

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA :	Acides aminées
ALAT :	Alanine aminotransférase (ou TGP : Transaminase glutamo-pyruvique)
ASAT :	Aspartate aminotransférase (ou TGO : Transaminase glutamo-oxaloacétique)
ACD :	Acidocétose diabétique
ACL :	Acidose lactique
ADA :	<i>American Diabetes Association</i>
ADO :	Antidiabétiques oraux
AG :	Acides gras
BA :	Basophiles
BBS1a :	<i>N, N'</i> - Bis (benzyl) sulfamide
BPS1b :	<i>N, N'</i> - Bis (propyl) sulfamide
Bili D :	Bilirubine directe
Bili T :	Bilirubine totale
CAT :	Catalases
CCMH :	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
C-HDL :	Cholestérol des Lipoprotéines de haute densité
C-LDL :	Cholestérol des Lipoprotéines de faible densité
C-VLDL :	Cholestérol des Lipoprotéines de très faible densité
CRP :	Protéine C-réactive
CT :	Cholestérol total
DPP-4 :	Dipeptidylpeptidase-4
DSG :	Diabète Sucré Gestationnel
DT1 :	Diabète de type 1
DT2 :	Diabète de type 2
DTNB :	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman
EASD :	<i>European Association for the Study of Diabetes</i>
EDTA :	Ethylène diamine tétra-acétique
EO :	Eosinophiles
ERO :	Espèce réactive de l'oxygène
ESP1b :	Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate
ESP1d :	Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate
FID :	Fédération internationale de diabète (ou IDF : <i>International Diabetes Federation</i>)
GB :	Globules blancs
GLB :	Glibenclamide
GPx :	Glutathion peroxydase

GSSG :	Glutathion oxydé
GST :	Glutathion S-transférase
GR :	Globules rouges
GSH :	Glutathion réduit
γ-GT :	Gamma-Glutamyl Transférase
GIP :	<i>Glucose-dependent Insulin releasing Polypeptide</i>
GL :	Glinides
GLP-1 :	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
Hb :	Hémoglobine totale
HCT :	Hématocrite
HbA1c :	Hémoglobine glyquée
HGPO :	Hyperglycémie Provoquée par voie Orale
HTA :	Hypertension Artérielle
LDH :	Lactate Déshydrogénase
LY :	Lymphocytes
MDA :	Malondialdéhyde
MO :	Monocytes
NE :	Neutrophiles
OMS :	Organisation Mondiale de la Sante (ou WHO : <i>World Heath Organisation</i>)
PAL :	Phosphatases Alcalines
PLT :	Plaquettes
K_{ATP} :	Canal potassique dépendant de l'ATP
SH :	Sulfamides hypoglycémiant
SU :	Sulfonylurées
SUR :	Récepteurs aux Sulfonylurées
t_{1/2} :	Demi-vie d'élimination
TG :	Triglycérides
TGMH :	Teneur globulaire moyenne en hémoglobine
VGM :	Volume globulaire moyen

LISTE DES FIGURES

Figure. 1 :	Nombre estimé de personnes (20-79 ans) atteintes de diabète à travers le monde et par région en 2015 et 2040 selon la Fédération Internationale du Diabète.....	8
Figure. 2 :	Principaux effets de l'insuline.....	12
Figure. 3 :	Structure primaire de l'insuline humaine.....	13
Figure. 4 :	Rôle du pancréas endocrine dans la régulation de la glycémie.....	15
Figure. 5 :	Formule chimique du répaglinide	21
Figure. 6 :	Formule chimique de la metformine	22
Figure. 7 :	Formules chimiques de la rosiglitazone et de la pioglitazone.....	23
Figure. 8 :	Formules chimiques de l'acarbose, de ses produits de dégradation et du miglitol.....	24
Figure. 9 :	Formule chimique de la sitagliptine.....	25
Figure. 10 :	Formule chimique du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) humain, de l'exénatide et du liraglutide.....	27
Figure. 11 :	Illustration des sites et des mécanismes d'action principaux des différentes classes d'antidiabétiques oraux.....	30
Figure. 12 :	Formule chimique de l'alloxane et de l'acide dialurique.....	31
Figure. 13 :	Formule chimique de la streptozotocine et de la méthyle-nitroso-urée.....	32
Figure. 14 :	La structure chimique commune des sulfamides hypoglycémiantes.....	37
Figure. 15 :	Formules chimiques des sulfamides hypoglycémiantes.....	37
Figure. 16 :	Mécanisme de l'effet insulinosécréteur de sulfonylurées.....	41
Figure. 17 :	Canal potassique sensible à l'ATP : sites de fixation de l'ATP, de sulfonylurées et de glinides.....	43
Figure. 18 :	Structures et caractéristiques physicochimiques des deux sulfamides symétriques <i>N, N'</i> -bis-(alkyl) sulfamides.....	55
Figure. 19 :	Structure et caractéristiques physicochimiques des deux dérivés <i>N</i> -acylsulfonamides.....	56
Figure. 20 :	Schéma récapitulatif du protocole expérimental (souris Swiss).....	61
Figure. 21 :	Schéma récapitulatif du protocole expérimental (rat Wistar).....	66
Figure. 22 :	Des exemples de chromatogrammes obtenus avec la méthode D-10 [®] HbA _{1c}	71
Figure. 23 :	Méthode Coulter de comptage et d'analyse volumétrique.....	107
Figure. 24 :	Évolution de la de la glycémie à jeun chez les souris Swiss diabétiques durant les 14 jours de la période de traitement par les quatre molécules nouvellement synthétisées, BBS1a, BPS1b, ESP1b et ESP1d.....	116

Figure. 25 :	Évolution du poids corporel chez les rats Wistar diabétiques durant les 28 jours de la période de traitement par la molécule ESP1b.	121
Figure. 26 :	Variation entre poids initial et final de rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.	122
Figure. 27 :	Variation du poids relatif du pancréas (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	123
Figure. 28 :	Variation du poids relatif du foie (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	123
Figure. 29 :	Variation du poids relatif des reins (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	124
Figure. 30 :	Variation du poids relatif du cœur (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	124
Figure. 31 :	Variation du poids relatif des testicules (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	124
Figure. 32 :	Variation du poids relatif de la rate (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	125
Figure. 33 :	Évolution de la glycémie (mg/dl) chez les rats diabétiques durant les 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	127
Figure. 34 :	Variation de la concentration plasmatique de l'insuline (μ U/ml) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	129
Figure. 35 :	Variation du taux de l'hémoglobine glyquée (% Hb) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	130
Figure. 36 :	Variation de la teneur hépatique en glycogène (mg/g du tissu) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	130
Figure. 37 :	Évolution de la glycémie chez les rats diabétiques traités par la molécule ESP1b durant le test OGTT.....	131
Figure. 38 :	Variation de la concentration plasmatique de triglycérides (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b....	134
Figure. 39 :	Variation de la concentration plasmatique de cholestérol total (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	134
Figure. 40 :	Variation de la concentration plasmatique de cholestérol-HDL (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	135

Figure. 41 : Variation de la concentration plasmatique de cholestérol-LDL (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	135
Figure. 42 : Variation de la concentration plasmatique de cholestérol-VLDL (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	136
Figure. 43 : Variation du rapport CT/C-HDL chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	136
Figure. 44 : Variation du rapport C-LDL/C-HDL chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	137
Figure. 45 : Variation de la concentration plasmatique de protéines totales (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b....	139
Figure. 46 : Variation de la concentration plasmatique d'albumine (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	139
Figure. 47 : Variation de la concentration plasmatique de créatinine (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	140
Figure. 48 : Variation de la concentration plasmatique d'urée (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	140
Figure. 49 : Variation de la concentration plasmatique d'acide urique (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	141
Figure. 50 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique d'Alanine aminotransférase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	143
Figure. 51 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique d'Aspartate aminotransférase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	143
Figure. 52 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique de la Lactate déshydrogénase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	144
Figure. 53 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique des Alcalines phosphatases (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	144
Figure. 54 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique du Gamma-glutamyl transpeptidase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	145

Figure. 55 :	Variation de la concentration plasmatique de la Bilirubine totale (mg/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	145
Figure. 56 :	Variation de la concentration plasmatique de la Bilirubine directe (mg/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	146
Figure. 57 :	Variation de la teneur hépatique en GSH (nM GSH/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	148
Figure. 58 :	Variation de l'activité enzymatique hépatique du GPx ((μ M GSH/min/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	148
Figure. 59 :	Variation de l'activité enzymatique hépatique du GST (nM GSH-CDNB/min/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	149
Figure. 60 :	Variation de l'activité enzymatique hépatique du CAT (μ M H ₂ O ₂ /min/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	149
Figure. 61 :	Variation de la teneur hépatique en MDA (nmol /mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	150
Figure. 62 :	Variation du nombre de globules rouges ($\times 10^6/\mu$ l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	152
Figure. 63 :	Variation de la concentration d'hémoglobine totale (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	152
Figure. 64 :	Variation du taux d'hématocrite (%) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	153
Figure. 65 :	Variation du volume globulaire moyenne (fl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	153
Figure. 66 :	Variation du teneur globulaire moyenne en hémoglobine (pg) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	154
Figure. 67 :	Variation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	154
Figure. 68 :	Variation du nombre de plaquettes ($\times 10^3/\mu$ l) chez les rats diabétiques	

	après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	155
Figure. 69 :	Variation du nombre de globules blancs ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	157
Figure. 70 :	Variation du nombre de Neutrophiles ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	157
Figure. 71 :	Variation du nombre de Lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	158
Figure. 72 :	Variation du nombre de Monocytes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	158
Figure. 73 :	Variation du nombre d'Eosinophiles ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	159
Figure. 74 :	Variation du nombre de Basophiles ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	159
Figure. 75 :	Variation de la concentration plasmatique de la protéine C-réactive (mg/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	160
Figure. 76 :	Comparaison histologique des photomicrographies de sections de tissus pancréatiques (HE 400x) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	161
Figure. 77 :	Comparaison histologique des photomicrographies de sections de tissus hépatiques (HE 100x) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	163
Figure. 78 :	Comparaison histologique des photomicrographies de sections de tissus rénales (HE 400x) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.....	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau. 1 :	Classification étiologique du diabète sucré.....	11
Tableau. 2 :	Caractéristiques des antidiabétiques.....	29
Tableau. 3 :	Classification et caractéristiques pharmacocinétiques des Sulfamides hypoglycémiantes	38
Tableau. 4 :	Les différents types de canaux k_{ATP} présents dans l'organisme.....	45
Tableau. 5 :	Composition du régime croquette (ONAB Bejaia).....	58
Tableau. 6 :	Variation de la glycémie à jeun (mg/dl) chez les souris Swiss diabétiques après 14 jours de traitement par les quatre molécules nouvellement synthétisées, BBS1a, BPS1b, ESP1b et ESP1d.....	117
Tableau. 7 :	Effet de l'ESP1b sur le poids corporel et le poids relatif des organes chez les rats Wistar diabétiques.....	120
Tableau. 8 :	Effet de l'ESP1b sur la glycémie à jeun, l'insuline, l'hémoglobine glyquée et le glycogène hépatique chez les rats Wistar diabétiques.....	126
Tableau. 9 :	Effet de l'ESP1b sur le profil lipidique et les rapports athérogéniques chez les rats diabétiques.....	133
Tableau. 10 :	Effet de l'ESP1b sur les protéines totales, albumine, créatinine, urée et l'acide urique chez les rats Wistar diabétiques.....	138
Tableau. 11 :	Effet de l'ESP1b sur ALAT, ASAT, LDH, ALP, GGT, Bilirubine Totale et Directe chez les rats Wistar diabétiques.....	142
Tableau.12 :	Effet de l'ESP1b sur les paramètres du stress oxydatif tissulaire chez les rats Wistar diabétiques.....	147
Tableau.13 :	Effet de l'ESP1b sur le nombre de globules rouges ($\times 10^6/\mu l$), concentration de l'hémoglobine totale (g/dl), taux d'hématocrite (%), volume globulaire moyenne (fl), teneur globulaire moyenne en hémoglobine (pg), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dl) et nombre de plaquettes ($\times 10^3/\mu l$) chez les rats Wistar diabétiques.....	151
Tableau.14 :	Effet de l'ESP1b sur le nombre des globules blancs ($\times 10^3/\mu l$), formule leucocytaire (%) et concentration de la protéine C-réactive (mg/l) chez les rats Wistar diabétiques.....	156

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur le diabète sucré	
1. Historique.....	5
2. Epidémiologie	7
3. Définition et aspects cliniques	8
4. Classification étiologique	9
4.1. Diabète sucré de type 1	9
4.2. Diabète sucré de type 2.....	9
4.3. Diabète sucré gestationnel.....	10
4.4. Diabètes secondaires.....	10
5. Sécrétions du pancréas endocrine et régulation de la glycémie	12
5.1. Insuline.....	12
5.2. Glucagon.....	14
5.3. Somatostatine.....	14
6. L'hyperglycémie au cours du diabète sucré	15
6.1. Les mécanismes.....	15
6.2. Les conséquences.....	16
6.2.1. La glucotoxicité.....	16
6.2.2. Le stress oxydatif.....	17
6.3. La lipotoxicité.....	18
7. Traitement du diabète.....	18
7.1. Traitement du diabète de type 1.....	18
7.2. Traitement du diabète de type 2.....	19
7.2.1. Traitement non médicamenteux (intervention sur le mode de vie).....	19
7.2.2. Traitement médicamenteux.....	20
7.2.2.1. Les sulfamides hypoglycémiantes (Les sulfonamides).....	20
7.2.2.2. Les glinides.....	21
7.2.2.3. La metformine.....	21
7.2.2.4. Les glitazones (ou thiazolidinediones).....	22
7.2.2.5. Les inhibiteurs des α -glucosidases.....	23
7.2.2.6. Les «gliptines» les inhibiteurs de la <i>dipeptidyl-peptidase-4</i> (DPP4).....	25
7.2.2.7. Les analogues du GLP-1« <i>glucagon-like peptide-1</i> ».....	25
7.2.2.8. Les analogues d' Amyline (le Pramlintide).....	27
7.2.2.9. Les inhibiteurs du SGLT-2 « <i>Sodium-Glucose transporter-2</i> »	28
7.2.2.10. L'insuline.....	28
8. Diabète expérimental induit par les substances chimiques	30
8.1. Modèle induit par l'alloxane.....	31
8.2. Modèle induit par la streptozotocine.....	32
Chapitre II. Les sulfonamides	
1. Historique de la découverte de sulfonamides	35
2. Définition.....	36
3. Structure chimique.....	37
4. Propriétés physicochimiques.....	37
5. Classification.....	38
6. Données pharmacologiques	38
6.1. Propriétés pharmacocinétiques.....	38
6.2. Propriétés Pharmacodynamiques.....	39
6.2.1. Effet insulinosécréteur.....	39
6.2.2. Effets extra-pancréatiques.....	39
6.2.3. Effets sur les plaquettes et l'endothélium vasculaire	40

7. Mécanisme de l'effet insulinosécréteur	41
8. Site d'action « Les canaux potassiques K_{ATP} »	42
8.1. Caractérisation moléculaire	42
8.2. Fonctionnement	43
8.3. Pharmacogénomique du canal potassique	43
8.4. Différents types de canaux k_{ATP} présents dans l'organisme	44
9. Réversibilité et sélectivité vis-à-vis les récepteurs SUR1 pancréatiques	44
10. Pouvoir hypoglycémiant	45
11. Action sur les différentes phases de l'insulinosécrétion	46
12. Effets indésirables	46
12.1. Hypoglycémie	46
12.2. Prise de poids	47
12.3. Effets cardiovasculaires	47
12.4. Hypersensibilité	48
13. Efficacité thérapeutique	49
14. Place des sulfamides hypoglycémiant dans le traitement du diabète	50

Partie expérimentale

I. Matériel et Méthodes

1. Nouvelle molécules	54
1.1. Procédure générale de synthèse des deux N, N'-bis-(alkyl) sulfamides	54
1.2. Procédure générale de synthèse des deux dérivés N-acylsulfonamides	55

1^{ère} étude expérimentale:

« Evaluation de l'activité antidiabétique de quatre molécules nouvellement synthétisées chez les souris Swiss rendus diabétiques par la streptozotocine »

1. Animaux	58
2. Induction du diabète expérimental	58
3. Traitement	59
4. Suivi glycémique des animaux	59
5. Explorations statistique des résultats de suivi glycémique	61

2^{ème} étude expérimentale:

« Evaluation de l'activité antidiabétique de l'Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine »

1. Animaux	63
2. Induction du diabète expérimental	63
3. Traitement	63
4. Suivi des animaux pendant l'expérimentation	64
4.1. Poids corporel	64
4.2. Glycémie	64
5. Test de tolérance au glucose oral (OGTT)	64
6. Sacrifice et prélèvement des échantillons sanguins	65
7. Prélèvement des organes	65
8. Dosage de paramètres biochimiques sanguins	67
8.1. Dosage de l'Insuline	67
8.2. Dosage de l'Hémoglobine glyquée (HbA_{1c})	69
8.3. Dosage de Lipides totaux	72
8.4. Dosage de Triglycérides	73
8.5. Dosage du Cholestérol total	75
8.6. Dosage du Cholestérol HDL	77
8.7. Évaluation du Cholestérol-LDL	78
8.8. Dosage de l'Albumine	79
8.9. Dosage de la Créatinine	80
8.10. Dosage de l'Urée	82

8.11. Dosage de l'Acide urique.....	83
8.12. Dosages de Bilirubine totale et directe.....	85
8.13. Dosage de l'Aspartate aminotransférase (ASAT)	87
8.14. Dosage de l'Alanine aminotransférase (ALAT).....	89
8.15. Dosage de Phosphatases alcalines (PAL).....	90
8.16. Dosage de la Gamma glutamyl transférase (γ -GT)	91
8.17. Dosage de la Lactate déshydrogénase (LDH)	93
8.18. Dosage de la Protéine C-réactive (CRP).....	94
9. Dosage de paramètres biochimiques tissulaires (hépatiques)	96
9.1. Dosage du Glycogène hépatique	96
9.2. Dosage du Glutathion réduit (GSH).....	97
9.3. Mesure de l'activité enzymatique de la Glutathion peroxydase (GPx).....	98
9.4. Mesure de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-transférase (GST).....	99
9.5. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT).....	101
9.6. Dosage du Malondialdéhyde (MDA).....	103
9.7. Dosage de Protéines tissulaires	104
10. Evaluation des paramètres hématologiques.....	106
10.1. Prise en charge des échantillons sanguins.....	106
10.2. Principes de fonctionnement de l'automate.....	106
10.2.1. Analyse de numération.....	106
10.2.2. Analyse différentielle.....	107
10.2.3. Mesure de l'hémoglobine.....	108
10.3. Paramètres et mode d'acquisition.....	108
10.3.1. Numération de globules rouges (GR).....	109
10.3.2. Concentration en hémoglobine (Hb).....	109
10.3.3. Volume moyen globulaire (VMG) ou cellulaire (VMC).....	109
10.3.4. Hématocrite (Ht).....	109
10.3.5. Teneur cellulaire moyenne en hémoglobine (TCMH).....	109
10.3.6. Concentration cellulaire moyenne en hémoglobine (CCMH).....	110
10.3.7. Numération plaquettaire (Plt).....	110
10.3.8. Numération de globules blancs (GB).....	110
10.3.9. Formule leucocytaire en Pourcentages.....	110
10.3.10. Formule leucocytaire en Valeurs absolues.....	111
11. Réalisation des coupes histologiques.....	111
11.1. Réalisation des prélèvements.....	111
11.2. Déshydratation.....	111
11.3. Réalisation des blocs.....	112
11.4. Coloration.....	112
12. Explorations statistique des résultats hématologiques et biochimiques.....	113

II. Résultats et interprétations

Résultats de la 1^{ière} étude expérimentale:

« Evaluation de l'activité antidiabétique de quatre molécules nouvellement synthétisées chez les souris Swiss rendus diabétiques par la streptozotocine »

1. Effets du traitement sur l'évolution de la glycémie.....	116
2. Variation de la glycémie après 14 jours de la période de traitement.....	117

Résultats de la 2^{ème} étude expérimentale:

« Evaluation de l'activité antidiabétique de l'Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine »

1. Effets du traitement sur le poids corporel et le poids relatif des organes.....	120
1.1. Poids corporel	121
1.2. Poids relatif des organes.....	123

2. Effets du traitement sur les paramètres biochimiques	126
2.1. Glycémie, insuline plasmatique, hémoglobine glyquée et glycogène hépatique.	126
2.1.1. Evolution de la glycémie durant les 28 jours de traitement.....	127
2.1.2. insuline plasmatique, hémoglobine glyquée et glycogène hépatique	128
2.2. Évolution de la glycémie durant le test OGTT	131
2.3. Profil lipidique et rapports athérogeniques	132
2.4. Protéines totales, albumine et paramètres de la fonction rénale	137
2.5. Paramètres de la fonction hépatique	141
2.6. Paramètres du stress oxydatif tissulaire	146
3. Effets du traitement sur les paramètres hématologiques et immunologiques	150
3.1. Numération de globules rouges, indices érythrocytaires et nombre de plaquettes	150
3.2. Numération de globules blancs, formule leucocytaire et taux de CRP	155
4. Effets du traitement sur l’histologie du pancréas, foie et rein	161
4.1. Le tissu pancréatique	161
4.2. Le tissu hépatique	163
4.3. Le tissu rénal	165
Discussion	167
Conclusion et perspectives	180
Références bibliographiques	
Annexes	
Publication de l’auteur	

Partie bibliographique

Le diabète sucré est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique et une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il résulte d'une déficience de la sécrétion et/ou de l'activité de l'insuline. La classification, basée sur l'étiologie de la maladie, distingue quatre types de diabète : type 1, type 2, diabète gestationnel et les autres types (parmi lesquels des déficiences génétiques conduisant à un déficit en insuline, des altérations génétiques des cellules bêta pancréatiques, des diabètes mitochondriaux, et plusieurs endocrinopathies ou maladies du pancréas). La majorité des cas de diabète sont représentés par les diabètes de type 1 et de type 2 (respectivement environ 15 % et 80 % des cas), le reste étant constitué par des formes plus rares, telles que les diabètes MODY (« *maturity-onset diabetes of the young* ») représentant moins de 5 % des cas ([Bonnefont-Rousselot et al., 2004](#)).

Les derniers chiffres de la Fédération Internationale du Diabète ([FID, 2015](#)) indiquent que 8,8 % d'adultes – 415 millions de personnes – sont atteints de diabète. La majorité a entre 40 et 59 ans, et 75 % d'entre eux vivent dans des pays à faible et moyen revenu. Tous les types de diabète sont en progression, en particulier le diabète de type 2. Un chiffre alarmant qui devrait encore augmenter pour atteindre, 642 millions d'ici à 2040. Cette augmentation phénoménale de la prévalence du diabète est due à une multiplicité de facteurs, notamment la croissance démographique, le vieillissement de la population, l'urbanisation, et l'épidémie concomitante de l'obésité.

Le traitement de cette maladie est un défi majeur à cause de ces trois raisons principales. L'augmentation exponentielle de la prévalence mondiale, la complexité de la base pathogénique et physiopathologique, outre, ses complications organiques et métaboliques sévères.

Les complications du diabète, surtout mal soignée, ont des conséquences humaines considérables. En effet, aujourd'hui, on admet qu'un quart à un tiers des sujets admis en unité

de soins intensifs de cardiologie (USIC) pour un problème coronarien et environ un tiers des accidents vasculaires cérébraux concernent des patients diabétiques. Cette maladie demeure la première cause d'amputation, de cécité acquise de l'adulte, de neuropathie douloureuse et enfin d'insuffisance rénale chronique terminale.

Le traitement actuel du diabète repose sur une stratégie multirisque, comportant des mesures hygiéno-diététiques, des antidiabétiques oraux (ADO) et de l'insuline pour contrôler seule la dérive glycémique, associées des traitements non hypoglycémiant à visée vasculaire. Ces thérapies ont fait la preuve d'une efficacité métabolique. Cependant, elles peuvent éventuellement entraîner des réactions indésirables telles que l'hypoglycémie modérée ou sévère, l'acidose lactique, le syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire, les réactions immunologiques et cardiovasculaires.

Parmi les ADO, les Sulfamides hypoglycémiant (ou les Sulfonylurées) constituent un élément principal des thérapies, actuellement bien validées, du DT2 ([Blicklé, 2011](#) ; [Scheen, 2015](#)), ces médicaments exercent leur effet anti-hyperglycémiant en se liant à un récepteur spécifique (SUR-1), exprimé sur la membrane plasmique de cellules β pancréatiques. La liaison de sulfonylurées aux récepteurs SUR-1 ferme les canaux potassiques K_{ATP} , associés à ces récepteurs, et ainsi provoque une séquence d'événements qui mènent à l'exocytose de vésicules sécrétoires d'insuline ([Tielmans et al., 2007a](#)). Certains auteurs ont démontré également que les sulfamides hypoglycémiant ont des effets insulino-sensibilisants ou insulino-mimétiques séparés de leur effet connu sur la cellule β ([Putnam et al, 1981](#)).

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier l'activité antidiabétique de certaines molécules de la classe de sulfonamides, récemment synthétisées au niveau du laboratoire de Chimie Bio-Organique Appliquée de l'Université Badji Mokhtar- Annaba.

Les objectifs proposés dans ce travail ont été :

- l'évaluation, *in vivo*, d'une éventuelle activité antidiabétique de quatre molécules de la classe de sulfonamides (deux sulfamides symétriques *N, N'*-bis-(alkyl) sulfamides et deux dérivés *N*-acylsulfonamides), en effectuant un suivi glycémique chez un modèle animal de diabète expérimental induit par la streptozotocine.
- l'évaluation des effets thérapeutiques ou iatrogènes de ces molécules, en analysant les paramètres biochimiques plasmatiques et du stress oxydant tissulaire (hépatique).
- La mise en évidence des altérations immuno-hématologiques et tissulaires que pourraient engendrer ces molécules en réalisant ;
 - Une numération et formule sanguine (NFS complète).
 - Et, une étude histopathologique de principaux organes métaboliques (pancréas, foie et reins).

Notre travail sera donc réparti en deux parties, initié par une synthèse bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre des généralités sur l'étiologie et le traitement de cette pathologie complexe. Le deuxième chapitre sera consacré à l'historique de la découverte, le mécanisme d'action thérapeutique, les effets indésirables, et la place actuelle de sulfonylurées dans le traitement du diabète. Dans la 2^{ème} partie, nous présentons le matériel et la méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail et finalement, nous joignons une discussion des résultats figurées et interprétées à cette partie pratique, qui illustrent, d'une part, les altérations entraînées par le diabète expérimental induit par la streptozotocine, et d'autre part, les effets des traitements ; sur les paramètres biologiques évalués chez les animaux diabétiques.

Chapitre I :
Généralités sur le diabète sucré

1. Historique

Les premiers signes du diabète ont été décrits il y a plus de 3 000 ans en Égypte par un scribe qui avait noté sur un papyrus que certaines personnes se mettaient subitement à boire et à uriner abondamment. Une centaine d'années avant notre ère, le nom de diabète fut pour la première fois prononcé par un médecin grec (**Arretée de Cappadoce**). Le terme de diabète qui vient du Grec *diabetes*, « passer à travers », était destiné à caractériser des personnes ayant une maladie dramatique qui entraînait une mort rapide chez des sujets jeunes. Ainsi était décrite 100 ans avant Jésus-Christ (J.-C.) une maladie qui est connue aujourd'hui comme étant le diabète de type 1. Ce n'est que 1 500 ans après J.-C. qu'un médecin européen (**Paracelsus**) mit en évidence dans les urines des diabétiques une substance qui se présentait comme une poudre blanche. À cette époque, cette substance qui était du glucose fut confondue avec du sel. Cent ans plus tard (1 600 après J.-C.), on découvrit que les urines des diabétiques avaient un goût sucré. Le terme de diabète sucré (*diabetes mellitus*) fut utilisé pour la première fois. Il fallut une centaine d'années supplémentaires (1 700 ans après J.-C.) pour que **Thomas Cawley** découvre que la substance présente en abondance dans l'urine des diabétiques était un sucre. En 1 800 après J.-C., **Langerhans** découvre en Allemagne les îlots pancréatiques qui porteront ultérieurement son nom. Au moment de la découverte de ces petites structures tissulaires dont la masse totale ne dépasse pas 2 g, Langerhans n'en identifia pas la fonction. Ce n'est que plusieurs décennies plus tard que **Von Mering** et **Minkowski** démontrèrent que l'exérèse totale du pancréas entraînait le diabète. En 1902, **Eugène Opie** découvre que les diabétiques sont porteurs d'une dégénérescence des îlots pancréatiques. À partir de cette date, le rythme des découvertes ne cesse de s'accélérer :

- en 1916, **Hopman** découvre que les îlots de Langerhans sont le site de la sécrétion insulinique ;

- en 1921, **Banting** et **Best**, à Toronto, extraient une substance du pancréas. Ils l'appellent « l'insuline » et l'utilisent pour la première fois pour traiter un patient atteint de diabète insulino-dépendant ;
- en 1936, le Danois **Hagedorn** met au point le procédé de fabrication des insulines retardées en ajoutant à l'insuline de la protamine et du zinc ;
- en 1943, **Marcel Janbon** et **Auguste Loubatières** découvrent à Montpellier les propriétés hypoglycémiantes des sulfamides, médicaments qui sont toujours d'actualité dans le traitement du diabète sucré ;
- en 1950, **Berson** et **Yalow**, aux États-Unis, mettent au point le dosage radio-immunologique de l'insuline. Cette découverte permettra ultérieurement de faire un bond considérable dans la compréhension de la physiopathologie des états diabétiques ;
- en 1955, **Sanger**, à Chicago, identifie la structure complexe de l'insuline ;
- dans les années 1970, on découvre que le diabète est une maladie auto-immune ;
- en 1975 sont mises en évidence les relations entre diabète de type 1 et gènes du système d'histocompatibilité majeur (système HLA). Le diabète de type 1 apparaît comme une maladie déclenchée par des facteurs d'environnement (agression virale) survenant chez des sujets génétiquement prédisposés ;
- en 1977 sont mis au point les premiers dosages de l'HbA1c (hémoglobine A glyquée). La technique sera ultérieurement améliorée pour aboutir aujourd'hui à un dosage fiable qui est largement utilisé en routine pour la surveillance de l'équilibre glycémique des diabétiques ;
- en 1979, les premières insulines produites par génie génétique sont développées. En quelques années ces insulines vont remplacer les insulines d'origine animale (de bœuf ou de porc) qui étaient utilisées jusqu'alors ;
- dans les années 1990, commence la production d'analogues de l'insuline à vie courte d'abord, puis à action prolongée ;

- au cours des dernières années, après une longue période de stagnation, de nouvelles médications antidiabétiques voient le jour : les glitazones, les inhibiteurs de la DPP-4 (*dipeptidyl-peptidase-4*) et les analogues du GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*). Le positionnement de ces médicaments dans la stratégie thérapeutique du diabète de type 2 est l'objet de réévaluations permanentes, motivées par les données des nouvelles études et par le retrait de certaines classes thérapeutiques comme la pioglitazone. Cette dernière a été retirée de la pharmacopée française en juin 2011. Il n'en reste pas moins que la plupart de ces médicaments sont venus compléter notre arsenal thérapeutique qui se limitait, en dehors de l'insuline, à la metformine et aux sulfamides hypoglycémisants pour les antidiabétiques oraux (Monnier et Colette, 2014).

2. Epidémiologie

Les derniers chiffres de la Fédération Internationale du Diabète (FID, 2015) indiquent que 8,8 % d'adultes – 415 millions de personnes – sont atteints de diabète. La majorité a entre 40 et 59 ans, et 75 % d'entre eux vivent dans des pays à faible et moyen revenu (Fig.1). Tous les types de diabète sont en progression, en particulier le diabète de type 2. Un chiffre alarmant qui devrait encore augmenter pour atteindre, 642 millions d'ici à 2040. Tant en termes humains que financiers, le fardeau du diabète est énorme puisqu'il provoquera 5 millions de morts et engloutira près de 673 milliards de dollars en dépenses de santé (11,6 % des dépenses totales dans le monde entier) en 2015. Ces dernières estimations de la FID donnent une indication inquiétante de l'impact futur du diabète en tant que menace majeure pour le développement mondial.

Le nombre estimé de personnes adultes (20-79 ans) atteintes de diabète en Algérie selon la 7^{ième} édition de l'atlas de diabète de la FID (2015) est de 2,37 millions.

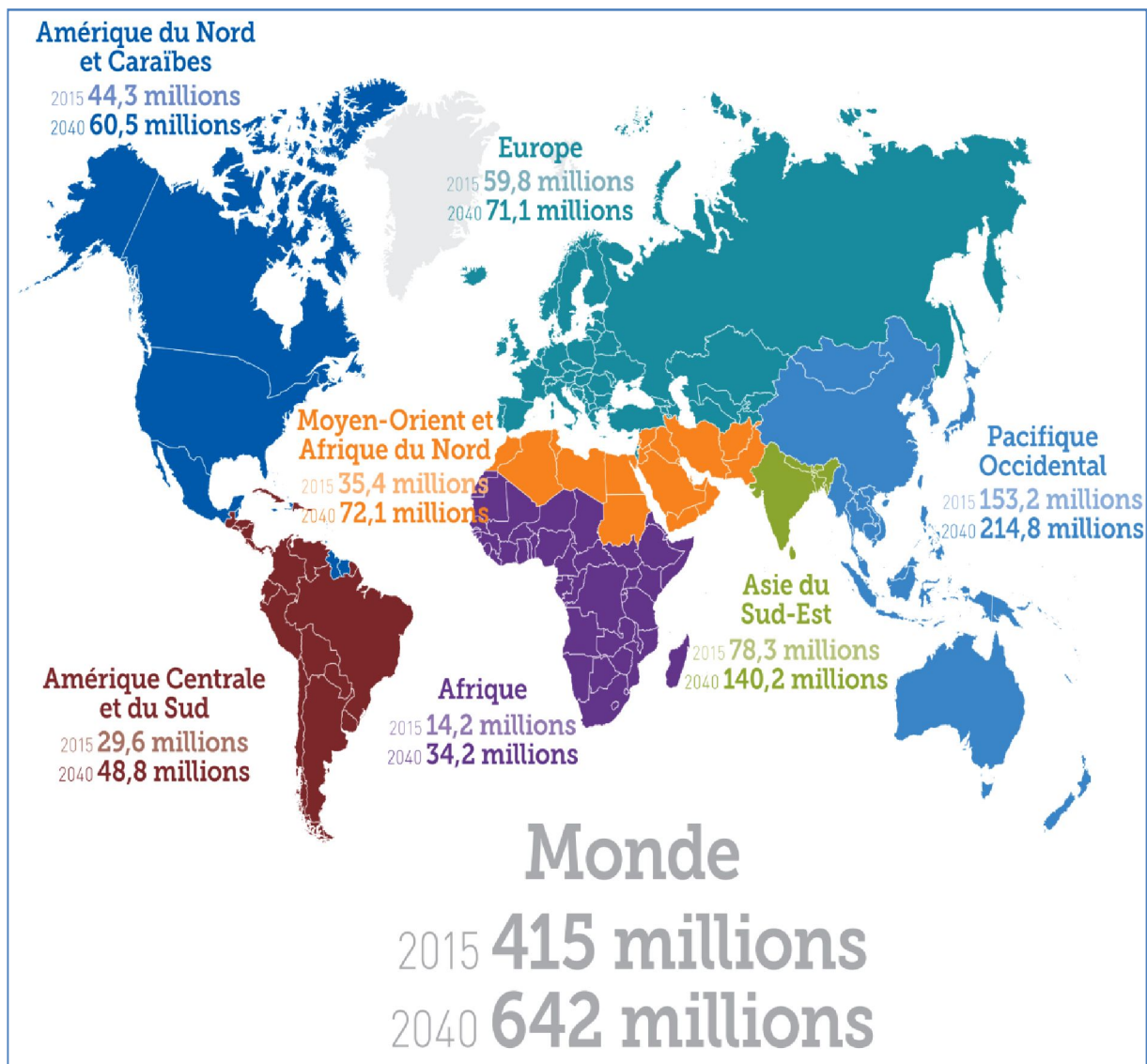


Figure. 1 : Nombre estimé de personnes (20-79 ans) atteintes de diabète à travers le monde et par région en 2015 et 2040 selon la Fédération Internationale du Diabète (FID, 2015).

3. Définition et aspects cliniques

Le diabète sucré est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique et une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il résulte d'une déficience de la sécrétion et/ou de l'activité de l'insuline (Bonnefont-Rousselot et al., 2004). Les symptômes reliés à cette hyperglycémie incluent la polyurie, la polydipsie, la perte de poids, la polyphagie dans certains cas ainsi qu'une vision trouble. À long terme, elle est associée aux atteintes, dysfonctionnements et insuffisances de divers organes, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins, et peut également

accompagner par une dépréciation de la croissance et une susceptibilité à certaines infections. En outre, le diabète non ou mal contrôlé peut entraîner des conséquences aigus tels que l'acidose diabétique (cétosique) ou le syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire non-cétosique (ADA : *American Diabetes Association*, 2014).

4. Classification étiologique

La classification actuelle du diabète sucré (**Tab.1**) repose sur des critères étiologiques et physiopathologiques selon la dernière révision de cette classification en 1997 par *The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* (1997). Elle distingue quatre grands types de diabète :

4.1. Diabète sucré de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) représente 5-10% des personnes diabétiques, actuellement, est défini comme la conséquence d'une destruction sélective des cellules β insulinosécrétrices (ADA, 2014). Auparavant, la définition du DT1 reposait sur des critères cliniques : diabète «insulinodépendant», de survenue brutale, chez un sujet jeune, avec tendance spontanée à la cétose (Dussoix et al., 1997). La mise en évidence d'autoanticorps dirigés contre les cellules d'îlots (ICA), et plus récemment d'anticorps spécifiques d'antigènes (décarboxylase de l'acide glutamique [GAD], IA-2), chez les sujets présentant un DT1 a permis d'établir une définition plus précise mais aussi plus large de la maladie : quelle que soit la présentation clinique du diabète, la présence de ces autoanticorps affirme son caractère auto-immun (diabète 1A). En l'absence de ces marqueurs, le diabète est dit de type 1 « idiopathique » (diabète 1B) (Dubois-Laforgue, 2007).

4.2. Diabète sucré de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) représente 90-95% des personnes diabétiques, précédemment dénommé diabète non-insulinodépendant, diabète de type II, ou diabète de la maturité (diabète de l'âge mûre) (ADA, 2014). Il s'agit d'une maladie : chronique hétérogène, au moins bipolaire, combinant un déficit insulinosécrétoire et une insulino-résistance, ces deux

composantes contribuant à l'hyperglycémie dans une proportion variable selon les patients et le stade de la maladie ; évolutive au cours du temps, essentiellement en raison du tarissement progressif de l'insulinosécrétion, ce qui impose une stratégie thérapeutique dynamique en fonction de la progression de l'affection ; dont le traitement peut entraîner diverses manifestations indésirables iatrogènes, les plus connues sont un risque hypoglycémique, parfois grave, et une prise de poids, souvent mal vécue et potentiellement délétère ; complexe, puisque non strictement limitée à l'hyperglycémie, mais généralement associée à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire (obésité abdominale, hypertension artérielle, dyslipidémie, etc.), ce qui requiert une prise en charge globale de type multirisques (Scheen et Paquot, 2009).

4.3. Diabète sucré gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) est un trouble de la tolérance glucidique, conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quel que soit le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum (WHO: *World Health Organization*, 1999). Cette définition proposée par l'Organisation mondiale de la santé est large puisqu'elle inclut à la fois les diabètes réellement induits par la grossesse (il s'agit alors du DG stricto sensu, transitoire) et les diabètes préexistants à la grossesse, mais méconnus et diagnostiqués seulement à l'occasion de celle-ci (souvent de type 2, plus exceptionnellement de type 1) (Deruelle et al., 2009).

4.4. Diabètes secondaires

Se sont les autres types de diabète (**Tab.1**); parmi lesquels des déficiences génétiques conduisant à un déficit en insuline, des altérations génétiques des cellules bêta pancréatiques, des diabètes mitochondriaux, et plusieurs endocrinopathies ou maladies du pancréas (Bonfont-Rousselot et al., 2004).

Tableau. 1 : Classification étiologique du diabète sucré (ADA, 2014).

I. Diabète sucré de type 1 : (destruction des cellules β , résultant généralement en une carence absolue en insuline)	
A. Médiation auto-immune.	
B. Idiopathique (rare, sans élément pour facteur auto-immun).	
II. Diabète sucré de type 2 : (peut aller d'une insulino-résistance prédominante associée à une carence relative en insuline à une anomalie prédominante de la sécrétion associée à une insulino-résistance.)	
III. Types spécifiques de diabète.	
<p>A. Anomalies génétiques de la fonction des cellules β</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. MODY 1: (Chromosome 20, HNF-4α; <i>Hepatocyte nuclear factor 1α</i>) 2. MODY 2: (Chromosome 7, glucokinase) 3. MODY 3: (Chromosome 12, HNF-1α) 4. MODY 4: (Chromosome 13, IPF-1; <i>insulin promoter factor-1</i>) 5. MODY 5: (Chromosome 17, HNF-1β) 6. MODY 6: (Chromosome 2, <i>NeuroD1</i>) 7. MODY 7: (Chromosome 9, <i>carboxyl ester lipase</i>) 8. Diabète néonatal transitoire (le plus souvent ZAC / HYAMI empreinte défaut sur 6q24) 9. Diabète néonatal permanent (le plus souvent KCNJ11 gène codant Kir6.2 sous-unité de canal K_{ATP} des cellules β) 10. ADN mitochondrial (Diabète mitochondrial) 11. Autres <p>B. Anomalies génétiques dans l'action de l'insuline</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Résistance à l'insuline de type A 2. Léprechaunisme 3. Syndrome de Rabson-Mendenhall 4. Diabète lipoatrophique 5. Autres <p>C. Maladies du pancréas exocrine</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pancréatite 2. Traumatisme/Pancréatectomie 3. Néoplasie 4. Fibrose kystique 5. Hémochromatose 6. Pancréatopathie fibrocalculeuse 7. Autres <p>D. Endocrinopathies</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acromégalie 2. Syndrome de Cushing 3. Glucagonome 4. Phéochromocytome 5. Hyperthyroïdisme 6. Somatostatine 7. Aldostérone 8. Autres. 	<p>E. Induit par des médicaments ou produits chimiques</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Vacor (rodenticide) 2. Pentamidine 3. Acide nicotinique 4. Glucocorticoïdes 5. Hormone thyroïdienne 6. Diazoxide 7. Agonistes β-adrénergiques 8. Thiazides 9. Inhibiteurs de la protéase 10. Stéroïdes 11. Autres <p>F. Infections</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Rubéole congénitale 2. Cytomégalovirus 3. Autres <p>G. Formes rares de diabète à médiation immune.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Syndrome de Stiff-Man « de l'homme raide » 2. Anticorps anti-récepteurs de l'insuline 3. Autres <p>H. Autres syndromes génétiques parfois associés au diabète</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Syndrome de down (Trisomie 21) 2. Syndrome de Klinefelter (2N=47, XXY) 3. Syndrome de Turner (2N=45,X) 4. Syndrome de Wolfram (DIDMOAD) 5. Ataxie de Friedreich 6. Chorée de Huntington 7. Syndrome de Laurence-Moon-Biedl 8. Syndrome de Prader-Willi 9. Porphyrie 10. Dystrophie myotonique 11. Autres
IV. Diabète gestationnel	
Les patients atteints de toute forme de diabète peuvent nécessiter un traitement à l'insuline à un certain stade de leur maladie. Une telle utilisation de l'insuline ne peut pas, en soi, être utilisée pour classer les patients.	

5. Sécrétions du pancréas endocrine et régulation de la glycémie

Le pancréas est une glande mixte :

- Exocrine productrice d'enzymes intervenant dans la digestion (c'est le seul organe producteur de lipase) ;
- Endocrine à l'origine de sécrétions hormonales et neuropeptidiques multiples.

Le pancréas comporte moins de 2 % de tissu endocrine, sous forme de plus d'un million d'îlots de Langerhans regroupant plusieurs types de cellules spécialisées qui sécrètent majoritairement de l'insuline, mais aussi du glucagon, de la somatostatine (ou *growth hormone inhibiting hormone*), et des neuropeptides dont le poly-peptide pancréatique (PP) et le *vasoactive intestinal peptide* (VIP) (Siliart et al., 2014).

5.1. Insuline

L'insuline est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans. C'est la principale hormone hypoglycémiante face à l'arsenal copieux des hormones et des neurotransmetteurs hyperglycémiantes (glucagon, adrénaline, hormone de croissance GH, cortisol, hormones thyroïdiennes, etc ...).

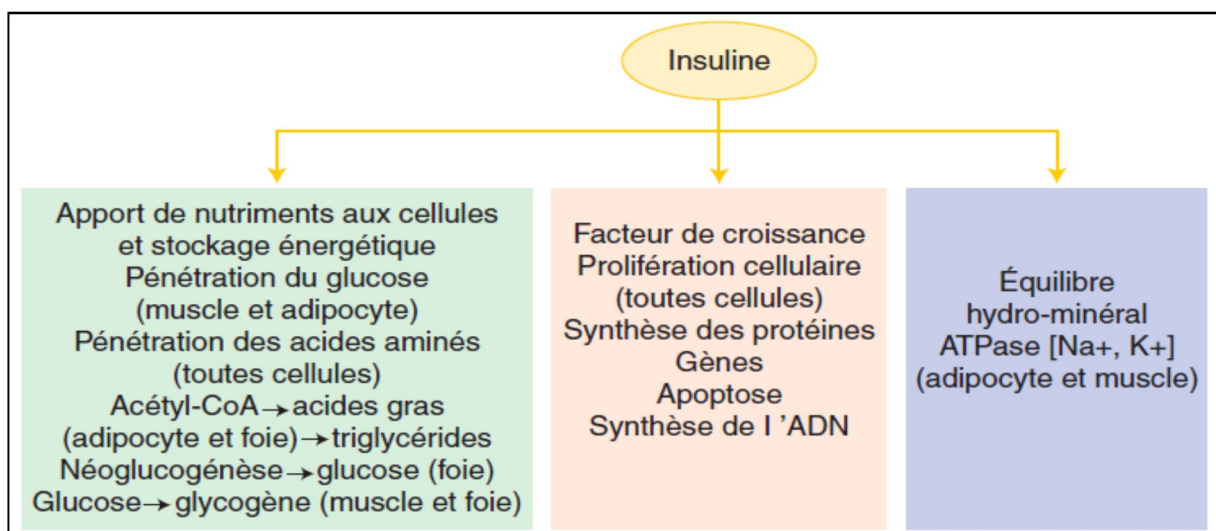


Figure. 2 : Principaux effets de l'insuline.

L'insuline a un effet métabolique très important aussi bien sur les glucides, les lipides ou les protéines, mais plus généralement c'est un facteur de croissance pour tout l'organisme et un régulateur de l'équilibre hydrominéral. **ATPase** : adénosine triphosphatase assurant l'échange **Na** : sodium / **K** : potassium ; **ADN** : acide désoxyribonucléique (Siliart et al., 2014).

L'insuline a un effet métabolique très important (**Fig. 2**) aussi bien sur les glucides, les lipides ou les protéines, mais plus généralement c'est un facteur de croissance pour tout l'organisme et un régulateur de l'équilibre hydrominéral. Cette hormone stimule la pénétration cellulaire du glucose dans la plupart des tissus périphériques (sauf le foie et le système nerveux), favorise la mise en réserve de glucose sous forme de glycogène dans le foie et dans le muscle, stimule le stockage des lipides (triglycérides) dans le tissu adipeux blanc et contribue fortement à la rétention protéique dans tous les tissus (Karaca et Magnan, 2013; Siliart et al., 2014).

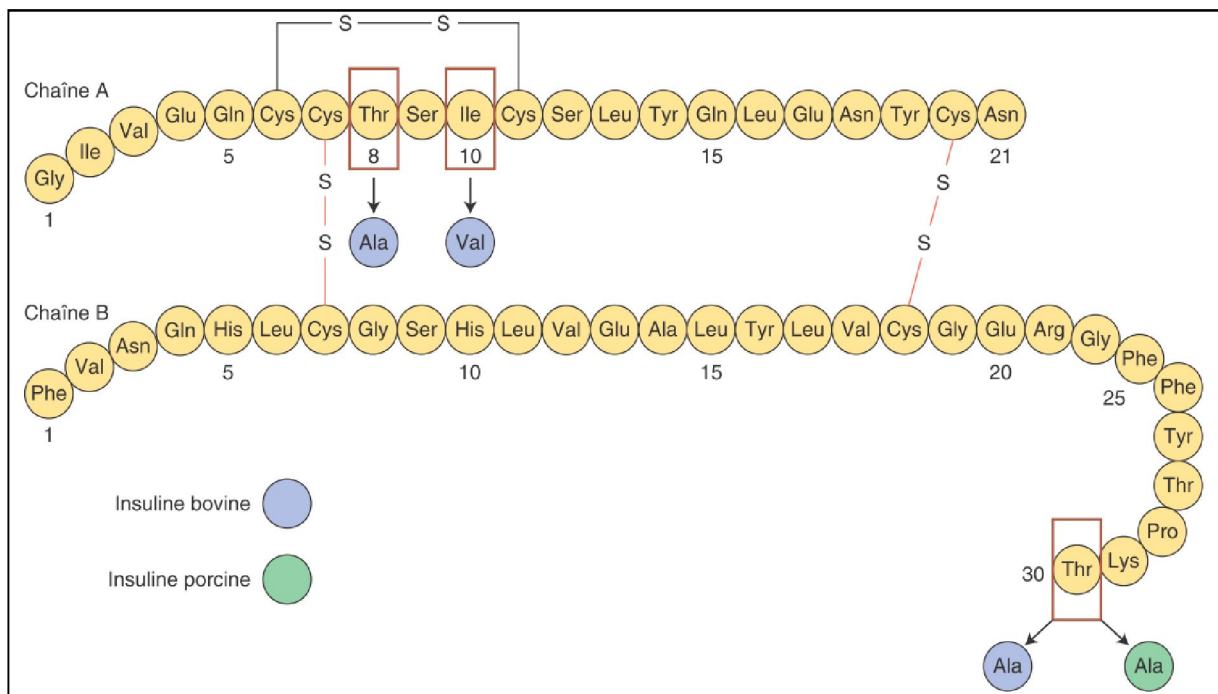


Figure. 3 : Structure primaire de l'insuline humaine.

L'insuline porcine ne diffère de l'insuline humaine que par un seul acide aminé (la thréonine en position 30 de la chaîne B est remplacée par une alanine). Trois acides aminés différencient l'insuline bovine de l'insuline humaine : une alanine et une valine, respectivement en position 8 et 10 de la chaîne A, remplacent la thréonine et l'isoleucine. L'acide aminé 30 de la chaîne B est une alanine au lieu d'une thréonine (Karaca et Magnan, 2013).

La séquence primaire en acides aminés de la molécule d'insuline a été établie en 1955 par le groupe de Sanger (Brown et al., 1955). Cette hormone est un polypeptide de taille plutôt modeste, d'un poids moléculaire d'environ 6 kDa. C'est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne A et la chaîne B, reliées entre elles par deux ponts

disulfures. Dans la plupart des espèces, l'espèce humaine comprise, la chaîne A comporte 21 acides aminés et la chaîne B en comporte 30. Un pont disulfure intracaténaire relie les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A. La structure primaire de l'insuline humaine et celle, très proche, de l'insuline porcine et de l'insuline bovine sont représentées sur la **Figure 3** (Karaca et Magnan, 2013).

La sécrétion de l'insuline est déclenchée par le glucose, mais aussi par les acides aminés, les acides gras ou les corps cétoniques, et le potassium. La libération sanguine d'insuline est aussi stimulée par de nombreuses hormones ou neurotransmetteurs : acétylcholine mais aussi catécholamines, *growth hormone* (GH), *adrenocorticotropin hormone* (ACTH), *thyroid stimulating hormone* (TSH), cortisol, glucagon et certains neuropeptides intestinaux. Un peptide, l'amyline, est synthétisé par les cellules β et cosécritée avec l'insuline. En cas de forte activité sécrétoire, elle peut se polymériser en substance amyloïde, et inhiber l'activité cellulaire β et la synthèse d'insuline (Siliart et al., 2014).

5.2. Glucagon

Il est sécrété par les cellules α des îlots de Langerhans. Au contraire de l'insuline, il favorise tous les processus hépatiques de libération du glucose sanguin, ainsi que d'acides gras libres, de corps cétoniques et d'acides aminés. La sécrétion du glucagon est stimulée essentiellement par l'hypoglycémie, les catécholamines, certaines hormones gastro-intestinales, la GH et les glucocorticoïdes (Siliart et al., 2014).

5.3. Somatostatine

Elle est sécrétée par les cellules γ des îlots de Langerhans. Elle inhibe aussi bien l'insuline que le glucagon, mais en revanche elle est globalement hypoglycémiant. Sa sécrétion est stimulée par les facteurs favorisant l'insulinosécrétion (hyperglycémie, glucagon, peptides gastro-intestinaux). Son rôle physiologique est de ralentir l'absorption des nutriments (Siliart et al., 2014).

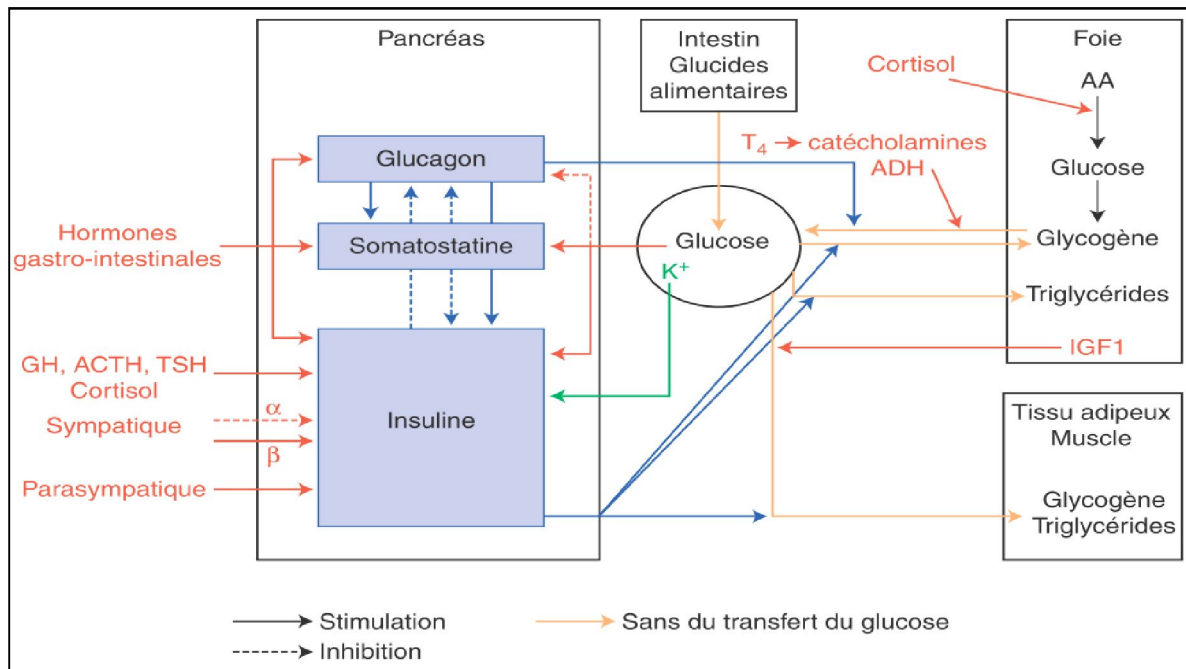


Figure. 4 : Rôle du pancréas endocrine dans la régulation de la glycémie.

L'insuline est la principale hormone hypoglycémisante, mais de nombreux facteurs de croissance insulino-mimétiques peuvent aussi entraîner la pénétration et l'utilisation du glucose par les cellules. Au contraire, le glucagon est hyperglycémiant et les deux sont inhibés par la somatostatine. **GH** : *growth hormone* ; **ACTH** : *adrenocorticotropic hormone* ; **TSH** : *thyroid stimulating hormone* ; **K** : potassium ; **T4** : thyroxine ; **ADH** : hormone antidiurétique ; **AA** : acides aminés ; **IGF1** : *insulinlike growth factor* (Siliart et al., 2014).

6. L'hyperglycémie au cours du diabète sucré

6.1. Les mécanismes

L'hyperglycémie du DT1 est due à une carence absolue en insuline résultant de la destruction des cellules β , généralement, par un mécanisme auto-immun, cependant, au cours du DT2 elle provient de l'association :

- de troubles fonctionnelles précoces de la cellule β (Perte du caractère pulsatile de l'insulinosécrétion basale, Perte du pic précoce de l'insulinosécrétion stimulée, l'insulinopénie franche à l'état basal et après charge en glucose et la sécrétion excessive de pro-insuline et pro-insuline clivée en 32-33 et en 64-65 de faible activité biologique) (Guillausseau et al., 2008) précédant le diagnostic de diabète (1,26 g/l à jeun à deux reprises) ;

- d'une insulino-résistance qui touche le foie (excès de production de glucose) et le muscle (captage insuffisant de glucose), ainsi que le tissu adipeux (excès de lipolyse avec taux élevés d'acides gras libres circulants, qui contribuent à accentuer l'insulino-résistance hépatique et musculaire et aggravent le «défaut» de la sécrétion d'insuline.) (Halimi et al., 2008) ;
- d'une hypersécrétion de glucagon, qui participe au maintien d'une production hépatique de glucose élevée (Gaborit et Andreelli, 2008) ;
- d'une diminution de « l'effet incrétine », et ainsi, la baisse de la stimulation de l'insulinosécrétion et l'inhibition de la sécrétion du glucagon (Halimi et al., 2008; Virally et al., 2007).

À tous ces facteurs, s'ajoutent des pertes quantitatives de cellule β conduisant, dans un délai plus ou moins long, tous les diabétiques de type 2 vers l'insulinorequérance (Halimi et al., 2008).

6.2. Les conséquences

L'hyperglycémie, même modérée dès la phase prédiabétique entraîne des conséquences délétères sur les cellules β tels que la glucotoxicité, la lipotoxicité, et le stress oxydatif en provoquant des altérations β -fonctionnelles et l'apoptose de ces cellules pancréatiques, en outre, ces altérations métaboliques peuvent être impliquées dans les complications diabétiques macro- et surtout micro-vasculaires (néphropathie, rétinopathie et neuropathie).

6.2.1. La glucotoxicité

Décrit des effets lents et progressifs de l'exposition prolongée des cellules β pancréatiques au taux élevés de glucose, telles que les anomalies de l'insulinosécrétion en réponse au glucose, l'expression altérée du gène de l'insuline, ainsi que, la diminution de la masse β -cellulaire (par les réactions d'apoptose). Les mécanismes biochimiques de la glucotoxicité interviendraient, entre autres, la génération d'un stress oxydatif chronique (Poitout et Robertson, 2008).

6.2.2. Le stress oxydatif

Dénoté également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants – antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec une perturbation des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Sergent et al., 2001). Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une sur-production des oxydants comme les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants, lesquels incluent des systèmes antioxydants endogènes enzymatiques, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (Gpx), ou des systèmes non-enzymatiques, comme le glutathion réduit (GSH), l'acide urique, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite) (NADPH), le coenzyme Q, l'albumine et la bilirubine. À ces antioxydants endogènes, s'ajoutent des molécules réductrices exogènes provenant de l'alimentation et englobant les vitamines C et E, les caroténoïdes et les polyphénols (Hokayem et al., 2012). Les ERO sont principalement représentées par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ces deux dernières molécules sont des radicaux libres (RL). Les radicaux libres ont pour caractéristique de présenter au moins un électron célibataire sur leur orbitale externe et de réagir avec les molécules environnantes pour appairer cet électron célibataire, ce qui leur confère une extrême réactivité et toxicité (Sergent et al., 2001).

Par rapport aux autres cellules de l'organisme, les cellules β sont plus sensibles au stress oxydatif pour trois raisons :

- une activité métabolique élevée ;
- une activité anti-oxydante faiblement exprimée : faible concentration en Cu/Zn superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase ;
- un faible contenu en glutathion réduit.

Cette fragilité des cellules β au stress oxydatif est suggérée d'être impliquée, par effet d'apoptose dans : l'apparition des troubles de l'insulinosécrétion et de la sensibilité à l'insuline qui caractérisent le pré-diabète, la progression du DT2 et la destruction des cellules β chez les modèles animaux de diabète expérimental sous l'effet d'agents diabétoènes comme l'alloxane et la streptozotocine (Lenzen, 2008).

6.3. La lipotoxicité

À l'état normal, les acides gras (AG) sont des sources énergétiques essentiels pour les cellules β , cependant, ils deviennent toxiques lorsqu'ils sont chroniquement présentes à des niveaux excessifs. L'exposition prolongée des cellules pancréatiques aux AG augmente la libération d'insuline basale, mais inhibe l'insulinosécrétion en réponse au glucose. En outre, les AG inhibent l'expression du gène de l'insuline en présence des niveaux élevés du glucose, en partie par la régulation négative du facteur de transcription (*pancreatic-duodenum homeobox-1*). Les taux élevés et chroniques d'AG entraînent également la mort cellulaire par apoptose *in vitro* et *in vivo* ; des îlots pancréatiques de rat (Poitout et Robertson, 2008).

7. Traitement du diabète

7.1. Traitement du diabète de type 1

Le DT1 nécessite une insulinsation. L'Insulinothérapie de référence est constitué par les schémas dits « basal-bolus » associant la délivrance d'un débit insulinique faible et constant (le « basal ») et des doses de charge juste avant les repas (les « bolus »). Ce schéma d'insulinothérapie, dit « basal-bolus » s'appuie sur la physiologie de la sécrétion d'insuline : sécrétion permanente d'insuline, avec des pics prandiaux, justifiant l'utilisation d'au moins deux types d'insuline. Le plus classique est celui qui est constitué par une injection d'un analogue lent de l'insuline le soir (avant le dîner ou avant le coucher), combinée à 3 injections d'un analogue rapide de l'insuline avant chaque repas. Ce type de schéma peut être effectué à l'aide de multi-injections sous-cutanées privilégiant l'utilisation d'analogues lents ou rapides

de l'insuline ou par pompe à insuline externe diffusant en continu un analogue rapide de l'insuline avec bolus d'insuline au moment des repas (Sola et al., 2006).

Quel que soit le type d'administration de l'insuline choisi, pompe ou injections multiples, le patient doit apprendre à gérer en autonomie le choix des doses d'insuline, à adapter son traitement aux conditions alimentaires, aux divers types d'activités physiques et à des situations critiques intercurrentes.

Les schémas non physiologiques du DT1 (consistaient à injecter soit une insuline lente une fois par jour, soit une insuline intermédiaire 2 fois par jour) qui avaient été utilisés pendant de nombreuses années sont aujourd'hui abandonnés (Sola et al., 2006).

7.2. Traitement du diabète de type 2

Le traitement du DT2 Comporte une intervention sur le mode de vie du patient associé à un traitement médicamenteux hypoglycémiant et non-hypoglycémiant.

7.2.1. Traitement non médicamenteux (intervention sur le mode de vie)

L'intervention sur le mode de vie est une mesure thérapeutique essentielle chez tout diabétiques de type 2. Elle doit être initiée dès le diagnostic du diabète et ne pas être abandonnée au cours du suivi. Elle inclut un apport calorique réduit dans le cadre d'une alimentation saine et équilibrée ainsi qu'un exercice physique régulier (au moins 150 minutes par semaine), pour atteindre une réduction d'au moins 5 à 10 % du poids corporel initial (Sigal et al., 2006). Ces mesures permettent initialement une nette amélioration de la glycémie et des facteurs de risque cardio-vasculaires souvent présents chez les diabétiques de type 2 (hypertension, dyslipidémie), ainsi qu'une réduction de l'HbA1c de 1 à 2 % (Nathan et al., 2009). La mise en œuvre pratique étant souvent difficile, en outre elles ne permettent que chez 10 à 20 % de tous les diabétiques de type 2 un contrôle adéquat durable de la glycémie. Par conséquent, il faut y ajouter suffisamment tôt un traitement médicamenteux (Klein et al., 2004).

7.2.2. Traitement médicamenteux

La stratégie du traitement médicamenteux comporte deux volets (Charbonnel, 2008) :

- 1) Hypoglycémiant (**Tab.2**) a pour objectif la normoglycémie.
- 2) Non hypoglycémiant vise à réduire les facteurs de risque cardio-vasculaires (Hypertension, Dyslipidémie).

L'objectif de cette stratégie est de normaliser la glycémie, ce qui prévient au moins les complications microvasculaires de la maladie (Charbonnel, 2008). L'objectif glycémique recommandée par le consensus ADA-EASD (*American Diabetes Association/ European Association for the Study of Diabetes*) est un taux d' l'hémoglobine glyquée (HbA1c) < 7 % pour la plus part des patients (Nathan et al., 2009).

7.2.2.1. Les sulfamides hypoglycémiantes (Les sulfonylurées)

Les sulfonylurées (SU) ont été les premiers antidiabétiques oraux (ADO) disponibles depuis plus de 50 ans (Tielmans et al., 2007a). Ils agissent exclusivement en stimulant l'insulinosécrétion prandiale et plus modérément à distance des repas. Leur pouvoir hypoglycémiant est puissant et démontré (Halimi et al., 2008). La baisse attendue de l'HbA1c est de l'ordre de 1 à 2 % (Nathan et al., 2009). Ces molécules stimulent l'insulinosécrétion en se liant à un récepteur membranaire spécifique (SUR1), exprimé sur la membrane plasmique des cellules β des îlots de Langerhans. Ce récepteur est associé à un canal potassique dépendant de l'ATP (K_{ATP}), la fixation des SU aux récepteurs SUR ferme les canaux K_{ATP} et entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique, l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, l'intrusion du calcium Ca^{2+} , et enfin, l'exocytose des vésicules et la libération d'insuline (Tielmans et al., 2007a). Leur effet sur la sécrétion d'insuline s'exerçant quel que soit le niveau glycémique, ainsi, leur principal risque est l'hypoglycémie (Halimi et al., 2008), Il s'agit le plus souvent d'accidents mineurs survenant en fin d'après-midi, favorisés par une activité physique inhabituelle, le jeûne et la polymédication. Ils surviennent préférentiellement chez les sujets âgés, et/ou ayant une insuffisance rénale

(Tielmans et al., 2007a). En outre, les SU sont responsables d'une discrète prise de poids et peuvent constituer un obstacle à l'amaigrissement (Halimi et al., 2008). Les autres effets indésirables sont extrêmement rares : ictère choléstatique et hépatite cytolytique (glibenclamide) ; prurit, urticaire, érythème réversibles à l'arrêt du traitement; exceptionnels vascularites et syndrome de Lyell ; thrombopénie, agranulocytose, leucopénie ou anémie ; hyponatrémie de dilution, effet antabuse (Tielmans et al., 2007a).

7.2.2.2. *Les glinides*

Les glinides (répaglinide (**Fig.5**), natéglinide, mitiglinide) sont des insulino-sécrétagogues non sulfamidés, disponibles depuis la fin des années 1990. Les glinides ont les mêmes modes d'action que les SU, mais les sites de fixation semblent différents (Tielmans et al., 2007a). Ils agissent plus rapidement et plus brièvement sur la sécrétion d'insuline et ciblent plus spécifiquement la phase d'hyperglycémie postprandiale. Leur action plus courte réduit le risque hypo-glycémique mais oblige à plusieurs prises quotidiennes (une avant chaque repas) (Halimi et al., 2008).

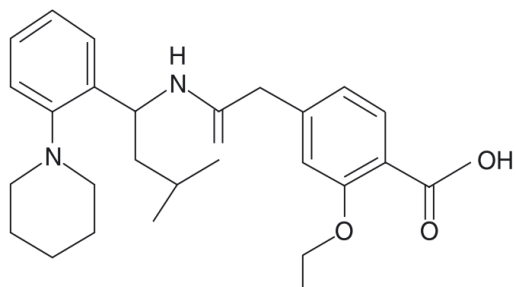


Figure. 5 : Formule chimique du répaglinide (Blicklé, 2011).

7.2.2.3. *La metformine*

La metformine (diméthylbiguanide) (**Fig. 6**), molécule de la classe des biguanides, est utilisée depuis 30 ans pour traiter l'hyperglycémie des diabétiques de type 2 (Kirpichnikov et al., 2002). Elle abaisse le taux d'HbA1c de 1 à 2 % (Nathan et al., 2009). Elle est considérée comme un traitement de l'insulinorésistance ; en réalité, son principal effet démontré est sa capacité à réduire l'excès de production hépatique de glucose (par inhibition de la néoglucogenèse) (Halimi et al., 2008). Elle augmente le captage musculaire du glucose et la

synthèse musculaire de glycogène, inhibe la lipolyse au niveau du tissu adipeux et la production de VLDL (lipoprotéines de très faible densité) par le foie (Kirpichnikov et al., 2002). Son action à l'échelle moléculaire pourrait s'exercer *via* une protéine kinase activée par l'AMP, l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*), par inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et à l'augmentation d'AMP (Zhou et al., 2001 ; Guillausseau, 2003). La metformine est neutre ou favorable au plan pondéral ainsi qu'elle n'entraîne aucune stimulation de la sécrétion d'insuline (pas de risque hypo-glycémique) (Halimi et al., 2008). Les effets secondaires sont des troubles digestifs (bénins mais fréquents: anorexie, nausées, vomissements, diarrhée) et l'acidose lactique, par accumulation d'acide lactique due à l'inhibition de la néoglucogenèse. Cette complication est rare avec la metformine mais grave: la mortalité est de 30 à 50 % (Guillausseau et Laloï-Michelin, 2003). La durabilité de son effet ainsi que son efficacité sur le contrôle glycémique et la courbe pondérale ont été globalement en faveur de la metformine comme monothérapie de première intention pour le traitement du DT2 (Halimi et al., 2008).

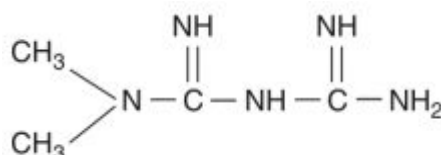


Figure. 6 : Formule chimique de la metformine (Blicklé, 2011).

7.2.2.4. Les glitazones (ou thiazolidinediones)

Les glitazones (pioglitazone et rosiglitazone) (**Fig. 7**) sont des médicaments hypoglycémisants oraux relativement récents. La première de ces molécules, la troglitazone, fut commercialisée aux États-Unis en 1997 avant d'être interdite plus tard en raison de son hépatotoxicité (Pillon et al., 2014). Ils sont des insulinosensibilisateurs purs agissant en activant des récepteurs nucléaires, les PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ*) principalement exprimés dans le tissu adipeux (Girard, 2001 ; Guillausseau, 2003). Ils entraînent la différenciation de jeunes adipocytes, ce qui conduit à une baisse des acides gras libres circulants, à une diminution de l'insulinorésistance musculaire et de la production

hépatique de glucose, ainsi qu'à la baisse de certaines cytokines pro-inflammatoires (Yki-Järvinen, 2004). En monothérapie, leur activité hypoglycémiante est plus faible que celle des sulfonylurées et de la metformine. Les effets secondaires sont une rétention hydrosodée responsable de prise de poids, d'œdèmes et d'anémie par hémodilution, avec risque d'aggravation d'une insuffisance cardiaque (Guillausseau, 2003). Les glitazones ont été retirés du marché européen en 2011 (Pillon et al., 2014).

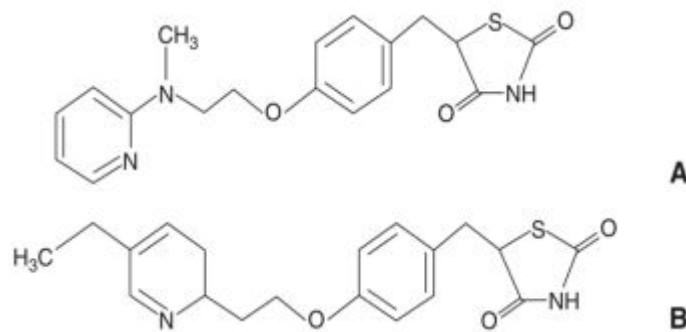


Figure. 7 : Formules chimiques de la rosiglitazone et de la pioglitazone (Blicklé, 2011).

(A) ; Rosiglitazone, (B) ; Pioglitazone.

7.2.2.5. Les inhibiteurs des α -glucosidases

Deux molécules de cette classe thérapeutique sont actuellement disponibles : l'Acarbose et le Miglitol (Fig. 8). Se sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles des α -glucosidases intestinales : enzymes hydrolysant les poly-, oligo- et disaccharides en monosaccharides absorbables (glucose, fructose).

L'Acarbose est de structure pseudo-tétra-saccharidique, il n'est pratiquement pas absorbé et est éliminé dans les selles à 80 % sous forme inchangée. Seuls 20 % de la dose subissent une dégradation dans le tube digestif, formant des métabolites partiellement absorbés et éliminés dans les urines (Blicklé, 2011).

Le Miglitol est de structure monosaccharidique, il est en revanche absorbé en quasi-totalité par un mécanisme saturable au niveau du tractus digestif supérieur. Cette absorption est sans conséquences sur son action thérapeutique qui s'effectue uniquement dans la lumière intestinale, car la pénétration cellulaire du produit est extrêmement faible. Le miglitol est éliminé par voie rénale sous forme inchangée (Blicklé, 2011).

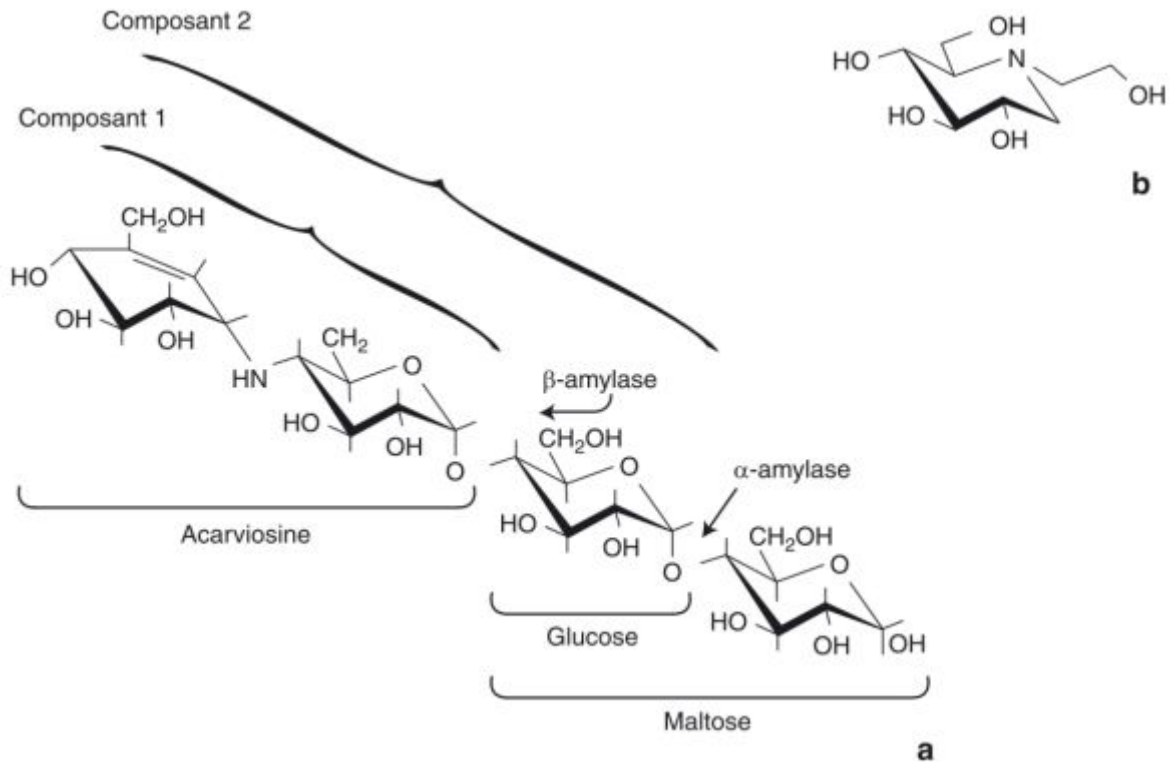


Figure. 8 : Formules chimiques de l'acarbose, de ses produits de dégradation et du miglitol.

(a) ; l'acarbose et ses produits de dégradation, (b), le miglitol (Blicklé, 2011).

Ces molécules d'origine bactérienne jouent un rôle de faux substrat, retardant ainsi l'hydrolyse des glucides complexes et réduisant l'hyperglycémie postprandiale. Le traitement de première intention en monothérapie par l'acarbose ou le miglitol provoque une diminution de l'HbA1c de 0,2 à 1 %, Ils sont donc moins efficaces dans cette indication que la metformine et les insulinosécrétagogues (Tielmans et al., 2007b). Certains auteurs suggèrent de les réserver aux patients dont l'hyperglycémie postprandiale est prédominante (Monnier et al., 2003). Ainsi, dans des situations d'échec secondaire des insulinosécrétagogues ou de la metformine, l'ajout d'acarbose ou de miglitol améliore le contrôle glycémique (Salman et al., 2001). Leurs effets secondaires sont digestifs (jusqu'à 50 % des cas) : flatulence, météorisme, diarrhée (Guillausseau, 2003). Ces troubles sont minimisés par une posologie progressive qui permet à la flore bactérienne de s'adapter au traitement. Elles s'améliorent généralement au cours du temps mais peuvent nécessiter la réduction des doses (Tielmans et al., 2007b).

7.2.2.6. « Les gliptines » les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP4)

Trois inhibiteurs compétitifs, puissants et sélectifs de la DPP4 (l'enzyme dégradant physiologiquement le GLP-1« *glucagon-like peptide-1*») sont actuellement disponibles: la sitagliptine (**Fig. 9**), la vildagliptine et la saxagliptine (Blicklé, 2011). Elles constituent la première approche visant à restaurer l'effet incrétine chez le diabétique de type 2. En augmentant les concentrations circulantes de GLP-1, les gliptines permettent d'abaisser la glycémie à jeun et les glycémies postprandiales par le biais d'une augmentation de la sécrétion d'insuline et d'une diminution de celle de glucagon. La baisse attendue de l'HbA1c est de 0,6 à 1,1 %, et plus si l'HbA1c de départ est supérieure à 9 ou 10 %. Elles offrent trois avantages : L'administration par voie orale, l'absence de tout risque d'hypoglycémie (grâce à leur effet glucodépendant sur les cellules α et β des îlots) et la neutralité pondérale (ou parfois une discrète perte de poids). Les inhibiteurs des DPP4 sont d'un maniement particulièrement simple, leur utilisation ne nécessitant aucune adaptation posologique avec une tolérance remarquable par rapport aux sulfamides et aux glinides, Ainsi ils entrent en concurrence avec ces médicaments au stade de l'échec de la monothérapie initiale par metformine (Halimi et al., 2008).

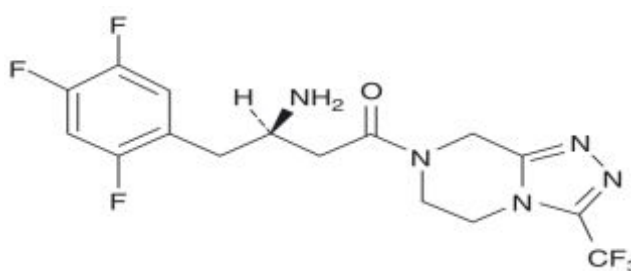


Figure. 9 : Formule chimique de la sitagliptine (Blicklé, 2011).

7.2.2.7. Les analogues du GLP-1« *glucagon-like peptide-1* »

Le recours à des analogues du GLP-1 résistant à l'action des DPP 4 et reproduisant les effets de l'hormone, constitue une seconde approche visant à restaurer l'effet incrétine chez le diabétique de type 2 (Halimi et al., 2008). Deux molécules appartenant à cette classe thérapeutique sont actuellement disponibles : l'exénatide et le liraglutide (**Fig. 10**) (Blicklé, 2011).

L'exenatide, est une forme synthétique de l'exendine-4, peptide isolé à partir de la salive d'un lézard venimeux d'Amérique, *Heloderma suspectum* (Gila Monster), qui offre une analogie de structure de 52 % avec le GLP-1, 1, résistant à l'action de la DPP-4, avec une demi-vie terminale moyenne de 2,4 heures (Blicklé, 2011).

L'exénatide exerce tous les effets obtenus avec GLP-1:

- stimulation glucodépendante de la sécrétion d'insuline avec un effet prononcé sur la première phase et augmentation de la synthèse hormonale ;
- freinage également glucodépendant de la sécrétion de glucagon ;
- stimulation de la néogenèse des cellules β des îlots de Langerhans, démontrée chez l'animal ; une amélioration de la fonction β -cellulaire est toutefois suggérée par l'observation humaine;
- ralentissement de la vidange gastrique ;
- diminution de la prise alimentaire.

Il résulte de l'action, sur le couple insuline-glucagon, une diminution de la production hépatique du glucose, responsable d'une baisse de la glycémie basale. En outre, l'effet sur la vidange et la majoration du pic précoce d'insulinosécrétion expliquent l'abaissement des glycémies postprandiales (Blicklé, 2011).

Il ne peut s'administrer que par voie sous-cutanée (Halimi et al., 2008). la réduction d'HbA1c est de 0,8 % à 1,7 % associée à une perte de poids de 1,75 à 3,8 kilos à la dose de deux fois 10 μ g par jour en injection sous-cutanée (DeFronzo et al., 2005 ; Zinman et al., 2007). Le risque d'hypoglycémie est faible et même nul, cependant, ils peuvent entraîner des effets indésirables, principalement d'ordre digestif, en particulier des nausées et des vomissements survenant chez 10 à 30 % des patients en début de traitement. Des anticorps antiexenatide apparaissent chez environ 40 % des patients traités mais sans effet délétère connu à ce jour (Halimi et al., 2008).

Le liraglutide est un analogue vrai du GLP-1 substitué sur le résidu 34 et greffé d'un acide gras en C16, facilitant sa liaison à l'albumine et le protégeant de l'action de la DPP-4. Sa demi-vie est ainsi de 13 heures, permettant son administration une fois par jour. Ses propriétés pharmacodynamiques sont identiques à celles de l'exénatide (Blicklé, 2011).

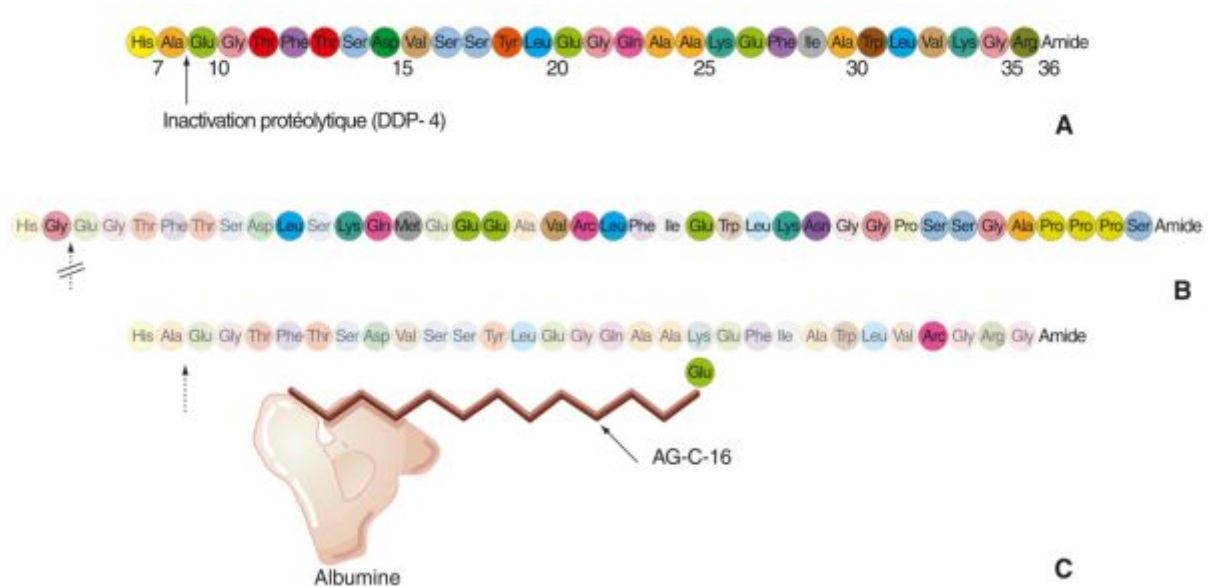


Figure. 10 : Formule chimique du *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) humain, de l'exénatide et du liraglutide. (A) ; GLP-1 humain, (B) ; Exénatide, (C) ; Liraglutide. **DPP-4** : dipeptyl-peptidase-4 (Blicklé, 2011).

7.2.2.8. Les analogues d'Amyline (Le Pramlintide)

Le pramlintide est un analogue synthétique de l'amyline une hormone sécrétée par la Cellule β . Il est administré par voie sous-cutané avant le repas, ralentit la vidange gastrique, inhibe la production du glucagon dans un mode glucodépendant et, d'une manière prédominante, diminue l'hyperglycémie postprandiale (Schmitz et al., 2004). Dans les études cliniques, l' HbA1c a été diminué de 0.5 à 0.7 % (Riddle et al., 2007). L'effet secondaire clinique majeur de ce médicament est de nature gastro-intestinale. Environ 30% de participants traités dans les essais cliniques ont développé des nausées, cet effet secondaire a tendance à diminuer avec le temps pendant la thérapie. La perte de poids associée avec ce médicament est environ de 1 à 1.5 kg après 6 mois de traitement; comparable à l'exénatide (Nathan et al., 2009).

7.2.2.9. *Les inhibiteurs du SGLT-2 « Sodium-Glucose transporter-2 »*

La dapagliflozine est une nouvelle molécule ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) (Forxiga® 5 et 10 mg, voie orale, 1 prise/jour). Il s'agit d'un inhibiteur sélectif et réversible du cotransporteur (Sodium-Glucose) SGLT-2, transporteur impliqué dans la réabsorption du glucose dans le tubule rénal proximal, diminuant ainsi la réabsorption du glucose, ce qui provoque une augmentation de son excrétion urinaire. L'action des inhibiteurs de SGLT-2 ne dépend ni de la présence d'insuline, ni de la sensibilité à l'insuline du tubule proximal. Cela permet d'envisager de traiter tous les diabétiques, y compris les diabétiques de type 2 avec insulino-résistance significative (patients insulinotraités ou non), qui constituent actuellement la population cible de cette nouvelle classe thérapeutique. Dans les essais cliniques, des effets indésirables sont constatés : infections urinaires et génitales, hypotension, insuffisance rénale fonctionnelle par déshydratation, nausées, vertiges, etc. L'intérêt de cette molécule est qu'elle s'attaque à une nouvelle cible (innovante), mais il faudra étudier à long terme ses bénéfices sur la morbi-mortalité cardiovasculaire et sa tolérance (Pillon et al., 2014).

7.2.2.10. *L'insuline*

Les patients diabétiques de type 2 peuvent avoir recours à une insulinothérapie transitoire ou nécessiter une insulinothérapie définitive. L'insulinothérapie transitoire est nécessaire dans les situations de stress ou certaines situations aiguës tel est le cas d'une infection grave, d'un accident sévère cardiovasculaire, d'un séjour en réanimation ou en période chirurgicale. Qui contre-indiquent la poursuite des ADO et rendent le traitement par insuline obligatoire afin de contrôler rapidement l'hyperglycémie pour diminuer la morbi-mortalité. L'insulinothérapie définitive est un «concept thérapeutique» assez récent mais souvent nécessaire à moyen terme chez les patients diabétiques de type 2 (Virally et al., 2005), elle doit être débutée lorsque l'HbA1c dépasse 7 % malgré une utilisation optimale des ADO (Halbron et al., 2007).

Tableau. 2. Caractéristiques des antidiabétiques (Pillon et al., 2014).

Classe pharmacologique	Exemple de molécules	Mécanisme d'action	Voie	Nombre de prises par jour	Effets cardiovasculaires	Avantages	Inconvénients
Sulfamides hypoglycémiant	Gliclazide, glipizide, glibémipiride, glibenclamide	Augmentation de la sécrétion d'insuline	Orale	1 à 2 prises/jour	Pas de bénéfice cardiovasculaire montré dans les études cliniques Pas d'effets nocifs démontrés	Bonne tolérance Faible coût	Hypoglycémie Augmentation du poids Nécessité de surveiller les glycémies Initiation du traitement de manière prudente (nécessité d'une titration)
Biguanides	Métformine	Effet antihyperglycémiant	Orale	1 à 3 fois/jour	Réduction de la morbi-mortalité cardiovasculaire (infarctus du myocarde) dans l'étude clinique <i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i> (UKPDS)	Bonne tolérance à long terme Pas de prise de poids Faible risque d'hypoglycémie Faible coût	Diarrhées +++ Possible lien avec la survenue d'une acidose lactique À éviter en cas d'insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine < 30 mL/min)
Inhibiteurs des alpha-glucosidases	Acarbose, miglitol	Inhibition des alpha-glucosidases intestinales : diminution de la dégradation des carbohydrates en monosaccharides absorbables	Orale	Jusqu'à 3 fois/jour	Inconnu	Pas de prise de poids Faible coût	Flatulences Diarrhées
Glinides	Répaglinide	Stimulation de la sécrétion d'insuline	Orale	Prise à chaque repas	Pas d'effets bénéfiques retrouvés	Action hypoglycémiant rapide	Prise de poids à long terme Hypoglycémie Nécessité d'une surveillance des glycémies
Analogues du GLP-1	Exénatide, liraglutide	Augmentation de la sécrétion d'insuline et suppression de la sécrétion du glucagon	Sous-cutanée	1 à 2 injections/jour	Inconnu Les études chez l'animal suggèrent un effet bénéfique sur la survenue d'un infarctus du myocarde et d'une insuffisance cardiaque congestive	Pas de prise de poids Faible risque d'hypoglycémie	Pancréatite Lien avec un cancer médullaire de la thyroïde à confirmer À éviter en cas d'insuffisance rénale
Inhibiteurs de la DPP-4	Sitagliptine, vildagliptine, saxagliptine	Augmentation des concentrations endogènes d'incrétines	Orale	1 fois/jour	Inconnu mais pas d'évidence d'effets néfastes cardiovasculaires	Faible risque d'hypoglycémie	Pancréatite
Inhibiteurs de SGLT-2	Dapagliflozine	Réduction de la réabsorption du glucose au niveau du tubule contourné proximal	Orale	1 fois/jour	Inconnu	Perte de poids	Polyurie Insuffisance rénale fonctionnelle par déshydratation Hypotension artérielle Infections urinaires Mycoses vaginales À éviter en cas d'insuffisance rénale modérée à sévère
Insuline		Active directement le récepteur à l'insuline	Sous-cutanée	1 à 4 injections/jour en fonction de la durée d'action de l'insuline	Pas d'effets néfastes au niveau cardiovasculaire	Bon équilibre glycémique comparativement aux autres médicaments	Prise de poids Hypoglycémies Nécessité d'une surveillance des glycémies

DPP-4 : dipeptidyl peptidase-4 ; GLP-1 : glucagon-like peptide-1 ; SGLT-2 : sodium-glucose de type 2.

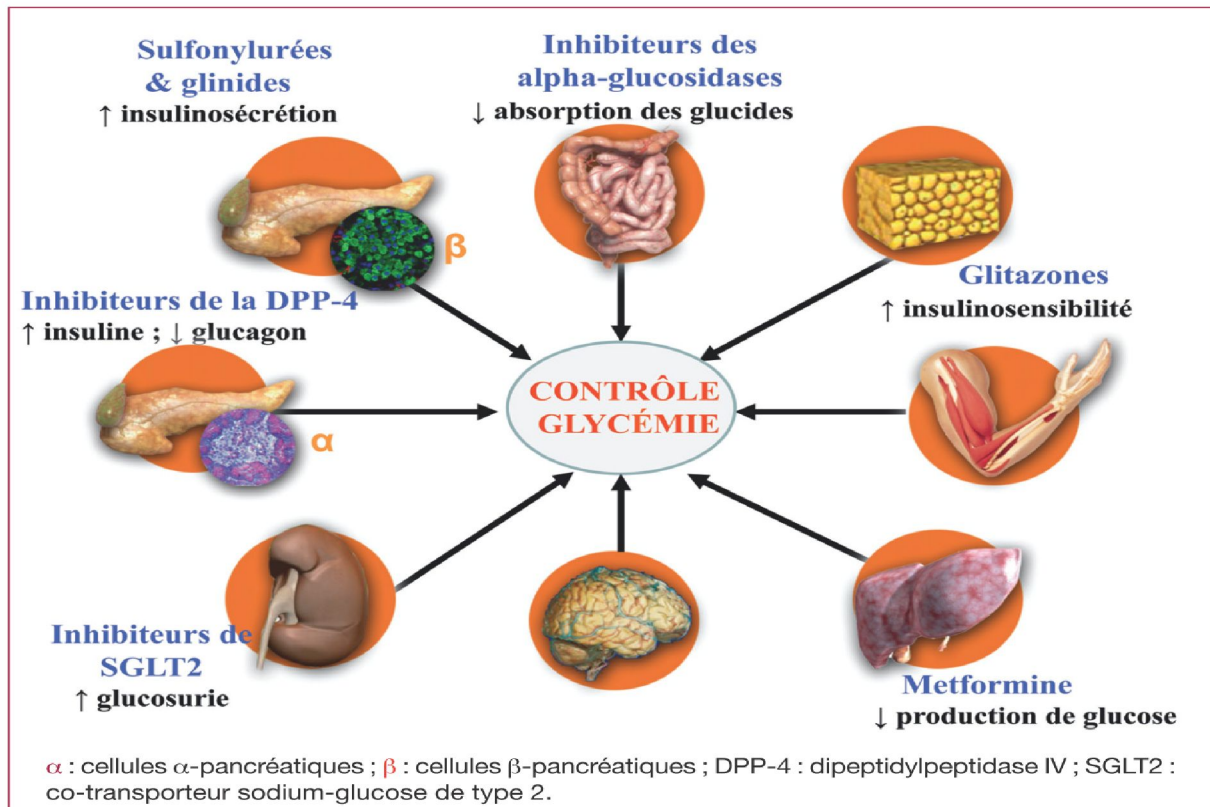


Figure. 11 : Illustration des sites et des mécanismes d'action principaux des différentes classes d'antidiabétiques oraux (Scheen, 2015).

8. Diabète expérimental induit par les substances chimiques

L'installation du diabète chez les modèles animaux se fait soit spontanément soit par induction chimique, chirurgicale, régime alimentaire hypercalorique ou par génie génétique. Actuellement, La plupart des recherches de diabète expérimental sont effectuées sur des rongeurs, bien que certaines études soient encore réalisées chez de plus grands animaux.

Les substances chimiques diabétogènes les plus utilisées sont l'alloxane et la streptozotocine. Les deux sont des analogues cytotoxiques de glucose, qui entraînent la destruction des îlots de Langerhans par nécrose, après leur accumulation préférentielle dans les cellules β du pancréas via le transporteur de glucose GLUT2 (Lenzen, 2008). Les animaux rendus expérimentalement diabétiques par l'alloxane ou la streptozotocine peuvent présenter les mêmes symptômes du diabète humain tels que : l'hyperglycémie chronique, la glycosurie, la polyphagie, la polydipsie, la polyurie, la perte du poids....etc (Srinivasan et Ramarao, 2007).

8.1. Modèle induit par l'alloxane

L'alloxane ou (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine;5,6-dioxyuracil) est un composé chimique décrit initialement par Brugnatelli en 1818 (Szkudelski, 2001). Sa structure chimique est représentée par la (Fig.12A).

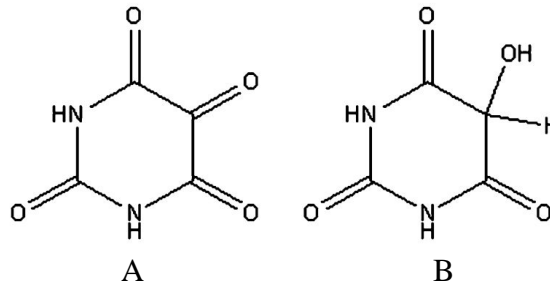


Figure. 12 : Formule chimique de l'alloxane et de l'acide dialurique. (A) ; Alloxane, (B) ; acide dialurique (Lenzen, 2008).

Le mot Alloxane est employé pour la première fois par Wöhler et Liebig en 1838, elle est issu de la combinaison des deux mots Allantoïne (produit d'oxydation de l'acide urique) et acide oxalurique (dérivé de l'acide oxalique et de l'urée) (Lenzen et Panten, 1988). Les propriétés diabétogènes de ce composé ont été rapportées plusieurs années plus tard par Dunn, et al (1943), qui ont étudié l'effet de son administration chez le lapin. Depuis lors, l'alloxane a été couramment utilisé pour induire le diabète chez les modèles animaux rongeurs et non rongeurs.

L'effet diabétogène de l'alloxane est principalement attribuable à la absorption rapide par les cellules β et la formation de radicaux libres, dont les cellules β ont des mécanismes de défense faible contre eux (King, 2012). Avant la formation de ces derniers, L'alloxane va d'abord oxyder les groupements thiols (SH) trouvés au niveau des agents réducteurs de la cellule β de Langerhans. Ces agents réducteurs sont le glutathion réduit (GSH), la cystéine, les enzymes sulfhydriles, l'acide ascorbique et surtout la glucokinase. Après cette étape, L'alloxane est réduit en acide dialurique capable de se ré-oxyder en alloxane. Ce dernier et son produit de réduction créant ainsi un cycle redox produisant des radicaux intermédiaires d'alloxane (HA) et des ions superoxydes (O_2^-). Les radicaux superoxydes formés vont libérer

les ions ferriques Fe^{3+} de la ferritine et les réduire par la suite en ions ferreux Fe^{2+} . Les ions superoxydes vont subir une dismutation soit spontanée soit par l'enzyme dismutase produisant ainsi du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier va former alors en présence de Fe^{2+} de l' OH^\cdot (réaction de Fenton) :



En plus de produire ces radicaux libres, l'alloxane agit en perturbant l'homéostasie du Ca^{2+} cytosolique libre des cellules β de Langerhans (Szkudelski, 2001).

La dose d'alloxane requise pour induire le diabète dépend de l'espèce animale, la voie d'administration et de l'état nutritionnel. Les animaux mis à jeun sont plus susceptibles à l'effet de ce produit, tandis que l'augmentation des concentrations de glucose sanguin offre une protection partielle. Les îlots humains sont beaucoup plus résistantes à l'alloxane que celles du rat et de la souris. La dose intraveineuse la plus fréquemment utilisée de cette substance pour induire le diabète chez le rat est de 65 mg/kg p.c. Lorsque l'alloxane est administrée par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée sa dose efficace doit être 2-3 fois plus élevée. La dose intrapéritonéale inférieure à 150 mg/kg p.c. peut être insuffisante pour induire le diabète chez le rat (Szkudelski, 2001).

8.2. Modèle induit par la streptozotocine

La streptozotocine ou 2-désoxy-2-([méthyl (nitroso) amino] carbonyl) amino)- β -D glucopyranose est un antibiotique à large spectre qui a d'abord été isolé à partir de fermentations de *Streptomyces achromogenes* (Herr et al, 1960; Vavra et. al., 1960). Sa structure chimique est représentée par la (Fig. 13).

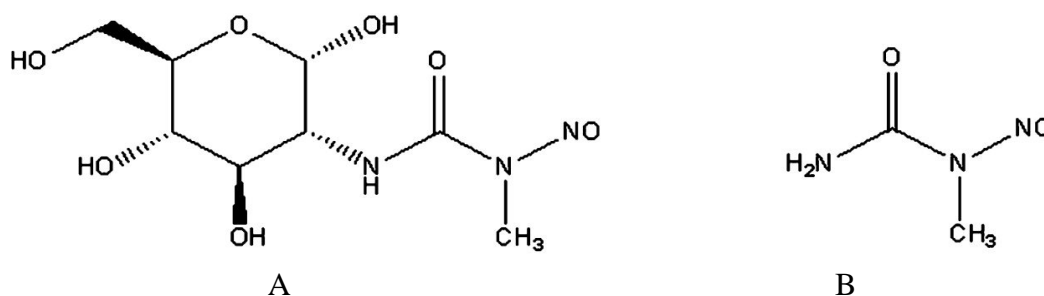


Figure. 13 : Formule chimique de la streptozotocine et de la méthyle-nitroso-urée. (A) ;

Streptozotocine, (B) ; Méthyle-nitroso-urée (Lenzen, 2008).

Au cours des études de pharmacologie préclinique, il a été vite remarqué que la streptozotocine possède une action diabétogène chez les rats et les chiens, qui est médiée par la destruction de cellules β pancréatiques par nécrose (Rakieten et al., 1963).

Bien que les mécanismes impliqués dans l'effet β -cytotoxique de la streptozotocine sont toujours sujets à controverse, il a été généralement admis que la principale raison de l'effet diabétogène de la streptozotocine est la fragmentation de l'ADN, en raison de la capacité d'alkylation de l'ADN de son partie méthyle-nitroso-urée (Elsner et al., 2000). Cependant, il a été rapporté que la streptozotocine peut générer des espèces réactives de l'oxygène (Takasu et al., 1991) et agir comme un donneur intracellulaire d'oxyde nitrique (Turk et al., 1993). En conséquence, il a été suggéré que l'action synergique des espèces réactives de l'oxygène et de l'oxyde nitrique peut également contribuer aux dommages de l'ADN et aux autres changements délétères provoqués par cette toxine (Szkudelski, 2001).

L'intervalle de la dose de STZ n'est pas aussi étroit que dans le cas de l'alloxane. La dose intraveineuse unique fréquemment utilisé chez les rats adultes pour induire le diabète est comprise entre 40 et 60 mg/kg p.c., mais des doses plus élevées sont également utilisées. La STZ est également efficace après administration intrapéritonéale d'une dose similaire ou supérieure, mais la dose unique inférieure à 40 mg/kg p.c. peut être inefficace (Szkudelski, 2001).

Actuellement, ce produit diabétogène est également commercialisé comme médicament de chimiothérapie sous le nom de Zanosar®. Il est utilisé chez les cancéreux comme antinéoplasique pour le traitement des adénocarcinomes métastatiques des îlots de Langerhans et des tumeurs carcinoïdes métastasées.

Chapitre II.
Les sulfonamides

Les sulfamides ou les sulphonamides ou plus précisément les sulfonamides constituent une classe médicamenteuse importante, ils ont une place particulière dans l'histoire de l'antibiothérapie et des antidiabétiques oraux (Supuran et al., 2003).

1. Historique de la découverte de sulfonamides

Le développement des sulfamides a débuté par les travaux du chimiste allemands Paul Gelmo qui a synthétisé la sulfanilamide en 1906 (Kaempfert, 1950 ; Comroe, 1976 ; Jarrott, 2004).

Les propriétés antibactériennes des sulfamides en particulier le prontosil, premier sulfamide antibactérien, ont été découvertes en 1932 par le médecin allemand Gerhard Domagk (Domagk, 1957). Peu après La publication de cette découverte en 1935, des chercheurs français (J Tréfouël, MT Tréfouël, F Nitti et D Bovet) à l'Institut Pasteur de Paris ont montré que l'activité thérapeutique du prontosil, qui est inactif *in vitro*, s'exprime *in vivo*, après scission de la molécule et libération du para-amino-benzène-sulfonamide (la sulfanilamide) (Schwartz, 2008), qui servira dans les années suivantes comme structure de base à la synthèse de différents sulfamides antimicrobiens (Montanaro, 1998). Ces médicaments ont été les premiers agents efficaces utilisés comme antibiotiques chez l'homme en 1935. Ils ont ouvert l'ère moderne des traitements anti-infectieux, 6 ans avant la première utilisation de la pénicilline en 1941 (Bastides, 1998).

Marcel Janbon et al, en 1942, à Montpellier ont observé que un nouveau sulfamide appelé (VK 57 ou 2254 RP), destinée à traiter la fièvre typhoïde et la brucellose, a provoqué des accidents hypoglycémiques inattendues parmi une trentaine de patients traités avec des doses élevées (Janbon, et al 1942) Rapidement, les expérimentations animales ont permis à Auguste Loubatières de suspecter que cet effet hypoglycémiant était dû à une stimulation de l'insulinosécrétion (Loubatières, 1944) Cependant, ce n'est qu'une quinzaine d'années plus tard, après la redécouverte fortuite de l'action hypoglycémiant des sulfamides antibactériens, en Allemagne que l'application au traitement du diabète sucré a pu être développée

(Radermecker, 2005b). Au printemps 1954 devaient se produire à Berlin des événements similaires à ceux qui s'étaient produits une décennie plus tôt à Montpellier. Franke et Fuchs observèrent qu'un nouveau sulfamide, le BZ 55 ou carbutamide, testé dans le traitement de diverses infections bactériennes, provoquait une hypoglycémie chez les sujets normaux (Loubatières-Mariani, 2007), il est devenu le premier médicament sulfonylurée antidiabétique utilisée d'une manière clinique (Smith et Jones, 2008 ; Zimmerman, 1997) Cette activité plus loin a été exploitée dans le développement de la classe de médicaments connu génériquement comme les sulfonylurées antidiabétiques, ou les sulfamides hypoglycémiant oraux (Smith et Jones, 2008 ; Radermecker, 2005b).

2. Définition

Les sulfamides hypoglycémiant (SH) ou Les sulfonylurées (SU) est la première classe d'agents antidiabétiques oraux (ADO) (Virally et al., 2007), Disponibles depuis plus 50 ans pour la prise en charge du DT2 (Silverberg et Ligaray, 2008). Ce sont des aryl-sulfonylurées substituées présentant une grande homogénéité structurale. La structure chimique de base responsable de l'effet hypoglycémiant est l'aryl-sulfonylurée (**Fig. 14**). Les groupements (R_1 et R_2) interviennent sur la lipophilie de la molécule, déterminent sa puissance et sa durée d'action (Blicklé, 1999). Ces médicaments augmentent l'insulinosécrétion (**Fig. 16**) en se lient à un récepteur (SUR-1) associé à des sous-unités protéiques (Kir 6.2) d'un canal potassique K^+ Sensible à l'ATP au niveau de la cellule β pancréatique, cette liaison bloque les canaux potassiques (K^+) et ainsi provoque une séquence d'événements qui mènent à l'exocytose des granules d'insuline (Virally et al., 2007; Smith et Jones, 2008). Cet effet est induit physiologiquement, par l'augmentation du rapport ATP/ADP qui résulte du métabolisme de glucose dans la cellule (β) et ainsi, les SU n'interviennent pas dans la synthèse de la proinsuline. Mais elles potentialisent l'effet physiologique de glucose (Virally et al., 2007). L'usage de ces insulinosécrétagogues résulte en une baisse absolue moyenne de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) de 1.1% à 1.9 % (Miser, 2007).

3. Structure chimique

Les sulfamides hypoglycémiantes (**Fig. 15**) possèdent tous une structure chimique commune (**Fig. 14**).

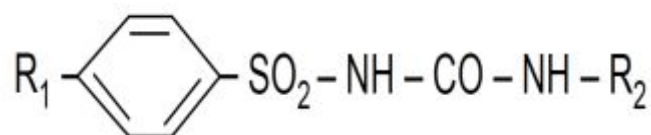


Figure. 14 : La structure chimique commune des sulfamides hypoglycémiantes (Blicklé, 1999).

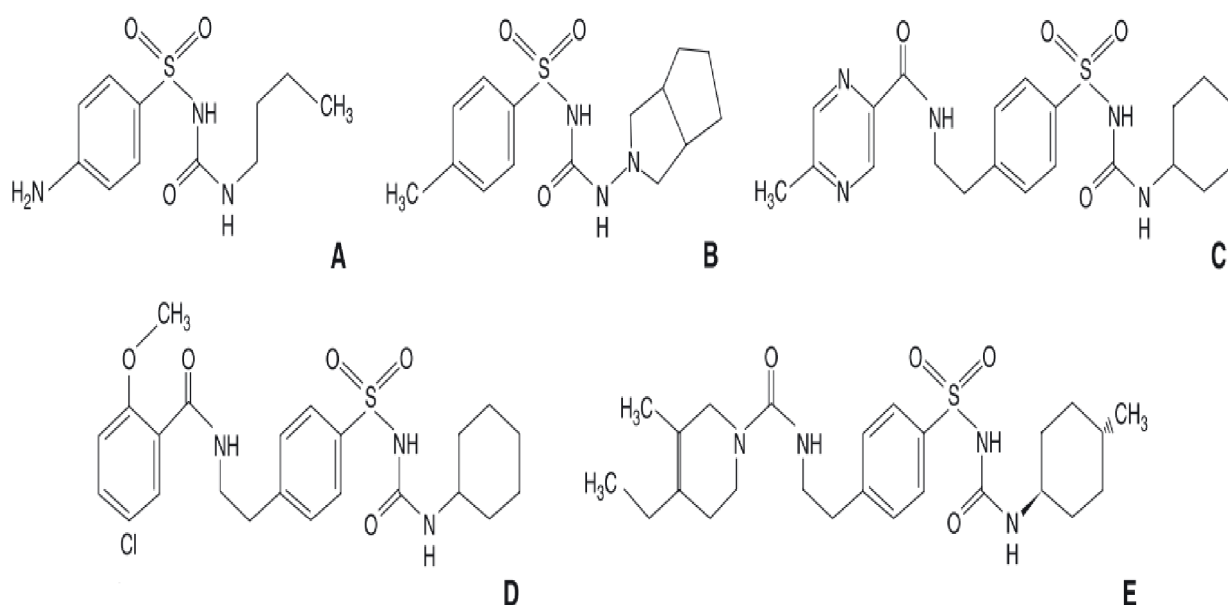


Figure. 15 : Formules chimiques des sulfamides hypoglycémiantes. (A). Carbutamide ; (B). Gliclazide ; (C). Glipizide ; (D). Glibenclamide/glyburide ; (E). Glimépiride (Blicklé, 2011).

4. Propriétés physicochimiques

La plupart des SH se présentent sous forme d'une poudre blanche ou très légèrement colorée, cristalline, inodore, peu ou pas soluble dans l'eau. La solubilité des sulfamides est influencée par le caractère lipophile du groupement phényle et de ses substituants, ainsi que par les propriétés hydrophiles du groupement $\text{SO}_2\text{-NH-CO-N}$ (Blicklé, 1999).

5. Classification

Elles sont classées en trois groupes (**Tab. 3**), sulfamides de première, deuxième et troisième génération.

Tableau. 3 : Classification et caractéristiques pharmacocinétiques des Sulfamides hypoglycémisants (Tielmans et al., 2007a).

	Dose (mg/24 heures)	Durée de vie (heures)	Durée maximale d'action (heures)	Liaison protéines (%)	Métabolites	Voie élimination
Sulfamides de première génération						
Carbutamide	500-3 000	45	-	75	Actifs + inactifs	Rein
Tolazamide	100-1000	7	-	-	Inactifs	Rein
Tolbutamide	500-2 000	3-12	12	95-97	Inactifs	Rein (100 %)
Sulfamides de deuxième génération						
Glibenclamide	1,25-15	10-16	24	99	Actifs (3 OHG) + inactifs	Rein (50 %) + foie
Gliclazide 80	40-320	12	24	94	Inactifs	Rein (60-70 %) + foie
Glipizide	2,5-40	3-7	24	92-99	Inactifs	Rein (80 %) + foie
Glibornuride	25-75	5-12	24	95	Inactifs	Rein (65 %) + foie
Sulfamides à libération prolongée (3^e génération)						
Glimepiride	1-8	> 24 heures	> 24 heures	99	Inactifs + actifs	Rein (60 %) + foie
Gliclazide 30MR	30-120	Libération prolongée	> 24 heures	94	Inactifs	Rein (60-70 %) + foie
Glipizide GITS	5-20	Libération prolongée	> 24 heures	92-99	Inactifs	Rein (80 %) + B

6. Données pharmacologiques

6.1. Propriétés pharmacocinétiques

Les SH sont des acides faibles, totalement ionisés au pH physiologique. Pour la majorité d'entre eux, l'absorption digestive est presque complète et il n'y a pas d'effet significatif de premier passage (Zimmerman, 1997). L'alimentation est susceptible de ralentir l'absorption de certains SH, mais ne réduit pas leur absorption. Toutefois, bien qu'en prise unique, l'efficacité des SH sur le contrôle glycémique postprandial soit optimale lorsqu'ils sont administrés une demi-heure avant le repas, cela n'a que peu d'influence dans un traitement prolongé. L'hyperglycémie pourrait également influencer l'absorption du glipizide en particulier (Blicklé, 2011).

Les SH circulent tous sous forme liée aux protéines plasmatiques, surtout à l'albumine, à plus de 95 %, ce qui explique leur faible volume de distribution. Ils sont biotransformés dans le foie en métabolites le plus souvent inactifs et, sauf pour le glibenclamide, les métabolites actifs qui peuvent être produits ne participent pas à l'effet hypoglycémiant, sauf en cas d'accumulation liée à une insuffisance rénale. La métabolisation est quasi complète. Seuls le carbutamide et, à un moindre degré, le glipizide sont partiellement éliminés par voie rénale sous forme inchangée, et par conséquent varient selon le pH urinaire. L'élimination des SH et de leurs métabolites est essentiellement rénale, partiellement biliaire pour le glibenclamide et le glimépiride (**Tab.3**). (Blicklé, 2011; Tielmans et al, 2007a).

6.2. Propriétés Pharmacodynamiques

6.2.1. Effet insulinosécréteur

Il s'agit du mécanisme d'action principal et le plus anciennement connu des SH. Cet effet, bien que potentialisé par l'hyperglycémie, persiste à glycémie basse. Il correspond à une libération d'insuline préformée et non à une augmentation de sa synthèse.

Cet effet insulinosécréteur des SH, bien mis en évidence en administration aiguë, semble s'estomper lors d'un traitement chronique, ce qui a conduit à la recherche d'effets extra-pancréatiques des SH.

En fait, les différences de niveau glycémique expliquent, pour une grande part, ce fait observé, qui peut aussi résulter à un moindre degré de la perte cellulaire β au cours de l'histoire naturelle du DT2 (Blicklé, 2011).

6.2.2. Effets extrapancréatiques

Plusieurs études ont mis en évidence certains effets extra-pancréatiques ; telles que l'amélioration de la liaison de l'insuline à son récepteur *in vitro* avec des concentrations de SH excédant souvent largement celles atteintes en thérapeutique et de la sensibilité à l'insuline *in vivo* lors d'un traitement chronique par SH (Kaku et al., 1995).

- **Augmentation de l'activité de la glycogène-synthase.** Au niveau musculaire, une augmentation de l'activité basale de la glycogène-synthase et de l'effet de l'insuline sur cette enzyme a été observée sous gliclazide (Bak et al., 1989).
- **Réduction de la clairance hépatique de l'insuline.** Au niveau hépatique, le glipizide et le glibenclamide, en administration chronique, pourraient réduire l'extraction hépatique de l'insuline et ainsi augmenter sa disponibilité en périphérie, ce qui va engendrer une baisse de la production de glucose par diminution de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse (Kaku et al., 1995). Inversement, cette réduction de l'extraction hépatique de l'insuline pourrait diminuer leur influence sur la suppression de la production hépatique de glucose et ainsi majorer l'hyperglycémie à jeun, apportant une explication à certains effets paradoxaux observés lors des traitements par de fortes doses de SH (Wählin-Boll et al., 1982).

Il est toutefois difficile d'attribuer les effets extra-pancréatiques observés, *in vivo*, sur le modèle animal et dans les études cliniques à une action directe du SH dans la mesure où ils pourraient également résulter du renversement de la gluco- et lipotoxicité liées à l'amélioration du contrôle glycémique. D'autre part, leur participation à l'effet thérapeutique est vraisemblablement négligeable, car, en l'absence de cellules β fonctionnelles, chez l'animal pancréatectomisé ou chez le sujet diabétique insulino-dépendant aucun effet significatif du traitement par les SH n'a été démontré (Blicklé et Brogard, 1998 ; Krentz, 2003).

6.2.3. Effets sur les plaquettes et l'endothélium vasculaire

Les SH, en particulier le glimépiride et le gliclazide, réduisent l'adhésivité et l'agrégation plaquettaire *in vitro* et diminuent certains marqueurs d'activation plaquettaire (Siluk et al., 2002). Le gliclazide exerce en outre un effet antioxydant et une action sur l'endothélium vasculaire avec augmentation de la synthèse de prostacycline vasodilatatrice (Blicklé, 2011).

7. Mécanisme de l'effet insulinosécréteur

L'effet insulinosécréteur des sulfonylurées hypoglycémiantes a été démontré très rapidement par [Loubatières \(1944\)](#) après la découverte de leurs propriétés hypoglycémiantes par [Janbon et al en 1942](#), mais c'est seulement au cours des années 1980 que les mécanismes de leur action au niveau cellulaire (**Fig. 16**) ont été décryptés ([Henquin, 1992](#)). En bref, les SH en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques (SUR1) couplés aux canaux potassiques ATP-dépendant (k_{ATP}) de la cellule β , provoquant la fermeture des canaux potassiques et une dépolarisation membranaire. Cette dernière induit à son tour une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration cytosolique du calcium ionisé Ca^{2+} qui en résulte, déclenche l'exocytose des granules sécrétoires contenant l'insuline ([Blicklé et Brogard, 1998](#)). Ce schéma simple soulève plusieurs questions :

- existe-t-il réellement un récepteur spécifique aux SH, quel est son ligand endogène, son rôle physiologique et sa participation éventuelle à la pathogénie du diabète de type 2 et aux échecs secondaires du traitement oral ?
- l'effet des SH concerne-t-il uniquement la libération d'insuline préformée ou affecte-t-il également sa synthèse ?
- cet effet laisse-t-il persister un rôle régulateur de la glycémie ?

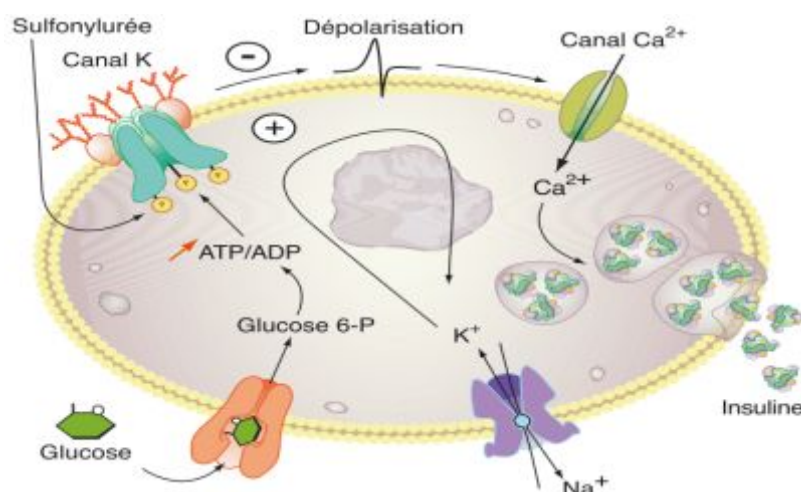


Figure. 16 : Mécanisme de l'effet insulinosécréteur de sulfonylurées ([Blicklé, 2011](#)).

La fermeture du canal potassique est provoquée physiologiquement par l'augmentation du rapport ATP/ADP, résultant de la pénétration et du métabolisme du glucose dans la cellule β .

8. Cible moléculaire « Les canaux potassiques K_{ATP} »

8.1. Caractérisation moléculaire

Les études qui ont mené à la caractérisation moléculaire des canaux K_{ATP} (Ashcroft et al., 1984 ; Bataille, 2000) ont permis de mettre en évidence qu'ils étaient formés de deux types de sous-unités, nommées respectivement Kir6.2 et SUR1. La sous-unité Kir fait partie d'une famille de canaux potassiques (K) à "rectification entrante", en anglais "inwardly rectifying" (ir), terme qui décrit certaines des caractéristiques électrophysiologiques de ces canaux dont il existe une grande variété dans tout le règne animal. La variante 6.2 est celle présente dans les cellules β . Quatre de ces sous-unités, arrangées comme indiqué dans la **Figure17**, forment le pore du canal qui laisse (ou ne laisse pas) passer l'ion potassium, suivant le plus ou moins grand espace disponible, qui dépend des mouvements des sous-unités Kir au sein de la membrane plasmique. Cet ensemble est entouré de quatre sous-unités régulatrices appelées SUR1. "SUR" signifie "*Sulfonylurea Receptor*", car cette protéine a été isolée (Aguilar-Bryan et al., 1995) comme étant le "récepteur" des sulfonurées hypoglycémiantes, médicaments majeurs du diabète de type 2. Ce récepteur est, en fait, destiné à une molécule endogène qu'a été mise en évidence par Virsolvy-Vergine et al en 1992 et qu'ils ont appelée "endosulfine". Le récepteur (SUR) appartenait à une famille de protéines aptes à lier l'ATP, appelées protéines ABC (*ATP binding cassette*) dont on connaît à ce jour une centaine de représentants, transporteurs d'ions, de glucides, d'acides aminés ou de peptides. Ces protéines possèdent 2 sites intracellulaires hydrophiles de liaison à l'ATP et plusieurs segments transmembranaires hydrophobes ayant la capacité de reconnaître et de lier aux nucléotides et à des agents pharmacologiques provoquant l'ouverture (diazoxide, nicorandil) ou la fermeture (SH, glinides) du canal (Blicklé, 2011).

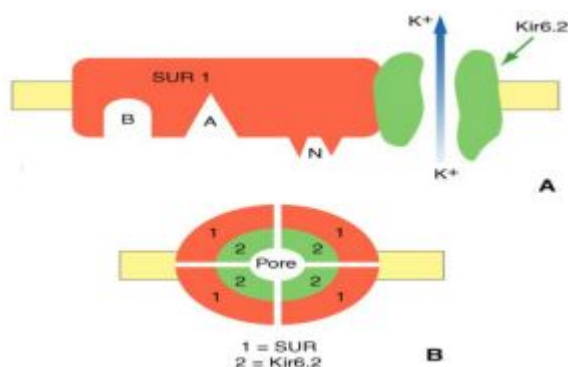


Figure. 17 : Canal potassique sensible à l'ATP : sites de fixation de l'ATP, de sulfonylurées et de glinides (Magnan et Ktorza 2005).

A. Représentation schématique de l'insertion du canal potassique sensible à l'ATP dans la membrane de la cellule β . B : site de fixation des glinides ; A : site de fixation des sulfonylurées (gliclazide) ; N : site de fixation de l'ATP.

B. Coupe transversale du canal montrant le complexe octamérique dans la membrane constitué de quatre sous-unités SUR-1 entourant quatre sous-unités Kir 6.2. L'ensemble ménage un pore dans la membrane qui permet le passage du potassium.

8.2. Fonctionnement

Il apparaît donc clairement que le fonctionnement du canal K_{ATP} , à savoir son ouverture ou sa fermeture, donc la possibilité de l'ion potassium de s'échapper de la cellule, est régulé par le rapport ATP/ADP qui dépend du métabolisme du glucose et ce grâce à la présence au sein des protéines Kir et SUR de sites de liaison des nucléotides ("*nucleotide binding fold*" ou NBF), mais dont la fermeture peut également être obtenue indépendamment par liaison d'une sulfonylurée dans un contexte pharmacologique (ou de l'endosulfine dans un contexte physiologique) sur la sous-unité SUR. On comprend, dès lors, que les SU peuvent, dans une certaine mesure, remplacer le glucose dans sa capacité à stimuler la sécrétion d'insuline, capacité qui est diminuée dans le diabète de type 2, sans que l'on sache encore quelle(s) est (sont) l'étape (ou les étapes) en cause dans le défaut observé dans la maladie. (Bataille, 2002).

8.3. Pharmacogénomique du canal potassique

Il est intéressant de noter que des mutations de Kir 6.2 et de SUR-1 ont été impliquées dans les diabètes néonataux transitoires et définitifs et que ces derniers peuvent être sensibles aux sulfamides hypoglycémiantes. À l'inverse, d'autres mutations sont impliquées dans les

syndromes d'hypoglycémies hyperinsuliniques néonatales. Certains polymorphismes de Kir s'accompagnant d'une réduction de la sensibilité du canal à l'effet inhibiteur de l'ATP ont été associés au DT2 (Sattiraju et al., 2008).

8.4. Différents types de canaux k_{ATP} présents dans l'organisme

Il existe, dans divers tissus (essentiellement le système nerveux central, les cellules des îlots de Langerhans, le cœur, les muscles squelettiques et les muscles lisses) plusieurs variants de canaux K_{ATP} , variants moléculaires qui dérivent de la combinaison de deux sous-types possibles de protéine Kir (Kir6.1 ou Kir6.2) et de trois sous-types possibles de protéine SUR (SUR1, SUR2A ou SUR2B). Comme indiqué dans le tableau I, la combinaison SUR1/Kir6.2 est commune aux cellules de l'îlot de Langerhans et au système nerveux central, la combinaison SUR2A/Kir6.2 est spécifique du cœur et des muscles squelettiques, la combinaison SUR2B/Kir6.1 se trouve dans les muscles lisses vasculaires, alors que l'ensemble SUR2B/Kir6.2 est celui trouvé dans les autres muscles lisses. Bien entendu, une combinaison différente de protéines peut avoir une pharmacologie différente, c'est-à-dire réagir différemment à des molécules-ligands. Le site de liaison des SU étant présent sur la protéine SUR, il était légitime d'attendre des différences éventuelles dans l'affinité de diverses molécules en fonction du sous-type de protéine SUR. C'est effectivement ce qui a été observé (Bataille, 2002).

9. Réversibilité et sélectivité vis-à-vis les récepteurs SUR1 pancréatiques

Si l'on considère les choses sous l'angle du ligand pharmacologique et non du récepteur, il est possible que des différences de structure chimique jouent un rôle sur la réversibilité de la liaison et sur la sélectivité de celle-ci vis-à-vis de la cellule β (Gribble et Reimann 2003).

La réversibilité de la liaison au récepteur semble dépendre du nombre de points d'interaction avec SUR-1. Ainsi, l'effet du tolbutamide et du chlorpropamide (retirés du marché), ainsi que du gliclazide, qui n'en possèdent qu'un, est rapidement réversible. En revanche, la liaison du

glibenclamide et du glimépiride apparaît beaucoup plus durable. Cela pourrait avoir des conséquences en termes de risque d'hypoglycémie (Blicklé, 2011).

La sélectivité vis-à-vis de SUR-1 soulève la question d'éventuels effets délétères cardiovasculaires. Des travaux in vitro (Nagashima et al., 2004 ; Dabrowski et al., 2001) ont montré que les SU n'avaient pas, aux concentrations thérapeutiques, une affinité de liaison aux récepteurs SUR1 et SUR2 identique. Pouvaient être ainsi classées en 2 groupes. Les SU du 1^{ier} groupe (tolbutamide, gliclazide) sont appelés β -sélectifs car ils ne ferment aux concentrations thérapeutiques que les canaux pancréatiques (Kir 6.2/SUR1). En revanche, Les molécules du 2^{ième} groupe (glibenclamide, glimépiride) sont non β -sélectives car, aux concentrations thérapeutiques, elles bloquent également les récepteurs vasculaires et coronaires (Kir 6.2/SUR2). Cette action sur le myocarde peut être délétère car susceptible de supprimer le préconditionnement myocardique à l'ischémie, mécanisme physiologique efficace de protection tissulaire contre l'ischémie (Tielmans et al., 2007a).

Tableau. 4 : Les différents types de canaux k_{ATP} présents dans l'organisme (Bataille, 2002).

Sous-unités	ATP	EC ₅₀ Glib	Tolb	Conductance pS	Localisation	Fonction
SUR1/Kir6.2	30 μ mol/l	1 nmol/l	1 μ mol/l	80	pancréas cerveau	Sécrét. Insuline ?
SUR2A/Kir6.1	?	?	?	?	?	?
SUR2A/Kir6.2	100 μ %	10 nmol/l	1 nmol/l	80	cœur muscle squelet	Cardioprotection Anti-ischémie
SUR2B/Kir6.1	1 μ mol/l	40 nmol/l	?	20	muscle lisse vasculaire	relaxation
SUR2B/Kir6.2	300 μ mol/l	< 10 nmol/l	< 1 μ mol/l	80	muscle lisse non vasculaire	relaxation

10. Pouvoir hypoglycémiant

La puissance hypoglycémiant des différents SU est étroitement corrélée à la constante d'affinité de chacune des molécules au récepteur SUR. Plus cette constante est forte, moins la dose (quantité exprimée en mg) de la sulfonylurée considérée doit être élevée pour exercer le même pouvoir hypoglycémiant. Ce concept explique les différences posologiques par

comprimé (par exemple, 2,5 mg de glibenclamide ou 80 mg de gliclazide) (Radermecker, 2005a).

11. Action sur les différentes phases de l'insulinosécrétion

En réponse au glucose intraveineux, la sécrétion d'insuline normale revêt un aspect diphasique. Une première phase ou phase précoce est immédiate, correspond à de l'insuline préformée et dure 10 min. Lui fait suite une deuxième phase ou phase tardive, d'augmentation progressive et durant aussi longtemps que le stimulus glucose est appliqué. Le tolbutamide, le glipizide, et le gliclazide ont un effet physiologique (effet "tolbutamide-like"), stimulent préférentiellement la phase précoce. Cependant, d'autres sulfonylurées, comme le glibenclamide et le glimépiride, ne stimulent que la deuxième phase (effet "glibenclamide-like"). Cette action sur les différentes phases de l'insulinosécrétion peut être bénéfique ou problématique. Dont, l'amélioration de la première phase permet de corriger la glycémie post-prandiale, alors que, la stimulation de la phase tardive seule expose probablement à un risque hypoglycémique plus élevé (Tielmans et al., 2007a).

12. Effets indésirables

Les effets secondaires principaux des SU sont l'hypoglycémie et le gain de poids, habituellement, ce sont des médicaments bien tolérés, et il est rare que les malades rapportent des réactions allergiques ou des intolérances gastro-intestinal contre ces médicaments (Virally et al., 2007).

12.1. Hypoglycémie

Contrairement à la stimulation physiologique par le glucose, l'insulinosécrétion déclenchée par les SU n'est pas régulée par la glycémie, ce qui explique le risque hypoglycémique observé en clinique (Radermecker, 2005a).

Vu leur mécanisme d'action fondamental, l'hypoglycémie est l'effet adverse majeur des sulfonylurées. Cette complication est liée au fait que les SU n'augmentent pas réellement la sensibilité de la cellule β au glucose, mais majorent d'un facteur constant (la fermeture des

canaux potassiques) la sécrétion d'insuline pour les différentes concentrations sanguines de glucose (Blicklé et Brogard, 1998). Ce risque d'hypoglycémie est associé à tous les sulfonylurée (Cheng et Fantus 2005), il dépend des caractéristiques pharmacocinétiques (temps de l'élimination, activité de métabolites), de la réversibilité et de la puissance de la liaison du médicament au récepteur (Virally et al., 2007).

12.2. Prise de poids

Une augmentation du poids corporel a été attribuée communément à la thérapie par les sulfonylurées, mais cela est également vrai pour la plupart de médicaments utilisés pour la prise en charge du diabète. Le gain de poids associé à la thérapie par les glitazones ou l'insuline est généralement plus signifiant que celui associé à l'utilisation de sulfonylurées. Seuls la metformine et l'exénatide semblent être épargnés de cet effet secondaire (Green et Feinglos, 2006). Dans l'UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*), après 10 ans de suivi, la moyenne de gain poids a varié entre un minimum de 1,7 kg pour le glibenclamide pour un maximum de 2,6 kg pour le chlorpropamide (UKPDS 33, 1998). La prise de poids corporel observée avec les sulfonylurées, est vraisemblablement en rapport avec l'augmentation des taux de l'insulinémie (Lebovitz, 2004), et peut-être due en partie à l'amélioration de l'utilisation du glucose administré et d'une réduction de la glycosurie (Krentz et Bailey, 2005).

12.3. Effets cardiovasculaires

Contrairement aux canaux potassiques (SUR1/Kir6.2) au niveau des cellules β , Les canaux myocardiques (SUR2A/Kir6.2) sont fermés dans les conditions physiologiques en raison du rapport ATP/ADP élevé (phénomène de préconditionnement myocardique). Cependant, dans le cas d'une ischémie (diminution ou arrêt temporaire de la vascularisation) ou d'une anoxie (un infarctus), la réduction de l'oxygénation et ainsi la diminution de la concentration intracellulaire d'ATP conduit à leur ouverture, permettant une fuite de potassium K^+ et une repolarisation de la membrane, ce qui remet le système dans un état

initial. Egalement, il en résulte une réduction de la concentration du calcium Ca^{2+} cytosolique à l'origine d'une diminution de la contractilité et de la demande myocardique d'oxygène. En revanche, Si le patient est sous glibenclamide ou une SU équivalente en termes de spécificité tissulaire, il existe un risque que les canaux myocardiques (SUR2A/Kir6.2) ne puissent s'ouvrir, supprimant ainsi le caractère bénéfique de ce système que l'on peut comparer à une soupape de sécurité, et majorer les conséquences de l'ischémie sur le myocarde. Les mêmes phénomènes ont été décrits au niveau des cellules musculaires lisses des coronaires (SUR2B/Kir6.2), dont la vasodilatation au cours de l'ischémie pourrait être entravée par les sulfonylurées (Blicklé, 1999 ; Bataille, 2002).

12.4. Hypersensibilité

Une réaction allergique ou une réaction d'hypersensibilité à un médicament peut être définie comme toute réponse immunologique à un médicament ou un de ses métabolites qui se traduit par une réaction indésirable (Hemstreet et Page, 2006). Plusieurs médicaments ont le potentiel de produire des réactions d'hypersensibilité. Après les β -Lactames (pénicillines et céphalosporines), les sulfamides antibiotiques sont parmi les causes les plus fréquentes (Dibbern et Montanaro, 2008). L'apparition de réactions allergiques aux sulfamides dans la population générale a été estimée à 3%. Classiquement caractérisée par une fièvre, une éruption maculo-papuleuse généralisée, et la toxicité d'un ou plusieurs organes internes (qui peut être asymptomatique). Cette réaction se développe généralement entre 7 à 14 jours après l'initiation du traitement et de même résoudre entre 7 à 14 jours après l'arrêt de l'agent causal, D'autres symptômes plus graves peuvent se produire aussi telles que les réactions anaphylactiques, anaphylactoïdes, le syndrome de Stevens-Johnson et la nécrose épidermique toxique mais sont beaucoup moins fréquentes (Slatore et Tilles, 2004). Outre les sulfamides antibiotiques, plusieurs médicaments ont l'entité sulfonamide (SO_2-NH_2), y compris certains médicaments les plus prescrits, comme les diurétiques, les sulfonylurées et les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2). Une différence fondamentale entre ces sulfonamides est la

présence d'un groupe arylamine (-NH₂) à la position N4 du cycle benzène uniquement dans les sulfamides antibiotiques (Slatore et Tilles, 2004). Ce groupe est pensé pour être critique dans le développement des réactions d'hypersensibilité (Hemstreet et Page, 2006). L'absence du groupe arylamine alors devrait réduire ou élimine le risque de réactivité croisée avec les sulfamides non-antibiotiques (Strom et al, 2003). Toutefois, cette question est devenue controversée et continuent de compliquer la pharmacothérapie par ces médicaments (Brackett, 2007), d'autre part, Les sulfonylurées (les sulfamides antidiabétiques) elles-mêmes peuvent occasionnellement entraîner des effets indésirables présumés avec des mécanismes immunologiques, les plus souvent différentes éruptions dermatologiques telles que l'urticaire, le rash photosensible, et la vascularite leucocytoclasique. Les symptômes généralement associés à ces médicaments sont assez différents de ceux qui sont souvent vus avec les sulfonylarylamines (les sulfamides antibiotiques) (Dibbern et Montanaro, 2008).

13. Efficacité thérapeutique

L'UKPDS 33 (1998) et les nombreuses études récentes où les SH sont utilisés comme comparateurs apportent l'essentiel des données d'efficacité et de tolérance concernant cette classe thérapeutique ancienne.

L'effet sur la glycémie est rapide avec une certaine dose-dépendance pour un sujet donné, mais un effet dans un intervalle de concentration relativement étroit et peut-être pour le glibenclamide un effet crochet (diminution de l'efficacité aux très fortes concentrations). La baisse de l'HbA1c, de l'ordre de 1 % à 1,5 %, en fait une classe thérapeutique majeure du DT2. Le maintien de l'efficacité dans le temps apparaît toutefois moindre qu'avec la metformine et plus encore les glitazones (Kahn et al, 2006).

À la différence de la metformine (UKPDS 34, 1998), un effet favorable sur les événements cardiovasculaires n'a pu être démontré dans l'UKPDS. En revanche, le bénéfice en termes de microangiopathie apparaît clair (Blicklé, 2011).

14. Place des sulfamides hypoglycémiantes dans le traitement du diabète

Les SU ont été l'un des piliers de la thérapie du diabète pendant des décennies. En général, cette classe de médicaments représente une option abordable, bien tolérée, et rapidement efficace pour la prise en charge du DT2. Cependant, les données de l'UKPDS, ainsi que le corps de l'expérience clinique, suggèrent que les SH en monothérapie n'entraînent pas un contrôle glycémique suffisant à long terme. En outre, la variété et le nombre d'autres médicaments antidiabétiques a augmenté de façon spectaculaire au cours des dernières années. Compte tenu de cette information, ainsi que des préoccupations concernant la sécurité cardiovasculaire de la classe, le rôle de la thérapie par les SH dans la prise en charge actuelle du diabète est devenu moins clair ([Green et Feinglos, 2006](#)).

Les recommandations actuelles du traitement pharmacologique « bien validé » du DT2 selon Le document de consensus de l'ADA-EASD ont considérée la metformine comme le 1^{er} choix médicamenteux, à instaurer d'emblée chez tout patient diabétiques de type 2 (sauf en présence de contre-indications), obèses ou non. D'autre part, dans une 2^{ème} étape, ont recommandé soit d'ajouter un SH en cas d'échec de la dose maximale tolérée de metformine à abaisser et à maintenir le taux d'HbA1c < 7 % au bout de 2 à 3 mois, ou l'insuline basale si le taux d'HbA1c >8,5 % pour diminuer rapidement l'hyperglycémie. Alors que, les autres traitements antidiabétiques ont été considérés comme des thérapies moins bien validées ([Nathan et al., 2009](#)).

L'utilisation de la metformine comme thérapie de première intention est basé sur les nombreuses études qui ont montré la présence d'une insulino-résistance bien avant l'existence d'un déficit insulinosécrétoire au cours de l'histoire naturelle du DT2 (la théorie de la décompensation de la cellule β). Ces études ont amené à proposer, logiquement, de débiter le traitement oral par un médicament ciblant d'abord le versant insulino-résistance de la problématique ([Radermecker, 2005b](#)). Cependant ces études n'ont pas pris en compte la cinétique de l'insulinosécrétion et ont donc ignoré l'abolition du pic précoce, anomalie

apparaissant très tôt dès les premiers troubles de la glycorégulation (IG, HMJ). Si cette anomalie est prise en compte, l'introduction rapide dans le schéma thérapeutique d'un SH rétablissant la première phase d'insulinosécrétion rencontre une certaine logique (Radermecker, 2005b; Guillausseau et al., 2008). Quoiqu'il en soit, la plupart des patients ont rapidement besoin de plusieurs antidiabétiques de classes différentes afin d'atteindre l'objectif glycémique (Radermecker, 2005b). En outre, la thérapie de combinaison traitant les deux défauts pathogénétiques est susceptible d'assurer et maintenir un meilleur contrôle glycémique aux doses inférieures et avec peu d'événements défavorables (Del Prato et Pulizzi, 2006).

D'autre part, l'appréciation du rôle important des défauts des cellules β dans le développement et la progression de l'hyperglycémie au cours du DT2 a mis en évidence la nécessité de traitements qui peuvent stimuler la sécrétion d'insuline et préserver la masse de ces cellules. L'introduction récente de l'exénatide, un mimétique des incrétines et des inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase 4 pourrait offrir de telles opportunités, en élargissant les possibilités thérapeutiques pour le traitement du DT2 (Ahren et Schmitz, 2004 ; Buse et al., 2004). En outre, l'utilisation concomitante de SH et de l'exénatide a entraîné d'importantes améliorations du contrôle glycémique, ce qui a été associée à la réduction du poids corporel. Ainsi que, le ratio pro-insuline à insuline a été amélioré, suggérant une amélioration de la fonction des cellules β (Del Prato et Pulizzi, 2006).

En conclusion, l'avancement dans la formulation et les propriétés non-hypoglycémiantes établi de certains SH continuent de fournir une opportunité pour un traitement efficace du DT2. Outre cette forme classique de thérapie, de nombreuses autres sont disponibles et beaucoup plus sont en cours de développement, de sorte que notre arsenal va croître. Avec l'augmentation des options thérapeutiques, il sera le devoir du diabétologue de prendre le plus d'avantage en assurant le contrôle glycémique et en réduisant le risque de complications diabétiques par la pleine compréhension des mécanismes d'action et des caractéristiques des agents antidiabétiques (Del Prato et Pulizzi, 2006).

Partie expérimentale

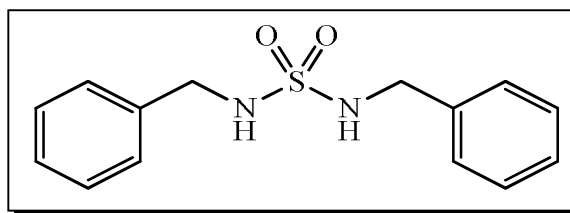
I. Matériel et Méthodes

1. Nouvelles molécules

Dans la présente étude, nous avons évalué, *in vivo*, les effets antidiabétiques de quatre molécules de la classe de sulfonamides (deux **sulfamides symétriques *N, N'*-bis-(alkyl) sulfamides** et deux **dérivés *N*-acylsulfonamides**), ces molécules ont été récemment synthétisées par le Groupe de Chimie Bioorganique du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée de l'Université Badji Mokhtar-Annaba (Cheloufi et al., 2014; Hessainia et al., 2013).

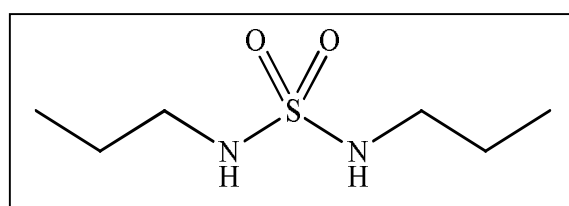
1.1. Procédure générale de synthèse des deux *N, N'*-bis-(alkyl) sulfamides

Les procédures chimiques de synthèse des deux sulfamides symétriques *N, N'*-bis-(alkyl) sulfamides ont été décrit en détail dans l'article de Hessainia et al (2013). Brièvement, à une solution d'amine primaire (1eq, 1g, 9,34 mmol) en suspension dans du dichlorométhane anhydre (CH₂Cl₂) placé dans un Bicol, sous agitation magnétique à 0°C, 2,5 équivalents de triéthylamine TEA (2,5 eq, 3,25 ml, 9,34 mmol) ont été ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome surmontée d'une garde à chlorure de calcium. Au bout de 15 min, sous agitation magnétique à 0°C, 0,5 équivalent de SO₂Cl₂ (0,5 eq, 0,37 ml, 9,34 mmol) a été ajouté au mélange lentement en 45 min goutte à goutte à l'aide d'une seringue, après un certain temps la solution devient jaune et le mélange réactionnel est abandonné à température ambiante durant 3 heures. Ce mélange a été dilué avec 100 ml de CH₂Cl₂, acidifié avec une solution d'acide chlorhydrique HCl (0,1 N, 10 ml). La phase organique est lavée avec l'eau (40 ml) jusqu'à neutralité, séchée sur sulfate de sodium anhydre Na₂SO₄ et concentrée sous vide. La recristallisation du produit brut dans l'éther a donné les *N, N'*-bis-(alkyl) sulfamides attendues sous forme de solides blancs. Les méthodes spectroscopiques, infrarouge (**IR**), résonance magnétique nucléaire du proton et carbone 13 (**RMN ¹H et RMN ¹³C**) ainsi que spectroscopie de masse à haute résolution (**HRMS**) ont été mises à profit pour établir les caractéristiques structurales propres à ces produits.



***N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide, 1a.**

Produit solide blanc, **Rendement de synthèse** 69 %. $R_f = 0.42$ [CH_2Cl_2 / MeOH: 99/1]. **Point de fusion:** 182 - 183 °C. **IR (KBr, ν cm^{-1}):** 3325.1 (NH), 1153-1334 (SO_2). **RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm):** 4.0 (d, $J = 4.02$ Hz, 2 H, CH_2), 7.22 - 7.31 (m, 10 H, H-Ar), 7.43 (t, $J = 7.46$ Hz, 2 H, NH). **RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , δ ppm):** 45.83 (CH_2), 127.06, 127.75, 128.26 et 138.40 (C-Ar). **HRMS calcul. pour $[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}]$ M = 276 g/mol**



***N, N'*- Bis (propyl) sulfamide, 1b.**

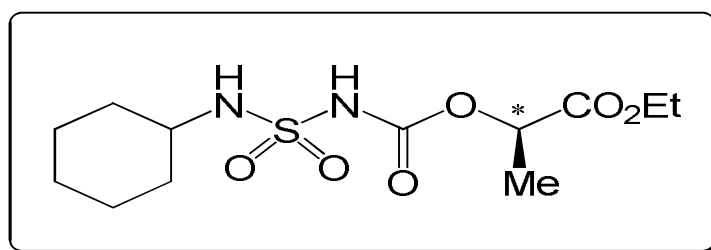
Produit solide blanc, **Rendement de synthèse** 66 %. $R_f = 0.46$ (CH_2Cl_2 / MeOH: 99/1). **Point de fusion:** 110 - 111 °C. **IR (KBr, ν cm^{-1}):** 3290.6 (NH), 1148-1315 (SO_2). **RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ ppm) :** 0.9 (t, $J = 7.35$ Hz, 6 H, CH_3), 1.6 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.0 (t, $J = 7.11$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.25 (s, 2 H, NH). **RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , δ ppm):** 11.2 (CH_3), 21.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 42.8 ($\text{CH}_2\text{-NH}$). **HRMS calcul. pour $[\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}]$ M = 180 g/mol.**

Figure. 18: Structures et caractéristiques physicochimiques des deux sulfamides symétriques *N, N'*-bis-(alkyl) sulfamides.

1.2. Procédure générale de synthèse des deux dérivés *N*-acylsulfonamides

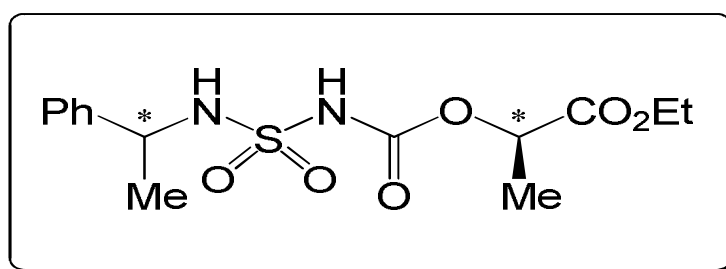
Les procédures de synthèse des deux dérivés *N*-acylsulfonamides ont été rapportées dans l'article de [Cheloufi et al \(2014\)](#). Brièvement, à une solution agitée d'isocyanate de chlorosulfonyl (1 ml) dans dichlorométhane anhydre (10 ml), du lactate d'éthyle (11,4 mmol) a été ajouté goutte à goutte à 0°C. Après 30 min, la solution résultante a été ajoutée lentement à une amine primaire ou secondaire (11,4 mmol, 1 éq.) dans du CH_2Cl_2 anhydre (10 ml), en présence de triéthylamine TEA (1,1 éq.) sous agitation vigoureuse à 0°C. Le mélange a été agité pendant une période de 2 h, et la progression de la réaction a été surveillée par CCM jusqu'à la conversion de l'aminé a été achevée. Le mélange a été dilué avec du CH_2Cl_2 et lavé avec HCl 0,1 N et de l'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO_4 ou Na_2SO_4 et le

solvant a été évaporé sous pression réduite. Les produits ont été purifiés par Chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant CH_2Cl_2 comme éluant, pour obtenir 70 % de *N*-acylsulfonamides et 20% des sulfonylurées. Les caractéristiques structurales de tous les composés obtenus ont été confirmées sans ambiguïté par résonance magnétique nucléaire du proton et carbone 13 (**RMN ^1H et RMN ^{13}C**) ainsi que par spectroscopie de masse à haute résolution (**HRMS**).



Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate, **1b**.

Produit solide blanc, **Rendement de synthèse** 74%, $R_f = 0.66$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1), **Point de fusion** =119–121°C, **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.60 (s,1H, NH), 5.15 (m,2H, *CH- CH_3 + NH), 4.20 (q, $J = 7.16$ Hz, 2H, CH_2 - CH_3), 3.30 (m, 1H, CH-NH), 1.90 (m, 2H, CH_2 cyc), 1.60 (m,2H, CH_2 -cyc), 1.40 (m, 4H, 2 CH_2 -cyc), 1.31 (m, 5H, CH_2 - CH_3 + CH_2 -cyc). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , δ ppm): 171.6; 151.2; 68.3; 63.2; 54.2; 34.1; 25.4; 25.3; 16.2; 15.1. **MS ESI $^+$ 30eV m/z**: 345 [$\text{M}+\text{Na}^+$], 323 [$\text{M}+\text{H}^+$]. **HRMS calcul. pour** [$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$] $\text{M} = 322.3779$ g/mol.



Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy propanoate, **1d**.

Produit solide blanc, **Rendement de synthèse** 89%, $R_f = 0.45$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1), **Point de fusion** =116–118°C, **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.32(s, 1H,NH), 7.25 (s, 5H, Ar), 5.75 (d, $J = 7.36$ Hz, 1H, NH), 5.00 (q, $J = 7.00$ Hz, 1H, *CH), 4.95 (q, $J = 7.12$ Hz, 1H, *CH), 4.55 (m, 2H, *CH), 4.25 (q, $J = 7.12$ Hz, 2H, CH_2 - CH_3), 1.60 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, *CH- CH_3), 1.52 (d, $J = 6.93$ Hz,3H, *CH- CH_3), 1.25 (t, $J = 6.20$ Hz, 3H, CH_2 - CH_3). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , δ ppm): 170.2; 153.3; 145.0; 127.0; 126.5; 126.1; 69.7; 63.2; 47.0; 21.2; 18.3; 12.1. **MS ESI $^+$ 30eV m/z**: 367 [$\text{M}+\text{Na}^+$], 345 [$\text{M}+\text{H}^+$]. **HRMS calcul. pour** [$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$] $\text{M} = 344.3834$ g/mol.

Figure. 19: Structure et caractéristiques physicochimiques des deux dérivés *N*-acylsulfonamides.

1^{ière} étude expérimentale:

**« Evaluation de l'activité antidiabétique de quatre molécules nouvellement synthétisées
chez les souris Swiss Albinos rendus diabétiques par la streptozotocine »**

1. Animaux

Des souris Swiss albinos mâles, âgés de 6-8 semaines et pesant entre 27 et 35 g, provenant de l'institut Pasteur d'Alger (Centre d'élevage, Kouba, Alger), ont été utilisés. Ces animaux ont été soumis à une période d'adaptation de 7 jours, aux conditions de l'animalerie, à une température voisine de 25°C et une photopériode naturelle. Ils ont été maintenus dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Ils ont été nourris *ad libitum* avec un régime standard de croquette (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) dont la composition est citée au **Tableau 5**, l'eau étant quotidiennement renouvelée.

Tableau. 5 : Composition du régime croquette (ONAB Bejaia).

Composants	%
Mais	52.80
Son	10.80
Soja	32.10
Calcaire	01.50
Phosphate	00.80
Complément vitaminique	02.00

2. Induction du diabète expérimental

Après une nuit à jeun (avec accès libre à l'eau), les souris ont été injectées par voie intra-péritonéale avec la Streptozotocine (Sigma-Aldrich, USA) à une dose de 150 mg/kg de poids corporel dissoute dans un tampon citrate (3 mM de pH = 4.5) fraîchement préparée (Mutalik et al., 2005). Pour protéger les souris contre les hypoglycémies sévères produites par la STZ ; ces animaux ont été administrées des solutions de 10 % de glucose pendant 2 jours, Après 5 jours de l'injection, l'état l'hyperglycémique a été confirmée à l'aide d'un glucomètre Actif Accu-Chek (Roche Diagnostic, Allemagne). Seuls les souris avec des glycémies supérieures à 300 mg/dl ont été choisies et utilisés dans cette étude.

3. Traitement

Nous avons utilisé 6 souris mâles normaux (non traités avec la STZ) et 36 souris rendus diabétiques par la STZ. Ces animaux ont été répartis en sept groupes ($n=6$ souris/groupe) et traités comme suit :

- **TS** : lot Témoin Sain a reçu 0,2 ml de l'eau physiologique (solution de 0,9 % NaCl) ;
- **DNT** : lot Diabétique (non traité) a reçu 0,2 ml de l'eau physiologique ;
- **D+BBS1a 10 mg** : lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule BBS1a; *N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide, **1a**.
- **D+BPS1b 10 mg** : lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule BPS1b; *N, N'*- Bis (propyl) sulfamide, **1b**.
- **D+ESP1b 10 mg** : lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule ESP1b; Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate, **1b**.
- **D+ESP1d 10 mg** : lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule ESP1d; Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate, **1d**.
- **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. /jour de glibenclamide.

Les quatre nouvelles molécules (BBS1a, BPS1b, ESP1b, ESP1d) et le glibenclamide (GLB) ont été solubilisés dans l'eau physiologique et administrée aux animaux par gavage oral (*per os*) pendant 14 jours.

4. Suivi glycémique des animaux

Durant la période de traitement, la glycémie des souris expérimentaux a été mesurée périodiquement (j1, j3, j7, j10 et j14) à l'aide d'un glucomètre Accu-Chek active, qui se compose d'un lecteur électrique avec des bandelettes réactives, permet la mesure quantitative de la glycémie à partir de sang capillaire frais, ce dosage repose sur la méthode enzymatique-colorimétrique (GOD-POD) de [Trinder \(1969\)](#).

➤ **Principe de la méthode**

La Glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) formé de cette réaction est détecté par un accepteur d'oxygène chromogénique, le Phénol-Aminophénazone (PAP), ce chromogène réduit incolore, en présence de la Peroxydase (POD), sera oxydé en un dérivé coloré (Quinone).



➤ **Échantillon**

Sang total capillaire obtenu au niveau de la queue.

➤ **Réalisation du test**

Chaque bandelette est munie d'une zone réactive contenant les enzymes. L'application sang sur cette zone réactive provoque des réactions enzymatiques se traduisant par un changement de la couleur de la zone réactive. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration initiale de glucose présente dans l'échantillon testé.

➤ **Calcul**

❖ Le glucomètre calcule et affiche automatiquement la valeur de glycémie (mg/dl) correspondant à la coloration obtenue.

$$\text{Facteur de conversion: } \text{mg/dl} \times 0,0555 = \text{mmol/l.}$$

❖ Le pourcentage d'évolution de la glycémie durant la période de traitement a été calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de diminution de la glycémie} = [(\text{glycémie finale} - \text{glycémie initiale}) / \text{glycémie initiale}] \times 100.$$

- (+) : indique une augmentation de la glycémie.
- (-) : indique une diminution de la glycémie

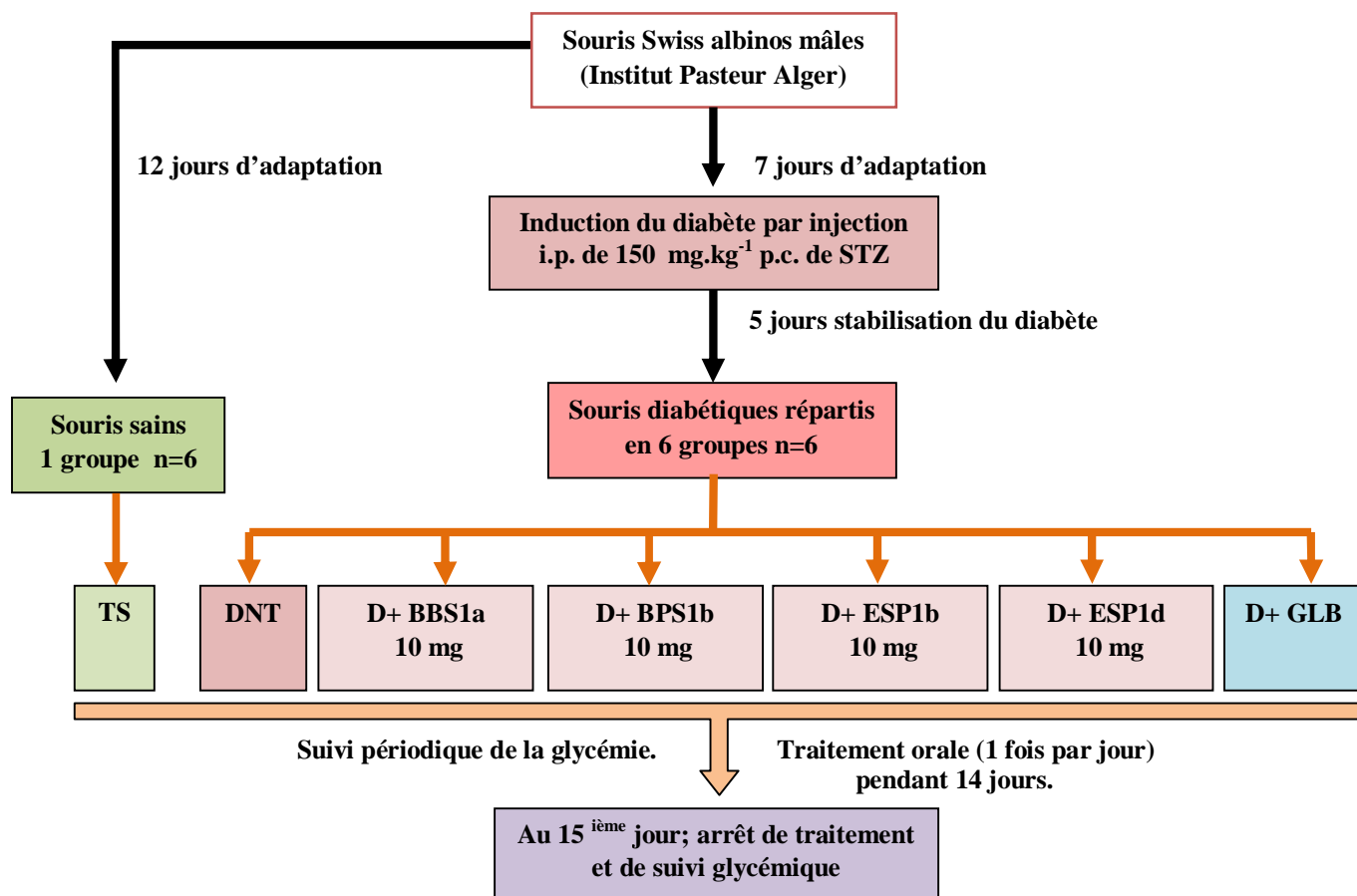


Figure. 20 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental (souris Swiss).

TS, lot Témoin Sain ; **DNT**, lot Diabétique non traité; **D+BBS1a 10 mg**, lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule [*N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide, 1a] ; **D+BPS1b 10 mg**, lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule [*N, N'*- Bis (propyl) sulfamide, 1b] ; **D+ESP1b 10 mg**, lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule [Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate, 1b] ; **D+ESP1d 10 mg**, lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule [Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate, 1d].; **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. /jour de glibenclamide.

5. Explorations statistique des résultats de suivi glycémique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne \pm écart type à la moyenne (Moy \pm Er-T moy). La valeur de $p \leq 0,05$ est considéré comme significative. En utilisant l'ANOVA modèle linéaire généralisé (comparaisons avec un contrôle) suivie d'un test de Dunnett, nous avons comparé les résultats des lots diabétiques (traités et non traité) par rapport au lot témoin sain, puis nous avons comparé les résultats des lots diabétiques traités par rapport au lot diabétique témoin (non traité), ces explorations statistiques ont été réalisés grâce au logiciel de MINITAB (Min, Ver. 13.4).

2^{ième} étude expérimentale:

« Evaluation de l'activité antidiabétique de l'Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine »

1. Animaux

Des rats mâles de la souche Wistar, âgés de huit semaines et pesant entre 180 et 220 g ont été ramenés de l'institut Pasteur d'Alger (Centre d'élevage, Kouba, Alger). Ces animaux ont été regroupés par six dans des cages collectives, soumis à une période d'adaptation de 15 jours aux conditions de l'animalerie, à une température ambiante ($23^{\circ} \pm 2$), une hygrométrie de 45 ± 10 % et une photopériode naturel ($12^h / 12^h$). Ils ont été nourris *ad libitum* avec un régime standard de croquette (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) dont la composition est citée au **tableau 5**, l'eau a été quotidiennement renouvelée.

2. Induction du diabète expérimental

Après une nuit de jeûne (avec accès libre à l'eau), les rats ont été injectés par voie intrapéritonéale avec la streptozotocine (STZ) à une dose de 55 mg/kg p.c. dissoute dans un volume de 1ml/kg p.c. de tampon citrate 0,1 M de pH = 4,5 fraîchement préparé (Altan et al., 1997). Étant donné que l'administration de STZ est capable de produire une hypoglycémie fatale à la suite d'une libération massive de l'insuline du pancréas, les rats ont été gavés, 6 h après l'injection de STZ, avec une solution de 5% de glucose pendant les 48 h suivantes pour prévenir cette hypoglycémie réactive (Ramachandran et al., 2004). Sept jours après l'injection de STZ, les animaux ayant une glycosurie avec des taux de glucose sanguin supérieur à 300 mg/dl ont été considérés comme diabétiques (Ahmed et al., 1998) et sélectionnés pour l'expérience.

3. Traitement

Dans cette étude, nous avons utilisé 12 rats normaux (non traités avec la STZ) et 30 rats rendus diabétiques par la STZ. Ces animaux ont été répartis en sept groupes (n=6 rats/groupe) et traités comme suit :

- **TS** : lot Témoin Sain a reçu 0,5 ml de l'eau physiologique (solution de 0,9 % NaCl) ;
- **S+ESP1b 20 mg**: lot Sain Traité par 20 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule ESP1b : **Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate, 1b**;

- **DNT**: lot Diabétique (non traité) a reçu 0,5 ml de l'eau physiologique ;
- **D+ESP1b 5 mg**: lot Diabétique traité par 5 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule ESP1b;
- **D+ESP1b 10 mg** : lot Diabétique traité par 10 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule ESP1b;
- **D+ESP1b 20 mg** : lot Diabétique traité par 20 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la molécule ESP1b;
- **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. /jour de glibenclamide.

Les trois doses de la nouvelle molécule (ESP1b) et du glibenclamide (GLB) ont été solubilisées dans l'eau physiologique et administrée aux animaux par gavage oral (*per os*) pendant 28 jours.

4. Suivi des animaux pendant l'expérimentation

4.1. Poids corporel

Les rats ont été pesés périodiquement durant la période expérimentale.

4.2. Glycémie

La glycémie à jeun a été mesurée en 1^{er}, 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jour de la période de traitement à l'aide d'un glucomètre Accu-Chek active.

Le pourcentage d'évolution de la glycémie a été calculé de la manière suivante :

% de diminution de la glycémie = [(glycémie finale – glycémie initiale) / glycémie initiale] × 100.

- (+) : indique une augmentation de la glycémie.
- (-) : indique une diminution de la glycémie

5. Test de tolérance au glucose oral (OGTT)

Au 12^{ème} jour de la période de traitement, les animaux ont été soumis à un test de tolérance au glucose oral (OGTT). Après une nuit de jeûne (16 h), un échantillon de sang a été prélevé (t=0 min) chez les rats dans les groupes normaux et diabétiques. Sans tarder, une charge de glucose (2g/kg p.c.) a été administrée par gavage. Quatre autres échantillons ont également été prélevés à partir de la queue à 30, 60, 90 et 120 min d'intervalle pour l'estimation des concentrations de glucose sanguin par le procédé mentionné ci-dessus ([Latha et Daisy, 2011](#)).

6. Sacrifice et prélèvement des échantillons sanguins

Au 29^{ième} jour, les rats sont sacrifiés à 08^h:00 du matin pour éviter l'effet du stress et à jeun pour éviter la perturbation des paramètres biochimiques par la composition de la nourriture.

Le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes EDTA différents :

- L'un a été destiné au dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) et l'évaluation des paramètres hématologiques (Numération et Formule Sanguine).
- L'autre a subi une centrifugation à 6000 rpm pendant 10 minutes, le plasma résultant a été destiné au dosage des paramètres biochimiques.

7. Prélèvement des organes

Après la dissection des rats, le foie, le pancréas, les reins, les testicules, le cœur et la rate, sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium (Na Cl) à 0,9 %, puis pesées afin d'évaluer les rapports organo-corporels.

Un fragment, du foie, du pancréas et des reins de chaque animal sont fixés dans une solution de formol-aldéhyde à 10 % pendant 48 heures en vue de réaliser des coupes histologiques.

Une partie du foie, a été stockée au congélateur à -20 °C pour le dosage du glycogène hépatique et des paramètres tissulaires de stress oxydant.

La **figure 21** résume les différentes étapes du protocole expérimental.

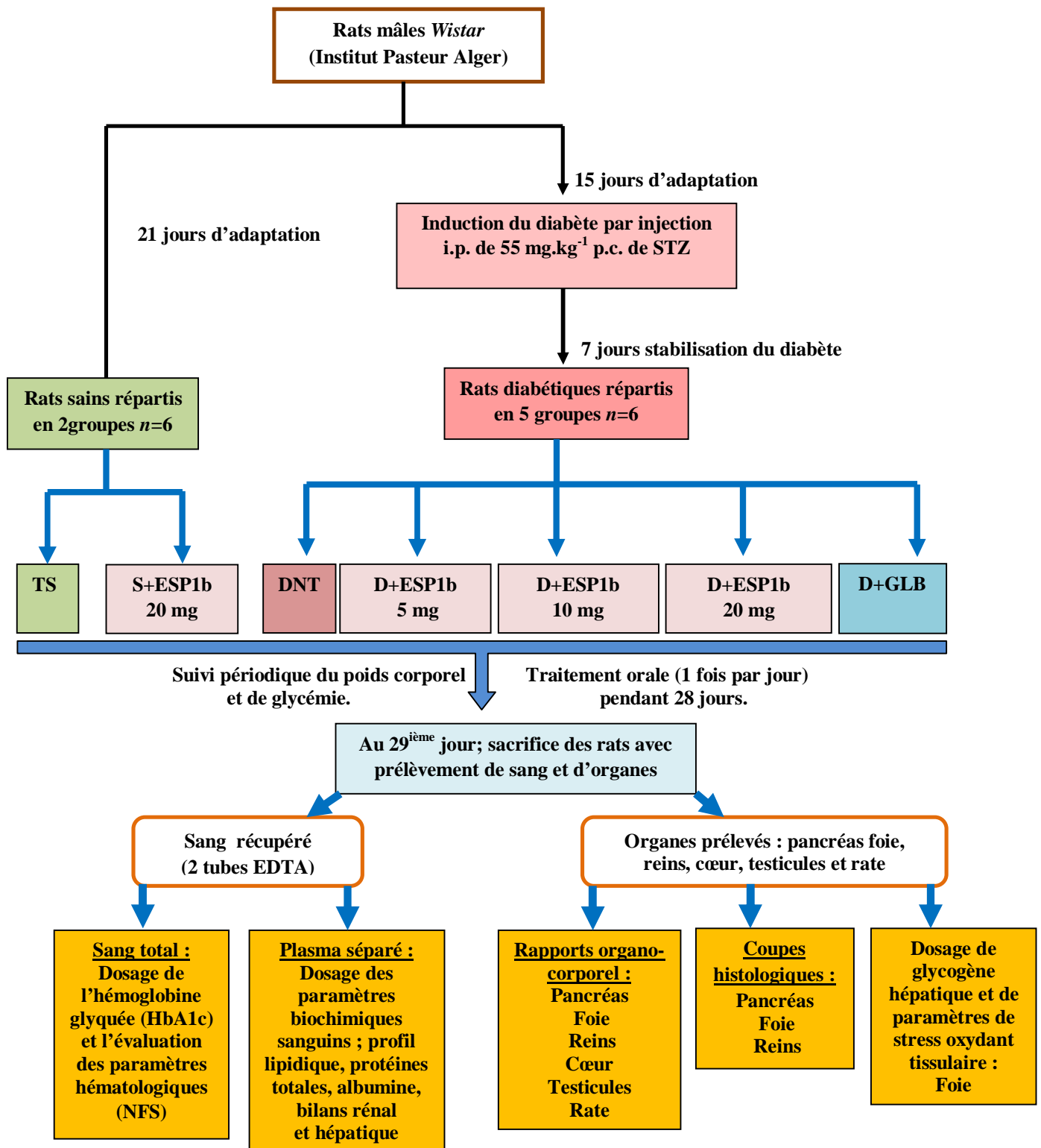


Figure. 21: Schéma récapitulatif du protocole expérimental (rat Wistar).

TS : lot Témoin Sain ; **S+ESP1b:** lot Sain Traité par 20 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la nouvelle molécule ESP1b ; **DNT:** lot Diabétique non traité; **D+ESP1b:** lots Diabétiques traités, respectivement, par 5, 10 et 20 mg.kg⁻¹ p.c. /jour de la nouvelle molécule ESP1b; **D+GLB :** lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. /jour de glibenclamide.

8. Dosage des paramètres biochimiques sanguins

La plupart des paramètres biochimiques sanguins ont été évalués par des méthodes spectrophotométriques (chimiques et/ou enzymatiques) manuelles à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS (6405 Jenway).

Trois paramètres ont été évalués à l'aide des automates de biochimie clinique; l'insuline, l'hémoglobine glyquée (HbA1c) et la protéine C-réactive (CRP) :

- L'insuline, par la méthode immunologique «sandwich» ; test d'électrochimiluminescence «ECLIA» sur l'analyseur Cobas e 411 (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne).
- L'hémoglobine glyquée (HbA1c) par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) par échange d'ions sur l'analyseur Bio-Rad D-10™ (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France).
- La protéine C-réactive (CRP) par la méthode quantitative immunoturbidimétrique sur l'analyseur Beckman SYNCHRON CX7 (Beckman Coulter, Inc. Villepinte, France).

8.1. Dosage de l'Insuline

En utilisant, une **Méthode Immunologique «sandwich» par électrochimiluminescence «ECLIA»** sur l'analyseur **cobas e 411** (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Selon la fiche technique *cobas* (12179113001V11).

➤ *Principe de la méthode*

1^{ère} incubation : dans une prise d'essai de 20 µl, l'échantillon est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique marqué au ruthénium. Il se forme un «sandwich ».

2^e incubation : les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunitaire est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de tampon système « ProCell ». Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

➤ **Réactifs**

M	Microparticules tapissées de streptavidine (bouchon transparent), 1 flacon contenant 6,5 ml : microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/ml, conservateur
R 1	Ac anti-insuline~biotine (bouchon gris), 1 flacon contenant 10 ml : anticorps monoclonaux (de souris) anti-insuline biotinylés 1 mg/l ; tampon MES 50 mmol/l, pH 6,0 ; conservateur
R 2	Ac anti-insuline~Ru(bpy) ²⁺ ₃ (bouchon noir), 1 flacon contenant 10 ml : anticorps monoclonaux (de souris) anti-insuline marqués au ruthénium 1,75 mg/l ; tampon MES 50 mmol/l, pH 6,0 ; conservateur

➤ **Échantillon**

Plasma fraîchement prélevé et séparé

➤ **Réalisation du test**

- L'analyseur effectue automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les informations spécifiques du test mémorisées dans le code-barres doivent être saisies. Si, exceptionnellement, le code-barres ne peut être lu par l'appareil, saisir manuellement la série des 15 chiffres inscrits sur l'étiquette.
- Amener les réactifs réfrigérés à env. 20 °C avant le chargement et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20 °C. Eviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

➤ *Calcul*

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en $\mu\text{U/ml}$ ou en pmol/l .

$$\text{Facteurs de conversion : } \mu\text{U/ml} \times 6,945 = \text{pmol/l}$$

$$\text{pmol/l} \times 0,144 = \mu\text{U/ml}$$

8.2. Dosage de l'Hémoglobine glyquée (HbA_{1c})

En utilisant, une méthode de **Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) par échange d'ions** sur l'analyseur **Bio-Rad D-10™** (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France).

✓ Le Bio-Rad D-10™ est un analyseur compact, peu encombrant (dimensions : 402 mm (L) x 476 mm (H) x 534 mm (P), poids de 35 Kg). Il s'agit d'un système de CLHP par échange d'ions utilisable pour le dosage des hémoglobines A_{1c}, A₂, F et le dépistage des variants de l'hémoglobine. Dans notre étude expérimentale, nous l'avons utilisé seulement pour le dosage de l'HbA_{1c}.

Il comporte :

- un système de prélèvement, de dilution des échantillons et de lavage ;
- un module chromatographique contenant une pompe double piston, une vanne et une boucle d'injection de 25 μl , une enceinte thermostatée contenant la colonne échangeuse d'ions, un détecteur (diode électroluminescente) ;
- un module électronique comprenant une imprimante, un écran tactile et un PC équipé d'un logiciel permettant une connexion bidirectionnelle avec l'informatique du laboratoire.

➤ *Principe et méthodologie du dosage*

Ce dosage repose sur le principe de la séparation des analytes par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) par échange d'ions. Les échantillons sont automatiquement dilués dans le système D-10[®], puis injectés dans la cartouche analytique.

Le système D-10[®] envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante dans la cartouche ; les molécules d'hémoglobine sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec le matériau contenu dans la cartouche. Les molécules d'hémoglobine séparées traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm.

Le logiciel D-10 intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un compte rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon. Il comporte les informations suivantes : date et heure du dosage, identification de l'échantillon (calibrant, contrôle, patient), identification de l'injection (numéro de la série, numéro de l'injection, position de l'échantillon sur le rack), le chromatogramme, les surfaces et les temps de rétention des différents pics identifiés et le taux de l'HbA_{1c} en %. La **Figure 22** illustre des exemples de chromatogrammes obtenus avec la méthode D-10[®] HbA_{1c}.

Pour un sang normal, six fractions sont identifiées dans l'ordre de leur élution : HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA_{1c} labile identifiée «LA_{1c}» sur le chromatogramme, HbA_{1c}, HbA₀. La surface de l'hémoglobine A_{1c} est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien exponentiellement modifié qui permet d'exclure la surface des pics dus à l'HbA_{1c} labile et à l'hémoglobine carbamylée de la surface du pic A_{1c}.

La séparation des fractions s'effectue en 3 minutes dans le programme HbA_{1c}, en 6,5 minutes en programme A₂/F/A_{1c}. Le passage d'un programme à l'autre se fait sans changement de réactifs ni de cartouche et sans soumettre le système à un nouveau conditionnement.

➤ **Echantillon**

Sang total

➤ **Exemples de chromatogrammes obtenus avec la méthode D-10[®] HbA_{1c}**

La **Figure 22** présente 2 chromatogrammes obtenus avec la méthode D-10[®] HbA_{1c}

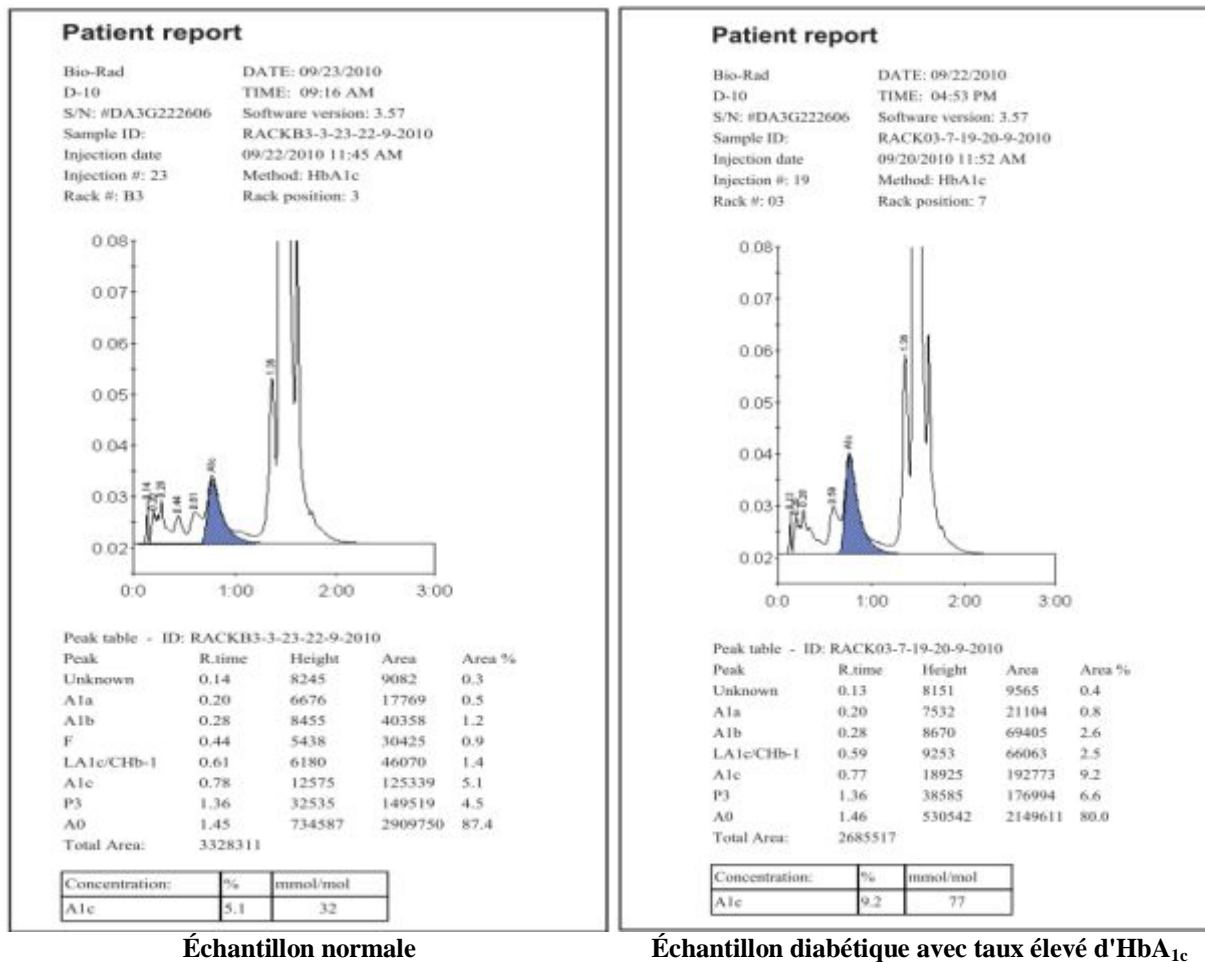


Figure. 22 : Des exemples de chromatogrammes obtenus avec la méthode D-10[®] HbA_{1c}.

➤ **Composition du kit**

Le coffret de réapprovisionnement contient le matériel nécessaire à la réalisation de 400 tests pour l'HbA_{1c} ou de 200 tests pour HbA₂/F/A_{1c}:

REF	Description
220-0210	Tampon d'éluion 1. Deux flacons contenant 2000 ml d'un tampon bis-tris/phosphate, pH 6,0. Contient moins de 0,05 % d'azide de sodium en tant qu'agent conservateur.
220-0211	Tampon d'éluion 2. Un flacon contenant 1000 ml d'un tampon bis-tris/phosphate, pH 6,7. Contient moins de 0,05 % d'azide de sodium en tant qu'agent conservateur.
220-0212	Solution de lavage/dilution. Un flacon contenant 1600 ml d'eau dé-ionisée avec moins de 0,05 % d'azide de sodium en tant qu'agent conservateur.
220-0128	Gamme étalon/diluant HbA_{1c}. Chaque gamme comprend 3 flacons d'étalon de niveau 1, 3 flacons d'étalon de niveau 2 et 1 flacon de diluant d'étalon. Les flacons d'étalon contiennent un hémolyt lyophilisé de

	globules rouges humains ainsi que de la gentamicine, de la tobramycine et de l'EDTA en tant qu'agents conservateurs. Le volume de reconstitution est de 7 ml par flacon. Le diluant d'étalon contient 100 ml d'eau déionisée, ainsi que de l'azide de sodium à moins de 0,05 % en tant qu'agent conservateur.
220-0218	Gamme étalon/diluant HbA₂/F/A_{1c}. Chaque gamme comprend 3 flacons d'étalon de niveau 1, 3 flacons d'étalon de niveau 2 et 1 flacon de diluant d'étalon. Les flacons d'étalon contiennent un hémolysat lyophilisé de globules rouges humains ainsi que de la gentamicine, de la tobramycine et de l'EDTA en tant qu'agents conservateurs. Le volume de reconstitution est de 7 ml par flacon. Le diluant d'étalon contient 100 ml d'eau déionisée, ainsi que de l'azide de sodium à moins de 0,05 % en tant qu'agent conservateur.
220-0212	Cartouche analytique. Une cartouche échangeuse de cations, 4,0 mm DI x 30 mm.
220-0148	Sang total de conditionnement. Quatre flacons d'hémolysat lyophilisé de globules rouges humains contenant de la gentamicine, de la tobramycine et de l'EDTA en tant qu'agents conservateurs. Le volume de reconstitution est de 1,0 ml par flacon,
220-0215	Disquette informatique contenant les paramètres du D-10 Dual Program.
220-0149	Microtubes échantillons. 100 godets en polypropylène avec capuchons perforables, 1,5 ml. Papier imprimante, Un rouleau.

8.3. Dosage de Lipides totaux

Par la **Méthode Colorimétrique (Sulfo-phospho-vainilline)**. Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS27-I 22/06/11).

➤ *Principe de la méthode*

Les lipides insaturés réagissent avec l'acide sulfurique pour former des ions carbonium. Dans une deuxième étape, les ions carbonium réagissent avec la phosphovainilline pour donner une couleur rose. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des lipides totaux dans l'échantillon ([Cottet et al., 1965](#)).

➤ *Réactifs*

R	Phosphovainilline	235 mmol/l
TOTAL LIPIDS CAL	Etalon aqueux de Lipides totaux	750 mg/dl
Réactif additionnel	Acide sulfurique	p.a. (H ₂ SO ₄)

Le réactif et l'étalon sont prêts à l'emploi.

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Étalon	Échantillon
H₂SO₄ (ml)	2,5	2,5
Étalon (µl)	100	--
Echantillon (µl)	--	100

- Agiter les tubes préparés à l'aide d'un agitateur mécanique.
- Incuber pendant 10 minutes dans un bain d'eau bouillante (100°C).
- Refroidir dans l'eau glacée et les transférer dans d'autres tubes à essais:

	Blanc	Étalon	Échantillon
R (ml)	1,0	1,0	1,0
Échantillon. digéré en acide (µl)	--	--	50
Étalon. digéré en acide (µl)	--	50	--

- Agiter les tubes préparés à l'aide d'un agitateur mécanique.
- Incuber à 37°C pendant 15 minutes.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 520 nm contre le blanc. La couleur est stable au moins 1 heure.

➤ *Calcul*

$$\frac{(A)_{\text{Échant}}}{(A)_{\text{Étalon}}} \times 750 (\text{Conc de l'Étalon}) = \text{mg/dl de Lipides totaux dans l'échantillon}$$

8.4. Dosage de Triglycérides

Par la **Méthode Enzymatique-Colorimétrique (GPO-POD) de Fossati et Prencipe couplée à une réaction de Trinder**. Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS31-F 24/09/13).

➤ **Principe de la méthode**

Les triglycérides présents dans l'échantillon sont hydrolysés enzymatiquement par la Lipoprotéine lipase (LPL) afin de libérer du Glycérol et des Acides gras libres. Le glycérol résultant est phosphorylé par l'Adénosine triphosphate (ATP) et la Glycérol kinase (GK) pour produire du Glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'Adénosine diphosphate (ADP). Le glycérol-3-phosphate est ensuite oxydé en Dihydroxyacétone phosphate (DAP) par la Glycérol phosphate oxydase (GPO) en produisant du Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans une dernière réaction colorée (de Trinder), le peroxyde d'hydrogène réagit avec la 4-Aminophénazone (4-AP) et le p-Chlorophénol en présence de la Peroxydase (POD) pour produire un composé rose (la Quinonéimine).



L'absorbance du composé coloré (la Quinonéimine) est proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans l'échantillon testé (Fossati et Prencipe, 1982 ; Trinder, 1969).

➤ **Réactifs**

R1 : Tampon	GOOD pH= 7,5	50 mmol/l
	p-Chlorophénol	2 mmol/l
R2 : Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/l
	Glycérol-kinase (GK)	500 U/l
	Glycérol phosphate oxydase (GPO)	2500 U/l
	Peroxydase (POD)	440 U/l
	4-Aminophénzone (4-AP)	0,1 mmol/l
	ATP	0,1 mmol/l
TRIGLYCERIDES CAL	Etalon primaire de Triglycérides	200 mg/dl

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): dissoudre une capsule d'enzymes R2 dans le contenu d'un flacon de 10 mL de tampon R1, Refermer et agiter doucement jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Stabilité du RT : 6 semaines au réfrigérateur (2-8°C) ou une semaine à 15-25°C.

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	--	10	--
Échantillon (µl)	--	--	10

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés pendant 5 minutes à 37 °C ou 10 minutes à température ambiante (15-25 °C).
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon à 505 nm contre le blanc. La coloration est stable au moins 30 minutes.

➤ *Calcul*

$$\frac{(A)_{\text{Échant}}}{(A)_{\text{Étalon}}} \times 200 (\text{Conc de l'Étalon}) = \text{mg/dl de triglycérides dans l'échantillon}$$

$$\text{Facteur de conversion: mg/dl} \times 0,0113 = \text{mmol/l.}$$

8.5. Dosage du Cholestérol total

Par la **Méthode enzymatique colorimétrique (CHOD-POD)**. Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS11-F 12/09/13).

➤ *Principe de la méthode*

Le cholestérol présent dans l'échantillon donne lieu à un composé coloré en rose (la Quinonéimine), selon les étapes suivantes :

Dans une première étape, les Esters de cholestérol sont hydrolysés par la Cholestérol estérase (CHE) en Cholestérol et Acides gras libres. Le cholestérol libre, y compris celui initialement présent, est ensuite oxydé par l'intermédiaire de la Cholestérol oxydase (CHOD) pour former du 4-Cholesténone et du Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le peroxyde d'hydrogène réagit avec le 4-Aminophénazone et le Phénol en présence de la Peroxydase (POD) pour former un chromophore rose (la Quinonéimine).



L'intensité de la couleur rose formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol présent dans l'échantillon testé (Allain et al., 1974).

➤ Réactifs

R1:	PIPES pH 6,9	90 mmol/l
Tampon	Phénol	26 mmol/l
R 2 :	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/l
Enzymes	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/l
	Peroxydase (POD)	1250 U/l
	4 -Aminophénazone (4-AP)	0,4 mmol/l
CHOLESTEROL CAL	Étalon primaire aqueux de Cholestérol	200 mg/dl

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): dissoudre une capsule d'enzymes R2 dans le contenu d'un flacon de tampon R1, Refermer et agiter doucement jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Stabilité du RT : 4 mois au réfrigérateur (2-8°C) ou 40 jours à 15-25°C. Conserver à l'abri de la lumière.

➤ Échantillon

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	--	10	--
Échantillon (µl)	--	--	10

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés pendant 5 minutes à 37 °C ou 10 minutes à température ambiante (15-25 °C).
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et l'échantillon à 505 nm contre le Blanc. La coloration reste stable pendant au moins 60 minutes.

➤ *Calcul*

$$\frac{(A)_{\text{Échant}}}{(A)_{\text{Étalon}}} \times 200 (\text{Conc de l'Étalon}) = \text{mg/dl de Cholestérol dans l'échantillon}$$

Facteur de conversion: mg/dl \times 0,0258 = mmol/l.

8.6. Dosage du Cholestérol HDL

Par la **Méthode de Réactif précipitant**. Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS12-F 12/09/13).

➤ *Principe de la méthode*

Les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) du sérum ou du plasma se précipitent spécifiquement par addition d'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. Le surnagent obtenu, après centrifugation du précipité, contient les lipoprotéines de haute densité (HDL). La fraction du Cholestérol-HDL est déterminée en employant le réactif enzymatique du cholestérol total (Grove, 1979).

➤ **Réactifs**

R	Acide phosphotungstique	14 mmol/l
Réactif précipitant	Chlorure de magnésium	2 mmol/l
additionnel	kit du Cholestérol total	Réf. 1001092 Réf. 1001093

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

➤ **Échantillon**

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ **Mode opératoire**

- Pipetez dans des tubes à centrifuger :

R (µl)	100
Échantillon (ml)	1,0

- Agiter les tubes préparer et les laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 20 min à 4000 r.p.m. ou 2 min à 12000 r.p.m.
- Collecter le surnageant et mesurer la concentration du cholestérol-HDL en suivant les instructions du réactif de cholestérol total.

➤ **Calcul**

Procéder selon les instructions détaillées dans les instructions de travail de Cholestérol total.

8.7. Évaluation du Cholestérol-LDL

- La concentration sérique de cholestérol-LDL (C-LDL) est un élément clé de l'évaluation du risque cardiovasculaire. La première méthode de routine permettant d'obtenir le C-LDL est la formule de Friedewald ([Friedewald et al., 1972](#)), qui estime le C-LDL à partir du cholestérol total, du cholestérol-HDL et de la triglycéridémie.
- La formule de Friedewald permet de calculer le cholestérol LDL à condition que le taux des triglycérides soit inférieur à 3.75 mmol/L (3,4 g/L).

Pour les dosages exprimés en mmol/l: $C\text{-LDL} = C\text{-total} - (C\text{-HDL} + TG/2,2)$

Pour les dosages exprimés en g/l: $C\text{-LDL} = C\text{-total} - (C\text{-HDL} + TG/5)$

- ✓ Le rapport **TG/2,2** (en mmol/l) ou **TG/5** (en g/l) est une estimation de la concentration de cholestérol dans les **VLDL**

- ❖ Si le taux des triglycérides est supérieur à 3.75 mmol/l (3,4 g/l) le cholestérol-LDL peut être calculé par la formule de Planella ([Planella et al., 1997](#)) après le dosage de l'Apolipoprotéine B :

$$C\text{-LDL (mmol/l)} = 0,41 C\text{-total (mmol/l)} - 0,32 TG \text{ (mmol/l)} + 1,7 \text{ apo B(g/l)} - 0,27.$$

8.8. Dosage de l'Albumine

Par la **Méthode Colorimétrique au Vert de bromocrésol (BCG ; *Bromocresol green*)**. Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS02-F 05/05/14).

➤ *Principe de la méthode*

En milieu tamponné à pH 4.2, l'albumine se combine au vert de bromocrésol pour former un complexe bleu-vert qui absorbe à 630nm. L'intensité de la coloration du complexe est proportionnelle à la concentration d'albumine présente dans l'échantillon ([Doumas et al., 1971](#)).

➤ *Réactifs*

R	Vert de Bromocrésol, pH 4,2	0.12 mmol/l
ALBUMINE CAL	Albumine aqueux	5 g/dl

Le réactif et l'étalon sont prêts à l'emploi.

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	--	5	--
Échantillon (µl)	--	--	5

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés pendant 5 minutes à 37 °C ou 10 minutes à température ambiante (15-25 °C).
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon à 630 nm contre le blanc. La coloration est stable au moins 30 minutes.

➤ *Calcul*

$$\frac{(A)_{\text{Échant}}}{(A)_{\text{Étalon}}} \times 5(\text{Conc de l'Étalon}) = \text{mg/dl d'albumine dans l'échantillon}$$

$$\text{Facteur de conversion: mg/dl} \times 144,9 = \mu\text{mol/l.}$$

8.9. Dosage de la Créatinine

Par la **Méthode colorimétrique-cinétique de Jaffé (sans déprotéinisation)**. Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS13-F 13/09/13).

➤ *Principe de la méthode*

Le dosage de la créatinine est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium comme décrit par [Jaffé \(1886\)](#) sans l'étape de déprotéinisation de l'échantillon.

La créatinine en réagissant avec l'acide picrique en milieu alcalin forme un complexe de couleur rouge. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine présente dans l'échantillon.

Les intervalles de temps optés pour la mesure, par cette méthode cinétique de 2 points, évitent des interférences d'autres constituants de sérum ([Butler, 1975](#) ; [Vasiliades, 1976](#)).

➤ *Réactifs*

R1: Réactif picrique	Acide picrique	17,5 mmol/l
R 2 : Réactif alcalinisant	Hydroxyde de sodium	0,29 mmol/l
CREATININE CAL	Étalon aqueux de créatinine	2 mg/dl

Préparation des réactifs

Réactif de travail (RT): Mélanger des volumes égaux de réactif picrique R1 et de réactif alcalinisant R2. Stabilité du réactif de travail: 1 mois à 2-8°C ou 3 semaines à température ambiante (15-25°C).

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	--	100	--
Échantillon (µl)	--	--	100

- Agiter les tubes préparés, et démarrer le chronomètre.
- Lire l'absorbance 1 (A1) après 30 secondes et l'absorbance 2 (A2) après 90 secondes de l'addition de l'échantillon ou de l'étalon à 492 nm contre le blanc.
- Calculer: $\Delta A = A2 - A1$ pour l'étalon et les échantillons.

➤ *Calcul*

$$\frac{(\Delta A)_{\text{Échant}}}{(\Delta A)_{\text{Étalon}}} \times 2 (\text{Conc de l'Étalon}) = \text{mg/dl de Créatinine dans l'échantillon}$$

$$\text{Facteur de conversion: mg/dl} \times 88,4 = \mu\text{mol/l.}$$

8.10. Dosage de l'Urée

Par la **Méthode enzymatique cinétique UV (Uréase-GLDH)** basée sur la réaction décrite par [Talke et Schubert \(1965\)](#) et optimisée par [Tiffany et al \(1972\)](#). Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS32-F 13/09/13).

➤ *Principe de la méthode*

L'urée, présente dans l'échantillon, est hydrolysée par l'uréase en Ammoniaque (NH_3) et en Dioxyde de carbone (CO_2). L'Ammoniaque formé réagit avec l' α -Cétoglutarate pour former le L-glutamate par une réaction, catalysée par la Glutamate déshydrogénase (GLDH), avec oxydation simultanée de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduite (NADH) en Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD). Deux moles de NADH sont oxydées pour chaque mole d'urée présente.



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^+ , mesurée pendant un temps donné à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en urée dans l'échantillon testé.

➤ *Réactifs*

R1:	TRIS pH 7,8	80 mmol/l
Tampon	α -Cétoglutarate	6 mmol/l
R 2 :	Uréase	3750 U/l
Enzymes	Glutamate déshydrogénase (GLDH)	6000 U/l
	NADH	0,32 mmol/l
UREE CAL	Étalon primaire aqueux d'urée	50 mg/dl

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): dissoudre une capsule d'enzymes R2 dans le contenu d'un flacon de tampon R1, Refermer et agiter doucement jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Stabilité du RT : 6 semaines à 2-8°C ou 7 jours à 15-25°C.

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	--	10	--
Échantillon (µl)	--	--	10

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés pendant 5 minutes à 37 °C ou 10 minutes à température ambiante (15-25 °C).
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon à 340 nm contre le blanc. La coloration est stable au moins 30 minutes.

➤ *Calcul*

$$\frac{(A)_{\text{Échant}}}{(A)_{\text{Étalon}}} \times 50 (\text{Conc de l'Étalon}) = \text{mg/dl d'urée dans l'échantillon}$$

$$\text{Facteur de conversion: mg/dl} \times 0,1665 = \text{mmol/l.}$$

8.11. Dosage de l'Acide urique

Par la **Méthode enzymatique colorimétrique (Uricase-POD)**, selon la fiche technique **Spinrect** (BSIS01-F 12/09/13)

➤ *Principe de la méthode*

L'uricase agit sur l'acide urique présent dans l'échantillon pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone (CO₂) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène réagit avec le 2-4 diclorophénol sulphonate (DCPS) et le 4-aminophénazone (4-AP) pour former un complexe de couleur rouge, la Quinonéimine.



L'absorbance mesurée à 520 nm (490-530) de la quinonéimine formée, est proportionnelle à la concentration de l'acide urique présent dans le spécimen (Fossati et al., 1980).

➤ **Réactifs**

R1:	Phosphate (pH = 7,4)	50 mmol/l
Tampon	2-6 Dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mmol/l
R 2 :	Uricase	60 U/l
Enzymes	Peroxydase (POD)	660 U/l
	Ascorbate oxydase	200 U/l
	4-Aminophénazone (4-AP)	1 mmol/l
ACIDE URIQUE CAL	Étalon aqueux d'acide urique	6 mg/dl

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): dissoudre une capsule d'enzymes R2 dans le contenu d'un flacon de 10 mL de tampon R1, Refermer et agiter doucement jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Stabilité du RT : 1 mois au réfrigérateur (2-8°C) ou 10 jours à une température ambiante (15-25 °C).

➤ **Échantillon**

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ **Mode opératoire**

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	--	25	--
Échantillon (µl)	--	--	25

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés pendant 5 minutes à 37 °C ou 10 minutes à température ambiante (15-25 °C).
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon à 520 nm contre le blanc. La coloration est stable au moins 30 minutes.

➤ **Calcul.**

$$\frac{(A)_{\text{Échant}}}{(A)_{\text{Étalon}}} \times 6 (\text{Conc de l'Étalon}) = \text{mg/dl d'acide urique dans l'échantillon}$$

Facteur de conversion: mg/dl \times 59,5 = $\mu\text{mol/l}$.

8.12. Dosages de Bilirubine totale et directe

Par la **Méthode colorimétrique DMSO** basée sur le principe de [Malloy et Evelyn \(1937\)](#) modifié par [Walters et Gerarde \(1970\)](#). Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS36-F 13/09/13).

➤ **Principe de la méthode**

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfanilique diazoté. La bilirubine, en présence de l'acide sulfanilique diazoté, forme un composé, l'azobilirubine, coloré en bleue à pH alcalin et en rouge à pH neutre ou acide.

Des deux fractions présentes dans le sérum, la bilirubine conjuguée au glucuronide (soluble dans l'eau) et la bilirubine libre, non conjuguée, insoluble dans l'eau et donc prise en charge par le transporteur non spécifique du plasma, la sérum-albumine, seule la bilirubine-glucuronide réagit directement en milieu aqueux et dite « Bilirubine directe », cependant la bilirubine non conjuguée exige de la solubilisation avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) avant de réagir et dite « bilirubine indirecte ». Pendant le dosage de la bilirubine indirecte, on dose également la directe, le résultat correspondant à la « bilirubine totale ».

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

➤ *Réactifs*

R1: (D)	Acide sulfanilique	30 mmol/l
	Acide chlorhydrique (HCL)	150 mmol/l
R 2 : (T)	Acide sulfanilique	30 mmol/l
	Acide chlorhydrique (HCL)	50 mmol/l
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7 mmol/l
R3	Nitrite de sodium	29 mmol/l
Optionnel	BILIRUBIN CAL	Réf. 1002250

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	Blanc	B. totale	Blanc	B. direct
R1 (D) (ml)	--	--	1,5	1,5
R2 (T) (ml)	1,5	1,5	--	--
R3 (µl)	--	50	--	50
Échantillon / Étalon (µl)	100	100	100	100

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés pendant exactement 5 minutes à température ambiante (15-25 °C).
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon à 555 nm contre leurs blancs. La coloration finale est stable au moins pendant une heure.

➤ *Calcul***Avec Calibrant:**

$$\frac{(A)_{\text{Échant}} - (A)_{\text{Blanc Échant}}}{(A)_{\text{Étalon}} - (A)_{\text{Blanc Étalon}}} \times \text{Conc de l'Étalon} = \text{mg/dl de bilirubine dans l'échantillon}$$

Avec *Facteur:

(A) Échant – (A) Blanc Échant x *Facteur = mg/dl de bilirubine dans l'échantillon

$$*\text{Facteur} = \frac{\text{Conc de l'Étalon}}{(\text{A})\text{Étalon} - (\text{A})\text{Blanc Étalon}}$$

*Facteur théorique : Bilirubine T = 19,1 ; Bilirubine D = 14

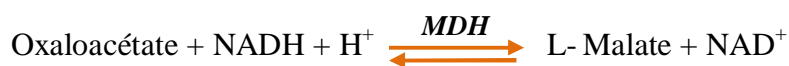
Facteur de conversion: mg/dl × 17,1 = μmol/l.

8.13. Dosage de l'Aspartate aminotransférase (ASAT)

Par la **Méthode cinétique UV. IFCC**. Méthode développée par [Karmen \(1955\)](#) et optimisée par [Henry et al \(1960\)](#). Conforme aux recommandations de l'IFCC ; *International Federation of Clinical Chemistry (1985)* ([Bergmeyer et al., 1986a](#)). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS09-F 13/02/14).

➤ **Principe de la méthode**

L'Aspartate aminotransférase (ASAT) précédemment appelée Glutamate Oxaloacétate Transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé de la L-Aspartate au α-Cétoglutarate en formant le L-Glutamate et l'Oxaloacétate. L'oxaloacétate formé est en suite réduit en L-Malate par le Malate déshydrogénase (MDH) et en présence du coenzyme NADH,H.



La vitesse d'oxydation du NADH en NAD⁺ est proportionnelle à l'activité catalytique de l'AST. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

➤ *Réactifs*

R1: Tampon	TRIS (pH= 7,8)	80 mmol/l
	L- aspartate	200 mmol/l
R 2 : Substrats	NADH	0,18 mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/l
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/l
	α-cétoglutarate	12 mmol/l

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): dissoudre une capsule d'enzymes R2 dans le contenu d'un flacon de 15 mL de tampon R1, Refermer et agiter doucement jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Stabilité du RT : 21 jours à 2-8°C ou 4 jours à température ambiante (15-25°C).

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

Réactif de travail (ml)	1,0
Échantillon (µl)	100

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés à la température choisie (25, 30 ou 37°C) pendant 1 minute.
- Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon à 340 nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes.
- Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$).

➤ *Calcul*

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/l de ASAT}$$

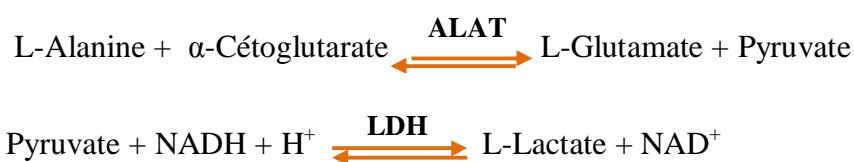
Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de substrat par minute, dans des conditions standard. La concentration est exprimée en unités par litre d'échantillon (U/l).

8.14. Dosage de l'Alanine aminotransférase (ALAT)

Par la **Méthode cinétique UV. IFCC**. Méthode développée par [Wroblewski et LaDue \(1956\)](#), optimisée par [Henry et al \(1960\)](#) et [Bergmeyer et al \(1978\)](#). Conforme aux recommandations de l'IFCC ; *International Federation of Clinical Chemistry (1985)* ([Bergmeyer et al., 1986 b](#)). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS09-F 13/02/14).

➤ Principe de la méthode

L'alanine Aminotransférase (ALAT) ou la Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé de la L-Alanine au α -Cétoglutarate en formant le L-Glutamate et le Pyruvate. Le pyruvate formé est en suite réduit en L-Lactate par le Lactate déshydrogénase (LDH) et en présence du coenzyme NADH,H.



La vitesse d'oxydation du NADH en NAD⁺ est proportionnelle à l'activité catalytique de l'ALT. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

➤ Réactifs

R1: Tampon	TRIS (pH= 7,8)	100 mmol/l
	L-Alanine	500 mmol/l
R 2 : Substrats	NADH	0,18 mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/l
	α -cétoglutarate	15 mmol/l

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): dissoudre une capsule d'enzymes R2 dans le contenu d'un flacon de 15 mL de tampon R1, Refermer et agiter doucement jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Stabilité du RT : 21 jours à 2-8°C ou 5 jours à température ambiante (15-25°C).

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

Réactif de travail (ml)	1,0
Échantillon (µl)	100

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés à la température choisie (25, 30 ou 37°C) pendant 1 minute.
- Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon à 340 nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes contre l'eau distillée ou l'air.
- Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$).

➤ *Calcul*

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/l de ALT}$$

8.15. Dosage de Phosphatases alcalines (PAL)

Par la **Méthode cinétique au Tampon DEA**, Méthode optimisée basée sur les recommandations de la Société allemande de chimie clinique DGKC ([Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972](#)). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS44-F 13/02/14).

➤ *Principe de la méthode*

En milieu alcalin, en présence du Magnésium (Mg^{2+}) et d'un accepteur de phosphate, la Diéthanolamine (DEA), les Phosphatases alcalines (PAL) catalysent l'hydrolyse du p-Nitrophénylphosphate en p-Nitrophénol (composé jaune) et phosphate inorganique, selon la réaction suivante :



La vitesse d'apparition du p-Nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité des PAL dans le spécimen.

➤ *Réactifs*

R1: Tampon	Diéthanolamine (DEA) pH=10,4	1 mol/l
	Chlorure de Magnésium	0,5 mmol/l
R 2 : Substrats	p-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10 mmol/l

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): Mélanger 4 volumes de réactif R1 (Tampon) avec 1 volume de réactif R2 (Substrats). Stabilité du RT : 21 jours à 2-8°C ou 5 jours à température ambiante (15-25°C).

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

Réactif de travail (ml)	1
Échantillon (µl)	20

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés à la température choisie (25, 30 ou 37°C) pendant 1 minute.
- Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon à 405 nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes contre l'eau distillée ou l'air.
- Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$).

➤ *Calcul*

$$\text{à } 405 \text{ nm : } \Delta A/\text{min} \times 2750 = \text{U/l de ALP}$$

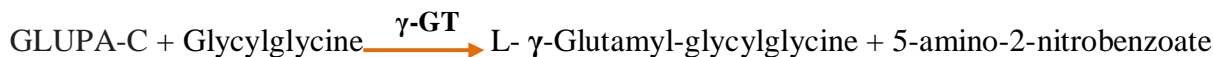
$$\text{à } 410 \text{ nm : } \Delta A/\text{min} \times 2910 = \text{U/l de ALP}$$

8.16. Dosage de la Gamma glutamyl transférase (γ -GT).

Par la Méthode cinétique (GLUPA-C), Méthode optimisée basée sur les travaux de Szasz (1969). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS47-F 12/09/13).

➤ **Principe de la méthode**

La Gamma-Glutamyl transférase (γ -GT) catalyse le transfert d'un groupe γ -Glutamyl de la L- γ -Glutamyl-3-carboxy-p-nitroanilide (GLUPA-C) au dipeptide accepteur, la Glycylglycine, selon la réaction suivante :



La vitesse de formation du 5-amino-2-nitrobenzoate, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de γ -GT dans l'échantillon testé.

➤ **Réactifs**

R1: Tampon	TRIS pH=8,6	100 mmol/l
	Glycylglycine	100 mmol/l
R 2 : Substrats	L- γ -Glutamyl-3-carboxy-p-nitroanilide (GLUPA-C)	3 mmol/l

Préparation des réactifs:

Le réactif de travail (RT): Mélanger 4 volumes de réactif R1 (Tampon) avec 1 volume de réactif R2 (Substrats). Stabilité du RT : 2 mois à 2-8°C ou 1 semaine à température ambiante (15-25°C).

➤ **Échantillon**

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ **Mode opératoire**

- Pipeter dans des tubes à essais:

Réactif de travail (ml)	1
Échantillon (μl)	100

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés à la température choisie (25, 30 ou 37°C) pendant 1 minute.
- Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon à 405 nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes contre l'eau distillée ou l'air.
- Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$).

➤ *Calcul*

à 405 nm : $\Delta A/\text{min} \times 1190 = \text{U/l de } \gamma\text{-GT}$

à 410 nm : $\Delta A/\text{min} \times 1339 = \text{U/l de } \gamma\text{-GT}$

8.17. Dosage de la Lactate déshydrogénase (LDH)

Par la **Méthode cinétique UV. DGKC**. Méthode optimisée par [Henry et al \(1960\)](#), basée sur les recommandations de la Société allemande de chimie clinique DGKC ([Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972](#)). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS43-F 05/02/14).

➤ *Principe de la méthode*

La lactate déshydrogénase (LDH), en présence du NADH, catalyse la réduction du pyruvate en L-Lactate selon la réaction suivante :



La vitesse d'oxydation du NADH en NAD^+ , déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la concentration catalytique de la LDH dans l'échantillon testé.

➤ *Réactifs*

R1: Tampon	Imidazole	65 mmol/l
	pyruvate	0,6 mmol/l
R 2 : Coenzyme	NADH	0,18 mmol/l

Préparation des réactifs

Le réactif de travail (RT): Mélanger 4 volumes de réactif R1 (Tampon) avec 1 volume de réactif R2 (Coenzyme). Stabilité du RT : 21 jours à 2-8°C ou 5 jours à température ambiante (15-25°C).

➤ *Échantillon*

Plasma fraîchement prélevé et séparé.

➤ *Mode opératoire*

- Pipeter dans des tubes à essais:

	25° - 30°C	37°C
Réactif de travail (ml)	3,0	3,0
Échantillon (µl)	100	50

- Agiter les tubes préparés, puis les incubés à la température choisie (25, 30 ou 37°C) pendant 1 minute.
- Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon à 340 nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes contre l'eau distillée ou l'air.
- Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$).

➤ *Calcul*

25° - 30°C ; $\Delta A/\text{min} \times 4925 = \text{U/l de LDH}$
37°C : $\Delta A/\text{min} \times 9690 = \text{U/l de LDH}$

8.18. Dosage de la Protéine C-réactive (CRP)

Par la **Méthode quantitative immunoturbidimétrique** sur l'analyseur **Beckman SYNCHRON CX7** (Beckman Coulter, Inc. Villepinte, France). Selon la fiche technique **Beckman Coulter** (389832 AE).

➤ *Principe de la méthode*

La concentration de Protéine C-réactive a été déterminée quantitative grâce à une méthode immunoturbidimétrique (Boyden et al., 1947; Hellsing, 1974).

Au cours de la réaction, la protéine C-réactive se combine avec un anticorps spécifique pour former des complexes antigène-anticorps insolubles.



La mesure de la variation d'absorbance (due au trouble amené par la réaction antigène-anticorps) à 340 nanomètres est directement proportionnelle à la concentration de CRP dans l'échantillon.

➤ **Réactifs**

Anticorps anti-CRP polyclonal (chèvre)	3,5 ml
Tampon réactionnel Protéine C-réactive	63,4 ml
Contient également d'autres composés non réactifs nécessaires aux performances optimales de l'automate.	

➤ **Echantillon**

Plasma fraîchement prélevé et séparé

➤ **Réalisation du test**

Chaque coffret contient: Deux cartouches de réactif CRP (2 x 200 tests)

VOLUMES PAR TEST	
Volume d'échantillon	10 μ l
Volume total de réactif	260 μ l

- L'analyseur Beckman SYNCHRON CX7 distribue automatiquement les volumes appropriés d'échantillon et de réactif dans la cuve à réaction.
- Le rapport de dilution suivant est utilisé : 1 volume d'échantillon pour 26 volumes de réactif.
- Le système contrôle la variation de l'absorbance à 340 nanomètres.

➤ **Calcul**

La variation d'absorbance est utilisée par l'analyseur Beckman SYNCHRON CX7 pour calculer et exprimer la concentration en CRP (mg/dl) à partir d'une courbe d'étalonnage multipoints, non linéaire (obtenue à l'aide du Trousse calibrateur CRP pour le SYNCHRON®).

9. Dosage de paramètres biochimiques tissulaires (hépatiques)

9.1. Dosage du Glycogène hépatique

➤ *Principe de la méthode*

Le dosage du glycogène dans le tissu hépatique est réalisé selon la méthode colorimétrique de l'antrone-acide sulfurique (Hassid et Abraham, 1957).

➤ *Mode opératoire*

- 100 mg de foie de chaque rat sont homogénéisés dans 2 mL de solution de potasse (KOH à 30 %).
- Le mélange est mis dans des glaçons et broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine.
- La suspension résultante est mise dans un bain-marie à 100 °C pendant 20 min. Après refroidissement, elle est filtrée, puis on ajoute à chaque tube 5 ml d'éthanol à 95 %, ensuite le mélange est gardé à 4 °C pendant une nuit.
- Le précipité est récupéré par centrifugation à 1000 rpm pendant 15 min puis lavé avec de l'éthanol à 80 %.
- Le glycogène ainsi obtenu est séché puis dissous dans 2 ml d'eau distillée.
- 2 ml de l'échantillon est additionné à 5 ml de réactif (antrone-acide sulfurique), agité et incubé au bain marie à 100 °C pendant 10 min puis refroidi.

La densité optique est lue à 620 nm contre un blanc réactif contenant de l'eau distillée, la valeur de l'absorbance est calculée puis convertie en équivalent de concentration glycogène à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie, avec du glucose, dans les mêmes conditions expérimentales.

9.2. Dosage du Glutathion réduit (GSH)

➤ *Principe de la méthode*

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode d'Ellman (1959) modifiée par Weekbeker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB, réactif d'Ellman) par les groupements thiols (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat (par l'acide sulfosalicylique 0,25 %) est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiols spécifiques du glutathion.

➤ *Préparation de l'homogénat*

Les échantillons (200 mg de foie de chaque animal) sont mis séparément en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0,02 M, puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pour obtenir un homogénat.

➤ *Mode opératoire*

- Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0,25 %.
- Agiter le mélange et incubé pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 5 min.
- Prélever 0,5 ml du surnagent.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris + EDTA (0,02 M d'EDTA), pH 9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB à 0,01 M (dissout dans le méthanol absolu).
- incubé pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- Lire les densités optiques (DO) à 412 nm contre le blanc.

➤ *Calcul*

$$\frac{DO \times 1 \times 1,525}{131000 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg de protéine}} = \text{GSH (nM GSH/mg de protéine)}$$

DO : Densité optique à 412 nm.

1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0,8 ml homogénat + 0,2 ml SSA).

1,525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 ml surnageant + 1 ml Tris –EDTA + 0,025 ml DTNB)

13100 : Coefficient d'absorbance (contenant le groupement –SH à 412 nm).

0,8: Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans un 1 ml.

0,5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1,525 ml.

9.3. Mesure de l'activité enzymatique de la Glutathion peroxydase (GPx)

➤ *Principe de la méthode*

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de [Flohé et Günzler \(1984\)](#). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en glutathion oxydé (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :

➤ *Préparation de l'homogénat*

Les échantillons (500 mg de foie de chaque animal) sont mis séparément en présence de 5 ml d'une solution TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

➤ *Mode opératoire*

- Prélever 0,2 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM).
- Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).

- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- Ajouter 0,2 ml de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- Prélever 0,48 ml du surnageant.
- Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
- Ajouter 0,32 mL de DTNB (1 mM).
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

➤ *Calcul*

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{(\text{DO Échant} - \text{DO Étalon}) \times 0.04}{\text{DO Étalon}} = Q$$

Q : Quantité de GSH disparue (oxydée)

DO Échant : Densité optique de l'échantillon

DO Étalon : Densité optique de l'étalon.

0.04 : Concentration du substrat (GSH)

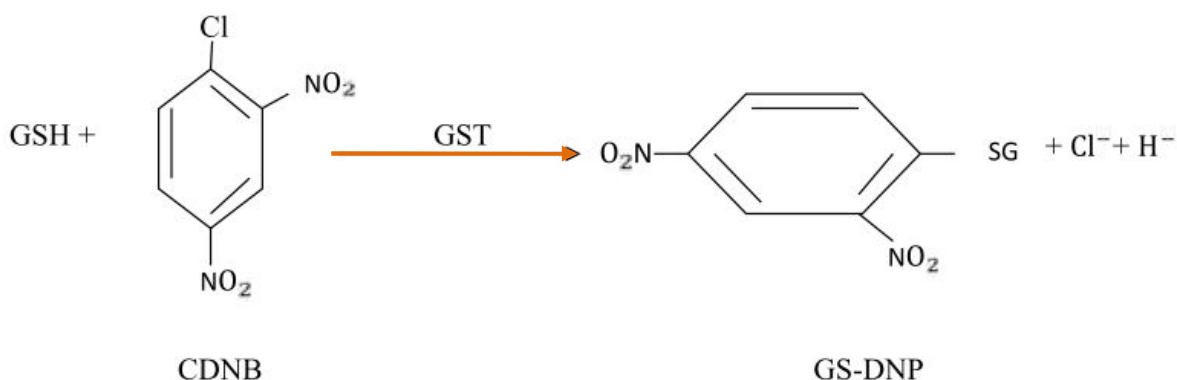
$$\frac{Q}{\text{mg de protéines}} = \text{GPx (}\mu\text{M GSH/min/mg de protéines)}$$

9.4. Mesure de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-transférase (GST)

➤ *Principe de la méthode*

La mesure de l'activité des GSTs a été réalisée par la méthode de [Habig et al. \(1974\)](#), celle-ci consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du 1-chloro,2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugue facilement avec le glutathion (GSH) sous l'action de nombreuses formes de GST. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la

formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Di nitrobenzène (CS-DNB) qui absorbe fortement la lumière à 340 nm de longueur d'onde.



La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST.

➤ *Mode opératoire*

- Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 6,5).
- L'homogénat est centrifugé à 1400 rpm pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes.
- Le dosage consiste à faire réagir les GSTs contenue dans le surnageant sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6.5;

	Blanc	Échantillon
Tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 (µl)	850	830
CDNB 0,02 M (µl)	50	50
GSH 0,1 M (µl)	100	100
Échantillon (surnageant) (µl)	--	20

- La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes (5 lectures / 5 minutes) à une longueur d'onde de 340 nm.
- La valeur de la densité optique de blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

➤ *Calcul*

L'activité enzymatique de la GST est obtenue par la formule suivante:

$$\frac{(\text{DO Échant /min} - \text{DO Blanc/min})}{9,6 \times \text{mg de protéines}} = \text{GST (nM GSH-CDNB/min/mg de protéines)}$$

DO Échant/min : Densité optique de l'échantillon par minute.

DO blanc/min : Densité optique du blanc par minute.

9,6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

9.5. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT)

Les catalases interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène.

➤ *Principe de la méthode*

L'activité de la catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une température d'incubation de 25 °C (Aebi., 1984).

➤ *Préparation de l'homogénat*

Les échantillons (500 mg de foie de chaque animal) sont mis séparément en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat, ce dernier est centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes.

➤ *Mode opératoire*

	Blanc	Échantillon
Tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (µl)	800	780
H ₂ O ₂ 0,5 M (µl)	200	200
Échantillon (surnageant) (µl)	--	20

On note que :

- Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.
- La quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de surnageant dilué.
- L'activité décroît rapidement, il est important de respecter toujours le même temps de pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

➤ *Calcul*

L'activité enzymatique de la CAT est calculée par la formule suivante :

$$\frac{\Delta DO \times 10}{\varepsilon \times l \times Q \times Fd} = \text{CAT } (\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg de protéines})$$

Δ DO : Variation de la densité optique par minutes.

ε : Coefficient d'extinction du H₂O₂ (0,04 mM⁻¹.cm⁻¹).

l : Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1 cm).

Q : Quantité des protéines en mg/ml.

Fd : Facteur de dilution du H₂O₂ dans le tampon (0,02).

9.6. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiées par les radicaux libres. Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation in vitro.

➤ *Principe de la méthode*

Le taux du MDA a été évalué selon la méthode d'[Esterbauer et al, \(1992\)](#). Le dosage repose sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud (80°C) avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose) absorbant à 530 nm. L'absorbance obtenue est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

➤ *Préparation de l'homogénat*

Les échantillons (500 mg de foie de chaque animal) sont mis séparément en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

➤ *Mode opératoire*

- Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Agiter et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCl 0,6 M.
- Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM).
- Mélanger et incubé au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.
- Lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

➤ *Calcul*

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = \epsilon \cdot l \cdot C$) :

$$\frac{DO \cdot 10}{\epsilon \cdot l \cdot X \cdot Fd} = C(\text{nmol/mg de protéines})$$

C : Concentration en nmoles /mg de protéines ;

DO : Densité optique lue à 530 nm ;

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

l : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;

Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

On note que le dosage de plusieurs paramètres tissulaires (hépatiques) est mesuré par rapport à 1 mg de protéine. C'est pour cela que ces dosages doivent être accompagnés par le dosage des protéines tissulaires.

9.7. Dosage de Protéines tissulaires

➤ *Principe de la méthode*

La concentration des protéines tissulaires est déterminée selon la méthode de [Bradford \(1976\)](#). Ce dosage spectrophotométrique est basé sur le changement d'absorbance après la fixation d'un colorant, se manifestant par le changement de la couleur du Bleu de Coomassie après liaison (complexification) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine.) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et marrons, absorbant à 465-470 nm. Tandis que la forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

➤ *Préparation du Réactif de Bradford*

Bleu de Coomassie (G 250)	0,1 g
Ethanol (95 %)	50 ml
Agiter pendant 2 heures (agitateur magnétique), puis ajouter ;	
Acide Orthophosphorique (85%)	100 ml
Eau distillée	qsp 1000 ml
Ce réactif doit être filtré puis ; il peut être conservé pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.	

➤ *Mode opératoire*

- Prélever 0,1 ml de l'homogénat
- Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.

	Blanc	Échantillon
Réactif de Bradford (ml)	5,0	5,0
Eau distillée (ml)	0,1	--
Échantillon (l'homogénat) (ml)	--	0,1

- Homogénéiser
- Laisser reposer 5 min.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions.

10. Evaluation des paramètres hématologiques

Une numération-formule sanguine (NFS) (ou hémogramme) a été réalisée, pour chaque rat, en prélevant des échantillons de sang total dans des tubes contenant un anticoagulant sec qui est l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA). Cet anticoagulant, chélateur du calcium, permet une bonne conservation des cellules sanguines (de 24 à 48 heures à 4 °C), respecte leur morphologie (Ledieu, 2003) et permet d'éviter les erreurs de comptage dues à la dilution du sang par un excès d'anticoagulant liquide comme l'héparine.

L'automate utilisé pour l'analyse de l'hémogramme est le Beckman[®] Coulter HmX[™]. Cet appareil est un analyseur d'hématologie cytométrique entièrement automatisé avec un passeur d'échantillon (*with Autoloader*), fonctionnant selon 3 principes la variation d'impédance (principe de volumétrie Coulter), la photométrie et l'analyse cytométrique tridimensionnelle (Beckman Coulter, 2010).

10.1. Prise en charge des échantillons sanguins

Lorsque le sang est aspiré dans l'automate, il est segmenté en 3 aliquotes :

- Un échantillon pour effectuer la numération des globules rouges et des plaquettes sur un même canal.
- Un échantillon pour effectuer la numération des leucocytes et le dosage photométrique de l'hémoglobine, après lyse des globules rouges.
- Un échantillon pour effectuer l'analyse cytométrique tridimensionnelle : formule leucocytaire et réticulocytes (Ledieu, 2003).

10.2. Principes de fonctionnement de l'automate

10.2.1. Analyse de numération

- **La numération des trois lignées GB, GR et PLT** ; se base sur la variation d'impédance ou Principe Coulter du nom des inventeurs (Wallace and Joe Coulter-1953), Méthode de référence, la plus répandue pour les numérations sanguines.

- La méthode Coulter effectue avec précision le comptage et l'analyse volumétrique des cellules en détectant et en mesurant les variations de résistance électrique observées lorsqu'une particule (telle qu'une cellule) se trouvant dans un liquide conducteur passe par un micro-orifice. Voir **Figure 23**.

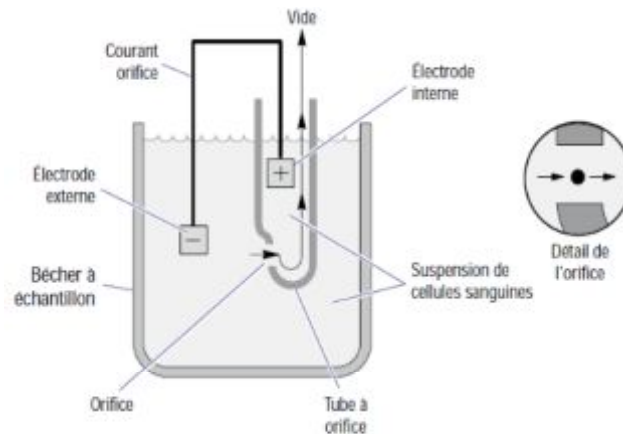


Figure. 23 : Méthode Coulter de comptage et d'analyse volumétrique (Beckman Coulter, 2010).

- Chaque cellule en suspension dans un liquide conducteur (diluant) agit comme un isolant. Lorsqu'une cellule passe au travers de l'orifice, elle augmente momentanément la résistance électrique entre les électrodes submergées situées de part et d'autre de l'orifice. Ceci provoque une impulsion mesurable. Pour le comptage, le vide utilisé pour entraîner la suspension de cellules diluée au travers de l'orifice doit être régulé.
- Le nombre d'impulsions est corrélé au nombre de particules.
- La hauteur de l'impulsion électrique est proportionnelle au volume de la cellule (Beckman Coulter, 2010).

10.2.2. Analyse différentielle

- Lorsque l'échantillon, préparé pour une analyse différentielle, traverse la cellule de mesure, ces trois mesures sont effectuées simultanément sur chaque globule blanc afin de le classer :
 - Un courant basse fréquence mesure le volume.

- Un courant haute fréquence détecte le contenu cellulaire interne en mesurant les variations de conductivité.
- La lumière laser se reflétant sur les leucocytes individuels définit la surface, la forme et la réflectivité de la cellule (Beckman Coulter, 2010).
- La Formule leucocytaire est obtenue par la Technologie VCS de Beckman Coulter, qui se base sur la cytométrie de flux avec analyse tridimensionnelle des données : Impédance - Conductivité - Diffraction laser
 - **V** = Volume : La mesure de la variation d'impédance détermine le volume de la cellule (Principe COULTER)
 - **C** = Conductivité : Une onde électromagnétique de haute fréquence sonde la cellule pour déterminer la taille et la densité de son noyau
 - **S** = Scatter-Diffraction : La quantité de lumière Laser diffractée par la cellule permet de caractériser sa structure interne, ses granulations et sa surface membranaire.

10.2.3. Mesure de l'hémoglobine

Une fois la dilution GB lysée, le système envoie un faisceau de lumière blanche au travers du bac de l'orifice GB, puis au travers d'un filtre optique. La transmission de cette lumière (longueur d'onde de 525 nm) au travers d'un bac de longueur standard de solution de Hb est comparée à la transmission de la même lumière au travers d'un blanc réactif. Le système convertit ce rapport en absorbance. Il convertit ensuite l'absorbance en valeurs Hb, en g/dl, au moyen d'un facteur de calibrage (Beckman Coulter, 2010).

10.3. Paramètres et mode d'acquisition

Cet analyseur délivre un bilan hématologique de 26 paramètres, ces paramètres peuvent être mesurés directement ou obtenus par des calculs (Beckman Coulter, 2010), pour la présente étude ; nous avons retenu (18) paramètres hématologiques:

10.3.1. **Numération de globules rouges (GR)** : C'est le nombre d'érythrocytes mesuré directement, multiplié par la constante de calibrage, et exprimé en tant que

$$GR = n \times \frac{10^6 \text{ cellules}}{\mu\text{l}}$$

10.3.2. **Concentration en hémoglobine (Hb)** : Le poids (masse) de l'hémoglobine, déterminé à partir du degré d'absorbance observé au moyen de la transmission du courant photoélectrique, est :

$$Hb \text{ (g/dl)} = \text{constante} \times \log_{10} \left(\frac{\text{référence \%T}}{\text{échantillon \%T}} \right)$$

10.3.3. **Volume moyen globulaire (VMG) ou cellulaire (VMC)** : C'est le volume moyen des érythrocytes individuels acquis à partir de l'histogramme GR. Le système :

- Multiplie le nombre d'érythrocytes dans chaque canal par le volume des érythrocytes dans ce canal.
- Additionne les produits de chaque canal entre 36 fl et 360 fl.
- Divise cette somme par le nombre total d'érythrocytes entre 36 fl et 360 fl.
- Multiplie la valeur obtenue par une constante de calibrage et exprime le VMC en femtolitres.

10.3.4. **Hématocrite (Ht)** : C'est le volume relatif des érythrocytes par rapport au sang total, calculé par :

$$Ht \text{ (\%)} = \frac{GR \times VMC}{10}$$

10.3.5. **Teneur cellulaire moyenne en hémoglobine (TCMH)** : C'est le poids d'hémoglobine dans la numération érythrocytaire moyenne, calculé par :

$$TCMH \text{ (pg)} = \frac{Hb}{GR} \times 10$$

10.3.6. **Concentration cellulaire moyenne en hémoglobine (CCMH)** ; C'est le poids moyen d'hémoglobine dans une dilution mesurée, calculé par :

$$\text{CCMH (g/dl)} = \frac{\text{Hb}}{\text{Ht}} \times 100$$

10.3.7. **Numération plaquettaire (Plt)** ; C'est le nombre de thrombocytes extrait de l'histogramme des plaquettes et multiplié par une constante de calibrage. Ce nombre est exprimé sous la forme :

$$\text{Plt} = n \times 10^3 \text{ cellules}/\mu\text{l}$$

10.3.8. **Numération de globules blancs (GB)** : C'est le nombre de leucocytes mesuré directement, multiplié par la constante de calibrage, et exprimé en tant que

$$\text{GB} = n \times \frac{10^3 \text{ cellules}}{\mu\text{l}}$$

10.3.9. **Formule leucocytaire en Pourcentages**

Les pourcentages de chaque sous-population leucocytaire sont acquis à partir du scattergramme.

$$\begin{aligned} \text{NE\%} &= \frac{\text{nbre de cellules dans la zone NE}}{\text{nbre de cellules dans NE + LY + MO + EO + BA}} \times 100 \\ \text{LY\%} &= \frac{\text{nbre de cellules dans la zone LY}}{\text{nbre de cellules dans NE + LY + MO + EO + BA}} \times 100 \\ \text{MO\%} &= \frac{\text{nbre de cellules dans la zone MO}}{\text{nbre de cellules dans NE + LY + MO + EO + BA}} \times 100 \\ \text{EO\%} &= \frac{\text{nbre de cellules dans la zone EO}}{\text{nbre de cellules dans NE + LY + MO + EO + BA}} \times 100 \\ \text{BA\%} &= \frac{\text{nbre de cellules dans la zone BA}}{\text{nbre de cellules dans NE + LY + MO + EO + BA}} \times 100 \end{aligned}$$

10.3.10. Formule leucocytaire en Valeurs absolues

Les valeurs absolues de leucocytes dans chaque catégorie sont calculées à partir de la numération leucocytaire et des pourcentages de la formule.

$$\begin{aligned} \text{NE\# (10}^3 \text{ cellules/}\mu\text{l)} &= \frac{\text{NE\%}}{100} \times \text{numération leucocytaire} \\ \text{LY\# (10}^3 \text{ cellules/}\mu\text{l)} &= \frac{\text{LY\%}}{100} \times \text{numération leucocytaire} \\ \text{MO\# (10}^3 \text{ cellules/}\mu\text{l)} &= \frac{\text{MO\%}}{100} \times \text{numération leucocytaire} \\ \text{EO\# (10}^3 \text{ cellules/}\mu\text{l)} &= \frac{\text{EO\%}}{100} \times \text{numération leucocytaire} \\ \text{BA\# (10}^3 \text{ cellules/}\mu\text{l)} &= \frac{\text{BA\%}}{100} \times \text{numération leucocytaire} \end{aligned}$$

11. Réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital Ibn Roched d'Annaba, service d'anatomie pathologie suivant la technique classique de La coloration à l'Hématoxyline-Eosine (Houlot, 1984) :

11.1. Réalisation des prélèvements

- Les organes (foie et pancréas) de chaque rat sont retirés de la solution de Bouin alcoolique, puis coupés à l'aide de couteaux tranchant afin de réaliser des prélèvements, pour l'étude histologique, ayant une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 1,5 mm.
- Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

11.2. Déshydratation

- les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus, cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol

de concentration croissante (70%, 80%,90% ,100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spéciaux.

11.3. Réalisation des blocs

- Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur), les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, vient alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe, cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'états liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.
- La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 µm en moyenne) sont possibles grâce à des appareils spéciaux appelés « Microtomes ». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixés sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

11.4. Coloration

- La coloration est réalisée par la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine), qui nécessite la présence d'un alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70 % + 50 ml acide HCL), d'une eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et d'une solution d'Eosine (100 ml Eosine solution aqueuse à 3 %, 125 ml alcool éthylique à 95 %, 375 ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration se fait selon les étapes suivantes :
 - 1)- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
 - 2)- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
 - 3)- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.

- 4)- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- 5)- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
- 6)- Enfin déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt.

Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

12. Explorations statistique des résultats physiologiques et biochimiques

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne \pm écart type à la moyenne (Moy \pm Er-T moy). La valeur de $p \leq 0,05$ est considéré comme significative. En utilisant l'ANOVA modèle linéaire généralisé (comparaisons avec un contrôle) suivie d'un test de Dunnett, nous avons comparé les résultats des lots diabétiques (traités et non traité) par rapport au lot témoin sain, puis nous avons comparé les résultats des lots diabétiques traités par rapport au lot diabétique témoin (non traité), ces explorations statistiques ont été réalisés grâce au logiciel de MINITAB (Min, Ver. 13.4).

I. Résultats et interprétations

Résultats de la 1^{ière} étude expérimentale:

**« Evaluation de l'activité antidiabétique de quatre molécules nouvellement synthétisées
chez les souris Swiss rendus diabétiques par la streptozotocine»**

1. Effets du traitement sur l'évolution de la glycémie

Le suivi glycémique périodique des souris Swiss diabétiques durant les quatorze jours de traitement à une dose de $10 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c./jour}$ par les molécules nouvellement synthétisées ; [N, N'- Bis (benzyl) sulfamide]; [N, N'- Bis (propyl) sulfamide]; [Ethyl (S)-2-(1-cyclohexyl sulfamide carbamoyloxy) propanoate] et [Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate], nous a amené à obtenir les résultats illustrés sur la **Figure 24** et **Tableau 6**.

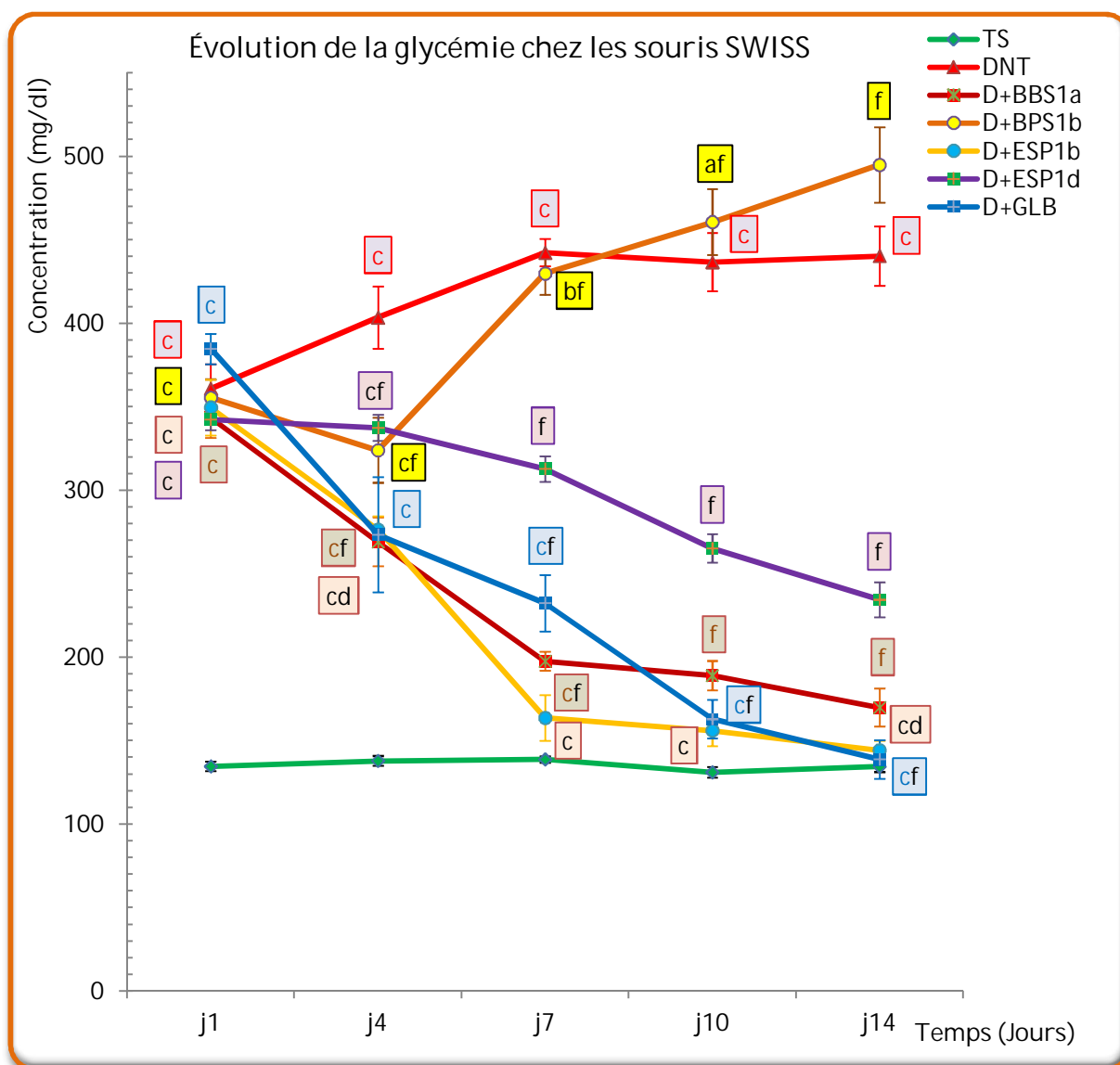


Figure. 24 : Évolution de la de la glycémie à jeun (mg/dl) chez les souris Swiss diabétiques durant les 14 jours de la période de traitement par les quatre molécules nouvellement synthétisées, BBS1a, BPS1b, ESP1b et ESP1d.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$, ^f $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

2. Variation de la glycémie après 14 jours de la période de traitement

Tableau. 6 : Variation de la glycémie à jeun (mg/dl) chez les souris Swiss diabétiques après 14 jours de traitement par les quatre molécules nouvellement synthétisées, BBS1a, BPS1b, ESP1b et ESP1d.

Lots expérimentaux	Glycémie à jeun (mg/dl)		% Variation de la glycémie entre j1 et j14
	Initiale	Finale	
TS	134,50 ± 2,95	134,33 ± 3,19	(-) 0,12
DNT	360,70 ± 14,6 ^c	440,20 ± 17,8 ^c	(+) 22,04
D+BBS1a 10 mg	343,20 ± 12,1 ^c	169,80 ± 11,4 ^f	(-) 50,52
D+BPS1b 10 mg	355,30 ± 11,0 ^c	494,70 ± 22,6 ^{c,d}	(+) 39,23
D+ESP1b 10 mg	349,50 ± 16,7 ^c	144,17 ± 5,63 ^f	(-) 58,74
D+ESP1d 10 mg	342,33 ± 6,31 ^c	234,30 ± 10,4 ^{c,f}	(-) 31,55
D+GLB	384,50 ± 9,09 ^c	138,70 ± 11,5 ^f	(-) 63,92

TS, lot Témoin Sain ; DNT, lot Diabétique non traité; D+BBS1a 10 mg, lot Diabétique traité par *N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour; D+BPS1b 10 mg, lot Diabétique traité par *N, N'*- Bis (propyl) sulfamide à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour; D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour; D+ESP1d 10 mg, lot Diabétique traité par Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d*P* < 0.05, ^e*P* < 0.01, ^f*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett..

Les résultats obtenus (**Fig. 24 ; Tab. 6**) révèlent que les moyennes des glycémies initiales des lots diabétiques traités et non traité sont 3 à 4 fois plus élevés que celle du lot témoin sain.

Une baisse dans les valeurs du glucose sanguin a été observée à partir du 4^{ème} jour de traitement des souris Swiss diabétiques par les quatre molécules nouvellement synthétisées, BBS1a, BPS1b, ESP1b et ESP1d à une dose de 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour. Après ce point (quatrième jour) nous avons observé des diminutions très remarquables de la glycémie, qui se poursuivent jusqu'à la fin de la période de traitement (j14), par les molécules BBS1a, ESP1b et ESP1d atteignant, respectivement, les valeurs minimales de 169,80 ± 11,4 mg/dl, 144,17

mg/dl et $234,30 \pm 10,4$ mg/dl (**Tab. 6**). En revanche, nous avons noté une augmentation inattendue de la glycémie de 39,23 % chez les souris diabétiques traités par la molécule BPS1b atteignant, une valeur maximale de $494,70 \pm 22,6$ mg/dl à la fin de l'expérimentation (j14). Le médicament de référence, le glibenclamide, a engendré une baisse de la glycémie de -63,92%. La glycémie des rats diabétiques non traités a évolué de $360,70 \pm 14,6$ mg/dl (j1) à $440,20 \pm 17,8$ mg/dl (j14). Pour ce qui concerne les souris saines aucun changement de la glycémie n'a été observé. Celle ci reste dans les limites normales (entre $134,50 \pm 2,95$ mg/dl et $134,33 \pm 3,19$ mg/dl).

Le traitement par la molécule ESP1b a entraîné la diminution la plus remarquable de la glycémie (-58,74%) parmi les quatre molécules nouvellement synthétisées. C'est pour cette raison que nous avons voulu confirmer cette activité antidiabétique chez un deuxième modèle animal, le rat Wistar, durant une période plus longue, 28 jours.

Résultats de la 2^{ème} étude expérimentale:

« Evaluation de l'activité antidiabétique de l'Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine »

1. Effet du traitement sur le poids corporel et le poids relatif des organes

Les résultats obtenus concernant l'effet du traitement par l'Ethyl (S)-2-(1-cyclohexyl sulfamide carbamoyloxy) propanoate sur l'évolution du poids corporel et du poids relatif des organes sont mentionnés sur le **Tableau.7**.

Tableau. 7 : Effet de l'ESP1b sur le poids corporel et le poids relatif des organes chez les rats Wistar diabétiques

	Lots expérimentaux						
	TS	S+ESP1b 20 mg	DNT	D+ESP1b 5 mg	D+ESP1b 10 mg	D+ESP1b 20 mg	D+GLB
Poids corporel initial (g)	202,53 ± 4,31	198,08 ± 3,03	199,50 ± 2,74	196,47 ± 2,14	193,85 ± 3,98	195,23 ± 2,92	198,43 ± 3,35
Poids corporel final (g)	226,05 ± 3,20 ^h	232,48 ± 2,15 ⁱ	161,87 ± 1,55 ^{cl}	176,93 ± 3,74 ^{ca,h}	177,22 ± 3,56 ^{ca,g}	184,52 ± 2,45 ^{ca,g}	179,17 ± 1,73 ^{ca,i}
variation du poids corporel entre j1 et j28 (%)	11,61	17,36	-18,86	-9,94	-8,57	-5,48	-9,70
Poids relatif du pancréas (g/100g)	0,41 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,02
Poids relatif du foie (g/100g)	4,13 ± 0,06	3,98 ± 0,04	4,70 ± 0,17 ^b	4,52 ± 0,07 ^a	4,19 ± 0,12 ^e	4,06 ± 0,09 ^f	4,11 ± 0,05 ^f
Poids relatif des reins (g/100g)	0,67 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,81 ± 0,02 ^b	0,77 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,75 ± 0,03	0,73 ± 0,01
Poids relatif du cœur (g/100g)	0,46 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,45 ± 0,03
Poids relatif des testicules (g/100g)	0,69 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,66 ± 0,02	0,66 ± 0,01	0,67 ± 0,02	0,68 ± 0,01	0,69 ± 0,02
Poids relatif de la rate (g/100g)	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,38 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,01

TS, lot Témoin Sain ; S+ESP1b 20 mg: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); DNT, lot Diabétique non traité; D+ESP1b 5 mg, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 20 mg, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de gibenclamide. Les valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6), ^aP < 0,05, ^bP < 0,01, ^cP < 0,001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^dP < 0,05, ^eP < 0,01, ^fP < 0,001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ^gP < 0,05, ^hP < 0,01, ⁱP < 0,001 Comparaisons avec poids corporel initial. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

1.1. Poids corporel

Le suivi pondéral des rats Wistar diabétiques durant les vingt-huit jours de traitement par l'Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate à 5, 10 et 20 mg.kg⁻¹ p.c/jour, nous a amené à obtenir les résultats illustrés sur les **Figures 25** et **26**.

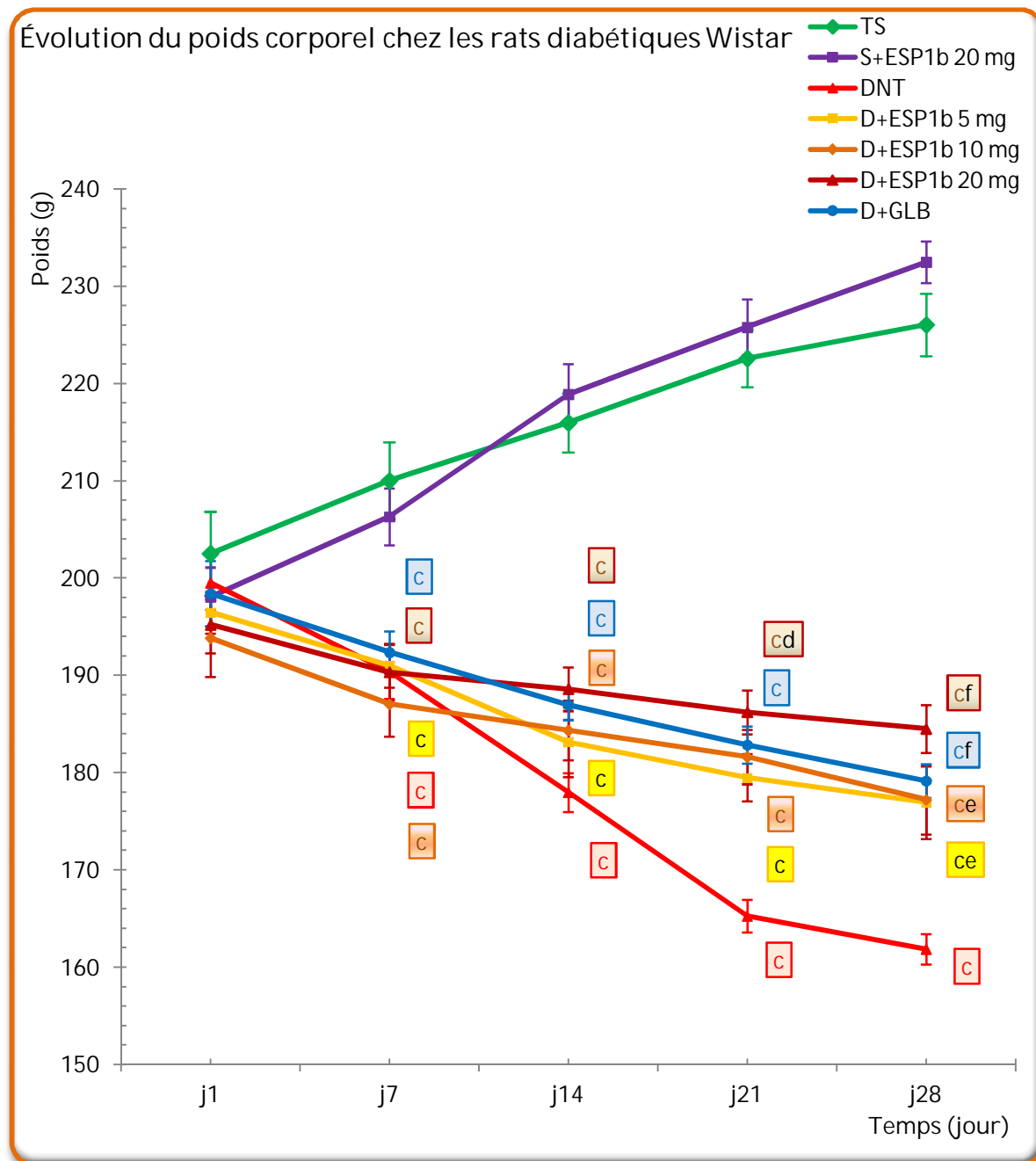


Figure. 25 : Évolution du poids corporel chez les rats Wistar diabétiques durant les 28 jours de la période de traitement par la molécule ESP1b.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$, ^f $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

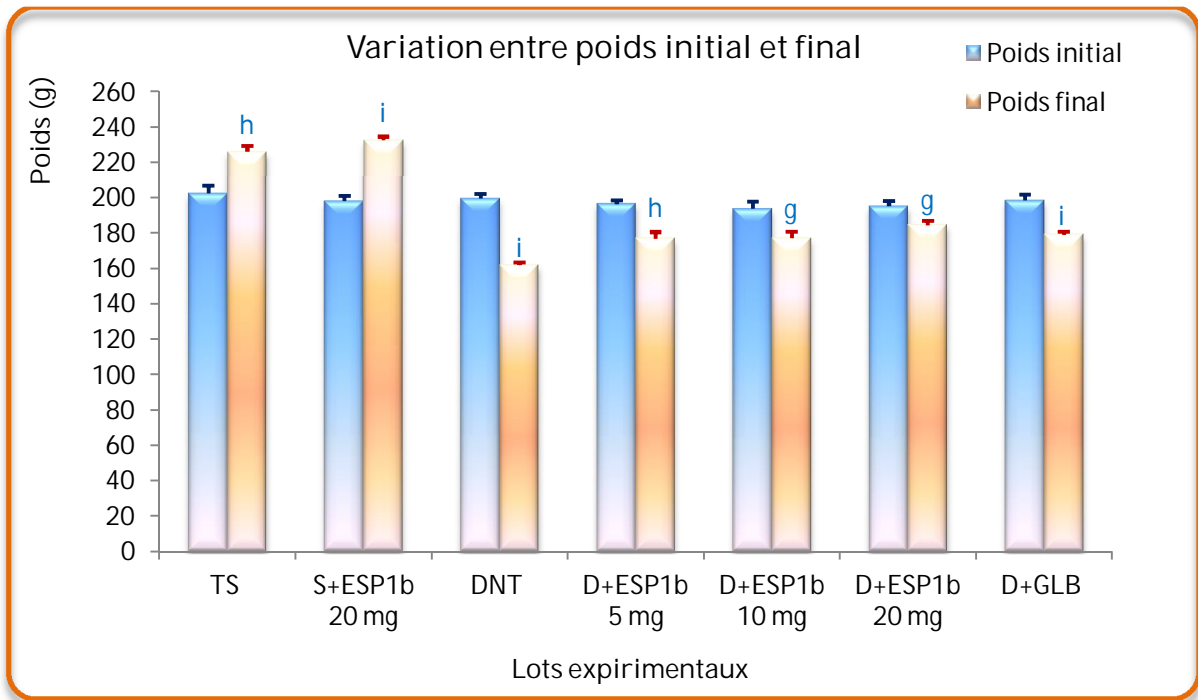


Figure. 26 : Variation entre poids initial et final de rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

^s $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$, ⁱ $P < 0.001$ Comparaisons avec poids corporel initial. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

Nos résultats (**Fig.25**) montrent une légère prise de poids chez les rats normaux traités par la molécule ESP1b à une dose de 20 mg.kg⁻¹ p.c/jour en comparaison avec le lot témoin sain. En revanche, les animaux diabétiques traités et non traités ont révélé une perte de poids évolutive durant toute la période expérimentale.

Les lots diabétiques traités par le glibenclamide et la molécule ESP1b ont montrés un signe de récupération du poids corporel par rapport aux rats témoins diabétiques (**Fig.25**). Toutefois, nous constatons qu'il existe toujours une différence significative entre le poids initial et final de rats diabétiques traités (**Fig.26**).

1.2. Poids relatif des organes

Les **Figures (27-32)** illustrent la variation du poids de différents organes (pancréas, foie, rein, cœur, testicule et rate) rapportés à 100 g de poids corporel chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b à 5, 10 et 20 mg.kg⁻¹ p.c./jour.

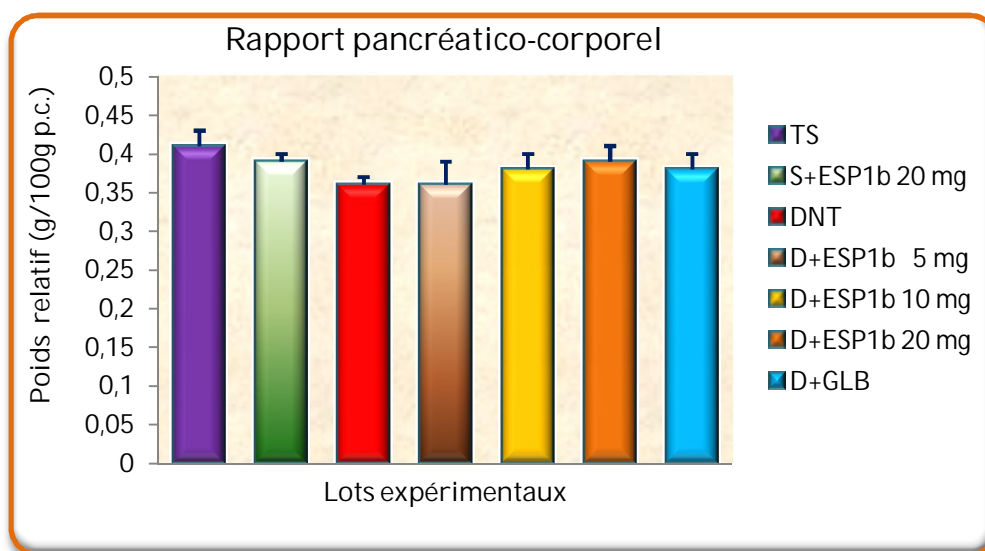


Figure. 27 : Variation du poids relatif du pancréas (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

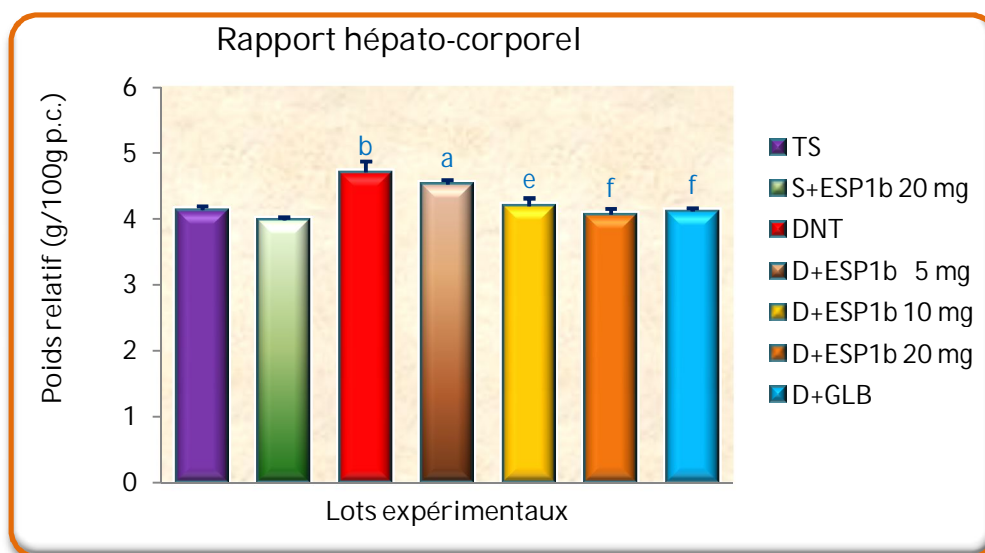


Figure. 28 : Variation du poids relatif du foie (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

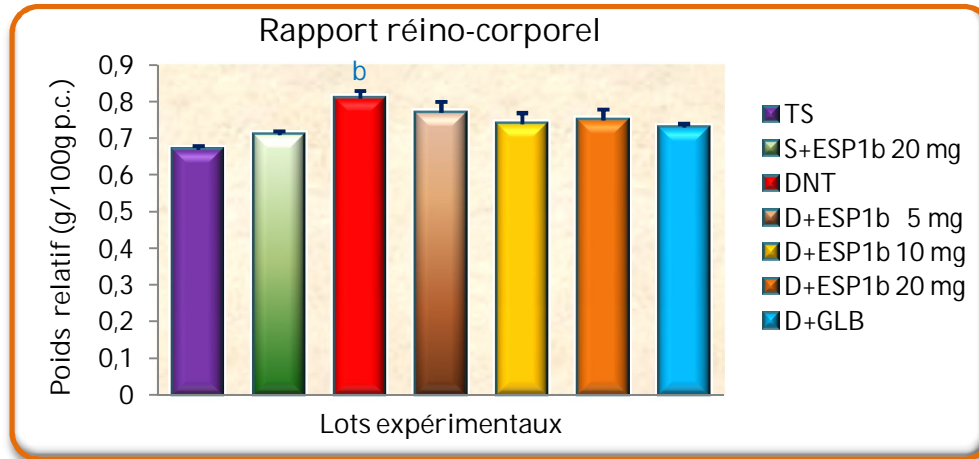


Figure. 29 : Variation du poids relatif des reins (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

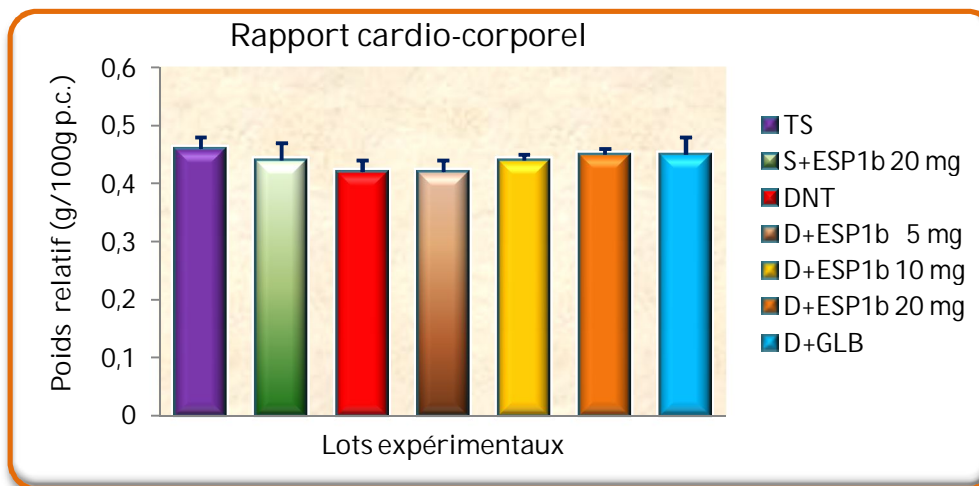


Figure. 30 : Variation du poids relatif du cœur (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

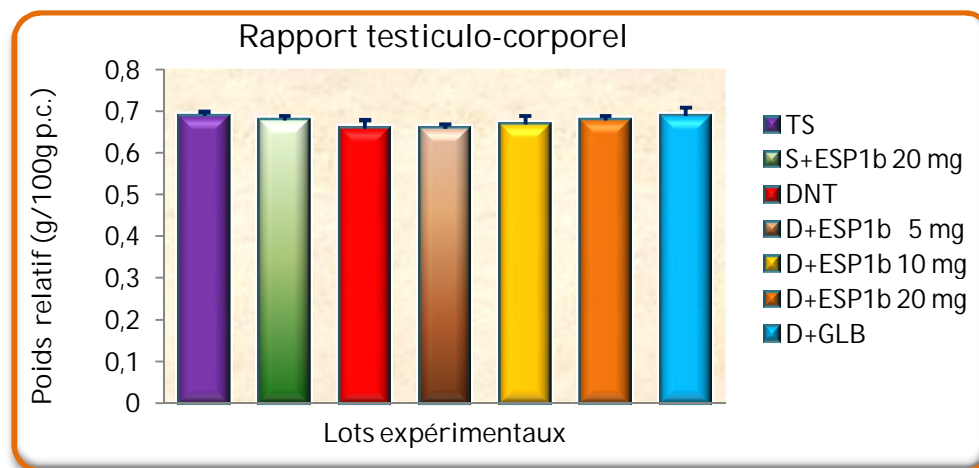


Figure. 31: Variation du poids relatif des testicules (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

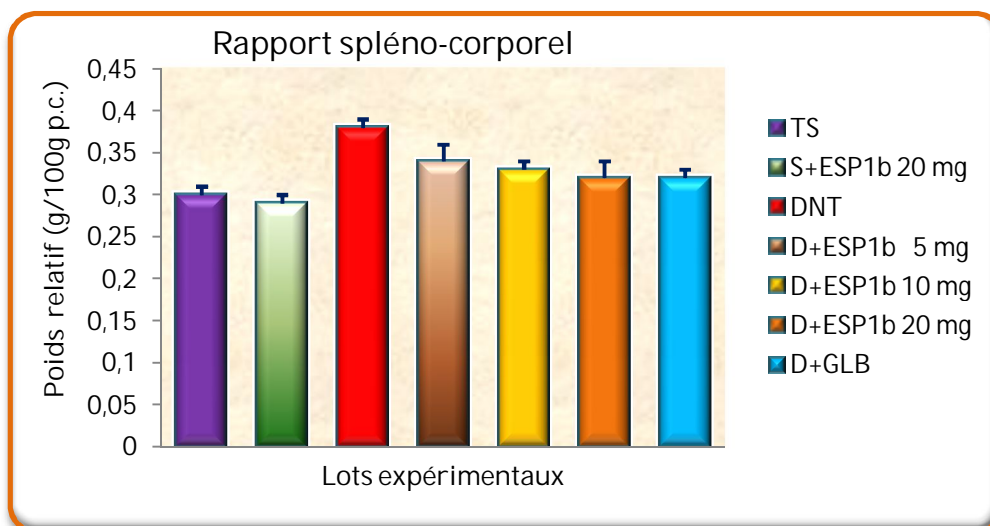


Figure. 32: Variation du poids relatif de la rate (g/100g p.c.) chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

Malgré que nous observons une diminution modéré du poids relatif de pancréas chez les rats diabétiques non traités (**Fig. 27**), l'analyse statistique des résultats obtenus ne révèle aucune différence significative des rapports pancréatico-corporels entre les sept lots expérimentaux.

Des augmentations significatives ($p \leq 0.01$) du poids relatif du foie et du rein (**Fig. 28 et 29**) ont été observées chez les animaux diabétiques non traités en comparant au lot témoin sain.

L'étude des rapports cardio- et testiculo-corporel (**Fig.30 et 31**) ne montre aucune différence significative entre les groupes d'animaux traités et non traités.

Une augmentation modérée du rapport spléno-corporel (**Fig.32**) a été notée chez les rats diabétiques non traités en comparaison aux rats témoins normaux.

2. Effet du traitement sur les paramètres biochimiques

2.1. Glycémie, insuline plasmatique, hémoglobine glyquée et glycogène hépatique

Les résultats obtenus concernant l'effet de 28 jours de traitement par l'Ethyl (S)-2-(1-cyclohexyl sulfamide carbamoyloxy) propanoate sur la variation de la glycémie à jeun, l'insuline plasmatique, l'hémoglobine glyquée et le glycogène hépatique chez les rats Wistar diabétiques sont mentionnés sur le **Tableau.8**.

Tableau. 8 : Effet de l'ESP1b sur la variation de la glycémie à jeun, l'insuline plasmatique ($\mu\text{U/ml}$), l'hémoglobine glyquée (% Hb) et le glycogène hépatique (mg/g du tissu) chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	Jour 1	Jour 28	Variation de la glycémie entre j1 et j28 (%)	Insuline ($\mu\text{U/ml}$)	HbA1C (% Hb)	Glycogène hépatique (mg/g du tissu)
TS	89,33 \pm 1,73	88,17 \pm 1,49	(-) 1,29	14,75 \pm 0,10	5,58 \pm 0,06	63,95 \pm 1,38
S+ESP1b 20 mg	81,67 \pm 2,43	73,83 \pm 1,19	(-) 9,60	16,42 \pm 0,07 ^c	4,53 \pm 0,09 ^c	65,81 \pm 1,70
DNT	332,17 \pm 8,81 ^c	439,70 \pm 17,0 ^c	(+) 32,37	08,22 \pm 0,20 ^c	9,31 \pm 0,22 ^c	26,05 \pm 1,77 ^c
D+ESP1b 5 mg	329,33 \pm 7,26 ^c	174,50 \pm 5,29 ^{c,f}	(-) 47,01	09,17 \pm 0,27 ^{ce}	8,40 \pm 0,18 ^{ce}	29,53 \pm 1,92 ^c
D+ESP1b 10 mg	340,83 \pm 5,52 ^c	156,17 \pm 6,69 ^{c,f}	(-) 54,17	11,18 \pm 0,19 ^{cf}	7,95 \pm 0,25 ^{cf}	37,45 \pm 2,19 ^{cf}
D+ESP1b 20 mg	338,00 \pm 7,77 ^c	130,67 \pm 2,96 ^{b,t}	(-) 61,34	12,69 \pm 0,13 ^{cf}	6,38 \pm 0,14 ^{bt}	42,69 \pm 2,56 ^{cf}
D+GLB	336,50 \pm 4,06 ^c	119,33 \pm 3,21 ^{a,t}	(-) 64,53	13,48 \pm 0,15 ^{cf}	5,46 \pm 0,08 ^t	51,48 \pm 1,72 ^{cf}

HbA1C, Hémoglobine glyquée; **Hb**, Hémoglobine totale; **TS**, lot Témoin Sain; **S+ESP1b 20 mg**: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **DNT**, lot Diabétique non traité; **D+ESP1b 5 mg**, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 10 mg**, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 20 mg**, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+GLB**: lot Diabétique Traité par 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c. de gibenclamide. Les valeurs sont Moy \pm Er-T Moy (n = 6). ^aP < 0,05, ^bP < 0,01, ^cP < 0,001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^dP < 0,05, ^eP < 0,01, ^fP < 0,001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

2.1.1. Evolution de la glycémie durant les 28 jours de traitement

Le suivi glycémique régulier des rats Wistar diabétiques pendant les vingt-huit jours de traitement par la molécule Ethyl (S)-2-(1-cyclohexyl sulfamide carbamoyloxy) propanoate, nous a amené à obtenir les résultats illustrés sur la **Figure 33**.

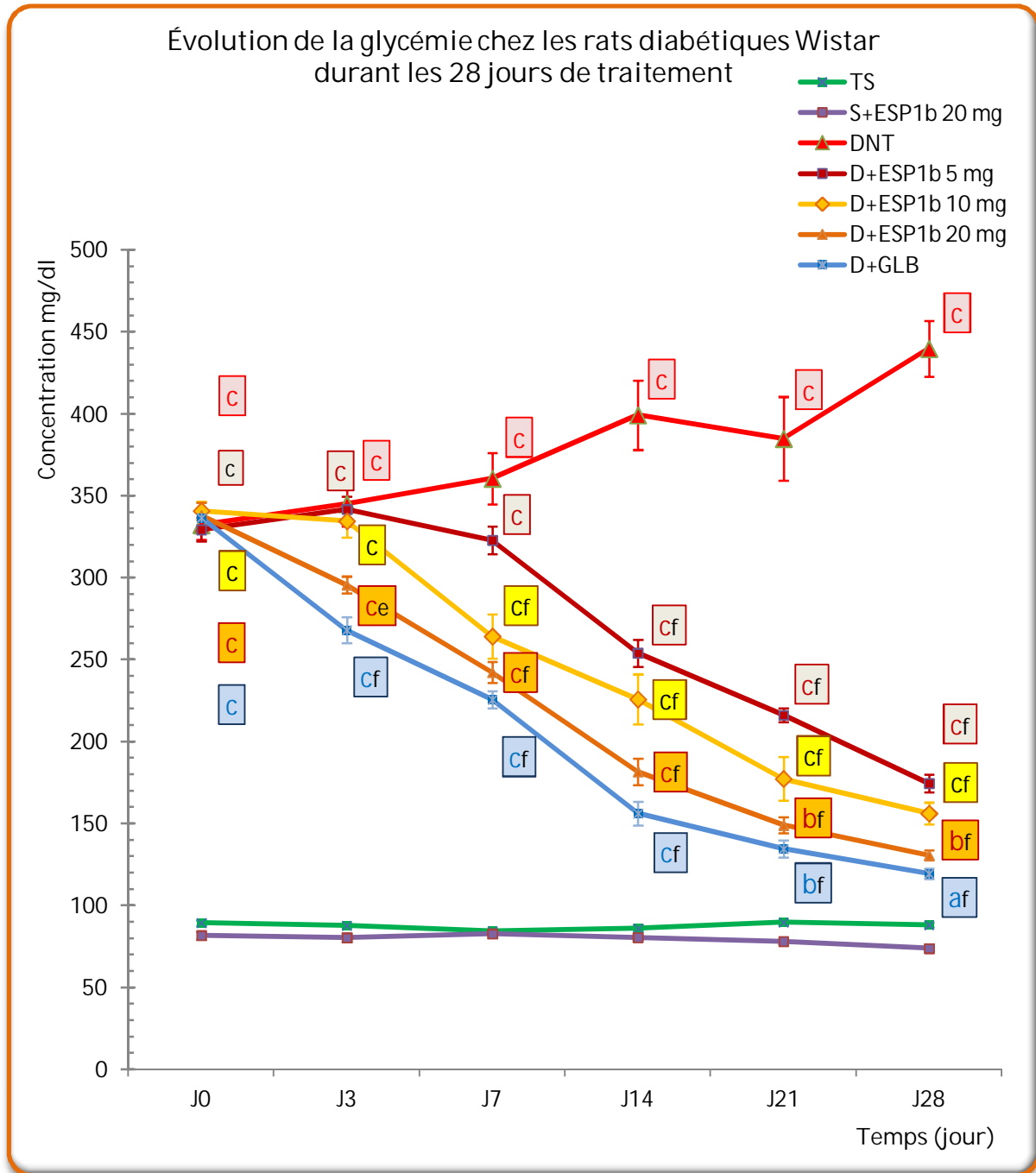


Figure. 33 : Évolution de la glycémie (mg/dl) chez les rats diabétiques durant les 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$, ^f $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

Les résultats obtenus (**Fig. 33 ; Tab. 8 et 17**) révèlent que les moyennes normales de la glycémie pour cette souche se situent entre $84,50 \pm 1,52$ mg/dl et $89,67 \pm 1,28$ mg/dl. Le diabète expérimental a augmenté ce niveau glycémique à des valeurs supérieures à 300 mg/dl, sept jours après l'injection de la streptozotocine. Cette état hyperglycémique a persisté chez rats diabétiques non traités jusqu'à la fin de la période de suivi, atteignant une valeur maximale de $439,70 \pm 17,0$ mg/dl.

L'administration orale d'une dose journalière de 20 mg.kg^{-1} p.c/jour de la molécule ESP1b aux rats diabétiques a entraîné une diminution significative ($P < 0.01$) de la glycémie, dès le troisième jour du suivi glycémique, cependant, les rats des deux lots diabétiques traités quotidiennement par 10 et 5 mg.kg^{-1} p.c de la molécule ESP1b n'ont pas révélés des baisses significatives de la glycémie qu'après, respectivement, 7 et 14 jours de traitement. Ces diminutions ont se poursuivi jusqu'à la fin de la période de traitement (j28), atteignant les valeurs minimales de $174,50 \pm 5,29$ mg/dl, $156,17 \pm 6,69$ mg/dl et $130,67 \pm 2,96$ mg/dl chez les animaux diabétiques traités, respectivement, par $5,10$ et 20 mg.kg^{-1} p.c/jour (**Tab.8**). Les rats expérimentaux traités par $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c/jour ont montré une glycémie finale de $119,33 \pm 3,21$ mg/dl.

2.1.2. Insuline plasmatique, hémoglobine glyquée et glycogène hépatique

Les **Figures (34-36)** illustrent la variation de la concentration plasmatique de l'insuline, le pourcentage de l'hémoglobine glyquée et le taux de glycogène hépatique chez les rats Wistar diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b à $5, 10$ et 20 mg.kg^{-1} p.c/jour.

Le diabète expérimental a produit une baisse significative ($P < 0,001$) de la concentration plasmatique de l'insuline et du taux de glycogène hépatique, respectivement, de l'ordre de $44,27\%$ et $59,26\%$, tandis qu'il a augmenté l'hémoglobine glyquée de l'ordre de $66,84\%$ en comparaison aux rats normaux sains.

Le traitement oral des rats diabétiques par 20 mg.kg⁻¹ p.c/jour de la molécule ESP1b a amélioré très remarquablement ($P < 0,001$) ces altérations métaboliques en engendrant une baisse de l'hémoglobine glyquée de l'ordre de 31,47% et des augmentations de la concentration plasmatique de l'insuline et du taux de glycogène hépatique, respectivement, de l'ordre de 54,37% et 62.14%, en comparant aux résultats des rats diabétiques non traités.

Une diminution significative ($P < 0,001$) de l'hémoglobine glyquée de l'ordre de 31,47% et une élévation significative ($P < 0,05$) de la concentration plasmatique de l'insuline de l'ordre de 11.32% ont été observées chez les rats normaux traités par la molécule ESP1b à 20 mg.kg⁻¹ p.c/jour (**Fig. 34 et 35**) en comparaison au lot témoin sain.

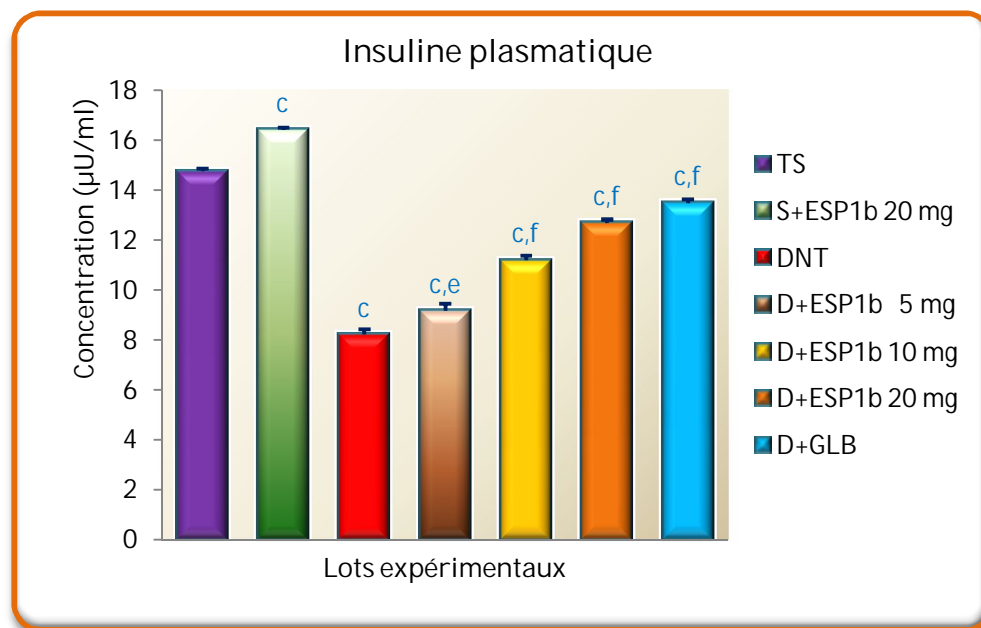


Figure. 34: Variation de la concentration plasmatique de l'insuline ($\mu\text{U/ml}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

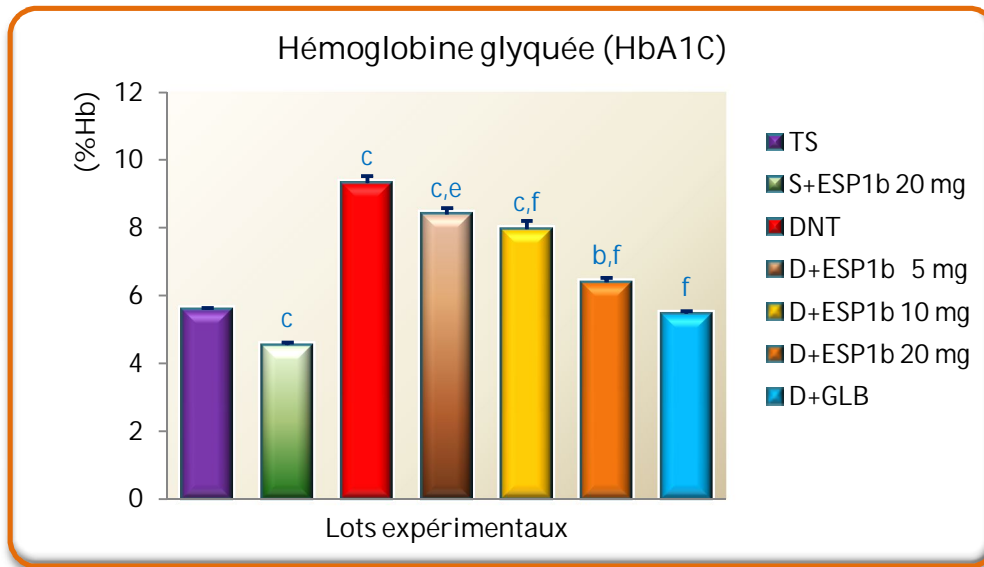


Figure. 35: Variation du taux de l'hémoglobine glyquée (% Hb) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

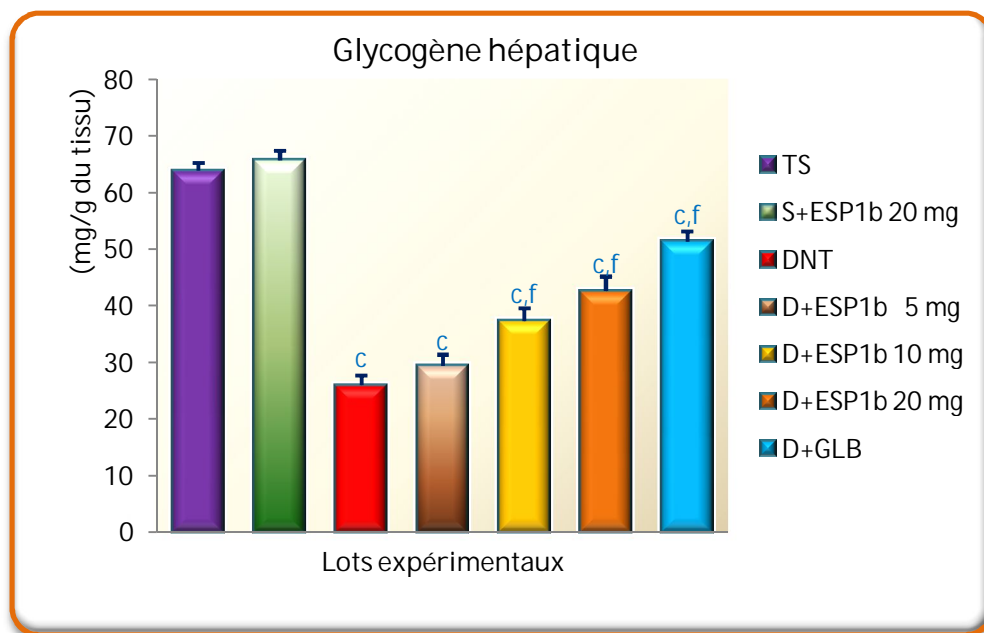


Figure. 36: Variation de la teneur hépatique en glycogène (mg/g du tissu) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

2.2. Évolution de la glycémie durant le test de tolérance au glucose oral (OGTT)

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose oral chez les animaux diabétiques traités par les différentes doses de la molécule ESP1b sont rassemblés dans le **tableau 18** (annexe) et illustrés dans la **Figure 37**.

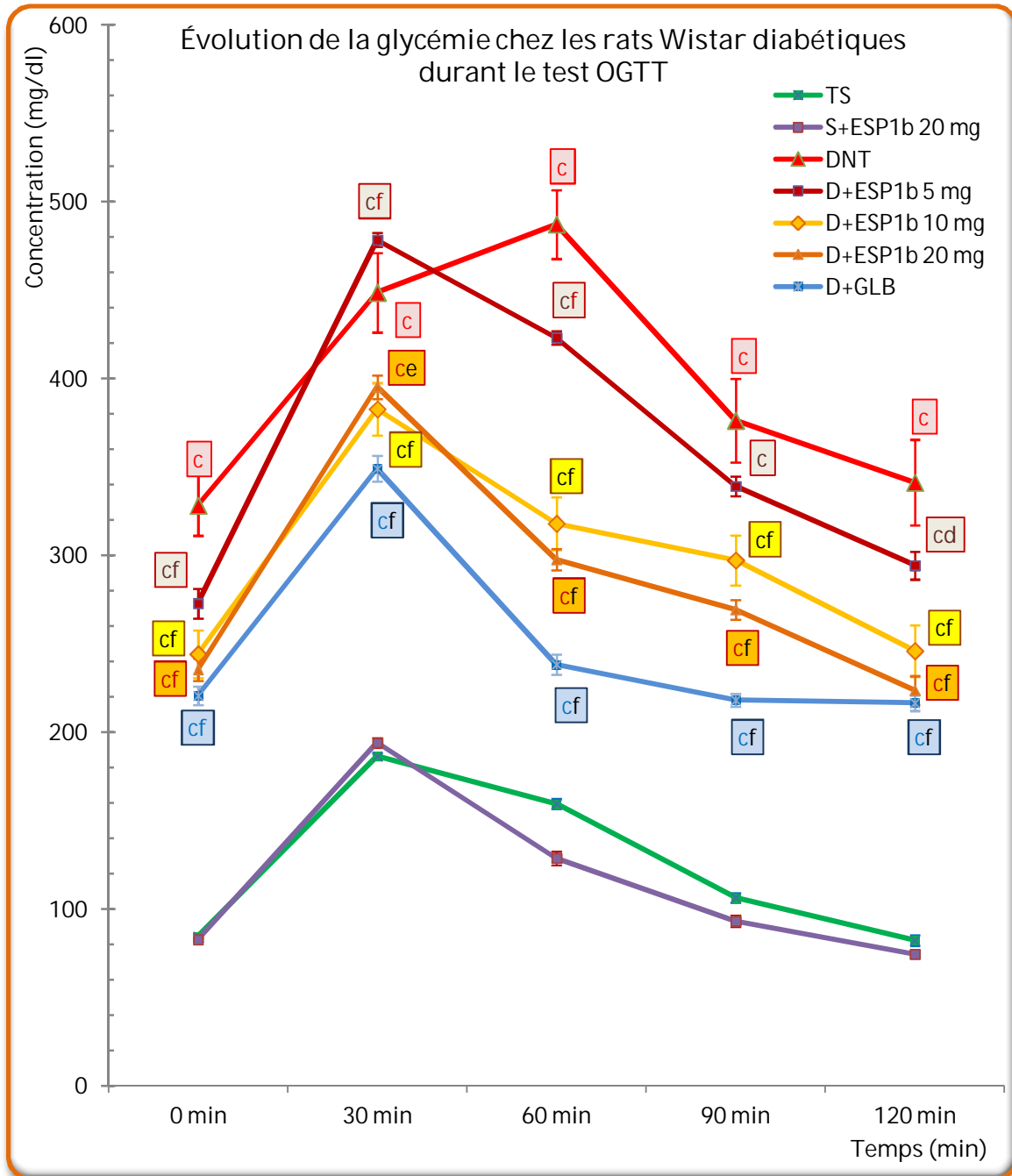


Figure. 37 : Évolution de la glycémie chez les rats diabétiques traités par la molécule ESP1b durant le test OGTT.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$, ^f $P < 0.001$ Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

Une nette différence des valeurs basales de la glycémie à jeun a été notée entre les groupes d'animaux normaux et diabétiques (**Fig. 37**). Après la charge en glucose de 2 mg.kg^{-1} p.c., la glycémie des rats normaux témoins et traités avec la molécule ESP1b à 20 mg.kg^{-1} p.c./jour a montrée un pic maximal à 30 min, puis a diminuée pour retrouver un niveau proche du basal à 120 min. Le taux de baisse de la glycémie a été plus rapide chez les animaux normaux traités avec la molécule ESP1b que les animaux du lot témoin sain. Chez les animaux diabétiques non traités, la glycémie augmente significativement à partir de 30 min, atteint sa valeur maximale à 60 min, elle diminue au-delà mais reste plus élevée qu'à jeun, même après 120 min. Un pic maximal a également été observé à 30 min chez les rats diabétiques traités avec les différentes doses de la molécule ESP1b, puis une baisse d'une manière dépendante de la dose a été observée à 60 et 90 min. A la fin du test de tolérance au glucose orale, la molécule ESP1b à une dose de 20 mg.kg^{-1} p.c./jour était aussi efficace que le GLB ($600 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c./jour) pour réduire les taux de glucose sanguin.

2.3. Profil lipidique et rapports athérogéniques

Nos résultats (**Tab.9 et Fig.38-44**) ont révélé que le traitement des rats normaux avec la molécule ESP1b à 20 mg.kg^{-1} p.c./jour n'a pas entraîné de changements significatifs dans les concentrations de lipides plasmatiques et les rapports athérogéniques en comparaison aux rats témoins normaux. Les animaux diabétiques non traités ont montré des augmentations significatives ($P < 0,001$) des taux de TG, cholestérol total, LDL et VLDL associées à un taux bas de cholestérol HDL, en outre, une élévation significative ($P < 0,001$) dans les rapports athérogéniques a été noté dans ce groupe, en comparaison au lot témoin sain. Le traitement oral des animaux diabétiques avec la molécule ESP1b a renversé les taux de TG, cholestérol HDL et VLDL à des valeurs proches de la normale et significativement ($P < 0,001$) réduit la concentration de cholestérol total et LDL par rapport aux valeurs des rats témoins diabétiques.

Le traitement avec la molécule ESP1b a également significativement ($P < 0,001$) diminué les rapports athérogéniques chez les rats diabétiques.

Tableau. 9 : Effet de l'ESP1b sur le profil lipidique et les rapports athérogéniques chez les rats diabétiques.

Lots expérimentaux	TG (mg/dl)	CT (mg/dl)	C-HDL (mg/dl)	C-LDL (mg/dl)	C-VLDL (mg/dl)	CT/C-HDL	C-LDL/C-HDL
TS	87,89 ± 1,90	95,41 ± 0,86	27,84 ± 0,63	49,99 ± 0,25	17,57 ± 0,38	3,43 ± 0,05	1,80 ± 0,04
S+ESP1b 20 mg	81,20 ± 1,68	99,46 ± 1,07	29,56 ± 0,81	53,65 ± 0,52	16,24 ± 0,33	3,37 ± 0,06	1,82 ± 0,05
DNT	144,21 ± 1,90 ^c	138,70 ± 1,48 ^c	14,70 ± 0,87 ^c	95,15 ± 1,94 ^c	28,84 ± 0,37 ^c	9,62 ± 0,65 ^c	6,62 ± 0,5 ^c
D+ESP1b 5 mg	116,70 ± 1,89 ^{cf}	130,57 ± 1,60 ^{ce}	22,26 ± 0,75 ^{cf}	84,95 ± 0,59 ^{cf}	23,34 ± 0,37 ^{cf}	5,88 ± 0,13 ^{cf}	3,83 ± 0,11 ^{cf}
D+ESP1b 10 mg	98,61 ± 1,72 ^{bf}	123,15 ± 1,75 ^{cf}	24,47 ± 0,54 ^{bf}	78,95 ± 1,49 ^{cf}	19,72 ± 0,34 ^{bf}	5,04 ± 0,12 ^{cf}	3,23 ± 0,10 ^{cf}
D+ESP1b 20 mg	91,45 ± 2,31 ^f	116,09 ± 1,38 ^{cf}	25,71 ± 0,46 ^f	72,08 ± 0,63 ^{cf}	18,28 ± 0,46 ^f	4,51 ± 0,04 ^{af}	2,80 ± 0,04 ^{bf}
D+GLB	92,09 ± 2,28 ^f	100,90 ± 1,29 ^{af}	22,64 ± 0,65 ^{cf}	59,83 ± 0,63 ^{cf}	18,41 ± 0,45 ^f	4,46 ± 0,09 ^{af}	2,65 ± 0,08 ^{bf}

TG, Triglycérides; CT, Cholestérol total; C-HDL, Cholestérol des Lipoprotéines de haute densité; C-LDL, Cholestérol des Lipoprotéines de faible densité; C-VLDL, Cholestérol des Lipoprotéines de très faible densité; TS, lot Témoin Sain ; S+ESP1b 20 mg: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); DNT, lot Diabétique non traité; D+ESP1b 5 mg, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 20 mg, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$ Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d $P < 0,05$, ^e $P < 0,01$, ^f $P < 0,001$ Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

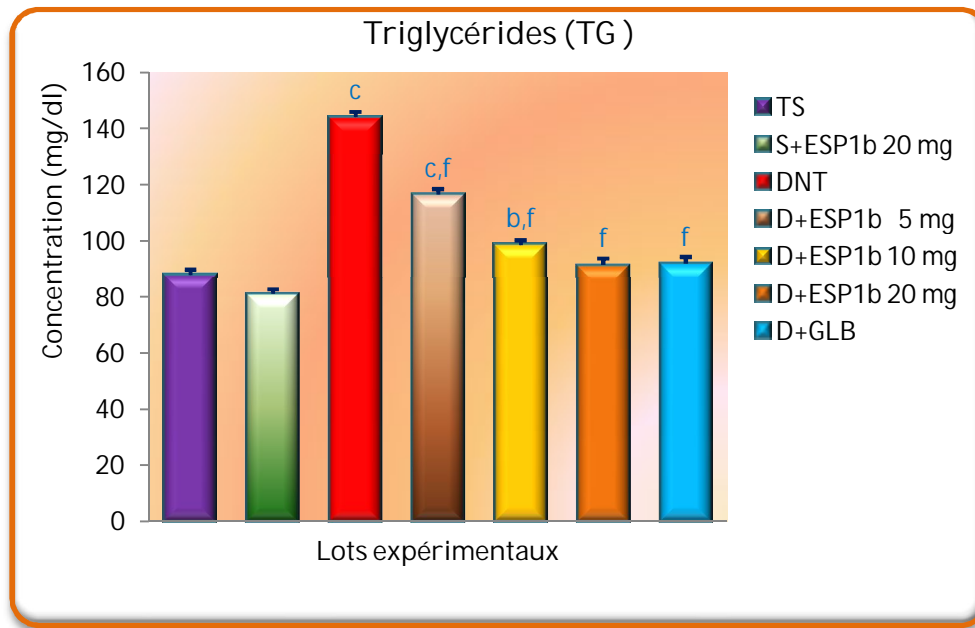


Figure. 38: Variation de la concentration plasmatique de triglycérides (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

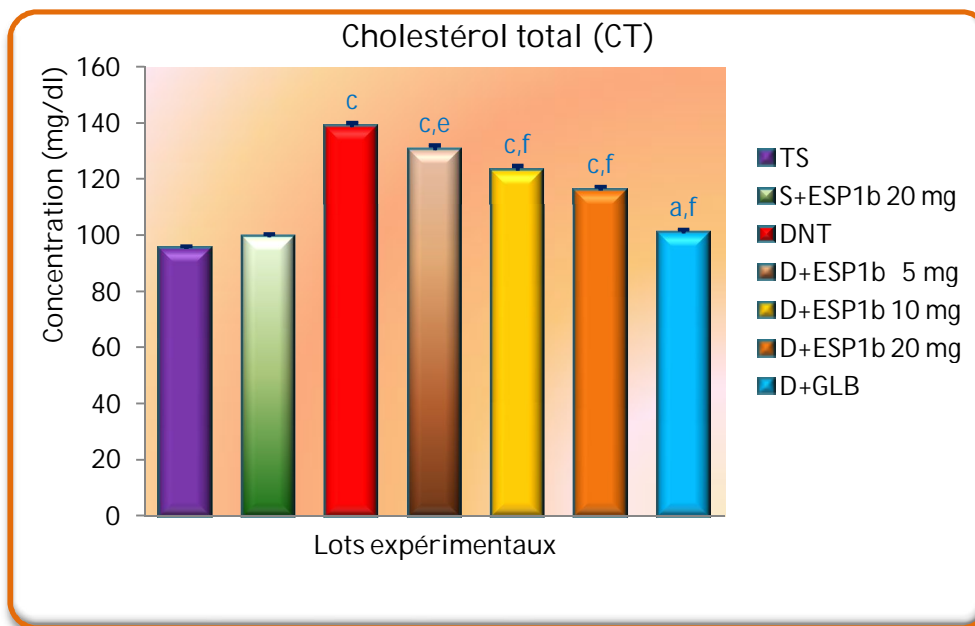


Figure. 39: Variation de la concentration plasmatique de cholestérol total (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

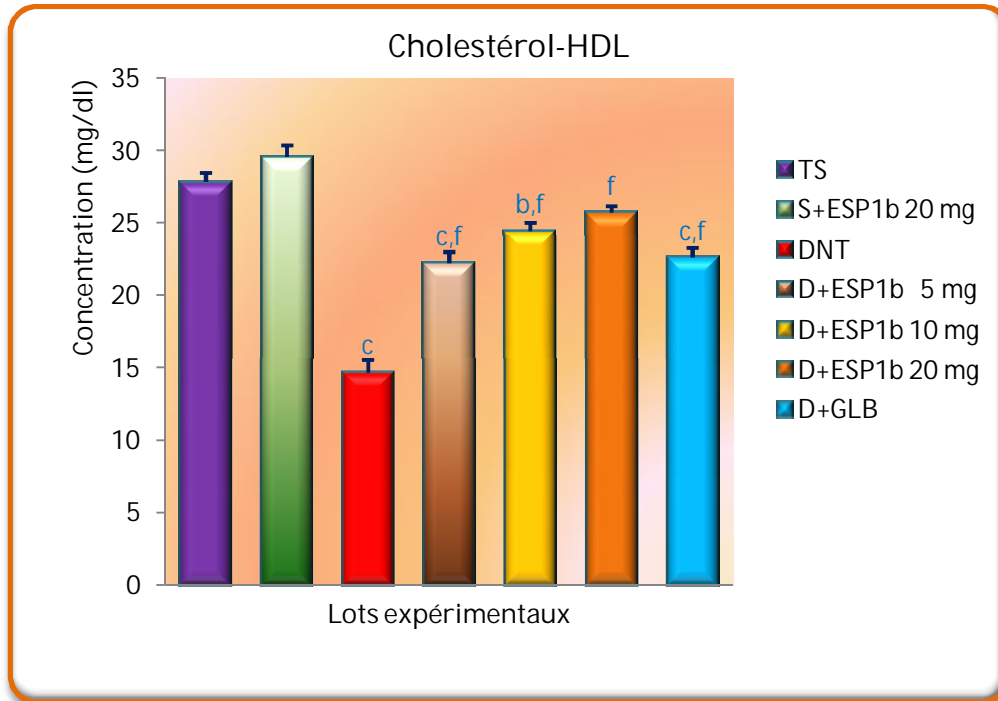


Figure. 40: Variation de la concentration plasmatique de cholestérol-HDL (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

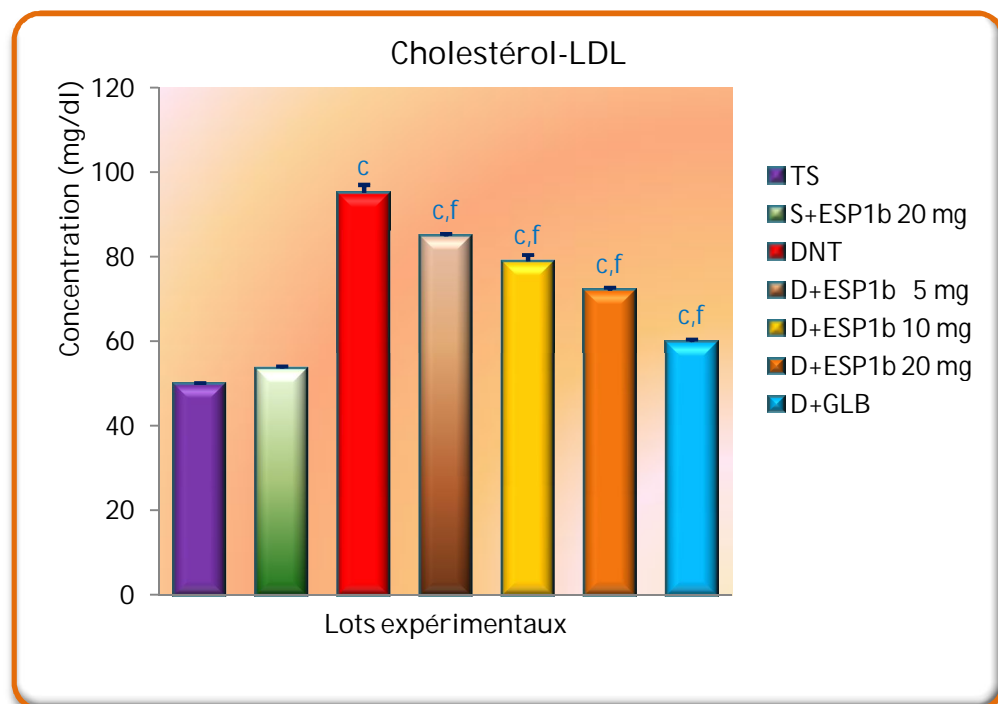


Figure. 41: Variation de la concentration plasmatique de cholestérol-LDL (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

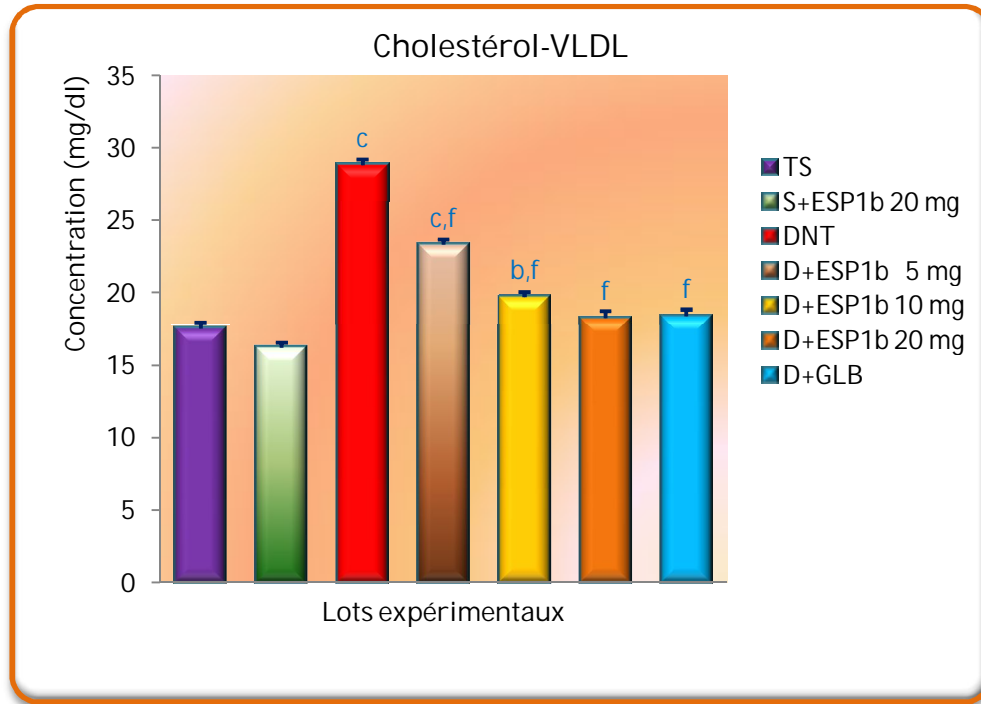


Figure. 42: Variation de la concentration plasmatique de cholestérol-VLDL (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

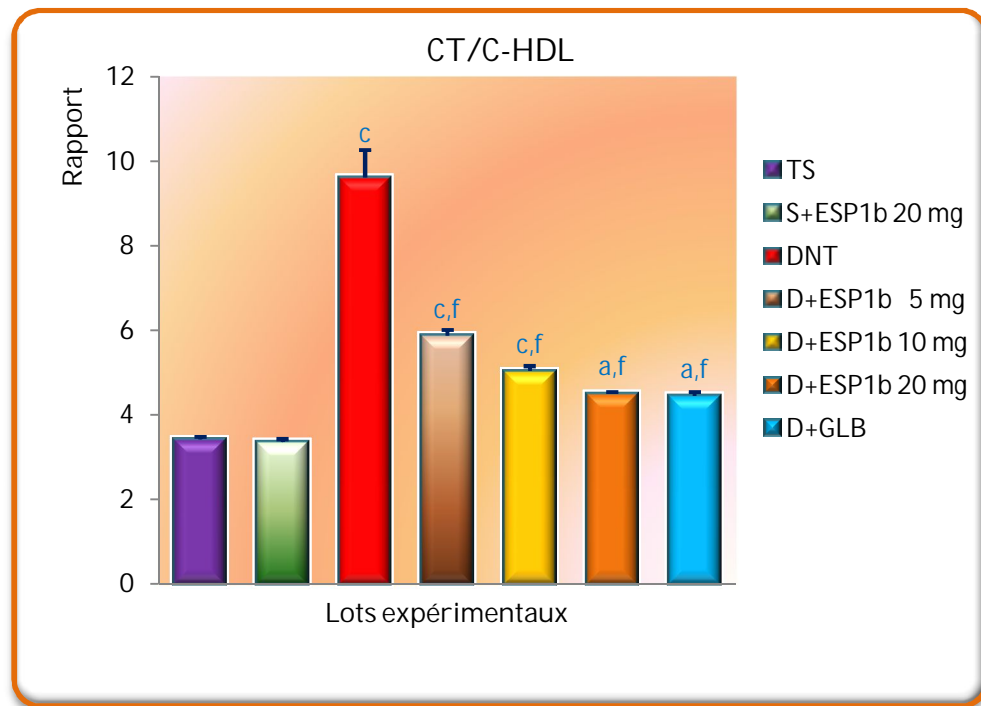


Figure. 43: Variation du rapport CT/C-HDL chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

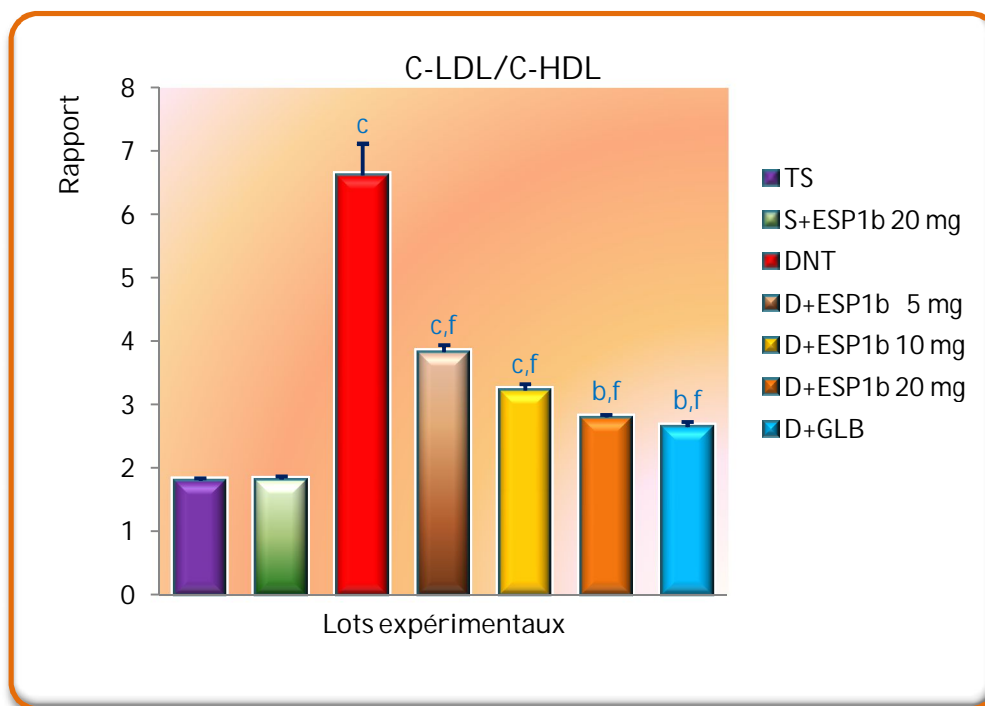


Figure. 44: Variation du rapport C-LDL/C-HDL chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

2.4. Protéines totales, albumine et paramètres de la fonction rénale

Les variations des taux plasmatiques de protéines totales, albumine, créatinine, urée et acide urique chez les rats normaux et diabétiques sont énumérés dans le **Tableau 10** et illustrées sur les **Figures 45-49**. Les rats diabétiques non traités ont diminué significativement ($P < 0,001$) les concentrations de protéines totales et d'albumine, respectivement, de l'ordre de 24,56% et 23,87 %. Cependant, ce groupe d'animaux à entraîné des augmentations significatives ($P < 0,001$) des taux de créatinine, urée et acide urique, respectivement, de l'ordre de 92,85%, 76,42% et 66,95%, en comparaison aux valeurs des animaux témoins normaux. Le traitement orale des rats diabétiques avec la molécule ESP1b a augmenté significativement ($P < 0,001$) les concentrations de protéines totales et de l'albumine par rapport au groupe témoin diabétique, alors, qu'il a réduit les taux plasmatiques de créatinine, urée et acide urique à des valeurs proches des concentration du lot témoin sain. Les rats

normaux traités par la molécule ESP1b ont montré une augmentation modérée des taux de protéines totales et d'albumine.

Tableau. 10 : Effet de l'ESP1b sur les protéines totales, albumine, créatinine, urée et l'acide urique chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	Protéines	Albumine	Créatinine	Urée	Acide Urique
	Totales (g/dl)	(g/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
TS	7,45 ± 0,07	4,44 ± 0,04	0,70 ± 0,05	32,84 ± 0,59	1,15 ± 0,04
S+ESP1b 20 mg	7,49 ± 0,09	4,46 ± 0,06	0,65 ± 0,04	34,11 ± 0,40	1,38 ± 0,09
DNT	5,62 ± 0,12 ^c	3,38 ± 0,07 ^c	1,35 ± 0,05 ^c	58,01 ± 1,71 ^c	1,92 ± 0,04 ^c
D+ESP1b 5 mg	6,30 ± 0,09 ^{c,f}	3,75 ± 0,05 ^{c,f}	0,78 ± 0,05 ^f	46,15 ± 1,02 ^{c,f}	1,57 ± 0,08 ^{c,e}
D+ESP1b 10 mg	6,52 ± 0,13 ^{c,f}	3,87 ± 0,08 ^{c,f}	0,71 ± 0,05 ^f	42,34 ± 0,58 ^{c,f}	1,43 ± 0,06 ^{a,f}
D+ESP1b 20 mg	6,97 ± 0,07 ^{b,f}	4,13 ± 0,05 ^{b,f}	0,69 ± 0,04 ^f	40,76 ± 0,45 ^{c,f}	1,24 ± 0,05 ^f
D+GLB	7,24 ± 0,08 ^f	4,32 ± 0,03 ^f	0,67 ± 0,05 ^f	38,17 ± 0,62 ^{c,f}	1,13 ± 0,04 ^f

TS, lot Témoin Sain ; S+ESP1b 20 mg: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); DNT, lot Diabétique non traité; D+ESP1b 5 mg, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 20 mg, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^dP < 0.05, ^eP < 0.01, ^fP < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

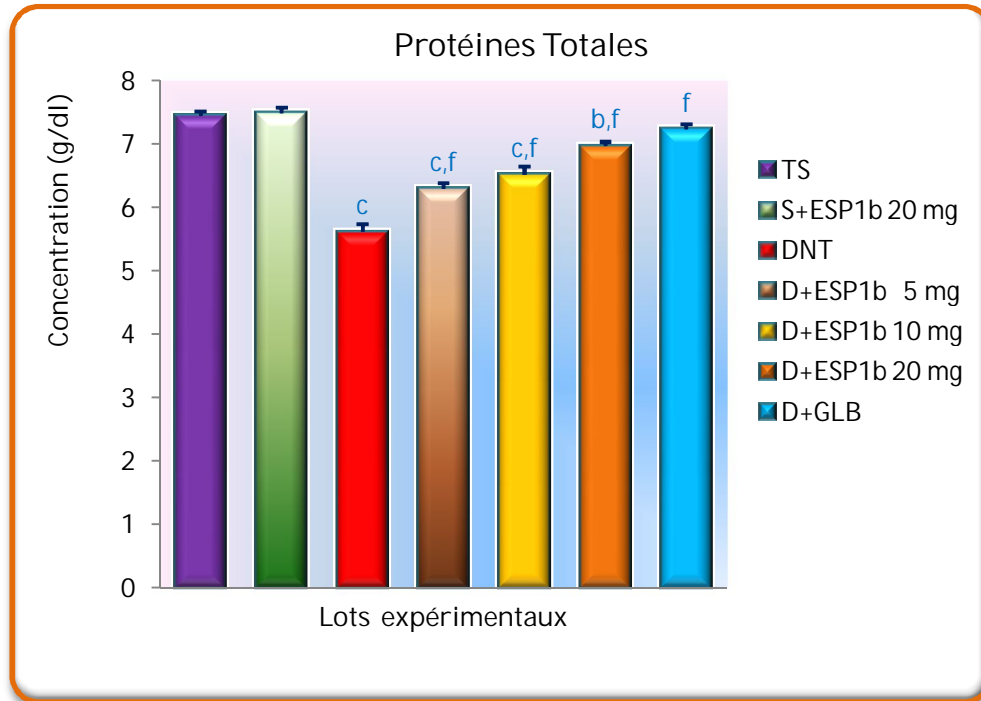


Figure. 45 : Variation de la concentration plasmatique de protéines totales (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

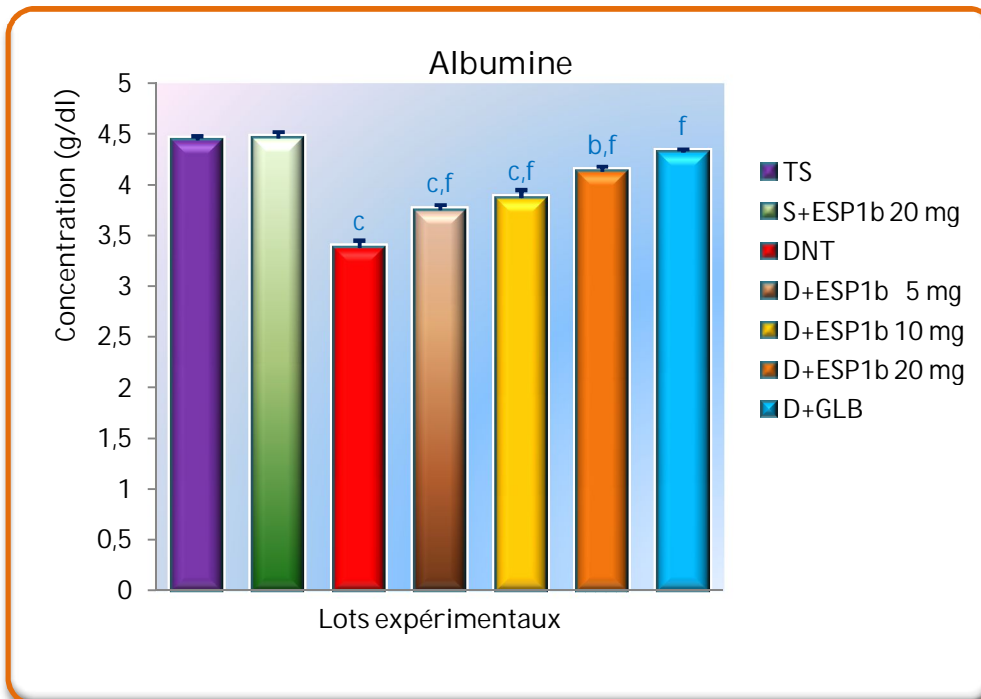


Figure. 46 : Variation de la concentration plasmatique d'albumine (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

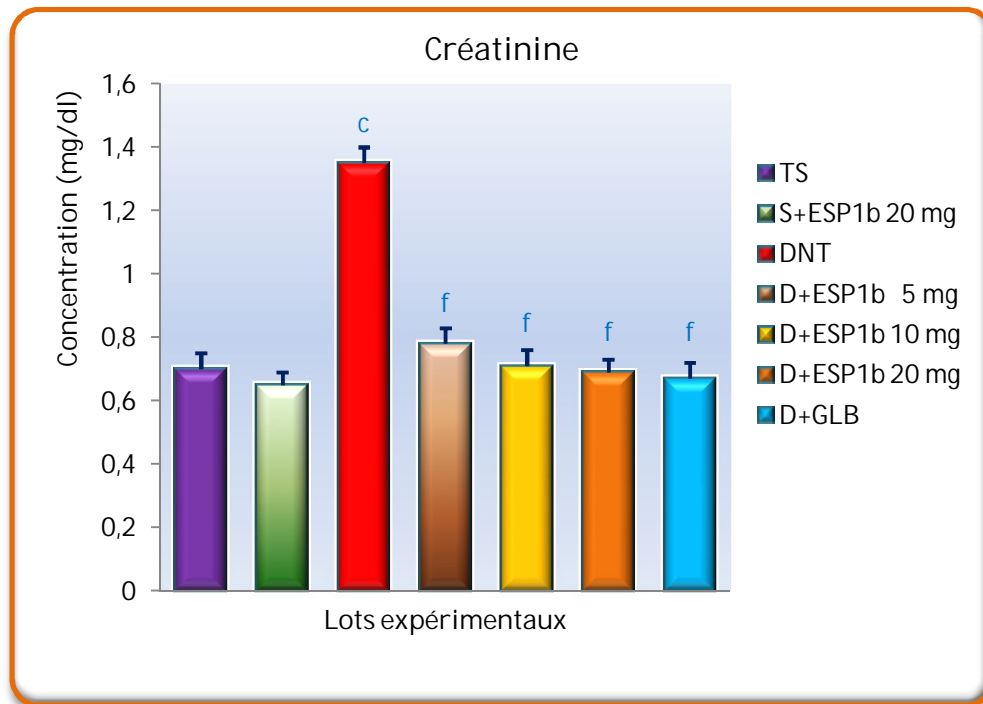


Figure. 47 : Variation de la concentration plasmatique de créatinine (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

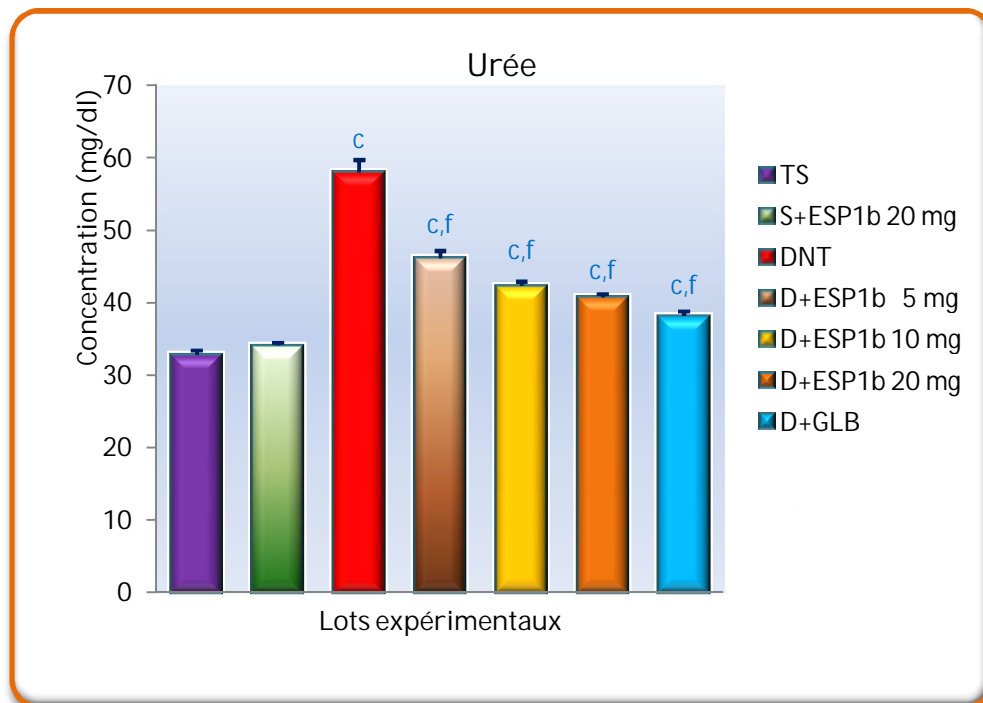


Figure. 48 : Variation de la concentration plasmatique d'urée (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

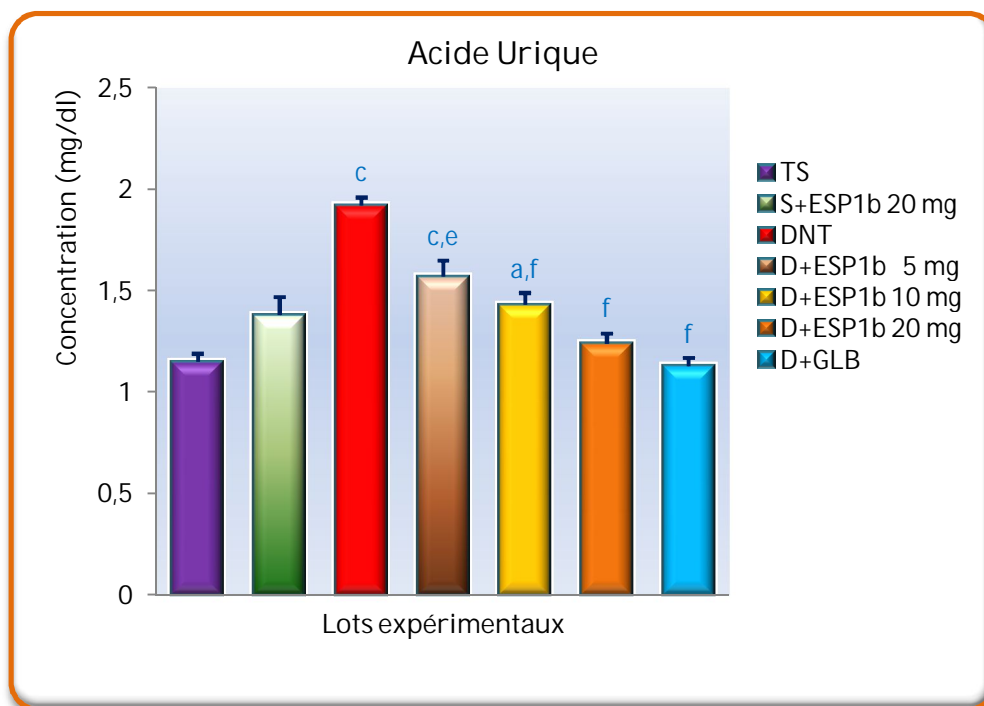


Figure. 49 : Variation de la concentration plasmatique d'acide urique (mg/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

2.5. Paramètres de la fonction hépatique

En comparant aux résultats des animaux témoins normaux (**Tab. 11 ; Fig. 50-56**), le lot diabétique non traité a révélé des augmentations significatives ($P < 0,001$) des activités plasmatiques des enzymes ALAT, ASAT, LDH, ALP et γ -GT, respectivement, de l'ordre de 66,40%, 30,28%, 50,69%, 59,74% et 65,71%. L'administration orale de la molécule ESP1b aux animaux diabétiques significativement rétabli ces activités enzymatiques à des valeurs proches des activités normales, alors que, chez les rats normaux, nous avons constaté que le traitement oral par la molécule ESP1b a entraîné diminution significative ($P < 0,05$) de l'activité de la LDH et une légère réduction des autres activités enzymatiques de plasma.

Il y avait une nette augmentation dans les concentrations plasmatiques de la bilirubine totale ($P < 0,001$) et directe ($P < 0,01$) chez les animaux diabétiques non traités, respectivement, par 45,71% et 51,02% en comparaison aux concentrations des animaux normaux. Des diminutions significatives des taux de la bilirubine totale et directe,

respectivement, de l'ordre de 30,25% et 31,08% ont été observées chez le lot diabétique traité avec 20 mg.kg⁻¹ p.c/jour de la molécule ESP1b en comparant aux animaux témoins diabétiques; Cependant, nous avons noté des élévation modérées des taux de la bilirubine totale et directe, respectivement, de l'ordre de 6,93% et 12,24% chez les rats normaux traités par la molécule ESP1b en comparaison aux résultats des rats témoins normaux.

Tableau. 11 : Effet de l'ESP1b sur ALAT, ASAT, LDH, ALP, GGT, Bilirubine Totale et Directe chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	ALAT (IU/l)	ASAT (IU/l)	LDH (IU/l)	PAL (IU/l)	γ-GT (IU/l)	Bili T (mg/l)	Bili D (mg/l)
TS	24,20 ± 0,60	39,53 ± 1,37	1164,5 ± 33,7	87,54 ± 1,88	16,39 ± 0,60	2,45 ± 0,08	0,49 ± 0,05
S+ESP1b 20 mg	22,74 ± 0,72	38,97 ± 0,75	1041,2 ± 42,5 ^a	86,63 ± 1,57	15,02 ± 0,42	2,62 ± 0,05	0,55 ± 0,03
DNT	40,27 ± 0,90 ^c	51,50 ± 1,53 ^c	1754,8 ± 31,5 ^c	139,84 ± 2,95 ^c	27,16 ± 0,92 ^c	3,57 ± 0,23 ^c	0,74 ± 0,05 ^b
D+ESP1b 5 mg	34,48 ± 0,50 ^{cd}	49,86 ± 0,94 ^c	1631,2 ± 23,6 ^{cd}	123,57 ± 1,76 ^{cd}	25,84 ± 0,69 ^c	3,43 ± 0,05 ^c	0,67 ± 0,04 ^a
D+ESP1b 10 mg	30,63 ± 0,71 ^{cd}	46,39 ± 0,89 ^{ce}	1534,2 ± 20,8 ^{cd}	114,50 ± 1,31 ^{cd}	23,35 ± 0,85 ^{ce}	2,78 ± 0,10 ^f	0,58 ± 0,02 ^d
D+ESP1b 20 mg	27,95 ± 0,52 ^{bf}	42,21 ± 0,84 ^f	1293,0 ± 32,0 ^{cd}	98,06 ± 1,71 ^{bf}	18,45 ± 0,51 ^f	2,49 ± 0,06 ^f	0,51 ± 0,02 ^c
D+GLB	31,22 ± 0,64 ^{cd}	40,72 ± 1,04 ^f	1326,8 ± 26,8 ^{bf}	91,76 ± 1,47 ^f	18,61 ± 0,60 ^f	2,64 ± 0,06 ^f	0,54 ± 0,04 ^e

ALAT, Alanine aminotransférase; ASAT, Aspartate aminotransférase; LDH, Lactate déshydrogénase; PAL, Phosphatase alcalines; γ-GT, Gamma-glutamyl transférase; Bili T, Bilirubine totale; Bili D, Bilirubine directe; TS, lot Témoin Sain ; S+ESP1b 20 mg: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); DNT, lot Diabétique non traité; D+ESP1b 5 mg, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 20 mg, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^aP < 0,05, ^bP < 0,01, ^cP < 0,001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^dP < 0,05, ^eP < 0,01, ^fP < 0,001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

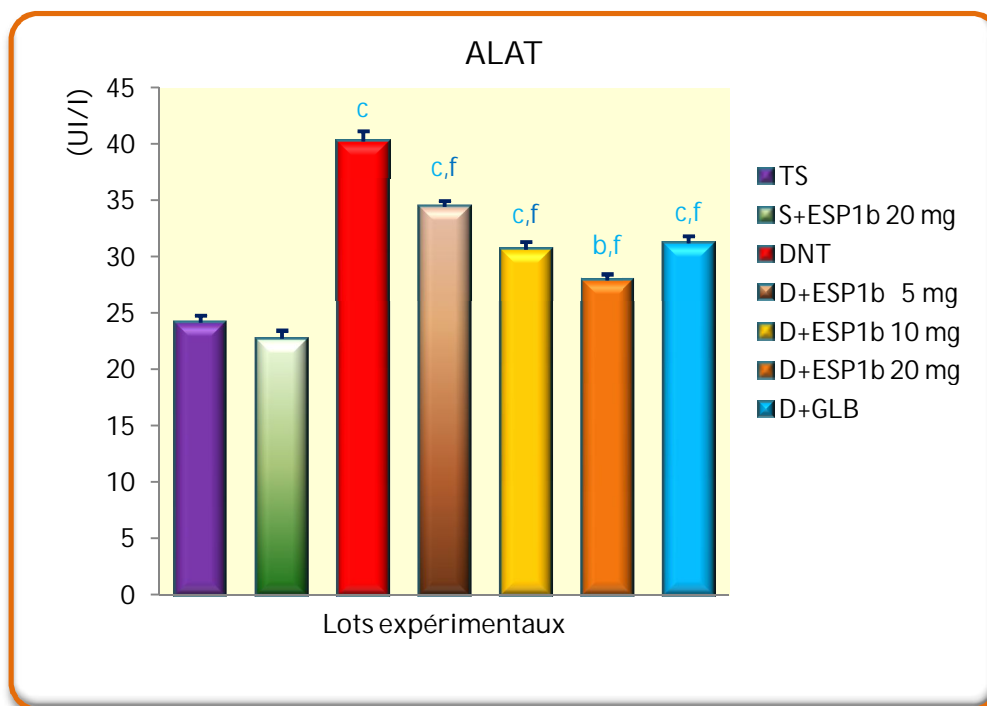


Figure. 50 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique d'Alanine aminotransférase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

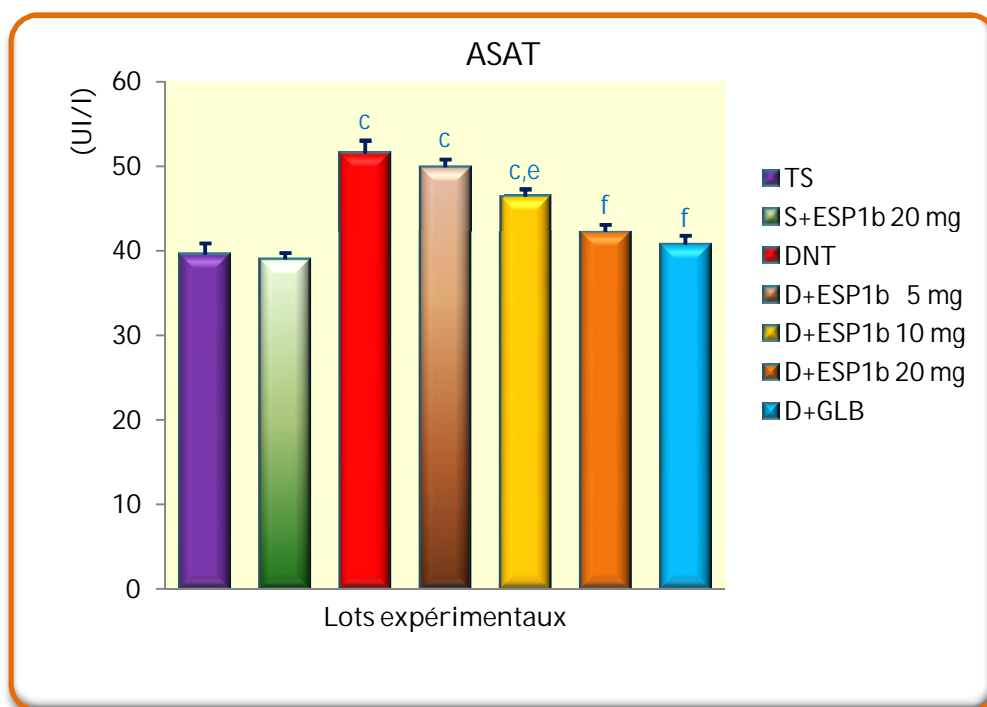


Figure. 51 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique d'Aspartate aminotransférase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

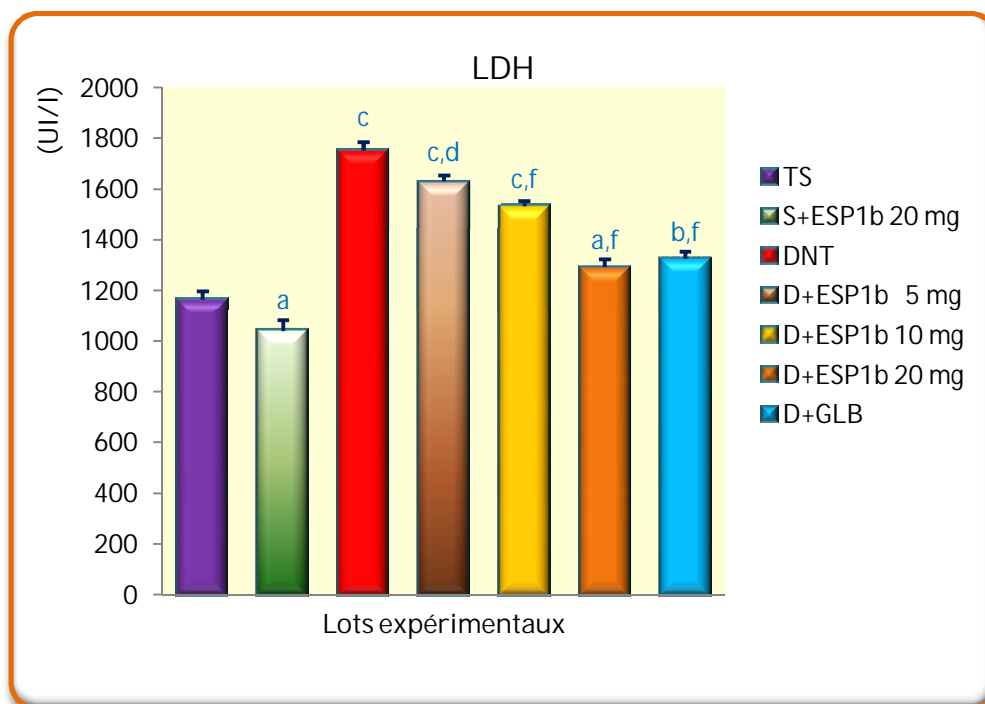


Figure. 52 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique de la Lactate déshydrogénase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

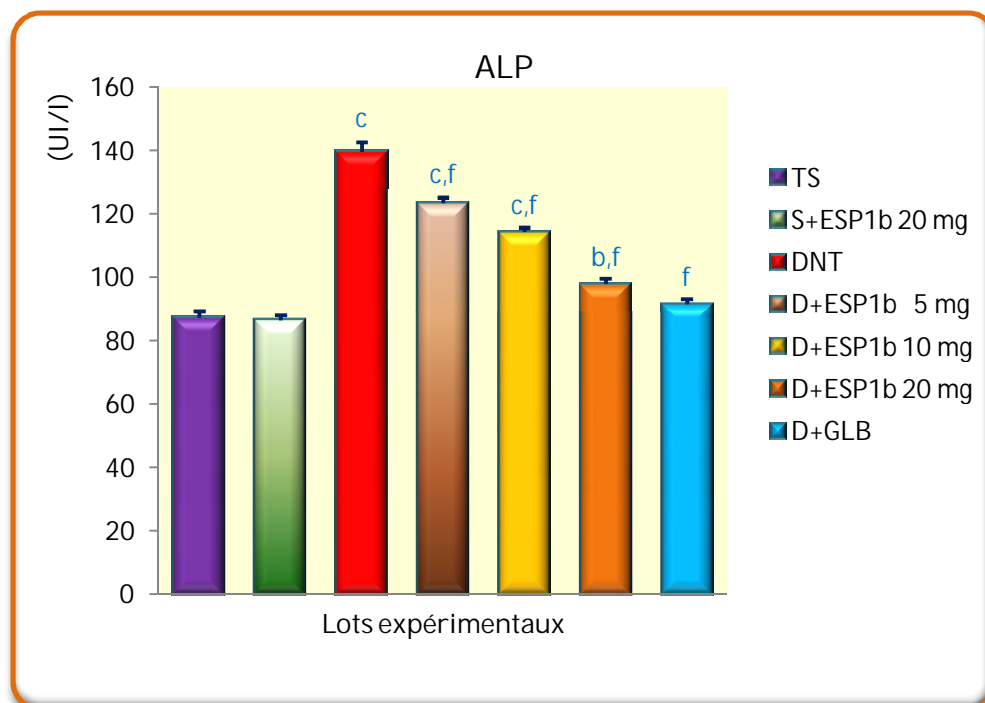


Figure. 53 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique des Alcalines phosphatases (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

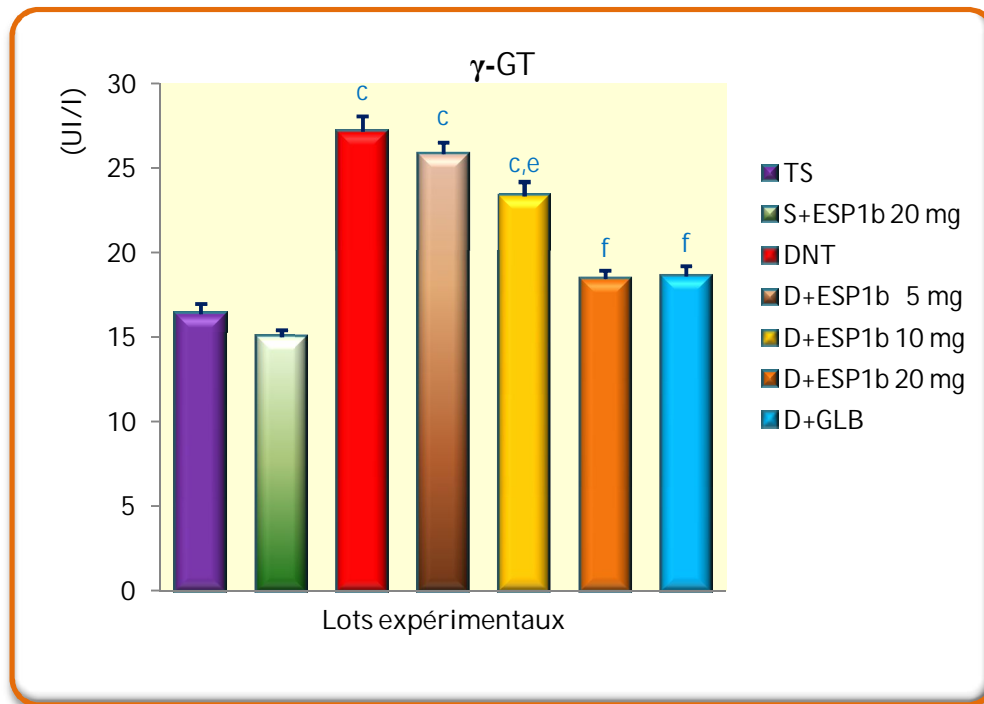


Figure. 54 : Variation de l'activité enzymatique plasmatique du Gamma-glutamyl transférase (UI/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

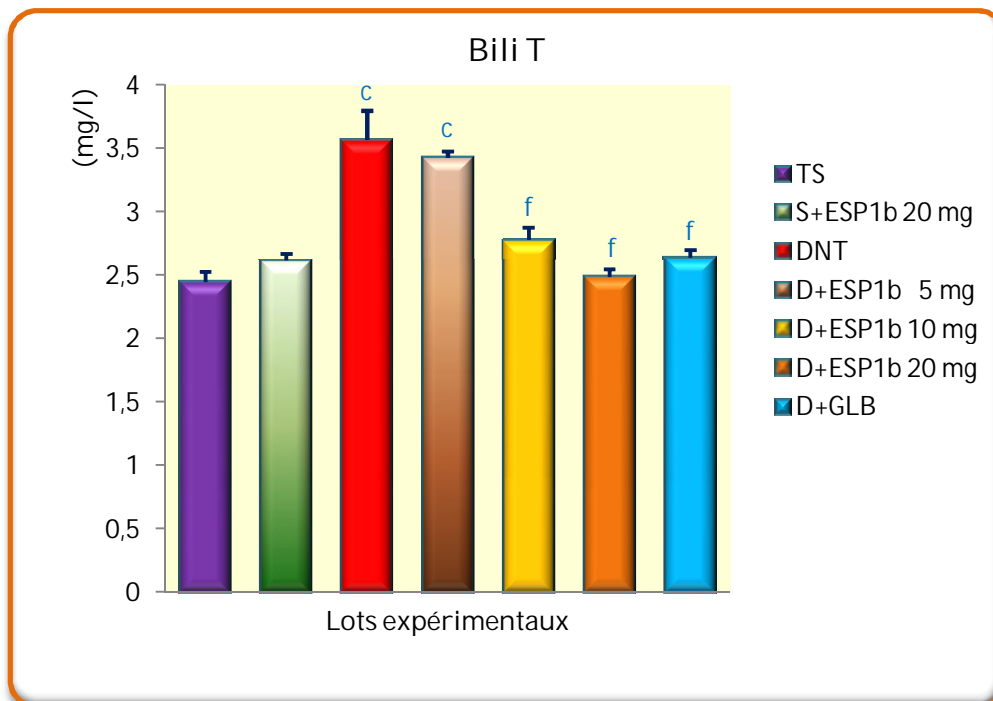


Figure. 55 : Variation de la concentration plasmatique de la Bilirubine totale (mg/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

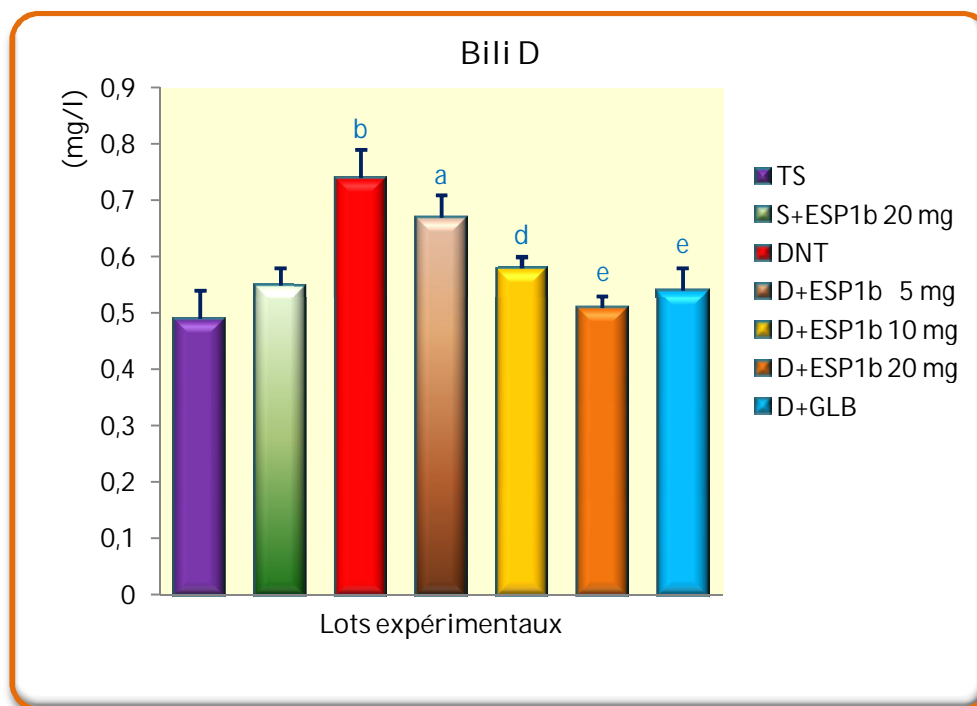


Figure. 56 : Variation de la concentration plasmatique de la Bilirubine directe (mg/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

2.6. Paramètres du stress oxydatif tissulaire

Les résultats obtenus (**Tab. 12** et **Fig. 57**) montrent une diminution significative ($P < 0,01$) de la teneur hépatique en glutathion réduit (GSH) chez les animaux du lot diabétique non traité comparé aux rats témoins normaux. En revanche, les autres lots traités n'ont pas présenté aucune différence statistiquement significative en comparaison aux résultats du lot témoin sain.

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique (**Tab. 12** et **Fig. 58**) a été significativement ($P < 0,01$) diminuée chez le lot diabétique non traité et chez les rats diabétiques traités avec 5 mg.kg^{-1} p.c/jour de la molécule ESP1b par rapport aux rats témoins normaux.

Une diminution modérée de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) hépatique a été noté chez le lot diabétique non traité en comparant au lot témoin sain (**Tab. 12** et **Fig. 59**).

Nos résultats (**Tab. 12** et **Fig. 60**) révèlent des diminutions significatives ($P < 0,001$) de l'activité enzymatique des catalases hépatiques chez tout les lots des rats diabétiques en comparaison aux rats témoins sains.

D'après les résultats illustrés sur la **Figure 61**, on observe des augmentations claires de la teneur hépatique en Malondialdéhyde (MDA) chez les groupes d'animaux diabétiques traités et non traités.

Tableau.12 : Effet de l'ESP1b sur les paramètres du stress oxydatif tissulaire chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	GSH (mM GSH/ mg de Prot)	GPx (μ M GSH/min/mg de Prot)	GST (mM GSH-CDNB/min/mg de Prot)	CAT (μ M H ₂ O ₂ /min/mg de Prot)	MDA (nmol/ mg de Prot)
TS	39,74 \pm 0,99	0,35 \pm 0,02	1,96 \pm 0,11	68,76 \pm 2,01	0,27 \pm 0,01
S+ESP1b 20 mg	38,63 \pm 1,84	0,34 \pm 0,01	1,79 \pm 0,16	67,31 \pm 1,67	0,28 \pm 0,02
DNT	29,81 \pm 1,54 ^b	0,22 \pm 0,01 ^b	1,50 \pm 0,13	46,93 \pm 1,34 ^c	0,39 \pm 0,02 ^c
D+ESP1b 5 mg	34,26 \pm 2,45	0,23 \pm 0,02 ^b	1,74 \pm 0,14	48,06 \pm 2,27 ^c	0,38 \pm 0,01 ^c
D+ESP1b 10 mg	35,17 \pm 1,69	0,28 \pm 0,02	1,76 \pm 0,14	48,78 \pm 1,31 ^c	0,37 \pm 0,01 ^b
D+ESP1b 20 mg	35,66 \pm 1,18	0,28 \pm 0,03	1,77 \pm 0,07	49,66 \pm 2,64 ^c	0,36 \pm 0,01 ^b
D+GLB	35,72 \pm 2,43	0,29 \pm 0,03	1,71 \pm 0,12	50,12 \pm 1,55 ^c	0,37 \pm 0,01 ^b

GSH, Glutathion réduit; GPx, Glutathion peroxydase; GST, Glutathion-S-transférase; CDNB, 1-chloro,2,4-dinitrobenzène; CAT, Catalases; MDA, Malondialdéhyde; TS, lot Témoin Sain; S+ESP1b 20 mg, lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); DNT, lot Diabétique non traité; D+ESP1b 5 mg, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+ESP1b 20 mg, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB : lot Diabétique Traité par 600 μ g.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy \pm Er-T Moy (n = 6). ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d $P < 0,05$; ^e $P < 0,01$; ^f $P < 0,001$ Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

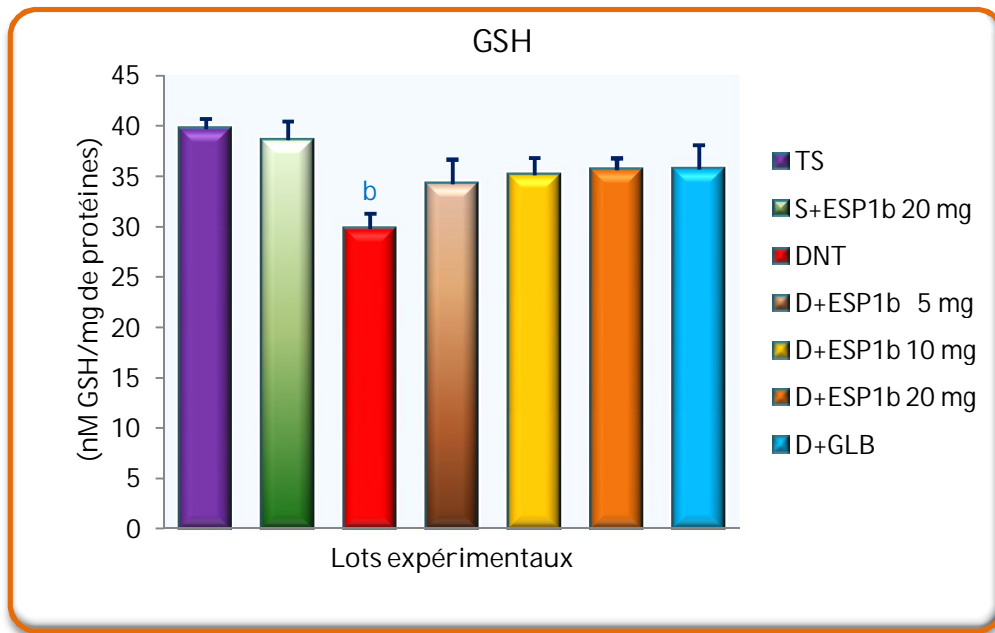


Figure. 57 : Variation de la teneur hépatique en GSH (nM GSH/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

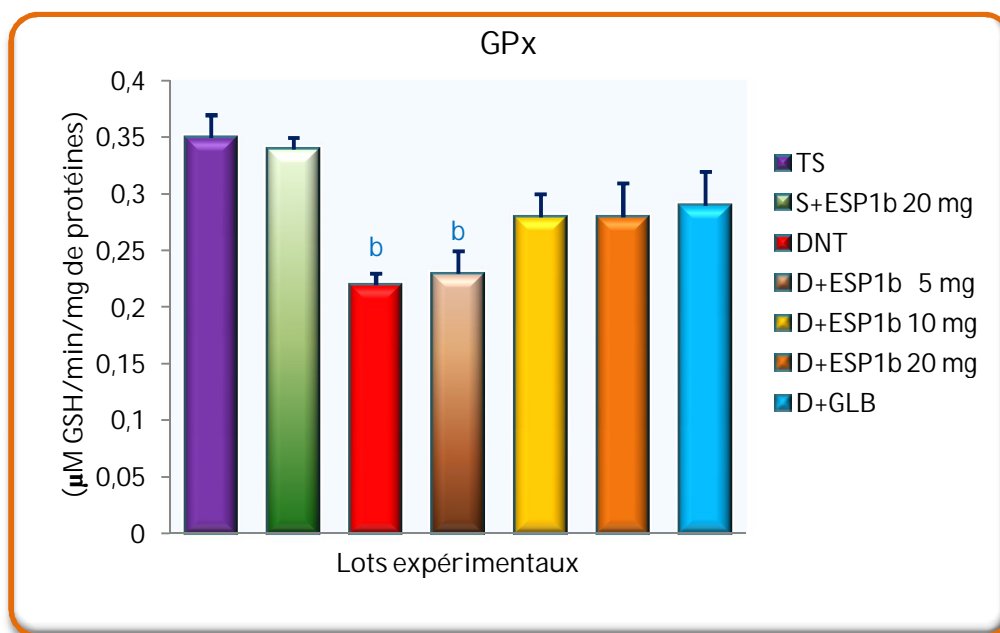


Figure. 58 : Variation de l'activité enzymatique hépatique du GPx (µM GSH/min/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

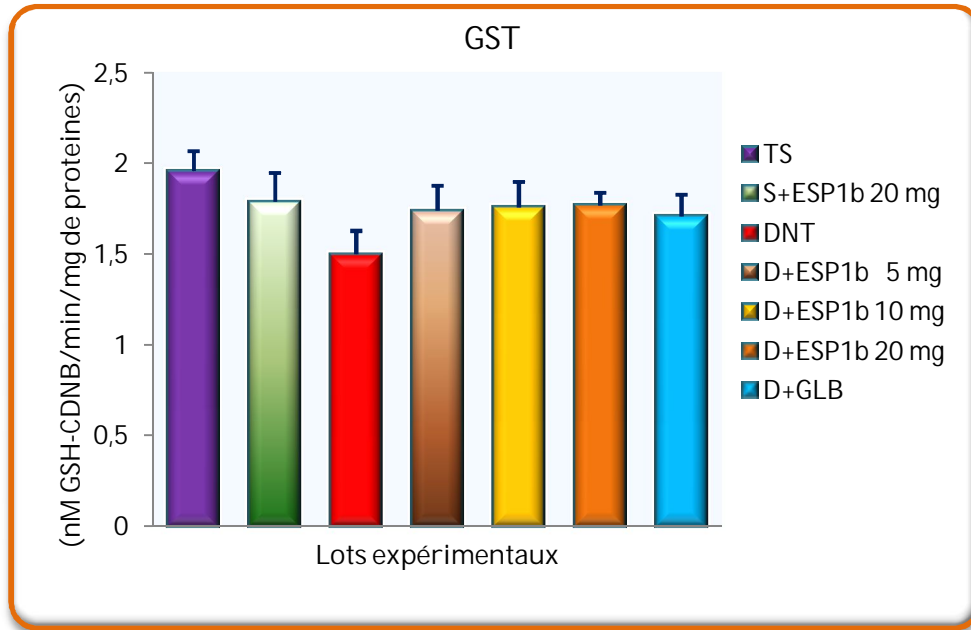


Figure. 59 : Variation de l'activité enzymatique hépatique du GST (nM GSH-CDNB/min/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

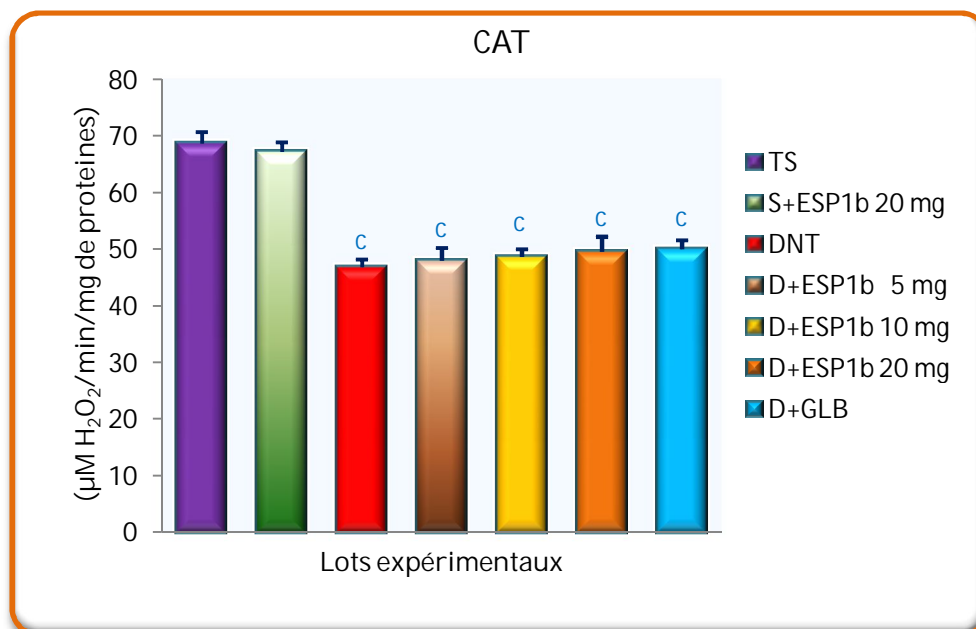


Figure. 60 : Variation de l'activité enzymatique hépatique du CAT (µM H₂O₂/min/mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

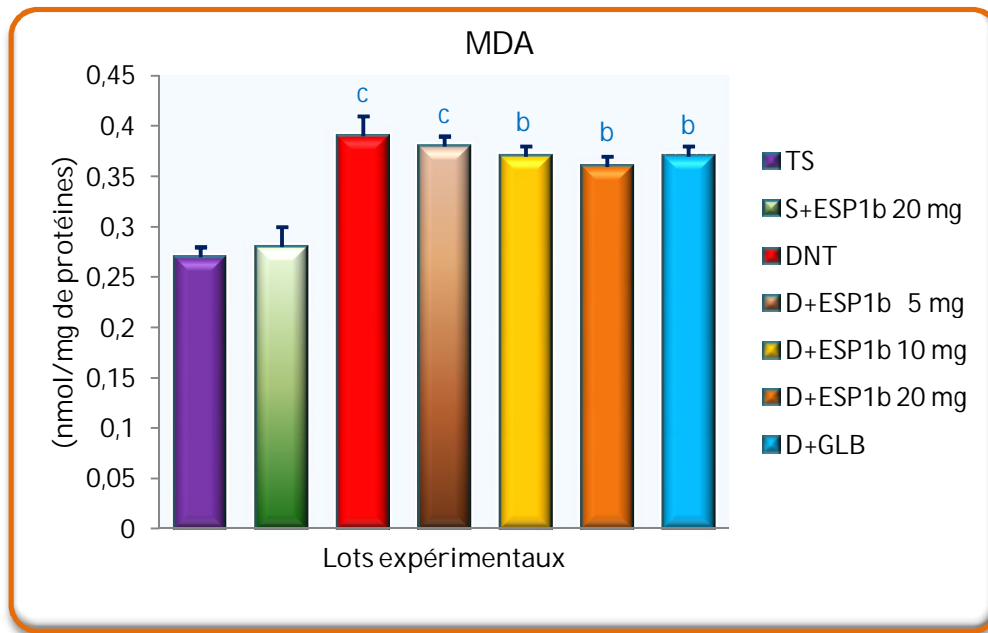


Figure. 61 : Variation de la teneur hépatique en MDA (nmol /mg de protéines) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

3. Effets du traitement sur les paramètres hématologiques et immunologiques

3.1. Numération de globules rouges, indices érythrocytaires et nombre de plaquettes

Les résultats obtenus (**Tab. 13; Fig. 62 à 68**) montrent que le diabète expérimental induit par la streptozotocine a diminué remarquablement le nombre de globules rouges (GR), la concentration d'hémoglobine total (Hb), le taux d'hématocrite (Ht), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et le nombre de plaquette (Plt). Le traitement des rats diabétiques par la molécule ESP1b a renversé ces perturbations hématologiques.

Les rats normaux traités par la molécule ESP1b n'ont pas présenté aucun changement significatif des paramètres hématologiques évalués par rapport au lot témoin sain.

Le volume globulaire moyen (VGM) n'a pas changé entre les lots expérimentaux traités et non traités.

Tableau.13 : Effet de l'ESP1b sur le nombre de globules rouges ($\times 10^6/\mu\text{l}$), concentration de l'hémoglobine totale (g/dl), taux d'hématocrite (%), volume globulaire moyenne (fl), teneur globulaire moyenne en hémoglobine (pg), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dl) et nombre de plaquettes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	GR ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VGM (fl)	TGMH (pg)	CCMH (g/dl)	Plaquettes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
TS	6,93 \pm 0,17	13,53 \pm 0,18	37,78 \pm 1,29	54,70 \pm 2,61	19,53 \pm 0,46	35,95 \pm 1,09	726,7 \pm 17,6
S+ESP1b 20 mg	6,90 \pm 0,13	13,16 \pm 0,15	36,21 \pm 0,93	52,38 \pm 0,92	19,05 \pm 0,20	36,45 \pm 0,61	689,3 \pm 19,4
DNT	5,52 \pm 0,19 ^a	9,96 \pm 0,11 ^c	29,35 \pm 0,91 ^c	53,23 \pm 1,62	18,06 \pm 0,43 ^a	34,05 \pm 0,73	478,5 \pm 23,1 ^c
D+ESP1b 5 mg	6,33 \pm 0,11 ^e	10,21 \pm 0,15 ^e	32,27 \pm 1,17 ^a	50,93 \pm 2,05	16,08 \pm 0,21 ^{cf}	31,76 \pm 0,94 ^b	584,5 \pm 36,0 ^b
D+ESP1b 10 mg	6,74 \pm 0,12 ^f	10,85 \pm 0,19 ^{ce}	34,70 \pm 1,44 ^d	51,38 \pm 2,03	16,03 \pm 0,13 ^{cf}	31,43 \pm 0,99 ^b	645,2 \pm 38,7 ^c
D+ESP1b 20 mg	7,00 \pm 0,14 ^f	11,48 \pm 0,19 ^{cf}	36,38 \pm 1,51 ^e	51,82 \pm 1,68	16,35 \pm 0,16 ^{ce}	31,72 \pm 1,01 ^a	680,2 \pm 39,4 ^f
D+GLB	6,89 \pm 0,16 ^f	12,51 \pm 0,14 ^{cf}	38,03 \pm 1,32 ^f	55,05 \pm 0,97	18,13 \pm 0,42 ^a	33,07 \pm 1,10	694,8 \pm 24,7 ^f

GR, Globules rouges ; **Hb**, Hémoglobine totale ; **Ht**, Hématocrite ; **VGM**, Volume globulaire moyen ; **TGMH**, Teneur globulaire moyenne en hémoglobine ; **CCMH**, Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine; **TS**, lot Témoin Sain ; **S+ESP1b 20 mg**: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **DNT**, lot Diabétique non traité; **D+ESP1b 5 mg**, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 10 mg**, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 20 mg**, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy \pm Er-T Moy (n = 6). ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d*P* < 0.01, ^e*P* < 0.05, ^f*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

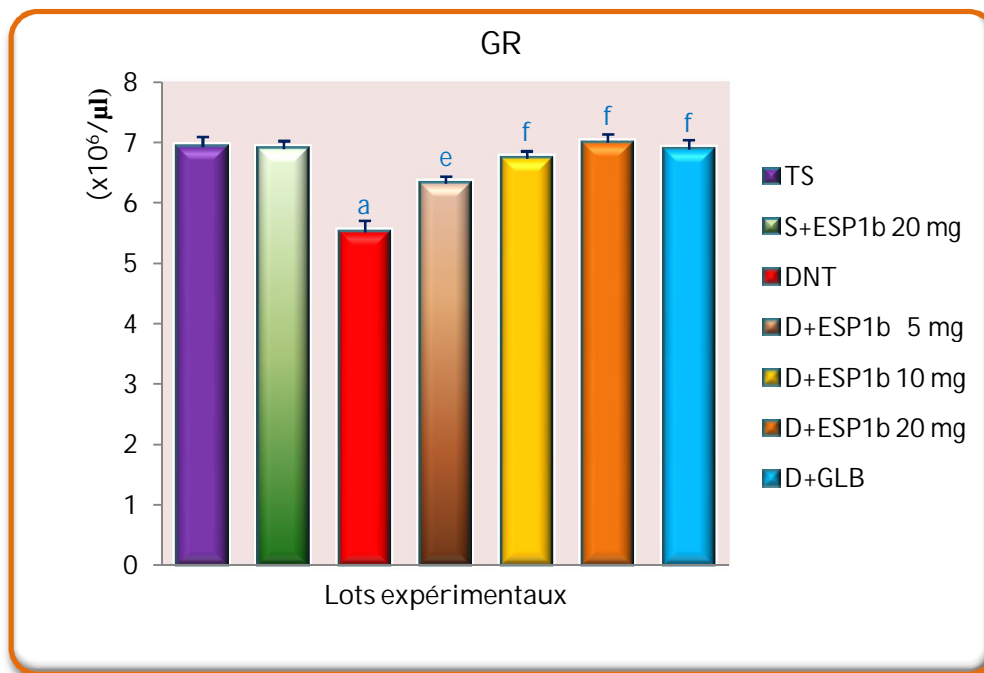


Figure. 62 : Variation du nombre de globules rouges ($\times 10^6/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

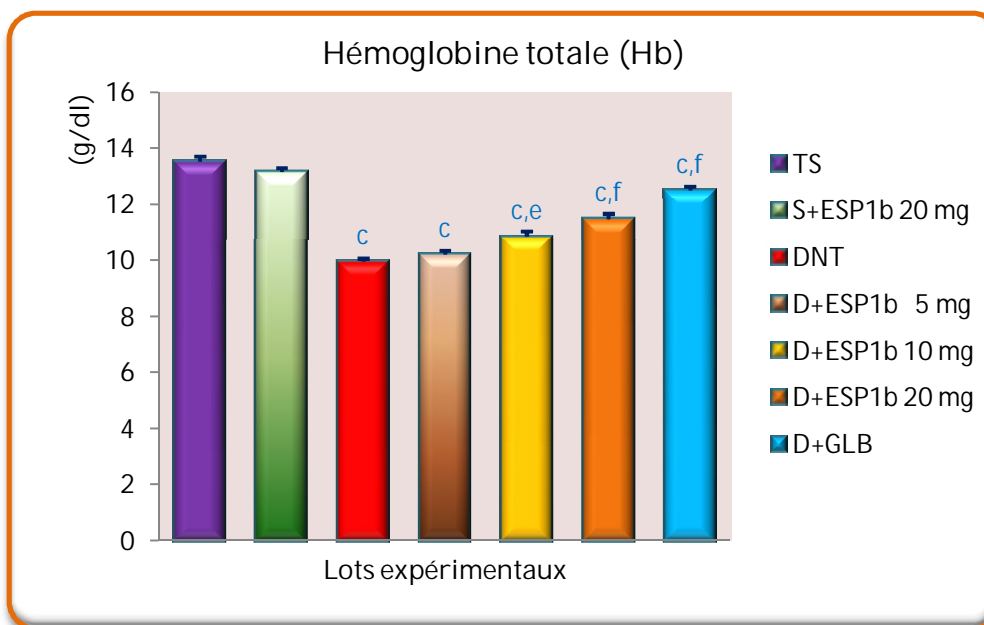


Figure. 63 : Variation de la concentration d'hémoglobine totale (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

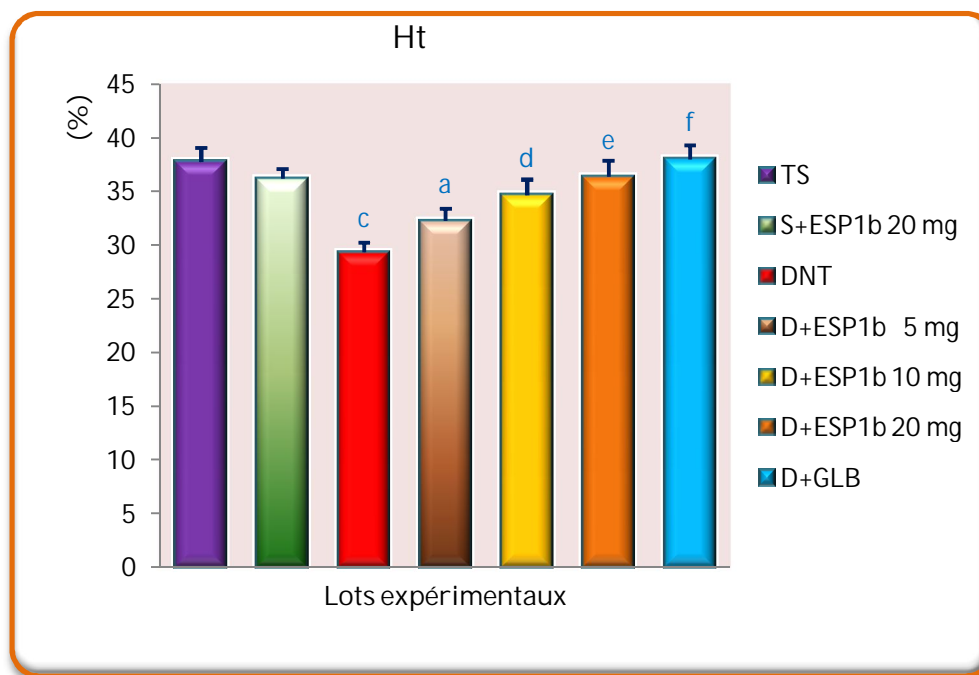


Figure. 64 : Variation du taux d'hématocrite (%) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

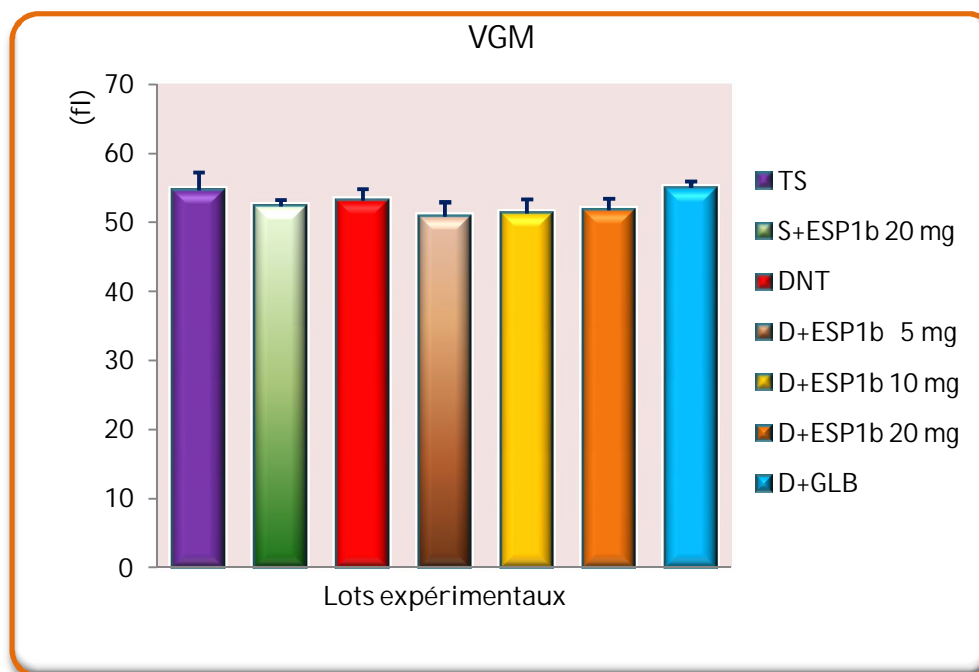


Figure. 65 : Variation du volume globulaire moyenne (fl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

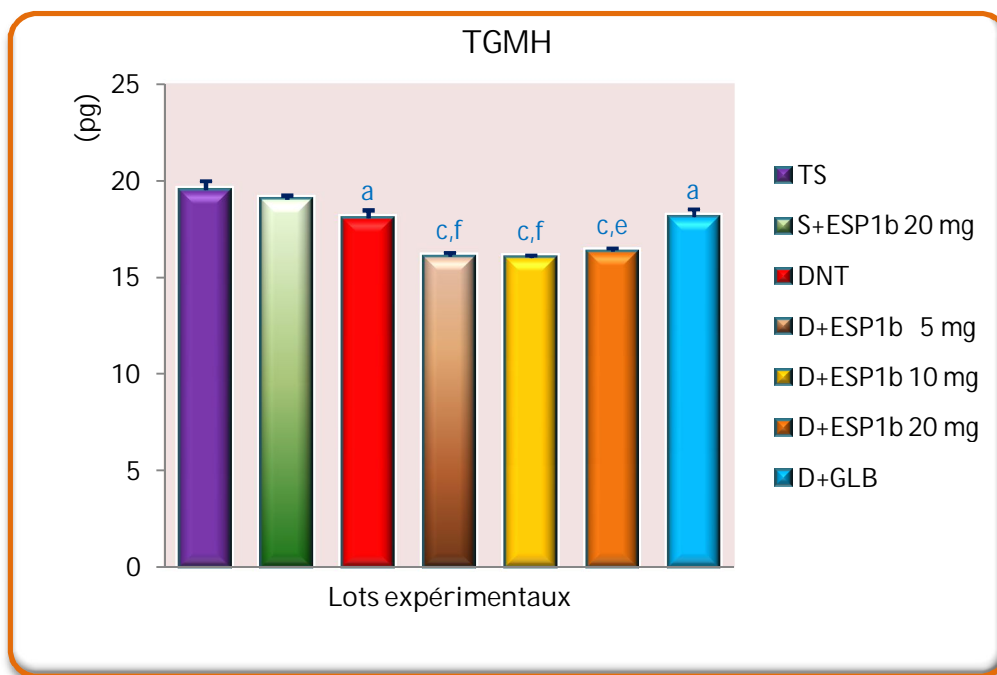


Figure. 66 : Variation de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (pg) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

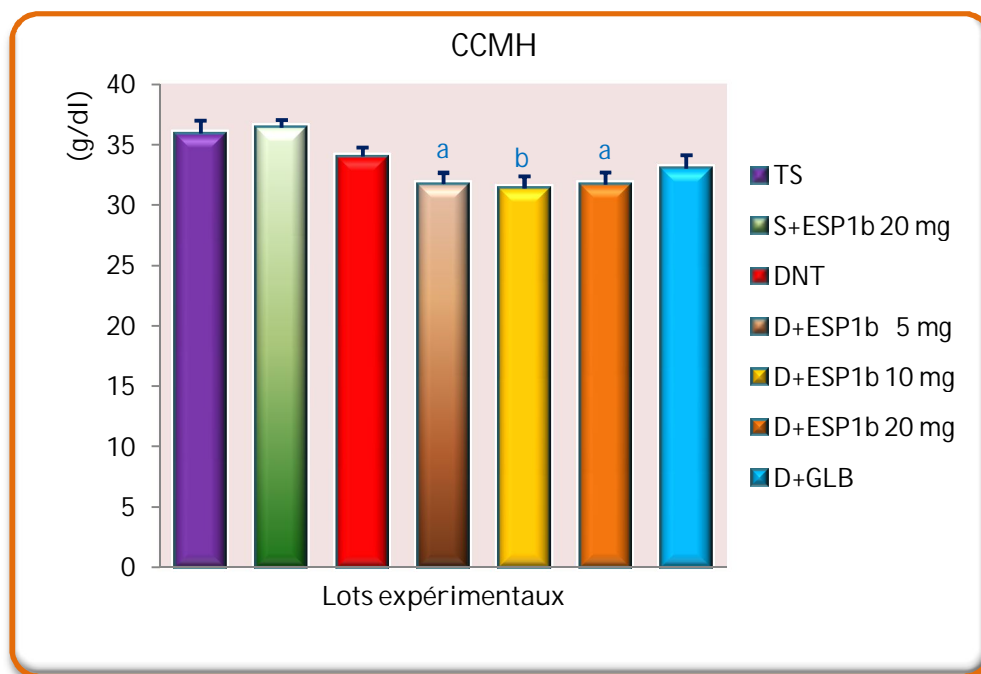


Figure. 67 : Variation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dl) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

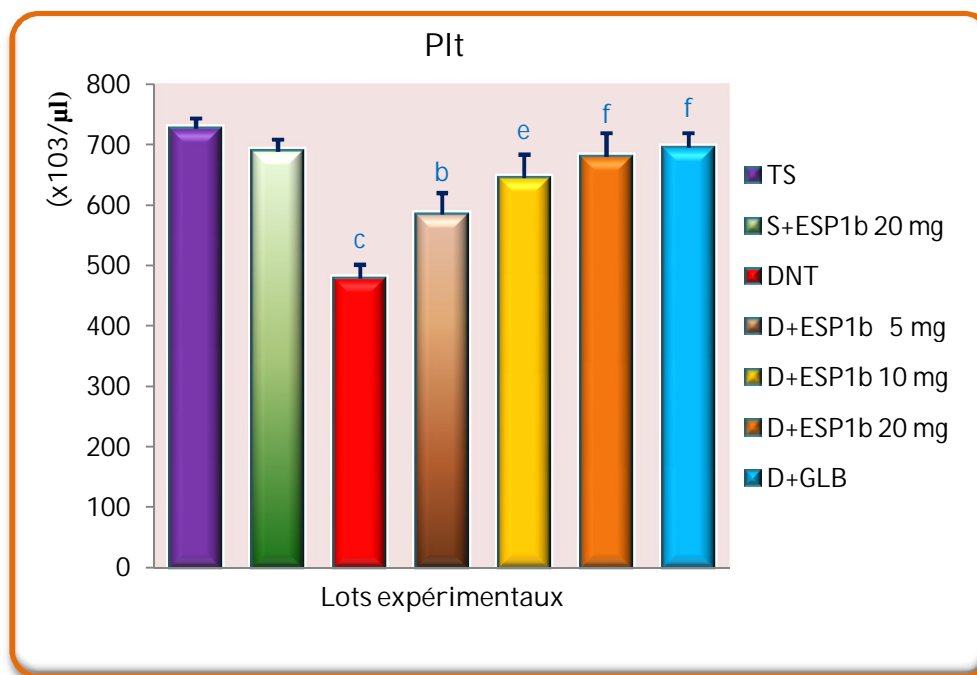


Figure. 68 : Variation du nombre de plaquettes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

3.2. Numération de globules blancs, formule leucocytaire et taux de CRP

Les résultats obtenus (**Tab. 14; Fig. 69 à 74**) montrent que le diabète expérimental induit par la streptozotocine a diminué clairement le nombre de globules blancs (GB), en diminuant les cinq populations leucocytaires (neutrophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles et basophiles). En revanche, il a augmenté significativement ($P < 0,001$) la protéine C-réactive (**Fig. 75**). Le traitement des rats diabétiques par la molécule ESP1b a rétabli ces altérations.

Les rats normaux traités par la molécule ESP1b ont augmenté légèrement le nombre de globules blancs et la concentration de la protéine inflammatoire CRP par rapport au lot témoin sain.

Tableau.14 : Effet de l'ESP1b sur le nombre des globules blancs ($\times 10^3/\mu\text{l}$), formule leucocytaire (%) et concentration de la protéine C-réactive (mg/l) chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	GB ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	NE (%)	LY (%)	MO (%)	EO (%)	BA (%)	CRP (mg/l)
TS	8,44 \pm 0,52	18,33 \pm 1,43	76,50 \pm 1,57	2,00 \pm 0,25	2,66 \pm 0,33	0,50 \pm 0,22	1,35 \pm 0,17
S+ESP1b 20 mg	8,92 \pm 0,34	21,50 \pm 1,18	71,00 \pm 1,15	2,50 \pm 0,34	3,33 \pm 0,21	1,50 \pm 0,56	2,52 \pm 0,21
DNT	5,71 \pm 0,37 ^c	29,00 \pm 1,24 ^c	67,00 \pm 1,39 ^b	1,33 \pm 0,21	1,50 \pm 0,34	1,16 \pm 0,40	11,06 \pm 1,26 ^c
D+ESP1b 5 mg	7,86 \pm 0,24 ^e	28,00 \pm 0,63 ^c	63,67 \pm 1,67 ^c	3,16 \pm 0,65 ^a	3,33 \pm 0,61 ^a	1,83 \pm 0,60	9,27 \pm 1,21 ^c
D+ESP1b 10 mg	7,95 \pm 0,41 ^e	25,17 \pm 1,60 ^b	70,33 \pm 2,64	1,66 \pm 0,49	2,00 \pm 0,44	0,50 \pm 0,34	7,12 \pm 0,89 ^{c,d}
D+ESP1b 20 mg	8,27 \pm 0,45 ^f	24,66 \pm 0,95 ^b	68,67 \pm 1,99 ^a	2,33 \pm 0,42	2,66 \pm 0,76	1,33 \pm 0,61	4,94 \pm 0,57 ^{a,f}
D+GLB	8,06 \pm 0,19 ^f	22,00 \pm 1,37 ^c	74,00 \pm 1,86 ^d	1,50 \pm 0,34	1,83 \pm 0,30	0,67 \pm 0,33	5,73 \pm 1,09 ^{b,f}

GB, Globules blancs ; **NE**, Neutrophiles ; **LY**, Lymphocytes ; **MO**, Monocytes ; **EO**, Eosinophiles ; **BA**, Basophiles ; **CRP**, protéine C-réactive ; **TS**, lot Témoin Sain ; **S+ESP1b 20 mg**: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **DNT**, lot Diabétique non traité; **D+ESP1b 5 mg**, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 10 mg**, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 20 mg**, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy \pm Er-T Moy (n = 6). ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d*P* < 0.05, ^e*P* < 0.01, ^f*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

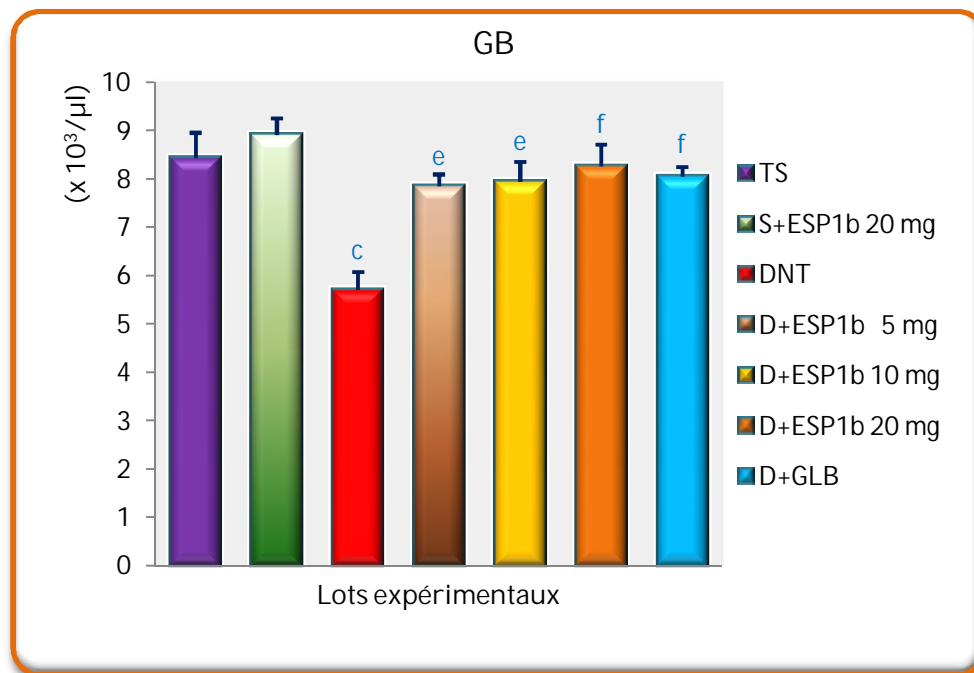


Figure. 69 : Variation du nombre de globules blancs ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

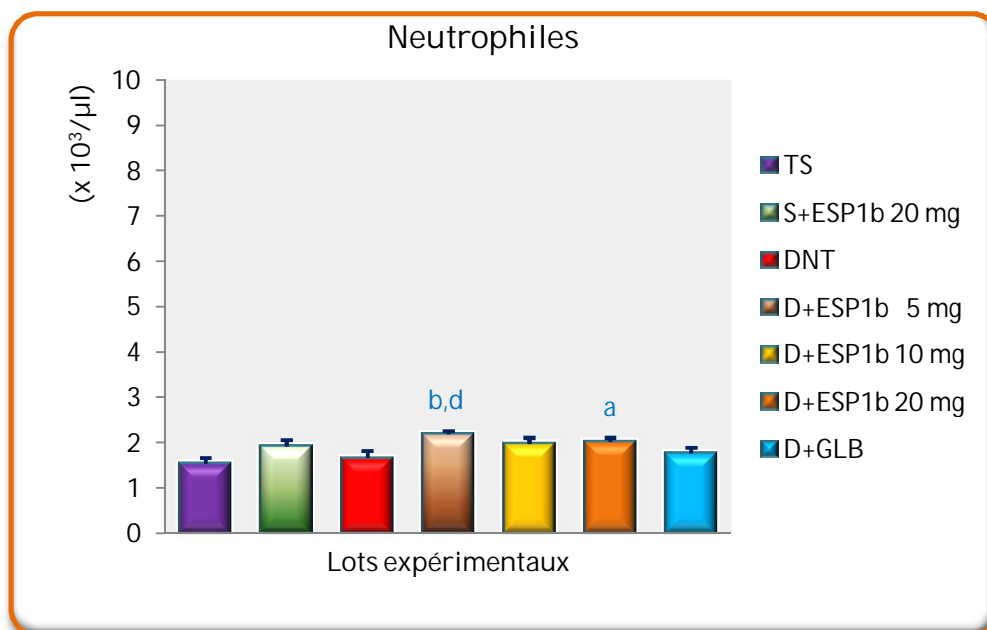


Figure. 70 : Variation du nombre de Neutrophiles ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

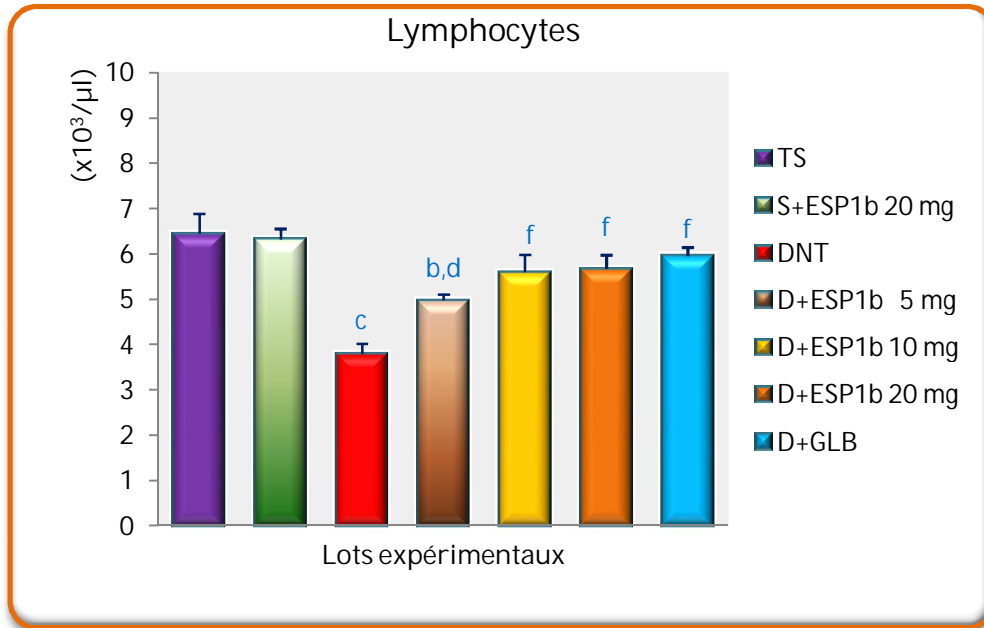


Figure. 71 : Variation du nombre de Lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

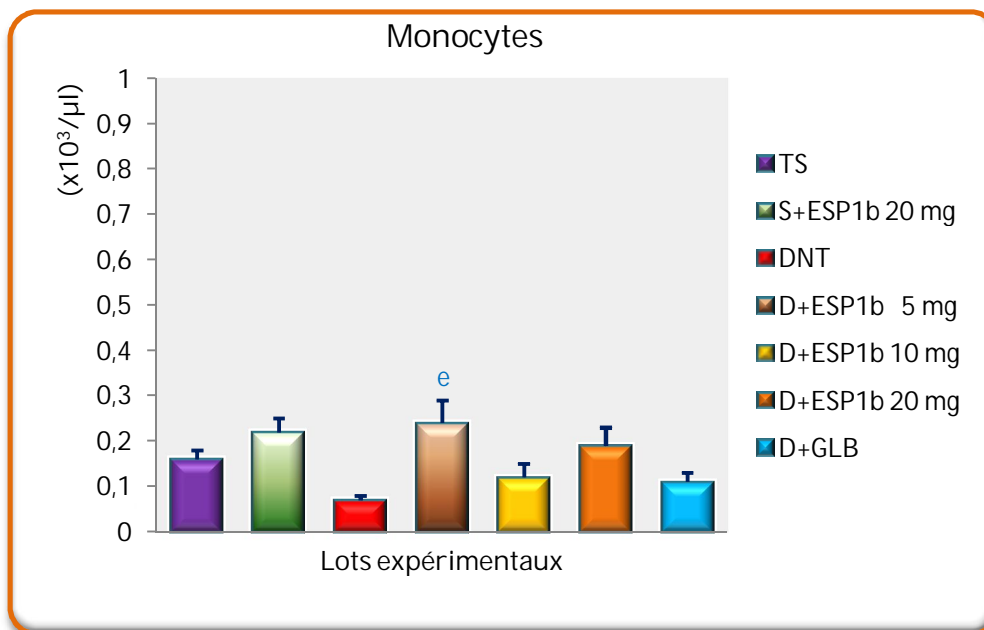


Figure. 72 : Variation du nombre de Monocytes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

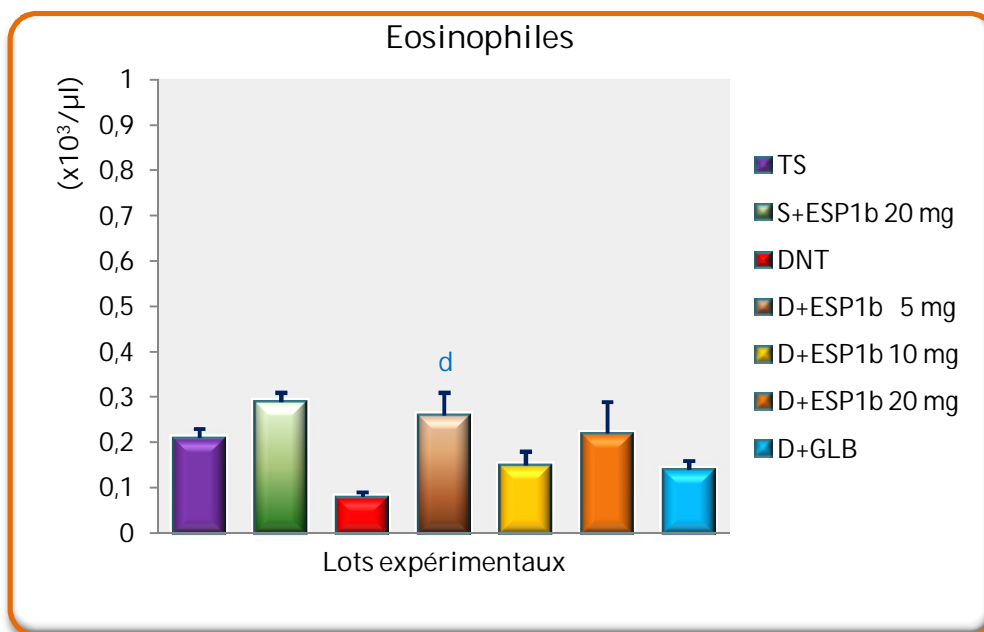


Figure. 73 : Variation du nombre d'Eosinophiles ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

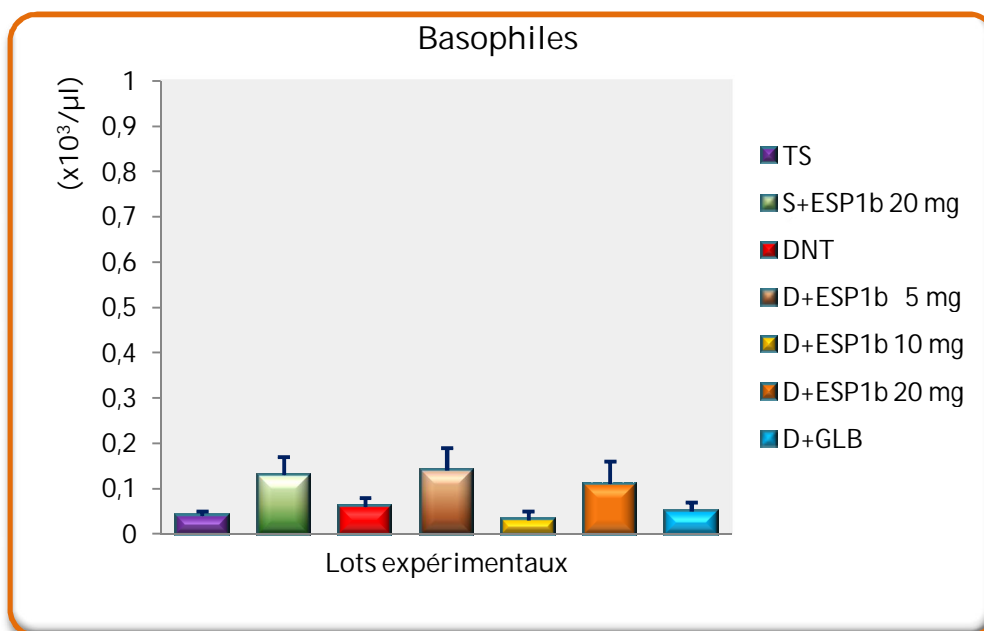


Figure. 74 : Variation du nombre de Basophiles ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

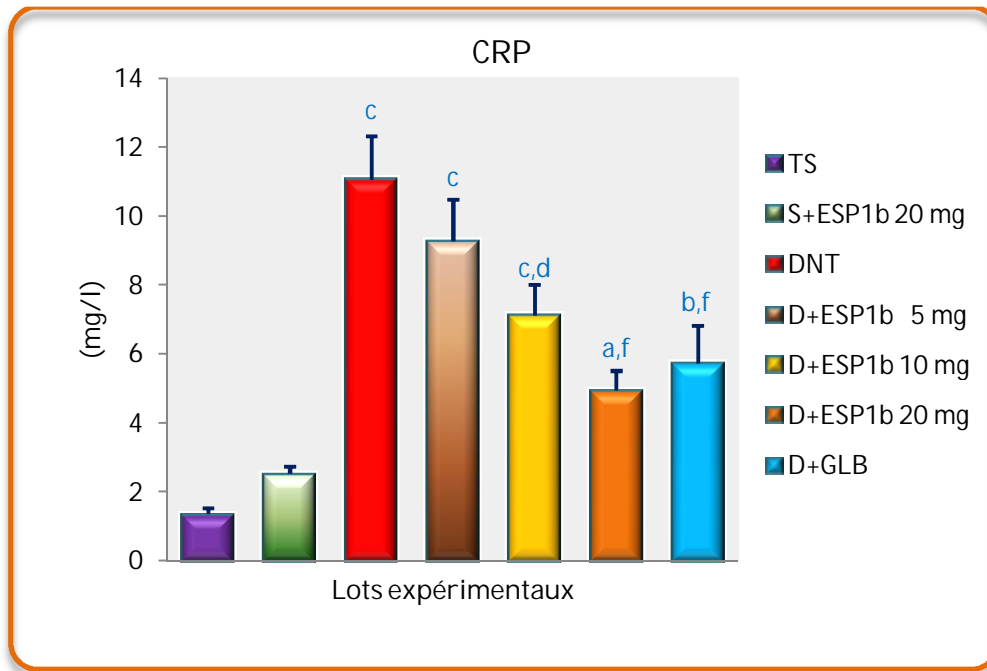


Figure. 75 : Variation de la concentration plasmatique de la protéine C-réactive (mg/l) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

4. Effets du traitement sur l'histologie du pancréas, foie et rein

4.1. Le tissu pancréatique

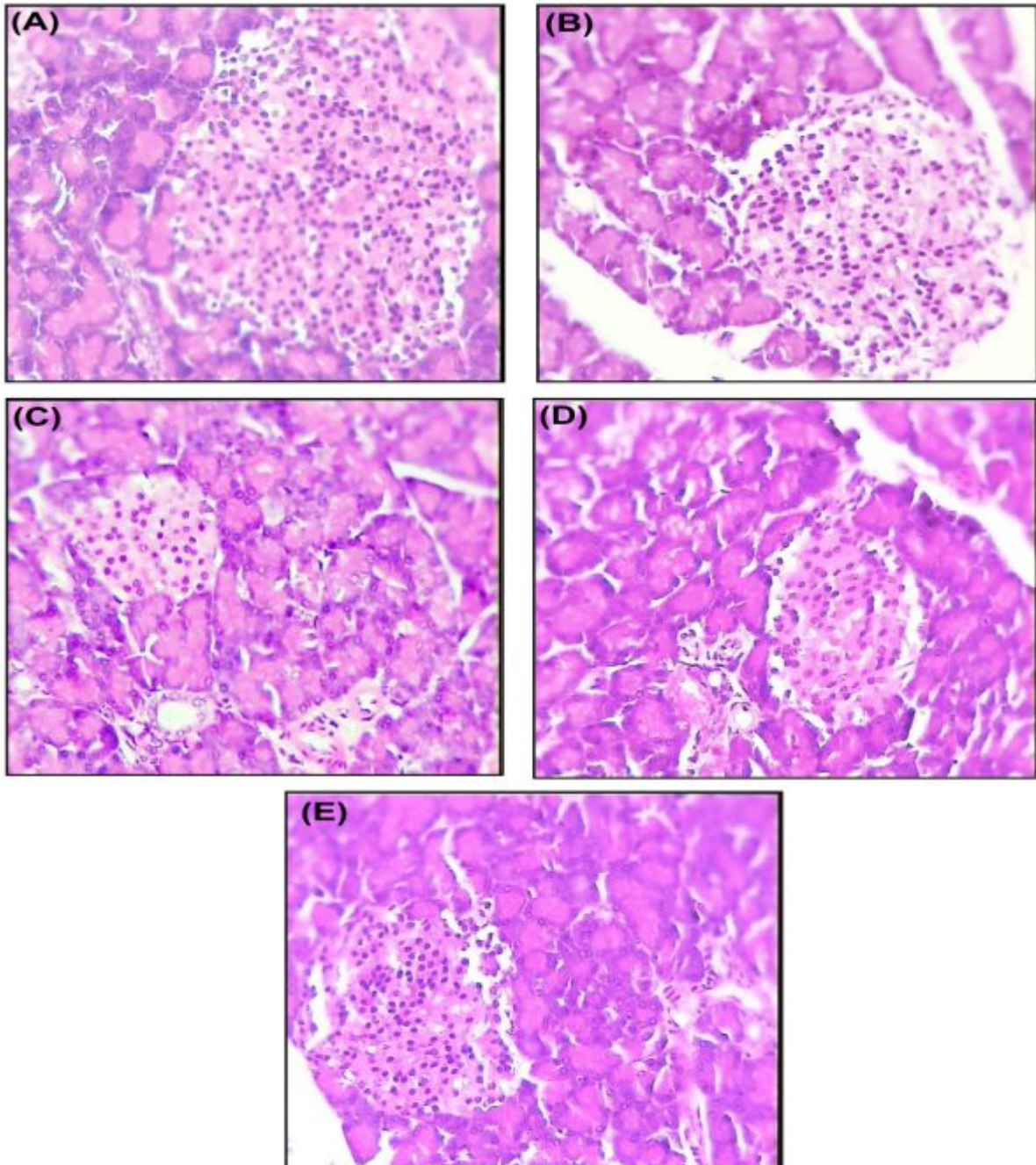


Figure. 76 : Comparaison histologique des photomicrographies de sections de tissus pancréatiques (HE 400x) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

(A), lot Témoin Sain ; (B), lot Sain Traité par la molécule ESP1b à $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c./jour}$; (C), lot Diabétique non traité; (D), lot Diabétique traité par la molécule ESP1b à $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c./jour}$; (E), lot Diabétique Traité par $600 \text{ µg.kg}^{-1} \text{ p.c.}$ de glibenclamide.

Les photomicrographies de sections de tissus pancréatiques de rats diabétiques non traités ont montré une atrophie sévère des îlots pancréatiques associée à une dégranulation des cellules β (**Fig. 76C**) en comparaison à l'histologie pancréatique du lot témoin sain (**Fig. 76A**). Le traitement des rats diabétiques avec la molécule ESP1b a entraîné une amélioration notable du volume des îlots (**Fig. 76D**) en comparant aux animaux témoins diabétiques (**Fig. 76C**). Aucune modification dégénérative des cellules β pancréatiques a été observées chez les animaux normaux traités avec la molécule ESP1b (**Fig. 76B**).

4.2. Le tissu hépatique

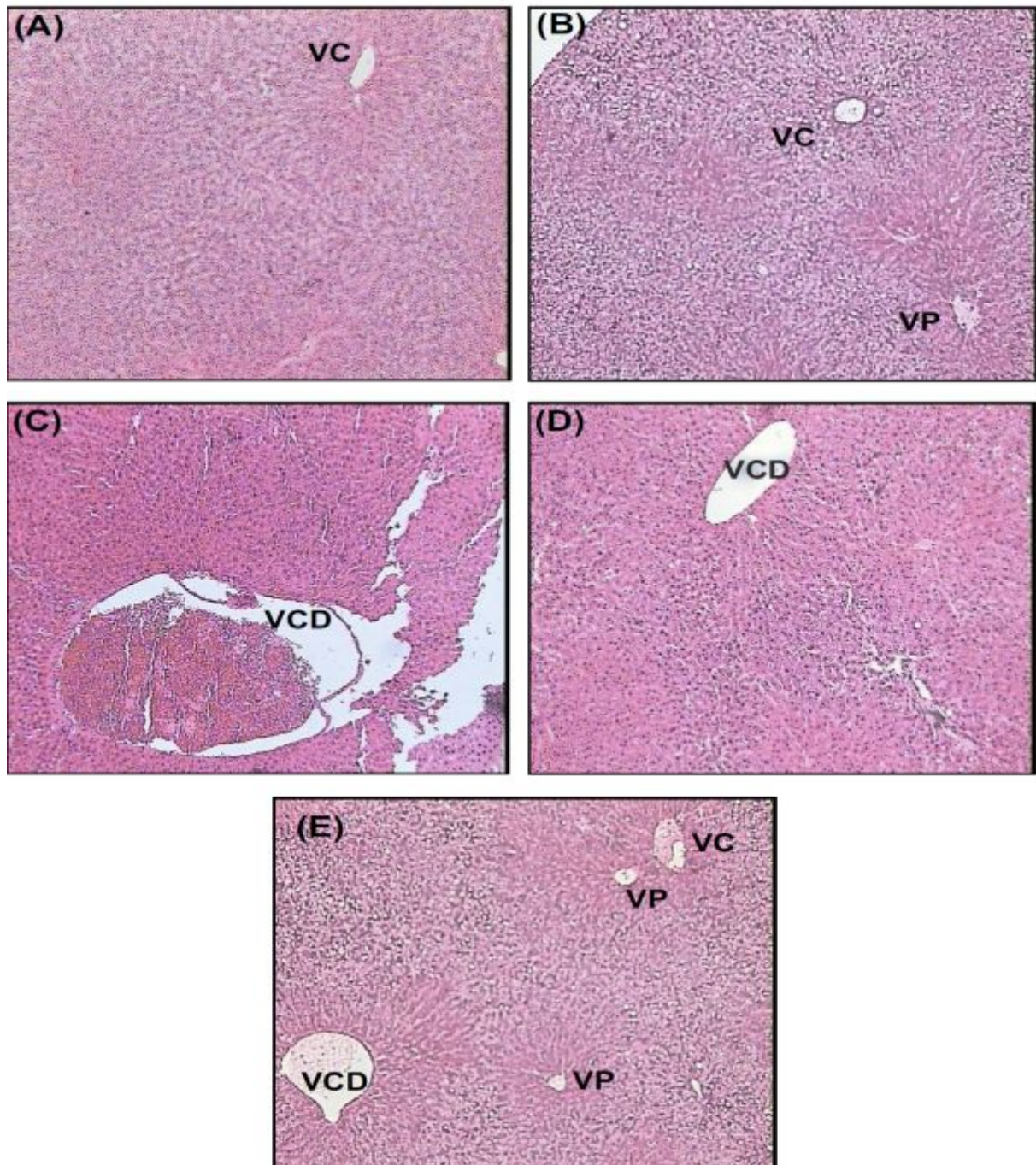


Figure. 77 : Comparaison histologique des photomicrographies de sections de tissus hépatiques (HE 100x) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

(A), lot Témoin Sain ; (B), lot Sain Traité par la molécule ESP1b à $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c/jour}$; (C), lot Diabétique non traité; (D), lot Diabétique traité par la molécule ESP1b à $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c/jour}$; (E), lot Diabétique Traité par $600 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c.}$ de glibenclamide.

VC : Veine centrolobulaire VCD : Veine centrolobulaire dilatée VP : Veine porte

Le lot témoin sain présente une histologie hépatique normale, des hépatocytes avec un cytoplasme granuleux et préservé, associées à une veine centrolobulaire clairement visible (**Fig. 77A**).

Chez le rat du lot sain traité par la molécule ESP1b (**Fig. 77B**), l'histologie du foie montre qu'il a une structure presque normale.

Les rats diabétiques non traités montrent une architecture hépatique altérée avec veine centrolobulaire dilatée avec des hépatocytes irrégulières et ballonnées (**Fig. 77C**)

Alors que pour les lots diabétiques traités par la molécule ESP1b, une veine centrolobulaire dilatée a été notée (**Fig. 77D**) mais en générale l'architecture hépatique semble intacte.

4.2. Le tissu rénal

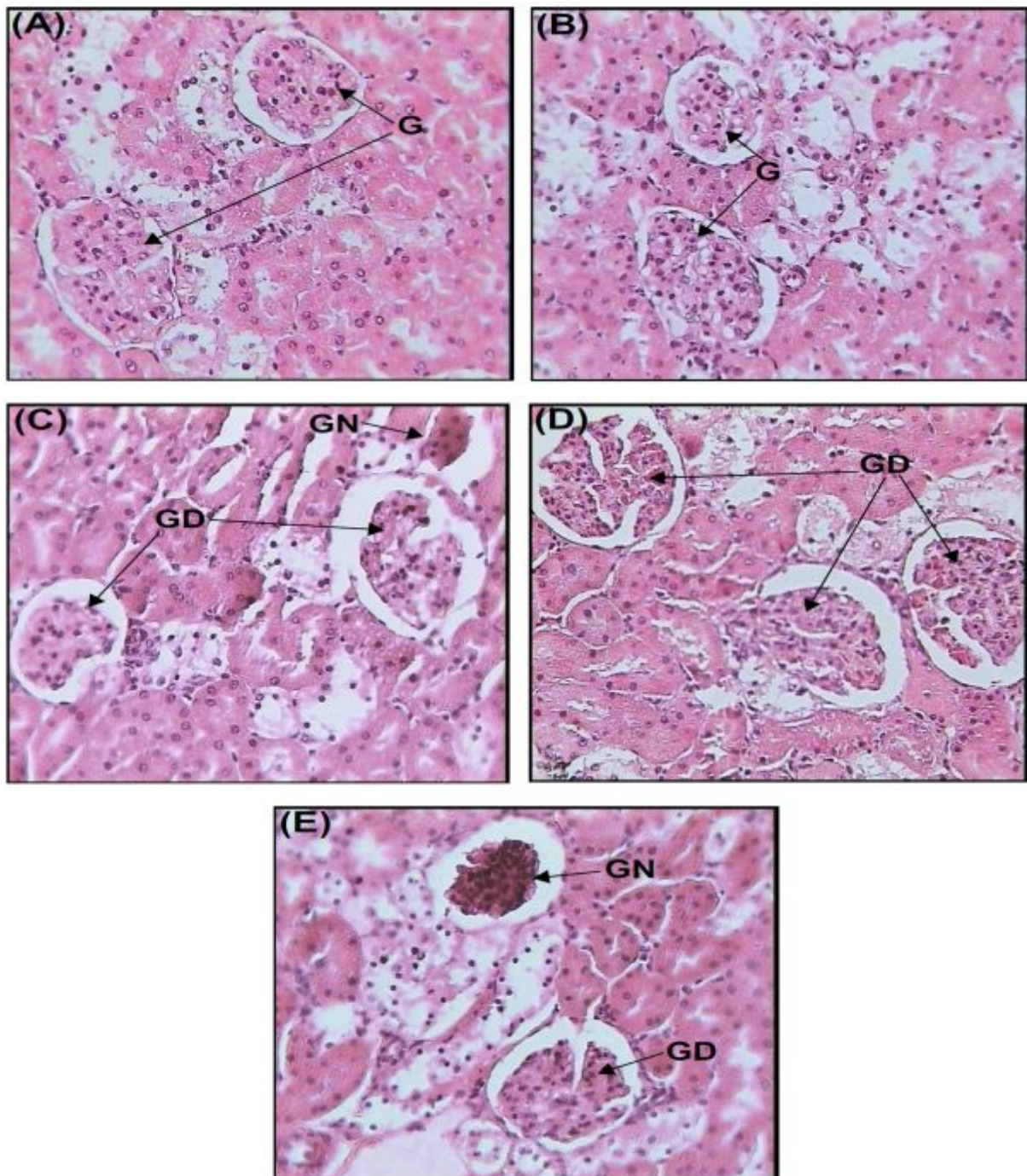


Figure. 78 : Comparaison histologique des photomicrographies de sections de tissus rénales (HE 100x) chez les rats diabétiques après 28 jours de traitement par la molécule ESP1b.

(A), lot Témoin Sain ; (B), lot Sain Traité par la molécule ESP1b à $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c./jour}$; (C), lot Diabétique non traité; (D), lot Diabétique traité par la molécule ESP1b à $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c./jour}$; (E), lot Diabétique Traité par $600 \text{ µg.kg}^{-1} \text{ p.c.}$ de glibenclamide.

G : Glomérule

GN : Glomérule nécrosée

GD : Glomérule dilatée

L'histologie du cortex rénal d'un rat du lot témoin (**Fig. 78A**) a montré la présence de glomérules uniformes avec membrane bien définie.

Chez le rat du lot traité par la molécule ESP1b (**Fig. 78B**), l'histologie du cortex rénale a montré une structure proche de la normale.

L'architecture du cortex rénal chez le rat du lot diabétique non traité (**Fig. 78C**) était sévèrement altérée où la plus part des glomérules sont dilatées ou nécrosées.

Chez le rat du lot diabétique traité par la molécule ESP1b (**Fig. 78D**), les glomérules paraient plus grands et non arrondis (dilatés).

Discussion

Dans la présente recherche, nous avons évalué, *in vivo*, les effets antidiabétiques de quatre molécules nouvellement synthétisées de la classe de sulfonamides ; deux sulfamides symétriques : le [*N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide] (**BBS1a**) et le [*N, N'*- Bis (propyl) sulfamide] (**BPS1b**) et deux dérivés *N*-acylsulfonamides : l' [Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate] (**ESP1b**) et l' [Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate] (**ESP1d**).

Ces molécules ont été administrées, par voie orale, durant quatorze jours, aux souris Swiss mâles rendus diabétiques par la streptozotocine (150 mg.kg⁻¹ p.c.). Les résultats (**Fig. 24 ; Tab. 6**) du suivi glycémique pendant cette première étude expérimentale montrent que les trois molécules ; BBS1a, ESP1b et ESP1d ont diminué remarquablement la glycémie de souris traités, tandis que la molécule BPS1b a accru significativement l'état hyperglycémique de ces animaux en comparant aux résultats de souris diabétiques non traités. La réduction la plus notable de la glycémie de souris diabétiques a été observée avec la molécule ESP1b. C'est pour cette raison que nous avons voulu confirmer l'activité antidiabétique de cette molécule chez un deuxième modèle animal, le rat Wistar, durant une période plus longue, 28 jours.

Dans cette deuxième étude, le diabète expérimental a été induit chez le rat Wistar par une injection intrapéritonéale unique de 55 mg.kg⁻¹ p.c. de streptozotocine. Cela a provoqué une atrophie sévère des îlots pancréatiques associée à une dégranulation de cellules β (**Fig. 76C**), abaissé significativement ($P < 0,001$) la concentration plasmatique d'insuline et la teneur hépatique en glycogène, tandis qu'il a augmenté constamment la glycémie, et élevé le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) à plus de 9 % de l'hémoglobine totale (**Tab. 8**). Ces altérations histologiques et du métabolisme glucidique, observées chez notre modèle murin, sont similaires à celles rapportées précédemment ([Chandramohan et al, 2008](#); [Harini et al, 2012](#)).

Sept jours post-injection, les rats Wistar ont reçu l'ESP1b quotidiennement par voie orale à 5, 10 et 20 mg.kg⁻¹ p.c pour une durée de vingt-huit jours. Cela a entraîné une nette diminution, d'une manière dose-dépendante, du taux de glucose sanguin pendant le test de tolérance au glucose oral (OGTT) (**Fig. 37**) et les quatre semaines de la période de traitement (**Fig. 33**). En outre, un accroissement de la concentration d'insuline plasmatique associée à un taux diminué d'HbA1c (<6,5% de l'hémoglobine totale) (**Tab. 8**) ont été observées chez ces animaux. Cela signifie un meilleur contrôle glycémique et une glycation réduite de protéines en raison de l'augmentation de la sécrétion d'insuline à partir des îlots de Langerhans, qui peut être avec le même mode d'action de sulfonylurées (les sulfamides hypoglycémiantes), des médicaments importants pour la prise en charge du DT2 ([Blicklé,2011](#) ; [Scheen,2015](#)), exerçant leur effet anti-hyperglycémiant en se liant à un récepteur spécifique (SUR-1), exprimé sur la membrane plasmique de cellules β des îlots pancréatiques, ce récepteur est associé à un canal potassique dépendant de l'ATP (K_{ATP}). La liaison de sulfonylurées aux récepteurs SUR-1 ferme les canaux potassiques K_{ATP} et ainsi provoque une séquence d'événements qui mènent à l'exocytose de vésicules sécrétoires d'insuline ([Tielmans et al., 2007a](#)). Certains auteurs ont démontré que les sulfamides hypoglycémiantes ont également des effets insulino-sensibilisants ou insulino-mimétiques séparés de leur effet connu sur la cellule β ([Putnam et al, 1981](#)). Cependant, aucun effet significatif du traitement par les sulfonylurées n'était démontré chez l'animal pancréatectomisé ou chez le sujet diabétique insulino-dépendant ([Blicklé et Brogard, 1998](#) ; [Krentz, 2003](#)).

Les photomicrographies de sections de tissus pancréatiques ont confirmé les effets thérapeutiques précédents du traitement de rats diabétiques avec la molécule ESP1b, montrant une amélioration remarquable du volume des îlots de Langerhans (**Fig. 76D**), qui pourrait être expliquée par l'augmentation du nombre de cellule β , l'accroissement du volume cellulaire, ou la combinaison des deux. L'expansion de la masse β -cellulaire peut être considérée comme

une conséquence de la réduction de l'effet délétère de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) sur les cellules β , qui ont une capacité de défense anti-oxydante particulièrement faible (Lenzen, 2008), ou en tant que réponse compensatoire de l'îlot pancréatique à la demande accrue d'insuline pour contrôler l'homéostasie de glucose. Les animaux diabétiques traités par la molécule ESPb1 ont également montré une amélioration de leur masse corporelle (Tab. 7). Cette capacité de la molécule ESPb1 pour protéger les rats de la perte de poids semble être liée à l'amélioration des taux plasmatiques d'insuline, ce qui conduit à une réduction de catabolismes lipidique et protéique.

Le diabète sucré est généralement associée à plusieurs anomalies de graisses et de lipoprotéines (Dunn, 1990). La caractéristique la plus typique de ces troubles est l'abondance de lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL) dans le sang (Laakso, 2009), ce qui a été observé chez les animaux diabétiques (Tab. 9). Une élévation des concentrations plasmatiques de TG, cholestérol total et LDL associée à des taux réduits de cholestérol HDL ont également été notées. Cela peut être due à la diminution profonde du catabolisme de lipoprotéines riches en TG, secondaire à une activité réduite de la lipoprotéine lipase (LPL), l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de lipoprotéines riches en TG plasmatiques (Taskinen, 1987), et / ou probablement provoquée par une surproduction hépatique de particules VLDL stimulée par une augmentation d'acides gras libres (AGL) circulants (les substrats de la biosynthèse de VLDL) résultante de l'action non-inhibée de la lipase hormonosensible (HSL) au niveau du tissu adipeux (Vergès, 2009). Le traitement oral des rats diabétiques avec la molécule ESPb1 a diminué la perturbation du profil lipidique et des rapports athérogéniques (Tab. 9). Cet effet hypolipidémiant peut être attribué essentiellement à l'élévation des taux plasmatiques (Fig. 34) de l'hormone antilipolytique, l'insuline, un puissant stimulateur de la LPL et un inhibiteur de l'activité de la HSL. D'autre part, il pourrait être dû à l'augmentation de l'utilisation du glucose, en raison de l'amélioration de l'insulinosécrétion, ce qui diminue

par la suite la mobilisation des AGL à partir des dépôts de graisses et la biosynthèse de VLDL par le foie.

Les troubles métaboliques induits par le diabète sucré impliquent non seulement le métabolisme des glucides et lipides, mais aussi celui de protéines. Dans la présente étude, les concentrations plasmatiques de protéines (**Tab. 10**) ont été diminuées chez les animaux diabétiques. Cela confirme le bilan azoté négatif communément signalé au cours du diabète expérimental induit par la streptozotocine (Almdal et Vilstrup, 1987). En outre, il pourrait indiquer une synthèse hépatique diminuée, secondaire à la carence en insuline (Biolo et Wolfe, 1993), ou l'apparition de la microalbuminurie et de la micro-protéinurie (Mogensen, 1984). Les groupes d'animaux traités par la molécule ESP1b ont rétabli les concentrations de protéines totales, d'albumine (**Tab. 10**) et de l'hémoglobine (**Tab. 13**) en comparaison aux témoins diabétiques. Ceci peut être dû principalement à la stimulation de la sécrétion d'insuline. En effet, cette hormone anabolique incite clairement la synthèse protéique (Biolo et Wolfe, 1993), ce qui contribue à la reprise du bilan azoté chez les animaux expérimentaux.

Les rats diabétiques ont élevé les taux plasmatiques d'urée, de créatinine et d'acide urique (**Tab. 10**). Cela pourrait être attribué à la clairance réduite de ces substances, qui reflète une baisse du taux de filtration glomérulaire (Almdal et Vilstrup, 1988) et / ou une nette augmentation de l'absorption tubulaire (Johnson et al., 2003). Néanmoins, au cours de ce trouble métabolique, les concentrations accrues de l'urée, le produit final principal du métabolisme protéique et de la créatinine, le dérivé de la dégradation de la créatine et de la phosphocréatine, qui sont considérés comme étant des composés de stockage d'énergie dans les muscles squelettiques, peuvent aussi être la conséquence d'une dégradation musculaire extensive associée à un catabolisme accru des protéines plasmatiques et hépatiques (Jordá et al., 1982). Par ailleurs, l'augmentation du taux d'acide urique, qui est un produit du métabolisme de la purine et l'un des principaux antioxydants endogènes, pourrait être en

corrélation d'un stress oxydant, responsable de l'augmentation de l'activité de la xanthine oxydase, la seule enzyme qui est capable de produire l'acide urique (Becker, 1993). En plus de stress oxydant, l'hyperuricémie peut être une conséquence de la perturbation métabolique (Madianov et al., 2000) et, plus particulièrement, de la glycation protéique, qui conduit à l'atrophie musculaire et l'augmentation de la libération de purines (adénosine et guanosine), les principaux sources d'acide urique et stimulateurs majeurs de la xanthine oxydase (Anwar et Meki, 2003). Le lot diabétique administré avec la molécule ESP1b a révélé une histologie du cortex rénale de structure proche de la normale (Fig. 78B). En outre, nos données (Fig.29 ; Tab.10) indiquent que ce traitement a diminué le rapport réino-corporel, l'urémie, la créatininémie et l'uricémie. Ceci peut être interprété par une fonction rénale améliorée associée à une diminution de la dégradation de protéines plasmatiques et musculaires.

Le streptozotocine est connu pour avoir des effets toxiques non seulement sur les cellules β du pancréas, mais aussi sur d'autres organes, y compris le foie (Lenzen, 2008), l'organe métabolique central de l'organisme, qui joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du glucose; par l'absorption, le stockage, la libération et la synthèse *de novo* à partir d'autres précurseurs tels que les acides aminés (AA) (Hagopian et al., 2003). Dans notre étude, le diabète expérimental a augmenté les activités des enzymes plasmatiques; ALAT, ASAT, LDH, PAL et γ -GT (Tab. 11). Cela pourrait être due à la fuite de ces enzymes, et plus spécifiquement L'ALAT, du contenu cytosolique du foie à la circulation sanguine (Navarro et al., 1993), ce qui démontre un dommage hépatocellulaire (El-Demerdash et al., 2005). Ceci a été mise en évidence par l'inflammation et l'augmentation du poids relatif du foie (g/100g p.c.) (Fig. 28), conformé par l'étude histopathologique des sections de tissus hépatiques (Fig. 77), qui révèle une architecture tissulaire altérée avec une veine centrolobulaire dilatée et des hépatocytes irrégulières et ballonnées chez le lot diabétique non traité (Fig. 77C). Toutefois, les activités élevées de transaminases (ALAT et ASAT) plasmatiques au cours de diabète,

pourrait aussi être due à une accumulation excessive des AA néoglucogéniques (alanine et glutamate) à la suite de la mobilisation des AA à partir de réserves en protéines périphériques (Felig et al., 1970). En outre, l'augmentation des activités sériques d'ASAT et LDH, présentes essentiellement dans les muscles cardiaques et squelettiques, pourrait être attribuée à une lésion du myocarde (Awaji et al., 1990). En plus de ces sources extra-hépatiques intervenant dans l'élévation des activités enzymatiques en circulation, les déterminations des isoenzymes sériques ont révélé une origine uniquement intestinale de l'hyperphosphatasémie observé chez les rats diabétiques (Chua et Shrago, 1978), menant, à suggérer que l'activité sérique élevée de la PAL peut être secondaire à l'hyperphagie (Chua et Shrago, 1978) ou à un effet toxique direct de la streptozotocine sur l'intestin (Hough et al., 1981).

Bien que, l'augmentation de l'activité sérique de la γ -GT chez les patients a été initialement considérée comme un marqueur sensible de la consommation d'alcool, de la stéatose hépatique et de l'hépatite (Teschke et al, 1977), des études plus récentes (Lee et al., 2003; Mason et al. , 2010) ont rapporté que l'activité sérique élevée de la γ -GT est également fortement associée au développement du syndrome métabolique, diabète sucré et maladies cardio-vasculaires, qui se caractérisent tous par le stress oxydant. Ainsi, l'activité élevée de la γ -GT dans le plasma des rats diabétiques (**Tab. 11**) pourrait être expliquée par un besoin accru de ces organismes à produire plus de glutathion réduit (GSH), l'antioxydant non protéique-thiol le plus abondant dans le corps, afin de modifier le stress oxydant existant pendant cet état pathologique (Bidel al., 2008).

L'hyperbilirubinémie observée chez les rats diabétiques (**Tab. 11**) pourrait indiquer des altérations d'un ou plusieurs processus hépatiques responsables de l'élimination de la bilirubine du plasma, y compris l'absorption et la conjugaison (Tuñon et al., 1991). Bien que cette catabolite a longtemps considéré comme un déchet toxique, en particulier pour le système nerveux central; ce pigment jaune a également montré une forte activité

antioxydante (Stocker et al., 1987). Cette propriété précieuse a soutenu une hypothèse émergente que la hausse modérée des taux de bilirubine de plasma peut être aussi une réponse physiologique au stress oxydatif (Kapitulnik, 2004). Le traitement des rats diabétiques avec la molécule ESP1b a diminué les activités des enzymes plasmatiques et les concentrations de la bilirubine totale et directe à des valeurs moyennes proches de la normale (**Tab. 11**). Cela peut être principalement dû à l'amélioration de la sécrétion d'insuline, ce qui réduit, par conséquence, le stress oxydant, la mobilisation des AA et l'hyperphagie des animaux diabétiques.

Plusieurs études antérieures ont démontré que le diabète sucré humain, qu'il s'agisse du type 1 ou du type 2, présente un état de stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre entre pro-oxydants et anti-oxydants au profit des premiers (Bonfont-Rousselot et al., 2004), ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec une perturbation des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Sergent et al., 2001). L'hyperglycémie chronique au cours du diabète sucré est considérée comme le principal facteur contribuant à l'augmentation de la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Cheng et al., 2013). Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la genèse de ce stress oxydant : auto-oxydation du glucose, surproduction de radicaux superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale et par activation de la NAD(P)H oxydase vasculaire, voie des polyols, et formation de produits de glycation avancée (Bonfont-Rousselot et al., 2004).

Les systèmes de défense antioxydants endogènes incluent des systèmes enzymatiques, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (Gpx), et des systèmes non-enzymatiques, comme le glutathion réduit (GSH), l'acide urique, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite) (NADPH), le coenzyme Q,

l'albumine et la bilirubine (Hokayem et al., 2012). Par rapport aux autres cellules de l'organisme, les cellules β pancréatiques sont plus sensibles au stress oxydant pour trois raisons : i) une activité métabolique élevée ; ii) une activité anti-oxydante faiblement exprimée (faible concentration en SOD, CAT et GPx); iii) associées, à un faible contenu en GSH. Cette fragilité des cellules β au stress oxydant est suggérée d'être impliquée, par effet d'apoptose dans : l'apparition des troubles de l'insulinosécrétion et de la sensibilité à l'insuline qui caractérisent le pré-diabète, la progression du DT2 et la destruction des cellules β chez les modèles animaux de diabète expérimental sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'alloxane et la streptozotocine (Lenzen, 2008).

Nos résultats (**Tab. 12 ; Fig. 57-60**) montrent des diminutions notables de la teneur hépatique en GSH et des activités enzymatiques antioxydantes (GPx, GST, CAT) du foie associées à des augmentations claires de la teneur hépatique en Malondialdéhyde (MDA) chez les groupes d'animaux diabétiques traités et non traités en comparant aux rats témoins normaux.

Le glutathion (L-**-*glutamyl-L-cystéinyglycine) est un tripeptide synthétisé par toutes les cellules de l'organisme. Il existe sous deux formes chimiques, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH) qui représente 98 à 99 % du glutathion total. Le GSH participe de façon prépondérante aux mécanismes de défense cellulaire. La fonction sulfhydryle (-SH) est à l'origine de la grande réactivité et du puissant pouvoir réducteur de ce mercaptan. Le GSH permet la détoxification de certains xénobiotiques électrophiles, l'inactivation des composés oxygénés réactifs (peroxydes, radicaux libres, etc.). De plus, il est impliqué dans le métabolisme de nombreux substrats endogènes comme les acides désoxyribonucléiques, les protéines, les prostaglandines, les leucotriènes, etc (Boutolleau et al., 1997). La diminution significative ($P < 0,01$) de la teneur hépatique en glutathion réduit (GSH) chez les animaux du lot diabétique non traité (**Tab. 12 et Fig. 57**) pourrait être le résultat d'une utilisation accrue

par les cellules hépatiques pour les défendre contre le stress oxydatif ou d'une diminution de la synthèse à cause de l'inhibition de la glutathion synthétase par le diabète (Furfaro et al., 2012).

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes à sélénium de structures très proches, ayant la propriété de catalyser la réduction des hydroperoxydes par l'oxydation du GSH. Elles constituent la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes (peroxyde d'hydrogène H₂O₂, hydroperoxydes organiques ROOH) dans la plupart des cellules et des compartiments subcellulaires (Richard et al., 1997). Dans notre étude, l'activité enzymatique de la GPx hépatique (**Tab. 12 et Fig. 58**) a été significativement ($P < 0,01$) diminuée chez les rats diabétiques non traités. Cela, peut être dû à l'inactivation et la glycation d'enzymes induite par les radicaux libres (Zhang et Tan, 2000). Néanmoins, l'activité réduite de la GPx pourrait également être expliquée par la faible teneur en glutathion observé dans l'état diabétique, parce que le glutathion est un substrat et cofacteur de cette enzyme (Ramachandran et Saravanan, 2013).

Les GST se sont les enzymes, qui catalysent la réaction de conjugaison du GSH à différents substrats électrophiles nocifs pour la cellule. Par conséquent, elles constituent une importante ligne de défense protégeant les composants cellulaires (ADN, lipides et protéines) des effets délétères induits par ces substrats électrophiles. Les GST jouent aussi un rôle important dans le transport de composés endogènes (les hormones, les stéroïdes, l'acide urique et la bilirubine) et dans le métabolisme des éicosanoïdes (synthèse des prostaglandines E₂,F_{2a},D₂ et des leucotriènes C₄,E₄) (Habdous et al., 2004). La présente étude a révélé une diminution modérée de l'activité enzymatique de la GST hépatique chez le lot diabétique non traité (**Tab. 12 et Fig. 59**). Cela, peut être dû à l'augmentation des métabolites de l'oxygène (Schettler et al., 1994), à la glycation non enzymatique des enzymes antioxydantes (Kennedy

et Baynes, 1984) ou, à l'épuisement des contenus GSH, car ce dernier est nécessaire en tant que substrat pour l'activité de la GST (Al-Wabel et al., 2008).

Les catalases (CAT) sont des antioxydants enzymatiques largement distribués dans tous les tissus de l'organisme avec une activité importante dans les globules rouges et le foie (Maritim et al., 2003). La diminution de l'activité enzymatique de CAT entraîne divers effets délétères dus à l'accumulation de radicaux superoxydes et hydroxyles (Ramachandran et Saravanan, 2013). Dans la présente étude, une activité réduite de CAT hépatiques a été observé chez tous les lots diabétiques (Tab. 12 et Fig. 60). La baisse notée de l'activité de CAT chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine, peut être la conséquence d'une production incontrôlée de peroxyde d'hydrogène en raison de l'auto-oxydation du glucose, de la glycation de protéines et de l'oxydation de lipides (Rajasekaran et al., 2005).

L'oxydation non enzymatique des lipides (*via* les ERO), appelée « peroxydation lipidique », est un processus complexe allant de la formation des produits primaires comme les hydroperoxydes jusqu'à celle des produits secondaires terminaux comme le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et les isoprostanes (Michel et al., 2008). Nos données (Tab. 12 et Fig. 61) montrent des augmentations claires de la teneur hépatique en MDA chez les groupes d'animaux diabétiques traités et non traités. Ceci peut être expliqué par une peroxydation lipidique accrue au cours du diabète expérimental.

L'administration orale de la molécule ESP1b aux rat diabétiques a rétabli la teneur hépatique en GSH et les activités enzymatiques de GPx et GST à des valeurs proches des niveaux normaux, alors qu'elle a amélioré modérément l'activité de CAT et la teneur hépatique en MDA (Tab. 12 ; Fig. 57-61). L'amélioration des paramètres du stress oxydant tissulaire pourrait être due à la génération diminuée des ERO, qui est en corrélation avec l'état glycémique des animaux.

La survenance d'une anémie au cours du diabète sucré a été suggérée d'être, principalement, en raison de l'augmentation de la glycation non enzymatique de protéines membranaires de globules rouges (Kennedy et Baynes, 1984 ; Koga et al., 1998 ; Oyedemi et al., 2011). L'oxydation de ces protéines et l'hyperglycémie persistante au cours du diabète entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique membranaire qui conduisent à l'hémolyse de globules rouges (Arun et Ramesh, 2002). Les principales conséquences pathologiques de la peroxydation lipidique membranaire induite par l'agression de radicaux libres ; comprennent une augmentation de la rigidité de la membrane, une diminution de la déformabilité cellulaire, la survie réduite des érythrocytes et la fluidité diminuée de lipides (Kolanjiappan et al., 2005). Les résultats obtenus (Tab. 13; Fig. 62 à 68) au cours de la présente étude, révèlent que le diabète expérimental induit par la streptozotocine a diminué remarquablement le nombre de globules rouges (GR), la concentration d'hémoglobine total (Hb), le taux d'hématocrite (Ht), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et le nombre de plaquette (Plt). Le traitement des rats diabétiques par la molécule ESP1b a renversé ces perturbations hématologiques. Ceci peut être attribué à la diminution de la glycation non enzymatique de protéines, la peroxydation lipidique et le niveau de glucose plasmatique qui conduit à une susceptibilité réduite de globules rouges à l'hémolyse.

Chez les rongeurs et les grands animaux (chiens et singes rhésus), la streptozotocine a été signalé à affecter le système immunitaire, étant associée à la suppression de la moelle osseuse, la nécrose des organes lymphoïdes, les troubles de la numération leucocytaire (leucopénie), et l'épuisement de lymphocytes dans le sang et la rate, les mécanismes de ces altérations immunologiques ne sont pas entièrement élucidés (Nichols et al., 1979 ; Levine et al., 1980 ; Muller et al., 2011). En outre, l'état hyperglycémique au cours du diabète a été suggérée pour avoir par lui-même a un effet immunosuppresseur (Nagaraju et al., 2014).

L'injection intrapéritonéale de la streptozotocine à nos rats expérimentaux a réduit significativement le nombre de globules blancs (GB), en diminuant les cinq populations leucocytaires (neutrophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles et basophiles) (**Tab. 14; Fig. 69 à 74**). Le nombre de globules blancs et la formule leucocytaire des rats diabétiques ont été considérablement restaurés après l'administration la molécule ESP1b durant les 28 jours. Ceci peut être dû principalement à l'amélioration de l'état glycémique, et n'est pas dû à un effet immuno-modulateur protecteur de la molécule, étant donné que les rats normaux traités par la molécule ESP1b ont augmenté légèrement le nombre de globules blancs et la concentration de la protéine inflammatoire CRP par rapport au lot témoin sain.

Conclusion et perspectives

Les résultats du suivi glycémique pendant la première étude expérimentale montrent que les trois molécules nouvellement synthétisés ; **BBS1a**, [*N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide] ; **ESP1b**, [Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate] et **ESP1d**, [Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate] ont diminué remarquablement la glycémie de souris Swiss diabétiques, tandis que la molécule **BPS1b**, [*N, N'*- Bis (propyl) sulfamide] a accru significativement l'état hyperglycémique de ces animaux. La molécule qui a entraîné la diminution la plus notable de la glycémie chez les souris diabétiques était la molécule ESP1b.

La deuxième étude expérimentale a confirmé l'activité antidiabétique de la molécule ESP1b chez le rat Wistar. En effet, cette molécule a atténué la perte de poids corporel, entraîné une nette diminution, d'une manière dose-dépendante, du taux de glucose sanguin, amélioré la concentration plasmatique d'insuline et en même temps diminué de façon remarquable les valeurs de l'hémoglobine glyquée, de lipoprotéines et les rapports athérogènes. En outre, l'ESP1b a considérablement restauré les fonctions rénale ainsi que hépatique. Les évaluations histopathologiques des sections de tissus pancréatique, hépatique et du cortex rénal ont confirmé les résultats biochimiques précédents. L'équilibre métabolique résultant a abaissé l'état du stress oxydant, ce qui a été accompagné par une amélioration des paramètres hématologiques et immunologiques.

L'activité antidiabétique de la molécule ESP1b pourrait avoir le même mode d'action de sulfonylurées (les sulfamides hypoglycémiantes), des médicaments importants pour la prise en charge du DT2, exerçant leur effet anti-hyperglycémiant *via* l'augmentation de l'insulino-sécrétion par les cellules bêta pancréatiques

Cette recherche reste préliminaire et peu indicatif sur le mode d'action réel de ce nouveau sulfamide. Par conséquent, la réalisation de recherches ultérieures *in vivo* sur d'autres modèles animaux présentant un état d'insulinorésistance, ou même *in vitro* sur des cellules β -pancréatiques sera d'une importance cruciale.

Références bibliographiques

- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro, in: *Methods in Enzymology*. pp. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P., Boyd, a E., González, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., Nelson, D. a, 1995. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423–6. doi:10.1126/science.7716547
- Ahmed, I., Adeghate, E., Sharma, A.K., Pallot, D.J., Singh, J., 1998. Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 40, 145–151. doi:10.1016/S0168-8227(98)00022-9
- Ahren, B., Schmitz, O., 2004. GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 36, 867–876. doi:10.1055/s-2004-826178
- Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W., Fu, P.C., 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470–475.
- Almdal, T.P., Vilstrup, H., 1988. Strict insulin therapy normalises organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 31, 114–118. doi:10.1007/BF00395558
- Almdal, T.P., Vilstrup, H., 1987. Effects of streptozotocin-induced diabetes and diet on nitrogen loss from organs and on the capacity of urea synthesis in rats. *Diabetologia* 30, 952–956. doi:10.1007/BF00295880
- Altan, N., Yiğit, Ş., Elmali, E., Malhatun, E., Rota, S., Kiliç, N., 1997. Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase in streptozotocin-induced diabetic rat muscle. *Gen. Pharmacol.* 28, 795–796. doi:10.1016/S0306-3623(96)00355-2
- Al-Wabel, N.A., Mousa, H.M., Omer, O.H., Abdel-Salam, A.M., 2008. Biological Evaluation of Aqueous Herbal Extracts and Stirred Yoghurt Filtrate Mixture Against Alloxan-Induced Oxidative Stress and Diabetes in Rats. *Int. J. Pharmacol.* 4, 135–139. doi:10.3923/ijp.2008.135.139
- American Diabetes Association, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1, S81–90. doi:10.2337/dc14-S081
- Anwar, M.M., Meki, A.-R.M.A., 2003. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 135, 539–547. doi:10.1016/S1095-6433(03)00114-4
- Arun, S., Ramesh, K., 2002. Improvement of insulin sensitivity by perindopril in spontaneously hypertensive and streptozotocin-diabetic rats. *Indian J. Pharmacol.* 34, 156–164.
- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E., Ashcroft, S.J., 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312, 446–8. doi:10.1038/312446a0
- Awaji, Y., Hashimoto, H., Matsui, Y., Kawaguchi, K., Okumura, K., Ito, T., Satake, T., 1990. Isoenzyme profiles of creatine kinase, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase in the diabetic heart: comparison with hereditary and catecholamine cardiomyopathies. *Cardiovasc. Res.* 24, 547–554.
- Bak, J.F., Schmitz, O., Sorensen, N.S., Pedersen, O., 1989. Postreceptor effects of sulfonylurea on skeletal muscle glycogen synthase activity in type II diabetic patients. *Diabetes* 38, 1343–1350.
- Bastides, F., 1998. Sulfamides et associations. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), AKOS Encycl. Prat. Médecine*, 1–5 [Article 5–0110].

- Bataille, D., 2002. Mécanismes moléculaires de l'insulinosécrétion. *Diabetes Metab.* 28, 7–13.
- Becker, B.F., 1993. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 615–631. doi:10.1016/0891-5849(93)90143-I
- Beckman Coulter, 2010. Analyseur d'hématologie COULTER® HmX avec passeur d'échantillons. Add. au Man. d'utilisation PN 177384B, 7–25.
- Bell, D.S.H., 2004. Practical considerations and guidelines for dosing sulfonylureas as monotherapy or combination therapy. *Clin. Ther.* doi:10.1016/j.clinthera.2004.10.014
- Bergmeyer, H., Horder, M., Rej, R., 1986a. Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 24, 497–510.
- Bergmeyer, H., Horder, M., Rej, R., 1986b. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 24, 481–495.
- Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., Wahlefeld, A.W., 1978. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* 24, 58–73.
- Bidel, S., Silventoinen, K., Hu, G., Lee, D.-H., Kaprio, J., Tuomilehto, J., 2008. Coffee consumption, serum gamma-glutamyltransferase and risk of type II diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62, 178–185. doi:10.1038/sj.ejcn.1602712
- Biolo, G., Wolfe, R.R., 1993. Insulin action on protein metabolism. *Baillière's Clin. Endocrinol. Metab.* 7, 989–1005.
- Blicklé, J., Brogard, J., 1998. Sulfamides hypoglycémiantes : nouvelles données pharmacologiques et implications pratiques. *Diabetes Metab.* 24, 276–280.
- Blicklé, J.F., 1999. Traitements oraux du diabète. *Endocrinologie-Nutrition* 1–14 [Article 10–366–R–20].
- Blicklé, J.-F., 2011. Traitement du diabète en dehors de l'insuline. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Endocrinol. Nutr.* 1–20 [Article 10–366–R–20].
- Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J.-L., Théron, P., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J., 2004. Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann. Pharm. Françaises* 62, 147–157. doi:10.1016/S0003-4509(04)94297-6
- Boutolleau, D., Lefèvre, G., Étienne, J., 1997. Dosage du glutathion avec la méthode GSH-400 : intérêt de la spectrophotométrie dérivée. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 55, 592–596.
- Boyden, A., Bolton, E., Gemeroy, D., 1947. Precipitin testing with special reference to the photoelectric measurement of turbidity. *J. Immunol.* 57, 211–27.
- Brackett, C.C., 2007. Sulfonamide allergy and cross-reactivity. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7, 41–48. doi:10.1007/s11882-007-0029-8
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Brown, H., Sanger, F., Kitai, R., 1955. The Structure of Pig and Sheep Insulins. *Biochem. J.* 60, 556–565.
- Buse, J.B., Henry, R.R., Han, J., Kim, D.D., Fineman, M.S., Baron, A.D., Exenatide-113 Clinical Study Group, 2004. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 2628–35.
- Butler, A.R., 1975. The Jaffé reaction. Identification of the coloured species. *Clin. Chim. Acta.* 59, 227–32. doi:10.1016/0009-8981(75)90033-9
- Chandramohan, G., Ignacimuthu, S., Pugalendi, K.V., 2008. A novel compound from *Casearia esculenta* (Roxb.) root and its effect on carbohydrate metabolism in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 590, 437–43. doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.082
- Charbonnel, B., 2008. Place des inhibiteurs DPP-4 dans la stratégie thérapeutique du diabète de type 2. *Médecine des Mal. Métaboliques* 1, S53–S56.
- Cheloufi, H., Berredjem, M., Boufas, W., Bouchareb, F., Djahoudi, A., Aouf, N., 2014. Efficient Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Novel N -Acylsulfonamides and Sulfonylureas. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* 189, 1396–1404. doi:10.1080/10426507.2013.865125
- Cheng, A.Y.Y., Fantus, I.G., 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ* 172, 213–26. doi:10.1503/cmaj.1031414
- Cheng, D., Liang, B., Li, Y., 2013. Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Res. Int.* 2013, 162724. doi:10.1155/2013/162724
- Chua, B., Shrago, E., 1978. Effects of experimental diabetes and food intake on rat intestine and serum alkaline phosphatase. *J. Nutr.* 108, 196–202.
- Comroe, J.H., 1976. Retrospectroscope: Missed opportunities. *Am. Rev. Respir. Dis.* 114, 1167–74. doi:10.1164/arrd.1976.114.6.1167
- Cottet, J., Etienne, J., Plas, M., 1965. Dosages des lipides sériques par la méthode sulfo-phospho-vanillique (1) de E. Chabrol et R. Charonnat. *Bull. l'Académie Natl. médecine.* 149, 331–338.
- Dabrowski, M., Wahl, P., Holmes, W.E., Ashcroft, F.M., 2001. Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* 44, 747–756. doi:10.1007/s001250051684
- DeFronzo, R.A., Ratner, R.E., Han, J., Kim, D.D., Fineman, M.S., Baron, A.D., 2005. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28, 1092–100. doi:doi: 10.2337/diacare.28.5.1092
- Del Prato, S., Pulizzi, N., 2006. The place of sulfonylureas in the therapy for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 55, S20–S27. doi:10.1016/j.metabol.2006.02.003
- Deruelle, P., Clay, J., Cazaubiel, M., Subtil, D., Fontaine, P., Vambergue, A., 2009. Diabète gestationnel. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Gynécologie/Obstétrique 5–042–C–20.
- Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.* 10, 182–192.
- Dibbern, D. a, Montanaro, A., 2008. Allergies to sulfonamide antibiotics and sulfur-containing drugs. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 100, 91–101. doi:10.1016/S1081-1206(10)60415-2

- Domagk, G., 1957. Domagk : Twenty-Five Years of Sulfonamide Therapy. *Ann. New York Acad. Sci.* 69, 380–384.
- Doumas, B.T., Watson, W.A., Biggs, H.G., 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with Bromocresol Green. *Clin. Chim. Acta* 31, 87–96.
- Dubois-Laforgue, D., 2007. Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Endocrinol.* 1–18 [Article 10–366–C–10]. doi:10.1016/S1155-1941(07)46585-4
- Dunn, F.L., 1990. Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diabetes. Metab. Rev.* 6, 47–61.
- Dunn, J.S., Kirkpatrick, J., McLetchie, N.G.B., Telfer, S. V., 1943. Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. *J. Pathol. Bacteriol.* 55, 245–257. doi:10.1002/path.1700550302
- Dussoix, P., Vaxillaire, M., Iynedjian, P.B., Tiercy, J.M., Ruiz, J., Spinass, G.A., Berger, W., Zahnd, G., Froguel, P., Philippe, J., 1997. Diagnostic heterogeneity of diabetes in lean young adults: Classification based on immunological and genetic parameters. *Diabetes* 46, 622–631.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., El-Naga, N.I.A., 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 43, 57–63. doi:10.1016/j.fct.2004.08.012
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., Lenzen, S., 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43, 1528–1533. doi:10.1007/s001250051564
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G., 1992. The Role of Lipid-Peroxidation and Antioxidants in Oxidative Modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 341–390. doi:10.1016/0891-5849(92)90181-f
- Ewis, S.A., Abdel-Rahman, M.S., 1995. Effect of metformin on glutathione and magnesium in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Appl Toxicol* 15, 387–390.
- Fédération Internationale du Diabète, 2015. Atlas du DIABETE de la FID, Septième. ed. Fédération Internationale du Diabète, Karakas Print. ISBN: 978-2-930229-81-2
- Felig, P., Marliss, E., Ohman, J.L., Cahill, G.F., 1970. Plasma Amino Acid Levels in Diabetic Ketoacidosis. *Diabetes* 19, 727–729. doi:10.2337/diab.19.10.727
- Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. [12] Assays of glutathione peroxidase, in: *Health* (San Francisco). pp. 114–120. doi:10.1016/S0076-6879(84)05015-1
- Fossati, P., Prencipe, L., 1982. Serum Triglycerides Determined Colorimetrically with an Enzyme That Produces Hydrogen Peroxide 28, 2077–2080.
- Fossati, P., Prencipe, L., Berti, G., 1980. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin. Chem.* 26, 227–31.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502. doi:10.1177/107424840501000106

- 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. *Int. J. Mol. Med.* 29, 899–905. doi:10.3892/ijmm.2012.915
- Gaborit, B., Andreelli, F., 2008. Mécanismes de l'action antidiabétique des thiazolidinediones. *Nutr. Clin. Metab.* 22, 84–87. doi:10.1016/j.nupar.2007.12.001
- Girard, J., 2001. Mécanisme d'action des thiazolidinediones. *Diabetes Metab (Paris)* 27, 271–278. doi:DM-04-2001-27-2-1262-3636-101019-ART14
- Green, J.B., Feinglos, M.N., 2006. Are sulfonylureas passé? *Curr. Diab. Rep.* 6, 373–377. doi:10.1007/s11892-006-0008-9
- Gribble, F.M., Reimann, F., 2003. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* 46, 875–891. doi:10.1007/s00125-003-1143-3
- Grove, T.H., 1979. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin. Chem.* 25, 560–564.
- Guillausseau, P., 2003. Diabète sucré de type 1 et 2 de l' enfant et de l' adulte 2e partie : Diabète sucré de type 2. *Rev Prat* 53, 1462–1471.
- Guillausseau, P.-J., Laloi-Michelin, M., 2003. Physiopathologie du diabète de type 2. *La Rev. Médecine Interne* 24, 730–737. doi:10.1016/S0248-8663(03)00244-3
- Guillausseau, P.-J., Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Médeau, V., Kevorkian, J.-P., 2008. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 34, S43–S48. doi:10.1016/S1262-3636(08)73394-9
- Habdous, G., siest, B., herbeth, S., visvikis, 2004. Polymorphismes des glutathion S-transférases bilan des études épidémiologiques 62, 15–24.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–9.
- Hagopian, K., Ramsey, J.J., Weindruch, R., 2003. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Exp. Gerontol.* 38, 267–278. doi:10.1016/S0531-5565(02)00202-4
- Halbron, M., Jacqueminet, S., Sachon, C., Bosquet, F., Hartemann-Heurtier, A., Grimaldi, A., 2007. Insulin therapy for type 2 diabetes: premixed or basal-prandial? *Diabetes Metab.* 33, 316–320. doi:10.1016/j.diabet.2007.01.005
- Halimi, S., Debaty, I., Villaret, L., Muller, M., 2008. Les nouveaux traitements du diabète de type 2 : quelle place pour les incrétines et le rimonabant par rapport aux précédents ? *La Rev. Médecine Interne* 29, 881–890. doi:10.1016/j.revmed.2008.05.011
- Harini, R., Ezhumalai, M., Pugalendi, K.V., 2012. Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, on streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 676, 89–94. doi:10.1016/j.ejphar.2011.11.051
- Hassid, W.Z., Abraham, S., 1957. [7] Chemical procedures for analysis of polysaccharides, in: *Methods in Enzymology*. pp. 34–50. doi:10.1016/S0076-6879(57)03345-5
- Helsing, K., 1974. The Effects of Different Polymers for Enhancement of the Antigen—Antibody Reaction as Measured with Nephelometry, in: *Protides of the Biological Fluids*. Elsevier, pp. 579–583. doi:10.1016/B978-0-08-017822-6.50099-X

- Hemstreet, B. a, Page, R.L., 2006. Sulfonamide Allergies and Outcomes Related to Use of Potentially Cross-Reactive Drugs in Hospitalized Patients. *Pharmacotherapy* 26, 551–557. doi:10.1592/phco.26.4.551
- Henquin, J., 1992. The fiftieth anniversary of hypoglycaemic sulphonamides. How did the mother compound work? *Diabetologia* 35, 907–912.
- Henry, R.J., Chiamori, N., Golub, O.J., Berkman, S., 1960. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *Am. J. Clin. Pathol.* 34, 381–98.
- Herr, R.R., Eble, T.E., Bergy, M.E., Jahnke, H.K., 1960. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot. Annu.* 7, 236–240.
- Hessainia, S., Bouchareb, F., Cheloufi, H., Berredjem, M., Berredjem, H., Becheker, I., Aouf, N., 2013. Efficient synthesis and antibacterial activity of novel cyclic sulfamides. *rasayan j Chem* 6, 175–182.
- Hokayem, M., Bisbal, C., Lambert, K., Avignon, A., 2012. Quelle place pour les antioxydants dans la prévention du diabète de type 2? *Médecine des Mal. Métaboliques* 6, 327–331.
- Hough, S., Avioli, L. V, Teitelbaum, S.L., Fallon, M.D., 1981. Alkaline phosphatase activity in chronic streptozotocin-induced insulin deficiency in the rat: Effect of insulin replacement. *Metabolism* 30, 1190–1194. doi:10.1016/0026-0495(81)90040-8
- Houlot, R., 1984. *Techniques d'histologie et de cytologie*. Edition Maloine, Paris.
- Jaffé, M., 1886. Über den niederschlag welchen pikrinsäure in normalen harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z. Physiol. Chem.* 10, 391–400.
- Janbon, M., Chaptal, J., Vedel, A., Schaap, J., 1942. Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamidothiazol (le VK 57 ou 2254 RP). *Montpellier med* 441, 21–22.
- Jarrott, B., 2004. Contributions to drug design and development. *Chem. Aust.* 1, 14–17.
- Johnson, R.J., Kang, D.H., Feig, D., Kivlighn, S., Kanellis, J., Watanabe, S., Tuttle, K.R., Rodriguez-Iturbe, B., Herrera-Acosta, J., Mazzali, M., 2003. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 41, 1183–1190. doi:10.1161/01.HYP.0000069700.62727.C5
- Jordá, A., Gomez, M., Cabo, J., Grisolia, S., 1982. Effect of streptozotocin diabetes on some urea cycle enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 37–43. doi:10.1016/0006-291X(82)92054-X
- Kaempffert, W., 1950. News of Dr. Paul Gelmo, Discoverer of Sulfanilamide. *J. Hist. Med. allied ...* V, 213–214.
- Kahn, S.E., Haffner, S.M., Heise, M. a, Herman, W.H., Holman, R.R., Jones, N.P., Kravitz, B.G., Lachin, J.M., O'Neill, M.C., Zinman, B., Viberti, G., 2006. Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355, 2427–2443. doi:10.1056/NEJMoa066224
- Kaku, K., Inoue, Y., Kaneko, T., 1995. Extrapancratic effects of sulfonylurea drugs. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28, S105–S108. doi:10.1016/0168-8227(95)01078-R
- Kapitulnik, J., 2004. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol. Pharmacol.* 66, 773–779. doi:10.1124/mol.104.002832

- Karaca, M., Magnan, C., 2013. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinol. - Nutr.* 10, 1–17 [Article 10–362–E–10]. doi:10.1016/S1155-1941(13)58044-9
- Karmen, A., 1955. A note on the spectrometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.* 34, 131–3. doi:10.1172/JCI103055
- Kennedy, L., Baynes, J.W., 1984. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* 26, 93–98. doi:10.1007/BF00281113
- King, A., 2012. The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Kirpichnikov, D., Mcfarlane, S.I., Sowers, J.R., 2002. Metformin: An Update. *Ann. Intern. Med.* 137, 25–33.
- Klein, S., Sheard, N.F., Pi-Sunyer, X., Daly, A., Wylie-Rosett, J., Kulkarni, K., Clark, N.G., Association, A.D., Obesity, N.A.A. for the S. of, Nutrition, A.S. for C., 2004. Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies. A statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American So. *Am J Clin Nutr* 80, 257–263.
- Koga, T., Moro, K., Terao, J., 1998. Protective effect of a vitamin E analog, phosphatidylchromanol, against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Lipids* 33, 589–595. doi:10.1007/s11745-998-0244-4
- Kolanjiappan, K., Manoharan, S., Kayalvizhi, M., 2002. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin. Chim. Acta* 326, 143–149. doi:10.1016/S0009-8981(02)00300-5
- Krentz, A., Bailey, C., 2005. Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65, 385–411.
- Krentz, A.J., 2003. Sulfonylureas in the prevention of vascular complications: from UKPDS to the ADVANCE study. *Int. Congr. Ser.* 1253, 261–277. doi:10.1016/S0531-5131(02)01278-5
- Laakso, M., 2009. Lipid disorders in type 2 diabetes. *Endocrinol. y Nutr.* 56, 43–45. doi:10.1016/S1575-0922(09)73517-X
- Latha, R.C.R., Daisy, P., 2011. Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 189, 112–8. doi:10.1016/j.cbi.2010.11.005
- Lebovitz, H.E., 2004. Oral antidiabetic agents: 2004. *Med. Clin. North Am.* 88, 847–863. doi:10.1016/j.mcna.2004.05.002
- Ledieu, D., 2003. Hémogramme rouge. *Encycl. Vétérinaire (Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Biol. Clin.* 0050, 10p.
- Lee, D.-H., Ha, M.-H., Kim, J.-H., Christiani, D.C., Gross, M.D., Steffes, M., Blomhoff, R., Jacobs, D.R., 2003. Gamma-glutamyltransferase and diabetes—a 4 year follow-up study. *Diabetologia* 46, 359–364. doi:10.1007/s00125-003-1036-5
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* doi:10.1007/s00125-007-0886-7

- Lenzen, S., Panten, U., 1988. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 31, 337–342. doi:10.1007/BF02341500
- Levine, B.S., Henry, M.C., Port, C.D., Rosen, E., 1980. Toxicologic Evaluation of Streptozotocin (NSC 85998) in Mice, Dogs and Monkeys. *Drug Chem. Toxicol.* 3, 201–212. doi:10.3109/01480548009108283
- Loubatières, A., 1944. Analyse du mécanisme de l'action hypoglycémiante du p- aminobenzène-sulfamido- isopropylthiodiazol (2254 RP). *CR Soc Biol* 138, 766–767.
- Loubatières-Mariani, M.-M., 2007. La découverte des sulfamides hypoglycémiants. *J. Soc. Biol.* 201, 121–125. doi:10.1051/jbio:2007014
- Madianov, I. V, Balabolkin, M.I., Markov, D.S., Markova, T.N., 2000. Main causes of hyperuricemia in diabetes mellitus. *Ter. Arkh.* 72, 55–58.
- Magnan, C., Ktorza, A., 2005. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinol.* 2, 241–264. doi:10.1016/j.emcend.2005.07.001
- Malloy, H.T., Evelyn, K.A., 1937. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 119, 481–490.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 2003. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* 14, 288–294. doi:10.1016/S0955-2863(03)00036-6
- Mason, J.E., Starke, R.D., Van Kirk, J.E., 2010. Gamma-glutamyl transferase: A novel cardiovascular risk biomarker. *Prev. Cardiol.* 13, 36–41. doi:10.1111/j.1751-7141.2009.00054.x
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., Théron, P., 2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: Aspects analytiques. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. doi:10.1684/abc.2008.0283
- Miser, W.F., 2007. The Management of Type 2 Diabetes Mellitus FOCUS on Quality. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* 34, 1–38. doi:10.1016/j.pop.2007.01.001
- Mogensen, C.E., 1984. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N. Engl. J. Med.* 310, 356–360.
- Monnier, L., Colette, C., 2014. Définitions et classifications des états diabétiques, in: *Diabétologie*. Elsevier, pp. 33–44. doi:10.1016/B978-2-294-73954-5.00003-2
- Monnier, L., Lapinski, H., Colette, C., 2003. Contributions of Fasting and Postprandial Plasma Glucose Increments to the Overall Diurnal Hyperglycemia of Type 2 Diabetic Patients: Variations with increasing levels of HbA1c. *Diabetes Care* 26, 881–885. doi:10.2337/diacare.26.3.881
- Montanaro, A., 1998. SULFONAMIDE ALLERGY. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 18, 843–850. doi:10.1016/S0889-8561(05)70043-6
- Muller, Y.D., Golshayan, D., Ehrichiou, D., Wyss, J.C., Giovannoni, L., Meier, R., Serre-Beinier, V., Yung, G.P., Morel, P., Bühler, L.H., Seebach, J.D., 2011. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. *Diabetes* 60, 2331–2340. doi:10.2337/db11-0159
- Mutalik, S., Chetana, M., Sulochana, B., Devi, P.U., Udupa, N., 2005. Effect of Dianex, a herbal formulation on experimentally induced diabetes mellitus. *Phyther. Res.* 19, 409–415. doi:10.1002/ptr.1570

- Nagashima, K., Takahashi, A., Ikeda, H., Hamasaki, A., Kuwamura, N., Yamada, Y., Seino, Y., 2004. Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 66, S75–S78. doi:10.1016/j.diabres.2003.12.011
- Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes Association, European Association for Study of Diabetes, 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32, 193–203. doi:10.2337/dc08-9025
- Navarro, M.C., Montilla, M.P., Martín, A., Jiménez, J., Utrilla, M.P., 1993. Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus*. *Planta Med* 59, 312–314.
- Nazaroglu, N.K., Sepici-Dincel, A., Altan, N., 2009. The effects of sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in the brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *J. Diabetes Complications* 23, 209–213. doi:10.1016/j.jdiacomp.2007.09.001
- Nichols, W.K., Spellman, J.B., Vann, L.L., Daynes, R.A., 1979. Immune responses of diabetic animals Direct Immunosuppressant Effects of Streptozotocin in Mice. *Diabetologia* 16, 51–57. doi:10.1007/BF00423151
- Oyedemi, S.O., Bradley, G., Afolayan, A.J., 2011. Beneficial effect of aqueous Stem Bark Extracts of *Strychnos henningsii* Gilg in Streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic wistar rats. *Int. J. Pharmacol.* 7, 773–781. doi:10.3923/ijp.2011.773.781
- Pillon, F., Tan, K., Jouty, P., Frullani, Y., 2014. Le traitement médicamenteux du diabète de type 2. *Actual. Pharm.* 53, 23–28. doi:10.1016/j.actpha.2014.10.005
- Planella, T., Cortés, M., Martínez-Brú, C., González-Sastre, F., Ordóñez-Llanos, J., 1997. Calculation of LDL-cholesterol by using apolipoprotein B for classification of nonchylomicronemic dyslipemia. *Clin. Chem.* 43, 808–15.
- Poitout, V., Robertson, R.P., 2008. Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction. *Endocr. Rev.* 29, 351–366. doi:10.1210/er.2007-0023
- Putnam, W.S., Andersen, D.K., Jones, R.S., Lebovitz, H.E., 1981. Selective potentiation of insulin-mediated glucose disposal in normal dogs by the sulfonylurea glipizide. *J. Clin. Invest.* 67, 1016–1023.
- Radermecker, R., 2005a. Le risque hypoglycémique : implications Thérapeutiques. *Rev Med Liege* 60, 461–465.
- Radermecker, R., 2005b. Place des insulinosécrétagues dans le traitement du diabète de type 2. *Rev Med Liège* 60, 402–408.
- Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., Subramanian, S., 2005. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacol. Reports* 57, 90–96. doi:10.1089/109662004322984725
- Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V., 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917), *Cancer Chemotherapy Reports*.
- Ramachandran, B., Sekar, D.S., Kandaswamy, M., Narayanan, V., Subramanian, S., 2004. Hypoglycemic Effect of Macrocyclic Binuclear Oxovanadium (IV) Complex on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Exp. Diabetes Res.* 5, 137–142. doi:10.1080/15438600490277842

- Ramachandran, V., Saravanan, R., 2013. Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Funct. Foods* 5, 1077–1087. doi:10.1016/j.jff.2013.03.003
- Riddle, M., Frias, J., Zhang, B., Maier, H., Brown, C., Lutz, K., Kolterman, O., 2007. Pramlintide improved glycemic control and reduced weight in patients with type 2 diabetes using basal insulin. *Diabetes Care* 30, 2794–9. doi:10.2337/dc07-0589
- Salman, S., Salman, F., Satman, I., Yilmaz, Y., Ozer, E., Sengül, a, Demirel, H.O., Karşıdağ, K., Dinççağ, N., Yilmaz, M.T., 2001. Comparison of acarbose and gliclazide as first-line agents in patients with type 2 diabetes. *Curr. Med. Res. Opin.* 16, 296–306. doi:10.1185/030079901750120231
- Saravanan, G., Ponmurugan, P., 2011. Ameliorative potential of S-allyl cysteine on oxidative stress in STZ induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 189, 100–6. doi:10.1016/j.cbi.2010.10.001
- Sattiraju, S., Reyes, S., Kane, G.C., Terzic, A., 2008. K(ATP) channel pharmacogenomics: from bench to bedside. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 354–7. doi:10.1038/sj.cpt.6100378
- Scheen, A.-J., 2015. Antidiabétiques oraux dans le traitement du diabète de type 2 : perspectives historique et médico-économique. *Médecine des Mal. Métaboliques* 9, 186–197. doi:10.1016/S1957-2557(15)30042-0
- Scheen, A.-J., Paquot, N., 2009. Quelle est la nouvelle donne pour soigner les patients diabétiques de type 2 ? *Médecine Mal. Métaboliques* 3, 141–146. doi:10.1016/S1957-2557(09)71625-6
- Schettler, V., Wieland, E., Verwiebe, R., Schuff-Werner, P., Scheler, F., Oellerich, M., 1994. Plasma lipids are not oxidized during hemodialysis. *Nephron* 67, 42–47.
- Schmitz, O., Brock, B., Rungby, J., 2004. Amylin Agonists: A Novel Approach in the Treatment of Diabetes. *Diabetes* 53, S233–S238. doi:10.2337/diabetes.53.suppl_3.S233
- Schwartz, M., 2008. The Institut Pasteur: 120years of research in microbiology. *Res. Microbiol.* 159, 5–14. doi:10.1016/j.resmic.2007.11.009
- Sen, S., Kar, M., Roy, A., Chakraborti, A.S., 2005. Effect of nonenzymatic glycation on functional and structural properties of hemoglobin. *Biophys. Chem.* 113, 289–298. doi:10.1016/j.bpc.2004.05.005
- Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J., 2001. Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 49, 689–695. doi:10.1016/S0369-8114(01)00244-9
- Sigal, R.J., Kenny, G.P., Wasserman, D.H., Castaneda-Sceppa, C., White, R.D., 2006. Physical activity/exercise and type 2 diabetes: A consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 29, 1433–1438. doi:10.2337/dc06-9910
- Siliart, B., Rochel, D., Jaillardon, L., 2014. Pancréas endocrine (méthodes d'exploration). *EMC - Vétérinaire* 11, 1–13 [Article BI 1200]. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1283-0828(13)53288-1
- Siluk, D., Kaliszan, R., Haber, P., Petruszewicz, J., Brzozowski, Z., Sut, G., 2002. Antiaggregatory activity of hypoglycaemic sulphonylureas. *Diabetologia* 45, 1034–1037. doi:10.1007/s00125-002-0855-0
- Silverberg, A.B., Ligaray, K.P.L., 2008. Oral Diabetic Medications and the Geriatric Patient. *Clin. Geriatr. Med.* 24, 541–549. doi:10.1016/j.cger.2008.03.012
- Slatore, C.G., Tilles, S. a, 2004. Sulfonamide hypersensitivity. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 24, 477–490. doi:10.1016/j.iac.2004.03.011

- Smith, D.A., Jones, R.M., 2008. The sulfonamide group as a structural alert: A distorted story? *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11, 72–9.
- Sola, A., Larger, E., M'Bemba, J., Elgrably, F., Slama, G., 2006. Les nouvelles insulines: intérêts et inconvénients. *Réanimation* 15, 454–460. doi:10.1016/j.reaurg.2006.09.009
- Srinivasan, K., Ramarao, P., 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J. Med. Res.* 125, 451–72.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, a F., Glazer, a N., Ames, B.N., 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043–1046. doi:10.1126/science.3029864
- Strom, B.L., Schinnar, R., Apter, A.J., Margolis, D.J., Lautenbach, E., Hennessy, S., Bilker, W.B., Pettitt, D., 2003. Absence of Cross-Reactivity between Sulfonamide Antibiotics and Sulfonamide Nonantibiotics. *N. Engl. J. Med.* 349, 1628–1635. doi:10.1056/NEJMoa022963
- Supuran, C.T., Casini, A., Scozzafava, A., 2003. Protease inhibitors of the sulfonamide type: Anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Med. Res. Rev.* 23, 535–558. doi:10.1002/med.10047
- Szasz, G., 1969. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.* 15, 124–136.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–46.
- Takasu, N., Komiya, I., Asawa, T., Nagasawa, Y., Yamada, T., 1991. Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 40, 1141–1145. doi:10.2337/diabetes.40.9.1141
- Talke, H., Schubert, G.E., 1965. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin. Wochenschr.* 43, 174–175. doi:10.1007/BF01484513
- Taskinen, M., 1987. Lipoprotein Lipase in Diabetes. *Diabetes. Metab. Rev.* 3, 551–570.
- Teschke, R., Brand, A., Strohmeyer, G., 1977. Induction of hepatic microsomal gamma-glutamyltransferase activity following chronic alcohol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 718–724.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20, 1183–1197.
- Tielmans, A., Laloi-Michelin, M., Coupaye, M., Virally, M., Meas, T., Guillausseau, P.-J., 2007a. Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (première partie). *Presse Med.* 36, 269–278. doi:10.1016/j.lpm.2006.10.017
- Tielmans, A., Virally, M., Coupaye, M., Laloi-Michelin, M., Méas, T., Guillausseau, P.-J., 2007b. Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (deuxième partie). *Presse Med.* 36, 467–474. doi:10.1016/j.lpm.2006.11.015
- Tiffany, T.O., Jansen, J.M., Burtis, C. a., Overton, J.B., Scott, C.D., 1972. Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer. *Clin. Chem.* 18, 829–40.
- Trinder, P., 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.* 22, 158–161. doi:10.1136/jcp.22.2.158

- Tuñon, M.J., Gonzalez, P., Garcia-Pardo, L.A., Gonzalez, J., 1991. Hepatic transport of bilirubin in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Hepatol.* 13, 71–77. doi:10.1016/0168-8278(91)90866-A
- Turk, J., Corbett, J.A., Ramanadham, S., Bohrer, A., Mcdaniel, M.L., 1993. Biochemical Evidence for Nitric Oxide Formation from Streptozotocin in Isolated Pancreatic Islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1458–1464.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group., 1998a. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352, 837–853. doi:10.1016/S0140-6736(98)07019-6
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group., 1998b. Effect of intensive blood glucose control with metofrmin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352, 854–865.
- Vasiliades, J., 1976. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex. *Clin. Chem.* 22, 1664–71.
- Vavra, J.J., Deboer, C., Dietz, a, Hanka, L.J., Sokolski, W.T., 1960. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot. Annu.* 7, 230–235.
- Vergès, B., 2009. Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 35, 353–360. doi:10.1016/j.diabet.2009.04.004
- Virally, M., Blicklé, J.-F., Girard, J., Halimi, S., Simon, D., Guillausseau, P.-J., 2007. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab.* 33, 231–44. doi:10.1016/j.diabet.2007.07.001
- Virally, M., Laloi-Michelin, M., Coupaye, M., Kevorkian, J.P., Guillausseau, P.J., 2005. Diabète de type 2 et insulinothérapie : situations transitoires et définitives. *Sang Thromb. Vaiss.* 17, 525–532.
- Virsolvy-Vergine, A., Leray, H., Kuroki, S., Lupo, B., Dufour, M., Bataille, D., 1992. Endosulfine, an endogenous peptidic ligand for the sulfonylurea receptor: purification and partial characterization from ovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6629–33.
- Wählin-Boll, E., Sartor, G., Melander, A., Scherstén, B., 1982. Impaired effect of sulfonylurea following increased dosage. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 22, 21–25. doi:10.1007/BF00606420
- Walters, M.I., Gerarde, H.W., 1970. An ultramicromethod for the determination of conjugated and total bilirubin in serum or plasma. *Microchem. J.* 15, 231–243. doi:10.1016/0026-265X(70)90045-7
- Weckbecker, G., Cory, J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.* 40, 257–264. doi:10.1016/0304-3835(88)90084-5
- World Health Organization, 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.
- Wroblewski, F., LaDue, J.S., 1956. Serum glutamic pyruvic transaminase SGP-T in hepatic disease: a preliminary report. *Ann. Intern. Med.* 45, 801–11.
- Yki-Järvinen, H., 2004. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 351, 1106–1118. doi:10.1056/NEJMra041001

- Zhang, X.F., Tan, B.K., 2000. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 358–63.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174. doi:10.1172/JCI13505
- Zimmerman, B.R., 1997. Sulfonylureas. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 26, 511–522.
- Zinman, B., Hoogwerf, B.J., Duran Garcia, S., Milton, D.R., Giaconia, J.M., Kim, D.D., Trautmann, M.E., Brodows, R.G., 2007. The effect of adding exenatide to a thiazolidinedione in suboptimally controlled type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 146, 477–485.

Annexes

Tableau. 15 : Evolution de la glycémie à jeun (mg/dl) chez les souris Swiss diabétiques durant les 14 jours de traitement par les quatre molécules nouvellement synthétisées, BBS1a, BPS1b, ESP1b et ESP1d.

Lots expérimentaux	Glycémie à jeun (mg/dl)				
	Jour 1	Jour 3	Jour 7	Jour 10	Jour 14
TS	134,5 ± 2,95	137,83 ± 2,93	138,67 ± 1,84	131 ± 3,13	134,67 ± 3,48
DNT	360,7 ± 14,6 ^c	403,3 ± 18,6 ^c	442,17 ± 8,25 ^c	436,5 ± 17,5 ^c	440,2 ± 17,8 ^c
D+BBS1a 10 mg	343,2 ± 12,1 ^c	269 ± 14,7 ^{c,f}	197,5 ± 5,69 ^{b,f}	188,83 ± 8,82 ^{a,f}	170,2 ± 12,1 ^f
D+BPS1b 10 mg	355,3 ± 11,0 ^c	323,8 ± 19,4 ^{c,d}	429,7 ± 12,8 ^c	460,5 ± 19,8 ^c	491,17 ± 21,9 ^{c,d}
D+ESP1b 10 mg	349,5 ± 16,7 ^c	276,33 ± 7,99 ^{c,f}	163,5 ± 13,8 ^f	156 ± 9,51 ^f	139,83 ± 5,93 ^f
D+ESP1d 10 mg	342,33 ± 6,31 ^c	337,17 ± 7,82 ^c	312,67 ± 7,68 ^{c,f}	265,17 ± 8,48 ^{c,f}	227,7 ± 9,71 ^{c,f}
D+GLB	384,5 ± 9,09 ^c	273,3 ± 34,6 ^{c,f}	232,3 ± 16,9 ^{c,f}	162,8 ± 11,5 ^f	132,5 ± 11,8 ^f

TS, lot Témoin Sain ; DNT, lot Diabétique non traité; D+BBS1a 10 mg, lot Diabétique traité par *N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour; D+BPS1b 10 mg, lot Diabétique traité par *N, N'*- Bis (propyl) sulfamide à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour; D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour; D+ESP1d 10 mg, lot Diabétique traité par Ethyl (S)-2-(phenylethyl)sulfamide carbamoyloxy) propanoate à 10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les Valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d*P* < 0.05, ^e*P* < 0.01, ^f*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett..

Tableau. 16 : Effet de l'ESP1b sur le poids corporel, durant les 4 semaines de la période de traitement, chez les rats Wistar rendus diabétiques par la streptozotocine.

Lots expérimentaux	Poids corporel (g)				
	Jour 1	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28
TS	202,53 ± 4,31	210,03 ± 3,94	215,98 ± 3,02	222,60 ± 2,96	226,05 ± 3,20
S+ESP1b 20 mg	198,08 ± 3,03	206,32 ± 2,93	218,88 ± 3,12	225,80 ± 2,86	232,48 ± 2,15
DNT	199,50 ± 2,74	190,38 ± 2,78 ^c	177,97 ± 2,01 ^c	165,27 ± 1,66 ^c	161,87 ± 1,55 ^c
D+ESP1b 5 mg	196,47 ± 2,14	191,03 ± 2,25 ^c	183,15 ± 3,58 ^c	179,48 ± 2,43 ^c	176,93 ± 3,74 ^{c,e}
D+ESP1b 10 mg	193,85 ± 3,98	187,05 ± 3,32 ^c	184,35 ± 3,06 ^c	181,63 ± 2,79 ^c	177,22 ± 3,56 ^{c,e}
D+ESP1b 20 mg	195,23 ± 2,92	190,33 ± 2,89 ^c	188,60 ± 2,24 ^c	186,22 ± 2,26 ^{c,d}	184,52 ± 2,45 ^{c,f}
D+GLB	198,43 ± 3,35	192,37 ± 2,15 ^c	186,98 ± 1,55 ^c	182,85 ± 1,90 ^c	179,17 ± 1,73 ^{c,f}

TS, lot Témoin Sain ; **S+ESP1b 20 mg**: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **DNT**, lot Diabétique non traité; **D+ESP1b 5 mg**, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 10 mg**, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 20 mg**, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d*P* < 0.05, ^e*P* < 0.01, ^f*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

Tableau. 17 : Effet de l'ESP1b sur l'évolution de la glycémie à jeun durant les 4 semaines de la période de traitement chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	Glycémie à jeun (mg/dl)					
	Jour 1	Jour 3	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28
TS	89,33 ± 1,73	87,67 ± 1,15	84,50 ± 1,52	86,00 ± 2,03	89,67 ± 1,28	88,17 ± 1,49
S+ESP1b 20 mg	81,67 ± 2,43	80,33 ± 2,67	82,67 ± 1,15	80,50 ± 1,43	78,00 ± 1,57	73,83 ± 1,19
DNT	332,17 ± 8,81 ^c	345,00 ± 13,5 ^c	360,50 ± 15,7 ^c	399,20 ± 21,2 ^c	384,80 ± 25,6 ^c	439,70 ± 17,0 ^c
D+ESP1b 5 mg	329,33 ± 7,26 ^c	341,67 ± 7,86 ^c	322,83 ± 8,45 ^c	254,00 ± 8,26 ^{c,f}	216,17 ± 4,27 ^{c,f}	174,50 ± 5,29 ^{c,f}
D+ESP1b 10 mg	340,83 ± 5,52 ^c	334,50 ± 9,83 ^c	264,20 ± 13,6 ^{c,f}	225,80 ± 15,3 ^{c,f}	177,30 ± 13,3 ^{c,f}	156,17 ± 6,69 ^{c,f}
D+ESP1b 20 mg	338,00 ± 7,77 ^c	295,67 ± 5,11 ^{c,e}	242,33 ± 6,38 ^{c,f}	181,67 ± 8,11 ^{c,f}	149,00 ± 4,81 ^{b,f}	130,67 ± 2,96 ^{b,f}
D+GLB	336,50 ± 4,06 ^c	268,00 ± 7,89 ^{c,f}	225,67 ± 5,20 ^{c,f}	156,17 ± 7,23 ^{c,f}	134,50 ± 5,16 ^{b,f}	119,33 ± 3,21 ^{a,f}

TS, lot Témoin Sain ; S+ESP1b 20 mg: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour);

DNT, lot Diabétique non traité; D+ESP1b 5 mg, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹

p.c/jour); D+ESP1b 10 mg, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹

p.c/jour); D+ESP1b 20 mg, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); D+GLB :

lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^aP < 0.05,

^bP < 0.01, ^cP < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^dP < 0.05, ^eP < 0.01, ^fP < 0.001 Comparaisons avec

lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

Tableau.18 : Effet de l'ESP1b sur l'évolution de la glycémie durant le test HGPO chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
TS	84,50 ± 1,57	186,33 ± 1,91	159,5 ± 2,88	106,33 ± 2,70	82,17 ± 3,03
S+ESP1b 20 mg	82,67 ± 1,15	194 ± 2,77	128,67 ± 3,89	93,17 ± 3,43	74,5 ± 2,25
DNT	328,30 ± 17,1 ^c	448,7 ± 22,5 ^c	487,3 ± 19,5 ^c	376,3 ± 23,6 ^c	341,3 ± 24,2 ^c
D+ESP1b 5 mg	272,83 ± 8,45 ^{c,f}	478,5 ± 4,01 ^{c,f}	423,17 ± 3,79 ^{c,f}	339,17 ± 5,54 ^c	294,33 ± 7,90 ^{c,d}
D+ESP1b 10 mg	244,20 ± 13,6 ^{c,f}	382,7 ± 14,9 ^{c,f}	318,00 ± 14,9 ^{c,f}	297,2 ± 14,1 ^{c,f}	246,00 ± 14,5 ^{c,f}
D+ESP1b 20 mg	235,50 ± 6,43 ^{c,f}	395,33 ± 6,67 ^{c,e}	297,67 ± 6,05 ^{c,f}	269,33 ± 5,50 ^{c,f}	223,67 ± 8,12 ^{c,f}
D+GLB	220,67 ± 5,20 ^{c,f}	349,17 ± 7,30 ^{c,f}	238,33 ± 5,74 ^{c,f}	218,17 ± 3,70 ^{c,f}	216,50 ± 4,38 ^{c,f}

HGPO, Hyperglycémie provoquée par voie orale ; **TS**, lot Témoin Sain ; **S+ESP1b 20 mg**: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **DNT**, lot Diabétique non traité; **D+ESP1b 5 mg**, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 10 mg**, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 20 mg**, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 µg.kg⁻¹ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy ± Er-T Moy (n = 6). ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d*P* < 0.05, ^e*P* < 0.01, ^f*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

Tableau. 19 : Effet de l'ESP1b sur le nombre des globules blancs ($\times 10^3/\mu\text{l}$) et formule leucocytaire ($\times 10^3/\mu\text{l}$) chez les rats Wistar diabétiques.

Lots expérimentaux	GB ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	NE ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	LY ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	MO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	EO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	BA ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
TS	8,44 \pm 0,52	1,54 \pm 0,13	6,45 \pm 0,44	0,16 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
S+ESP1b 20 mg	8,92 \pm 0,34	1,92 \pm 0,14	6,33 \pm 0,23	0,22 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,13 \pm 0,04
DNT	5,71 \pm 0,37 ^c	1,66 \pm 0,16	3,80 \pm 0,22 ^c	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02
D+ESP1b 5 mg	7,86 \pm 0,24 ^e	2,19 \pm 0,07 ^{b,d}	4,98 \pm 0,13 ^{b,d}	0,24 \pm 0,05 ^e	0,26 \pm 0,05 ^d	0,14 \pm 0,05
D+ESP1b 10 mg	7,95 \pm 0,41 ^e	1,98 \pm 0,13	5,60 \pm 0,39 ^f	0,12 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03	0,03 \pm 0,02
D+ESP1b 20 mg	8,27 \pm 0,45 ^f	2,02 \pm 0,09 ^g	5,67 \pm 0,31 ^f	0,19 \pm 0,04	0,22 \pm 0,07	0,11 \pm 0,05
D+GLB	8,06 \pm 0,19 ^f	1,77 \pm 0,12	5,96 \pm 0,19 ^f	0,11 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	0,67 \pm 0,33

GB, Globules blancs ; **NE**, Neutrophiles ; **LY**, Lymphocytes ; **MO**, Monocytes ; **EO**, Eosinophiles ; **BA**, Basophiles ; **TS**, lot Témoin Sain ; **S+ESP1b 20 mg**: lot Sain Traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **DNT**, lot Diabétique non traité; **D+ESP1b 5 mg**, lot Diabétique traité par une faible dose de ESP1b (5 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 10 mg**, lot Diabétique traité par une dose moyenne de ESP1b (10 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+ESP1b 20 mg**, lot Diabétique traité par une dose élevée de ESP1b (20 mg.kg⁻¹ p.c/jour); **D+GLB** : lot Diabétique Traité par 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c. de glibenclamide. Les valeurs sont Moy \pm Er-T Moy (n = 6). ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Témoin sain. ^d*P* < 0.05, ^e*P* < 0.01, ^f*P* < 0.001 Comparaisons avec lot Diabétique non traité. ANOVA (modèle linéaire généralisé) suivie par un test de Dunnett.

Publication de l'auteur



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Endocrine pharmacology

Antihyperglycemic and antidiabetic effects of Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats



Yassine Réggami^{a,b,*}, Hajira Berredjem^a, Hadjer Cheloufi^c, Malika Berredjem^c, Nouredine Bouzerna^a

^a Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar-Annaba University, P.O. Box 12, 23000 Annaba, Algeria

^b Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Sciences, Mohamed Boudiaf-M'sila University, P.O. Box 166, Ichbelia, M'sila, Algeria

^c Laboratory of Applied Organic Chemistry, Synthesis of Biomolecules and Molecular Modelling Group, Department of Chemistry, Badji Mokhtar-Annaba University, P.O. Box 12, 23000 Annaba, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2016

Received in revised form

7 March 2016

Accepted 8 March 2016

Available online 9 March 2016

Keywords:

Experimental diabetes

Insulin-secretagogue

Streptozotocin

Sulfonamide

ABSTRACT

In this study, we examined the antihyperglycemic and antidiabetic effects of a novel synthesized molecule, the Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate (ESP1b), in streptozotocin (STZ)-induced diabetic Wistar rats. Experimental diabetes mellitus was produced by a single intraperitoneal injection of STZ (55 mg/kg b.w.). Seven day post-injection, animals have received ESP1b orally at the doses of 5, 10 and 20 mg/kg b.w. daily for 28 days. This resulted in a clear decline, in a dose dependent manner, of blood glucose levels during the oral glucose tolerance test (OGTT) and the four weeks of treatment period. ESP1b at 20 mg/kg b.w. has alleviated body weight loss, improved plasma insulin concentration and at the same time markedly decreased the values of glycosylated hemoglobin, lipoproteins and atherogenic ratios. Additionally, ESP1b notably restored renal as well as hepatic functions tests. Histopathological examinations of pancreatic tissue also confirmed the previous biochemical findings. Considering the obtained results, it may be concluded that ESP1b possess a potent antihyperglycemic activity in STZ-diabetic rats possibly related to an insulin-secretagogue effect, which may be responsible for the moderate decrease in blood glucose concentration observed in normal rats administered with this tested compound.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) at present is a major health problem and one of the most common endocrine diseases in the world. According to the recent global estimates of diabetes prevalence by the International Diabetes Federation (IDF), approximately 382 million people were suffering from DM in 2013; and is expected that this figure will rise to over 592 million by the year 2035 (Guariguata et al., 2014).

DM is characterized by chronic hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat and protein metabolisms, resulting from defective insulin secretion, resistance to insulin action, or both (American Diabetes Association, 2014). The persistent hyperglycemia in uncontrolled DM is associated with various micro- and macrovascular complications such as retinopathy, neuropathy,

nephropathy, cardiomyopathy and foot amputation, which have substantial clinical impact, in terms of mortality, morbidity and quality of life (Holstein and Beil, 2009).

Several pharmacological approaches are employed in managing DM, such as the use of insulin therapy and different classes of oral antidiabetic drugs, which include agents that stimulate insulin secretion (Sulfonylureas and Short-acting insulin secretagogues), reduce hepatic glucose production (Biguanides), delay digestion and absorption of intestinal carbohydrates (Alpha-glucosidase inhibitors) or improve insulin action (Glitazones) (Cavallo Perin and Fornengo, 2011). All these therapeutic agents are often associated with certain adverse effects like causing hypoglycemia at higher doses, liver toxicity, lactic acidosis and diarrhea (Williams, 1994), or a decrease in response after prolonged use. Therefore, there is a need for novel drugs that have effective antidiabetic potential at low dose without undesirable side effects (Nathan et al., 2009). In this regard, the present study has been undertaken to investigate the antihyperglycemic and antidiabetic properties of, a tested compound, the Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy)

* Corresponding author at: Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar-Annaba University, P.O. Box 12, 23000 Annaba, Algeria. Tel.: +21338871061; fax: +21338871061.

E-mail address: reggamiyassine@gmail.com (Y. Réggami).

propanoate (ESP1b) in experimental animal model of diabetes induced by a chemical toxin, the Streptozotocin (STZ).

STZ or 2-deoxy-2-([methyl(nitroso)amino]carbonyl)amino)- β -D-glucopyranose is a broad spectrum antibiotic that was first isolated from *Streptomyces achromogenes* fermentations (Herr et al., 1960; Vavra et al., 1960). During the studies of preclinical pharmacology, it was soon noticed that STZ possess a diabetogenic action in rats and dogs, which is mediated by pancreatic β -cells destruction through necrosis (Rakićen et al., 1963). Although the exact mechanism of the cytotoxic effect of STZ has not been fully elucidated, it has generally been assumed that the selective uptake of this glucose toxic analog via the glucose transporter 2 (GLUT2) into the β -cell and subsequent cellular destruction through DNA fragmentation, as a result of the DNA alkylating ability of its methyl nitrosourea moiety, are the main reason of the STZ diabetogenicity (Elsner et al., 2000). However, STZ was found to generate reactive oxygen species (Takasu et al., 1991) and to act as an intracellular nitric oxide donor (Turk et al., 1993). As a consequence, it was suggested that synergistic action of both reactive oxygen species and nitric oxide may also contribute to DNA damage and other deleterious changes caused by this toxin (Szkudelski, 2001).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

STZ was purchased from Sigma-Aldrich, USA. Glibenclamide (GLB) was obtained from Sanofi, Algeria. The all other chemicals and reagents used were of analytical grade procured from Sigma-Aldrich or Merck-Millipore, France.

2.2. Synthesis of the novel compound ESP1b

ESP1b (Fig. 1) was synthesized by our Laboratory of Applied Organic Chemistry, as part of a research to develop a general and mild two steps approach (carbamylation and sulfamoylation) for the synthesis of alkyl or aryl sulfonamides. Synthetic route for the preparation of this compound was already described in detail in a prior paper (Cheloufi et al., 2014). Briefly, ESP1b and a series of other novel sulfonylureas and N-acylsulfonamides derivatives were prepared firstly using a reaction of chlorosulfonyl isocyanates (CSI) with ethyl lactate in the presence of an excess of triethylamine (TEA), which results in the formation of a corresponding N-chlorosulfonyl-carbamate (CSC), then, in a second step, carbamate reacted with primary or secondary amines in presence of TEA. Mixtures of obtained products were purified by column chromatography on silica gel using anhydrous dichloromethane (CH_2Cl_2) as eluent to give 70% of N-acylsulfonamides and 20% of sulfonylureas. Structures of all obtained compounds were unambiguously confirmed by Nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR) and High-resolution mass spectrometry (HRMS).

2.3. Animals

Male Wistar strain rats weighing about 180–220 g procured from the Pasteur Institute of Algeria, were used for the present

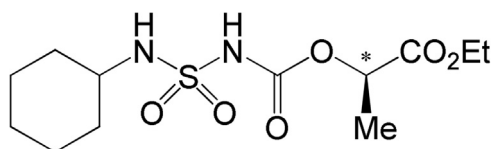


Fig. 1. Chemical structure of Ethyl (S)-2-(1-cyclohexylsulfamide carbamoyloxy) propanoate.

investigations. These animals were fed with a standard pellet rat's diet (ONAB, Bejaia, Algeria), supplied with normal drinking water *ad libitum* and acclimatized to laboratory conditions for 2 weeks, prior to experiments, at 23 ± 2 °C and $45 \pm 10\%$ relative humidity with a natural light/dark cycle. The experimental protocol was conducted in strict accordance with the current animal ethical norms approved by the Badji Mokhtar-Annaba University.

2.4. Induction of experimental diabetes

After an overnight fast, the animals were rendered diabetic by a single intraperitoneal injection of 55 mg/kg body weight of freshly dissolved STZ in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) (Altan et al., 1997). Since STZ administration is capable to produce fatal hypoglycemia as a result of massive release of pancreatic insulin, the rats were supplied, 6 h after the STZ injection, with 5% glucose solution for the next 48 h to prevent this reactive hypoglycemia (Ramachandran et al., 2004). Seven day post-injection, animals having glycosuria with hyperglycemia (i.e. blood glucose levels greater than 300 mg/dl) were considered diabetic (Ahmed et al., 1998) and selected for the experiment.

2.5. Experimental protocol

In present study, we have used 12 normal rats (Non-treated with the STZ) and 30 STZ-induced diabetic rats. These animals were divided into seven groups (n=6/each group) and treated orally once a day for 28 days as detailed follows: (1) NC: Normal control rats received a 0.5 ml of physiological saline (0.9% NaCl solution), (2) N+ESP1b 20 mg: Normal rats treated with ESP1b at 20 mg/kg b. w. dissolved in 0.5 ml of saline, (3) DC: STZ-induced diabetic control rats received a 0.5 ml of saline, (4) D+ESP1b 5 mg: STZ-induced diabetic rats treated with ESP1b at 5 mg/kg b.w. dissolved in 0.5 ml of saline, (5) D+ESP1b 10 mg: STZ-induced diabetic rats treated with ESP1b at 10 mg/kg b.w. dissolved in 0.5 ml of saline, (6) D+ESP1b 20 mg: STZ-induced diabetic rats treated with ESP1b at 20 mg/kg b. w. dissolved in 0.5 ml of saline, (7) D+GLB: STZ-induced diabetic rats treated with the well known antidiabetic sulfonylurea drug, glibenclamide, at the dose of 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. (Subash-Babu et al., 2008) dissolved in 0.5 ml saline.

During the treatment period, the levels of fasting blood glucose (FBG) in the normal and streptozotocin-induced diabetic rats were estimated at the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21th and 28th day by the method of Trinder (1969) using glucose oxidase-peroxidase reactive strips and ACCU-CHEK[®] Active glucometer (Roche diagnostics, France) on blood samples collected via tail vein by excision. The initial and final body weights of all animal groups were also recorded. At the end of the experiment, the rats were deprived of food overnight and then killed by cervical decapitation. Whole blood from each animal was collected into ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) containing tubes for the determination of total and glycosylated hemoglobin, whereas, fasting plasma samples were separated for the estimation of insulin, triglycerides, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, total protein, albumin, hepatic and renal dysfunction parameters.

2.6. Oral glucose tolerance test

On the 12th day of treatment period, animals were subjected to an oral glucose tolerance test (OGTT). After overnight fasting (16 h), a baseline (t=0 min) blood sample was taken from rats in normal and diabetic groups. Without delay, a load of glucose (2 g/kg b.w.) was administered by gavage. Four more samples were also withdrawn from the tip of the tail at 30, 60, 90 and 120 min interval for the estimation of blood glucose levels by the method mentioned above.

2.7. Estimation of plasma insulin, total and glycosylated hemoglobin

Plasma insulin was assayed with an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) (Sapin et al., 2001) using a Cobas e 411 Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Total hemoglobin (Hb) was estimated with a COULTER[®] HmX Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Inc. Villepinte, France). Glycosylated hemoglobin (HbA1c) was determined by an ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC) technique using a Bio-Rad D-10™ Analyzer (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France).

2.8. Determination of lipid profile

Triglycerides (TG) concentration was determined by GPO-POD enzymatic-colorimetric method (Fossati and Prencipe, 1982). Total cholesterol (TC) level was measured by the end point, CHOD-POD colorimetric-enzymatic method (Allain et al., 1974). High density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was assayed by the method of precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium (Grove, 1979). Very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in plasma were calculated by the Friedewald formula (Friedewald et al., 1972); $VLDL-C = TG/5$ and $LDL-C = \text{total cholesterol} - (HDL-C + VLDL-C)$, respectively. The atherogenic ratios such as TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C were also calculated.

2.9. Measurement of total protein, albumin and renal dysfunction parameters

Total protein (TP) content was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Albumin concentration was estimated by the colorimetric method with Bromocresol green (BCG) (Doumas et al., 1971). Urea level was assayed by the UV kinetic method with Urease-GLDH (Talke and Schubert, 1965). Creatinine level was measured by the colorimetric-kinetic method of Jaffé (1886). Uric acid concentration was determined by the colorimetric-enzymatic method with Uricase-POD (Fossati et al., 1980).

2.10. Assessments of plasma enzymes activities and hepatic dysfunction parameters

Aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) and Alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) activities were estimated by the UV enzymatic-Kinetic methods (Bergmeyer et al., 1978). Alkaline phosphatase (ALP; EC 3.1.3.1) and Lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) activities were determined by the Kinetic methods recommended by the German society of clinical chemistry (Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972). Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT; EC 2.3.2.2) was determined according to the kinetic photometric method of Szasz (1969). Total and direct bilirubin (TB, DB) levels were estimated by the colorimetric method with dimethylsulfoxide (DMSO) (Malloy and Evelyn, 1937).

2.11. Histopathological study

Pancreatic tissue was dissected out, washed in an ice-cold physiological saline, fixed in a 10% buffered neutral formalin solution, dehydrated in graded ethanol solutions (70–100%) and embedded into paraffin blocks. Then the tissue was sliced into sections of 5 μm thickness by a rotator microtome and stained with hematoxylin-eosin (H&E). Obtained sections were examined under a light microscope, and photomicrographs were taken.

2.12. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) for six rats in each group. Statistical analysis was performed using MINITAB software package Version 13.4. The means of experimental groups were compared vs controls means by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dennett's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant at the level of $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Blood glucose levels during the oral glucose tolerance test

Fig. 2 illustrates the results of the treatment with ESP1b on blood glucose levels during the OGTT test in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. A clear difference in baseline fasting blood glucose between the normal and STZ induced-diabetic groups was noted. After glucose loading, the level of blood glucose in both normal control rats and normal rats treated with ESP1b at 20 mg/kg b.w. showed a high peak value at 30 min and then decreased to near normal values at 120 min. The decline rate of blood glucose was faster in normal animals treated with ESP1b than the normal control animals. In STZ induced-diabetic control rats, the blood glucose levels reached the peak value at 60 min and then started to decrease but remained higher, even after 120 min. A high peak value at 30 min was also observed in diabetic rats treated with the different doses of ESP1b and then a decline in a dose-dependent manner was remarked at 60 and 90 min. At the end of oral glucose tolerance test, the ESP1b at a dose of 20 mg/kg b.w. was as effective as the GLB (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.) in reducing blood glucose levels.

3.2. Fasting blood glucose levels during the treatment period

During the 4 weeks of treatment period with ESP1b and GLB, Fasting blood glucose levels were estimated in normal and experimental rats on 1st, 3rd, 7th, 14th, 21th and 28th day. Our

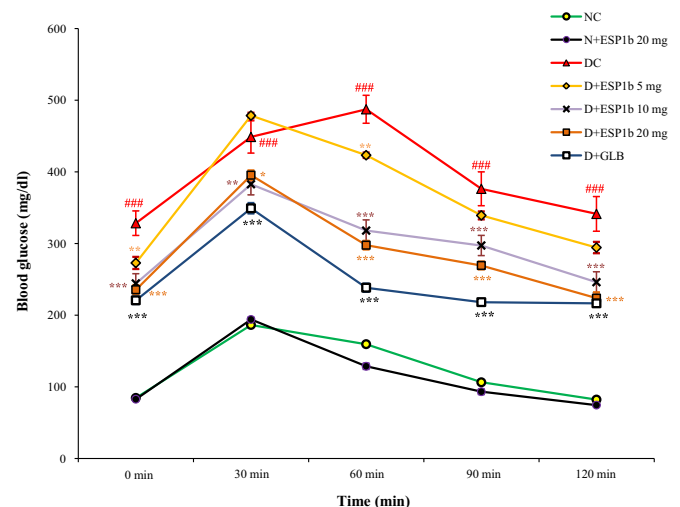


Fig. 2. Effect of ESP1b on blood glucose levels during the oral glucose tolerance test in normal and streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. NC, Normal control rats; N+ESP1b 20 mg, Normal rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); DC, STZ-induced diabetic control rats; D+ESP1b 5 mg, STZ-induced diabetic rats treated with low dose of ESP1b (5 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 10 mg, STZ-induced diabetic rats treated with medium dose of ESP1b (10 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 20 mg, STZ-induced diabetic rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); and D+GLB, STZ-induced diabetic rats treated with glibenclamide (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day). Values are mean \pm S.E.M. (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to NC group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to DC group.

Table 1

Effect of ESP1b on fasting blood glucose levels during the 4 weeks of treatment period in normal and streptozotocin-induced diabetic Wistar rats.

Groups	Fasting blood glucose levels (mg/dl)					
	1st day	3rd day	7th day	14th day	21th day	28th day
NC	89.33 ± 1.73	87.67 ± 1.15	84.50 ± 1.52	86.00 ± 2.03	89.67 ± 1.28	88.17 ± 1.49
N+ESP1b 20 mg	81.67 ± 2.43	80.33 ± 2.67	82.67 ± 1.15	80.50 ± 1.43	78.00 ± 1.57	73.83 ± 1.19
DC	332.17 ± 8.81 ^c	345.00 ± 13.5 ^c	360.50 ± 15.7 ^c	399.20 ± 21.2 ^c	384.80 ± 25.6 ^c	439.70 ± 17.0 ^c
D+ESP1b 5 mg	329.33 ± 7.26 ^c	341.67 ± 7.86 ^c	322.83 ± 8.45 ^c	254.00 ± 8.26 ^{c,f}	216.17 ± 4.27 ^{c,f}	174.50 ± 5.29 ^{c,f}
D+ESP1b 10 mg	340.83 ± 5.52 ^c	334.50 ± 9.83 ^c	264.20 ± 13.6 ^{c,f}	225.80 ± 15.3 ^{c,f}	177.30 ± 13.3 ^{c,f}	156.17 ± 6.69 ^{c,f}
D+ESP1b 20 mg	338.00 ± 7.77 ^c	295.67 ± 5.11 ^{c,e}	242.33 ± 6.38 ^{c,f}	181.67 ± 8.11 ^{c,f}	149.00 ± 4.81 ^{b,f}	130.67 ± 2.96 ^{b,f}
D+GLB	336.50 ± 4.06 ^c	268.00 ± 7.89 ^{c,f}	225.67 ± 5.20 ^{c,f}	156.17 ± 7.23 ^{c,f}	134.50 ± 5.16 ^{b,f}	119.33 ± 3.21 ^{a,f}

NC, Normal control rats; N+ESP1b 20 mg, Normal rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); DC, STZ-induced diabetic control rats; D+ESP1b 5 mg, STZ-induced diabetic rats treated with low dose of ESP1b (5 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 10 mg, STZ-induced diabetic rats treated with medium dose of ESP1b (10 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 20 mg, STZ-induced diabetic rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); and D+GLB, STZ-induced diabetic rats treated with glibenclamide (600 µg/kg b.w./day). Values are mean ± S.E.M. (n=6). ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001 compared to NC group. ^dP < 0.05, ^eP < 0.01, ^fP < 0.001 compared to DC group.

results (Table 1) showed that STZ injection in rats leads to a significant increase (P < 0.001) in FBG level when compared to normal controls. A clear reduction in FBG levels was observed from the 3rd day after the treatment with the ESP1b (P < 0.01) at 20 mg/kg b.w. and GLB (P < 0.001) when compared to STZ induced-diabetic control values. Highest percentage decreases of FBG levels by 64.53%, 61.34%, 54.17% and 47.01% have been noted at the end of experiment for the treatments, with GLB, ESP1b at 20, 10 and 5 mg/kg b.w., respectively. The more efficient glucose lowering effect of ESP1b was remarked at the dose of 20 mg/kg b.w. than the other two doses.

3.3. Body weight, plasma insulin, total and glycosylated hemoglobin

Table 2 illustrates the effect of ESP1b on body weight, plasma insulin, total and glycosylated hemoglobin in normal and experimental rats. Oral gavage of normal animals with ESP1b had not produced any significant changes in body weight and total hemoglobin level, whereas a significant decrease (P < 0.001) in glycosylated hemoglobin by 18.81% and a significant rise (P < 0.05) in plasma insulin by 11.32% were observed in comparison with normal control group. STZ-induced DM significantly (P < 0.001) decreased the body weight (28.39%), plasma insulin (44.27%), and total hemoglobin (26.38%) and increased glycosylated hemoglobin (66.84%) when compared to normal control animals. Oral administration of ESP1b at a dose of 20 mg/kg b.w. to STZ-induced diabetic animals significantly (P < 0.001) increased the body weight (13.99%), plasma insulin (54.37%), and total hemoglobin level (15.26%) and decreased glycosylated hemoglobin (31.47%) when compared to STZ-induced diabetic control rats.

Table 2

Effect of ESP1b on body weight, plasma insulin, total and glycosylated hemoglobin in normal and streptozotocin-induced diabetic Wistar rats.

Groups	Body weight (g/day)					
	Initial	Final	Difference between 1st and 28th day (%)	Hb (g/dl)	HbA1C (%Hb)	Insulin (U/l)
NC	202.53 ± 4.31	226.05 ± 3.20 ^h	11.61	13.53 ± 0.18	5.58 ± 0.06	14.75 ± 0.10
N+ESP1b 20 mg	198.08 ± 3.03	232.48 ± 2.15 ⁱ	17.36	13.16 ± 0.15	4.53 ± 0.09 ^c	16.42 ± 0.07 ^c
DC	199.50 ± 2.74	161.87 ± 1.55 ^{c,i}	-18.86	9.96 ± 0.11 ^c	9.31 ± 0.22 ^c	8.22 ± 0.20 ^c
D+ESP1b 5 mg	196.47 ± 2.14	176.93 ± 3.74 ^{c,e,h}	-9.94	10.21 ± 0.15 ^c	8.40 ± 0.18 ^{c,e}	9.17 ± 0.27 ^{c,e}
D+ESP1b 10 mg	193.85 ± 3.98	177.22 ± 3.56 ^{c,e,g}	-8.57	10.85 ± 0.19 ^{c,e}	7.95 ± 0.25 ^{c,f}	11.18 ± 0.19 ^{c,f}
D+ESP1b 20 mg	195.23 ± 2.92	184.52 ± 2.45 ^{c,f,g}	-5.48	11.48 ± 0.19 ^{c,f}	6.38 ± 0.14 ^{b,f}	12.69 ± 0.13 ^{c,f}
D+GLB	198.43 ± 3.35	179.17 ± 1.73 ^{c,f,i}	-9.70	12.51 ± 0.14 ^{c,f}	5.46 ± 0.08 ^f	13.48 ± 0.15 ^{c,f}

Hb, total hemoglobin; HbA1C, glycosylated hemoglobin; NC, Normal control rats; N+ESP1b 20 mg, Normal rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); DC, STZ-induced diabetic control rats; D+ESP1b 5 mg, STZ-induced diabetic rats treated with low dose of ESP1b (5 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 10 mg, STZ-induced diabetic rats treated with medium dose of ESP1b (10 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 20 mg, STZ-induced diabetic rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); and D+GLB, STZ-induced diabetic rats treated with glibenclamide (600 µg/kg b.w./day). Values are mean ± S.E.M. (n=6). ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001 compared to NC group. ^dP < 0.05, ^eP < 0.01, ^fP < 0.001 compared to DC group. ^gP < 0.05, ^hP < 0.01, ⁱP < 0.001 compared to Initial body weight

3.4. Plasma lipid profile and atherogenic ratios

Our results showed that treatment of normal rats with ESP1b had not involved any significant changes in the levels of plasma lipids and atherogenic ratios in comparison with normal control levels (Table 3). Diabetic control rats showed significantly (P < 0.001) higher levels of TG, total, LDL and VLDL cholesterol associated with lower levels of HDL cholesterol, moreover, a significant (P < 0.001) elevation in the atherogenic ratios was noted in this group, compared to normal control ratios. Treating diabetic animals with ESP1b returned back the levels of TG, HDL and VLDL cholesterol to near normal values and significantly (P < 0.001) reduced the concentration of total and LDL cholesterol when compared to diabetic control values. Treatment with ESP1b also significantly (P < 0.001) decreased the atherogenic ratios in diabetic rats (Table 3).

3.5. Total protein, albumin, creatinine, urea and uric acid

Changes in total protein, albumin, creatinine, urea and uric acid concentrations in normal and STZ-induced diabetic rats are listed in Table 4. Untreated diabetic rats exhibited significant (P < 0.001) decreases of total protein and albumin concentrations by 24.56% and 23.87%. However, this group show significant (P < 0.001) increases in creatinine, urea and uric acid levels by 92.85%, 76.42% and 66.95% respectively when compared to the values of normal control animals. Treating diabetic rats with ESP1b significantly (P < 0.001) raised the levels of total protein and albumin when compared to diabetic control group, whereas, it reduced the concentration of creatinine, urea and uric acid to near normal control

Table 3
Effect of ESP1b on lipid profile and atherogenic ratios in normal and streptozotocin-induced diabetic Wistar rats.

Groups	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	TC/HDL-C ratio	LDL-C/HDL-C ratio
NC	87.89 ± 1.90	95.41 ± 0.86	27.84 ± 0.63	49.99 ± 0.25	17.57 ± 0.38	3.43 ± 0.05	1.80 ± 0.04
N+ESP1b 20 mg	81.20 ± 1.68	99.46 ± 1.07	29.56 ± 0.81	53.65 ± 0.52	16.24 ± 0.33	3.37 ± 0.06	1.82 ± 0.05
DC	144.21 ± 1.90 ^c	138.70 ± 1.48 ^c	14.70 ± 0.87 ^c	95.15 ± 1.94 ^c	28.84 ± 0.37 ^c	9.62 ± 0.65 ^c	6.62 ± 0.5 ^c
D+ESP1b 5 mg	116.70 ± 1.89 ^{c,f}	130.57 ± 1.60 ^{c,e}	22.26 ± 0.75 ^{c,f}	84.95 ± 0.59 ^{c,f}	23.34 ± 0.37 ^{c,f}	5.88 ± 0.13 ^{c,f}	3.83 ± 0.11 ^{c,f}
D+ESP1b 10 mg	98.61 ± 1.72 ^{b,f}	123.15 ± 1.75 ^{c,f}	24.47 ± 0.54 ^{b,f}	78.95 ± 1.49 ^{c,f}	19.72 ± 0.34 ^{b,f}	5.04 ± 0.12 ^{c,f}	3.23 ± 0.10 ^{c,f}
D+ESP1b 20 mg	91.45 ± 2.31 ^f	116.09 ± 1.38 ^{c,f}	25.71 ± 0.46 ^f	72.08 ± 0.63 ^{c,f}	18.28 ± 0.46 ^f	4.51 ± 0.04 ^{a,f}	2.80 ± 0.04 ^{b,f}
D+GLB	92.09 ± 2.28 ^f	100.90 ± 1.29 ^{a,f}	22.64 ± 0.65 ^{c,f}	59.83 ± 0.63 ^{c,f}	18.41 ± 0.45 ^f	4.46 ± 0.09 ^{a,f}	2.65 ± 0.08 ^{b,f}

TG, Triglycerides; TC, Total cholesterol; HDL-C, High density lipoprotein cholesterol; VLDL-C, Very low density lipoprotein cholesterol; LDL-C, Low density lipoprotein cholesterol; NC, Normal control rats; N+ESP1b 20 mg, Normal rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); DC, STZ-induced diabetic control rats; D+ESP1b 5 mg, STZ-induced diabetic rats treated with low dose of ESP1b (5 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 10 mg, STZ-induced diabetic rats treated with medium dose of ESP1b (10 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 20 mg, STZ-induced diabetic rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); and D+GLB, STZ-induced diabetic rats treated with glibenclamide (600 µg/kg b.w./day). Values are mean ± S.E.M. (n=6). ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001 compared to NC group. ^dP < 0.05, ^eP < 0.01, ^fP < 0.001 compared to DC group.

Table 4
Effect of ESP1b on total protein, albumin, creatinine, urea and uric acid in normal and streptozotocin-induced diabetic Wistar rats.

Groups	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Creatinine (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Uric acid (mg/dl)
NC	7.45 ± 0.07	4.44 ± 0.04	0.70 ± 0.05	32.84 ± 0.59	1.15 ± 0.04
N+ESP1b 20 mg	7.49 ± 0.09	4.46 ± 0.06	0.65 ± 0.04	34.11 ± 0.40	1.38 ± 0.09
DC	5.62 ± 0.12 ^c	3.38 ± 0.07 ^c	1.35 ± 0.05 ^c	58.01 ± 1.71 ^c	1.92 ± 0.04 ^c
D+ESP1b 5 mg	6.30 ± 0.09 ^{c,f}	3.75 ± 0.05 ^{c,f}	0.78 ± 0.05 ^f	46.15 ± 1.02 ^{c,f}	1.57 ± 0.08 ^{c,e}
D+ESP1b 10 mg	6.52 ± 0.13 ^{c,f}	3.87 ± 0.08 ^{c,f}	0.71 ± 0.05 ^f	42.34 ± 0.58 ^{c,f}	1.43 ± 0.06 ^{a,f}
D+ESP1b 20 mg	6.97 ± 0.07 ^{b,f}	4.13 ± 0.05 ^{b,f}	0.69 ± 0.04 ^f	40.76 ± 0.45 ^{c,f}	1.24 ± 0.05 ^f
D+GLB	7.24 ± 0.08 ^f	4.32 ± 0.03 ^f	0.67 ± 0.05 ^f	38.17 ± 0.62 ^{c,f}	1.13 ± 0.04 ^f

NC, Normal control rats; N+ESP1b 20 mg, Normal rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); DC, STZ-induced diabetic control rats; D+ESP1b 5 mg, STZ-induced diabetic rats treated with low dose of ESP1b (5 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 10 mg, STZ-induced diabetic rats treated with medium dose of ESP1b (10 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 20 mg, STZ-induced diabetic rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); and D+GLB, STZ-induced diabetic rats treated with glibenclamide (600 µg/kg b.w./day). Values are mean ± S.E.M. (n=6). ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001 compared to NC group. ^dP < 0.05, ^eP < 0.01, ^fP < 0.001 compared to DC group.

values. The ESP1b treatment in normal rats had produced a moderate increase in the levels of total protein and albumin.

3.6. Plasma enzymes, total and direct bilirubin

Compared with normal control animals, diabetic untreated group exhibited significantly ($P < 0.001$) increased activities of plasma enzymes ALT, AST, LDH, ALP and GGT respectively by 66.40%, 30.28%, 50.69%, 59.74% and 65.71% (Table 5). Administration of ESP1b to diabetic animals significantly restored the enzyme activities to near normal control values, whereas, in normal rats, we noted that the oral gavage of ESP1b resulted in significant ($P < 0.05$) decrease of LDH activity and a slight reduction of other plasma enzymes activities.

There were a clear rise in the levels of TB ($P < 0.001$) and DB ($P < 0.01$) of untreated diabetic animals respectively, by 45.71%

and 51.02% when compared to normal controls levels. Significant decreases in the levels of TB and DB respectively, by 30.25% and 31.08% were observed in diabetic group treated with ESP1b compared to diabetic controls; however, we noted a moderate elevation in the level of TB and DB respectively by 6.93% and 12.24% in normal rats treated with ESP1b when compared to normal controls.

3.7. Histological changes

Photomicrograph of untreated diabetic rats showed severe atrophy of pancreatic islets and degranulation of β -cells (Fig. 3C) when compared to normal control pancreatic histology (Fig. 3A). Treating diabetic rats with ESP1b resulted in a remarkable improvement in the volume of islets (Fig. 3D) in comparison with diabetic control animals (Fig. 3C). No degenerative changes of

Table 5
Effect of ESP1b on ALT, AST, LDH, ALP, GGT, Total and Direct Bilirubin in normal and streptozotocin-induced diabetic Wistar rats.

Groups	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	GGT (IU/l)	TB (mg/l)	DB (mg/l)
NC	24.20 ± 0.60	39.53 ± 1.37	1164.5 ± 33.7	87.54 ± 1.88	16.39 ± 0.60	2.45 ± 0.08	0.49 ± 0.05
N+ESP1b 20 mg	22.74 ± 0.72	38.97 ± 0.75	1041.2 ± 42.5 ^a	86.63 ± 1.57	15.02 ± 0.42	2.62 ± 0.05	0.55 ± 0.03
DC	40.27 ± 0.90 ^c	51.50 ± 1.53 ^c	1754.8 ± 31.5 ^c	139.84 ± 2.95 ^c	27.16 ± 0.92 ^c	3.57 ± 0.23 ^c	0.74 ± 0.05 ^b
D+ESP1b 5 mg	34.48 ± 0.50 ^{c,f}	49.86 ± 0.94 ^c	1631.2 ± 23.6 ^{c,d}	123.57 ± 1.76 ^{c,f}	25.84 ± 0.69 ^c	3.43 ± 0.05 ^c	0.67 ± 0.04 ^a
D+ESP1b 10 mg	30.63 ± 0.71 ^{c,f}	46.39 ± 0.89 ^{c,e}	1534.2 ± 20.8 ^{c,f}	114.50 ± 1.31 ^{c,f}	23.35 ± 0.85 ^{c,e}	2.78 ± 0.10 ^f	0.58 ± 0.02 ^d
D+ESP1b 20 mg	27.95 ± 0.52 ^{b,f}	42.21 ± 0.84 ^f	1293.0 ± 32.0 ^{a,f}	98.06 ± 1.71 ^{b,f}	18.45 ± 0.51 ^f	2.49 ± 0.06 ^f	0.51 ± 0.02 ^e
D+GLB	31.22 ± 0.64 ^{c,f}	40.72 ± 1.04 ^f	1326.8 ± 26.8 ^{b,f}	91.76 ± 1.47 ^f	18.61 ± 0.60 ^f	2.64 ± 0.06 ^f	0.54 ± 0.04 ^e

ALT, Alanine aminotransferase; AST, Aspartate aminotransferase; LDH, Lactate dehydrogenase; ALP, Alkaline phosphatase; GGT, Gamma-glutamyl transpeptidase; TB, Total bilirubin; DB, Direct bilirubin; NC, Normal control rats; N+ESP1b 20 mg, Normal rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); DC, STZ-induced diabetic control rats; D+ESP1b 5 mg, STZ-induced diabetic rats treated with low dose of ESP1b (5 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 10 mg, STZ-induced diabetic rats treated with medium dose of ESP1b (10 mg/kg b.w./day); D+ESP1b 20 mg, STZ-induced diabetic rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); and D+GLB, STZ-induced diabetic rats treated with glibenclamide (600 µg/kg b.w./day). Values are mean ± S.E.M. (n=6). ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001 compared to NC group. ^dP < 0.05, ^eP < 0.01, ^fP < 0.001 compared to DC group.

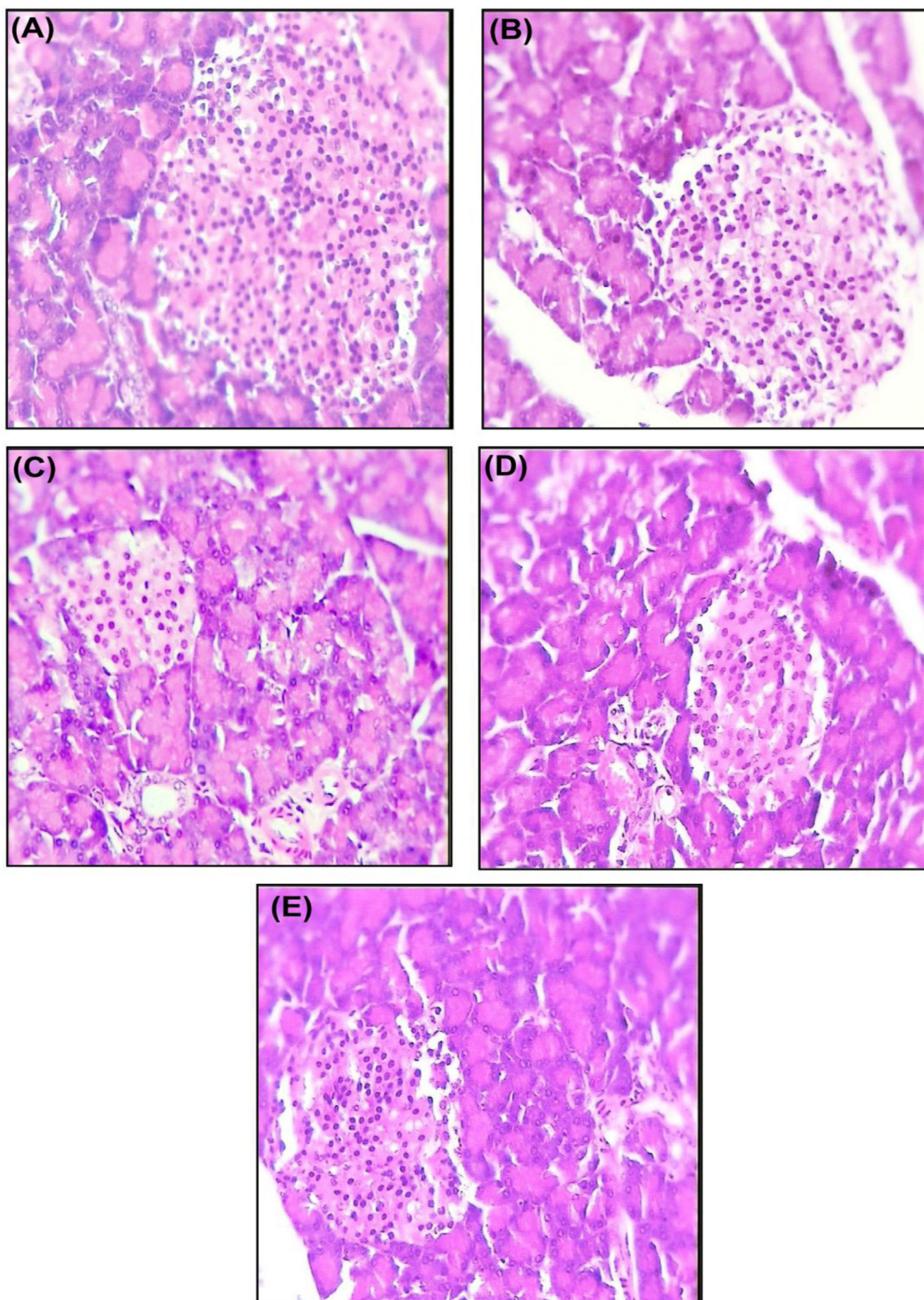


Fig. 3. Histopathological comparison of the pancreatic islet tissues in normal and streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Photomicrographs showing one single pancreatic islet of (A) Normal control rats; (B) Normal rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); (C) STZ-induced diabetic control rats; (D) STZ-induced diabetic rats treated with high dose of ESP1b (20 mg/kg b.w./day); and (E) STZ-induced diabetic rats treated with glibenclamide (600 μ g/kg b.w./day). In diabetic control rats, a severe atrophy of pancreatic islets was clearly observed. An improvement in the volume of islets was noted after ESP1b and GLB treatments. Examinations were carried out at $\times 400$ magnifications with hematoxylin-eosin's stain.

pancreatic β -cells were observed in normal animals treated with ESP1b (Fig. 3B).

4. Discussion

In the present study, we investigated the effects of a novel synthesized molecule, ESP1b, in STZ-induced diabetic Wistar rats. The obtained results show that intraperitoneal injection of STZ to our experimental rats has provoked a severe atrophy of pancreatic islets (Fig. 3C), diminished plasma insulin concentration, decreased final body weight, augmented persistently the levels of fasting blood glucose, and increased HbA1c percentage to over 9% of total hemoglobin (Tables 1 and 2). These observed alterations are similar to those reported previously (Chandramohan et al., 2008; Harini et al., 2012). Gavage of diabetic rats with the novel synthesized molecule ESP1b resulted in a decline, in a dose dependent manner, of blood glucose levels during the OGTT test (Fig. 2) and the four weeks of treatment period (Table 1). Moreover, a rise in insulin concentration associated with a diminished HbA1c value (< 6.5% of total hemoglobin) (Table 2) were noted in these animals. This signifies a better glycemic control and a reduced glycation of proteins as a result of increased release of insulin from Langerhans islets, which may be with the same mode of action of GLB and all other hypoglycemic sulfonylurea drugs (Green and Feinglos, 2006).

Photomicrographs of pancreatic specimen have confirmed the preceding effects of treating diabetic rats with ESP1b, showing an improvement in the total volume of Langerhans islets (Fig. 3D), which can be explained by an increase in the β -cells number, cellular volume, or a combination of both. The expansion of the β -cells mass may be viewed as a result of the reduced injurious effect of the overproduction of reactive oxygen species on β -cells, which have a particularly low antioxidative defense capacity, or as a compensatory response of pancreatic islet for the increased insulin demands in order to control blood glucose homeostasis. Diabetic animals on treatment with ESP1b have also showed an enhancement in their body weight (Table 2). This ability of ESP1b to protect rats from weight loss seems to be related to increased insulin level, which lead to reduced lipids and proteins breakdown.

DM is usually associated with several abnormalities of fats and lipoproteins (Dunn, 1990). The most typical feature of these disorders is the abundance of TG-rich lipoproteins such as chylomicrons and VLDLs in the blood (Laakso, 2009), which was noticed in STZ-diabetic animals (Table 3). An elevation in plasma concentrations of TG, total and LDL cholesterol associated with reduced levels of HDL were also observed. This may be regarded as a result of profound decreases in catabolism of TG-rich lipoproteins secondary to reduced activity of lipoprotein lipase (LPL) (Taskinen, 1987), and/or may be due to hepatic overproduction of VLDL particles that are stimulated by increased circulating free fatty acids (FFA), the substrates of VLDL, as a result of the uninhibited action of the hormone-sensitive lipase (HSL) in adipose tissue (Vergès, 2009). Oral treatment of diabetic rats with ESP1b has decreased the disturbance of lipid profile and atherogenic ratios (Table 3). This hypolipidemic effect may be attributed to the augmented circulating levels of the antilipolytic hormone, insulin, which is considered as a potent activator of LPL, the enzyme that catalyzes the hydrolysis of the plasma TG-rich lipoproteins. Moreover, the improvement in insulin secretion inhibits the HSL activity and increases the utilization of glucose, which in turn decreases the mobilization of FFA from the fat depots and the synthesis of VLDL by the liver.

Metabolic disorders induced by DM involve not only the metabolism of carbohydrates and lipids but also that of proteins. In this study, plasma proteins concentrations (Table 4) were found to

be reduced in diabetic animals. This confirm the negative nitrogen balance as well as loss of nitrogen from most organs that are commonly suggested in STZ-induced DM (Almdal and Vilstrup, 1987). Furthermore, it could indicate a diminished synthetic function of the liver secondary to insulin deficiency (Biolo and Wolfe, 1993) or the onset of microalbuminuria and microproteinuria, which are regarded as important predictors of diabetic nephropathy (Mogensen, 1984). ESP1b treated group has exhibited increased levels of total protein, albumin (Table 4) and Hb (Table 2) when compared to diabetic controls. This may be mainly related to boosted insulin secretion. Indeed, in most circumstances this hormone is anabolic, meaning that it stimulates net protein synthesis (Biolo and Wolfe, 1993), which contributes to the restoration of plasma proteins concentration in this condition.

STZ-diabetic animals have also enhanced plasma levels of urea, creatinine and uric acid (Table 4). This could be attributed to reduced clearance of these substances, reflecting a decline in the glomerular filtration rate (GFR) (Almdal and Vilstrup, 1988) and/or an increased net tubular absorption (Johnson et al., 2003). However, during this metabolic disorder, the augmented levels of urea, the main end product of protein metabolism, and creatinine, the degradation derivative of creatine and phosphocreatine that are viewed as energy storage compounds in skeletal muscles, could also be a result of an extensive muscles breakdown associated with an increased catabolism of liver and plasma proteins (Jordá et al., 1982). Moreover, the increment in the level of uric acid, which is a product of purine metabolism and one of the major endogenous antioxidants in the body, could relate to oxidative stress, which increases the activity of xanthine oxidase, the only enzyme that is able to produce uric acid (Becker, 1993). In addition to oxidative stress, hyperuricemia may be a consequence of metabolic disturbance (Madianov et al., 2000) and more particularly, protein glycation, which lead to muscle wasting and increased release of purine, the main source of uric acid as well as in activity of xanthine oxidase (Anwar and Meki, 2003). Our data (Table 4) indicate that diabetic rats administrated with ESP1b have significantly ($P < 0.001$) diminished the levels of urea, creatinine and uric acid compared to the mean values of diabetic control group. This may be interpreted by an improved renal function associated with decreased protein degradation secondary to reduced glucose concentration and subsequent glycation.

STZ is known to exert toxic effects not only on pancreatic β cells but also on other organs including liver (Lenzen, 2008), which is regarded as the central metabolic organ in the body that plays a pivotal role in the homeostasis of glucose; through regulation of its uptake, storage, release and *de novo* synthesis from other precursors such as amino acids (AAs) (Hagopian et al., 2003). In our study, experimental DM has increased activities of plasma enzymes; ALT, AST, LDH, ALP and GGT (Table 5). This might be primarily due to the leakage of these enzymes, and more specifically ALT, from liver cytosol into blood stream (Navarro et al., 1993), demonstrating a hepatocellular damage (El-Demerdash et al., 2005). However, the high activities of aminotransferases (ALT and AST) during DM, could also be due to excessive accumulation of gluconeogenic AAs (alanine and glutamate) as a result of AAs mobilization from peripheral protein stores (Felig et al., 1970). Furthermore, the increment in the activities of circulating AST and LDH that are predominantly presents in cardiac and skeletal muscles could attributed to myocardial injury (Awaji et al., 1990). In addition to these extra-hepatic sources of the raised enzymatic activities in circulation, serum isoenzymes determinations have revealed a solely intestinal origin of the observed hyperphosphatasemia in diabetic rats (Chua and Shrago, 1978), leading, to suggest that the elevated activity of circulating ALP may be secondary to the hyperphagia (Chua and Shrago, 1978) or to a direct toxic effects of STZ on the intestine (Hough et al., 1981).

Although, increased activity of GGT in patients sera was initially viewed as sensitive marker of alcohol consumption, liver inflammation, hepatic steatosis and hepatitis (Teschke et al., 1977), more recent studies (Lee et al., 2003; Mason et al., 2010) have reported that high activity of circulating GGT is also strongly associated with the development of metabolic syndrome, DM and cardiovascular diseases, which all characterized by increased oxidative stress. Thus, the elevated activity of GGT in plasma of diabetic rats (Table 5) may be explained by an enhanced need of these organisms to reproduce more glutathione (GSH), the most abundant nonprotein-thiol antioxidant in the body, in order to modify the existing oxidative stress during this pathologic state (Bidel et al., 2008).

Hyperbilirubinemia noticed in STZ-induced DM (Table 5) could reflect alterations of one or several hepatic processes responsible for the elimination of this heme catabolite from plasma, including bilirubin uptake and conjugation (Tuñon et al., 1991). Although bilirubin was long considered to be a toxic waste product, in particular for central nervous system; this yellow pigment has also exhibited a potent antioxidant activity (Stocker et al., 1987). This valuable property has supported an emerging hypothesis that the moderate rise in plasma bilirubin level may be also a physiological response to oxidative stress (Kapitulnik, 2004).

Treating diabetic rats with ESP1b has decreased the activities of plasma enzymes and levels of bilirubin to near normal mean values (Table 5). This may be mainly due to enhanced release of insulin, which consequently reduces oxidative stress, amino acids mobilization and hyperphagia of experimental animals.

5. Conclusion

The finding of this study evidently indicates that oral treatment of diabetic rats with ESP1b has lowered blood glucose levels, enhanced insulin secretion from surviving or regenerated β -cells and modulated the disturbances of lipids as well as proteins metabolism caused by STZ-induced DM. Furthermore, an improvement in renal and hepatic functions was also noticed in experimental animals. These therapeutic effects exhibited by the novel synthesized molecule were comparables with those of glibenclamide, a standard drug of type 2 DM.

Conflict of interest

The authors state that they do not have any conflict of interest.

References

- Ahmed, I., Adeghate, E., Sharma, A.K., Pallot, D.J., Singh, J., 1998. Effects of *Moringa charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 40, 145–151. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8227\(98\)00022-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8227(98)00022-9).
- Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W., Fu, P.C., 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470–475.
- Almdal, T.P., Vilstrup, H., 1987. Effects of streptozotocin-induced diabetes and diet on nitrogen loss from organs and on the capacity of urea synthesis in rats. *Diabetologia* 30, 952–956. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00295880>.
- Almdal, T.P., Vilstrup, H., 1988. Strict insulin therapy normalises organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 31, 114–118. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00395558>.
- Altan, N., Yiğit, S., Elmali, E., Malhatun, E., Rota, S., Kiliç, N., 1997. Effect of the sulfonyleurea glyburide on superoxide dismutase in streptozotocin-induced diabetic rat muscle. *Gen. Pharmacol.* 28, 795–796.
- American Diabetes Association, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 (Suppl 1), S81–S90. <http://dx.doi.org/10.2337/dc14-S081>.
- Anwar, M.M., Meki, A.R.M.A., 2003. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem. Physiol.* – Mol. Integr. Physiol. 135, 539–547. [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00114-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00114-4).
- Awaji, Y., Hashimoto, H., Matsui, Y., Kawaguchi, K., Okumura, K., Ito, T., Satake, T., 1990. Isoenzyme profiles of creatine kinase, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase in the diabetic heart: comparison with hereditary and catecholamine cardiomyopathies. *Cardiovasc. Res.* 24, 547–554.
- Becker, B.F., 1993. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 615–631. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90143-1](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(93)90143-1).
- Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., Wahlefeld, A.W., 1978. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* 24, 58–73.
- Bidel, S., Silventoinen, K., Hu, G., Lee, D.-H., Kaprio, J., Tuomilehto, J., 2008. Coffee consumption, serum gamma-glutamyltransferase and risk of type II diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62, 178–185. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602712>.
- Biolo, G., Wolfe, R.R., 1993. Insulin action on protein metabolism. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 7, 989–1005.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Cavallo Perin, P., Fornengo, P., 2011. New oral antidiabetic agents. *Intern. Emerg. Med.* 6, 135–138. <http://dx.doi.org/10.1007/s11739-011-0677-5>.
- Chandramohan, G., Ignacimuthu, S., Pugalendi, K.V., 2008. A novel compound from *Casearia esculenta* (Roxb.) root and its effect on carbohydrate metabolism in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 590, 437–443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.082>.
- Cheloufi, H., Berredjem, M., Boufars, W., Bouchareb, F., Djahoudi, A., Aouf, N., 2014. Efficient synthesis, characterization, and antibacterial activity of novel N-acyl-sulfonamides and sulfonyleureas. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 189, 1396–1404. <http://dx.doi.org/10.1080/10426507.2013.865125>.
- Chua, B., Shrago, E., 1978. Effects of experimental diabetes and food intake on rat intestine and serum alkaline phosphatase. *J. Nutr.* 108, 196–202.
- Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972. Empfehlungen Der Deutschen Gesellschaft Für Klinische Chemie. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 10, 182–192.
- Doumas, B.T., Watson, W.A., Biggs, H.G., 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta* 31, 87–96.
- Dunn, F.L., 1990. Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 6, 47–61.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., El-Naga, N.I.A., 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 43, 57–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.012>.
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., Lenzen, S., 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of Streptozotocin. *Diabetologia* 43, 1528–1533. <http://dx.doi.org/10.1007/s001250051564>.
- Felig, P., Marliss, E., Ohman, J.L., Cahill, G.F., 1970. Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 19, 727–729. <http://dx.doi.org/10.2337/diab.19.10.727>.
- Fossati, P., Prencipe, L., 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 28, 2077–2080.
- Fossati, P., Prencipe, L., Berti, G., 1980. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin. Chem.* 26, 227–231.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502. <http://dx.doi.org/10.1177/107424840501000106>.
- Green, J.B., Feinglos, M.N., 2006. Are Sulfonylureas passé? *Curr. Diabetes Rep.* 6, 373–377. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-006-0008-9>.
- Grove, T.H., 1979. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin. Chem.* 25, 560–564.
- Guariguata, L., Whiting, D.R., Hambleton, I., Beagle, J., Linnenkamp, U., Shaw, J.E., 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 103, 137–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>.
- Hagopian, K., Ramsey, J.J., Weindruch, R., 2003. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Exp. Gerontol.* 38, 267–278. [http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00202-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00202-4).
- Harini, R., Ezhumalai, M., Pugalendi, K.V., 2012. Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, on streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 676, 89–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.11.051>.
- Herr, R.R., Eble, T.E., Bergy, M.E., Jahnke, H.K., 1960. Isolation and characterization of Streptozotocin. *Antibiot. Annu.* 7, 236–240.
- Holstein, A., Beil, W., 2009. Oral antidiabetic drug metabolism: pharmacogenomics and drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5, 225–241. <http://dx.doi.org/10.1517/17425250902806424>.
- Hough, S., Avioli, L.V., Teitelbaum, S.L., Fallon, M.D., 1981. Alkaline phosphatase activity in chronic streptozotocin-induced insulin deficiency in the rat: effect of insulin replacement. *Metabolism* 30, 1190–1194.
- Jaffé, M., 1886. Über den Niederschlag Welchen Pikrinsäure in Normalen Harn Erzeugt und Über Eine Neue reaction Des Kreatinins. *Z. Physiol. Chem.* 10, 391–400.
- Johnson, R.J., Kang, D.H., Feig, D., Kivlighn, S., Kanellis, J., Watanabe, S., Tuttle, K.R., Rodriguez-Iturbe, B., Herrera-Acosta, J., Mazzali, M., 2003. Is there a pathogenic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease?

- Hypertension 41, 1183–1190. <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.0000069700.62727.C5>.
- Jordá, A., Gomez, M., Cabo, J., Grisolia, S., 1982. Effect of streptozotocin diabetes on some urea cycle enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 37–43. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)92054-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(82)92054-X).
- Kapitulnik, J., 2004. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol. Pharmacol.* 66, 773–779. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.002832>.
- Laakso, M., 2009. Lipid disorders in type 2 diabetes. *Endocrinol. Nutr.* 56, 43–45. [http://dx.doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)73517-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1575-0922(09)73517-X).
- Lee, D.-H., Ha, M.-H., Kim, J.-H., Christiani, D.C., Gross, M.D., Steffes, M., Blomhoff, R., Jacobs, D.R., 2003. Gamma-glutamyltransferase and diabetes – a 4 year follow-up study. *Diabetologia* 46, 359–364. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-003-1036-5>.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>.
- Madianov, I.V., Balabolkin, M.I., Markov, D.S., Markova, T.N., 2000. Main causes of hyperuricemia in diabetes mellitus. *Ter. Arkh.* 72, 55–58.
- Malloy, H.T., Evelyn, K.A., 1937. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 119, 481–490.
- Mason, J.E., Starke, R.D., Van Kirk, J.E., 2010. Gamma-glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk biomarker. *Prev. Cardiol.* 13, 36–41. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7141.2009.00054.x>.
- Mogensen, C.E., 1984. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N. Engl. J. Med.* 310, 356–360.
- Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., Zinman, B., 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care* 32, 193–203. <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-9025>.
- Navarro, M.C., Montilla, M.P., Martín, A., Jiménez, J., Utrilla, M.P., 1993. Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus*. *Planta Med.* 59, 312–314.
- Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V., 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.* 29, 91–98.
- Ramachandran, B., Ravi, K., Narayanan, V., Kandaswamy, M., Subramanian, S., 2004. Protective effect of macrocyclic binuclear oxovanadium complex on oxidative stress in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 149, 9–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2004.06.007>.
- Sapin, R., Le Galudec, V., Gasser, F., Pinget, M., Grucker, D., 2001. Elecsys insulin assay: free insulin determination and the absence of cross-reactivity with insulin Lispro. *Clin. Chem.* 47, 602–605.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N., 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043–1046. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3029864>.
- Subash-Babu, P., Ignacimuthu, S., Agastian, P., 2008. Insulin secretagogue effect of *Ichnocarpus frutescens* leaf extract in experimental diabetes: a dose-dependent study. *Chem. Biol. Interact.* 172, 159–171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2007.12.004>.
- Szasz, G., 1969. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.* 15, 124–136.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.
- Takasu, N., Komiya, I., Asawa, T., Nagasawa, Y., Yamada, T., 1991. Streptozotocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets: H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 40, 1141–1145. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.40.9.1141>.
- Talke, H., Schubert, G.E., 1965. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut Und serum Im Optischen test Nach Warburg. *Klin. Wochenschr.* 43, 174–175. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01484513>.
- Taskinen, M., 1987. Lipoprotein lipase in diabetes. *Diabetes Metab. Rev.* 3, 551–570.
- Teschke, R., Brand, A., Strohmeyer, G., 1977. Induction of hepatic microsomal gamma-glutamyltransferase activity following chronic alcohol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 718–724.
- Trinder, P., 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.* 22, 158–161. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>.
- Tuñón, M.J., Gonzalez, P., Garcia-Pardo, L.A., Gonzalez, J., 1991. Hepatic transport of bilirubin in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Hepatol.* 13, 71–77. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278\(91\)90866-A](http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278(91)90866-A).
- Turk, J., Corbett, J.A., Ramanadham, S., Bohrer, A., Mcdaniel, M.L., 1993. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1458–1464.
- Vavra, J.J., Deboer, C., Dietz, A., Hanka, L.J., Sokolski, W.T., 1960. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot. Annu.* 7, 230–235.
- Vergès, B., 2009. Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 35, 353–360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2009.04.004>.
- Williams, G., 1994. Management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 343, 95–100. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90822-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90822-2).