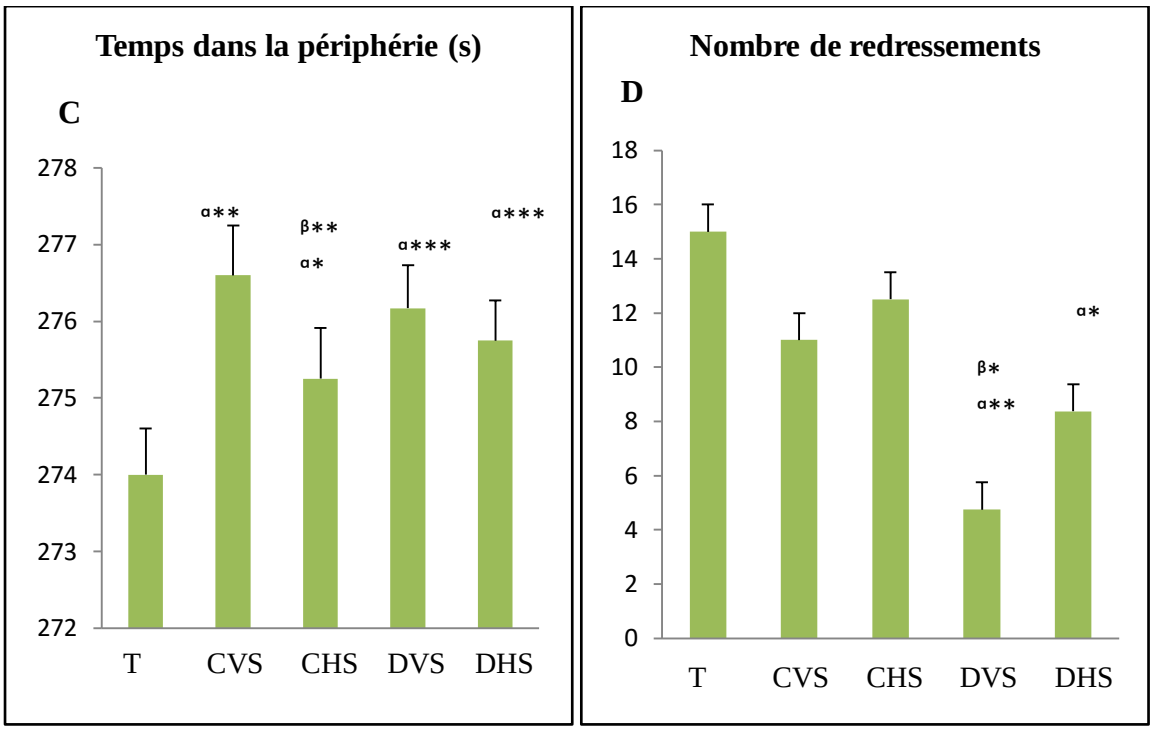


Figure 23 : Comportements des rattes gestantes témoins et stressées traitées à l'hespéridine dans l'open Field. La distance traversée (A), le temps passé dans le centre (B), le temps passé dans la périphérie (C) et le nombre de redressement (D). (α) la comparaison avec les rattes témoin, (β) la comparaison avec les rattes contrôle véhicule stressées et(γ) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule stressées.

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

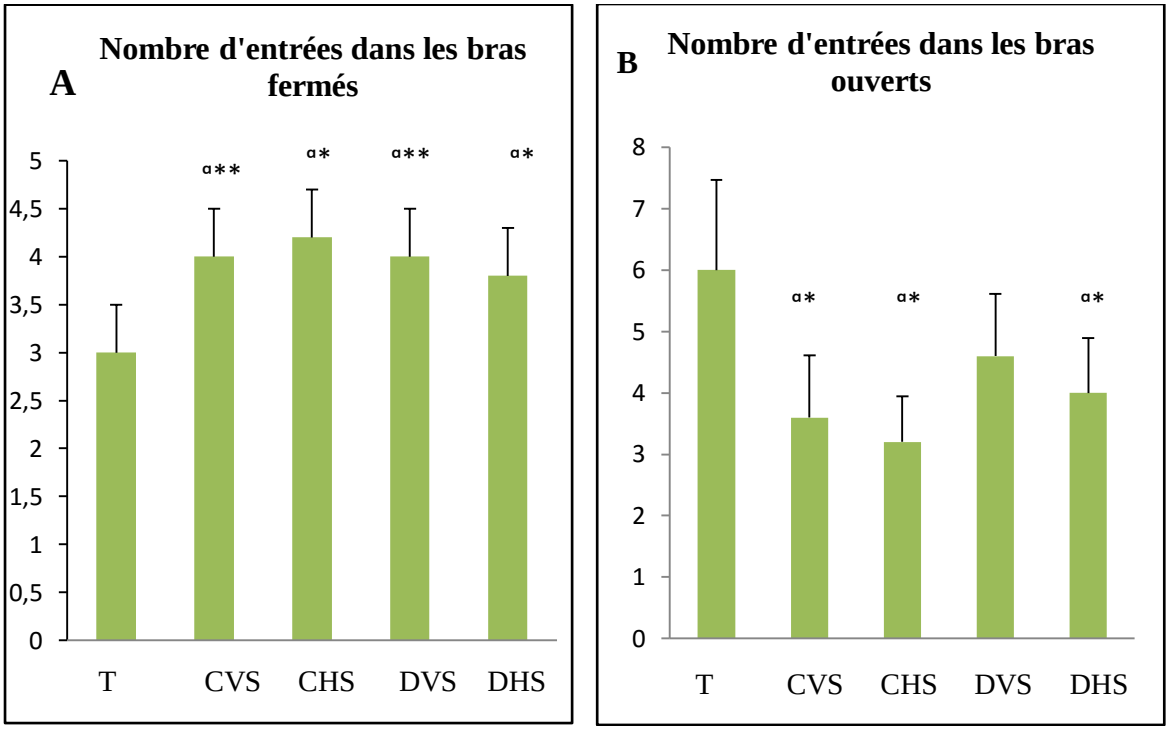
3.2.4. Le comportement anxieux dans l'Elevated Plus-Maze test

Les résultats obtenus dans la figure 24A et 24B montrent que le nombre d'entrées dans les bras fermés a augmenté significativement (p<0,05) chez les rattes stressées(CVS), stressées traitées à l'hespéridine(CHS), diabétique stressées (DVS) et diabétiques stressées traitées à l'hespéridine(DHS) par rapport à ceux des témoins, et par conséquence, le nombre d'entrées dans les bras ouverts a diminué chez les femelles stressées par rapport aux rattes témoins. L'analyse statistique montre une différence significative (p<0,05) chez les lots CVS, CHS et DHS comparativement aux témoins.

La figure 24C et 24D montrent que le temps passé dans les bras fermés du dispositif chez les lots stressés(CVS), stressés traités à l'hespéridine(CHS), diabétiques stressés (DVS) et diabétiques stressés traités à l'hespéridine(DHS) est supérieur à celui des rattes témoins. L'analyse statistique de ces résultats a montré une augmentation hautement significative (p<0,001) pour les femelles CVS, CHS, DVS et DHS par rapport aux témoins, et une augmentation très significative (p<0,01) chez les lots CHS et DHS par rapport aux rattes contrôle véhicule stressées (CVS).

Le prétraitement à l'hespéridine a diminué le temps passé dans les bras fermés chez les femelles diabétiques stressées traitées à l'hespéridine (DHS) par rapport aux rattes contrôle véhicule stressées (CVS).

Inversement, le temps passé dans les bras ouverts chez le lot témoin a augmenté par rapport aux rattes stressées(CVS), stressées traitées à l'hespéridine(CHS), diabétiques stressées (DVS) et diabétiques stressées traitées à l'hespéridine(DHS). L'analyse statistique montre une différence hautement significative des (CHS) (p<0,05) et une augmentation hautement significative (p<0,001) par rapport aux (CVS).



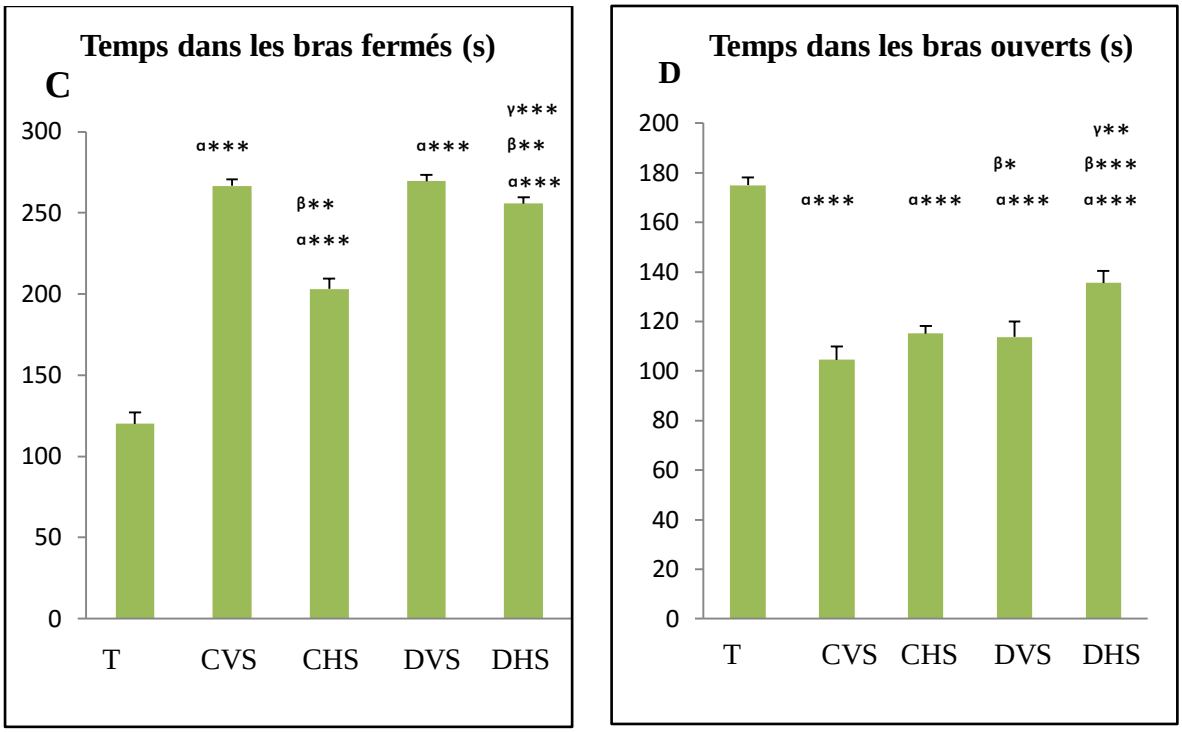


Figure 24 : Comportements des rattes gestantes témoins et stressées traitées à l'hespéridine dans l'Elevated plus-maze. Nombres d'entrées dans les bras fermés(A), nombres d'entrées dans les bras ouverts (B), le temps passé dans les bras fermés (C) et le temps passé dans les bras ouverts (D). (α) la comparaison avec les rattes témoins, (β) la comparaison avec les rattes contrôle véhicule stressées et(γ) la comparaison avec les rattes diabétiques véhicule stressées

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

3.2.5. Les mesures hématologiques gestationnelles

les résultats montrent une diminution du taux des GR, HgB, HCT et VMC chez les rattes contrôle stressées et diabétiques stressées par rapport aux témoins mais nous n'avons pas trouvé une différence significative, par contre l'analyse statistique a démontré une diminution significative ($p< 0.05$) de taux des plaquettes suite à l'injection de la STZ et l'application du WAS chez les rattes contrôle stressées et diabétiques stressées comparativement aux rattes témoins.(CVS : 691 ± 255 ; DVS : 694,3 ± 87,1 vs T : 864± 66,35)

Tableau 3 : Les mesures hématologiques maternelles au jour gestationnel 19 chez les rattes témoins et stressées traitées à l'hespéridine .

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.

Ns.: Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

Paramètres	Témoin	CVS	CHS	DVS	DHS
GR [×10⁶/µl]	8,32±0,51	5,22 ± 0,21	7,78 ± 0,58	6,12 ± 0,10	6,73 ± 0,49
HgB[g/dL]	9,67±1,24	7,57 ± 0,46	7,27 ± 1,05	6,2 ± 0,83	6,57 ± 0,46
HCT[%]	45,17± 1,75	32,8 ± 1,30	34,57 ± 1,72	40,97 ± 1,52	38,87 ± 1,31
VMC [fL]	60,32± 1,93	57,75 ± 1,70	56,25 ± 0,95	51,75 ± 0,82	50,87 ± 0,47
CCMH [g/dL]	24,62± 2,65	35,05 ± 0,75	33,65 ± 1,15	32,05 ± 1,42	31,02 ± 1,74
PLT [×10³/µl	864± 66,35	691 ± 255 *	767,3 ± 33	694,3 ± 87,1*	711 ± 55,05

3.2.6. Taux de glutathion cérébral

Une diminution très significative de taux de GSH réduit a été enregistrée chez les animaux de groupe CVS, DVS et DHS (p<0.01) par rapport aux témoins. Le traitement à l'hespéridine augmente significativement le niveau de GSH chez les rats du groupe CHS (p<0.01) comparativement aux contrôles stressés.

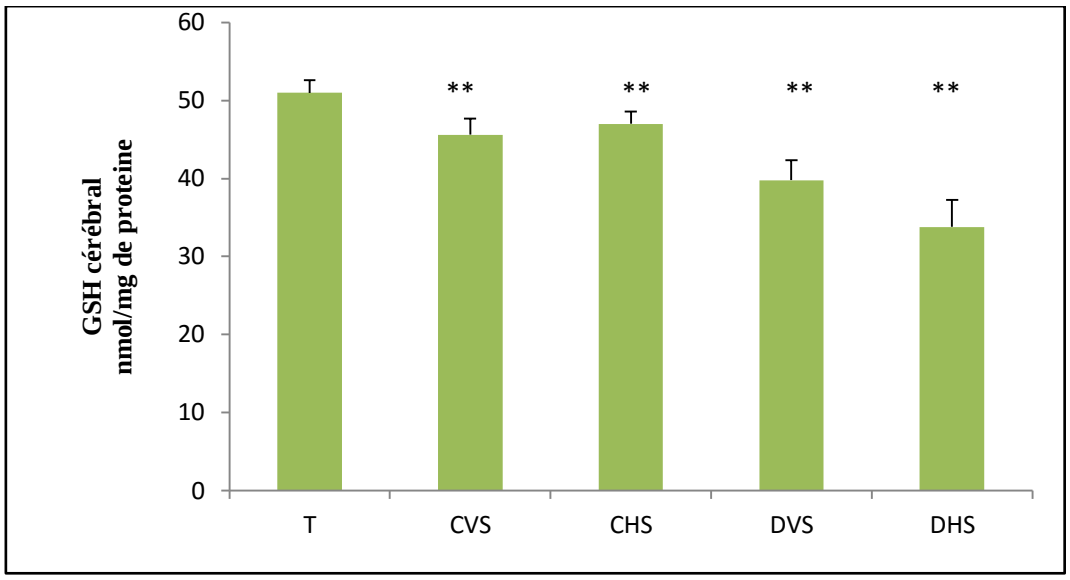


Figure 25 : Variation du taux de glutathion (nmol/mg protéines) cérébral chez les rattes gestantes témoins T, rattes gestantes control véhicule stressées CVS, rattes gestantes control stressées traitées à l'hespéridine CHS, rattes gestantes diabétiques stressées véhicule DVS, rattes gestantes diabétiques stressées traitées à l'hespéridine DHS.

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

3.2.7. Activité de la glutathion-S-transférase cérébrale

L'activité de la GST augmente significativement chez les rattes des groupes CVS et DVS ($p<0.001$) comparativement aux témoins. L'administration de l'hespéridine chez les rattes stressées prétraitées à la STZ réduit significativement l'activité de la GST ($p<0.001$) par rapport aux contrôles stressées et diabétiques stressées. Les mères du groupe DHS ont montré un accroissement significatif de l'activité de la GST ($p<0.001$)

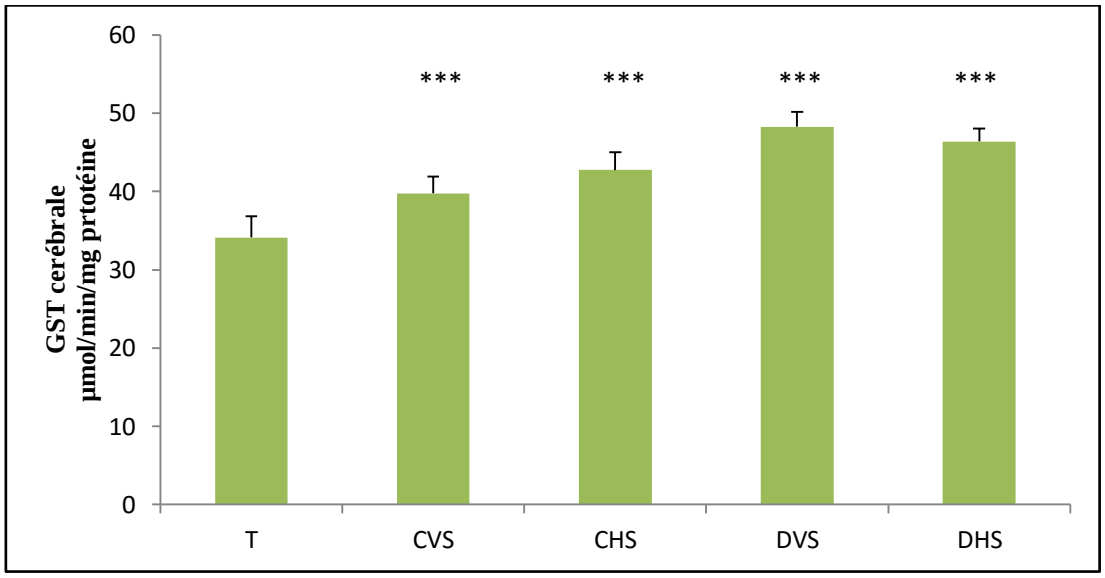


Figure 26 : Variation de l'activité de la glutathion-S-transférase (nmol/min/mg protéines) au niveau du cerveau des rattes témoins T, rattes gestantes control véhicule stressées CVS, rattes gestantes control stressées traitées à l'hespéridine CHS, rattes gestantes diabétiques stressées véhicule DVS, rattes gestantes diabétiques stressées traitées à l'hespéridine DHS.

Ns. : Différence non significative $p > 0.05$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$

DISCUSSION

4. DISCUSSION

Les aspects psychologiques et psychosociaux de la gestion des pathologies chroniques suscitent un vif intérêt. Cette évolution s'explique par l'accumulation des données scientifiques démontrant l'impact des troubles psychologiques sur les sujets atteints d'une dépression forment avec le diabète un complexe susceptible de modifier l'homéostasie interne de la glycémie et d'associer à plusieurs complications neuroendocrines incluant, une réduction des taux des monoamines cérébrales, une perte neuronale et une activité anormale de l'axe HPA (De Groot *et al* ., 2001).

Nos résultats ont mis l'accent sur la capacité de ce flavonoïde à restaurer les perturbations de la glycémie ce qui potentialisent l'hespéridine à lutter contre les altérations neurocomportementales et immunitaires reliées au diabète expérimental induit chez la ratte Wistar par la streptozotocine.

L'élévation très significative de la glycémie chez les lots diabétiques et diabétiques stressés témoigne de l'installation de la pathologie (Forde *et al* ., 2008) qui serait liée selon plusieurs recherches postérieurs au mode d'action de cet agent diabétogène sur les ilots de Langerhans β en réduisant la masse de ces cellules (Georg P et Ludvik B. 2000 ; Aughsteen A.A, 2000 ; Szkudelski.T, 2001 ; Chen et Ianuzzo, 1981). La SZT active l'expression de la protéine kinase C, protéine responsable de la déphosphorylation du récepteur de l'insuline (Divadoff *et al* ., 2004).

Cette hyperglycémie relevée, d'une part constitue un signal majeur qui stimule l'activité de l'axe Hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien dont la production hormonale excessive de la corticostérone causera une dépression des cellules immunitaires mononucléaires, polynucléaires et des plaquettes chez les rattes diabétiques (Medina-Sanchez et al, 1994 ; Auberval *et al* ., 2009). Plusieurs auteurs montrent également que l'hyperglycémie aigue est associée à une réduction de la réserve oxydative des leucocytes (Kwoun *et al* ., 1997).

Nos résultats mettent en évidence une perte de poids corporel des rattes Wistar rendues diabétiques par une injection intrapéritonéale de STZ (60 mg/kg de poids corporel).

Ces résultats rejoignent ceux de la littérature qui rapportent que l'injection intrapéritonéale de 35 mg/kg de poids corporel de streptozotocine provoque chez le rat Wistar une chute pondérale (Medina-Sanchez *et al* ., 1994).

De nombreuses études ont été effectuées afin de comprendre les différents facteurs de vie, contribuant dans le développement de l'anxiété, l'apparition de la dépression (*Pardon et Al* ., 2000 ; Gronli *et al* ., 2005 ; Brittney *et al* ., 2011 ; Shuichi *et al* ., 2012).

L'anxiété est un état de mauvaise adaptation qui empêche l'organisme à répondre adéquatement à son environnement (Leonardo & Hen, 2008). Le Labyrinthe en croix surélevé est couramment utilisé pour l'étude des comportements liés à l'anxiété chez les rongeurs (Torres C & Escarabajal, 2002). L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Les bras fermés représentent la sécurité, alors que les bras ouverts offrent une valeur exploratoire. Un animal anxieux aura naturellement tendance à préférer les espaces clos et sombres aux espaces ouverts et éclairés. Partant de ce principe, l'anxiété comportementale est mesurée par le degré d'évitement des espaces ouverts du labyrinthe. Un temps court passé dans les bras ouverts est considéré comme indice d'anxiété (Onaivi *et al* ., 1990 ; Lister, 1987; Pellow *et al* ., 1985).

Dans la présente étude, l'ensemble de ces complications associées au statut diabétique semble se percuter négativement sur le comportement explorateur et l'état anxieux des rattes diabétiques et diabétiques stressées durant la période gestationnelle. Ceci a été révélé par des tests comportementaux, à savoir le test d'Elevated plus maze (EPM) et l'Open field (OF).

Dans l'EPM, les rattes gestantes diabétiques et diabétiques stressées ont particulièrement montré une augmentation du temps passé dans les bras fermés avec une diminution du nombre d'entrées dans les bras fermés et ouverts qui indiquerait un état anxieux amplifié, attribué à l'hyperglycémie mais aussi un déficit d'apprentissage vis-à-vis de l'adaptation à cette tâche qui serait associée d'après plusieurs chercheurs à un processus de neurodégénérescence déclenché par le diabète et la formation d'espèces réactives d'oxygène ROS (Coyle et Puttefarcken ., 1993 ; Jenner et Olanow., 1996).

Dans l'OF aussi révélé que le temps passé dans la zone périphérique augmentait alors que le temps passé dans le centre du dispositif diminuait chez les femelles gestantes

diabétiques et diabétiques stressées. Cette hypoactivité locomotrice aigue est forcément liée à des dommages au niveau de la performance périphérique neuro-motrice et oculaire des rats diabétiques selon Wuarin et al., (1987). L'injection de la STZ chez les rats conduit à la présence des déficits du système nerveux périphérique, une autotomie des membres inférieurs ainsi qu'une rétinopathie en plus d'un ralentissement de l'influx nerveux signalé par Gispen et Biessels (2000).

Cette anxiété gestationnelle était aussi accompagnée de dérèglement hématologique dans l'organisme maternel. Plusieurs études tant chez l'animal que chez l'humain ont montré que le système immunitaire est impliqué dans l'apparition et le développement des troubles neurocomportementaux tel que la dépression et l'anxiété (Irwin, 1999).

Des expériences réalisées sur des souris immunodéficiences présentaient des désordres cognitifs au niveau du test aquatique de Morris. Ces effets ont été réparés après injection des lymphocytes T (Kipnis*et al* ., 2008).

Récemment, les agents hypoglycémiants des produits dérivant des plantes ont attiré l'attention des chercheurs puisque les sources végétales naturelles sont habituellement considérées comme moins toxiques, par rapport aux sources synthétiques (Sabu M C *et al* ., 2002).

L'administration orale de l'hespéridine s'est répercutée tardivement sur l'évolution glycémique gestationnelle.

Par ailleurs, l'évolution gestationnelle s'accordait avec une chute de la glycémie au jour 19 chez les rattes diabétiques traitées à l'hespéridine.

Cet effet hypoglycémiant lent, qui tendait à établir une normalisation pré-partum possible, a été auparavant constaté dans plusieurs contextes diabètologiques (Jung U J *et al* ., 2004 ; Scalbert *A et al* ., 2005 ; Okutan H *et al* ., 2005). En fait, l'hespéridine augmente l'activité de la glucokinase hépatique et maintient la concentration du glycogène dans cet organe tout en inhibant l'activité du glucose -6-phosphatase et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Jung U J *et al* ., 2006). De plus l'hespéridine stimule la sécrétion de l'insuline en faisant augmenter la concentration plasmatique du peptide-C et améliore la sensibilité périphérique à cette hormone chez les modèles animaux du diabète (Jung U J *et al* ., 2004).

Dans ce contexte, plusieurs études ont montré l'effet hypoglycémiant efficace des extraits de plusieurs plantes médicinales, telles *Indigofera arrecta* (Nyarko AK *et al* ., 1993), *Momordica*

charantia (Ali L *et al* ., 1993), *Cucurbita ficifolia* (Roman-Ramos R *et al* ., 2005) et *Vatairea macrocarpa* (Oliveira H C *et al* ., 2008). Cette constatation primaire de l'effet anti-diabétogène de l'hespéridine illustrait la capacité potentielle de ce principe actif à prévenir l'offensive d'une glucotoxicité maternelle chronique qui est à la base des aggravations physiopathologiques initiées par le stress oxydatif dit *glucodépendant*.

Les résultats de notre travail mentionnent une efficacité hiérarchique de l'hespéridine contre les différents niveaux des troubles causés par la maladie, et elle va intervenir au niveau moléculaire et cellulaire en corrigeant le statut hyper glycémique des rattes diabétiques traitées car elle possède une propriété anti-diabétogène, insulin-like (Akiyama S. *et al* ., 2010).

En effet, elle parvient à capturer les espèces réactives de l'oxygène ce qui est traduit par une protection de la composition hématologique en permettant une prévention contre la leucopénie et la thrombopénie. Les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzyme impliquée dans des voies importantes de la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et de la réponse immunitaire. Ils ont le pouvoir de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires dont les tissus musculaires et adipeux font partis, en inhibant l'apoptose de ces tissus, favorisant la glucagon-néogènèse et la glycogénolyse (Kim *et al* ., 2003), en conséquence empêcher les pertes du poids corporel des groupes traités.

Dans cette étude, le prétraitement à l'hespéridine a allégé les signes d'anxiété chez les rattes gestantes diabétiques et diabétiques exposées à un stress comme l'indiquent les résultats obtenus telles que l'amélioration de l'activité locomotrice et le nombre de redressement au cours du test EPM et OF.

Les rapports précédents ont démontré que l'hespéridine améliore le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM après traitement répété chez les rats (Wattanathorn *et al.*, 2007).

Dans l'organisme maternel, l'effet anxiolytique de l'hespéridine peut être expliqué par la modulation de certains récepteurs GABAergiques, en modulation qui est différente de la régulation classique des benzodiazépines (Goutman *et al* ., 2003 ; Lee *et al* ., 2005).

La présente étude a aussi démontré que l'anxiété est associée à un stress oxydatif, La relation entre les complications diabétologiques et le statut pro/antioxydant maternel constituait ces dernières années un parcours de recherche très étendu (Valko, M *et al* ., 2007).

Le diabète sucré est une maladie métabolique chronique qui touche 5 à 7% de la population mondiale (Singh and Kakkar, 2009 ; Zhou et al., 2009).

Il augmente la production des espèces réactives de l'oxygène et des radicaux libres qui causent le développement et la progression des complications diabétiques (Barbosa et al., 2008).

En ce qui concerne la glutathion-S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans l'intoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition aux radicaux libres (Hayes and Pulford, 1995).

L'augmentation de l'activité totale des GST hépatiques chez les lots diabétiques et diabétiques stressés non traités reflète la mobilisation des défenses anti-radicalaires dépendantes du GSH en réponse à un stress oxydatif intense. En outre, les mêmes tendances moléculaires ont été éprouvées dans le cœur suite à l'induction du diabète sucré expérimentale, ce qui indique que l'hyperglycémie chronique généraliserait la production des radicaux libres dans l'organisme insulino déprimé. .

GSH est un puissant antioxydant, important pour la protection cellulaire, la désintoxication des ROS, la conjugaison et l'excrétion des molécules toxiques (Brown et al., 2004).

Les résultats obtenus ont montré une diminution de la concentration du glutathion réduit hépatique (GSH) chez les rats diabétiques. Ceci est accordé par Sayed, (2012) qui a démontré une diminution de la concentration de GSH chez les rats diabétiques. La diminution des taux tissulaires de GSH chez les rats diabétiques a clairement suggéré son utilisation accrue par les cellules hépatiques qui pourrait être le résultat de la réduction de la synthèse ou du renforcement de la dégradation de GSH par l'augmentation du stress oxydant au cours de diabète (Furfaro et al., 2012), D'après (Jia A, 2009), le taux élevé de superoxyde et des radicaux libres, convertissent le GSH soit en glutathion oxydé ou en H_2S, ce qui provoque la diminution de taux hépatique du glutathion.

La supplémentation de l'hespéridine rétablit partiellement le niveau hépatique du GSH alors qu'elle atténue simultanément l'hyperactivité S-transférasique dans le foie. Ce qui nous pousse à considérer nos résultats comme positifs car l'administration des flavonoïdes était largement liée à une diminution des phénomènes oxydatives via des mécanismes mettant en jeu l'interférence de ces polyphénols avec le système enzymatique GSH-dépendants (Dastmalchi K *et al* ., 2008).

Dans ce sens, le pouvoir antioxydant de l'hespéridine a été évalué dans plusieurs contextes scientifiques dont elle protégeait les mésenchymes hépatiques contre le stress oxydatif induit par les molécules toxiques (Tirkey N *et al* ., 2005), atténuait sensiblement les désordres oxydatifs pulmonaires induits par la nicotine (Balakrishnan A et Menon V P, 2007). Par ailleurs, le rôle hépato-protecteur des flavonoïdes a été attribué non seulement à leurs capacités anti oxydantes qui dépendent de leurs structures chimiques privilégiées, mais aussi de leur pouvoir soupçonné à stimuler l'expression des gènes dépendants des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes, inspirant de cette action leurs effets hypoglycémiants efficaces. (Scalbert A *et al* ., 2002 ; Oh H *et al* ., 2004 ; Zang M *et al* ., 2006).

Par ailleurs, l'évaluation de l'état antioxydant du cerveau chez les rattes stressées nous a permis de distinguer que l'hespéridine réduisait l'activité de la GST et augmentait le niveau de GSH réduit par rapport aux femelles recevant la STZ et exposées à un stress.
Il est largement connu que l'hespéridine est un antioxydant efficace. Néanmoins, l'ampleur de cette efficacité suite à un traitement à la STZ n'a pas encore été explorée au tissu cérébral.
Nos résultats montrent clairement que l'hespéridine rétablie le statut oxydatif cérébral.

Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que l'administration de l'hespéridine à 0.12% par voie orale aux souris diabétiques gestantes exerçait des effets hypoglycémiants prononcés au détriment d'une insulinodéficience expérimentale, contribuait au rétablissement d'une bonne répartition énergétique maternelle adaptative et réduisant fortement le stress oxydatif cardio-hépatique et cérébral. En fait, les flavonoïdes agissent sur le système nerveux central en possédant des propriétés sédatives et dépressinogènes (Fernandez S P *et al* ., 2006), se comportent à forte doses comme agents pro-oxydant délétères (Rietjens I M C M *et al* ., 2002), exercent des effets paradoxaux au niveau des matrices extracellulaires (Mustata G T *et al* ., 2005) et jouent un rôle ambigu dans les interactions médicamenteuses (Brand W et al.,

2006). Ce qui exige des précautions rationnelles à propos de leur consommation quotidienne et leur emploi en thérapeutique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le diabète est une pathologie grave qui est liée au développement d'une multitude de complications neuro-immunitaires et métaboliques dont le stress oxydatif. Situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (cancers, déficits immunitaires, maladies neurodégénératives…).

Le but de cette étude était de trouver de nouvelles approches thérapeutiques dans la prévention des altérations physiopathologiques et comportementales, en diminuant le stress oxydant associé à cette pathologie. Pour cela, nous avons utilisé l'hespéridine, un antioxydant naturel qui s'intègre facilement au régime alimentaire quotidien de l'homme.

En outre, nous avons mis en évidence le rôle protecto-réparateur de l'hespéridine vis-à-vis de ces complications induites dans notre étude par une injection de la STZ. Les résultats obtenus prouvent que ces molécules stimulent les réponses réparatrices de l'organisme en limitant les dommages causés par l'oxydation cellulaire tout en modulant l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA).

A partir de ces résultats, il serait souhaitable

- ✓ D'évaluer les effets des troubles comportementaux liés aux complications du diabète sur les fonctions neuroendocriniennes et immunitaires en valorisant par des dosages hormonaux (l'œstradiol, progestérone et prolactine) et des cytokines (les interleukines *IL* 1et 6, le facteur de nécrose tumorale *TNF-α* et l'interféron *IFN-γ*)

- ✓ Tester le pouvoir anxiolytique et antioxydant d'autres molécules actives telles que, la cannelle, le curcumin, le resvératrol chez la progéniture.

- ✓ Evaluer les effets anti-tératologiques de l'hespéridine.

- ✓ Déterminer l'efficacité de l'hespéridine sur la dépression à l'aide du test de la nage forcée et évaluer le degré d'anxiété et de la perte de la mémoire associée au diabète en utilisant d'autres tests de comportement éventuellement le test de Morris.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abidi P, Aaq F, Arif JM, Lohani M, Rahman Q (1999) Chrysotile-mediated imbalance in the glutathione redox system in the developement of pulmonary injury *Toxicol Lett* 106 : 31-39.

Akiyama S, Katsumata S, Suzuki K, Ishimi Y, Wu J, Uehara M (2010) Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. J Clin Biochem Nutr. 46 (1):87-92.

Ali L, Khan A K, Nahar N, Rokeya B, Mamun M I et Nur-e-Alan M (1993) studies on the hypoglycaemic effects of fruit pulp, seed and the whole plant *of Momordica charantia in normal and diabetic model rats Planta Medica* 59: 408-412

American Diabetes Association (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **35**: S64-S71.

Association canadienne du diabète. (2008). Lignes directrices de pratique clinique pour la prévention et le traitement du diabète au Canada. *Canadian Journal of Diabetes* **32:** 1.

Auberval N., Langlois A., Bietiger W., Fougerousse A., Belcourt A., Jeandidier N., Pinget M et Sigrist S (2010) P 255 mesures du p H et du rH2 du sang de rat par la méthode bioélectronique de Vincent. Diabetes & Metabolism. 35 (1): A87

Aughsteen AA (2000) An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans inmice. J of Electron Microscopy 49 (5): 681-690.

Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth RH (1980) The laboratory Rat, Vol 2 Research Application Acadimic press. New York, NY.

Balakrishnan A et Menon V P (2007) effect of hesperidin on matrix metalloproteinases and antioxidant status during nicotine-induced toxicity *Toxicology* 238: 90-98

Barbosa, N.B., Rocha, J.B., Soares, J.C., Wondracek, D.C., Goncalves, J.F., Schetinger, M.R., Nogueira, C.W. (2008). Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* **46** (1): 186-94.

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*.

Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochemn* 72 :248-254

Brand W., Schutte M E, Williamson G, Van Zanden J J, Cnubben N H P, Groten JP, Van Bladern P J et Reitjens I M C M (2006) Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may effect the oral bioavailability of drugs, foof-borne toxic compounds and bioactive ingredients *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60: 508- 519

BressonD, von Herrath, M (2007). Moving towards efficient therapies in type 1 diabetes : to combine or not to combine ? *Autoimmunity Review* 6:315-322

Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K, (2005) Mouse models of diabetic nephropathy *J Am Soc Nephrol* 16 : 27-45

Brittney M, Coxa FA, Peter C, Neilla Mc, Matthew P, Gallowaya b, Shane A, Perrine A, (2011) Neurochemical, hormonal, and behavioral effects of chronic unpredictable stress in the rat .*Behavioural Brain Research*. 220, 106–111

Browne RW, Bloom MS, Schisterman EF, Hovey K, Trevisan M, Wu C, Liu A, Wactawski-Wende J, (2008) Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers* **13** (2): 160-83.

Brown, L.A., Harris, F.L., Ping, X.D., Gauthier, T.W. (2004). Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: A role for glutathione availability. *Alcohol* **33**: 191-197.

Buchanan, T.A., Xiang, A.H., Page, K.A. (2012). Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. *Nat. Rev. Endocrinol*. **8** (11): 639-649.

ChenV and Ianuzza CD (1981) Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can J Physiol Pharmacol*. 60:1251-1256.

Claeyssen R (2009) Zinc et brûlure : Etude du statut en zinc et de l'influence de la supplémentation sur un modèle animal de brûlure sévère. Approche métabolique et moléculaire. Thèse de doctorat, Ingénierie pour la sante, la cognition et l'environnement. *Grenoble*.

COPIL PRSP MCV (2009). Le Diabète. CHU service endocrinologie, maladie métaboliques. pp :1-16.

Coste TC, Armand M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T, (2007). An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clin. Biochem*. 40: 511-520.

Coyle J T, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. Science. 262 (5134): 689-95

Claeyssen, R. (2009). Zinc et brûlure : Etude du statut en zinc et de l'influence de la supplémentation sur un modèle animal de brûlure sévère. Approche métabolique et moléculaire. Thèse de doctorat, Ingénierie pour la sante, la cognition et l'environnement. *Grenoble*.

Daneman D (2006) Type 1 diabetes. Lancet Serminer Division of Endocrinology, Department of Paediatrics, Hospital for Sick Children and University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5G 1X8 367: 847–58

Dastmalchi K, Dormana H J D, Oinonena PP , Darwis Y , Laakso I, Hiltunen R (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of lemon balm (Melissa *officinalis* L) extract *LWT* 41: 391-400

Davidoff AJ, Davidson MB, Carmody MW, David ME and Ren J (2004). Diabetic cardiomyocyte dysfonction and myocyte insulin resistance: role of glucose-induced PKC activity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 262: 155-163.

De Groot M, Anderson R, Freedland K E, Clouse R E, Lustman P J. (2001) Association of depression and diabetes complications: a meta analysis. Psychosom Med 3 (4): 619-630

Delattre, J., Beaudeux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales. Paris. pp :1 - 405.

Denis, U. (2002). Etude pharmacologique de la voie de signalisation impliquée dans l'apoptose des péricytes rétiniens induite par les produits avancés de glycation (albumine bovine modifiée par le méthylglyoxal). Thèse de doctorat, L'institut National des Sciences Appliquées. *Lyon I.*

Draper HH, Hadley M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth Enzymol;186:421-31.

Ellman GL (1959). Plasma antioxidants. Arch. Biochemistry and Biophyisics 82 : 70-77

Filaire E, Toumi H (2012). Rôle des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'exercice physique sur le métabolisme osseux: amis ou ennemis ?. *rhumatisme* **79** : 387-392.

Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*. **36** : 327-358.

Frode TS and Medeiros YS (2008). Animal models o test drugs with potential antidiabetic activity *Journal of Ethnopharmacology* 155: 173-183

Fernandez S P, Wasowki C, Loscalzo L M, Granger R E, Johnston G A R, Paladini A C et Marder M (2006) central nervous system depressant action of flavonoid glycosides *European Journal of Pharmacology*. 539: 168-176

Filaire, E., Toumi, H. (2012). Rôle des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'exercice physique sur le métabolisme osseux: amis ou ennemis ?. *rhumatisme* **79** : 387-392.

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*. **36** : 327-358.

Fontaine, É. (2007). Radicaux libres - Stress oxydatif. *Cah. Nutr. Diét.* **42** : 2.

Furfaro, A.L., Nitti, M., Marengo, B., Domenicotti, C., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N. (2012). Impaired synthesis contributes to diabetes-induced decrease in liver glutathione. *Molecular Medicine* **29**: 899-905.

Gallagher, M.P., Goland, R.S., Greenbaum, C.J. (2011). Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **1243** : 119-134.

Georg P and Ludvik B (2000). Lipids and diabetes *Journal of Clinical and Basic Cardiology* 3:159-162.

Ghosh S, Rodrigues B (2006) Cardiac cell death in early diabetes ans its modulation by dietary fatty acids *Biochimica et Biophysia Acta* 1761 :1148-1162

Gispen WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci 23(11): 542

Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T, Kanazaw K (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2′-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine* **45**: 1318-1325.

Goutman JD, Waxenberg MD, Donate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ (2003) Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA (A) and GABA (C) receptors. Eur J Pharmacol 461: 79-87

Gronli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM (2005). Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. Physiol Behav 84, 571–7.

Haeser A da S, Sitta A, Barschak A G, Deon M, Barden AT, Schmitt GO, Landgraff S, Gomez R, Barros HMT, Vergas CR (2007) Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test : the clonazepam effect Brain Research 1154 : 137-143

Habig WH, Pabs MJ, Jacobi WB. (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation *J Biol Chem* 249: 137-143.

Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat. *J Comp Physical* 18 : 385-403

Halliwell B, Gutteridge J (2007). Free radicals in biology and medicine. 4th edn. New York: Oxford Univ. Press Inc. p: 187.

Handley SL, Mithani S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a mazeexploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 327, 1-5.

Hayes, J.D., Pulford, D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 445-600.

Hiramatsu Y, Sekiguchi N, Hayashi M, Isshiki K, Yokota T, King GL, Loeken MR (2002) Diacylglycerol production and protein kinase C activity are increased in a mouse model of diabetic embryopathy Diabetes 51: 2804-2810

Hiroo Amano, Izumi Negishi, Hiroshi Akiyama and Osamu Ishikawa (2008). Psychological Stress can Trigger Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice: An Inhibitory Effect of Corticotropin-Releasing Factor ;*Neuropsychopharmacology* 33, 566–573

Jia A (2009). Evaluation of in vivo antioxidant activities of Ganoderma lucidum polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chemistry* **115** (1): 32-36.

Irwin M. Immune correlates of depression (1999). Adv Exp Med Biol;461:1–24.

Issac JP, Wurch TA (1966) A new technique for the differential coloration of vaginal smears The Lancet 1:1210-1212

Jenner P., Olanow CW (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of parkinson's disease. *Neurology* 47: S161-S170

Jin H, Ogino K, Fujioka T, Yoshida M, Ishimaru,K (2008). New acylphloroglucinol glycocide from solidago altissima L.J Nat Med Apr 62(2):199-201

Jung U J., Lee M-K, Jeong K-S et Choi M S (2004) The Hypoglycemic effects of Hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice *J Nutr* 134: 2499-2503

Jung U J., Lee M-K, Park Y B, Kang M A et Choi M S (2006) Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme m RNA levels in type 2 diabetic mice *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28: 1134-1145

Kamal A, Biessels GJ, Duis SE, Gispen WH (2000) Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats : interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia* 43 (4) : 500-6

Kim H K, Jeong T-S, Lee M-K, Park Y B et Choi M S (2003) Lipid-lowering efficacy of hesperidin metabolites in high-cholesterol fed rats *Clinica Chimica Acta* 327: 129-137

Kipnis J, Derecki NC, Yang C, Scrable H. (2008) Immunity and cognition/what do age-related dementia,HIV-dementia and 'chemo-brain' have in common?. Trends Immunol 29(10) : 455-63.

Kirschvink N, De Moffarts B, Lekeux P (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary* **177**: 178–191.

Kobayashi S, Tanabe S, Sugiyama M, Konishi Y (2008) Transepithelial transport of hesperetin and hesperedin in intestinal Caco-2 cell monolayers *Biochimica et biophysica Acta* 1778 : 33-41

Koolman J, Rohm KH (1999). Atlas de Poche de Biochimie. *Flammarion*: Paris. p : 462.

Kwoun M O, Ling PR, Lydon E (1997) Immunologic effects of acute hyperglycemia innondiabetic rats *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 21: 91-95

Lamprecht M, Greilberger J, Oettl K (2004). Analytical aspects of oxidatively modified

substances in sports and exercises. *Nutrition* **20** (7-8): 728-730.

Langerhans P, (1869) Uber die nerven der menschlichen haut. Archives of Pathological Anatomy ;44:325–37.

Lee BH, Jeong SM, Chang CG, Kim HC, Han Y, Paik HD, Kim Y, Nah SY (2005) hesperidin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor- mediated ion current by interacting with pre-transmembrane domain 1. Mol Cells 20: 69-73

Lecompte, S (2012). Etude du rôle du gène PROX1 dans le diabète de type 2. Thèse de doctorat, Sciences de la Vie et de la Santé. *Lille 2*.

Leonardo E.D. & Hen R., 2008. Anxiety as a developmental disorder. *Neuro psycho pharmacology*. **33:** 134-140.

Li R, Thorens B, Loeken MR (2007) Expression of the gene encoding the high-km glucose transporter 2 by the early postimplantation mouse embryo is essential for neural tube defects associated with diabetic embryopathy *Diabetologia* 50 : 682-689

Lister R.G., **1987**. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. **92:** 180-185.

Mac Laren D (2007). Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.

McKenzie, R.C., Arthur, J.R., Beckett, G.J. (2002). Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxid. Redox Signal*. **4** (2): 339-351.

McLetchie, N.G.B. (2002). Alloxan diabetes: A discovery, albeit a minor one. *R. Coll. Physicians Edinb*. **32**: 134-142.

Medina –Sanchez M., Barneo-Serra L., Menendez-Peaz A., and Martinez-Esteban M (1994) Effects of streptozotocin induced diabetes and islet transplantation in proximal skeletal muscle and histochemical and morphometric analysis. *J.Lab. Clin .Med* 123: 921-929

Montgomery KC (1955). The relation on skip between fear induced by novel stimulation exploratory behaviour.*J.comp.physio*. 48 :254-260.

Mustata G T, Rosca M, Biemel K M, Reihl O, Smith M A, Viswanathan A, Strauch C, Du Y, Tang J, Kern T S, Lederer M O, Brownlee M, Weiss M F et Monnier V M (2005) Paradoxial effects of green tea (Camellia Sinensis) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mithochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycoxidation and cross-linking *Diabetes* 54: 517-526

Nielsen ILF, Chee WSS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen SE, Frederiksen H, Enslen M, Barron D, Horcajada M-N, Williamson G (2006) Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans : A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial *J Nutr* 136 : 404-408

Nyarko A K, Asare-Anane H, Ofosuhene M et Addy M E (2002) Extract of Ocimum canum lowers blood glucose and facilitates insulin release by isolated pancreatic beta-islet cells *Phytomedecine* 9: 346-351

Oh H, Kim D-H, Cho J-H et Kim Y-C (2004) Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense Journal of Ethnopharmacology* 95: 421-424

Okutan H, Ozcelikb N, Yilmazb HR et Uzb E (2005) Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart Clin Biochem 38: 191-196

Oldroyd J, Banerjee M, Heald A (2005). Diabetes and ethnic minorities. *Postegrad Med J* 81 : 486-490

Oliveira H C, dos Santos M P, Grigulo R, Lima L L, Martins D T O, Lima J C S, Stoppiglia L F, Lopes C F et Kawashita N H (2008) Antidiabetic activity of Vatairea macrocarpa extract in rats *Journal of Ethnopharmacology* 115: 515-519

Omari N, Dahmani-aït akli Y, Labrousse F, Hadj bekkouche F (2011). Influence of the streptozotocin on the corticotrope axis of the Wistar rat (Rattus norvegicus) 80 : 907- 938

Onaivi E.S., Green M.R., Martin B.R., 1990. Pharmacological characterization of cannaboids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther*. **253:**1002-1009.

Ornoy A (2007) Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy Reproductive Toxicology 24 : 31-41

Pardon MC, Gerardin P, Joubert C, Perez-Diaz F, Cohen-Salmon C (2000). Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal care behavior in mice. *Biol Psychiatr* 47,858–63.

Park HJ, Kim M-J, Ha E, Chung J-H (2008) Apoptotic effect of hesperidin through caspase activation in human colon cancer cells, SNU-C4 Phytomedicine 15 : 147-151

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985**)**Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14(3), 149-167.

Patin V, Lord B, Vincent A, Caston J (2005) Effect of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats Dev Brain Res 160 : 265-74

Pinto RM, Fernandes ES, Reis JEP, Peters VM, Guerra M de O (2007) Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* to rats *Reproductive Toxicology* 23 : 480-485

Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL (2008). Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq. Bras. Endocrinal. Metabol*. **52** (2): 156-165.

Portha B(1974). In: noninsulin-dependent diabetes mellitus. Dr Fatalis CR. Raynal AFP. Paris.

Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB (2010). Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *Sport Nutrition and Exercise Metabolism* **20**: 2-14.

Reece EA, Ma D-X, Zhao Z, Wu KY, Dhanasekaran D (2005) Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats. Apoptotic pathways Am *J Obstet Gynecol 194 : 967-972*

Reece EA, Ma D-X, Zhao Z, Wu KY, Dhanasekaran D (2006) Dietary vitamin and lipid therapy rescues aberrant signalling and apoptosis and prevents hyperglycemia-induced diabetic embryopathy in rats. Am *J Obstet Gynecol* 194 : 580-585

Rietjens I M C M, Boersma M G, de Haan L, Spenkelink B, Awad H M, Cnubben N H P, Van Zanden J J, Van der Woude H, Alink G M et Koeman J H (2002) The pro(oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 321-333

Roman –Ramos R, Alarcon-Aguilar F, Lara-Lemus A et Flore Saenz J L (1992) Hypoglycaemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics *Archives of Medicinal Research* 23: 59-64

Roy V (2002**).** Contribution a l'etude de conduites emotionnelles chez le rat : utilisation du handling prostnatalet et de l'approche ethoexperimental du comportement, these de doctorat universite de Rouen, France.

Sabu M C, Smitha K, Ramadasan K (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes *Journal of Ethnopharmacology* 83 : 109-116

Saha, S.k., Haque, E., Islam, D., Matiar, R., Islam, R., Parvin, A., Rahman, S. (2012). Comparative study between the effect of Momordica charantia (wild and hybrid variety) on hypoglycemic and hypolipidemic activity of alloxan induced type 2 diabetic long-evans rats. *Diabetes Mellitus* **2** (1): 131-137.

Santos J, Yang P-C, Benjamin M (2000). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat **48**:630–636

Scalbert A, Johnson I T et Saltmarsh M (2005) polyphenols: antioxidants and beyond *Am J Clin Nutr* 81: 215S-217S

Scalbert A, Morand C, Manach C et Rémésy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health *Biomed Pharmacother* 56: 276-282

Schoenle EJ, Schoenle D, Molinari L, Largo RH.(2002) Impaired intellectual development in children with Type I diabetes: association with HbA(1c), age at diagnosis and sex. Diabetologia 45: 108-114

Schwartz R, Teramo KA (2000) Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn *Seminars in Perinatology* 24(2) : 120-135

Shuichi C, Tadahiro N, Midori N, Misty C R, Chisato W, Hiroshi K. (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry* 39, 112-119.

Singh, J., Kakkar, P. (2009). Antihyperglycemic and antioxidant effect of Berberis aristata root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. *Ethnopharmacol*. 123(1): 22-6 doi:10.1016/j.jep.02.038.

Sáenz JCB, Villagro OR, Trias JF *(2006) Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. Behav Brain Res 169 : 57-65*

Sayed, A.A. (2012). Ferulsinaic acid modulates SOD, GSH, and antioxidant enzymes in diabetic kidney. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **58**:01-04.

Szkudelski T, Szkudelska K (2002). Streptozotocin induces lipolysis in rat adiposytes in vitro. *Phys Res* 51 : 255-259

Szkudelski T, (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*. **50** (6): 537-546.

Thierry R (2007) Anatomie comparée des animaux de laboratoire

Tirkey N, Pilkhwal S, Kuhad A, Chopra K (2005). Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney BMC Pharmacol 5(1) : 2

Toumi ML, Merzoug S, Boutefnouchet A , Tahraoui A, Ouali K, Guellati, MA (2009). Hesperidine, a natural citrus flavanone, alleviates hyperglycaemic state and attenuates embryopathies in pregnant diabetic mice. *Journal of Medicinal Plans Research* Vol. 3(11), pp. 862-869

Torres C ., Escarabajal M. D., 2002. Validation of a behaviora recording utomated system in the elevated plus-maze test. *Life Sciences*. **70:** 1751-1762.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease The International *Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 : 44-84

Vivot, K. (2012). Identification des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la perte précoce des ilots pancréatiques au cours de la transplantation. Thèse de doctorat, Centre Européen d'étude de Diabète. *Strasbourg*.

Wang Z, Hoy WE (2004) Body size measurements as predictors of type 2 diabetes in Aboriginal people *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 : 1580-1584

Wattanathorn J, Phachonpai W, Pri prem A, Suthiparin Yanout S, (2007) Intranasal administration of hesperidin liposome decreases anxiety-like behavior and increases spatial memory. *Am J Agric .Biol Sci* 2 (1): 31-5

Weekbecker G, Cory JG (1988) Ribonucleotide reductase activity and growth of glutatione-depleted mouse leukemia L 1210 cells *in vitro Cancer Letters* 40 : 49-53

White FR (1963) Streptozotocin *Cancer Chemother* 30 : 49-53

Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress *Current Opinion in Plant Biology* 5 : 218-223

Wuarin-Bierman L, Zahnd GR, Kaufman F, Burcklen L, Adler J, (1987) hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy.

Zang M, Xu S, Maitland-toolan K A, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren T J et Cohen R A (2006) Polyphenols stimulate AMP –activated protein kinase, lower lipids and inhibt accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor deficient mice *Diabetes* 55: 21801-2191

Zhou, I., Zhou, S., Tang, J., Zhang, K., Guang, L., Huang, Y., Xu, Y., Ying, Y., Zhang, L., Li, D. (2009). Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin and high-carbohydrate/ high-fat diet-induced diabetic rats. *European Pharmacology* **606**: 262-268.

ANNEXES

Available online on www.ijtpr.com
International Journal of Toxicological and Pharmacological Research 2015; 7(5); 256-258

ISSN: 0975-5160

Research Article

Influence of Flavonoid-Rich Fruit and Vegetable Intake on Diabetics-Related Biomarkers

Chouba Ibtissem*, Nessaibia Issam, Faci Hayette, Hamri Ahlem,Tahraoui Abdelkrim

Laboratory of Neuro- endocrinology Applied, Departement of Biology, Faculty of Science, University Badji Mokhtar 23000, Annaba, Algeria

Available Online :6th August, 2015

ABSTRACT

Our problem is to evaluate the behavioral effects of infection and combination diabetes - infection in pregnant rats and the protective effect of an antioxidant on neurobehavioral alterations and complications. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 60 mg / kg.

The administration of stresozotocine which is revealed, on one hand, the effects of of a single STZ i.p. injection on anxiety- and depression-like behaviors, brain oxidative status and immune response in adult wistar rates, and the other hand the protective role of antioxidant (Hesperidin) on STZ-induced disorders.

The hesperidins, a natural flavonoid was administered orally (gavages) at a dose of 100 mg / kg. This administration after WAS oxidative brain status showed an increase in glutathione-S-transferase (GST) activity and a decrease in reduced glutathione (GSH).

Key word: Diabetes, GHS, GST, Hesperidin, Oxidative stress

INTRODUCTION

Diabetes is a serious disease that is linked to the development of a multitude of neuro-immune and metabolic complications including oxidative stress. Location researchers involved in most human diseases (cancer, immune deficiencies, neurodegenerative diseases ...).

To investigate the etiology of the disease and because of the Gravitee its many metabolic and neurodegenerative effects in 1974 Portha[1] established diabetes in rats clinically by administration of streptozotocin, a substance that has selective toxicity on β cells of the islets of Langerhans in the endocrine pancreas thereby inducing insulin-dependent diabetes[2]. Flavonoids are powerful antioxidants that may inhibit the formation of free radicals and to oppose the oxidation of macromolecules reporting to the efficacitée several medicinal plants as natural anti-diabetic[3]. In this context our study is to explore the involvement of oxidative stress in diabetic pathology rated the antioxidant power hesperidin on oxidative stress in pregnant rats apply.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The biological material base that we have chosen is the rat Rattus rattus of the Wistar strain from Pasteur Institute in Algiers. The rats are nocturnal mammals of the order of rodents. Upon their arrival, the rats weighed an average of 180 grams, and at the time of the experiment, they weighed on average 250 ± 20 grams. The rats were acclimated under standardized conditions of natural photoperiod, an average temperature of 22 ± 4 ° C and humidity of 50-70%. After an adaptation period of three weeks , we have selected 25 females based on weight which we separated into five experimental groups each include five rats control group T, vehicle stress control CSV lot , lot control stress treated hesperidin CSH ,Lot diabetic stress vehicle DSV lot diabetic stress treated hesperidin DSH .

Treatment of Animals

Administration of streptozotocin

Streptozotocin (STZ) is a chemical commonly used in animal models for the study of diabetes[4]. Diabetes was

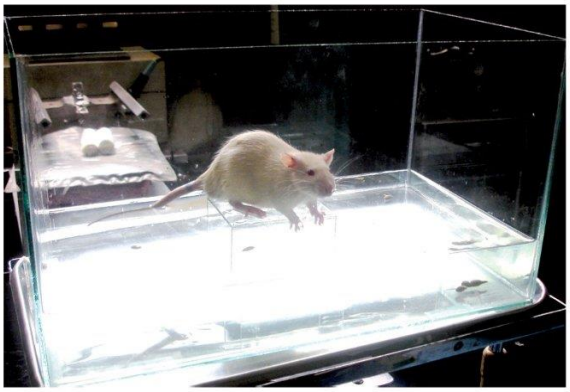


Figure 1 : WAS conditions. A mouse was placed on a glass platform located in the middle of a plastic container filled with water up to 1 cm below the level of the platform. The mouse on the platform cannot escape even if it jumps.

**Author for Correspondence*

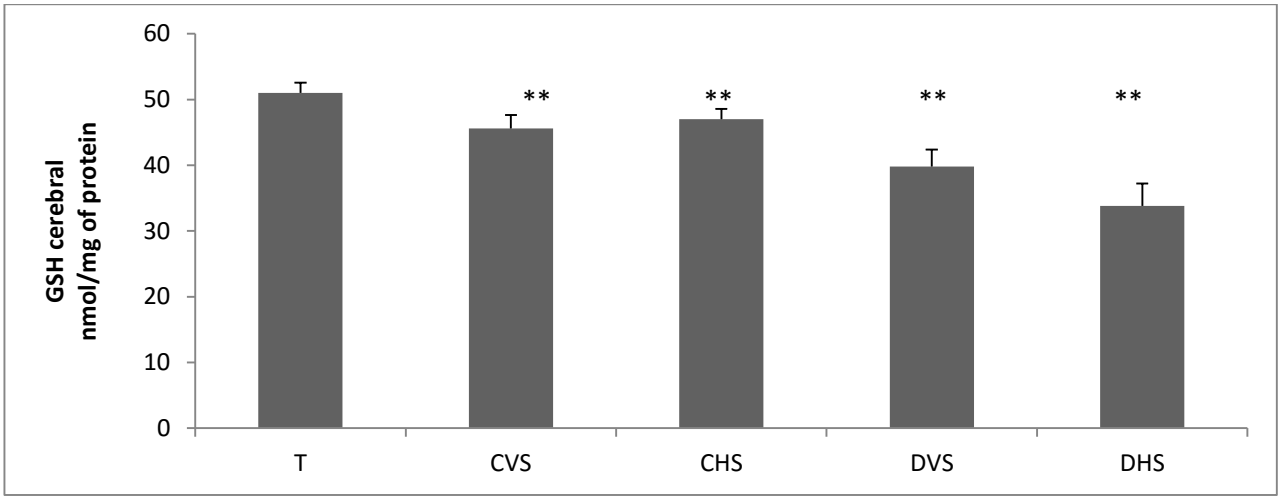


Figure 2: Variation of the concentration of cerebral GSH nmol / mg protein
Ns. : non significant difference P > 0.05 ; *P < 0.05 ; **P < 0.01; ***P < 0.001

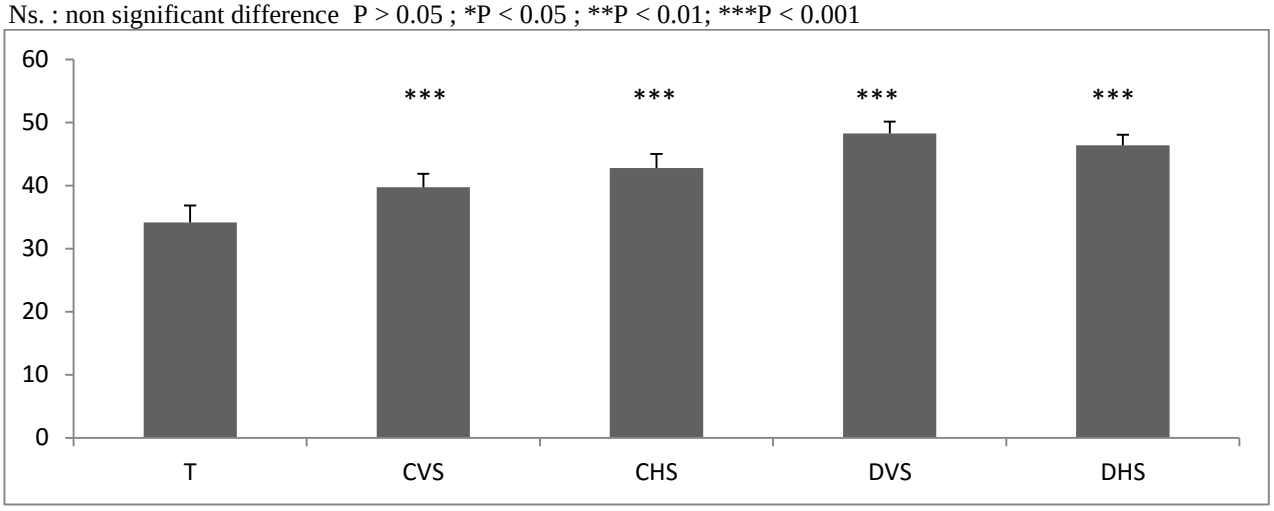


Figure 3: cerebral activity variation of GST in µmol/min/mg of proteins
Ns: Non significant difference P > 0.05 ; *P < 0.05 ; **P < 0.01; ***P < 0.001

induced in rats by intraperitoneal injection of STZ (Sigma Lowis ST, Mo) at a dose of 60 mg / kg body weight[5] dissolved in a 0.1M sodium citrate buffer pH 4.5.

Administration of hesperidin

Administration is by gastric gavages of rats to a high dose of 100 mg / kg body weight. Treatment with vehicle or the antioxidant Nacl for controls begin 72 hours after the induction of diabetes and it is for three days (15th , 17th and 18th day gestational).

The Stress Model (WAS Protocol)

WAS as reported by Santos et al (2000) [6]was chosen as the model of psychological stress. WAS consisted of placing a mouse for 1 h on a glass platform (height from floor, 11 cm; diameter, 7cm) located in the middle of a plastic container (60_58cm) filled with sterile water up to 1 cm below the level of the platform .

Determination of reduced glutathione (GSH)

The assay of GSH is based on the colorimetric method of Ellman[7]. The principle is based on the oxidation reaction of GSH with acid 5, 5'- dithiobis - 2 nitrobenzoic acids (DTNB) and releasing the absorbent at 412 nm thionitrobenzoic acid (TNB). For this assay , one gram of organ was homogenized in three volumes of 5 % TCA using a mill and then centrifuged at 1000 revs / min . 50 mu.l of supernatant are diluted in 10 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 8). To 3 ml of the dilution mixture, 20 .mu.l DTNB (0.01 M) are added, the absorbance measurement is obtained at a wavelength of 412 nm.

Determination of glutathione S - transferase (GST)

The measurement of the overall GST acivité is to provide to the various isoenzymes CDNB chlorodinitrobenzene. The CDNB readily reacts with GSH to form an enzymatically light at 340 nm absorbing conjugate. The value of the optical density is proportional to the bound GST activity[8]. son procedure is to mix 840 mu.l phosphate buffer (100 mM , pH 6.5), 50 mu.l CDNB , 10 .mu.l sample then add 100 µ GSH. The measurement of the enzymatic activity was performed for 5 minutes. The concentration of proteins in each organ was determined by the method of Bradford M[9] by using a calibration curve previously made by means of bovine serum albumin (BSA).

Statistical analysis of results

Results are presented as mean ± SEM and shown in histograms. A comparison test was used medium. The test

T of Student with the MINITAB program for comparing two averages.

RESULTS

Cerebral Content Of Reduced Glutathione (Gsh) In Pregnant Rats

The results showed a very significant ($P < 0.01$) in glutathione content in diabetic rats vehicle stress and significant increase ($P < 0.01$) contribution to the controls stress.(Fig. 2)

Measuring the cardiac activity of glutathione S-transferase (GST) in pregnant rats

The results indicate a very significant increase ($P < 0.001$) in GST concentration in diabetic rats stress treated with vehicle and hesperidin by contribution to controls stress. (Fig.3)

DISCUSSION

Our experimental study focused on properties that potentiate hesperidin fight against neuro behavioral alterations in rats of Wistar diabetic pregnant.

The relationship between complications and pro status / maternal antioxidant in recent years was a journey of extensive research[10]. Our results have showed a highly significant decrease in cerebral reduced glutathione (GSH) in diabetic pregnant rats. It is ubiquitous tripeptide core network of the cellular antioxidant which includes a series of enzymatic systems scavengers, such as that of glutathione S-transferase (GST)[11]. The increase in total activity of cerebral GST in the untreated diabetic lot reflects the mobilization of anti-radical defenses dependent GSH in response to intense oxidative stress, indicating that chronic hyperglycemia generalize the production of free radicals in the body. Supplementation of hesperidin partially restores the cardiac GSH levels while simultaneously attenuates hyperactivity S-transferase in cerebral organs.

What prompts us to consider our results as positive for the administration of flavonoids was largely due to a decrease in oxidative phenomena via mechanisms involving the interference of these polyphenols with GSH-dependent enzyme system[12]. In this sense, the antioxidant power of hesperidin has been evaluated in several scientific contexts in which it protected the liver mesenchymal against oxidative stress induced by toxic molecules[13].

CONCLUSION

This crucial issue to which we are interested, is summed up in the fact that the induction of experimental diabetes mellitus in pre-pregnant female mice causes 72h after a disturbance of the biochemical metabolism and causes a state of oxidative stress that is shown, on the one hand, by increasing the activity of glutathione-S-transferase (GST) with a strong cellular uptake of reduced glutathione (GSH) in cerebral organs of maternal bodies. hesperidin appears to prevent the complications of diabetes through an effective antioxidant effect.

REFERENCES

1. Portha, B.,1974. In: noninsulin-dependent diabetes mellitus. Dr Fatalis CR. Raynal AFP. Paris
2. Omari, N., Y. Dahmani-aït akli, F Labrousse and F.Hadj bekkouche , 2011.Influence of the streptozotocin on the corticotrope axis of the Wistar rat (Rattus norvegicus)., 80,907- 938
3. Toumi, M.L., S. Merzoug, A Boutefnouchet, A. Tahraoui, K Ouali and M.A.Guellati, 2009. Hesperidine, a natural citrus flavanone, alleviates hyperglycaemic state and attenuates embryopathies in pregnant diabetic mice. Journal of Medicinal Plans Research Vol. 3(11), pp. 862-869
4. Frode, T.S and Y. S. Medeiros, 2008. Animal models o test drugs with potential antidiabetic activity Journal of Ethnopharmacology., 155, 173-183.
5. Akbarzadeh, D., M. Norouzian, R. Mehrabi, Sh, Jamshidi., A. Farhangi, A. Allah Verdi, S. M. A. Mofidian and B. Lame Rad, 2007 . Induction of diabetes by Streptozotocin in rats Indian J Clin Biochem., 22(2), 60–64.
6. Santos J, Yang PC, So¨derholm JD, Benjamin M, Perdue MH (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. Gut 48: 630–636.
7. Ellman, G. L.,1959. Plasma antioxidants. Arch. Biochemistry and Biophyisics., 82, 70-77.
8. Habig, W H., M. J. Pabs and W. B. Jacobi, 1974. The first enzymatic step in mercapturic acid formation J Biol Chem., 249, 137-143
9. Sabu M C, Smitha K, Ramadasan K (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes *Journal of Ethnopharmacology* 83: 109-116
10. Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncola, M.T. D Cronin, M Mazura and J. Telser, 2007. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease The International Journal of Biochemistry & Cell Biology., 39, 44-84
11. Abidi, P., F. Aaqq, J M. Arif, M Lohani and Q. Rahman, 1999. Chrysotile-mediated imbalance in the glutathione redox system in the developement of pulmonary injury Toxicol Lett., 106, 31-39
12. Dastmalchi, K., H. J. D. Dormana, P.P. Oinonena, Y Darwis, I Laakso and R . Hiltunen, 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of lemon balm (Melissa officinalis L) extract LWT., 41, 391-400
13. Tirkey, N., S. Pilkhwal, A Kuhad and K. Chopra, 2005. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney BMC Pharmacol., 5(1), 2

World Journal of Medical Sciences 12 (1): 45-48, 2015
ISSN 1817-3055
© IDOSI Publications, 2015
DOI: 10.5829/idosi.wjms.2015.12.1.9290

Impact of Oxidative Stress in Diabetic Pregnant Rats Strain Wistar Treated by Hesperidin

Chouba Ibtissem, Nessaibia Issam, Kaarer Narjess, Ferhati Habiba and Tahraoui Abdelkrim

Departement of Biology, Faculty of Science, University Badji Mokhtar 23000, Annaba, Algeria

Abstract: The objective of this study aims to evaluate the effect of a free radicals-scavenging antioxidant, hesperidin, on the susceptibility of the diabetic rats to the diabeto-teratological complications during pregnancy. Indeed, the intraperitoneal administration of Streptozotocin (SZT) at a rate of 60 mg/Kg of body weight induces an experimental diabetes mellitus in 2-4 days. Work was centered on the one hand, by a hyperglycemia-associated considerable reduction in the maternal hepatic and maternal cardiac of the reduced glutathione (GSH) and on the other hand, by an increase in the maternal cardiac glutathione S-transferase (GST) activity, biomarkers of an oxidative stress. The treatment of the pregnant diabetic rats by hesperidin restored the maternal cardiac of GSH, attenuated hyperglycemia and dyslipidemias in the dams rats.This suggests a prophylactic effect of hesperidin opposite the embryonic malformations occurring at the time of badly followed -diabetes type 1.

Key words: Hesperidin · Rats · Diabetes Type1 · Oxidative Stress

INTRODUCTION

Diabetes is a serious disease that is linked to the development of a multitude of neuro-immune and metabolic complications including oxidative stress. Location researchers involved in most human diseases (cancer, immune deficiencies, neurodegenerative diseases...).

To investigate the etiology of the disease and because of the Gravitee its many metabolic and neurodegenerative effects in 1974 Portha [1] established diabetes in rats clinically by administration of streptozotocin, a substance that has selective toxicity on â cells of the islets of Langerhans in the endocrine pancreas thereby inducing insulin-dependent diabetes [2].

Flavonoids are powerful antioxidants that may inhibit the formation of free radicals and to oppose the oxidation of macromolecules reporting to the efficacitée several medicinal plants as natural anti-diabetic [3].In this context our study is to explore the involvement of oxidative stress in diabetic pathology rated the antioxidant power hesperidin on oxidative stress in pregnant rats apply.

MATERIALS AND METHODS

Animals: The biological material base that we have chosen is the rat Rattus rattus of the Wistar strain from Pasteur Institute in Algiers. The rats are nocturnal mammals of the order of rodents. Upon their arrival, the rats weighed an average of 180 grams and at the time of the experiment, they weighed on average 250 ± 20 grams. The rats were acclimated under standardized conditions of natural photoperiod, an average temperature of 22 ± 4 ° C and humidity of 50-70%. After an adaptation period of three weeks, we have selected 25 females based on weight which we separated into five experimental groups each include five rats control group T, vehicle control CV lot, lot control treated hesperidin CH Lot diabetic vehicle DV lot diabetic treated hesperidin DH.

Treatment of Animals

Administration of Streptozotocin: Streptozotocin (STZ) is a chemical commonly used in animal models for the study of diabetes [4]. Diabetes was induced in rats by intraperitoneal injection of STZ (Sigma Lowis ST, Mo) at a dose of 60 mg / kg body weight [5] dissolved in a 0.1M sodium citrate buffer pH 4.5.

Corresponding Author: Chouba Ibtissem, Applied Neuroendocrinology Laboratory, Departement of Biology, Faculty of Science, University Badji Mokhtar 23000, Annaba, Algeria. E-mail: ibti-bio@hotmail.fr.

Administration of Hesperidin: Administration is by gastric gavages of rats to a high dose of 100 mg / kg body weight. Treatment with vehicle or the antioxidant Nacl for controls begin 72 hours after the induction of diabetes and it is for three days (15th, 17th and 18th day gestational).

Determination of Reduced Glutathione (GSH): The assay of GSH is based on the colorimetric method of Ellman [6]. The principle is based on the oxidation reaction of GSH with acid 5, 5'- dithiobis - 2 nitrobenzoic acids (DTNB) and releasing the absorbent at 412 nm thionitrobenzoic acid (TNB).For this assay, one gram of organ was homogenized in three volumes of 5 % TCA using a mill and then centrifuged at 1000 revs / min. 50 mu.l of supernatant are diluted in 10 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 8). To 3 ml of the dilution mixture, 20.mu.l DTNB (0.01 M) are added, the absorbance measurement is obtained at a wavelength of 412 nm.

Determination of Glutathione S - Transferase (GST) : The measurement of the overall GST acivité is to provide to the various isoenzymes CDNB chlorodinitrobenzene. The CDNB readily reacts with GSH to form an enzymatically light at 340 nm absorbing conjugate. The value of the optical density is proportional to the bound GST activity [7].son procedure is to mix 840 mu.l phosphate buffer (100 mM, pH 6.5), 50 mu.l CDNB, 10.mu.l sample then add 100 ì GSH. The measurement of the enzymatic activity was performed for 5 minutes. The concentration of proteins in each organ was determined by the method of Bradford M [8] by using a calibration curve previously made ??by means of bovine serum albumin (BSA).

Statistical Analysis of Results: Results are presented as mean ± SEM and shown in histograms. A comparison test was used medium. The test T of Student with the MINITAB program for comparing two averages.

RESULTS

Cardiac Content of Reduced Glutathione (GSH) in Pregnant Rats: The results showed a very significant ($P < 0.01$) in glutathione content in diabetic rats vehicle and significant increase ($P < 0.05$) contribution to the controls

(Dv: 24±2,64 vs T: 59±8,91) (DH: 35,6±4,92 vs T: 59±8,91) (DH: 35,6±4,92 vs DV: 24±2,64).

Measuring the Cardiac Activity of Glutathione S-Transferase (GST) in Pregnant Rats: The results indicate a very significant increase ($P < 0.01$) in GST concentration in diabetic rats treated with vehicle and hesperidin by contribution to controls

(Dv: 129±5,62 vs T: 115±6,54), (DH: 119±10,11 vs T: 115±6,54) (DH: 119±10,11 vs DV: 129±5,62)

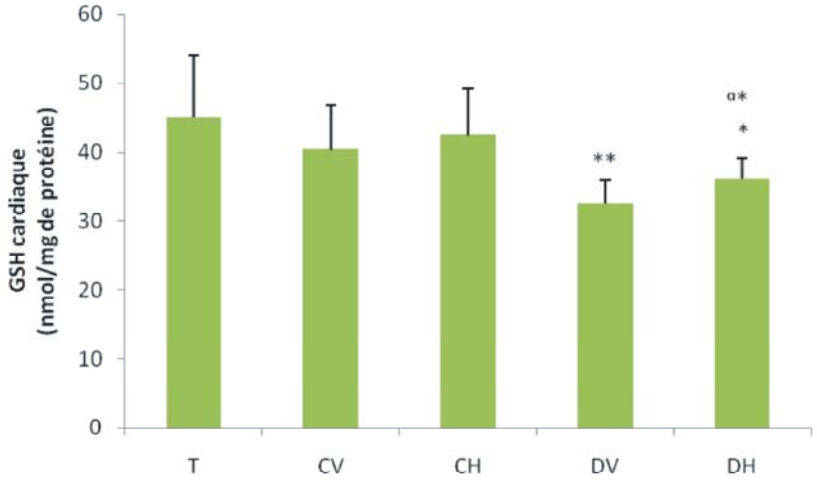


Fig. 1: Variation of the concentration of cardiac GSH nmol / mg protein
Ns.: non significant difference P > 0.05 ; *P < 0.05 ; **P < 0.01; ***P < 0.001

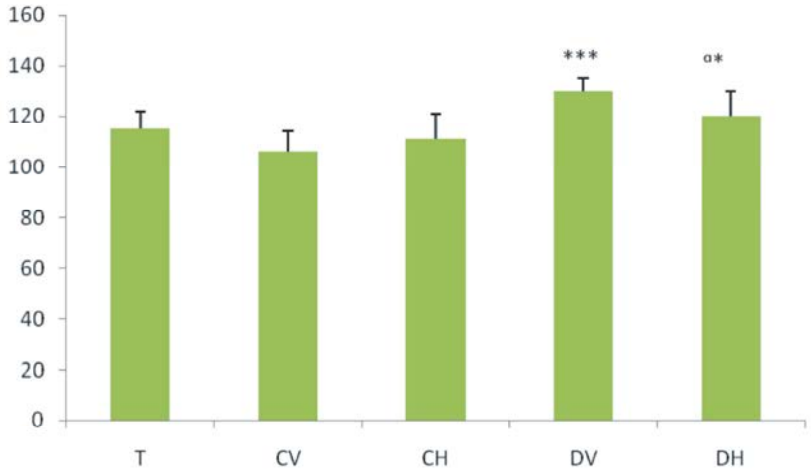


Fig. 2: Cardiac activity variation of GST in μmol/min/mg of proteins
Ns: Non significant difference P > 0.05 ; *P < 0.05 ; **P < 0.01; ***P < 0.001

DISCUSSION

Our experimental study focused on properties that potentiate hesperidin fight against neuro behavioral alterations in rats of Wistar diabetic pregnant.

The relationship between DHC complications and pro status / maternal antioxidant in recent years was a journey of extensive research [9]. Our results have showed a highly significant decrease in cardiac reduced glutathione (GSH) in diabetic pregnant rats. It is ubiquitous tripeptide core network of the cellular antioxidant which includes a series of enzymatic systems scavengers, such as that of glutathione S-transferase (GST) [10]. The increase in total activity of cardiac GST in the untreated diabetic lot reflects the mobilization of anti-radical defenses dependent GSH in response to intense oxidative stress, indicating that chronic hyperglycemia generalize the production of free radicals in the body. Supplementation of hesperidin partially restores the cardiac GSH levels while simultaneously attenuates hyperactivity S-transferase in the heart.

What prompts us to consider our results as positive for the administration of flavonoids was largely due to a decrease in oxidative phenomena via mechanisms involving the interference of these polyphenols with GSH-dependent enzyme system [11]. In this sense, the antioxidant power of hesperidin has been evaluated in several scientific contexts in which it protected the liver mesenchymal against oxidative stress induced by toxic molecules [12].

CONCLUSION

This crucial issue to which we are interested, is summed up in the fact that the induction of experimental diabetes mellitus in pre-pregnant female mice causes 72h after a disturbance of the biochemical metabolism and causes a state of oxidative stress that is shown, on the one hand, by increasing the activity of glutathione-S-transferase (GST) with a strong cellular uptake of reduced glutathione (GSH) in the Heart of maternal bodies. hesperidin appears to prevent the complications of diabetes through an effective antioxidant effect.

REFERENCES

1. Portha, B., 1974. In: noninsulin-dependent diabetes mellitus. Dr Fatalis CR. Raynal AFP. Paris
2. Omari, N., Y. Dahmani-aït akli, F. Labrousse and F. Hadj bekkouche, 2011. Influence of the streptozotocin on the corticotrope axis of the Wistar rat (Rattus norvegicus)., 80: 907-938.
3. Toumi, M.L., S. Merzoug, A. Boutefnouchet, A. Tahraoui, K Ouali and M.A.Guellati, 2009. Hesperidine, a natural citrus flavanone, alleviates hyperglycaemic state and attenuates embryopathies in pregnant diabetic mice. Journal of Medicinal Plans Research, 3(11): 862-869.
4. Frode, T.S. and Y.S. Medeiros, 2008. Animal models o test drugs with potential antidiabetic activity Journal of Ethnopharmacology., 155: 173-183.

5. Akbarzadeh, D., M. Norouzian, R. Mehrabi, Sh, Jamshidi, A. Farhangi, A. Allah Verdi, S.M.A. Mofidian and B. Lame Rad, 2007. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats Indian J Clin Biochem., 22(2): 60-64.
6. Ellman, G.L., 1959. Plasma antioxidants. Arch. Biochemistry and Biophyisics., 82: 70-77.
7. Habig, W.H., M.J. Pabs and W.B. Jacobi, 1974. The first enzymatic step in mercapturic acid formation J Biol Chem., 249: 137-143.
8. Bradford, M., 1979. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochemn., 72: 248-254.
9. Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncola, M.T.D. Cronin, M. Mazura and J. Telser, 2007. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease The International Journal of Biochemistry & Cell Biology., 39: 44-84.
10. Abidi, P., F. Aaqq, J.M. Arif, M. Lohani and Q. Rahman, 1999. Chrysotile-mediated imbalance in the glutathione redox system in the developement of pulmonary injury Toxicol Lett., 106: 31-39.
11. Dastmalchi, K., H.J.D. Dormana, P.P. Oinonena, Y. Darwis, I. Laakso and R. Hiltunen, 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of lemon balm(Melissa officinalis L) extract LWT., 41: 391-400.
12. Tirkey, N., S. Pilkhwal, A. Kuhad and K. Chopra, 2005. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney BMC Pharmacol., 5(1): 2.

Volume : 3 | Issue : 11 | November 2014 • ISSN No 2277 - 8179

Protective Effect of Hesperidin Agains Neurobehavioral Disorders And oxidative Stress in The Diabetic Ratte Gestante Strain Wistar

Biology

KEYWORDS : Diabete, Behavioral, Anxiety, Hesperidin, GSH hepatic, GST hepatic

Chouba Ibtissem	Laboratory of Neuro- endocrinology Applied Biology Department; Badji Mokhtar University Annaba , 23000 , Algeria .
Nessaibia Issam	Laboratory of Neuro- endocrinology Applied Biology Department; Badji Mokhtar University Annaba , 23000 , Algeria .
Haloui Meriem	Laboratory of Neuro- endocrinology Applied Biology Department; Badji Mokhtar University Annaba , 23000 , Algeria .
Tahraoui Abdelkrim	Laboratory of Neuro- endocrinology Applied Biology Department; Badji Mokhtar University Annaba , 23000 , Algeria .

ABSTRACT

Our problem is to evaluate the behavioral effects of infection and combination diabetes - infection in pregnant rats and the protective effect of an antioxidant on neurobehavioral alterations and complications. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 60 mg / kg . The hesperidins, a natural flavonoid was administered orally (gavages) at a dose of 100 mg / kg. This administration reduces anxiety and reduces damage due to hyperglycemia associated with a significant decrease in the rates of reduced glutathione (GSH) and maternal liver on the other hand, by increasing the activity of glutathione S- transferase (GST) hepatic mother, biomarkers of oxidative stress. The results indicate the ability of hesperidin to prevent changes induced by experimental diabetes.

1. Introduction

Diabetes mellitus type 1 is a common disease that affects individuals predisposed to develop at an early age an autoimmune reaction against pancreatic islet B cells [1]. It is one of the inevitable consequences, a disorder in the regulation of carbohydrate metabolism to a possibility of screening for psychiatric disorders such as depression, anxiety and behavioral problems [2]. Streptozotocin induces diabetes mellitus and diabetic causes installation syndrome characterized by polyphagia, polyuria, polydipsia, and glucosuria [3, 4] .STZ is a reference substance for the experimental study of diabetes [5, 3]. This endocrine disorder is characterized by the destruction of β cells Langerhans responsible for insulin deficiency [6]. Diabetologists have obviously deduced that a complementary therapy consisting of plant extracts is required to optimize the treatment of diabetes [7, 8, 9]. Flavonoids are powerful antioxidants that may inhibit the formation of free radicals and oxidation oppose macromolecules realizing the effectiveness of several herbs as natural diabetes [10]. In this context, we have developed an experimental approach that aims to study the antioxidant power of hesperidin on oxidative stress applied to pregnant rats by assessing the ability of detoxification kindergarten through the assay of reduced glutathione (GSH) and measuring the activity of glutathione S- transferase (GST) and its impact on the emotional state during the gestational period announced by the
(Open Field) behavioral test.

2 Materials and Methods

2.1 Animals

The biological material base that we have chosen is the rat Rattus rattus of the Wistar strain from Pasteur Institute in Algiers. The rats are nocturnal mammals of the order of rodents. Upon their arrival, the rats weighed an average of 180 grams, and at the time of the experiment, they weighed on average 250 ± 20 grams. The rats were acclimated under standardized conditions of natural photoperiod, an average temperature of 22 ± 4 º C and humidity of 50-70%. After an adaptation period of three weeks , we have selected 25 females based on weight which we separated into five experimental groups each include five rats control group T, vehicle control CV lot , lot control treated hesperidin CH Lot diabetic vehicle DV lot diabetic treated hesperidin DH .

2.2 Treatment of Animals

2.2.1 Administration of streptozotocin

Streptozotocin (STZ) is a chemical commonly used in animal models for the study of diabetes [11]. Diabetes was induced in rats by intraperitoneal injection of STZ (Sigma Lowis ST, Mo) at a dose of 60 mg / kg body weight [12] dissolved in a 0.1M sodium citrate buffer pH 4.5.

2.2.2 Administration of hesperidin

Administration is by gastric gavages of rats to a high dose of 100 mg / kg body weight. Treatment with vehicle or the antioxidant Nacl for controls begin 72 hours after the induction of diabetes and it is for three days (15th , 17th and 18th day gestational).

2.3 The test of open field (Open Field, OF)

The OF test, first described by Hall in 1934 [13], the device is a Plexiglas platform (70cm x 70cm x 40cm) divided into central and peripheral area. Each rat was placed individually in the center of the floor for 5 minutes and allowed exploration

[14]. An animal considered anxiety will tend to prefer the peripheral zone Parameters measured the time spent in the center , time spent in the periphery and the distance traveled.

2.4 Determination of reduced glutathione (GSH) Liver

The assay of GSH is based on the colorimetric method of Ellman (1959)

[15]. The principle is based on the oxidation reaction of GSH with acid 5, 5'- dithiobis - 2 nitrobenzoic acids (DTNB) and releasing the absorbent at 412 nm thionitrobenzoic acid (TNB).For this assay , one gram of liver was homogenized in three volumes of 5 % TCA using a mill and then centrifuged at 1000 revs / min . 50 mu.l of supernatant are diluted in 10 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 8). To 3 ml of the dilution mixture, 20 .mu.l DTNB (0.01 M) are added, the absorbance measurement is obtained at a wavelength of 412 nm.

2.5 Determination of glutathione S - transferase (GST) Liver

The measurement of the overall GST acivité is to provide to the various isoenzymes CDNB chlorodinitrobenzene. The

CDNB readily reacts with GSH to form an enzymatically light at 340 nm absorbing conjugate. The value of the optical density is proportional to the bound GST activity [16] .son procedure is to mix 840 mu.l phosphate buffer (100 mM , pH 6.5) , 50 mu.l CDNB , 10 .mu.l sample then add 100 µ GSH. The measurement of the enzymatic activity was performed for 5 minutes. The concentration of proteins in each organ was determined by the method of Bradford M (1976) [17] by using a calibration curve previously made by means of bovine serum albumin (BSA).

2.6 Statistical analysis of results

Results are presented as mean ± SEM and shown in histograms. A comparison test was used medium . The test T of Student with the MINITAB program for comparing two averages.

3 Results

3.1 Variation of the open Field Test parameters

The results in Figure 1A shows that the group of diabetic and diabetic rats treated spends less time in the central part of the device by providing groups of rats control , vehicle control and treated with hesperidin (W: 36 ± 12,28 vs DV:10.4 ± 2.05), (W: 36 ± 12.28 vs DH: 13.4 ± 5.23), (CV : 22.8 ± 7.46 vs. DV : 10.4 ± 2,059)

Figure 1B shows that the distance traveled by the control and diabetic rats treated with hesperidin was significant (P < 0.05) than that traversed by the vehicle control rats (CV : 33 ± 8.23 vs CH : 60 ± 1.69), (CV : 33 ± 8.23 vs DH: 45 ± 6.5) and a significant decrease (P < 0.01) in diabetic vehicle (CV : 33 ± 8.23 vs DV : 18 ± 4) and highly significant increase in the diabetic treated hesperidin (P < 0.001) by supplying the diabetic rats vehicle (DV :18 ± 4 vs DH: 45 ± 6.5)

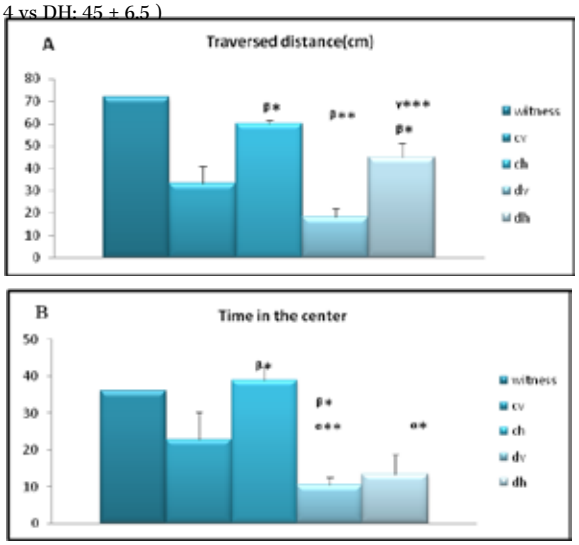


Figure 1: Behavior of pregnant rats in the control and treated open Field. The distance traveled (A), time spent in the center (B), (α) comparison with rats witness (β) compared with diabetic rats and vehicle (γ) compared with diabetic rats treated

Ns : Non significant difference P > 0.05 ; * P < 0.05 ; ** P <0.01 ; *** P < 0.001

3.2 Hepatic content of reduced glutathione (GST) in pregnant rats

The results showed a highly significant (P < 0.001) in liver glutathione content in diabetic rats vehicle and a very significant increase (P < 0.01) contribution to the controls (W: 55 ± 4.87 vs. DV: 24 ± 2.64), (W: 55 ± 4.87 vs DH: 33 ± 9.74).

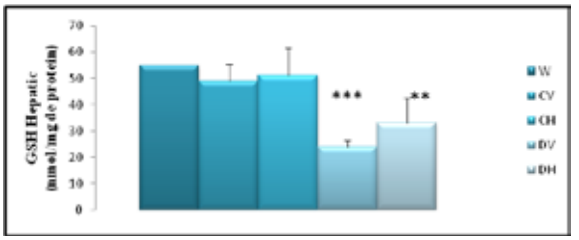


Figure 2. Variation of the concentration of hepatic GSH nmol / mg protein

Ns. : non significant difference P > 0.05 ; *P < 0.05 ; **P < 0.01; ***P < 0.001

3.3 Measuring the hepatic activity of glutathione S- transferase (GST) in pregnant rats

The results indicate a highly significant increase (P < 0.001) in liver GST concentration in diabetic rats treated with vehicle and hesperidin by contribution to controls (W: 117.2 ± 6.14 vs DV: 214.4 ± 5.59), (W: 117.2 ± 6, 14 vs DH: 161, 2 ± 4, 81).

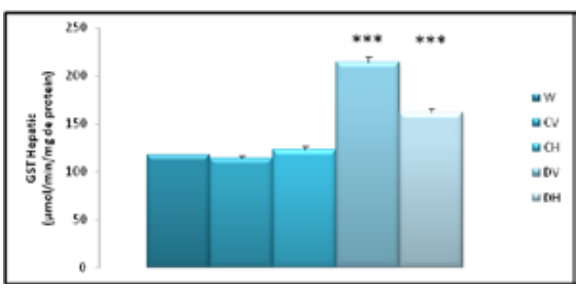


Figure 3: Hepatic activity variation of GST in µmol/min/mg of proteins

Ns: Non significant difference P > 0.05 ; *P < 0.05 ; **P < 0.01; ***P < 0.001

4. Discussion

Our experimental study focused on properties that potentiate hesperidin fight against neurobehavioral alterations in rats of Wistar diabetic pregnant. Recently, hypoglycemic agents products derived from plants have attracted the attention of researchers since natural plant sources are usually considered less toxic by contribution to synthetic sources [18]. The experimental streptozotocin-induced diabetes is characterized by hyperglycemia [11] which is linked by several studies to defects in insulin secretion by reducing the mass of β cells of Langerhans islets [19,20,21,22]. It activates the expression of protein kinase C, protein responsible for the dephosphorylation of the insulin receptor [23]. These complications associated with diabetes status seem to negatively affect the browser behavior and anxious state of diabetic rats at OF whose comparison with the control group reported persistent and acute locomotor hypoactivity represented by a decrease in the distance [24]. The results of our work mention a hierarchical efficiency of hesperidin against different levels of disorders caused by the disease, and it will intervene at the molecular and cellular level by correcting the hyperglycemic diabetic rats treated status because it has anti-diabetogenic property, insulin-like [25]. The relationship between DHC complications and pro status / maternal antioxidant in recent years was a journey of extensive research [26]. Our results have showed a highly significant decrease in hepatic reduced glutathione (GSH) in diabetic pregnant rats. It is ubiquitous tripeptide core network of the cellular antioxidant which includes a series of enzymatic systems scavengers, such as that of glutathione S-transferase (GST) [27]. The increase in total activity of hepatic GST in the untreated diabetic lot reflects the mobilization of an-

ti-radical defenses dependent GSH in response to intense oxidative stress, indicating that chronic hyperglycemia generalize the production of free radicals in the body. Supplementation of hesperidin partially restores the hepatic GSH levels while simultaneously attenuates hyperactivity S-transferase in the liver. What prompts us to consider our results as positive for the administration of flavonoids was largely due to a decrease in oxidative phenomena via mechanisms involving the interference of these polyphenols with GSH-dependent enzyme system [28]. In this sense, the antioxidant power of hesperidin has been evaluated in several scientific contexts in which it protected the liver mesenchymal against oxidative stress induced by toxic molecules [29].

5. Conclusion

The crucial problem is summarized in the fact that the induction of experimental diabetes mellitus streptozotocin causes complications and neurobehavioral disruption maternal plasma biochemical metabolism and causes a state of oxidative stress. The administration of hesperidin with a protective effect against anxiety and depressive disorders in rats Wistar diabetic. Treatment with hesperidin seems to restore the levels of maternal hepatic GSH; this suggests that it also has an antioxidant effect.

REFERENCE

1. Bresson,D.,von Herrath,M. (2007).Moving towards efficient therapies in type 1 diabetes : to combine or not to combine ? Autoimmunity Reviews.,6,315-322 | | 2. Oldroyd,J., Banerjee,M.,Heald, A. (2005). Diabetes and ethnic minorities. Postegrad Med J., 81,486-490. | | | 3. Omari, N., Dahmani-aït akli,Y., Labrousse.F and Hadj bekkouche , F .(2011). Influence of the streptozotocin on the corticotrope axis of the Wistar rat (Rattus norvegicus).,80,907- 938 | | 4. Calop,J., Limat,S and Frnandez,C.(2008). clinical pharmacology and therapeutic. Masson, Elsevier Masson, Paris. pp.417-427. | | 5. Portha, B.(1974). In: noninsulin-dependent diabetes mellitus. Dr Fatalis CR. Raynal AFP. Paris. | | 6. Bendayan,M., Malide,D and Ziv,E.(1995). Immuno-cytochemical investigation of insulin secretion by pancreatic beta-cells in control and diabetic sand rats (Psammomys obesus). J. Histochem. Cytochem., 43, 771-784. | | 7. Jin, H., Ogino, K., Fujioka,T., Yoshida, M and Ishimaru,K.(2008). new acylphloroglucinol glycocide from solidago altissima L.J Nat Med Apr .,62(2),199-201. | | 8. Bagchi,D., Garg, A., Krohn, R., Bagchi,M., Tran,M and Stohs,S. (1997). Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. Res Commun Mol Pathol Pharmacol., 95,179–90. | | 9. Kim, S. H., Hyun, S., H and Choung, S. Y. (2006). Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. Journal of Ethnopharmacology., 104(1–2) ,119–123. | | 10. Toumi, M.L., Merzoug, S., Boutefnouchet , A ., Tahraoui,A., Ouali, K and Guellati, M.A.(2009). Hesperidine, a natural citrus flavanone, alleviates hyperglycaemic state and attenuates embryopathies in pregnant diabetic mice. Journal of Medicinal Plans Research Vol. 3(11), pp. 862-869 | | 11. Frode, T.S and Medeiros, Y. S. (2008). Animal models o test drugs with potential antidiabetic activity Journal of Ethnopharmacology., 155 , 173-183. | | 12. Akbarzadeh, D., Norouzian,M., Mehrabi,R., Sh, Jamshidi., Farhangi,A., Allah Verdi,A., S. M. A. Mofidian and B. Lame Rad. (2007). Induction of diabetes by Streptozotocin in rats Indian J Clin Biochem., 22(2), 60–64. | | | 13. CS, Hall.(1934) Emotional behavior in the rat. J Comp Physical., 18, 385-403. | | 14. Sáenz, JCB., Villagro, OR and Trias, JF. (2006). Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. Behav Brain Res., 169,57-65 | | 15. Ellman, G. L.(1959). Plasma antioxidants. Arch. Biochemistry and Biophyisics., 82, 70-77. | | 16. Habig , W H., Pabs, M J and Jacobi, W B.(1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation J Biol Chem., 249 , 137-143. | | 17. Bradford, M . (1979). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochemn.,72,248-254 | | 18. Sabu, M C., Smitha , K and Ramadasan, K.(2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes Journal of Ethnopharmacology., 83, 109-116 | | 19. Georg, P and Ludvik , B. (2000). Lipids and diabetes Journal of Clinical and Basic Cardiology., 3 ,159-162. | | 20. Aughsteen , A.A. (2000). Ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans inmice J of Electron Microscopy., 49(5), 681-690. | | 21. Szkudelski , T and Szkudelska, K.(2002). Streptozotocin induces lipolysis in rat adiposytes in vitro. Phys Res., 51, 255-259. | | 22. Chen, V and Ianuzza, CD.(1981). Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. Can J Physiol Pharmacol., 60, 1251-1256. | | 23. Davidoff ,AJ., Davidson, MB ., Carmody , MW., David, ME and Ren, J.(2004). Diabetic cardiomyocyte dysfonction and myocyte insulin resistance : role of glucose-induced PKC activity. Molecular and Cellular Biochemistry., 262, 155-163. | | 24. Wuarin-Bierman, L., Zahnd, GR ., Kaufman, F., Burcklen,L ., Adler, J ., hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. | | 25. Akiyama, S., Katsumata, S ., Suzuki, K., Ishimi,Y ., Wu,J and Uehara, M. (2010). Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidimic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. J Clin Biochem Nutr., 46 (1), 87-92 | | 26. Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M .T. D ., Mazura, M and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease The International Journal of Biochemistry & Cell Biology., 39, 44-84 | | 27. Abidi, P., Aaqq ,F., Arif, J .M., Lohani, M and Rahman, Q.(1999). Chrysotile-mediated imbalance in the glutathione redox system in the developement of pulmonary injury Toxicol Lett., 106, 31-39 | | 28. Dastmalchi, K ., Dormana, H. J. D ., Oinonena,P.P ., Darwis, Y ., Laakso, I and Hiltunen, R . (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of lemon balm(Melissa officinalis L) extract LWT., 41, 391-400 | | 29. Tirkey, N., Pilkhwal, S., Kuhad, A and Chopra, K. (2005). Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney BMC Pharmacol., 5(1) , 2 |