

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار-عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Option : Biochimie

Présentée Par *DEROUICHE SAMIR*

Thème

Effet de la supplémentation en zinc sur le statut du zinc et des aspects biochimiques chez des rats sains et diabétiques nourris avec un régime alimentaire riche en cuivre et calcium

Soutenu le : 09 Novembre 2016

Devant le jury :

Président :	Mr. SAKA Saad	Prof	Université Badji Mokhtar- Annaba-
Rapporteur :	Mr. KECHRID Zine	Prof	Université Badji Mokhtar- Annaba-
Examineurs:	Mr. ATALAH Salah	Prof	Université Frères Mentouri - Constantine-
	Mr. DJABRI Belgacem	Prof	Université Larbi Tébessi - Tébessa-

2015-2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Avant toute chose, je remercie « Allah », l'omnipotent, pour m' avoir donné la force, la patience et le courage pour mener ce travail à son terme.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à Mr Z. KECHRID, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de m' encadrer, pour son dynamisme, son aide et ses précieux conseils, nos ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches.

Je remercie Mr S. SAKA, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Hommage respectueux.

Mes remerciements sincères et respectueux vont également A Monsieur S. ATTALAH, Professeur , Université Mentouri Constantine, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je suis honorée de sa présence. Qu'il soit assuré de ma sincère gratitude.

Je remercie infiniment Mr B.DJABRI maitre de conférence, Université Larbi Tebessi Tébéssa pour sa précieuse pour avoir accepté d'examiner et de venir honorer de sa présence mon jury de thèse. Qu'il me soit permis de lui exprimer mon profond respect.

Je souhaite exprimer mes sincères et profonds remerciements de Mme ABBAS K, Mme DJERMOUN M, M^{lle} DJOUADI A et M^{lle} ZEGHIB K pour leur aide au cours de la réalisation de ce travail

Je remercie également les membres du laboratoire de spectroscopie de departement de l'agronomie- Université de biskra pour leur aide et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer.

Je n'oublie pas de présenter mes remerciements à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Résumé

Le but de ce travail était d'étudier l'effet de la supplémentation en zinc sur le statut de zinc, l'activité de certains enzymes à zinc et le métabolisme des glucides, lipides et protéines chez des rats sains et diabétiques albinos (Wistar) nourris avec un régime riche en cuivre ou en calcium.

Ce travail est divisé en deux parties, la première est pour 60 rats répartis en six groupes (n=10). Le premier et le quatrième groupe ont servi de témoin sains et diabétiques. Le deuxième, troisième, cinquième et sixième groupe sont sert de sain cuivre, sain cuivre + zinc, diabétique cuivre et diabétique cuivre + zinc respectivement. Pour la deuxième partie (40 rats), les deux témoins, sains et diabétiques, ont été réutilisés en plus d'autres groupes, sain calcium, sain calcium + zinc, diabétique calcium et diabétique calcium + zinc.

Les rats sont rendus diabétiques par injection intra péritonéale de 150 mg/kg d'alloxane (dose unique). Le Cuivre (30 mg/ kg d'aliment) sous forme $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, le Calcium (35g /kg d'aliment) sous forme CaCO_3 et le Zinc (231 mg / kg d'aliment) sous forme $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ont été supplémenté dans l'alimentation pour les différents groupes expérimentaux. Le poids corporel et la consommation alimentaire sont mesurés régulièrement. Après 21 jours de traitement, les rats sont sacrifiés et les concentrations de zinc sérique et tissulaire, activité des enzymes à zinc et quelques paramètres biocimique et de stress oxydative sont déterminés.

A partir de l'analyse des résultats; la supplémentation en cuivre et calcium dans l'alimentation a provoqué un déficit pondéral, une diminution de la consommation alimentaire, de la concentration du zinc dans le sérum et les différents tissus (foie, rein, pancréas et testicule), des protéines totales, de glutathion réduit (GSH) hépatique et une diminution de l'activité des enzymes à zinc (PAL, aldolase, amylase et LDH). Par contre les deux éléments minéraux ont induit une augmentation des concentrations de glucose, de cholestérol, de triglycérides, l'urée, la créatinine et d'acide urique, MDA hépatique et des activités de transaminases (ASAT, ALAT) chez les rats sains ou diabétiques. Cependant un supplément alimentation de zinc a assuré une correction partielle des paramètres étudiés.

En conclusion, la présente étude montre l'effet bénéfique du traitement par le zinc contre les perturbations métaboliques induit par le cuivre et le calcium chez les rats sains et diabétiques.

Mots clés : rats, zinc, diabète, alloxan, phosphatase alcaline, cuivre, calcium

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of zinc supplementation on zinc status, enzymes zinc depending activities, and carbohydrate metabolism in diabetic albino (Wistar) rats fed a diet enriched with copper or calcium.

The study was performed with two experiments. The first experiment was designed as follows: animals were randomly divided into six groups (n=10). The first and fourth groups were non-diabetic and diabetic controls. The second, third, fifth and sixth groups were copper, copper+zinc, diabetic+copper, diabetic+copper+zinc groups respectively. In the second experiment both non-diabetic and diabetic controls were utilized with other groups, calcium, calcium+zinc, diabetic+calcium and diabetic+calcium+zinc.

Diabetes was induced intraperitoneally with alloxan in single dose (150mg/kg b.wt). Copper (30 mg/kg feed) as $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, calcium (35g/kg feed) as CaCO_3 and zinc (231 mg/kg feed) as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in feed were supplemented to the animals in copper, calcium and zinc groups. Body weight and food intake were recorded regularly. After 21 days of treatment, rats were sacrificed and serum and tissue zinc concentration, zinc enzymes activities and some biochemical and oxidative stress parameters are determined.

The findings showed that copper and calcium supplementations in diet caused a decrease in low body weight, food intake, zinc concentration in serum and various tissues (liver, kidney, pancreas and testes), total proteins level, liver reduced glutathione content and a decrease in enzymes depending zinc activities (PAL, aldolase, amylase and LDH). Meanwhile both metals led to an increase concentrations of glucose, cholesterol, triglycerides, urea, creatinine and uric acid, liver MDA and transaminases activities (GOT, GPT) either in diabetic or non-diabetic rats. However zinc supplementation to diet for copper and calcium animals assured a partial corrective on the previous parameters.

In conclusion, this study demonstrated the beneficial effect of zinc treatment against copper and calcium induced metabolic disturbance in diabetic and non-diabetic rats.

Keywords: : rats, zinc, diabetes, alloxan, alkaline phosphatase, copper, calcium

الملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة تأثير عنصر الزنك على محتوى الزنك في الجسم ونشاط بعض الانزيمات المتعلقة بالزنك و ايضا المواد الكربوهيدراتية عند جرذان سليمة واخرى مصابة بداء السكري نوع Wistar موضوعة تحت نظام غذائي غني بالنحاس و الكالسيوم.

هذا العمل مقسم الى جزئين، الجزء الاول اعتمد على 60 جرذ مقسم الى 6 مجموعات 10 جرذان في كل مجموعة موزعة كالاتي :المجموعة الاولى و الرابعة هي للشواهد من الجرذان السليمة و المصابة بالسكري اما المجموعة الثانية و الثالثة و الخامسة و السادسة هي للجرذان السليمة معالجة بالنحاس، سليمة معالجة بالنحاس+الزنك، مصابة بالسكري معالجة بالنحاس و مصابة بالسكري معالجة بالنحاس+الزنك على التوالي. أما الجزء الثاني من العمل فاعتمد على 40 جرذ والذي احتفظنا فيه بالشاهدين من الجرذان السليمة و المصابة بالسكري من الجزء الاول اما باقي المجموعات مكونة من جرذان سليمة معالجة بالكالسيوم، سليمة معالجة بالكالسيوم+الزنك، مصابة بالسكري ومعالجة بالكالسيوم و أخيرا مصابة بالسكري و معالجة بالكالسيوم+ الزنك. الفئران اصبحت مصابة بالسكري بواسطة حقن 150 مغ/كغ تحت الصفاق من مادة الالوكسان. ثم تم اضافة كل من النحاس 30مغ/ كغ غذاء على شكل ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) و الكالسيوم 35 مغ / كغ غذاء على شكل (CaCO_3) و الزنك 231مغ / كغ غذاء على شكل ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) الى النظام الغذائي المتبع للجرذان اثناء المعالجة و التي دامت 21 يوما. كما تم تقدير الوزن وكمية الغذاء المستهلكة بشكل دوري. بعد 21 يوم من المعالجة تم تقدير تراكيز الزنك في المصل و الانسجة ونشاط بعض الانزيمات المتعلقة بالزنك و كذلك بعض المعايير البيوكيميائية و الاجهاد التأكسدي.

النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة أثبتت أن زيادة النحاس و الكالسيوم في الغذاء عند الحيوانات السليمة او المصابة بالسكري أدى الى انخفاض في معدل النمو وكمية الغذاء المستهلكة وانخفاض واضح في مستوى تركيز الزنك في المصل وفي الانسجة المدروسة الكبد الكلية الخصية و البنكرياس وكذلك ادى الى انخفاض في نشاط بعض الانزيمات المتعلقة بعنصر الزنك وفي تركيز البروتينات الكلية وفي كمية الجلوتاثيون المختزل الكبدي. النتائج أظهرت أيضا أن زيادة عنصر النحاس والكالسيوم في الغذاء أدى الى زيادة في كل من مستوى السكر في الدم و الغليسيريدات الثلاثية والكوليسترول و اليوريا والكرياتينين و حامض اليوريك وزيادة في نشاط الانزيمات الناقلة للأمين وفي معدل مؤشر الاكسدة الليبيدية عند الفئران السليمة والمصابة. لكن المعالجة بواسطة عنصر الزنك عملت على تحسين و استعادة جزئية لمستوى المؤشرات المدروسة.

خلاصة ان هذه الدراسة بينت التأثير الفعال للزنك ضد الاضطرابات الايضية الناجمة عن زيادة النحاس و الكالسيوم عند الفئران السليمة او المصابة بداء السكري.

الكلمات المفتاحية: جرذان، مرض السكري، الزنك، الكوكسان، الفوسفاتاز القلوي، النحاس، الكالسيوم.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AGE: Advanced Glycated End-product (produits terminaux de glycation).

ATPases: adénosines triphosphatases .

BHT : Butyl hydroxy toluene

BSA : Sérum albumine bovine

CaBP: Calcium binding protein

CCS: Chaperon Copper pour la superoxyde dismutase

Cu/Zn-SOD : Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc.

CV-B4: coxsackievirus B4

DAG: Diacylglycérol.

DHAP: Dihydroxyacétone phosphate.

DMT1: Transporteur de métal bivalent 1

DPP4: dipeptidyl peptidase 4

DRO: Dérivé Réactive de l'Oxygène.

DTNB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou reactif d'Ellman.

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique acid.

ERN : Espèces Reactives de l'azote

ERO: Espèce Réactive d'Oxygène.

GAD: Glutamate acide décarboxylase

GFAT: Glutamine Fructose 6 phosphate amido-transférase.

GLP1: glucagon like peptide 1

GPx : Glutathion peroxydase

GRase : Glutathion réductase

GST : Glutathion –S- transférase

HMG CoA R: Hydroxy-3-méthyle-glutaryl-CoA réductase

IA2: Insulinoma Associated protein 2

IAA : Auto-Anti-corps anti insuline

ICA: Islet cell anti body ou anticorps anti-îlots

IL-1 : Interleukine-1.

IL-6 : Interleukine-6.

IMC : Indice de masse corporelle

IRS: insulin receptor substrates (substrats de récepteur de l'insuline)

LPO : Lipides Peroxydés

Mn-SOD : Superoxyde dismutase associée au manganèse.

MT : Métallothionéines

NML: nucléaire Menkes-like protein

NRAMP2: Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PFK: Phosphofructokinase

PI-3K: phosphatidylinositol-3 kinase

PK: pyruvate kinase

PKC : Protéine Kinase C.

PTH: Parathormone

PTP 1B: Protéine tyrosine phosphatase 1B

SDH: Sorbitol déshydrogénase

STZ : Streptozotocine

TBA : Thiobarbituric acid: L'acide thiobarbiturique

TCA : Trichloroacétique.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor ou facteur de nécrose tumorale.

VDR: Récepteur de la vitamine D

ZnT : Transporteur de zinc

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Structure du gène de l'insuline.....	06
Figure 02. Structure du récepteur de l'insuline.....	07
Figure 03 : Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline.....	12
Figure 04 : Structure de l'alloxane.....	13
Figure 05: Réactions cycliques redox entre l'acide alloxane et dialurique.....	13
Figure 06: Transporteurs de zinc	19
Figure 07: Homéostasie du Zinc.....	22
Figure 08 : Site structural et catalytique des protéines à zinc	24
Figure 09 : Mécanisme d'action des sites catalytiques à zinc	25
Figure 10: Hexamère d'insuline complexé à deux atomes de Zn.....	27
Figure 11: Effet du Zn et du couple redox sur la phosphorylation du récepteur à l'insuline.....	28
Figure 12 : Métabolisme du cuivre dans les entérocytes.....	31
Figure 13: Eléments de l'homéostasie du cuivre	33
Figure 14 : Voies d'absorption du calcium	37
Figure 15 : Voie para cellulaire	37
Figure 16 : Voie trans-cellulaire.	38
Figure 17 : Régulation hormonale de calcium	41
Figure 18: Schéma récapitulatif de protocole expérimental.....	52
Figure 19: Réaction de dialdéhydemalonique avec l'acide Thiobarbiturique.....	60
Figure 20 : Réaction d'Ellman	61
Figure 21 : Variation du poids corporel chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	65
Figure 22 : Variation de la consommation alimentaire chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	65

Figure 23: Variation de la concentration de zinc dans le sérum, le foie, les reins, le pancréas et les testicules chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	68
Figure 24: Variation de l'activité enzymatique de l'amylase, de la phosphatase alcaline (PAL), de lactate déshydrogénase (LDH) et de l'aldolase chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	71
Figure 25: Variation de la concentration sérique de glucose, des triglycérides et du cholestérol chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de Traitement.	73
Figure 26: Variation de la concentration sérique de l'urée, la créatinine, l'acide urique et les protéines totales chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement	75
Figure 27: variation de l'activité enzymatique sérique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	77
Figure 28: Variation de la teneur hépatique de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement	78
Figure 29: Variation de la teneur hépatique du glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	79
Figure 30: Variation du poids corporel chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	81
Figure 31: Variation de la consommation alimentaire chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	81
Figure 32: Variation de la concentration de zinc dans le sérum, le foie, les reins, le pancréas et les testicules chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	84
Figure 33: Variation de l'activité enzymatique de l'amylase, de la phosphatase alcaline (PAL), de lactate déshydrogénase (LDH) et de l'aldolase chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	87
Figure 34: Variation de la concentration sérique de glucose, des triglycérides et du cholestérol chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....	89

- Figure 35:** Variation de la concentration sérique de l'urée, la créatinine, l'acide urique et les protéines totales chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....91
- Figure 36:** Variation de l'activité enzymatique sérique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....93
- Figure 37:** Variation de la teneur hépatique de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....94
- Figure 38:** Variation de la teneur hépatique du glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.....95

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01: Apports journaliers recommandés en Zinc	17
Tableau 02: Facteurs influençant la résorption du zinc	18
Tableau 03 : Composition de l'alimentation utilisée.....	51
Tableau 04: Quantité des métaux dans l'alimentation	51

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I Diabète sucré	
1. Définition de diabète sucré.....	05
2. Insuline.....	05
2.1. Définition de l'insuline.....	05
2.2. Structure de l'insuline.....	05
2.3. Structure du gène de l'insuline.....	06
2.4. Synthèse de l'insuline.....	06
2.5. Récepteur de l'insuline.....	07
2.6. Rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme cellulaire.....	08
3. Types de diabète.....	08
3.1. Diabète de Type 1	08
3.1.1. Définition	08
3.1.2. Physiopathologie.....	08
3.2. Diabète de type 2.....	10
3.2.1. Définition.....	10
3.2.2. Physiopathologie.....	10
4. L'insulinorésistance.....	11
4.1. Définition.....	11
4.2. Mécanisme.....	11
5. Insulinodéficience.....	12
6. Complications de diabète.....	12
7. Diabète expérimental.....	12
8. Traitement du diabète	14
CHAPITRE II Le zinc	
1. Définition de zinc	16
2. Besoin et source de zinc.....	16
3. Métabolisme de zinc	17
3.1. Absorption et biodisponibilité	17

3.1.1 Absorption.....	17
3.1.2. Biodisponibilité.....	18
3.2. Transport et Distribution.....	19
3.2.1. Transport.....	19
3.2.2. Distribution	20
3.3. Élimination	20
4. Statut et régulation de l'homéostasie de zinc	21
4.1. Statut de zinc.....	21
4.2. Régulation de l'homéostasie de zinc.....	21
5. Rôle du zinc dans l'organisme.....	22
5.1. Rôle de zinc dans les systèmes biologiques	22
5.2. Rôle de zinc dans l'activité protéique	23
5.3. Rôle antioxydant du zinc.....	25
6. Effet pathologiques de carence en zinc.....	26
7. Zinc et diabète.....	26
7.1. Zinc et insulinosécrétion.....	26
7.2. Zinc et insulino-résistance.....	27

CHAPITRE III Cuivre et Calcium

I. Cuivre

1. Métabolisme du cuivre	30
1.1. Absorption	30
1.2. Transports et Distribution	31
1.2.1. Transport	31
1.2.2. Distribution	32
1.2.2.1. Maintien du stock en cuivre	32
1.2.2.2. Molécules chaperons.....	33
1.2.2.3. Répartition dans l'organisme.....	34
1.2.3. Pertes et élimination du cuivre.....	34
2. Rôle physiologique du cuivre	34
3. Pathologie associée au cuivre.....	35
3.1. Effets toxiques du cuivre	35
3.2. Maladies héréditaires du métabolisme du cuivre.....	35

3.3. Maladies neurodégénératives du cuivre.....	36
---	----

II-Calcium

1.Métabolisme du calcium	36
1.1. Absorption	36
1.2. Distribution dans l'organisme	39
1.3. Elimination de calcium	40
1.4. Régulation du métabolisme calcique	41
2. Rôle physiologiques du calcium	42
3. Pathologies associe au calcium.....	43
3.1. Hypercalcémie	43
3.1.1. Définition.....	43
3.1.2. Etiologies	44
3.1.3. Effet de l'hypercalcémie.....	44
3.2. Hypocalcémie.....	45
3.2.1. Définition.....	45
3.2.2. Etiologies.....	45

DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I Matériels et Méthodes

1. Matériel biologique et conditions d'élevage.....	49
2. Induction du diabète expérimental chez les rats.....	49
3. Traitement des animaux.....	49
4. Sacrifices et prélèvements des échantillons.....	51
4.1. Prélèvement sanguin	51
4.2. Prélèvement des organes.....	51
5. Méthodes de dosage du zinc.....	53
6. Méthodes de dosage des enzymes à zinc.....	53
6.1. Phosphatase alcaline.....	53
6.2. Lactate déshydrogénase.....	53
6.3. Fructose 1,6 bi phosphate aldolase	54
6.4. Alpha amylase.....	54
7. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques.....	55
7.1. Dosage du cholestérol total.....	55

7.2. Dosage des triglycerides.....	55
7.3. Dosage des protéines totales sériques.....	56
7.4. Dosage de l'urée.....	56
7.5. Dosage de la créatinine.....	57
7.6. Dosage de l'acide urique.....	57
7.7. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (TGP).....	58
7.8. Dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase ASAT (TGO).....	58
7.9. Dosage de MDA et GSH hépatique.....	59
7.9.1. Préparation de l'homogénat	59
7.9.2. Dosage des protéines tissulaires.....	59
7.9.2.1. Principe.....	59
7.9.2.2. Méthode de dosage.....	59
7.9.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	59
7.9.3.1. Principe.....	59
7.9.3.2. Méthode de dosage.....	60
7.9.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH)	61
7.9.4.1. Principe.....	61
7.9.4.2. Méthode de dosage.....	61
8. Traitement statistique des résultats.....	62

CHAPITRE II Résultats

1. Effet du zinc sur des rats alimentés par un régime riche en Cuivre.....	64
1.1. Etude de la croissance corporelle et la consommation alimentaire	64
1.1.1. Croissance corporelle.....	64
1.1.2. Consommation alimentaire	64
1.2. Etude de statut du zinc dans l'organisme.....	66
1.2.1. Concentration du zinc sérique et tissulaire.....	66
1.2.2. Activité de certains enzymes à zinc	69
1.3. Etude des paramètres biochimiques	71
1.3.1. Glucose, triglycérides et cholestérol.....	71
1.3.2. Urée, créatinine, acide urique et protéines totales.....	73
1.3.3. Activité des transaminases (ASAT, ALAT).....	76

1.3.4. Malondialdéhyde (MDA) et Glutathion réduit (GSH) hépatique.....	77
2. Effet de zinc sur des rats alimentés par un régime riche en calcium.....	80
2.1. Etude de la croissance corporelle et la consommation alimentaire	80
2.1.1. la croissance corporelle.....	80
2.1.2. la consommation alimentaire.....	80
2.2. Etude de statut du zinc dans l'organisme.....	82
2.2.1. Concentration du zinc sérique et tissulaire.....	82
2.2.2. Activité de certains enzymes à zinc	85
2.3. Etude des paramètres biochimiques	87
3. Glucose, triglycérides et cholestérol.....	87
4. Urée, créatinine, acide urique et protéines totales.....	89
5. Activité des transaminases (ASAT, ALAT).....	92
6. Malondialdéhyde (MDA) et Glutathion réduit (GSH) hépatique.....	93
CHAPITRE III Discussion.....	97
Conclusion et perspectives	109
Références bibliographiques.....	112
Annexes	145

Introduction

INTRODUCTION

Le diabète sucré est une maladie métabolique chronique qui touche 8.5% de la population mondiale (OMS, 2016), il est caractérisé par une hyperglycémie chronique, que l'on doit soigner, depuis sa découverte, tout au long de la vie. L'organisation mondiale de la sante (OMS) estimait a plus de 422 millions le nombre de diabétiques dans le monde en 2014. Le diabète est une maladie très dangereuse car une hyperglycémie chronique va entrainer plusieurs complications à long terme, notamment des yeux (rétinopathie diabétique), des reins (néphropathie diabétique), du cœur (coronaropathie) et des vaisseaux sanguins (artériopathie) et parfois, il s'arriver à l'état de pied diabétique (Bouysset, 2004).

Les minéraux sont des éléments chimiques simples indispensables pour l'organisme vivant, ils jouent un rôle important dans le fonctionnement des différents systèmes biologiques. De nombreux de ces éléments métalliques ont une grande importance en médecine et en thérapeutique et sont répertoriés et impliqués dans la physiopathologie de la maladie diabétique ou ses conséquences vasculaires (Chappuis et Favier, 1991).

Le zinc est un oligo-élément essentiel, nécessaire pour la fonction et l'activité de plus de 200 métalloenzymes (Debjit et al., 2010). Ces enzymes sont impliqués dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Afkhami et al., 2008) . Le zinc est aussi nécessaire pour le métabolisme et l'action de l'insuline. L'insuline est stockée sous la forme d'un hexamère contenant deux ions zinc dans les cellules β du pancréas (Katleen et al., 2012). Il semble donc raisonnable que les changements dans l'état de zinc dans le corps pourraient affecter la production, le stockage et la sécrétion d'insuline (Kira et al., 2013; Nisa et al., 2015). La présence de l'hyperzincurie et la basse absorption intestinale du zinc au cours de diabète ont approuvé la spéculation que les diabétiques sont plus susceptibles au carence du zinc (Shahidul et Loots, 2007). En outre, les interactions compétitives entre le zinc et d'autres ions ayant des propriétés physico-chimiques similaires peuvent affecter l'absorption intestinale du zinc (Miguel, 2006).

D'autre part le cuivre a fait l'objet de nombreux travaux dès le début de ce siècle. Le cuivre intervient dans plusieurs fonctions fondamentales de l'organisme et est connu comme un élément qui doit être associé à certains enzymes pour permettre à ceux-ci de jouer pleinement leur rôle dans le métabolisme humain (Chappuis et al., 2005). Le cuivre est également impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Naziroğlu et Yürekli , 2013). Il est également incorporée dans un certain nombre de métalloenzymes impliqués dans la formation de

l'hémoglobine, le métabolisme des glucides, biosynthèse des catécholamines et la réticulation du collagène (Osredkar et Sustar, 2011).

Le calcium étant le minéral le plus abondant du corps humain, il assure une des fonctions principales dans différents systèmes biologiques comme la formation des os et des dents, participe également à la coagulation sanguine, à la contraction musculaire, à la conduction nerveuse et à la libération d'hormones (Houillier, 2002). La supplémentation du calcium contribue à résoudre les problèmes de l'ostéoporose, l'hypertension, le cancer du côlon et les maladies cardiovasculaires (Ian et al., 2010). Certains éléments minéraux sont purement toxiques pour les êtres vivants; d'autres, essentiels à l'organisme et à de nombreuses fonctions biologiques, génèrent tout de même des effets néfastes sur l'organisme, passé un certain seuil de concentration (Huffman et O'Halloran, 2001).

Partant de ce constat, l'idée originale de notre travail de thèse était d'étudier et d'évaluer, chez des rats de la souche wistar rendus diabétiques suite à l'injection de l'alloxane, l'effet de la supplémentation du zinc pour la prévention des complications de diabète induit par l'excès de cuivre et de calcium.

Au vu de ces données, dans notre étude nous allons en premier temps présenter quelques connaissances dans la partie bibliographique sur : Le diabète, métabolisme et rôle de zinc, de cuivre et de calcium dans l'organisme. Puis dans la partie expérimentale, nous allons intéresser aux effets de zinc sur la dysfonction des systèmes biologiques provoqué par un supplément alimentaire de cuivre ou de calcium et associé au diabète chez les rats en évaluant les aspects biochimiques suivants :

- L'étude des paramètres de croissance ;
- L'étude de statut du zinc dans l'organisme ;
- L'étude de l'activité de certains enzymes à zinc dans l'organisme ;
- L'étude de quelques paramètres biochimiques et de stress oxydatif (MDA et GSH).

Etude bibliographique

CHAPITRE I

Diabète sucré

1. Définition de diabète sucré

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides des lipides et des protéines entraînant une hyperglycémie chronique (Grimaldi, 2001), résultant d'une insuffisance de la sécrétion ou l'action de l'insuline. Cette hyperglycémie produit les symptômes classiques; polyurie (miction fréquente), polydipsie (soif accrue) et polyphagie (augmentation de la faim) (Aouacheri et al., 2015). Selon l'OMS, le diabète sucré se définit comme un état d'hyperglycémie permanente avec une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/l (7mmol) à 2 reprises et/ou supérieure à 2 g/l (11,1mmol/l) à n'importe quel moment de la journée (Guillausseau, 2003; Garabedian et al., 2010).

2. Insuline

2.1. Définition de l'insuline

L'insuline est une hormone formée dans les îlots de Langerhans. Certain nombre d'études récentes suggèrent que des neurones particuliers, situés dans l'hypothalamus, ont également la capacité d'exprimer le gène et de synthétiser l'hormone (Magnan et Ktorza, 2005). Elle permet au glucose d'entrer dans les cellules et de leur fournir l'énergie dont elles ont besoin. Elle joue un rôle majeur dans le mécanisme du diabète. Quand le niveau de glucose est élevé dans le sang, les cellules du pancréas sécrètent de l'insuline (Stephen et al., 2004). Il joue un rôle anabolique majeur dans la mise en réserve des substrats glucidiques et lipidiques. Ses effets résultent de sa liaison à un récepteur membranaire spécifique exprimé en priorité sur ses trois tissus cibles (le foie, le muscle et le tissu adipeux) (Capeau, 2003).

2.2. Structure de l'insuline

L'insuline est un petit polypeptide de 51 acides aminés d'environ 6 kDa (De Meyts, 2004), composé de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne α comporte 21 acides aminés et la chaîne β comporte 30, reliées entre elles par deux ponts disulfures. Un pont disulfure intracaténaire relie les acides aminés 6 et 11 de la chaîne α (Magnan et Ktorza, 2005). L'insuline est formée à partir d'un précurseur, la pro-insuline, sous l'effet des protéases. La pro insuline est un polypeptide monocaténaire. Sa molécule comprend plus de 80 acides aminés. La pro-insuline représente la molécule d'insuline (fermée) par un peptide qui assure la liaison entre le carboxyle terminal de la chaîne β de l'insuline et la fonction amine terminale de la chaîne α . Ce peptide dit peptide C, rend la molécule d'insuline biologiquement inactive. Sous l'effet des enzymes protéolytiques, le peptide C se détache de la molécule d'insuline, ce qui fait que la molécule de pro-insuline scinde en

molécule d'insuline et en peptide C. Ce dernier est formés de 27-33 acide aminés. Sa masse moléculaire est de 3000 Da (Seok, 2012).

2.3. Structure du gène de l'insuline

Le gène de l'insuline humaine est situé sur le bras court du chromosome 11, à proximité du gène de (IGF-2) (Magnan et Ktorza, 2005). Ce gène contrôle la synthèse d'un précurseur de haut poids moléculaire, la pré-pro-insuline. Il est long de 1355 paires de bases et sa région codante comporte trois exons séparés de deux introns (région non transcrites), qui comportent respectivement 179 et 786 paires de bases. Le premier exon, long de 42 paires de bases, contrôle la synthèse du peptide signal. Le deuxième exon (187 paires de bases) code pour la chaîne β de l'insuline et une partie du peptide connecteur, le troisième exon dont la taille est de 220 paires de bases, code pour la chaîne B et le reste du peptide connecteur (figure 01) (Magnan et Ktorza, 2005).

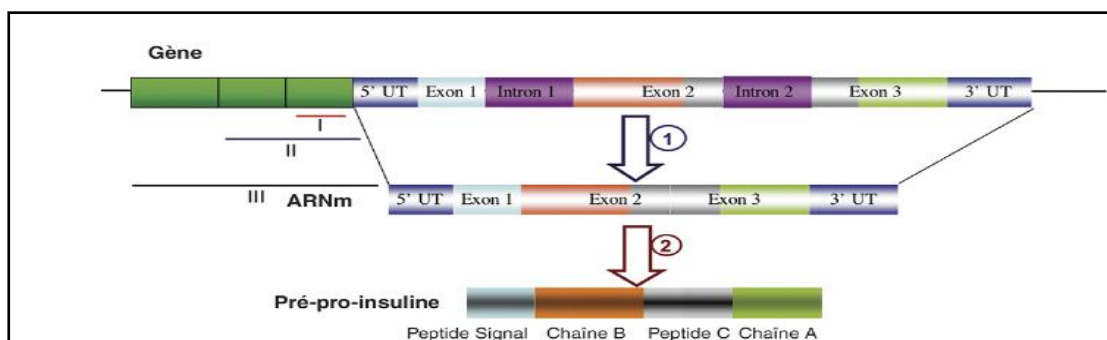


Figure 01: Structure du gène de l'insuline (Magnan et Ktorza, 2005).

2.4. Synthèse de l'insuline

Le gène de la prépro-insuline (PPI) est sous la dépendance de nombreux facteurs de transcription comme PDX-1. L'ARNm est traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux et la prépro-insuline est aussitôt clivée en pro-insuline(PI). La maturation de pro-insuline se fait à travers l'appareil de Golgi. Dans le réseau trans de l'appareil de Golgi, les vésicules immatures couvertes de clathrine sont formées. La maturation des vésicules de sécrétion implique la perte du manteau de clathrine et la coupure par les enzymes prohormone-convertase (PC2 et PC1/3) de la pro-insuline en insuline et peptide C. Les vésicules sécrétoires matures peuvent alors se diriger vers la voie de sécrétion Constitutive. Dans la voie régulée leur contenu sera libéré par une stimulation calcique. Après l'exocytose les vésicules sont endocytées. Puis recyclées vers l'appareil de Golgi via le compartiment endosomal. Les micro vésicules de type synaptique

(MVTs), plus petites que les vésicules sécrétoires, ont un cycle d'exocytose-endocytose indépendant de l'appareil de Golgi (Wang et al., 2000; Melloul et al., 2002; Zhuo et al., 2013).

2.5. Récepteur de l'insuline

L'action d'insuline est médiée par un récepteur, décrit pour la première fois par Freychet et isolé par Cuatrecasas (Cuatrecasas, 1971; Freychet et al., 1971). Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire appartient à la famille de récepteurs à activité tyrosine kinase (Estefanía, 2014), il est exprimé sur presque tous les types cellulaires des vertébrés (Kahn et Folli, 1993). Le gène codant ce récepteur est situé sur le chromosome 19 chez l'être humain. Dans sa configuration naturelle à l'état non activé, le récepteur de l'insuline se présente sous la forme d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités β et de deux sous-unités α , liées de façon covalente par des ponts disulfures (De Meyts, 2005). Les sous-unités α sont entièrement extracellulaires et contiennent les domaines de liaison à l'insuline. Les sous-unités β sont constituées par un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une partie intracellulaire (figure 02) (Kenji et Fumiaki, 2011).

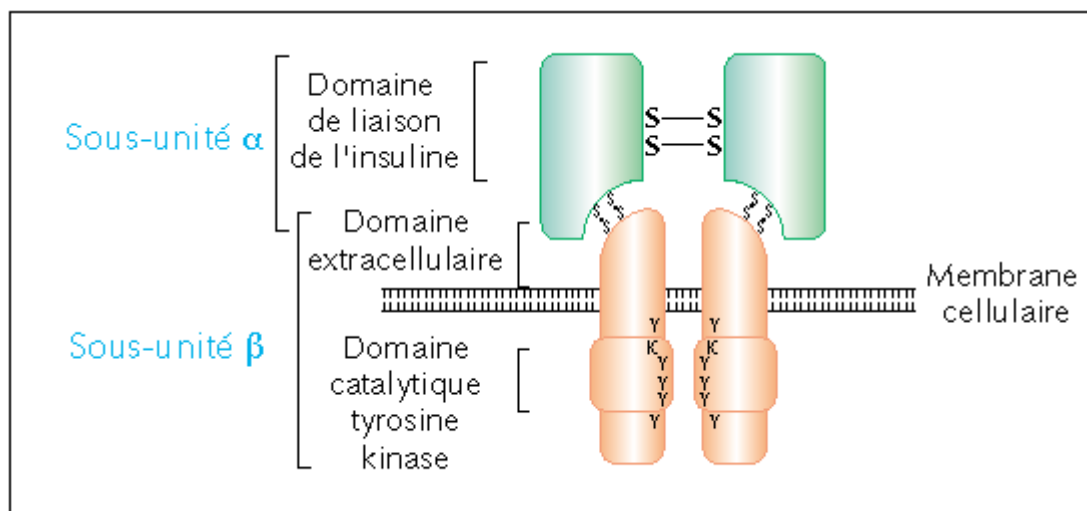


Figure 02: Structure du récepteur de l'insuline. K : lysine site de fixation de l'ATP ; Y : tyrosine site de phosphorylation (Corinne et al., 1999).

L'activation du récepteur va entraîner la liaison de l'ATP sur son site consensus et le dépliement de la boucle régulatrice qui occluait le site catalytique à activité tyrosine kinase. (Bruce et al., 2002).

En l'absence d'hormone, les sous-unités alpha exercent une inhibition permanente sur l'activité tyrosine kinase des sous-unités β . La liaison de l'insuline induit un changement conformationnel qui lève cette contrainte et permet à l'activité tyrosine kinase de s'exercer. Il y a

alors trans-autophosphorylation de chacune des sous-unités β sur des résidus tyrosine spécifiques dont les plus importants sont situés aux positions 1158, 1162 et 1163. Le récepteur ainsi phosphorylé devient actif, c'est-à-dire qu'il acquiert la capacité de phosphoryler d'autres protéines substrats (activité tyrosine kinase exogène) Corinne et al., 2011) .

2.6. Rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme cellulaire

L'insuline est un facteur de croissance ubiquiste qui régule la prolifération cellulaire, l'expression des gènes, la synthèse des protéines et la survie cellulaire dans la plupart des tissus mammifères (Wang, 2008). L'insuline a un rôle essentiel dans la mise en réserve et l'oxydation du glucose absorbé au niveau de l'intestin après les repas (Capeau et al., 1996). Elle module aussi la transcription, stimule la croissance, la synthèse de l'ADN et la division cellulaire (Jaya et al., 2009). Elle favorise la glycogénogénèse en agissant sur le transport du glucose et la glycogène synthétase. Elle inhibe la glycogénolyse et de la néoglucogénèse stimulées par le glucagon. L'insuline joue aussi un rôle principalement dans la synthèse et le stockage de triglycérides, grâce à l'activation de la lipoprotéine lipase et de la lipogénèse et inhibe la lipolyse adipocytaire (Capeau et al., 1996).

3. Types de diabète

3.1. Diabète de Type 1

3.1.1. Définition

Ce type de diabète touche préférentiellement les personnes les plus jeunes et provient d'une destruction progressive des cellules β du pancréas, qui sécrètent l'insuline (Woo, 2004), la destruction de ces cellules conduisant généralement à une insulino-pénie totale (l'hyperglycémie devient cliniquement manifeste quand 80% à 90% des cellules β sont atteintes) conduisant à une baisse de la tolérance au glucose (Moussard, 2006). L'insuffisance insulinaire conduisant au diabète de type 1. Ce diabète représente 5 à 10% de la population diabétiques (Hennen, 2001).

3.1.2. Physiopathologie

Le développement du diabète de type 1 est le résultat de l'interaction synergique de différents facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques, dont l'aboutissement est la destruction des cellules β pancréatiques (Derek, 2004).

a. Facteurs génétiques

Plus de 20 régions différentes du génome humain représentent une certaine liaison avec le diabète de type 1 telles que le gène qui se situe sur le chromosome 6p21 (50% du risque génétique global) ou du système HLA de classe II avec un risque relatif de 3 à 5%, Le risque relatif atteint 20 à 40% lorsque les deux antigènes DR3 et DR4 sont associés, ce qui veut dire que l'association DR3-DR4 est fréquente dans la population diabétique alors qu'elle est exceptionnelle dans la population non-diabétique (Grimaldi, 2000). Le 2^{ème} gène repéré se situe dans la région du gène de l'insuline sur le chromosome 11p 15 (gène appelé maintenant DSID2). Il contribue au risque de diabète de type 1 pour près de 10% (Bourgeois, 2003). Le risque pour une mère DID d'avoir un enfant diabétique est environ 2% alors que le risque est de 4 à 5 % lorsque c'est le père qui est diabétique ID (Raverot, 2005).

b. Facteurs auto-immuns

Le diabète de type 1 est lié à la destruction auto-immune de ces cellules bêta. Pendant la phase de pré-diabète, il n'y a pas de réduction suffisante de la masse des cellules à insuline pour que la glycémie monte. Il est donc totalement asymptomatique mais des auto-anticorps sont détectables (Duron, 2006). Ces auto-anticorps sont essentiellement au nombre de 4:

1. Les anticorps anti-îlots (islet cell anti body: ICA), présents dans 90% des cas au moment du diagnostic clinique, réaction auto-immune a été démontrée chez l'homme que la susceptibilité génétique était liée à l'absence d'un seul acide aminé (acide aspartique) en position 57 de la chaîne β de la molécule DQ du système HLA de classe II (Ghada, 2015).
2. Les auto-Anti-corps anti insuline IAA, Chez les patients DID, l'insuline est la première protéine contre laquelle la réaction auto-immunitaire a été documentée (Pugliese et Eisenbarth, 2004).
3. Les anticorps anti-IA2 (Insulinoma Associated protein 2) sont dirigés contre une phosphatase membranaire des cellules β (Min et al., 2014).
4. Les anticorps anti-GAD (glutamate acide décarboxylase), ces anticorps sont dirigés contre une enzyme ubiquitaire responsable de la synthèse du GABA, mais qui est exprimée au niveau pancréatique. Ils sont présents très tôt dans le pré-diabète (Marwaha et al., 2013).

c. Facteurs d'environnementaux

Dans les pays scandinaves, des diabètes de type 1 ont été rapportés plus fréquemment chez des patients ayant consommé de grandes quantités de viandes fumées. Le rôle toxique des nitrosamines a été avancé. On a aussi mentionné une prévalence plus élevée de diabète type 1 chez

des sujets ayant consommé de lait de vache dans les premiers mois de la vie par rapport à des "témoins" nourris au lait maternel. Au moment du diagnostic, d'anticorps anti-albumine bovine a également fait suspecter un rôle toxique de protéines du lait de vache (Rodier, 2001). On sait aujourd'hui que c'est une séquence d'acides aminés de l'albumine bovine qui est considérée comme immunogène car présentant des analogies de structure avec certaines protéines des cellules β (Buysschaert, 2006). Des virus, sont impliqués dans l'initiation ou l'aggravation de processus pathogènes qui aboutissent à la survenue du diabète de type 1 (DT1). Des arguments épidémiologiques plaident en faveur d'un lien entre les entérovirus et en particulier coxsackievirus B4 (CV-B4) et le DT1 (Jaïdane et al., 2008).

3.2. Diabète de type 2

3.2.1. Définition

Le diabète de type 2 (DNID) est une maladie métabolique apparaît généralement à l'âge adulte (Morrison et al., 2008). Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline. L'hyperglycémie est due à une diminution de la sensibilité tissulaire aux effets de l'insuline, ce qui se traduit par une insulino-résistance, et une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β du pancréas (Ozougwu et al., 2013).

3.2.2. Physiopathologie

Plusieurs facteurs interviennent dans l'éthiopathogénie du diabète de type 2 ; il est probable qu'un individu hérite la susceptibilité de développer un diabète de type 2 (facteur génétique), et qu'un ou plusieurs facteurs environnementaux comme le vieillissement, l'obésité, la consommation d'énergie insuffisante, la consommation d'alcool, le tabagisme sont des facteurs de risque pour la pathologie du diabète de type 2 (Kaku, 2010).

a. Facteur génétique

L'historique familial a permis de mettre en exergue le caractère héréditaire du diabète de type 2 (Ozougwu et al., 2013). En effet, la majorité des patients ont un parent au premier degré atteint de la maladie et ce risque « héréditaire » augmente avec le nombre de parents affectés. De plus, des études chez des jumeaux monozygotes ont montré une concordance proche de 100%, ce qui conforte l'aspect génétique de la maladie. Toutes les études convergent pour affirmer que le diabète de type 2 est une maladie polygénique ; il existe sans doute un très grand nombre de gènes de prédisposition au diabète de type 2 (Simonis-Bik et al., 2010).

b. L'obésité

Est un facteur majeur du DT2, due à une augmentation des apports caloriques et une sédentarité accrue qui s'explique par l'insulinorésistance. En effet, les acides gras libres ont des effets délétères sur la sensibilité à l'insuline qui résulte de surpoids, surtout si répartition abdominale de la graisse ou si associé à l'inactivité physique (Simon, 2008).

4. Insulinorésistance

4.1. Définition

La résistance à l'insuline est présente chez toute personne obèse, hypertendue ou diabétique de type 2. Cette résistance semble être un phénomène précoce dans l'évolution du diabète de type 2 (Kahn, 2003). L'insulinorésistance est une réponse biologique in vivo à l'insuline expliquée par une sécrétion réduite ou par son action défectueuse (Nicolai et al., 2015). Les facteurs qui induisent l'insulinorésistance dans le diabète et l'obésité sont essentiellement la glucotoxicité et la lipotoxicité (Lacolley, 2007).

4.2. Mécanisme

L'insulinorésistance peut être due à des anomalies situées en amont ou mieux, en aval des récepteurs tissulaires à l'insuline (Buysschaert, 2006), ces récepteurs sont également endommagés par les effets de cytokines libérées par les adipocytes (Medart, 2009). L'excès de tissu adipeux, notamment viscéral, est responsable d'une augmentation de la sécrétion d'adipocytokines (Astrid et Hebuterne, 2007), pro-inflammatoires, en particulier de $\text{TNF-}\alpha$ et d'interleukine 6. Celles-ci vont bloquer dans le muscle, la voie de signalisation intercellulaire de l'insuline au niveau post-récepteur, notamment son substrat (protéine IRS) qui sert d'intermédiaire entre le récepteur et les autres acteurs de signalisation dont la PI-3K (phosphatidylinositol-3 kinase) (Buysschaert, 2006).

Tous les agents responsables de résistance à l'insuline (les acides gras libres, le diacylglycérol, les acyl-CoA et le glucose, mais également des cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF-}\alpha$ (tumor necrosis factor α), ou l'IL (interleukine) 1β) (Capeau, 2003) sont conduits à l'activation de la protéine kinase C, qui stimule la phosphorylation de l'IRS-1 sur des résidus sérine et/ou thréonine, ce qui diminue la liaison de l'IRS-1 avec les tyrosines phosphorylées des sous-unités β des récepteurs et inhibe ainsi le signal insulinaire. Le $\text{TNF-}\alpha$ réduit également la phosphorylation de l'Akt (Protéine kinase), ce qui cause une réduction de la phosphorylation de l'AS160 et de la capture du glucose stimulée par l'insuline dans le tissu musculaire (Constantine et al., 2008), ce qui diminue aussi la stimulation de la PI-3K, d'où une diminution de la vitesse de

fusion des vésicules contenant GLUT-4 avec la membrane plasmique (figure 03) (Voet et Voet, 2005).

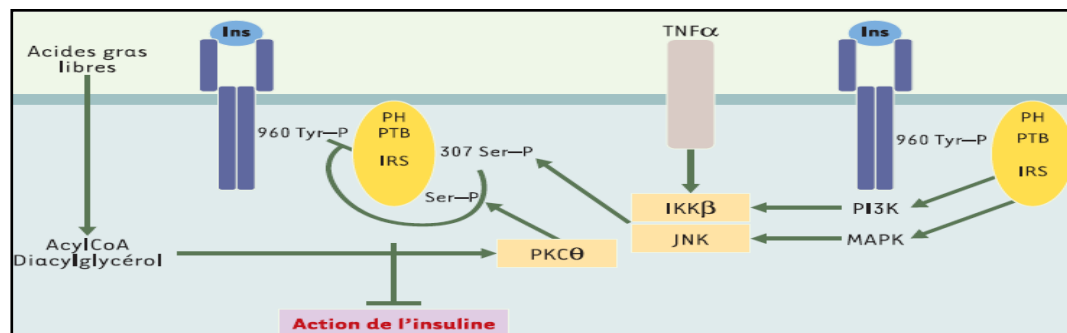


Figure 03: Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline (Capeau, 2003).

5. Insulinodéficience

Les anomalies de l'insulinosécrétion s'expriment par des altérations fonctionnelles de la cellule β , en particulier une perte de la première et un retard de la seconde phase de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation glucosée, ainsi que par un défaut de pulsativité de la sécrétion de l'insuline (Buysschaert, 2006). Elle est secondairement aggravée par l'hyperglycémie chronique (glucotoxicité), l'augmentation des AGL circulants (lipotoxicité) et possiblement par des dépôts lipidiques intra-cellule β insulinaire (Robertson et al., 2004).

6. Complications de diabète

Les complications du diabète sont les effets du diabète (type 1 ou 2) sur différents organes ou fonctions de l'organisme. L'hyperglycémie chronique est associée à des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux (rétinopathie), les nerfs (neuropathies), les reins (néphropathies), le cœur et les vaisseaux (maladies macrovasculaires), qui provoquent un risque de mortalité très élevé et aussi le pied diabétique est considéré comme complication des complications (Raccach, 2004 ; Schlienger, 2013).

7. Diabète expérimental

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

a. Diabète induit par l'alloxane

L'alloxane ou (2, 4, 5,6-tetraoxypyrimidine, 5,6-dioxyuracil) (figure 04) est un agent exerçant une activité cytotoxique sur les cellules β (Lenzen et Panten, 1988). La toxicité de l'alloxane sur les cellules bêta du pancréas est le résultat de plusieurs processus complexes. L'alloxane, par une analogie structurale au glucose, pénètre à travers les transporteurs de glucose GLUT2 des cellules β pancréatiques (Medjdoub et al., 2013).

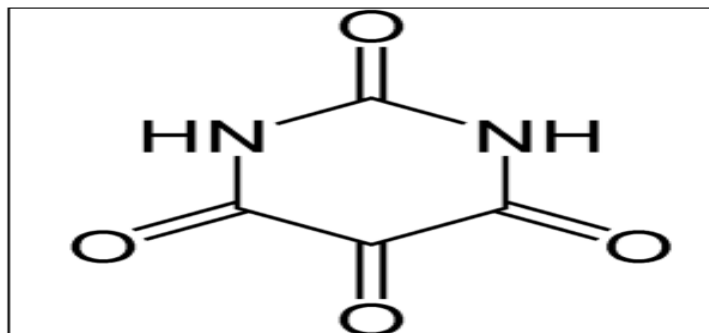


Figure 04. Structure de l'alloxane (Mootz et Jeffrey, 1965).

Au cytosol, l'Alloxane est réduit en acide dialurique. Cette réduction est assurée par plusieurs agents tels que le glutathion réduit (GSH) et les groupements SH des protéines (figure 05). L'acide dialurique (AH₂) formé est réoxydé en radical d'alloxane (AH[•]) puis en alloxan (A), ce qui génère des espèces réactives oxygénées (OH[•], O₂^{•-}) médie par la réaction de Fenton (Lenzen, 2008).

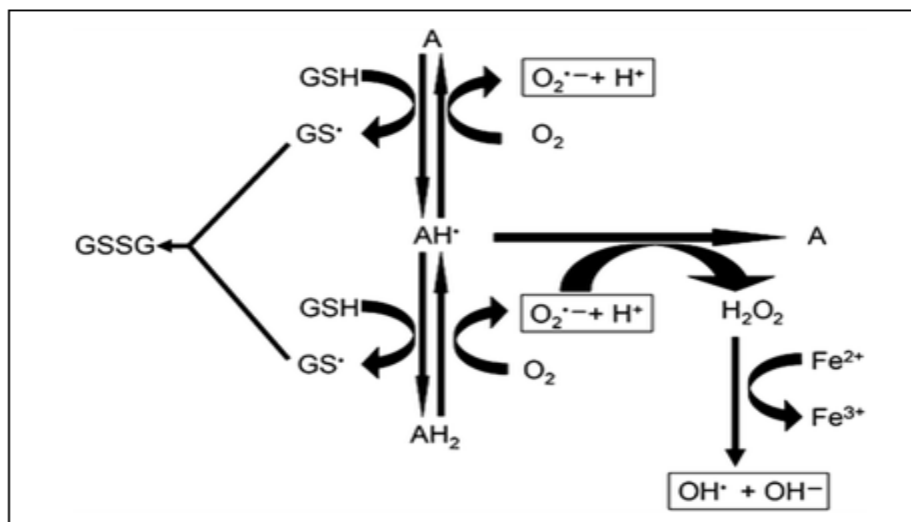


Figure 05: Réactions cycliques redox entre l'acide alloxane et dialurique (Lenzen, 2008).

L'alloxane a un groupe 5 carbonyle central qui réagit très avidement avec des groupes thiol du site actif de la glucokinase formant un pont disulfure et inactivant l'enzyme. L'inhibition de la

glucokinase, réduit l'oxydation du glucose et la génération de l'ATP, ce qui supprime le signal d'ATP, qui déclenche la sécrétion d'insuline (Szkudelski, 2001).

En outre, la perturbation de l'homéostasie de calcium intracellulaire, également été signalé qui constituer une étape importante dans l'action diabétogène de l'alloxane. L'alloxane cytosolique libre augmente la concentration de calcium dans les cellules β pancréatique. L'afflux de calcium entraîne la capacité de l'alloxane de dépolariser les cellules β du pancréas, qui s'ouvre en outre les canaux calciques voltage-dépendants et améliore l'entrée du calcium dans des cellules pancréatiques. La concentration accrue d'ion Ca^{2+} peut causer avec ROS des dommages des cellules β des îlots pancréatiques (Ankur et Shahjad, 2012).

La dose d'alloxane requise pour induire un diabète dépend de l'espèce animale, de la voie d'administration et du statut nutritionnel. Chez le rat, la dose habituellement utilisée en intra-veineuse est de 65 mg/kg. En intra-péritonéale et en sous-cutanée, cette dose est deux à trois fois plus élevée (Szkudelski, 2001).

8. Traitement du diabète

La prise en charge thérapeutique de diabète de type 1, associe une alimentation adaptée à un traitement hypoglycémiant pour assurer un équilibre nutritionnel correct, et éviter les variations de la glycémie. Le patient peut réellement manger de tout, c'est uniquement une question de fréquence et de quantité (Drouin et al., 1999). Cette traitement nécessite plusieurs injections quotidiennes d'insuline car l'hormone étant dégradée dans l'estomac, elle ne peut pas être prise par voie orale. Le malade apprend à adapter les doses qu'il s'administre en fonction de son alimentation d'une part, de son activité physique d'autre part (Cornet, 2009). Pour le diabète de type 2, la prise en charge thérapeutique doit être précoce et globale. Les objectifs généraux du traitement sont d'obtenir une normoglycémie mais aussi de prendre en charge l'ensemble des facteurs de risque cardio-vasculaire qui sont souvent associés au diabète. Le traitement vise en outre à réduire l'obésité et la sédentarité (ADA, 2015). Cinq types d'agents hypoglycémiants oraux étaient disponibles : les sulfonurées (ou sulfamides), les glinides, les biguanides, les thiazolidine diones et les inhibiteurs des alphaglucosidases. L'action hypoglycémiante de ces 5 classes de médicaments est bien établie, leurs mécanismes d'action différents (Nathan, 2007). Deux autres classes thérapeutiques ont été récemment mises à disposition, il s'agit des analogues du glucagon like peptide 1 (GLP1) et des inhibiteurs de l'enzyme dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) (Nauck, 2016).

CHAPITRE II

Le zinc

1. Définition de zinc

Le zinc porte le numéro atomique 30 et se situe dans le groupe XII de la classification Périodique des Eléments. Le zinc est un métal de transition caractérisé par une bonne conductivité électrique dont la température de fusion (692.7kelvin), de vaporisation (1180kelvin) et de densité égale à 7,14 (Samsonov, 1973).

En biologie, le zinc est généralement un cation divalent (Zn^{2+}) qui s'associe facilement avec l'oxygène et les éléments non métalliques tels que des acides aminés, des peptides, des protéines et des nucléotides, pour former des complexes avec quatre liaisons de coordinations en disposition tétraédrique. Dans l'organisme, le zinc fait effectivement partie de la catégorie des oligo-éléments ou éléments traces métalliques. Cette catégorie comprend les éléments contenus dans un organisme à une concentration inférieure à 50 mg /kg . Après le fer, le zinc est l'oligo-élément le plus abondant dans l'organisme et présente une concentration de 20 - 30 mg/kg de poids corporel (Kirchgessner et al., 1994).

Les oligo-éléments, dont fait partie le zinc, sont une classe d'éléments nécessaires à la vie d'un organisme, mais en quantités très faibles. Ils présentent également un caractère toxique pour l'organisme lorsqu'ils sont présents à des taux trop élevés. Un oligo-élément est dit essentiel lorsque son absence, tout comme son apport excessif, provoquent des anomalies structurelles et physiologiques pouvant mener à la mort (Tapiero et Tew, 2003).

2. Besoin et source de zinc

Les besoins en zinc sont estimés à 15 mg/j pour un adulte. Néanmoins, cet apport doit être adapté en fonction de l'âge et de l'activité et l'états physiologique (Tableau 01) (Newsome et al., 1988). On trouve du zinc dans les crustacés, les mollusques, les coquillages (huîtres), la viande (rouge essentiellement, mais également la volaille) (Revy et al., 2003), les œufs, les produits laitiers, les légumes (haricots verts, cresson, soja, champignon, pommes de terre), les céréales complètes (avoine, seigle, millet, riz brun, pain), les légumineuses (lentilles, fèves, haricots en grains, pois cassés...), les fruits secs (noix, noisettes), les germes de blé, les graines de quinoa, les levures, les agrumes. Les huîtres restent l'aliment le plus riche en zinc en proportion et surtout il y est particulièrement assimilable. De manière générale, le zinc contenu dans les protéines animales est mieux absorbé que celui contenu dans les protéines végétales (Shils et al., 1998).

Tableau 01: Apports journaliers recommandés en zinc (Newsome et al., 1988).

Age	AJR en zinc
Nourrissons 0 à 3 an	3 mg
Enfants 4 à 8 ans	5 mg
Adolescents	11 mg
Femmes	15 mg
Hommes	15 mg
Grossesse	20 mg
Allaitement	25 mg

3. Métabolisme de zinc

3.1. Absorption et biodisponibilité

3.1.1. Absorption

Le zinc, sous forme d'un complexe, est fixé par la bordure en brosse des entérocytes. Le zinc est absorbé selon deux procédés, le premier est un mécanisme d'absorption paracellulaire, passif et non saturable, qui dépend du gradient de concentrations intraluminal et interstitielle et le deuxième un mécanisme de transport transcellulaire, actif et saturable chez les mammifères, la voie active est considérée comme prédominante (Miller et al., 2007). L'iléon est le site de l'intestin préférentiel pour l'absorption d'ions de Zn dans le cas d'absorption non saturable, alors que ce processus a été médiée par une voie saturable dans le duodénum et le jéjunum. L'absorption active de zinc s'effectue en plusieurs étapes : le zinc présent dans le milieu intraluminal entre dans l'entérocyte à travers la membrane apicale, migre à travers le cytoplasme, jusqu'à la membrane basale d'où il est transporté dans le système de circulation sanguine (Yu et al., 2008). Après pénétration à l'intérieur des entérocytes, Il est en majorité complexé à des ligands organiques tels que l'albumine ou certains acides aminés. Sous cette forme, le zinc est facilement échangeable et peut se lier à diverses protéines tissulaires dont les métallothionéines dans le foie et les reins. Une faible partie du zinc circulant est piégée au niveau de l' α macroglobuline et ce complexe ne peut se dissocier qu'au niveau du foie (Gordon et al., 1981; Andreas et al., 2011).

3.1.2. Biodisponibilité

La couverture des besoins chez l'homme est assurée par la teneur en zinc des aliments. Le tableau 02 présente les facteurs favorisant ou inhibant la résorption de cet oligoélément. Comme les régimes végétariens contiennent beaucoup de phytate, de fibres et de caséine, sa biodisponibilité est très faible en raison de la formation de complexes insolubles (Nävert et al., 1985). Les phytates forment avec le zinc des complexes insolubles dans le milieu gastro-intestinal (Lönnerdal, 2000). L'apport de 0,8% de calcium sous forme de chlorure dans un aliment contenant du phytate de sodium a réduit la biodisponibilité du zinc chez le rat. Cette réponse s'expliquerait par un effet négatif du calcium sur la solubilité des complexes phytates-zinc (Lisbeth et al., 2008).

Un autre type d'interaction, pouvant altérer la biodisponibilité du zinc, est la compétition avec un autre minéral au site d'absorption. Le zinc et le fer ont un comportement antagoniste lorsque la concentration de l'un ou l'autre est trop élevée. L'expression de Zip14 (transporteur de zinc) a été réduite par un apport alimentaire de fer croissant (Hansen et al., 2009). Le cuivre est un cation divalent (Cu^{2+}), se lie aux MT, présent dans les entérocytes et une fois transféré dans le milieu intérieur, il est transporté vers le foie, majoritairement par les albumines. Une présence en cuivre excessive, par rapport à celle du zinc, provoque ainsi une carence induite en zinc, car les MT et les albumines sont aussi nécessaires pour la régulation du métabolisme du zinc. (Jondreville et al., 2002). Le rapport idéal du cuivre au zinc est de 1:8 en faveur de zinc. Le zinc est habituellement accompagné de cuivre dans l'alimentation (David et al., 1988).

Tableau 02: Facteurs influençant la résorption du zinc (Reinhard et al., 2010).

Facteurs inhibiteurs	Phytate, phosphate Fibres alimentaires telles que cellulose, hémicellulose, lignine Caséine Hautes doses de fer, cuivre et calcium
Facteurs stimulants	Protéines animales Formateurs de complexes tels qu'acides aminés (histidine, cystéine) Acides organiques (citrate) Peptides

3.2. Transport et Distribution

3.2.1. Transport

Deux familles de transporteurs de zinc ont été identifiées ; les transporteurs ZnT « Zn²⁺ transporters » et ZIP « Zrt- and Irt-Like Proteins » ou (Zn²⁺ and Fe²⁺ regulating proteins) qui ont des rôles opposés dans la régulation homéostatique du zinc cellulaire. Les protéines de la superfamille ZIP (14 transporteurs identifiés) captent le Zn extracellulaire ou des organites internes pour l'envoyer vers le cytosol assurant ainsi l'approvisionnement de la cellule en ce métal. Concernant l'efflux, ce sont les membres de la famille ZnT (10 transporteurs identifiés) qui expulsent le Zn pour éviter un excès de ce métal (Kambe et al., 2014). Ces transporteurs interviennent également dans le stockage du Zn. ZnT-1 est responsable du transport du zinc de l'entérocyte vers la circulation sanguine (Liuzzi et Cousins, 2004). L'expression de ces transporteurs change en fonction de l'apport alimentaire de zinc. Lors d'une déficience en zinc, son absorption augmente grâce à l'accroissement du nombre de transporteurs Zip (figure 07) (Robert, 2010).

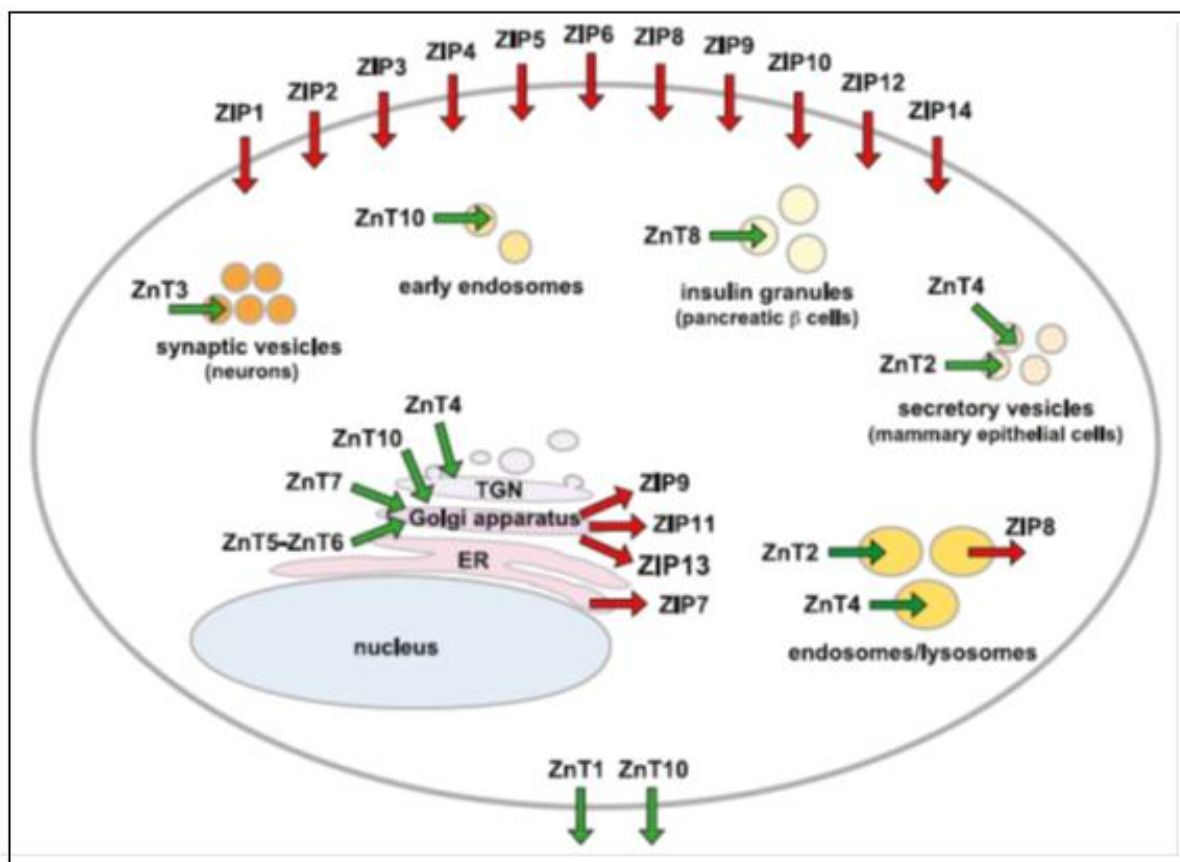


Figure 06 : Transporteurs de zinc (Kimura et Kambe, 2016).

3.2.2. Distribution

a. Dans le sang

Seul 0,1% du zinc total se trouve dans le sérum (Nazanin et al., 2013). Dans le plasma, la concentration normale de zinc est d'environ 1 mg/l (Noonan et al., 2003). Il est lié irréversiblement à l'albumine (65% du zinc plasmatique), strictement à l' α 2-macroglobuline (30% du zinc plasmatique) et réversiblement à la transferrine, à la transthyrétine, à des petites protéines et des acides aminés comme l'histidine et la cystéine. Le zinc plasmatique, lié à l'albumine, représente la source principale pour alimenter les tissus en zinc (Janet, 2011).

b. Dans les tissus

La quantité du zinc dans l'organisme est approximativement de 1,5 g chez la femme et 2,5 g chez l'homme, on trouve le zinc dans tous les tissus, 98% du zinc sont localisés au niveau intracellulaire (Reinhard et al., 2010). Les os et les muscles contiennent respectivement 30 et 60 % de la quantité totale de zinc présente dans le corps (Hans-Peter, 2003). Les 10% restants se trouvent distribués dans les entérocytes, les cellules épithéliales, le sang, le foie, le tractus gastrointestinal, les reins, la peau, les poumons, le coeur, le cerveau et le pancréas (Bentley et Grubb, 1991).

Des concentrations en zinc ont été également détectées au niveau de la prostate, de la rétine et du sperme (Jiang, 2016). Le foie, considéré à la fois comme organe de distribution de l'élément, de stockage et de détoxification (par la sécrétion via la bile) possède un turnover du zinc 5 à 6 fois plus élevé que les autres tissus. Il capte entre 30 et 40% du zinc plasmatique nouvellement absorbé qu'il stocke sous forme liée aux MT qu'il synthétise (Rucker et al., 1994).

3.3. Élimination

Le zinc est éliminé d'une manière prépondérante par le tube digestif (dans les fèces). Toutes les sécrétions digestives, notamment celles du pancréas, sont riches en zinc, dont une partie peut ensuite être réabsorbée. Les sécrétions endogènes intestinales de zinc proviennent des sécrétions gastriques et pancréatiques, de la bile, de la salive, de la muqueuse intestinale et des cellules intestinales (Shu-Ming et al., 2004). L'élimination urinaire correspond à environ à 3% de l'apport quotidien et est inférieure à 0.5-0.7 mg/24 h (Długaszek et al., 2011). Le zinc filtré au niveau glomérulaire (2 mg/j) est réabsorbé au niveau du tubule distal et réexcrété au niveau proximal. Les métallothionéines rénales seraient un mécanisme de défense contre les fuites du zinc dans les

urines (Arnaud, 1995). Les autres fluides corporels (sueur, desquamation, sperme, lait) sont également des voies importantes d'élimination du zinc (Faa et al., 2008).

4. Statut et régulation de l'homéostasie de zinc

4.1. Statut de zinc

Le zinc peut théoriquement être dosé dans le plasma, le sérum, le sang total/les érythrocytes, l'urine et les cheveux. La concentration de zinc dans le sérum ou le plasma n'est pas une méthode fiable pour quantifier une carence en zinc, du fait que seule une infime partie (0,1%) se trouve en solution dans le sérum (Reinhard et al., 2010) des index statistique de statu du zinc , tels que la concentration en zinc dans le plasma, les cellules de sang, et les cheveux, et l'excrétion urinaire de zinc sont diminuées dans l'insuffisance grave de zinc. Un certain nombre des conditions qui sont indépendantes de statut du zinc peuvent affecter tous ces index, en particulier niveaux du zinc plasmatique. Ingestion de nourriture, des situations telles que l'infection et la grossesse provoque la diminution de la concentration du zinc plasmatique (Agett et Favier, 1993).

Le zinc joue un rôle clé dans plusieurs enzymes, il est possible de mesurer le statut du zinc par le dosage de l'activité des enzymes zinc dépendante comme la phosphatase alcaline et les ribonucléases parce que ces enzymes sont parmi les facteurs les plus sensible à la variation du taux de zinc corporel (Conor, 2004).

4.2. Régulation de l'homéostasie de zinc

La régulation homéostatique du zinc est principalement contrôlée par l'adaptation de son absorption intestinale, de son excrétion endogène fécale, qui résulte du niveau de sécrétion endogène intestinale et de sa réabsorption, et de sa mise en réserve /mobilisation dans des tissus et le squelette. L'élément central de la régulation homéostatique du zinc se situe au niveau du système digestif, avec principalement l'intestin grêle, le foie et le pancréas (figure 06) (Krebs, 2000). Chez le rat adulte, quatre jours sont nécessaires pour adapter l'absorption réelle du zinc et environ sept jours sont nécessaires pour adapter son excrétion endogène fécale en réponse à un changement de concentration alimentaire de 58 mg à 2 mg Zn / kg d'aliment (Windisch, 2003).

Dans l'entérocyte, une partie du zinc est fixé aux métallothionéines (MT), protéines qui favorisent la captation du zinc intracellulaire (David, 2006). Chez le mammifère, la synthèse de MT dans l'entérocyte et autres tissus (foie, pancréas et reins) est induite par une augmentation de la teneur en zinc alimentaire. Les MT ne semblent pas indispensables à la survie, mais s'avèrent être un atout lorsque l'animal présente des inflammations, des infections, une consommation

alimentaire faible ou un apport insuffisant ou excessif de zinc alimentaire, car c'est une forme de réserve cellulaire de zinc rapidement mobilisable (Davis et Cousins, 2000).

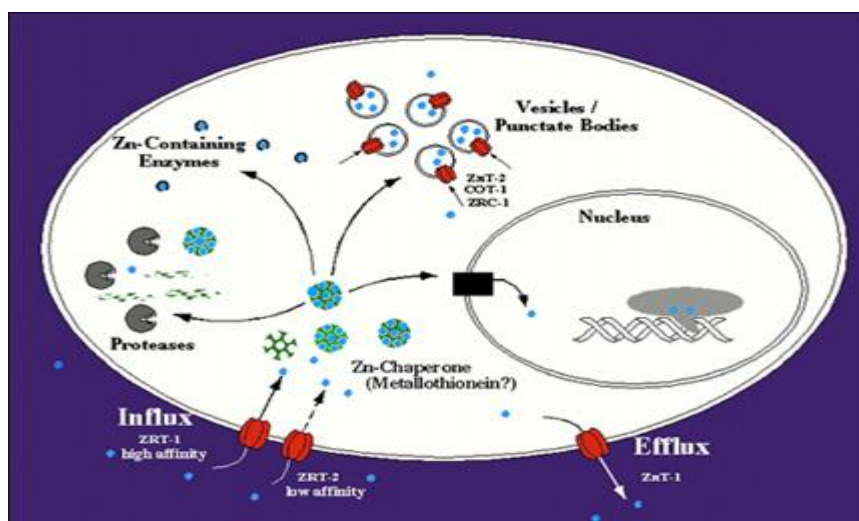


Figure 07: Homéostasie du Zinc (Suhy et al., 1999).

5. Rôle du zinc dans l'organisme

5.1. Rôle de zinc dans les systèmes biologiques

Le zinc (Zn) est un élément essentiel pour les êtres vivants, un métal physiologique qui intervient dans les grandes voies métaboliques, soit comme cofacteur, soit comme constituant de la structure d'enzymes telles que la phosphatase alcaline, la glutamate déshydrogénase ou la superoxyde dismutase (action anti-oxydante) etc (Kindermann et al., 2005).

On estime 12 à 50% du zinc intracellulaire implique dans le constituant structural d'un grand nombre de facteurs de transcription et traduction, ce qui explique son rôle pivot dans le contrôle de l'expression génique (Kindermann et al. 2005). Le nombre d'enzymes à zinc est identifié plus de 200 enzymes (Davis et Cousins, 2000). Le zinc joue un rôle central dans la croissance, le développement et la prolifération cellulaire, car la réplication et la transcription de l'ADN nécessitent l'activité des enzymes polymérase et transcriptase qui dépendent du zinc (Prasad et al., 1996)

Les tissus qui prolifèrent rapidement, tels que les tissus épithéliaux de la peau, du tractus gastro-intestinal et des voies respiratoires seraient les plus sensibles à l'apport de zinc (Rink et Gabriel, 2001). Le zinc est nécessaire pour le fonctionnement normal de la défense immunitaire et oxydative (Fraker et King, 2004), de la reproduction et de métabolisme d'hormones (Favier,

1992). Le zinc est indispensable aussi à la croissance et au développement, à la maturation testiculaire, à des fonctions neurologiques, à la cicatrisation des plaies et aux défenses immunitaires. Il est nécessaire pour la préservation du goût et de l'odorat. (Imoberdorf et al., 2010). Ce rôle du zinc s'explique par son implication dans l'intégrité des tissus externes du corps, qui représentent la « première barrière défensive ». Il s'explique aussi par son implication dans le développement cellulaire de la moelle épinière, qui synthétise les leucocytes (Fraker et al., 2000) et pour son implication dans l'activité des cellules monocytes hétérophiles (volaille) ou neutrophiles (mammifères) (Rink et Gabriel, 2001).

5.2. Rôle de zinc dans l'activité protéique

Le zinc a un rôle structural et/ou fonctionnel essentiel dans les protéines et participe à une grande diversité de fonctions dans l'organisme vivant. on le retrouve en effet dans les six groupes qui forment la famille des enzymes oxidoréductase (Lactate déshydrogénase), transférase, hydrolase (La phosphatase alcaline, amylase), lyase (aldolase), isomérase et ligase (vallee et Auld, 1990). Les fonctions biochimiques du zinc dans les enzymes peuvent être classées selon trois types :

- Catalytiques : la présence du zinc conditionne l'existence d'une activité catalytique;
- Structurales : le zinc stabilise les structures tertiaires et quaternaires, permettent à la protéine de garder une conformation active (protéine de liaison à l'ADN);
- Régulatrices : le zinc a un effet activateur ou inhibiteur sur l'activité catalytique (aminopeptidase) (prasad, 1993).

a. Les sites structuraux

Les sites structuraux possèdent une proportion plus importante en résidu cystéine et histidine. Les sites à zinc adoptent le plus fréquemment une conformation tétraédrique dans les protéines, établissant des liaisons avec des groupements soufrés (tels les groupements thiols des cystéines) ou azotés (asparagine). L'histidine est le ligand le plus courant, suivie par la cystéine, puis les résidus glutamate et aspartate (Dudev et Lim, 2003).

L'histidine se coordonne via son noyau imidazole et constitue donc un donneur neutre, alors que les résidus glutamate et aspartate se lient par l'intermédiaire de leurs groupes anioniques carboxylates déprotonés (figure 08) (Tamames et al., 2007).

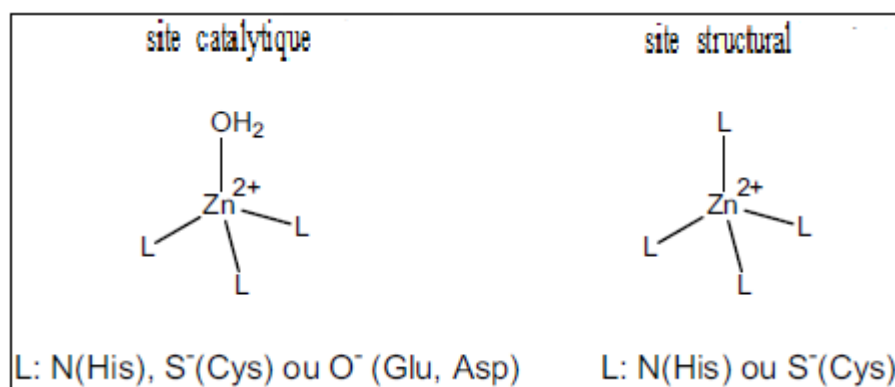


Figure 08: Site structural et catalytique des protéines à zinc (maynard et Covell, 2001).

b. Les sites catalytiques

Les sites catalytiques sont tenus pour responsables de l'activité enzymatique des protéines à zinc. La réaction s'effectue au niveau de la molécule d'eau liée au métal et peut mener à trois mécanismes de réactions différentes (figure 09):

Le plus fréquemment, le zinc agit comme acide et active la molécule d'eau par déprotonation, de façon à engendrer une espèce hydroxyde plus nucléophile à un pH proche de la neutralité (Parkin, 2004). Ce mécanisme se trouve, par exemple, pour l'anhydrase carbonique qui possède, outre la molécule d'eau liée au zinc, trois ligands histidines neutres en première sphère de coordination (Tripp et al., 2001).

Un deuxième moyen d'activer la molécule d'eau apparaît dans le cas de l'enzyme carboxypeptidase et phosphatase alcaline possédant un résidu glutamate dans son site actif. La charge anionique de ce résidu rend la déprotonation à pH neutre de la molécule d'eau plus difficile et incomplète. Dans ce cas, un glutamate sert de base pour activer la molécule d'eau par polarisation et permet la formation d'une espèce hydroxyde).

Le dernier type de participation du métal implique le déplacement complet de la molécule d'eau par un substrat. Ceci se produit, par exemple dans le cas de l'alcool déshydrogénase du foie, pour laquelle l'eau est déplacée par une molécule d'alcool (Alvarez-santos et al., 1994).

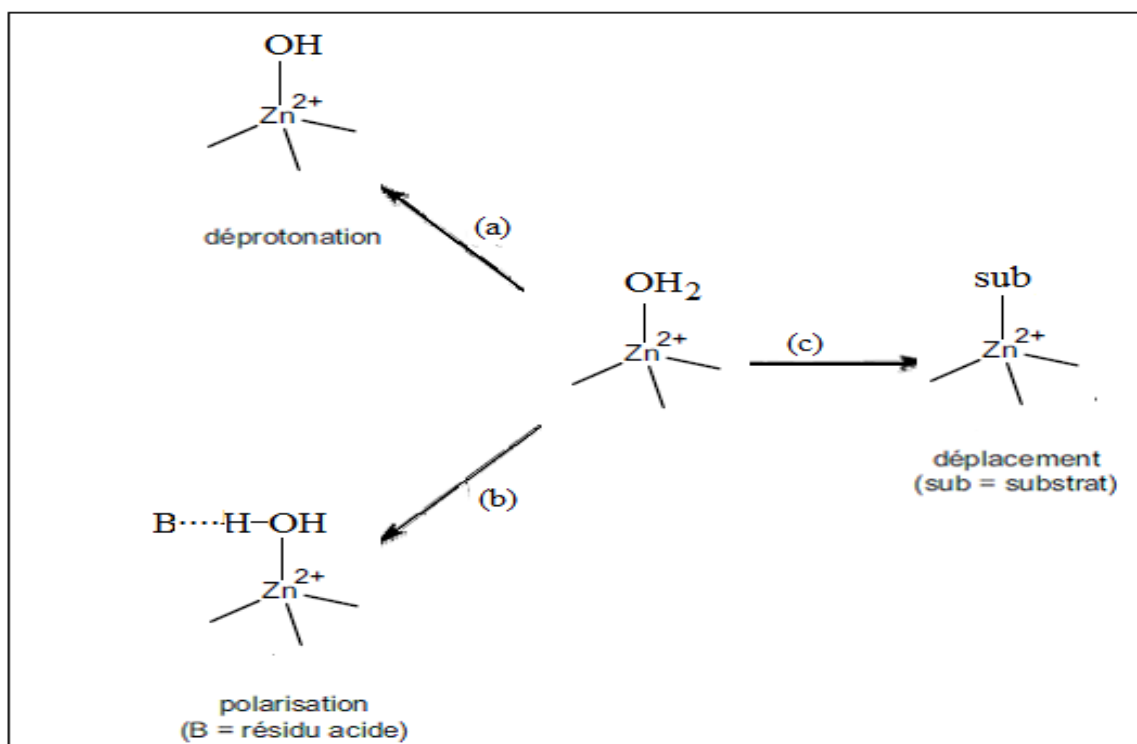


Figure 09 : Mécanisme d'action des sites catalytiques à zinc (Vallee et Auld, 1993)

5.3. Rôle antioxydant du zinc

Le rôle antioxydant du Zn s'exerce indirectement en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD (jemaia et al., 2007). Au-delà de cette fonction, le zinc possède d'autres propriétés antioxydantes pour lesquelles le mécanisme précis reste encore incomplètement connu (Prasad et al., 2004).

Le zinc inhibe la production des espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) par les métaux de transition, en entrant en compétition avec eux dans la réaction de Fenton. Il entrerait en compétition avec le fer et le cuivre, en diminuant, d'une part, leur absorption intestinale et, d'autre part, la chélation de ces derniers par la cystéine. Cependant, le fer lié à celle-ci peut transférer des électrons à l'oxygène et permettre la production d'anion superoxyde (Claeyssen et al., 2009).

Le zinc protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer ou par les ERO, en empêchant la formation des ponts disulfures intramoléculaires (Patricia, 2012). Par ailleurs le zinc inhibe l'enzyme NADPH oxydase qui catalyse la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ à partir d' O_2 (Prasad, 2008).

Le zinc joue un rôle important au niveau membranaire ayant un effet stabilisateur. Aussi il induit la production des métallothionéines, riches en cystéine, qui peuvent piéger les radicaux

hydroxyyles. Ceci entraîne la formation de ponts disulfures et ainsi, le relargage de zinc qui pourrait alors être capté par les membranes (Maret, 1995).

6. Effet pathologiques de carence en zinc

Le zinc est important pour de nombreuses fonctions. Il soutient la croissance et le développement pendant la grossesse, l'enfance et l'adolescence. La carence en zinc peut provoquer une perte d'appétit et un retard de croissance. Dans les cas les plus graves, on peut observer une perte de cheveux, de la diarrhée et un retard de la maturation sexuelle (Benoist et al., 2007). Les carences en zinc sont associées aussi à une plus grande incidence des infections et à un défaut de cicatrisation des plaies lié aux dysfonctionnements de la fonction immunitaire (Molnar et al., 2014). La déficience en zinc peut également provoquer la diminution de la dépression respiratoire et la diminution du goût et de l'odorat et retard à la cicatrisation des plaies (park et al., 2009).

Par ailleurs, le déficit en zinc diminue l'activité des désaturases, en altérant le métabolisme des acides gras oméga 6 et oméga 3 essentiels à la croissance neuronale, ce qui explique l'effet de la carence en zinc sur les altérations cérébrales (Bhatnagar et Taneja, 2001).

Une carence en zinc réduit aussi la capacité de défense immunitaire et défense oxydative des cellules, par le dysfonctionnement progressif des activités enzymatiques, de la défense des hétérophiles ou neutrophiles et des macrophages et de l'intégrité des structures cellulaires liées au zinc. Une carence en zinc, conduit à une réduction de l'activité du thymus, un changement de l'équilibre des cellules T auxiliaire et une insuffisance fonctionnelle des cellules immunitaires (Hajo et Lothar 2009). Les déficits en zinc sont également associés à une augmentation de l'apoptose des lymphocytes et à une lymphopénie (Kolenko et al., 2001).

7. Zinc et diabète

7.1. Zinc et insulinosécrétion

Le zinc, participe au stockage de l'insuline. Le zinc est un des composants de l'insuline et il est vraisemblablement aussi indispensable à son action sur la cellule. (Nisa et al., 2015). En effet, au cours de sa maturation, l'insuline est complexée sous forme d'hexamères avec deux atomes de Zn (figure 10). Ce complexe relativement peu soluble se cristallise dans les vésicules sécrétoires (Dunn, 2005). Des analyses en fluorescence ont permis de mettre en évidence que la concentration en Zn dans les îlots de Langerhans était en relation avec la synthèse, le stockage et la sécrétion d'insuline (Zalewski et al., 1994).

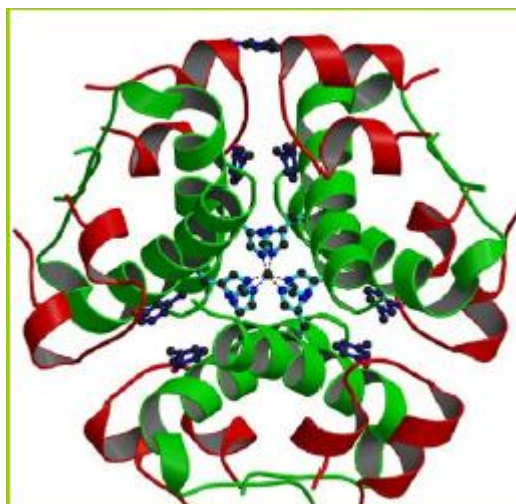


Figure 10: Hexamère d'insuline complexé à deux atomes de Zn (Dunn, 2005).

Le Zn intervient également dans la sécrétion d'insuline, au niveau des îlots pancréatiques. La cascade de signalisation, induite par le glucose et permettant cette sécrétion, fait intervenir des canaux potassium ATP-dépendants (Rutter, 2004). Or, le Zn a été identifié comme étant un régulateur intra et extracellulaire de ces canaux potassiums (Prost et al., 2004). De plus, la liaison du Zn sur des résidus histidines des quatre sous-unités régulatrices SUR1 (SulfonylUrea Receptor 1) active le canal (Bancila et al., 2005).

De plus, un gène SLC30A8, exclusivement exprimé dans les cellules β du pancréas, qui code pour un transporteur de Zn (ZnT-8), étroitement lié au processus de stockage et de relargage de l'insuline (Chimienti, 2004). Le ZnT-8 facilite l'accumulation du Zn du cytoplasme vers les vésicules intracellulaires. Autres transporteurs du Zn sont identifiés tels que ZnT-1, 2, 5, 8 et Zip4, ZnT-5 est abondant au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules sécrétrices, lieux d'assemblage et de stockage du complexe Zn-insuline (Dufner-Beattie et al., 2004).

7.2. Zinc et insulinoresistance

La phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline est l'un des processus central de la transduction du signal de l'insuline. La « Protein Tyrosine Phosphatase 1B » (PTP 1B) est la phosphatase « clé » dans le mécanisme de déphosphorylation du récepteur de l'insuline (Kenner et al., 1996) et donc dans son inactivation. Or, le Zn inhibe, de manière réversible, l'activité enzymatique de la PTP 1B (figure 11) (Haase et Maret, 2003).

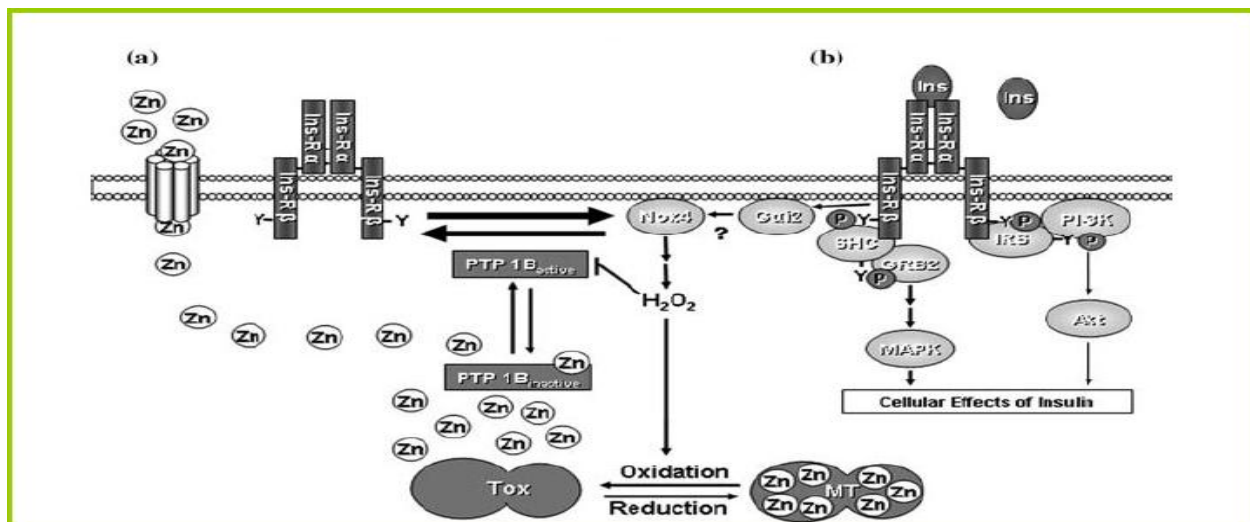


Figure 11: Effet du Zn et du couple redox sur la phosphorylation du récepteur à l'insuline (Haase et Maret, 2005).

Une carence en zinc provoquerait une insulino-résistance induite par des modifications, soit du récepteur à l'insuline, soit des mécanismes post-récepteur (Simon et Taylor, 2001). Donc un apport faible en Zn aggrave le diabète par une réduction de l'assimilation du glucose par les tissus périphériques et/ou par une diminution de la disponibilité de l'insuline. Les diminutions de l'assimilation du glucose et de la disponibilité de l'insuline seraient attribuées, respectivement, à une insulino-résistance périphérique (Faure et al., 1992) et à un dérèglement de la sécrétion de l'insuline (Huber et Gershoff, 1973).

Chez les diabétiques, on peut en outre s'attendre à une zincurie importante qui peut entraîner un appauvrissement en zinc. Le taux de zinc dans le sérum est généralement plus bas chez les diabétiques que chez les personnes saines. En cas de carence en zinc, les diabétiques de type 2 ont une libération diminuée d'insuline (Wutzke et Lorenz, 2004). Le zinc aussi a un rôle important dans la transduction du signal au niveau du récepteur d'insuline par la régulation de l'activité de la tyrosine phosphatase (Hajo et al., 2008).

CHAPITRE III

Cuivre et calcium

I. Cuivre

1. Métabolisme du cuivre

1.1. Absorption

L'absorption du cuivre se fait au niveau du tube digestif, principalement dans le duodénum. Il rentre dans les entérocytes par deux mécanismes :

- Grâce à un transporteur saturable et ayant une haute affinité pour le cuivre : le « human copper transporter 1 » (hCtr1). Ce transporteur permet l'absorption de Cu^+ lorsque la concentration en cuivre dans les entérocytes est faible (Moller et al., 2000; Portnoy et al., 2001) . Il est présent dans toutes les cellules de l'organisme;
- Via une diffusion passive à travers la bordure en brosse, qui est prédominante lorsque la concentration en cuivre dans les entérocytes est forte (Tapiero et al., 2003).

Un autre transporteur de métaux, le « Divalent Metal transporter 1 » (DMT1), aussi connu sous le nom de « Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2 » (NRAMP2) et de « Divalent Cation Transporter 1 » (DCT1), pourrait également jouer un rôle dans l'absorption du cuivre de manière non spécifique (Arredondo et al., 2003). Mais la voie majoritaire la plus probable est certainement le transporteur comme copper transporter 1 (CTR1) présent dans la membrane de toutes les cellules de l'organisme (Kuo et al., 2001).

Les adénosines triphosphatases de cuivre

Les adénosines triphosphatases (ATPases) de cuivre sont des protéines transmembranaires contenant une seule unité de masse moléculaire environ 170 kD . Les régions N - et C-terminale sont cytoplasmiques (Giuseppe et al., 2014). Les pompes possèdent plusieurs domaines distincts: un domaine de transduction de motif TGE (thréonine/glycine/glutamate) , un canal formé par l'ensemble de 8 hélices transmembranaires , un motif CPx (Cysteine/Proline) de l'hélice 6, formant la porte dans le canal de cuivre (L'acide aminé x est le plus souvent une cystéine, comme dans l'ATPase de la levure ou dans les ATPases humaines), un domaine de phosphorylation de motif DKTGT (Aspartate/ lysine/thréonine/glycine/thréonine), et un domaine de liaison à l'ATP de motif GDG (glycine/aspartate/glycine). Le nombre et la localisation des hélices de la membrane , la présence de domaines de liaison de métal dans l' extrémité N-terminale et le motif CPX- en hélice 6 sont des caractéristiques uniques de ATPases de métaux lourds (Ruslan et al., 2002).

ATPases de cuivre sont membres de la classe d' ATPases de type P qui comprend Na , K-ATPases , Ca-ATPase , et des enzymes associées. La fonction de ATPases de cuivre est à la translocation du cuivre à travers différentes membranes biologiques (Giuseppe et al., 2014).

1.2. Transport et distribution

1.2.1. Transport

Arrivé dans le secteur intracellulaire, le cuivre se fixe à des molécules chaperonnes: Atox1 (Antioxydant protein 1) (Garcia et al., 2009) délivre le cuivre aux transporteurs ATPase de type P (Fatemi et Sarkar, 2002) copper-transporting ATPase 1 (ATP7A) qui est présente dans le trans-Golgi de tous les tissus à l'exception du foie (Garcia et al., 2009; Trocello et al., 2010), qui assure le passage du cuivre dans l'appareil de Golgi en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP (Figure 12) (Puig et Thiele, 2002).

Une fois dans la circulation, le cuivre lié à l'albumine, l'histidine et à la transcupréine est transporté via la veine porte vers le foie, organe majeur de la régulation de l'homéostasie du cuivre (De Bie et al., 2007).

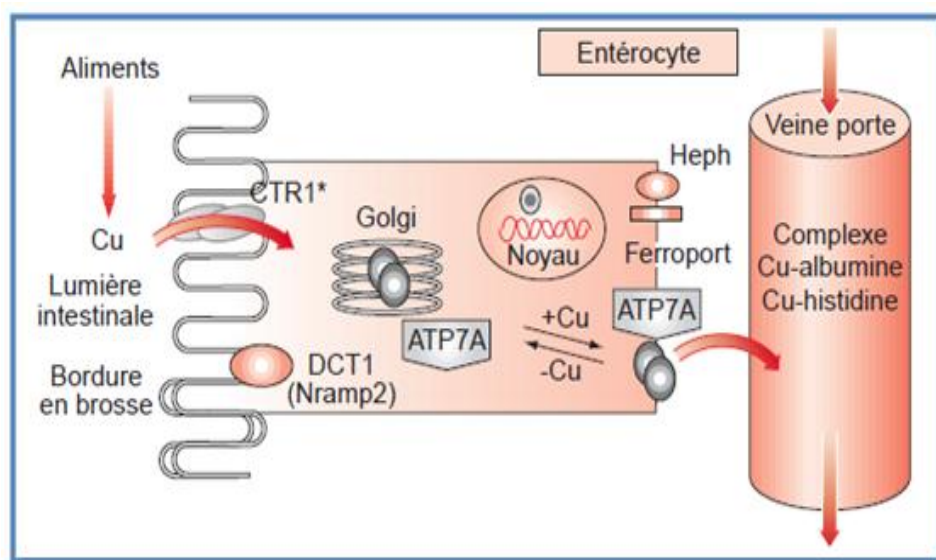


Figure 12: Métabolisme du cuivre dans les entérocytes (Guiraud et *al.*, 2003).

Transport dans le foie

Le cuivre est internalisé dans les hépatocytes par le transporteur CTR1 (copper transporter 1). Dans l'hépatocyte, il est lié à la chaperonne cytosolique Atox 1 qui le transmet à la protéine ATP7B, une ATPase membranaire qui permet son transport à travers la membrane du réseau *trans*-Golgi et ainsi dans la voie sécrétoire de l'hépatocyte où il est incorporé dans la céruloplasmine (Hernandez et *al.*, 2008) à raison de six atomes de cuivre au maximum par

protéine puis est distribué au niveau des tissus périphériques (Huster et Lutsenko., 2007), elle contient plus de 90 % du cuivre plasmatique chez les vertébrés (Guiraud et *al.*, 2003). En cas d'augmentation importante du taux de cuivre dans l'hépatocyte, ATP7B (copper-transporting ATPase 1) est impliqué dans l'exportation de cuivre au niveau de l'appareil de Golgi à partir des hépatocytes dans la bile (Vassiliev et *al.*, 2005; Trocello et *al.*, 2010; Willianne et *al.*, 2012).

Transport de cuivre dans le plasma

Dans le sang le cuivre est présent dans les globules rouges (sous forme d'érythrocupréine) et dans le plasma, il est soit fixé sur le sérumalbumine (2 %) (Valdiguie, 2000), soit surtout présent dans une α_2 -glycoprotéine et la céruloplasmine (95 %) (Trocello et *al.*, 2010).

La céruloplasmine est une hétéroprotéine, contenant 6 à 8 atomes de cuivre pour un poids moléculaire de 135 000 D soit 0,34 % de cuivre. Il possède l'activité d'une oxydase où le cuivre serait le coenzyme. Chez l'adulte les valeurs usuelles de céruloplasmine sont de 0,2 à 0,5 g/l (Valdiguie, 2000).

1.2.2. Distribution

1.2.2.1. Maintien du stock en cuivre

Le rôle du tube digestif dans le maintien du stock en cuivre est particulièrement bien illustré au cours de la maladie de Menkes. Cette pathologie est caractérisée par des mutations dans le gène ATP7A qui code pour une des protéines MNK (Menkes Protein) impliquées dans la sortie entérocytaire du cuivre vers la circulation générale (Miguel et Marco, 2005).

Le foie est particulièrement impliqué dans la gestion du stock en cuivre puisque les pertes de cuivre sont essentiellement biliaires. Ces pertes sont d'origine hépatocytaire et nécessitent l'intervention de la protéine WND (Wilson disease protein) codée par le gène ATP7B qui est muté au cours de la maladie de Wilson, pathologie de surcharge en cuivre. La protéine impliquée dans la maladie de Wilson est une ATPase de type P similaire à celle impliquée dans la maladie de Menkes, et est très exprimée au niveau du foie (Figure 13) (Miguel et Marco, 2005).

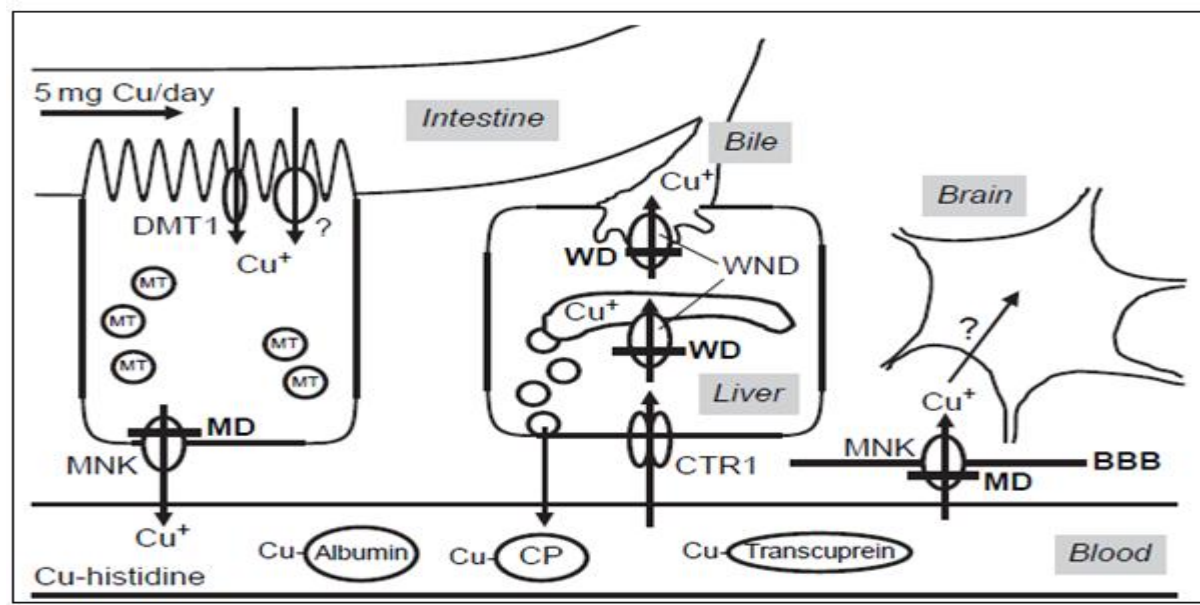


Figure 13: Eléments de l'homéostasie du cuivre (Bonnie et al., 2007)

1.2.2.2. Molécules chaprones

L'accumulation de cuivre dans le cytoplasme pose un risque pour les dommages oxydatifs, afin de minimiser cette possibilité, deux systèmes de protection peuvent participer à la désintoxication :

- Les métallothionéines sont des polypeptides riches en cystéine qui lient les ions métalliques, y compris Cu (I) (Winge, 1991). Dans des conditions de concentrations élevées de cuivre intracellulaires, le cuivre est séquestré par les métallothionéines dans le cytosol et, si elle est excessive, transportée vers les lysosomes. Les métallothionéines sont inductibles et leur expression est augmentée en réponse à des niveaux élevés des ions métalliques (Sturniolo et al., 1999).

- Les métallochaperones sont des protéines cytosoliques qui lient les ions de métaux lourds dans des complexes labiles (Huffman et O'Halloran, 2001). Au moins six chaperons de cuivre ont été identifiés chez les eucaryotes :

- Atox1 (Antioxydant 1 Copper Chaperone) interagit directement avec l' ATPase de cuivre; s'il s'agit d'une étape essentielle dans le transport du cuivre par ATPase (Walker et al , 2004).

- COX17 (Cytochrome c oxydase copper chaperone) a été montré chez la levure pour apporter le cuivre vers les mitochondries pour l'incorporation dans le cytochrome C oxydase (Heaton et al., 2000).

- Sco1p et Sco2p de levure (*Saccharomyces cerevisia*) semblent participer à la prestation de cuivre de COX17 de cytochrome c oxydase (Antoni et al., 2009).

- Cox11 code pour une protéine de la membrane mitochondriale interne (Tzagoloff et al., 1993)
- CCS (Chaperon Copper pour la superoxyde dismutase) délivre le cuivre spécifiquement vers le cytosol pour l'incorporation dans Cu, Zn superoxide dismutase (Zheng et al., 2010).
- NML45 (nucléaire Menkes-like protein), qui peut transporter le cuivre dans le noyau des cellules humain (Reddy et al., 2000).

1.2.2.3. Répartition dans l'organisme

Le cuivre se trouve dans tous les organes et les tissus du corps humain, il est normalement lié aux protéines ou à des composés organiques et ne se trouve pas sous forme d'ions de cuivre libres. Le cuivre est présent dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries de l'ensemble des cellules de l'organisme. L'organe le plus riche en cuivre est le foie où il est fixé par des métallothionéines qui sont des protéines cytoplasmiques inductibles, sous l'effet du zinc notamment (Sturniolo et al., 1999).

D'autres organes qui ont des concentrations élevées de cuivre sont les reins, le cœur, l'estomac et les différentes parties de l'intestin (James et al., 2010). Le cuivre est absolument indispensable au fonctionnement cérébral, mais on ne connaît pas les mécanismes régulant ses échanges entre le cerveau et le plasma, on sait cependant que les groupes SH jouent un rôle déterminant. Dans des conditions normales, le maintien de la teneur physiologique en cuivre de l'organisme est assuré presque exclusivement par l'absorption gastro-intestinale (Ma et Betts, 2000).

1.2.3. Pertes et élimination du cuivre

Le cuivre normalement ne s'accumule pas dans l'organisme. Les voies d'élimination sont de valeur très inégale. une part mineure est éliminée par voie urinaire (Valdiguie, 2000).- une majeure partie est éliminée par les voies biliaires et par les fèces : le cuivre fécal représente plus de 98 % du cuivre alimentaire (De Bie et al., 2007). La bile est la principale voie pour l'excrétion de cuivre et est extrêmement important dans le contrôle des niveaux du cuivre dans le foie (Winge et Mehra, 1990).

2. Rôle physiologique du cuivre

Le cuivre est concentré dans les tissus nerveux, le foie, le cœur, le rein, il est le cofacteur de plusieurs enzymes du métabolisme intermédiaire, essentiellement des oxydases (Frenot et

Vierling, 2001) et impliqués dans des réactions d'oxydoréduction ou dans le métabolisme de l'oxygène. Ce métal n'agit jamais comme ion libre au niveau cellulaire, mais:

- soit sous forme liée à la partie protéique de métalloenzymes.
- soit sous forme de complexe pouvant se lier au substrat.

Les principales enzymes renfermant du cuivre sont la dopamine S hydroxylase, catalysant la synthèse de la noradrénaline (Valdiguie, 2000), la cytochrome C oxydase, maillon des chaînes respiratoires (Kumar et al., 2007), la céruloplasmine (impliquée dans le transport du cuivre et surtout dans une activité ferro-oxydasique maintenant le fer à l'état ferrique) (Harris et al., 1998) et la superoxyde dismutase qui protège les cellules de l'effet toxique des radicaux libres de l'oxygène (Gambling et al., 2011).

Le cuivre est indispensable à la synthèse du collagène, de l'élastine (macromolécule du tissu conjonctif) et de l'hémoglobine (par mobilisation du fer ferreux), il est nécessaire au fonctionnement du système nerveux central et à l'intégrité de la myéline (80 µg/g de myéline) (Frenot et Vierling, 2001).

3. Pathologie associé au cuivre

3.1. Effets toxiques du cuivre

Le cuivre peut s'accumuler et devenir toxique pour la cellule. Les mécanismes de toxicité sont à la fois liés au stress oxydant et aux interactions directes avec les composants cellulaires. En effet, le Cu^+ réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour générer le radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) comme suite: $(\text{Cu(I)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu(II)} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-)$ (Wardman et Candeias, 1996). Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques, un radical très réactif et qui peut causer des dommages cellulaires. Les effets toxiques du cuivre peuvent également résulter de l'affinité des ions Cu^{2+} pour l'ADN (Bremner, 1998). L'autre mécanisme de toxicité du cuivre en excès est la modification des structures en doigts de zinc de certains facteurs de transcription qui ne peuvent plus se lier à l'ADN (Guiraud et Horn, 2003).

3.2. Maladies héréditaires du métabolisme du cuivre

L'homéostasie du cuivre est primordiale et son dérèglement entraîne deux maladies génétiques. Il s'agit des maladies de Menkes (Kodama et al., 1999) et de Wilson (Ferenci, 1999). La maladie de Wilson résulte de l'accumulation de cuivre au sein de plusieurs organes et tissus. Elle se présente sous différentes variétés cliniques, les plus communes étant des maladies du foie, une anémie et des troubles neuropsychiatriques. Cette accumulation de cuivre résulte d'un défaut

de la protéine Cu-ATP7B (ou protéine Wilson) de type P. Le gène qui code cette protéine est situé sur l'autosome 13 chez l'homme Cu-ATP7B transporte le cuivre de façon spécifique (Chen et al., 2015). L'accumulation de Cu engendre des cirrhoses hépatiques ainsi qu'une neurodégénérescence (Roger, 2010).

La maladie de Menkes est une maladie neurodégénérative. Le cuivre, ingéré oralement, s'accumule dans l'intestin et l'absorption par les autres organes et tissus (sang, foie, cerveau) est insuffisante. Le syndrome de Menkes est dû à une mutation du gène ATP7A, localisé sur le chromosome X; gène qui code pour une protéine Cu-ATP7A (Hille et al., 2016). La neurodégénérescence et l'hypothermie sont les principaux symptômes de cette maladie qui peut entraîner la mort au stade infantile (Zeynep et Lisbeth, 2010).

3.3. Maladies neurodégénératives du cuivre

La surproduction des espèces réactives de l'oxygène Cu-dépendante, joue un rôle important dans la mort neuronale au cours de la maladie d'Alzheimer. La sclérose latérale amyotrophique est une autre maladie neurodégénérative liée aux neurones moteurs. Un gène anormal a été identifié comme celui de la Cu/Zn-SOD (Rosen et al., 1993). Par comparaison au gène normal, la forme mutée possède le même nombre d'ions Cu et garde l'activité dismutase, par contre, elle produit beaucoup plus des radicaux libres en présence de peroxyde d'hydrogène. Cela est probablement dû à une altération de la spécificité pour son substrat (Rotilio et al., 2000).

II. Calcium

1. Métabolisme du calcium

1.1. Absorption

L'absorption du calcium est exclusivement intestinale à lieu essentiellement au niveau du duodénum (McCormick, 2002). Deux mécanismes distincts contribuent à ce processus (figure 14): D'une part un transport actif (20%), dépendent de la vitamine D, qui s'effectue dans le duodénum et le jéjunum supérieur, assuré par une protéine de transport [calcium binding protein] (CaBP) (Bronner, 2003; Lemoine, 2003), d'autre part une diffusion passive (80%), tout le long de l'intestin grêle, et ne dépend que du gradient de concentration entre le taux du calcium de la lumière intestinale et celui du plasma (Guenard et al., 2009).

Quand l'apport en calcium est élevé, ce mécanisme passif permet l'absorption de la plus grande partie du calcium (Abrams, 2003). Une insuffisance d'apport en calcium est compensée par

une augmentation du coefficient d'absorption du calcium par l'activation du métabolisme de vitamine D et de diverse hormone dont la parathormone (PTH) (Davies et al., 2000).

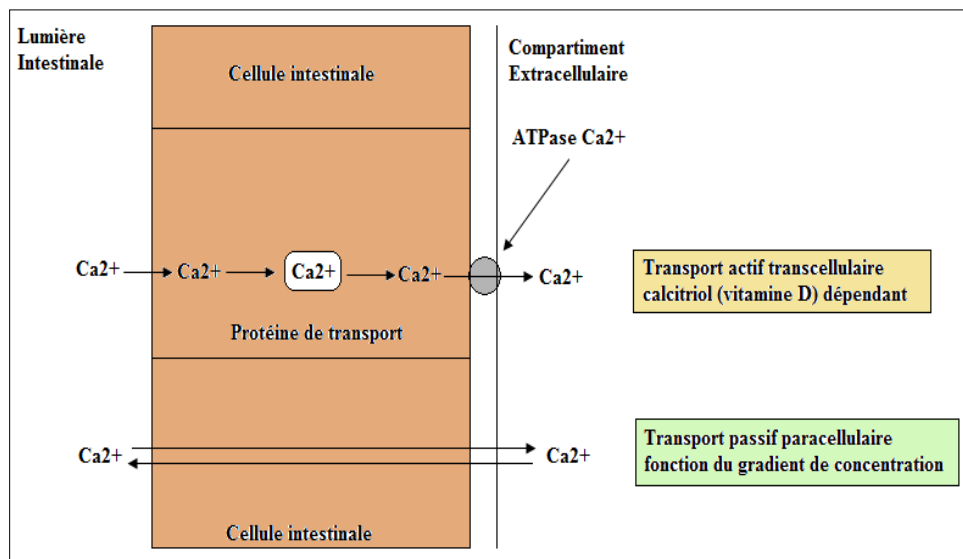


Figure 14 : Voies d'absorption du calcium (Hardman et Limbird, 1998).

L'absorption déterminée soit par la voie para-cellulaire passive ou par la voie trans-cellulaire:

a. Voie para cellulaire

Elle dépend de la différence de la concentration du calcium ionisé entre la lumière intestinal et le plasma ainsi que de la vitesse du transit du bol alimentaire dans l'intestin (figure 15). L'orsqu'il ya beaucoup de calcium libre dans l'intestin, son absorption passive par diffusion entre les cellules de la muqueuse intestinale est importante (James et Ryan, 2010).

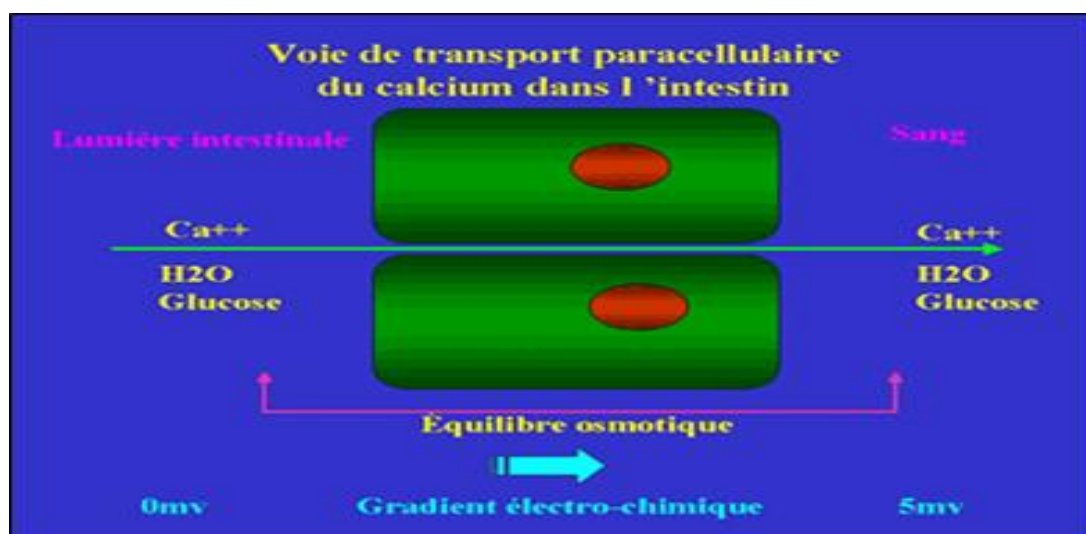


Figure 15: Voie para cellulaire (Davies et al., 2000).

A l'inverse, lorsqu'il y a peu de calcium dans l'intestin, non seulement l'absorption passive diminue, mais il peut même y avoir une sécrétion vers la lumière intestinale, ce qui entraîne une diminution du calcium ionisé sanguin, (Sharon, 2008). C'est le mécanisme passif ne dépend que du gradient de concentration entre le taux du calcium de la lumière intestinal et celui du plasma (Davies et al., 2000).

b. Voie transcellulaire

Une partie du calcium ionisé présent dans la lumière de l'intestin est absorbée par un mécanisme de transfert actif au niveau de membrane des cellules de l'épithélium intestinal (entérocytes). Dans laquelle le calcium rentre par la brosse travers le cytosol et est rejeté dans la circulation sanguine par l'intermédiaire d'une ATPase magnésium (Mg^{2+}) dépendant et aussi pompe l'échangeur Na^+ /calcium. Une protéine dite calcium CaBp (calcium binding protéine) interviendront dans ce transport, mais son rôle précis est encore à définir. Le 1.25-dihydroxy vitamine D₃ (1-25di OH D₃) est un régulateur de cette voie cellulaire, elle augmente l'entrée du calcium dans la cellule et active l'ATPase calcium Mg^{++} dépendant. (Reinhardt et al., 1988). Le transport transcellulaire du calcium s'effectue au moins en trois étapes (figure16):

- L'entrée dans la cellule à travers la membrane luminale au apicale.
- La traversée du cytoplasme
- La sortie à travers la membrane latéro-basales vers le sang.

La synthèse des canaux calcique est stimulée par la 1.25-dihydroxy vitamine D₃ ou celui calcitriol, qui est la forme active de la vitamine D produite par les reins (William, 2007).

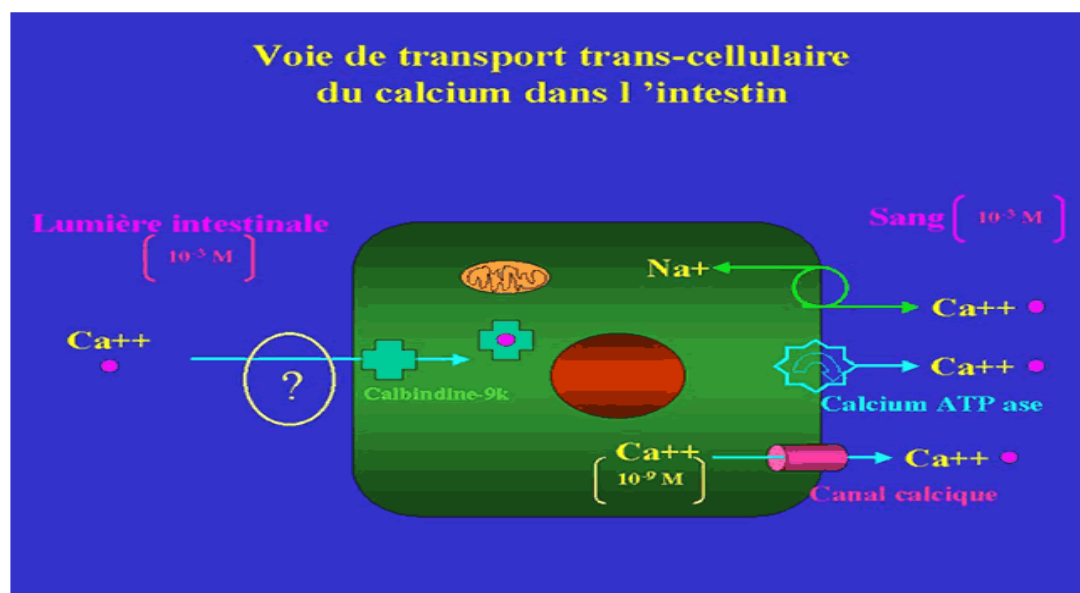


Figure 16 : Voie trans-cellulaire (Davies et al., 2000)

Lorsque les apports calciques sont faibles, les mécanismes d'absorption active du calcium sont stimulés et la voie passive est ralentie. A l'inverse, en cas d'apports élevés du calcium, la voie active est inhibée et la voie passive est alors prépondérante (Davies et al., 2000).

b. Facteurs intervenant dans l'absorption du calcium

L'efficacité nutritionnelle du calcium ingéré est sous la dépendance de nombreux facteurs biochimiques. Les uns renforcent la valeur calcique de la ration, d'autres lui en sont défavorables (Adrian et al., 2003) :

Classiquement un rapport alimentaire calcium sur phosphore égal à 1/1,5 chez l'adulte est considéré comme le plus favorable à l'absorption calcique (Comelade, 1995). Ces deux éléments sont liés parce que leur absorption commune est favorable à chacun d'eux (Alias et al., 2008). En effet, l'excès de l'un entraînera l'élimination de l'autre (Lederder, 1985).

Il a été démontré que la diminution des apports protéiques induit une diminution de l'absorption digestive du calcium (Breuil et Euler, 2004). Les protéines représentent un nutriment spécifique, par leur influence marquée sur la production d'insulin-like growth factor - 1 (IGF - 1) ; facteur indispensable à l'acquisition et au maintien d'un bilan osseux positif. Les protéines, dont la caséine, stimulent par l'intermédiaire de certains acides aminés essentiels, la sécrétion d'IGF - 1 par le foie. Ainsi, l'IGF - 1 agit aussi au niveau rénal, en stimulant la production du métabolite actif de la vitamine D (1,25(OH)₂D), qui à son tour, augmente la capacité de l'épithélium intestinal à absorber le calcium (Tome et al., 2002 ; Bonjour et al., 2005) ;

D'un autre côté, les aliments contenant l'acide phytique, ou de l'acide oxalique, provoquent la formation des sels insolubles (oxalates de calcium ou phytates de calcium), empêchant l'absorption du calcium et entraînant ainsi l'élimination dans les selles (Apfelbaum et al., 2004) ;

D'une façon générale; l'alcool, la caféine et la nicotine augmentent l'élimination du calcium (Gayet et Cazel, 2002). Les fibres alimentaires consommées en excès entraînent l'élimination d'une partie du calcium alimentaire dans les fèces. Mais également, les acides gras saturés à longue chaîne diminuent la digestibilité calcique en formant des savons intestinaux insolubles (Etcheverry et al., 2012);

Un régime hypersodé peut induire, via une diminution de la réabsorption tubulaire rénale, une augmentation de l'excrétion urinaire de calcium (Alias et al., 2003).

1.2. Distribution dans l'organisme

La concentration du calcium extracellulaire est d'environ 5 mmol/l (210 mg/l) et elle est contrôlée de façon très stricte. La concentration intracellulaire est de 0.05-1 mmol/l (2.1-42 mg/l),

cette quantité est très importante pour des organites intracellulaire comme mitochondries et réticulum endoplasmique (Parikh et Yanovski, 2003).

Le squelette contient plus de 99% du calcium de l'organisme. Chez l'adulte, la captation et le relargage de calcium par l'os sont à peu près équivalents, mais au cours du vieillissement, la perte prédomine. Au total, la distribution du calcium est essentiellement osseuse et extracellulaire (Pierre, 2000). Le 1% de calcium restant joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions vitales de l'organisme : coagulation du sang, activité musculaire et cardiaque, pression artérielle, transmission de l'influx nerveux, fonctionnement de nombreux enzymes (William, 2007).

1.3. Elimination de calcium

L'élimination du calcium se fait principalement par les reins et par le tube digestif. La sueur et le lait en période de lactation sont aussi le siège de cette excrétion (Duclos, 2003; Biesalski et Grimm, 2004). L'excrétion urinaire du calcium est la résultants de la masse filtrée par le glomérule et de la quantité réabsorbée. La quantité filtrée est d'environ 9g de Ca^{2+} par jour et la réabsorption tubulaire, très efficace, en réintroduit 98 % dans la circulation. L'efficacité de la réabsorption du calcium est étroitement régulée par l'hormone parathyroïdienne (PTH); elle dépend aussi de la quantité de Na^+ filtré, de la présence d'anions non réabsorbée, et elle est influencée par les diurétiques qui agissent sur la portion excédante de l'anse de henlé comme exemple les diverse thiazidiques réduisent la calciurie, simplement on dissociant le couplage dans l'excrétion du Na^+ et du Ca^{2+} . Il semble que la régulation instantanée des taux plasmatique de Ca^{2+} est due à l'action tubulaire de la PTH (Hardman et Limbird, 1998).

Des ajustements de faible capacité de la calciurie sont possibles dans le tubule distal et le canal collecteur, sans rapport avec le sodium. Le calcium finalement excrété ne représente en général qu'un ou deux pour cent du calcium plasmatique. L'excrétion urinaire de calcium, quantitativement faible, n'est pas un moyen de contrôle efficace de la calcémie (Mundy et Martin, 1993).

Pour une calcémie normale, une très petite partie du calcium filtré est éliminé. En cas d'hypercalcémie la moitié du calcium est réabsorbée et l'autre moitié est éliminé (Lagente, 2000). Ceci revient à dire, que la perte urinaire inévitable est imposée par la constance de la calcémie (Coxam et Davicco, 2006). En ce qui concerne l'élimination fécale ; elle est constituée du calcium alimentaire qui n'a pas été réabsorbé (Lagente, 2000).

1.4. Régulation du métabolisme calcique

Trois hormones tiennent un rôle primordial dans la régulation de ce métabolisme (figure 17). Deux d'entre elle sont hypercalcémiantes : la parathormone (PTH) et le calcitriol, la troisième est hypocalcémiante : la calcitonine (Ruasse, 2002). Ces régulateurs interviennent par l'intermédiaire de trois récepteurs principaux, l'os, le rein et l'intestin (Houillier, 2002).

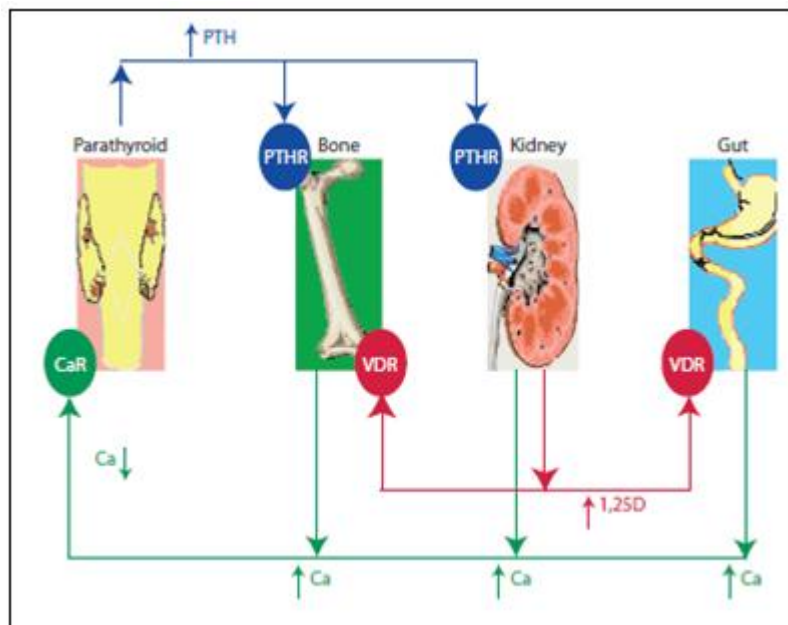


Figure 17: Régulation hormonale de calcium (Munro, 2010).

a. la parathormone

C'est une hormone peptidique de 84 acide aminés, sécrétée par les glandes parathyroïdes (Silbernagl et Despopoulos, 2001). La PTH favorise indirectement l'absorption intestinale du calcium par augmentation de la synthèse rénale du calcitriol. Elle stimule la résorption osseuse en synergie avec le calcitriol, augmente la réabsorption tubulaire distale du calcium (en augmentant la synthèse de calcitriol) et inhibe la réabsorption tubulaire proximale du phosphore inorganique (Souberbielle et al., 2006).

b. La vitamine D

La vitamine D existe sous deux formes. La vitamine D2 d'origine végétale, et la vitamine D3 issue de la conversion du déhydrocholestérol par les ultraviolets au niveau cutané en provitamine D3 isomérisée en vitamine D3. Il y a seulement 1 à 3 ng de vitamine D par millilitre de sang. Le foie est l'organe de stockage et de transformation en 25-hydroxyvitamineD (25-OH-VitD). Ce métabolite est la forme principale de circulation de la vitamine D. Cette 25-OH-VitD est transportée dans le sang par une protéine, la vitamineD-binding-protéine (VBP). Il existe

différentes hydroxylations de la 25-OH-VitD dans divers organes. Au niveau du rein, la PTH favorise la production de 1,25-(OH)₂Vit D ou calcitriol (Reinhardt et al., 1988).

La 1,25-(OH)₂Vit D agit comme une hormone stéroïdienne, la fraction libre de cette molécule agit dans la cellule même, grâce à ses propriétés lipophiles, et régule des synthèses protéiques. Les tissus cibles sont divers, mais l'essentiels sont l'intestin et l'os .

Au niveau intestinale, La 1,25(OH)₂ D active la synthèse des protéines de la bordure en brosse et le transport du calcium et du phosphate au travers de la muqueuse intestinale. Elle augmente la perméabilité de la bordure en brosse aux ions calcique par voie active. Sous l'influence de la vit D, le calcium s'accumule dans les organites de la cellules intestinales à partir desquels il peut être exporté au travers de la membrane basolétérale vers la circulation par un transport actif ATP dépendant également induit par la 1,25(OH)₂D. La vitamine D est ainsi capable de stimuler l'expression des ARNm codant la calbindine et la pompe à calcium ATP dépendante. la calbindine lie deux ions de calcium et contribue ainsi à régler la concentration intracellulaire de calcium au niveau des entérocytes et à favoriser son absorption intestinale (Georges, 2001; Jean-louis et Geneviève, 2011).

Au niveau de l'Os, Les cellules osseuses (ostéoclastes et ostéoblastes) possèdent des récepteurs à la vitamine D, ce dernier stimule la synthèse par l'ostéoblaste de certains protéines entrant dans la composition du tissu osseux dont l'ostéocalcine et l'ostéopontine (Jean-louis et Geneviève, 2011). La 1,25(OH)₂D est un puissant inhibiteur des gènes du collagène et activateur pour celui de l'ostéocalcine: elle favorise la maturation des ostéoclastes et la mobilisation calcique. A dose élevée la 1,25vit D exerce une stimulation de la résorption osseuse et inhibe la synthèse de collagène de la matrice (Georges, 2001).

c. La calcitonine

La calcitonine est une hormone hypocalcémiante, sécrétée par les cellules C de la glande thyroïde, lorsque la calcémie augmente. Son rôle principal est de diminuer la mobilisation du calcium osseux. La calcitonine inhibe la résorption osseuse ostéoclastique (Houillier, 2002).

2. Rôle physiologiques du calcium

Le calcium est un minéral essentiel, jouant un rôle dans divers types de cellules. Il a une importance considérable dans la physiologie de l'organisme en intervenant dans de nombreux processus biologiques (Labarthe, 2005).

Le calcium est un constituant essentiel et majeur de la matrice minérale de l'os et des dents. L'os est un organe vivant en continuel renouvellement et fait fonction de réservoir de calcium échangeable (Scanlon et Sanders, 2007). Dans le cas d'une hypocalcémie, la réserve de calcium de l'os est mis à contribution pour protéger le fonctionnement du cerveau, des poumons et des muscles dont le muscle cardiaque (Lambert-Lagace, 2004).

Le calcium est un cofacteur de nombreuses enzymes. Il est aussi l'activateur de voies métaboliques essentielles (Munro, 2010). Il intervient dans le processus de la coagulation sanguine et joue aussi un rôle prépondérant dans la contraction musculaire volontaire (Dipali et al., 1987; Carolyn et Slupsky, 1995).

Le calcium joue un rôle à part dans la communication cellulaire, car il agit à la fois en tant qu'un ion porteur de charges et donc impliqué dans la genèse du signal électro physiologique, et en tant qu'une molécule dont les concentrations cytoplasmiques varient de façon considérable, assurant une fonction de signal métabolique ou de second messager (Demotes-Mainard, 2003).

Les ions calcium sont indispensables à la division cellulaire, en particulier à la formation du fuseau mitotique, au mouvement des chromosomes à l'anaphase et aux remaniements membranaires (Giorgi et al., 2008; Hepler, 1994). L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} active les endonucléases, les phospholipases et les protéases qui provoquent des dommages cellulaires (Pinton et al., 2008).

3. Pathologie associe au calcium

3.1. Hypercalcémie

3.1.1. Définition

L'hypercalcémie est définie par un taux de calcium sérique supérieur à 105 mg/l (2,6 mmol/l) (Ariyan et Sosa, 2004). Sur le plan physiopathologique le mécanisme impliqué dans la survenue d'une hypercalcémie aiguë peut être une augmentation de l'absorption intestinale du calcium, de la destruction osseuse ou de la réabsorption tubulaire du calcium. Les manifestations cliniques de l'hypercalcémie aiguë sont l'association des signes digestifs, rénaux, neurologiques et cardiovasculaires (Potts, 1998).

3.1.2. Etiologies

Dans 90 % des cas, l'hypercalcémie est due à une hyperparathyroïdie primaire ou un cancer (métastases osseuses lytiques). On peut classer les hypercalcémies en 2 groupes: hypercalcémie PTH dépendante et hypercalcémie indépendante de la PTH (Ariyan et Sosa, 2004).

a. Hypercalcémie PTH dépendante

Elles sont caractérisées par la présence fréquente d'une hypophosphorémie.

- Hyperparathyroïdie primaire : Il s'agit le plus souvent d'un adénome localisé sur une des quatre glandes parathyroïdiennes. Une colique néphrétique associée à une hypercalcémie doit faire évoquer ce diagnostic.
- Syndrome paranéoplasique: Il s'agit le plus souvent de la sécrétion par une tumeur solide (pulmonaire, mammaire) d'une PTH related peptide (PTH-rp) (Inzucchi, 2004).

b. Hypercalcémie indépendante de la PTH

- Lyse osseuse d'origine métastatique. Elle est caractérisée par la présence fréquente d'une hyperphosphorémie.
- Augmentation de l'absorption intestinale de calcium due à une hypervitaminose D
- Médicaments : vitamine A, vitamine D, lithium, diurétiques thiazidiques.
- Endocrinopathies : hyperthyroïdie, insuffisance surrénale.
- Immobilisation prolongée.
- Automédication par la prise chronique de grandes quantités de lait et ou de carbonate de calcium pour traiter les épigastralgies de l'ulcère gastro-duodéal. Augmentation de l'absorption calcique digestive sous l'influence de la vitamine D produite en excès (granulomatoses) ou surdosage thérapeutique, excès majeur d'apport calcique (syndrome des buveurs de lait) (Guitton et al., 2002).

3.1.3. Effet de l'hypercalcémie

a. Effet sur le cœur

Le calcium antagonise les effets de l'hyperkaliémie sur le myocarde sans la diminuer. L'hyperkaliémie entraîne un ralentissement de la conduction intracardiaque et une élévation de l'excitabilité des cellules myocardiques (Aguilera et Vaughan, 2000).

b. Effet sur les muscles lisses

La contraction de toutes les cellules musculaires lisses est sous la dépendance des changements de la concentration intracellulaire de calcium (Bray et Creagg, 1992). L'hypercalcémie entraîne une contraction des cellules musculaires lisses artérielles par augmentation du calcium intracytosolique (Masayoshi et al., 1997). Une augmentation du calcium intracellulaire permet de majorer la liaison Ca-calmoduline, activant la protéine kinase qui phosphoryle la myosine. Cette protéine phosphorylée possède une grande affinité pour l'actine. Ce complexe est responsable de la contraction des cellules myocardiques et des muscles lisses (Aguilera et Vaughan, 2000).

c. Effet sur le rein

L'hypercalcémie altère la fonction rénale par plusieurs mécanismes directs ou indirects en rapport avec l'hypertension. Au niveau du tube proximal, l'hypercalcémie inhibe l'hydroxylation de la vitamine D (Quamme, 1982). L'hypercalcémie exerce une action diurétique qui explique la déshydratation globale fréquemment associée. La perte de sel résulte d'une diminution de la réabsorption du Na par inhibition du cotransporteur Na/K/Cl₂ secondaire à l'activation du récepteur calcium présent en grand nombre sur la surface basolatérale de la cellule épithéliale (Brown, 1999). De plus, l'hypercalcémie réduit la capacité rénale à concentrer les urines en inhibant la création du gradient osmotique corticomédullaire indispensable pour l'action de l'ADH sur le tube collecteur (Suki et al., 1969).

3.2. Hypocalcémie**3.2.1. Définition**

L'hypocalcémie est définie par un taux de calcium sérique inférieur à 88 mg/l (2.2 mmol/l) (Bianchetti, 1983). L'hypocalcémie est une anomalie biochimique fréquente qui varie en gravité, allant de l'absence de symptômes dans les cas bénins à une crise aiguë dangereuse pour la vie (Cooper et Gittoes, 2008). Les niveaux de calcium sérique sont régulés à l'intérieur d'une marge étroite (2,1 à 2,6 mmol/l) par 3 principales hormones responsables de la régulation du calcium, notamment la parathormone et la calcitonine, par l'intermédiaire de leurs effets spécifiques sur les intestins, les reins et le squelette (Murphy et Williams, 2009).

3.2.2. Etiologies

Dans 90 % des cas, l'hypocalcémie est due à une hypoparathyroïdie ou à un déficit en vitamine D (Guitton et al., 2002). Les causes principales d'hypocalcémie sont :

a. Les hyperphosphatemies

Les hyperphosphatemies aiguës sont dues à une insuffisance rénale aiguë ou à une lyse tumorale entraînent souvent une hypocalcémie aiguë: tétanie.

Les hyperphosphatemies chroniques sont dues à une insuffisance rénale chronique qui entraîne une diminution de la production des métabolites actifs de la VIT D (Calcidiol et Calcitriol): hypocalcémie

b. L'hypovitaminose D

L'hypovitaminose D est plus fréquemment que l'hypoparathyroïdie, la cause de l'hypocalcémie avec une hypophosphatémie est due à un apport alimentaire insuffisant, une malabsorption ou à un ensoleillement pauvre, à une diminution de la production des métabolites actifs de la Vitamine D

c. L'hypomagnésémie

Pour des magnésémie inférieure à 10 mg/l (0,4 mmol/l) par carence d'apport (alcoolisme) ou tubulopathies entraîne par différents mécanismes une hypocalcémie qui ne peut être corrigée que par un retour aux normes de la concentration plasmatique du magnésium (Jeremy et Aliya, 2012).

Etude expérimentale

CHAPITRE I

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique et conditions d'élevage

Dans cette expérimentation on a utilisé 100 rats mâles adultes de souche Wistar Albinos, issus de l'institut pasteur d'Alger, âgés de 10-12 semaines et pesant entre 220 et 290g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'une semaine environ, aux conditions de l'animalerie; à une température ambiante $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidité $65\pm 5\%$ et photopériode de 12h/12h. Ils ont été traités conformément au principe et directive énoncés dans le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène qui sont munies par des mangeoires et des biberons d'eau où chaque cage regroupe 5 rats. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. Les cages tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois, elles sont nettoyées quotidiennement et la litière est changée régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience. Les rats ont été nourris par un régime standard (Southon et al., 1984).

2. Induction du diabète expérimental chez les rats

Après une mise à jeun pendant une nuit, le diabète a été induit chez les rats par injection intrapéritonéale d'une solution fraîchement préparée de l'alloxan monohydrate (Sigma) à une dose de 150 mg/kg de poids corporel (Madubunyi et al., 2012). L'alloxan est dissoute dans une solution physiologique (Na Cl 0.9%). Les groupes des rats sains ont reçus par voie intrapéritonéale le même volume de tampon (Na Cl 0.9%). Après injection, les bouteilles d'eau ont été remplacées par des bouteilles contenant une solution de glucose 5% pendant 24 heures afin de surmonter l'hypoglycémie induite par l'alloxan suite à la destruction des cellules β pancréatiques et la libération massive d'insuline. Cette hypoglycémie peut être fatale pour les rats.

Après 72 heures de l'injection, le diabète a été confirmé chez les rats par mesure de la glycémie à l'aide d'un glucomètre de type (Accu-Check; Roche Diagnostics, Paris, France). Seuls les rats ayant le taux de glucose sanguin supérieur à (14 mmol/l) ont été considérés comme diabétiques et retenus pour cette expérimentation.

3. Traitement des animaux

Après l'induction du diabète, l'ensemble des rats, sains et diabétiques ont été divisés en dix groupes de dix rats chacun et gardés dans des mêmes conditions. Le début du traitement par les éléments minéraux commence 24 heures après la confirmation du diabète et dure 21 jours (durée de traitement). La préparation de la nourriture selon la méthode de Southon et al., (1984) (pour les rats et les souris) mentionnées dans les tableaux 03 et 04.

Groupes des animaux

Notre étude a été divisée en deux parties, la première partie concernée par l'étude de l'effet de zinc sur des rats sous un régime riche en cuivre pour 60 rats répartie en 6 groupes (n=10) comme suite:

- **Groupe 1** : Rats sains recevant une alimentation standard (TS);
- **Groupe 2** : Rats sains recevant une alimentation traité par cuivre (TSTCu);
- **Groupe 3** : Rats sains recevant une alimentation traité par cuivre et zinc (TSTCu+Zn);
- **Groupe 4** : Rats diabétiques recevant une alimentation standard. (DNT);
- **Groupe 5** : Rats diabétiques recevant une alimentation traité par cuivre (DTCu);
- **Groupe 6**: Rats diabétiques recevant une alimentation traité par cuivre et zinc (DTCu+Zn);

Pour la deuxième partie qui est concernée par l'étude de l'effet de zinc sur des rats sous un régime riche en calcium pour 40 rats en plus les deux groupes témoins sains (TS) et diabétique non traités (DNT) de la première partie répartie en 6 groupe (n=10) comme suite :

- **Groupe 1** : Rats sains recevant une alimentation standard (TS);
- **Groupe 2** : Rats sains recevant une alimentation traité par calcium (TSTCa);
- **Groupe 3** : Rats sains recevant une alimentation traité par calcium et zinc (TSTCa+Zn);
- **Groupe 4** : Rats diabétiques recevant une alimentation standard. (DNT);
- **Groupe 5** : Rats diabétiques recevant une alimentation traité par calcium (DTCa);
- **Groupe 6** : Rats diabétiques recevant une alimentation traité par calcium et zinc (DTCa+Zn).

Le zinc est administré aux rats à raison de 231 mg /kg d'alimentation sous forme $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Dorota et al., 2011), le cuivre à raison 30 mg /kg d'alimentation sous forme $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Bremner et al., 1976) et le calcium à raison de 35 g/kg d'alimentation sous forme CaCO_3 (Nelson et al., 1987).

Les éléments minéraux sont administrés aux rats avec l'alimentation pendant 21 jours. Les animaux sont pesés trois fois par semaine. Cependant la consommation alimentaire est mesurée quotidiennement jusqu'à la fin du traitement.

Tableau 03 : Composition de l'alimentation standard utilisée (Southon et al., 1984)

Matières premières	Quantité (g/kg)	Pourcentage (%)
Amidon (maïs)	326	32.6
Saccharose (sucre blanc)	326	32.6
Protéine (soja)	168	16.8
Cellulose (son de blé)	40	4
Minéraux	40	4
Vitamine	20	2
Huile (Afia)	80	8

Tableau 04 : Quantité des métaux dans l'alimentation (Southon et al., 1984)

métal	Quantité (mg/kg)	Métal	Quantité (g/kg)
zinc	52.1	Calcium	7.11
cuivre	6	Phosphate	14.02
iode	0.6	Potassium	3.68
manganèse	58.5	Magnésium	0.70
fer	28.6	Sodium	2.39
		chlor	3.68

4. Sacrifices et prélèvements des échantillons

4.1. Prélèvement sanguin

Les rats sont mis à jeûne puis sacrifiés (par décapitation). Le prélèvement sanguin et la mesure de la glycémie (par le glucomètre) ce fait au moment de sacrifice des rats, le sang prélevé est récolté dans des tubes secs, centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes puis le sérum est séparé en trois fractions dans des tubes eppendorfs et stockés au congélateur à une température de (-20° C) jusqu'au moment de dosage.

4.2. Prélèvement des organes

Après la dissection, le foie, les reins, le testicule et le pancréas sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium (Na Cl) à 0.9 % et pesés. Les reins, le testicule, le pancréas, et un fragment du foie de chaque animal sont mis dans une étuve à 80 C° pendant 16 heures pour les sécher, puis les conservés à température normale dans des tubes polyéthylènes pour le dosage du zinc. Un deuxième fragment du foie est maintenu à (- 20 C°) pour le dosage de MDA et GSH hépatique. La figure 18 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

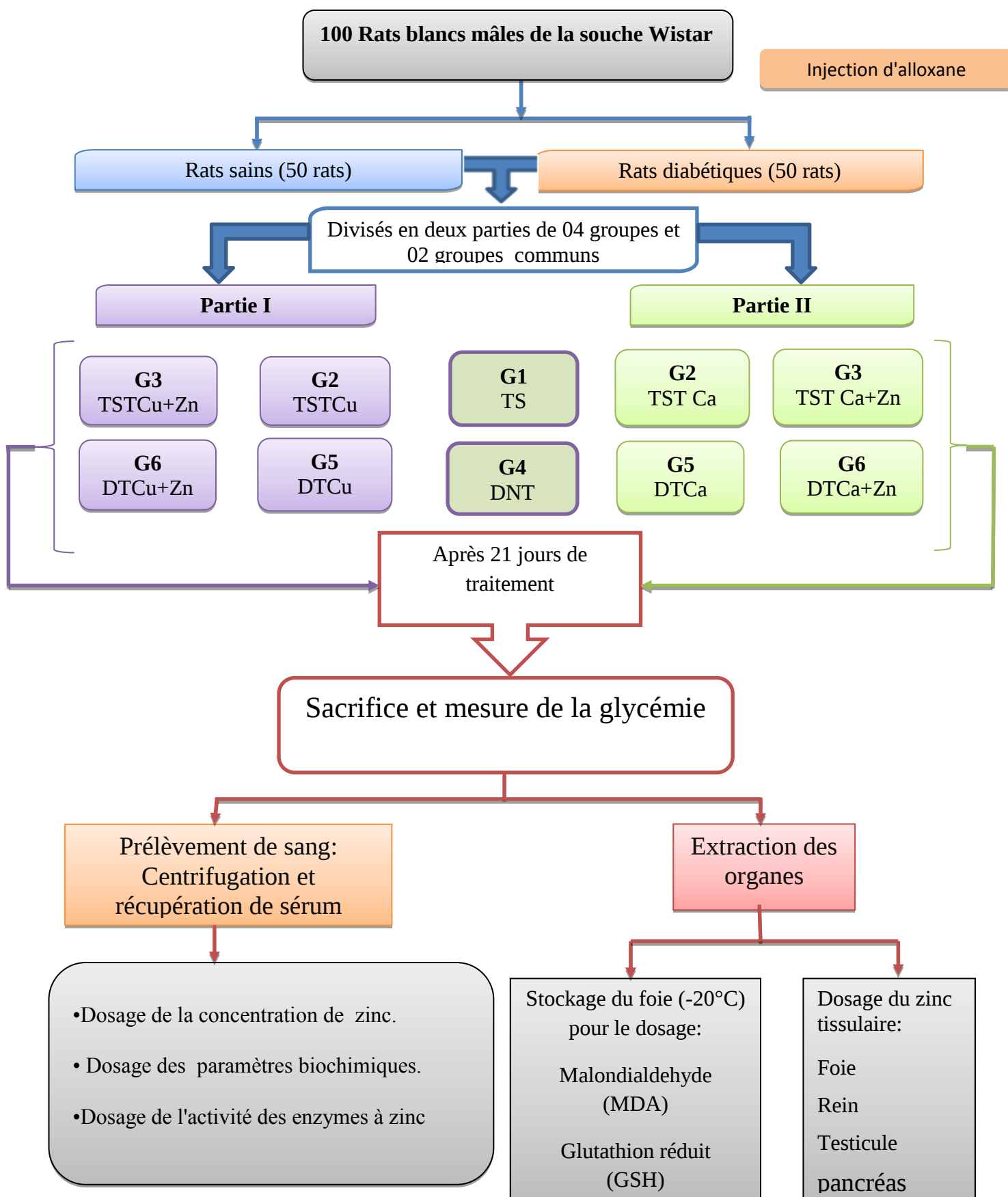


Figure 18: Schéma récapitulatif de protocole expérimental.

5. Méthodes de dosage du zinc

Les organes préalablement séchés sont mis au four à moufle à 480 C° après 48 heures, ils sont transformés en cendres. Après les avoir placés sur une plaque chauffante, on leur a ajouté l'acide nitrique. L'ensemble est agité jusqu'à ce qu'il devient homogène. Enfin, les échantillons sont filtrés à l'aide de papier filtre. Le dosage du zinc dans le sérum et les organes se fait à l'aide de spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme (Shimadzu AA-6200; Somerset, New Jersey, USA). La concentration du zinc est déterminée par comparaison à une gamme étalon de nitrate du zinc (1mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (Southon et al., 1988) .

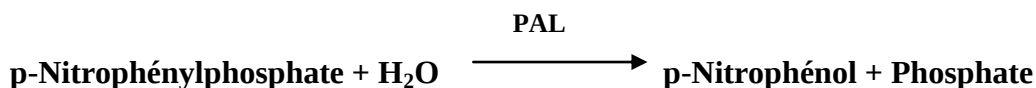
6. Méthodes de dosage de l'activité des enzymes à zinc

6.1. phosphatase alcaline

La mesure de l'activité de la phosphatase alcaline a été effectuée suivant une méthode cinétique enzymatique par le spectrophotomètre de type (UVmini-1240) en utilisant le Kit de réactif de la phosphatase alcaline (Spinreact).

6.1.1. Principe

Phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse des p-nitrophénylphosphate à pH= 10.4 et libération de p-nitrophénol et le phosphate, selon la réaction suivante:



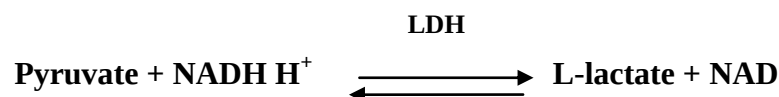
Le taux de formation de p-nitrophénol, mesurée par photométrie, est proportionnel à l'activité de la phosphatase alcaline présente dans l'échantillon (Rosalki, 1993).

6.2. Lactate déshydrogénase

La mesure de l'activité de lactate déshydrogénase a été effectuée suivant une méthode cinétique enzymatique par le spectrophotomètre en utilisant le Kit de réactif de lactate déshydrogénase (Spinreact).

6.2.1. Principe

Lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par NADH selon la réaction suivante:



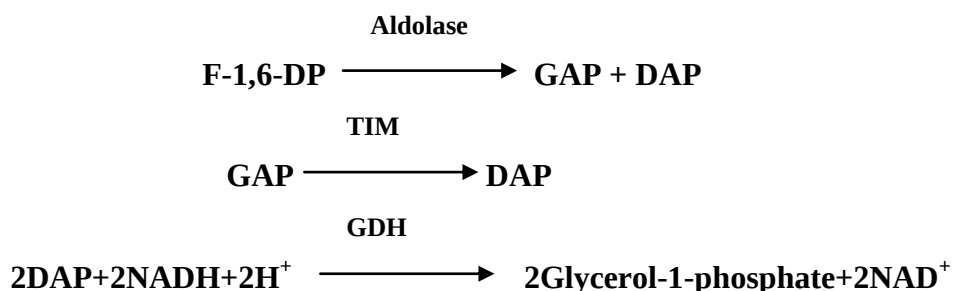
Le taux de la diminution de la concentration de NADPH mesurée par photométrie est proportionnel à l'activité de la LDH présents dans l'échantillon. (Pesce, 1984).

6.3. Fructose 1,6 bi phosphate aldolase

La mesure de l'activité de l'aldolase a été effectuée par le spectrophotomètre suivant une méthode cinétique enzymatique en utilisant le Kit de réactif de l'aldolase (Spinreact).

6.3.1. Principe

L'aldolase catalyse la conversion de fructose-1,6-diphosphate (F-1,6-DP) en glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et dihydroxyacétone phosphate (DAP). L'addition de triose phosphate isomérase (TIM), glycérolphosphate déshydrogénase (GDH) et NADH converti le dihydroxyacétone phosphate en glycérol-1-phosphate.



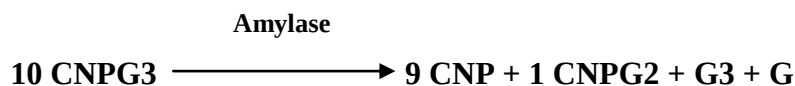
Le taux de la diminution de la concentration de NADPH mesurée à 340 nm est proportionnel à l'activité de l'aldolase présents dans l'échantillon (Feissli et al., 1966).

6.4. Alpha amylase

La mesure de l'activité de l'alpha amylase a été effectuée suivant une méthode cinétique par le spectrophotomètre en utilisant le Kit de réactif de l'alpha amylase (Spinreact).

6.4.1. Principe

Alpha amylase hydrolyse le 2-chloro-4-nitrophényl- α -D-maltotrioside (CNPG3) pour libérer 2-chloro-4-nitrophénol (CNP) et la forme de 2-chloro-4-nitrophényl- α -D-maltoside (CNPG2), maltotriose (G3) et de glucose (G) selon la réaction suivante:



Le taux de formation de 2-chloro-4-nitrophénol, mesurée par photométrie, est proportionnel à l'activité de l'alpha-amylase présente dans l'échantillon (Ying, 1998) .

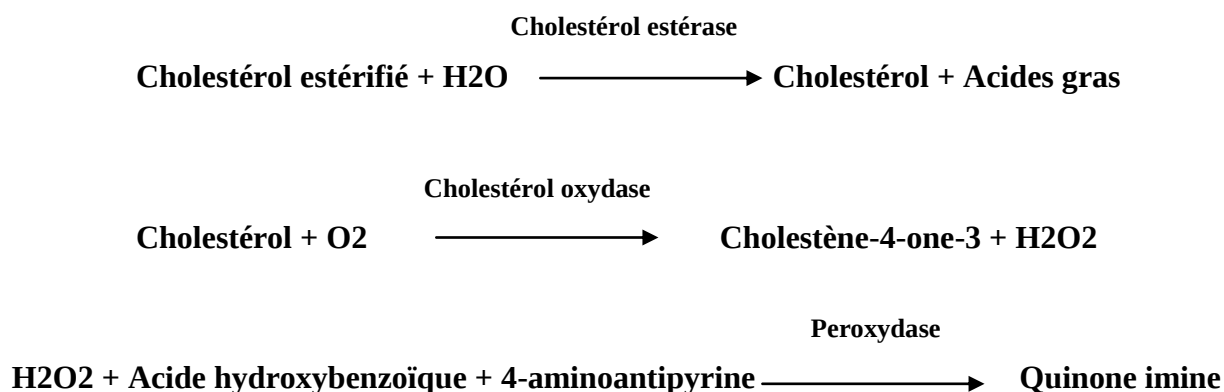
7. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques

7.1. Dosage du cholestérol total

Le cholestérol a été déterminé suivant une méthode enzymatique (réaction de Trinder) par un spectrophotomètre en utilisant le Kit de réactif du cholestérol (Spinreact).

7.1.1. Principe

Les esters de cholestérol sont hydrolysés enzymatiquement par la cholestérol estérase qui les décomposent en cholestérol et en acides gras libres. Le cholestérol libre, y compris celui initialement présent, est ensuite oxydé par le cholestérol oxydase pour former du cholestène-4-one-3 et du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène se combine avec de l'acide hydroxybenzoïque (HBA) et de la 4-aminoantipyrine pour former un chromophore (quinoneimine) quantifié à 500 nm.



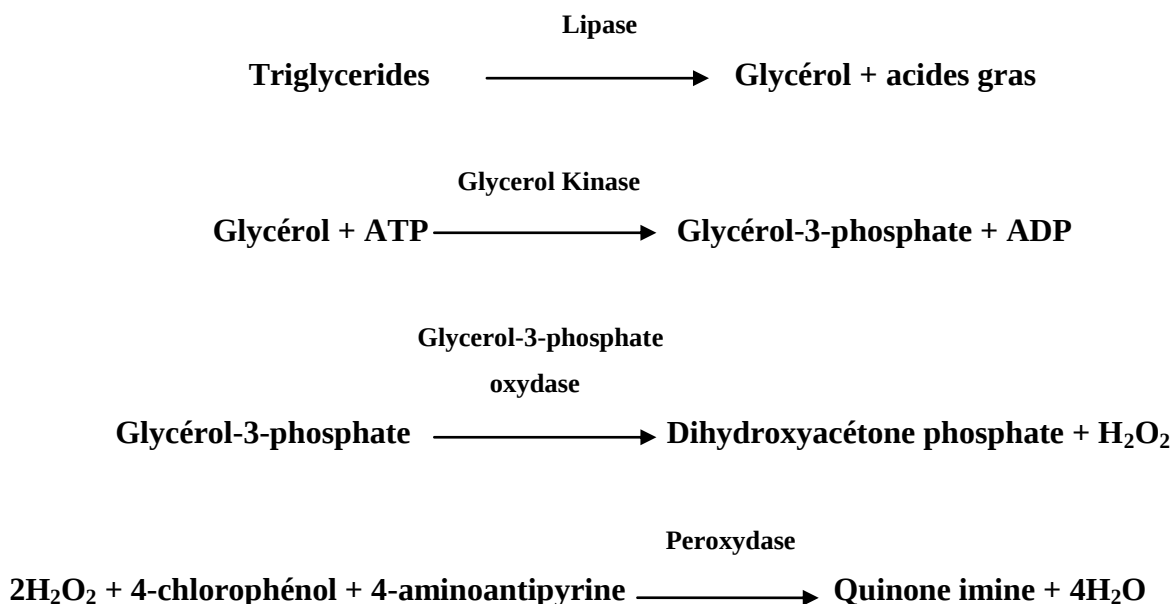
L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présent dans l'échantillon du sérum (Naito, 1984).

7.2. Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides a été effectué par le même spectrophotomètre suivant une méthode colorimétrique enzymatique des triglycérides (Glycérol phosphate oxydase) en utilisant le Kit de réactif des glycérides (Spinreact).

7.2.1. Principe

Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement par la lipase afin de libérer les acides gras et le glycérol. Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) et le glycérol Kinase (GK) pour produire du Glycérol-3-phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP). Le Glycérol-3-phosphate est oxydé en Dihydroxyacétone phosphate (DAP) par le glycérol phosphate oxydase (GPO) en produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Lors d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase, le H_2O_2 réagit avec le 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le 4-chlorophénol (4-CP) .



L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm est directement proportionnelle à la quantité des triglycérides dans l'échantillon du sérum (Kaplan et al., 1984).

7.3. Dosage des protéines totales sériques

Le dosage des protéines sérique a été effectué par le spectrophotomètre suivant une méthode de Biuret en utilisant le Kit de réactif des protéines (Spinreact).

7.3.1. Principe

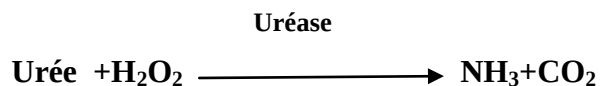
Les ions cuivriques, dans un milieu alcalin, interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe bleu violet ou l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des protéines sériques (Burtis et al., 1999)

7.4. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée a été effectué par le spectrophotomètre suivant une méthode cinétique enzymatique de l'urée (uréase) en utilisant le Kit de réactif de l'urée (Spinreact).

7.4.1. Principe

L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et libération ion d'ammonium et CO_2 selon la réaction suivante:



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en forment un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'urée (Kaplan, 1984).

7.5. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine a été effectué par le spectrophotomètre suivant une méthode colorimétrique en utilisant le Kit de réactif de la créatinine (Spinreact).

7.5.1. Principe

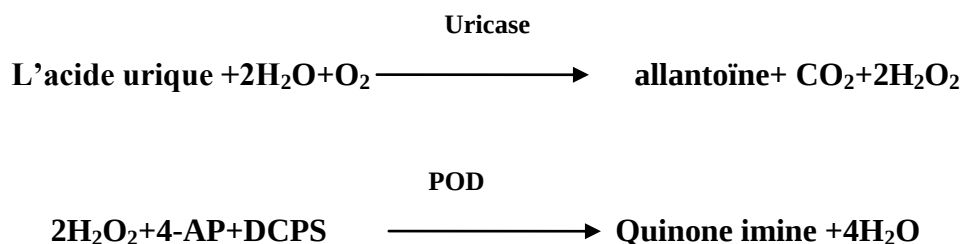
La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine (Murray, 1984).

7.6. Dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique a été effectué par le spectrophotomètre suivant une méthode cinétique enzymatique (uricase) en utilisant le Kit de réactif de l'acide urique (Spinreact).

7.6.1. Principe

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et de peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$), ce dernier en présence de peroxydase (POD) 4-aminophénazone (4-AP) et le 2-4 dichlorophéno sulfonates (DCPS) forme un composé rose (Schultz, 1984) selon les réactions :

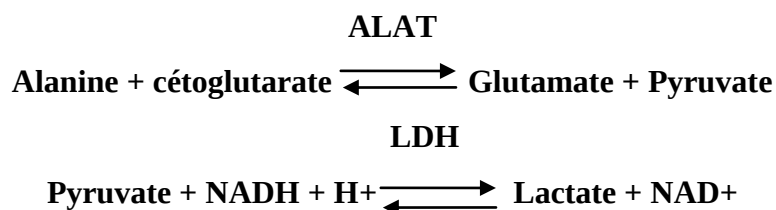


7.7. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (TGP)

La mesure de l'activité de ALAT a été effectuée par le spectrophotomètre suivant une méthode cinétique enzymatique en utilisant le Kit de réactif de ALAT (Spinreact).

7.7.1. Principe

Alanine aminotransférase (ALAT) ou Glutamate pyruvate transaminase (GPT) catalyses le transfert réversible de groupe amine de l'alanine en α - cétooglutarate pour former le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate par lactate déshydrogénase (LDH) et NADH:



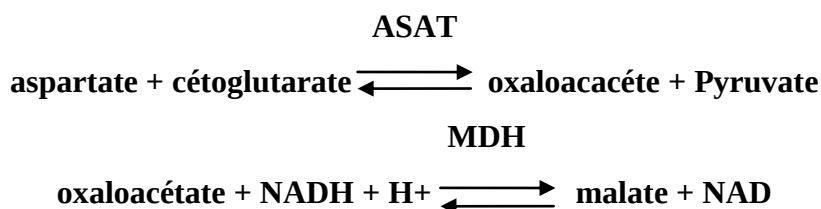
Le taux de la diminution de la concentration de NADH mesurée photométriquement est proportionnel à l'activité de l'ALAT présente dans l'échantillon (Murray, 1984)

7.8. Dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase ASAT (TGO)

La mesure de l'activité de ASAT a été effectuée par le spectrophotomètre suivant une méthode cinétique enzymatique en utilisant le Kit de réactif de ASAT (Spinreact) .

7.8.1. Principe

Aspartate aminotransférase (ASAT) ou Glutamate oxaloacétate transaminase (TGO) catalyses le transfert réversible de groupe amine de l'aspartate en α - cétooglutarate pour former le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est réduit en malate par malate déshydrogénase (MDH) et NADH:



Le taux de la diminution de la concentration de NADH est mesurée photométriquement proportionnel à l'activité de l'ASAT présente dans l'échantillon (Murray, 1984).

7.9. Dosage de MDA et GSH hépatique

7.9.1. Préparation de l'homogénat

Après le sacrifice des rats, les foies sont immédiatement prélevés par dissection et perfusés avec une solution saline (0.9%) afin de drainer tout le sang restant dans le foie. Un gramme de foie de rats des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150mM, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages du taux des protéines, malondialdéhyde (MDA) et la concentration de glutathion réduit (GSH).

7.9.2. Dosage des protéines tissulaires

7.9.2.1. Principe

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines.

7.9.2.2. Méthode de dosage

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

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

7.9.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

7.9.3.1. Principe

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. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'Esterbauer et al. (1992). Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut donc mesuré par spectrophotométrie à 530 nm (figure 19).

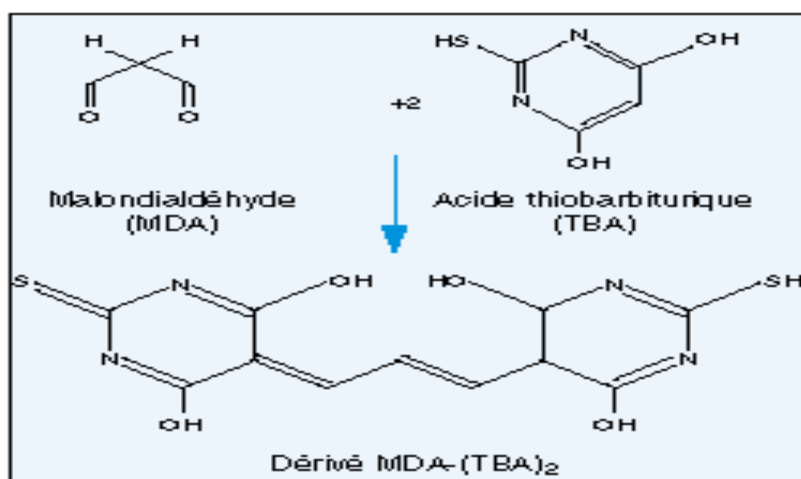


Figure 19 : Réaction de dialdéhydemalonique avec l'acide Thiobarbiturique.

7.9.3.2. Méthode de dosage

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

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

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

Lecture de la densité optique à $\lambda=530$ nm. La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$) :

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

C : Concentration en nmoles/mg de protéines ;

- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 1 cm ;

- X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2

7.9.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH)

7.9.4.1. Principe

Le dosage du glutathion est réalisé par le réactif d'Ellman (DTNB) selon la méthode de Weckbeker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5- mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion (figure 20).

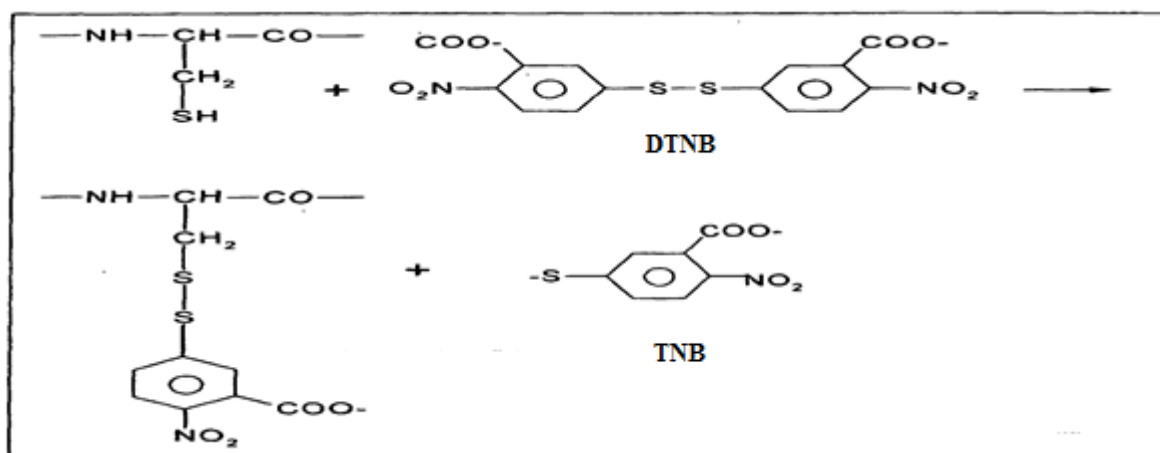


Figure 20 : Reaction d'Ellman

7.9.4.2. Méthode de dosage

Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation : 0.8 ml de l'homogénat auquel est ajouté 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25% . agitation, incubation dans un bain de glace pendant 15 minutes. Centrifugation 1000rpm pendant 5 minutes. 0.5 ml de surnageant au quel est ajouté 1 ml de tampon Tris. Agitation et addition de 0.025 ml de DTNB à 0.01M dissout dans le méthanol absolu. incubation 5 minutes à température ambiante puis lecture de la DO à $\lambda = 412$ nm.

$$\text{GSH } (\mu\text{mol GSH/mg de protéine}) = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg protéine}}$$

D0 : Densité optique.

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

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

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

0.8 : Volume de l'homogénat.

0.5 : Volume de surnageant.

8. Traitement statistique des résultats

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type moyen ($\text{Moy} \pm \text{SEM}$), la comparaison entre les différents groupes sont effectuées après un Test T de Student T. L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel MINITAB (Version 13). Les différences sont considérées comme : Significatives lorsque ($p < 0.05$). Hautement significative lorsque ($p < 0.01$). Très hautement significative lorsque ($p < 0.001$). Avec p : Seuil de signification.

CHAPITRE II

Résultats

1. Effet du zinc sur des rats alimentés par un régime riche en Cuivre

1.1 Etude de la croissance corporelle et la consommation alimentaire

1.1.1. Croissance corporelle

Les résultats obtenus dans notre travail (Figures 21) montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du poids corporel chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). D'autre part, les résultats indiquent une diminution significative du poids chez les rats sains traités par cuivre (TSTCu) ($p < 0.05$) et les rats diabétiques traités par cuivre (DTCu) ($p < 0.001$) comparativement aux lots témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

Tandis que, chez les rats sains traités par le cuivre et le zinc (TSTCu+Zn) nous remarquons une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) de poids corporel (+12.98%) comparativement au groupe des rats sains traités par cuivre (TSTCu). Alors que chez les rats diabétiques traités par le cuivre et le zinc (DTCu+Zn) nous remarquons une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de poids corporel (+38.70%) comparativement au groupe des rats diabétiques traités par cuivre (DTCu).

1.1.2. Consommation alimentaire

La figure 22 montre aussi une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) des taux de consommation journalière de nourriture chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). Nous remarquons aussi une diminution significative ($p < 0.05$) des taux de consommation journalière de nourriture chez les lots des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et les rats diabétiques traités par cuivre (DTCu) comparativement aux lots témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT).

Par contre chez le lot des rats sains traités par le cuivre et le zinc (TSTCu+Zn), on enregistre une amélioration significative ($p < 0.05$) du taux de consommation alimentaire (+5.21%) comparativement aux rats sains traités par cuivre (TSTCu). Mais pour les rats diabétiques traités par Cuivre et Zinc (DTCu+Zn), on observe une légère augmentation du taux de consommation alimentaire (0.59%) en comparaison avec les rats diabétiques non traités (DTCu).

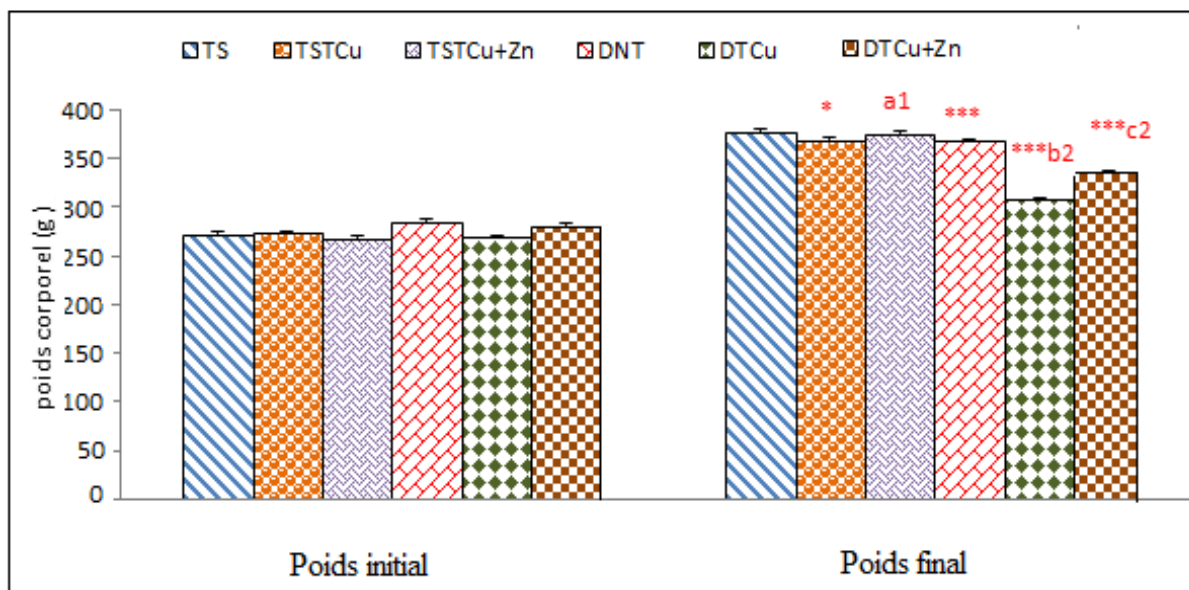


Figure 21 : Variation du poids corporel chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS
 a1 $p < 0.01$ comparaison avec le lot TSTCu
 b2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DNT
 c2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCu

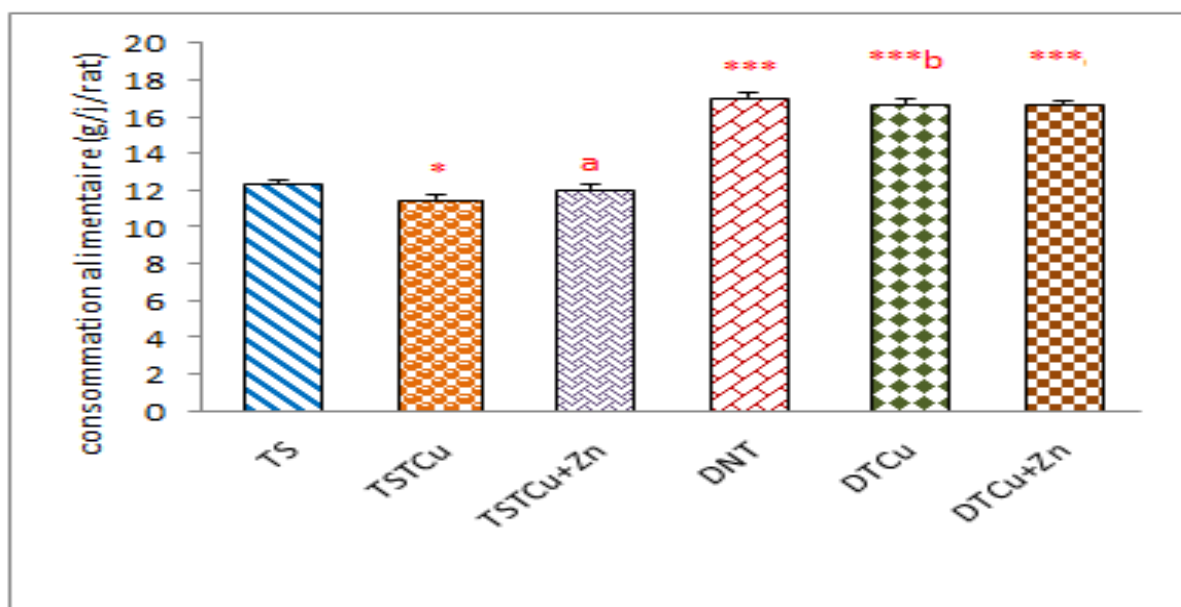


Figure 22 : Variation de la consommation alimentaire chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

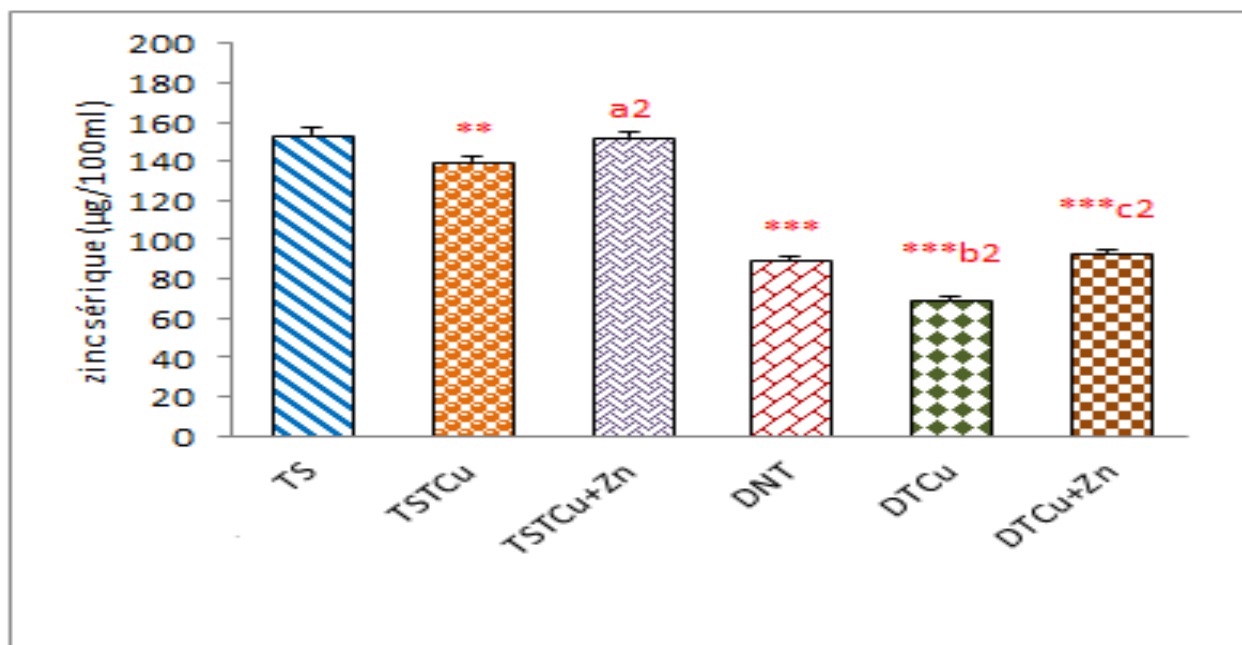
* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS
 a $p < 0.05$ comparaison avec le lot TSTCu
 b $p < 0.05$ comparaison avec le lot DNT
 c $p < 0.05$ comparaison avec le lot DTCu

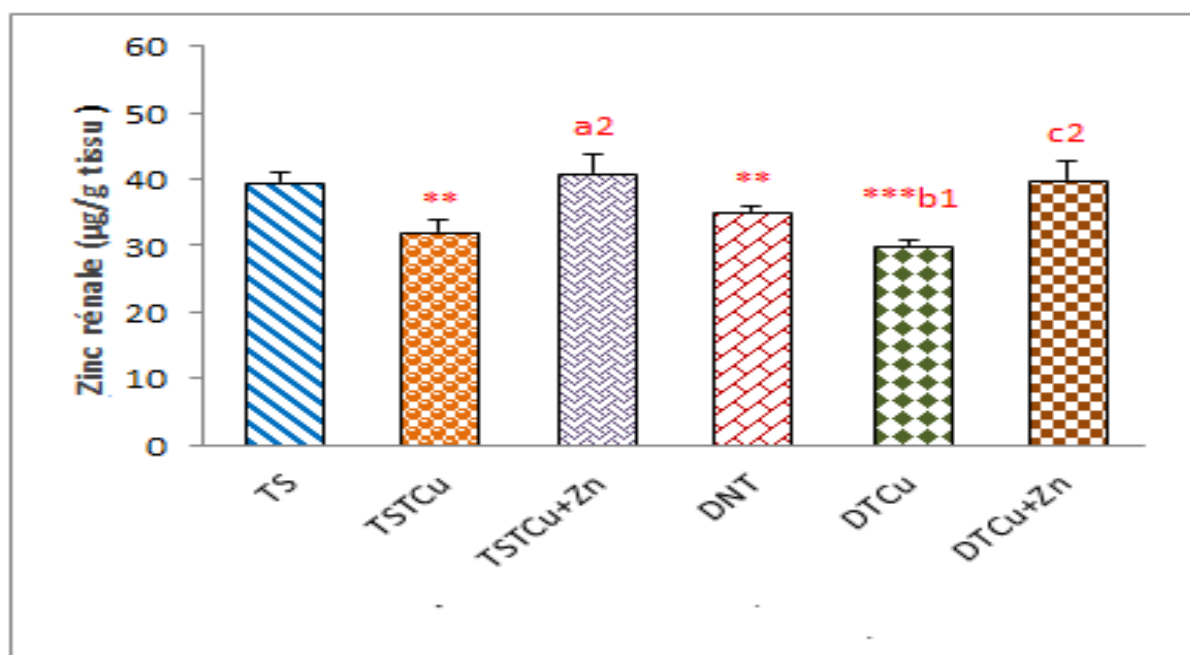
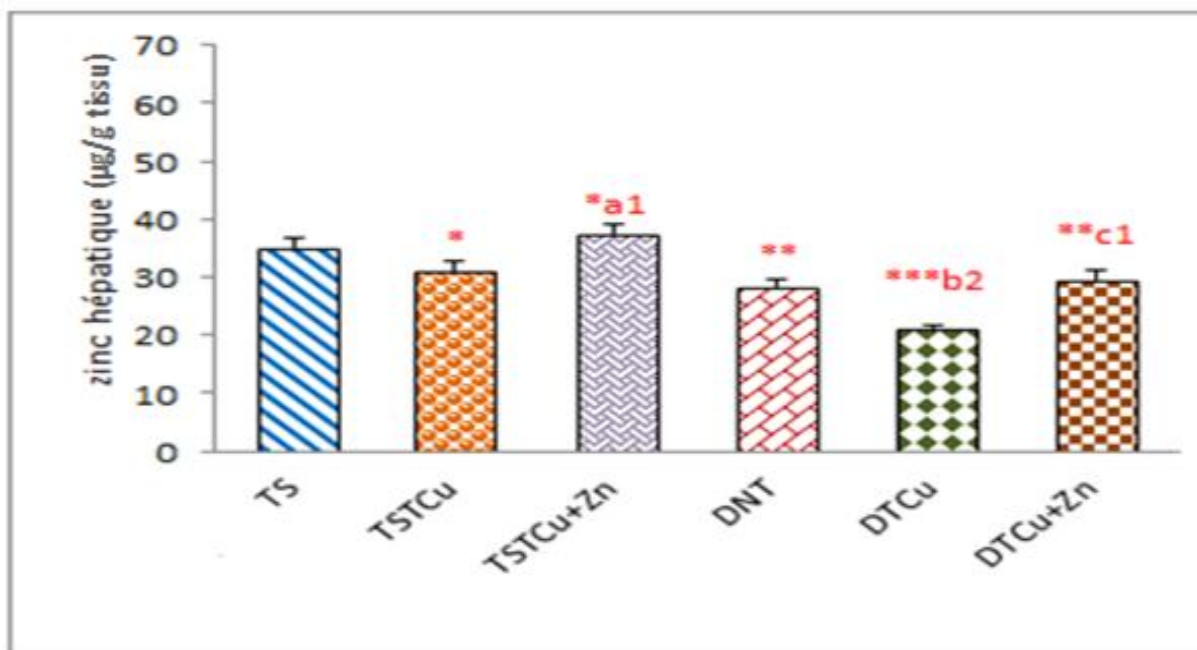
1.2. Etude de statut du zinc dans l'organisme

1.2.1. Concentration du zinc sérique et tissulaire

La figure 23 présente une diminution significative de la concentration du zinc dans le sérum et testicule ($p < 0.001$), dans le foie et le rein ($p < 0.01$) et dans le pancréas ($p < 0.05$) chez les rats diabétiques non traités (DNT) par rapport au rats témoins sains (TS). Un supplément de cuivre chez les rats sains (TSTCu) et diabétique (DTCu) diminue la concentration de zinc sérique ($p < 0.01$ et $p < 0.001$), hépatique ($p < 0.05$ et $p < 0.001$), rénale ($p < 0.01$ et $p < 0.01$), pancréatique ($p < 0.001$ et $p \geq 0.05$) et testiculaire ($p < 0.05$ et $p < 0.001$) en comparaison avec les groupes témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

Par contre chez les lots, rats sains traités par le cuivre et le zinc (TSTCu+Zn) et rats diabétiques traités par le cuivre et le zinc (DTCu+Zn), nous avons remarqué une amélioration significative de la concentration de zinc dans le sérum ($p < 0.001$) (+9.16% et 33.52%), foie ($p < 0.01$) (+10.48% et +39.15%), reins ($p < 0.001$ et $p < 0.001$) (+28.17% et +33.63%), pancréas ($p < 0.05$ et $p < 0.01$) (+6.36% et 8.18%) et testicules ($p < 0.05$ et $p < 0.05$) (+5.35% et +35.54%) par rapport aux rats sains traités par cuivre (TSTCu) et aux rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) respectivement.





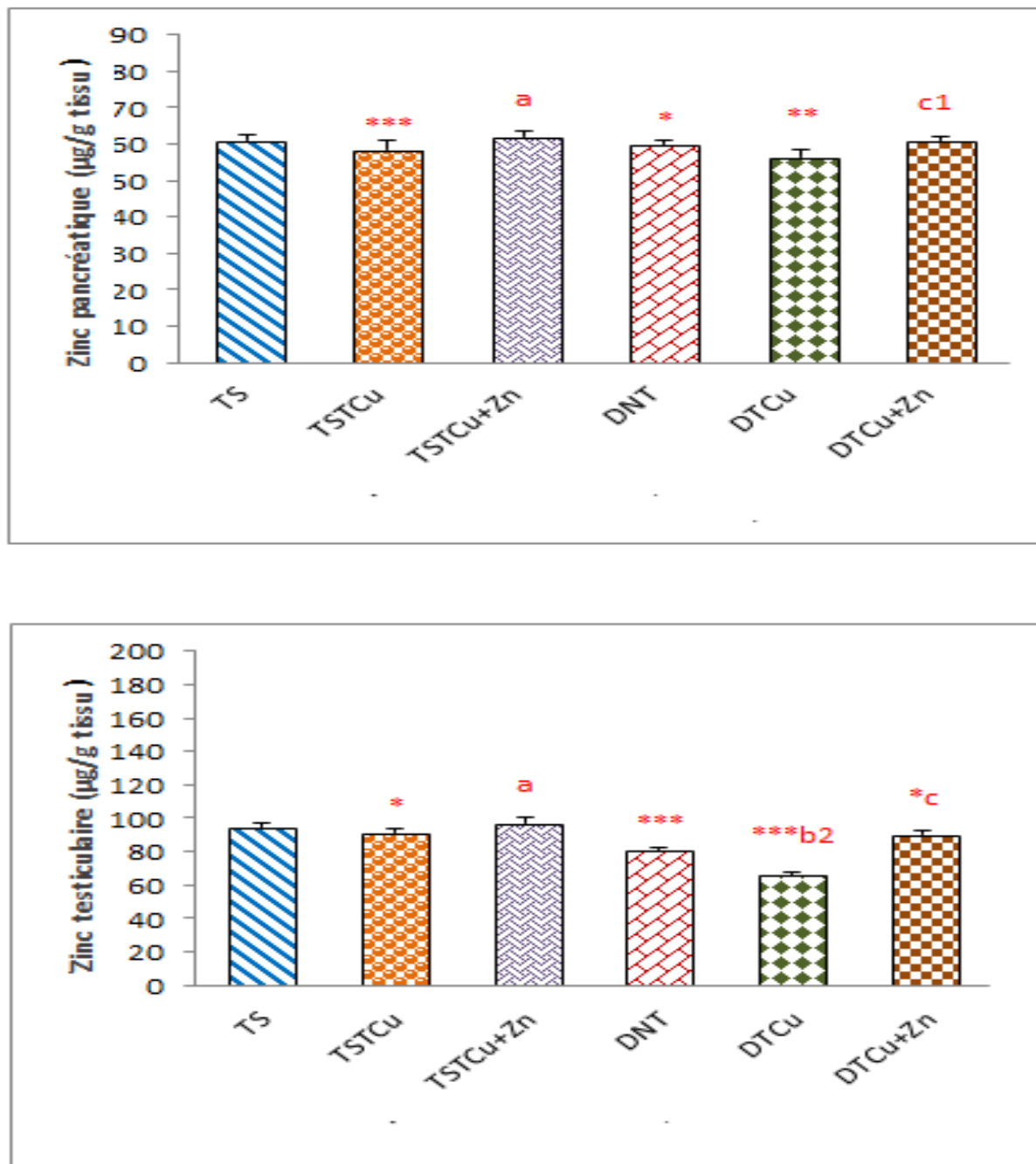


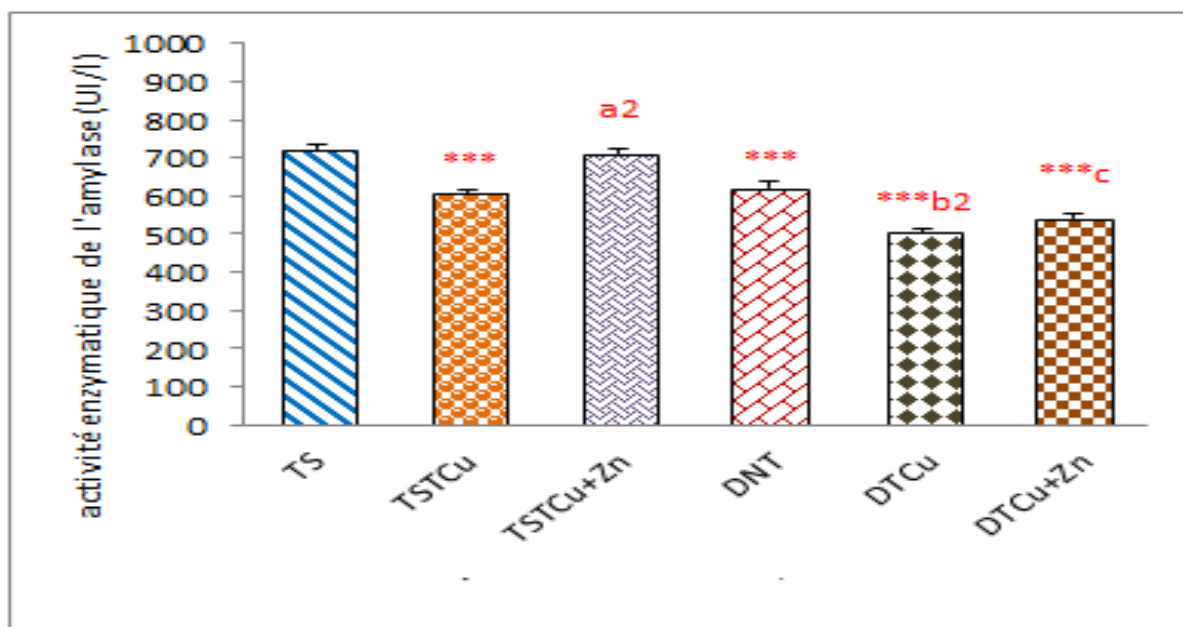
Figure 23: Variation de la concentration de zinc dans le sérum, le foie, les reins, le pancréas et les testicules chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

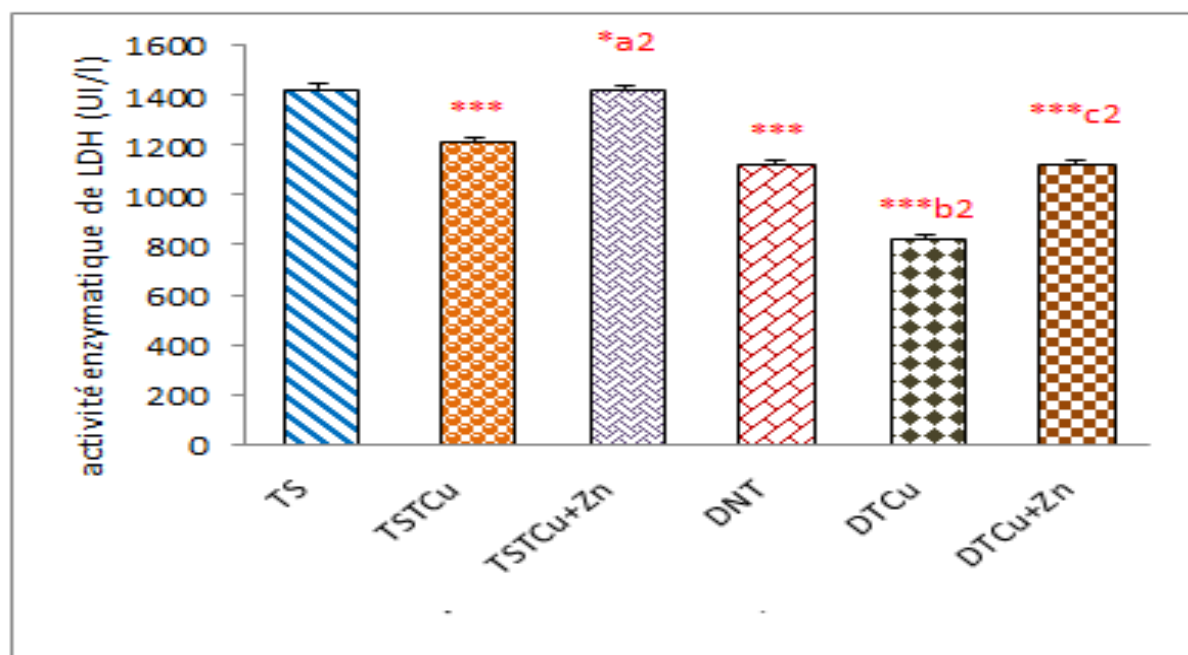
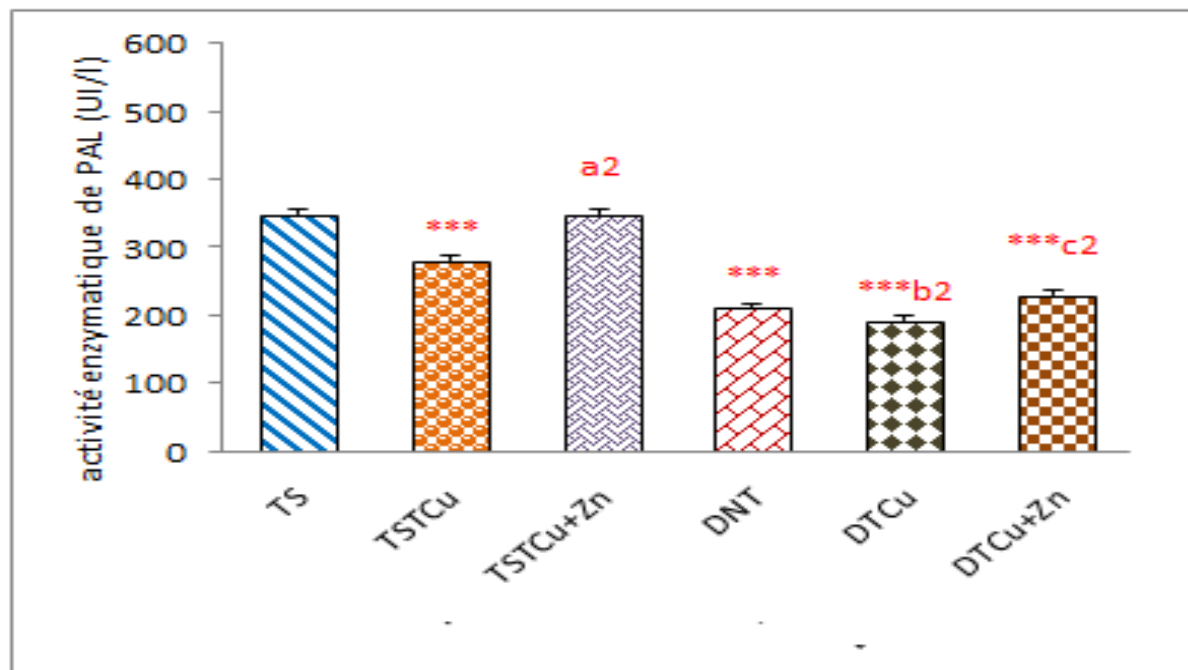
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS
a $p < 0.05$; a1 $p < 0.01$; a2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot TSTCu
b1 $p < 0.01$; b2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DNT
c $p < 0.05$; c1 $p < 0.01$; c2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCu

1.2.2. Activité de certains enzymes à zinc

Les résultats de l'effet de zinc sur l'activité des enzymes à zinc chez les rats supplémentés par le cuivre sont montrés dans la figure 24. En effet nos résultats montrent une diminution très hautement significative de l'activité enzymatique de l'amylase ($p < 0.001$), PAL ($p < 0.001$), LDH ($p < 0.001$) et l'aldolase ($p < 0.001$) dans le sérum des rats diabétiques non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). De plus chez les lots des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et les rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) on a constaté une diminution significative ($p < 0.001$) de l'activité sérique de l'amylase, PAL, LDH et l'aldolase en comparaison avec les lots témoins sains (TS) et diabétiques non traités (DNT) respectivement.

Alors que chez le lot rats sains traités par le cuivre et le zinc (TSTCu+Zn) et le lot rats diabétiques traités par le cuivre et le zinc (DTCu+Zn) on a enregistré une amélioration significative de l'activité enzymatique de l'amylase ($p < 0.001$ et $p < 0.05$) (+16.02% et 6.23%), la phosphatase alcaline ($p < 0.001$) (+24.78% et +20.72%), lactate déshydrogénase ($p < 0.001$) (+17.15% et +36.79%) et l'aldolase ($p < 0.001$) (+27.21% et +19.29%) lorsque en comparaison avec les lots des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) respectivement.





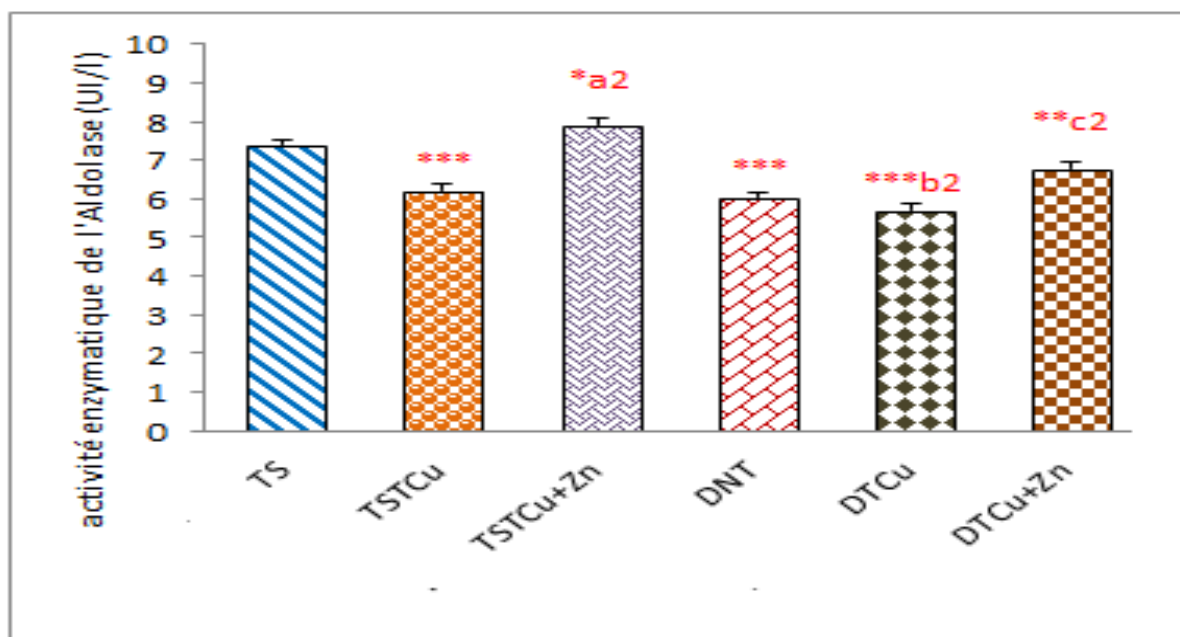


Figure 24: Variation de l'activité enzymatique de l'amylase, de la phosphatase alcaline (PAL), de lactate déshydrogénase (LDH) et de l'aldolase chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

^{a2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot TSTCu

^{b2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DNT

^c $p < 0.05$; ^{c2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCu

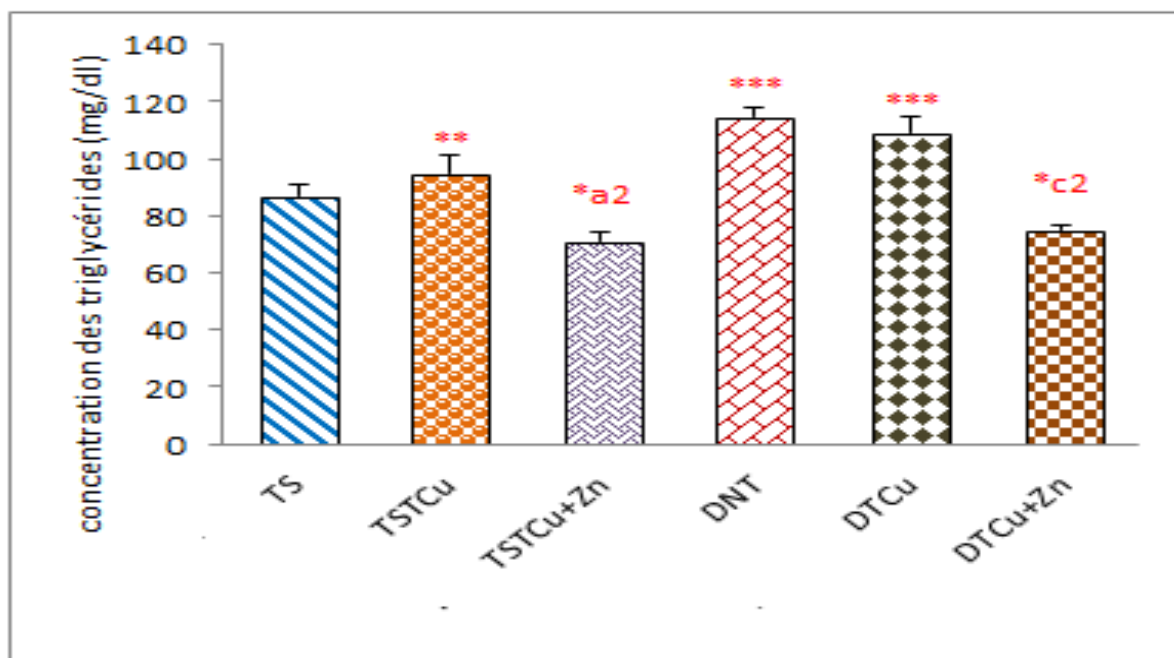
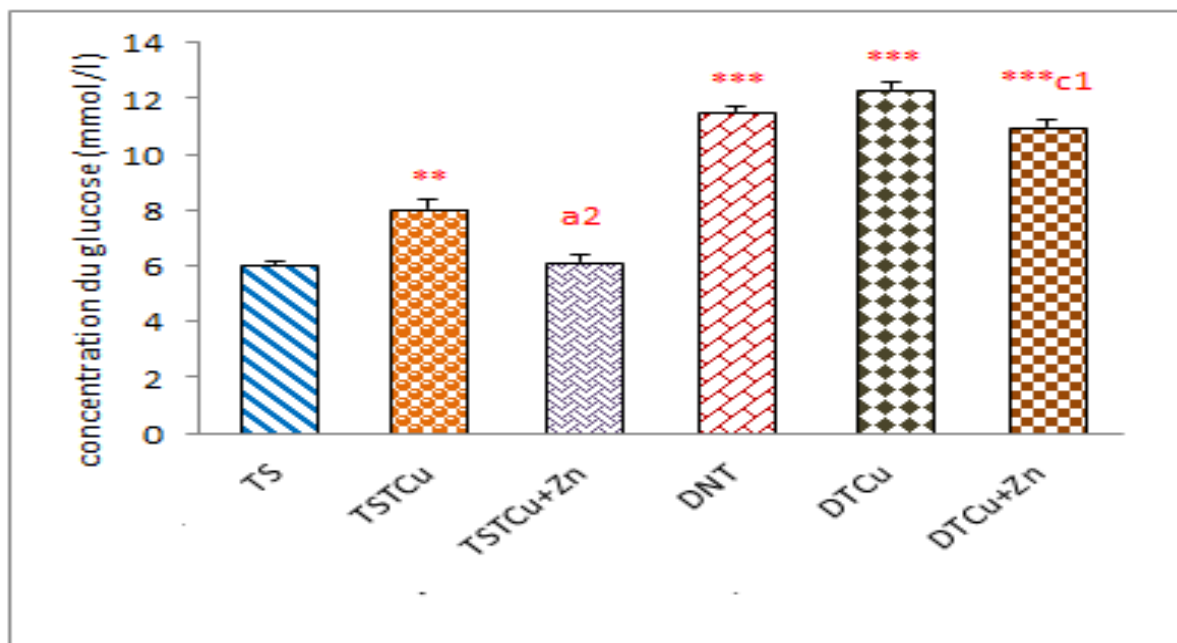
1.3. Etude des paramètres biochimiques

1.3.1. Glucose, Triglycérides et Cholestérol

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration sérique du glucose, triglycérides et du cholestérol chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). En revanche, on a remarqué une augmentation significative de la concentration sérique du glucose et triglycérides ($p < 0.01$) et du cholestérol ($p < 0.001$) chez le lot des rats sains traités par cuivre (TSTCu) par rapport au lot témoin sain (TS). Mais pour le lot des rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) on a signalé une augmentation non significative de la concentration du glucose (12.32 ± 0.26 contre 11.57 ± 0.16) et hautement significative ($p < 0.01$) de la concentration du cholestérol par rapport au lot diabétique non traité.

Par contre chez les lots traités par le cuivre et le zinc pour les rats sains (TSTCu+Zn) et diabétiques (DTCu+Zn), nous remarquons une diminution significative de la concentration du

glucose ($p < 0.001$ et $p < 0.01$) (- 23.47 % et -18.91%), triglycérides ($p < 0.001$) (-25.43% et -31.29%) et du cholestérol ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) (-8.59% et -10.98%) en comparaison avec les lots des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et des rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) respectivement (figure 25).



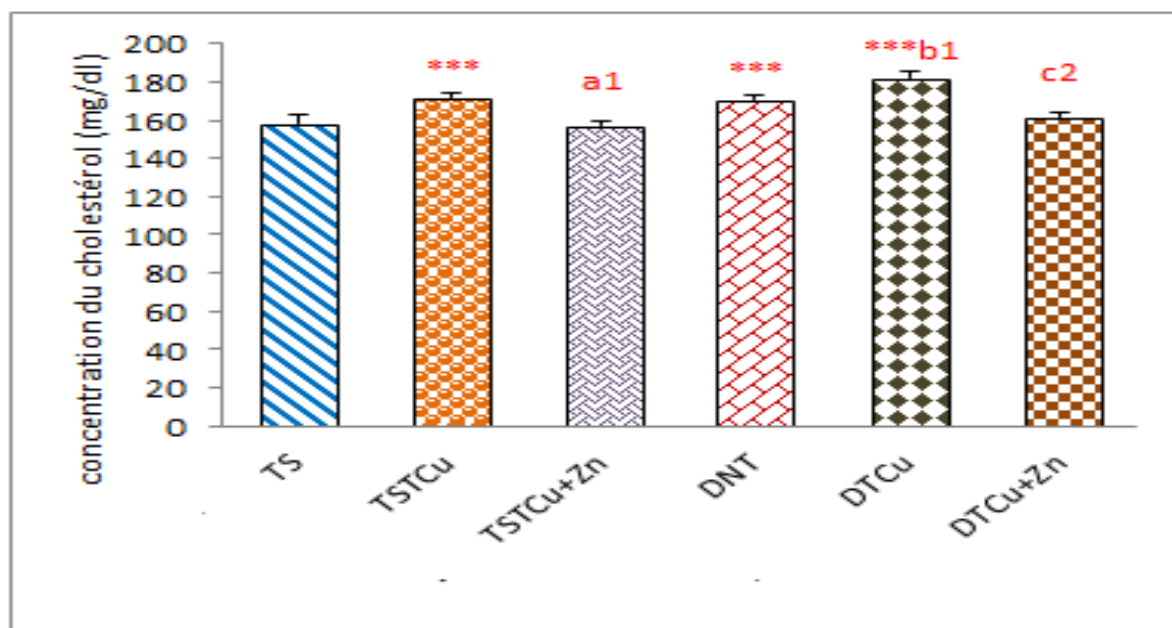


Figure 25: Variation de la concentration sérique de glucose, des triglycérides et du cholestérol chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

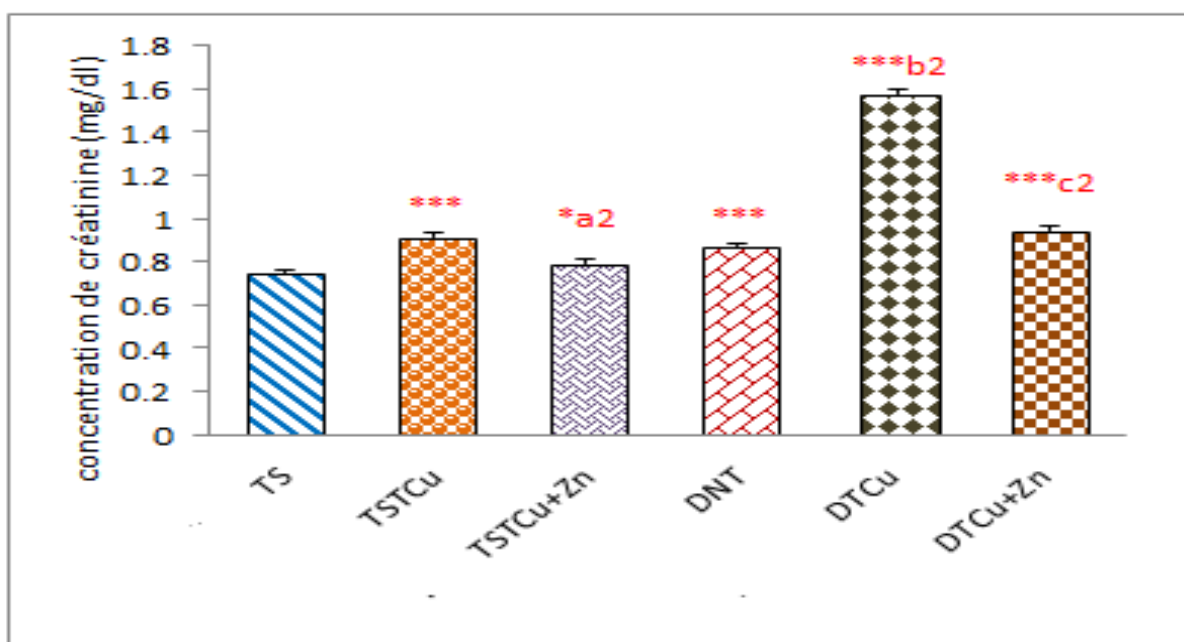
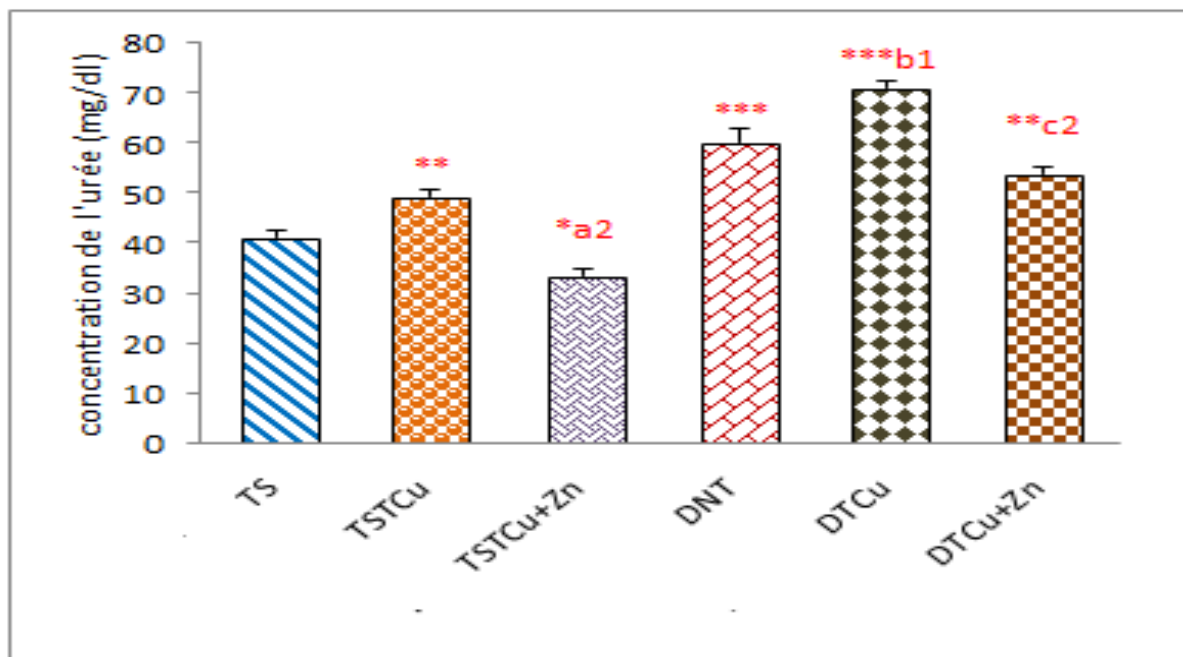
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS
 a1 $p < 0.01$; a2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot TSTCu
 b1 $p < 0.01$ comparaison avec le lot DNT
 c1 $p < 0.01$; c2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCu

1.3.2. Urée, créatinine, acide urique et protéines totales

La figure 26 illustre une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration sérique de l'urée, créatinine et l'acide urique et une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration des protéines totales chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). Par ailleurs, nos résultats indiquent une augmentation significative de la concentration sérique de l'urée ($p < 0.01$), de la créatinine ($p < 0.001$) et de l'acide urique ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) et une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration des protéines totales chez les lots des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et des rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) par rapport aux lots témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

En revanche l'administration du zinc chez les rats sains alimentés par un régime traité par le cuivre (TSTCu+Zn) a provoqué une diminution significative de la concentration sérique d'urée ($p < 0.01$) (-31.91%), de la créatinine ($p < 0.001$) (-14.13%) et de l'acide urique ($p < 0.01$) (-11.95%) et une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration des protéines totales (+19.44%) par rapport aux rats sains alimentés par un régime supplémenté de cuivre

(TSTCu), mais pour les rats diabétiques alimentés par un régime supplémenté de cuivre, le traitement par le zinc (DTCu+Zn) a causé une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration sérique d'urée (-23.94%), de créatinine (-39.87%) et d'acide urique (-9.71%) et une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) de la concentration des protéines totales (+14.67%) par rapport aux rats diabétiques alimentés par un régime supplémenté de cuivre (DTCu).



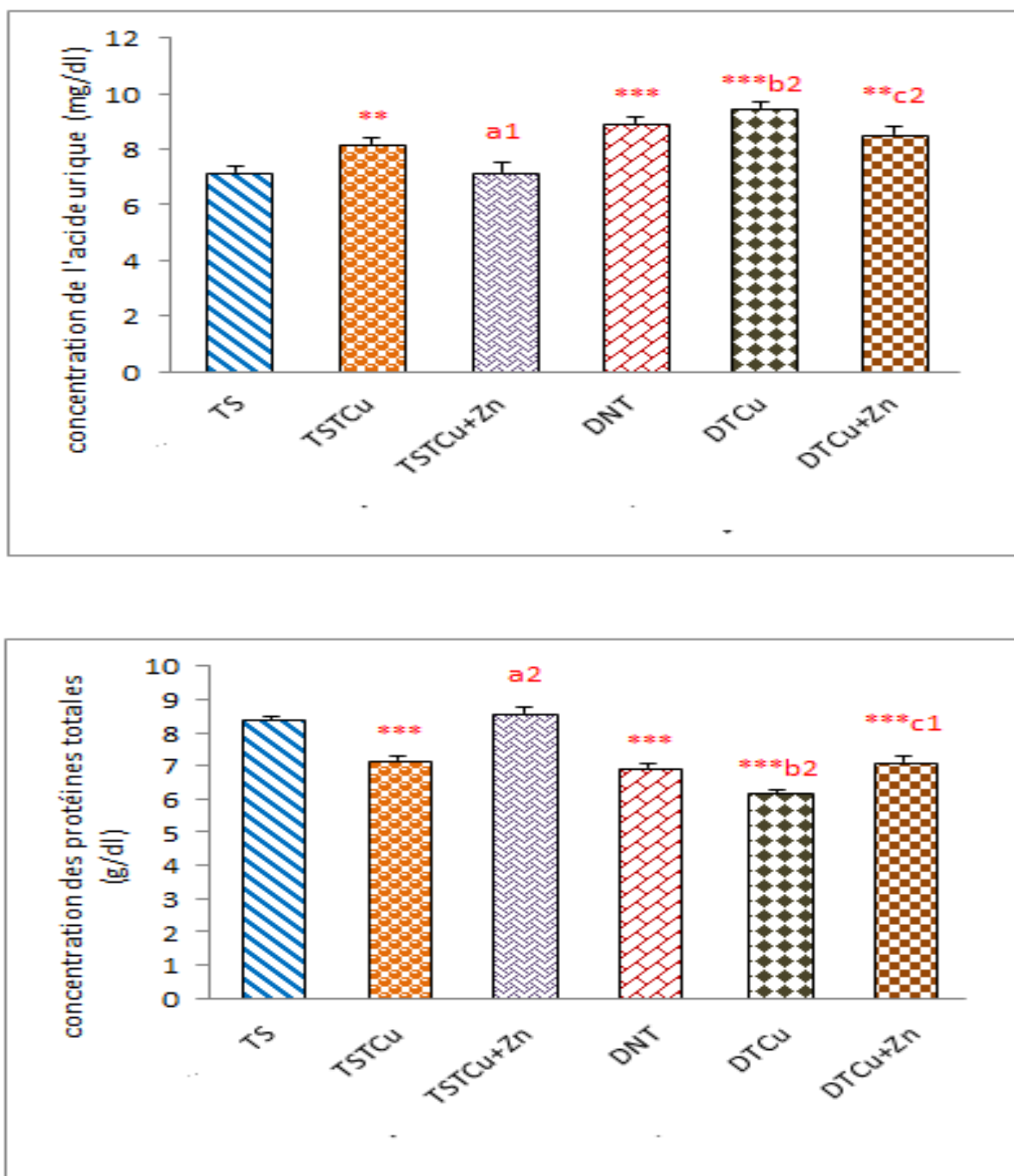


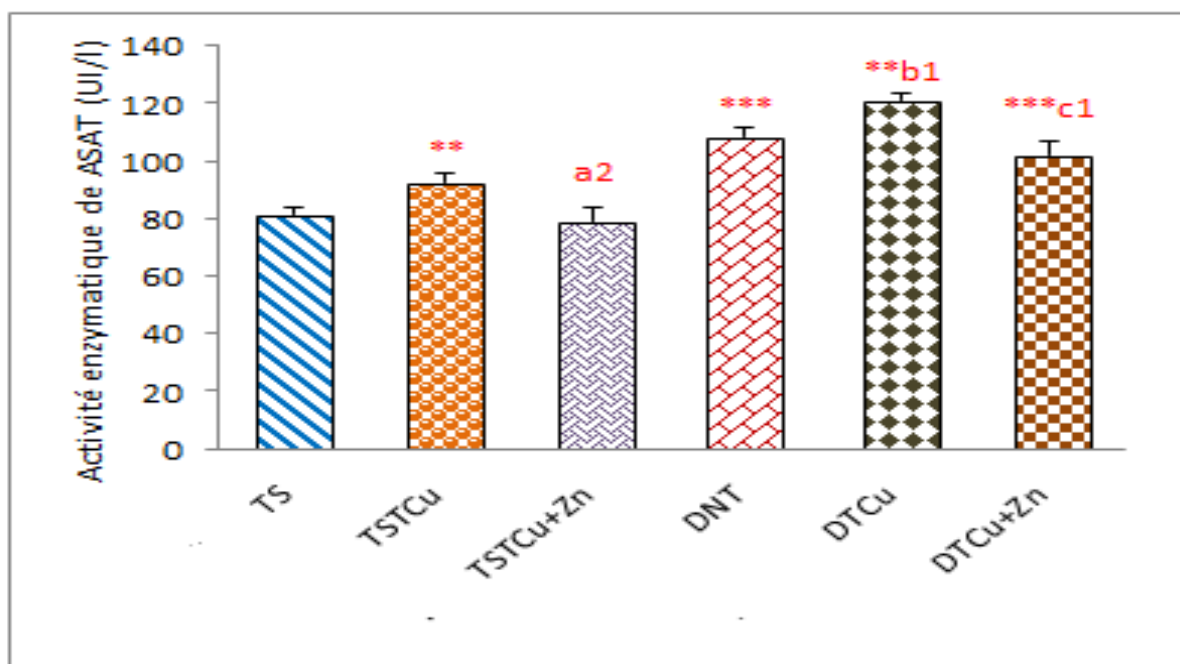
Figure 26: Variation de la concentration sérique de l'urée, la créatinine, l'acide urique et les protéines totales chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS
 a1 $p < 0.01$; a2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot TSTCu
 b1 $p < 0.01$; b2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DNT
 c1 $p < 0.01$ c2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCu

1.3.3. Transaminases (ASAT, ALAT)

Les résultats obtenus présentés dans la figure 27 révèlent une augmentation de l'activité des transaminases (ASAT, ALAT) avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$) chez les rats diabétiques non traité (DNT) par rapport aux rats témoin sain (TS). Une augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT et ALAT) avec une différence significative, a été enregistrée chez les lots des rats sains traités par cuivre (TSTCu) ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) et des rats diabétiques traités par cuivre (DTCu) ($p < 0.01$) par rapport au lot témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

D'autre part, l'administration du zinc chez les groups ; sains traité par cuivre (TSTCu+Zn) et diabétique traité par cuivre (DTCu+Zn) a provoqué une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) et hautement significative ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique de ASAT (-14.42% et -15.31%) et une diminution très hautement significative de l'activité de ALAT (-29.70% et -19.55%) par rapport au lot des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et des rats diabétiques traités par cuivre (DTCu) respectivement.



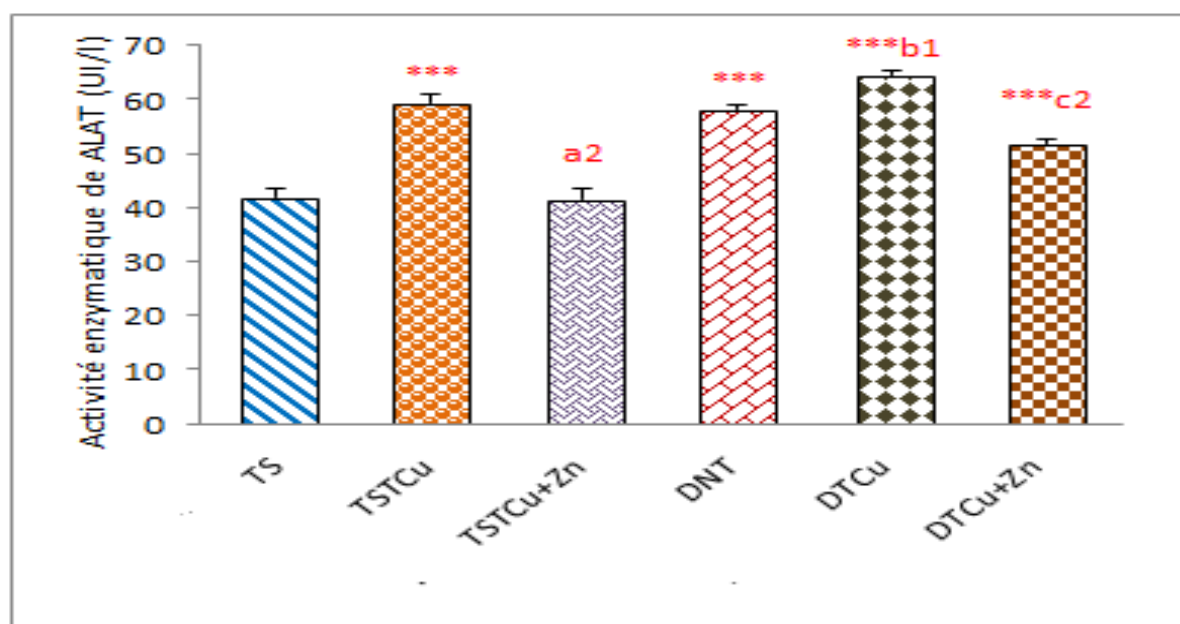


Figure 27: variation de l'activité enzymatique sérique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

** p < 0.01 ; *** p < 0.001 comparaison avec le lot TS
 a2 p < 0.001 comparaison avec le lot TSTCu
 b1 p < 0.01 comparaison avec le lot DNT
 c1 p < 0.01 c2 p < 0.001 comparaison avec le lot DTCu

1.3.4. Malondialdéhyde (MDA) et Glutathion réduit (GSH) hépatique

D'après les résultats obtenus (figure 28), on observe une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du taux hépatique de MDA chez le groupe diabétique non traité (DNT) par rapport au groupe témoin sain (TS). De même l'interprétation des résultats indique une augmentation du taux de MDA de façon significative ($p < 0.05$) pour le lot des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et le lot des rats diabétiques traités par cuivre (DTCu) par rapport aux lots témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

Par contre chez le lot des rats sains traités par le cuivre et le zinc (TSTCu+Zn) et des rats diabétiques traités par le cuivre et le zinc (DTCu+Zn) on a enregistré une diminution significative ($p < 0.05$ et $p < 0.001$) de la teneur hépatique en MDA (-2.74% et -34.40%) par rapport au lot des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et des rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) respectivement.

D'une autre coté les résultats (figure 29) montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la teneur hépatique du glutathion réduit (GSH) chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). En revanche, on a remarqué une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de GSH chez les lots supplémentés par le cuivre (TS Cu et D Cu) par rapport au rats témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

Par contre chez les lots ; rats sains traités par le cuivre et le zinc (TSTCu+Zn) et rats diabétiques traités par le cuivre et le zinc (DTCu+Zn) nous remarquons une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de teneur hépatique en GSH (+32.02% et +76.92%) par rapport au lot des rats sains traités par cuivre (TSTCu) et des rats diabétiques traité par cuivre (DTCu) respectivement.

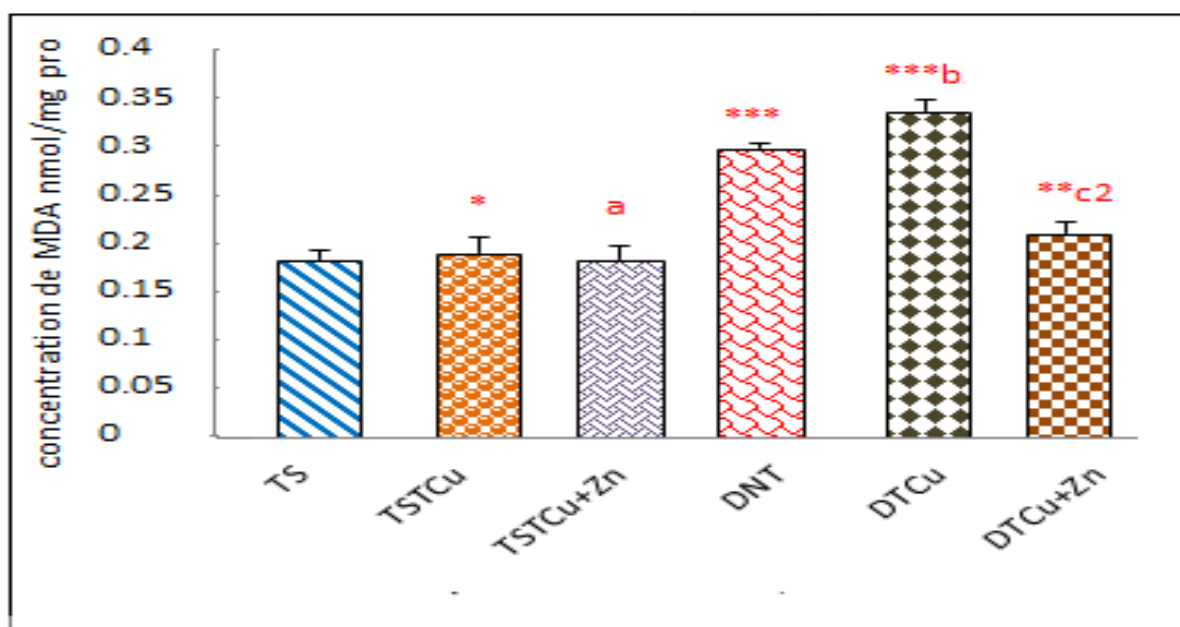


Figure 28: Variation de la teneur hépatique de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

^a $p < 0.05$ comparaison avec le lot Normal Cu

^b $p < 0.05$ comparaison avec le lot diabétique

^{c2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot diabétique Cu

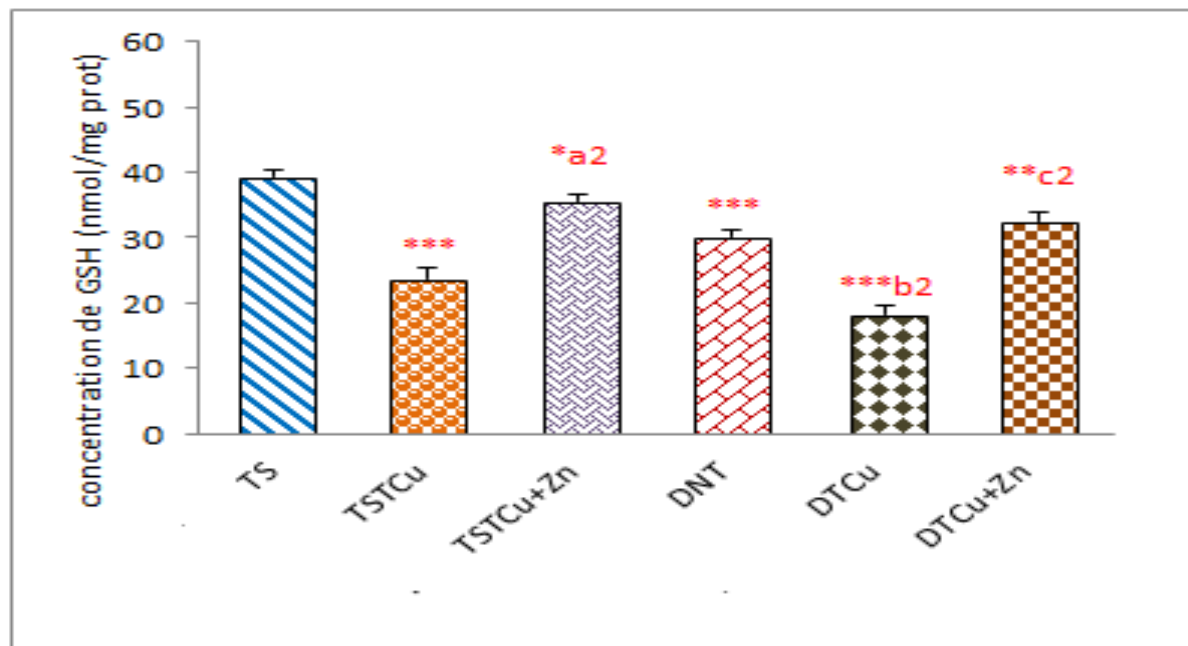


Figure 29: Variation de la teneur hépatique du glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

^{a2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot Normal Cu

^{b2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot diabétique

^{c2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot diabétique Cu

2. Effet de zinc sur des rats alimentés par un régime riche en calcium

2.1. Etude de la croissance corporelle et la consommation alimentaire

2.1.1. Croissance corporelle

D'après nos résultats, nous remarquons une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du poids corporel chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). D'autre part, les résultats indiquent une diminution significative de poids chez les lots ; des rats sains traités par calcium (TSTCa) ($p < 0.01$) et des rats diabétiques traités par calcium (DTCa) ($p < 0.05$) comparativement aux lots témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

Alors que, lorsque on ajoute le zinc chez les rats sains et diabétiques supplémentés par le calcium (TSTCa+Zn et DTCa+Zn), nous remarquons une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) du poids corporel (+18.79% et +20.85%) comparativement au groupe des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traités par calcium (DTCa) respectivement (figure 30).

2.1.2. Consommation alimentaire

Les résultats obtenus dans notre travail (figure 31) ont montré une augmentation significative ($p < 0.001$) des taux de consommation journalière de nourriture chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). Nous remarquons aussi une diminution hautement significative ($p < 0.01$) des taux de consommation journalière de nourriture chez les lots des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traités par calcium (DTCa) comparativement aux lots témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT).

Chez les lots, rats sains traités par le calcium et le zinc (TSTCa+Zn) et rats diabétiques traités par le calcium et le zinc (DTCa+Zn) on enregistre une amélioration significative ($p < 0.01$; $p < 0.001$) de taux de consommation alimentaire (+11.68.% et +8.09%) comparativement au groupe sains traités par calcium (TSTCa) et diabétiques traités par calcium (DTCa) respectivement.

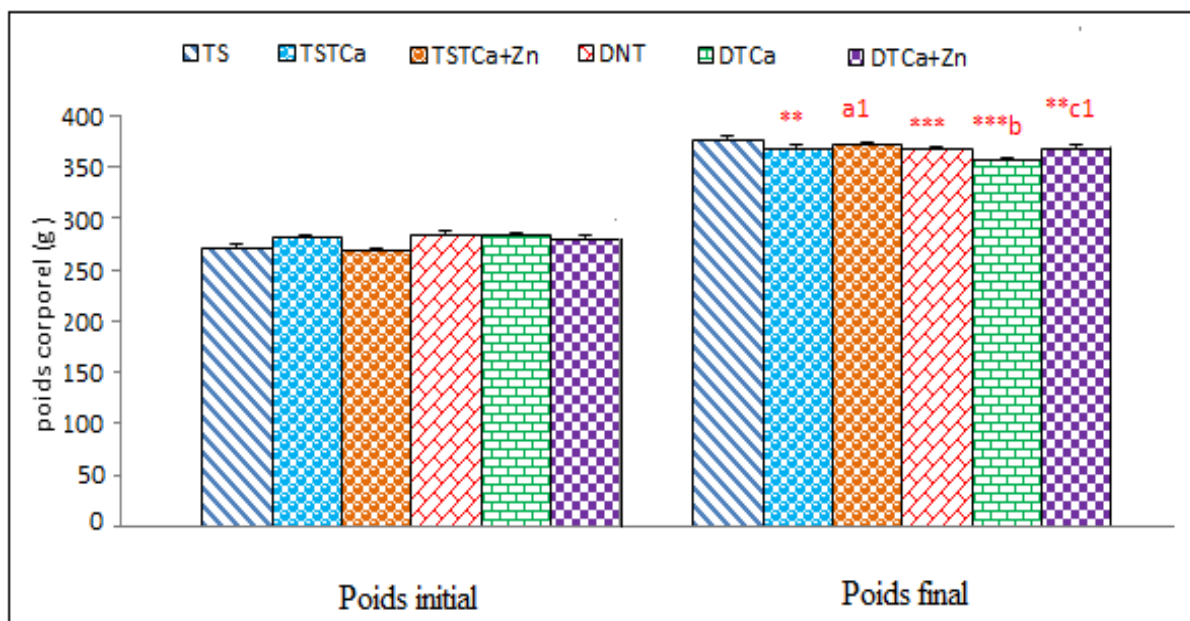


Figure 30: Variation du poids corporel chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

** p < 0.01 ; *** p < 0.001 comparaison avec le lot TS

a1 p < 0.01 comparaison avec le lot TSTCa

b p < 0.05 comparaison avec le lot DNT

c1 p < 0.01 comparaison avec le lot DTCa

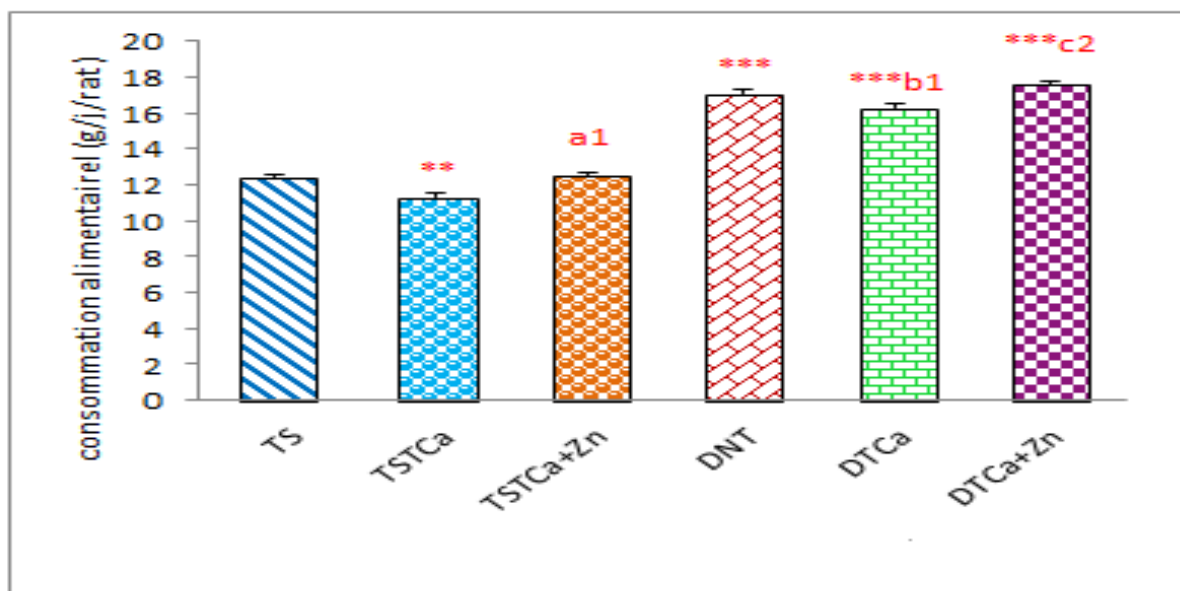


Figure 31: Variation de la consommation alimentaire chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

** p < 0.01 ; *** p < 0.001 comparaison avec le lot TS

a1 p < 0.01 comparaison avec le lot TSTCa

b1 p < 0.01 comparaison avec le lot DNT

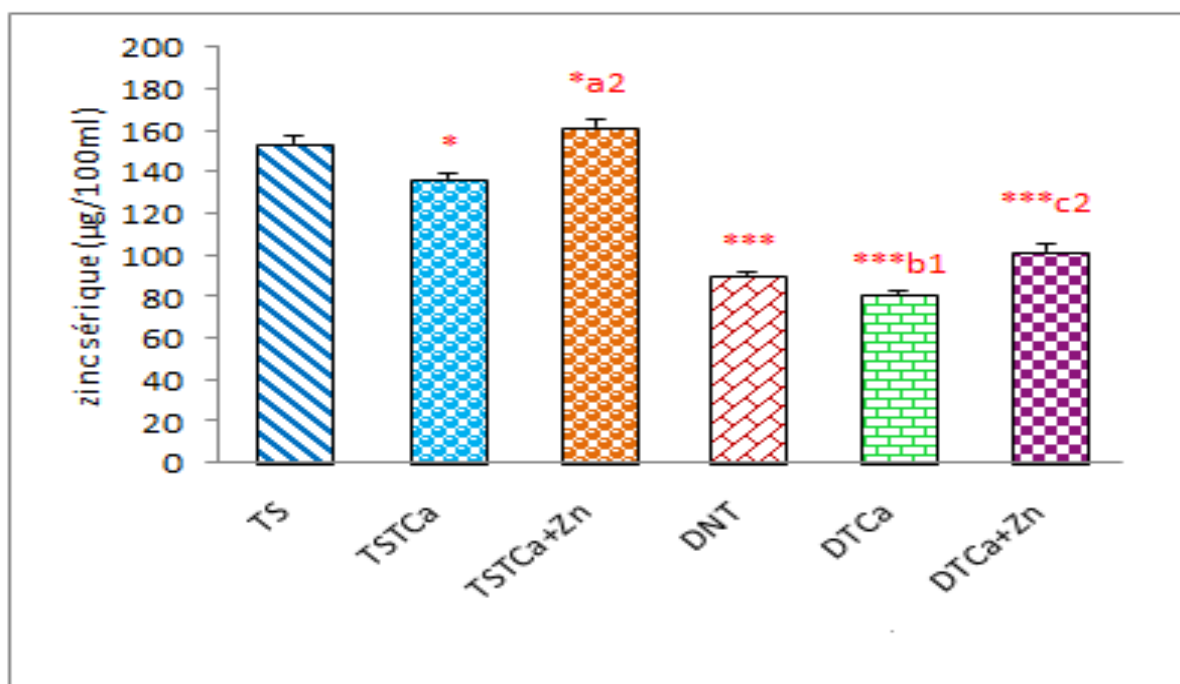
c2 p < 0.001 comparaison avec le lot DTCa

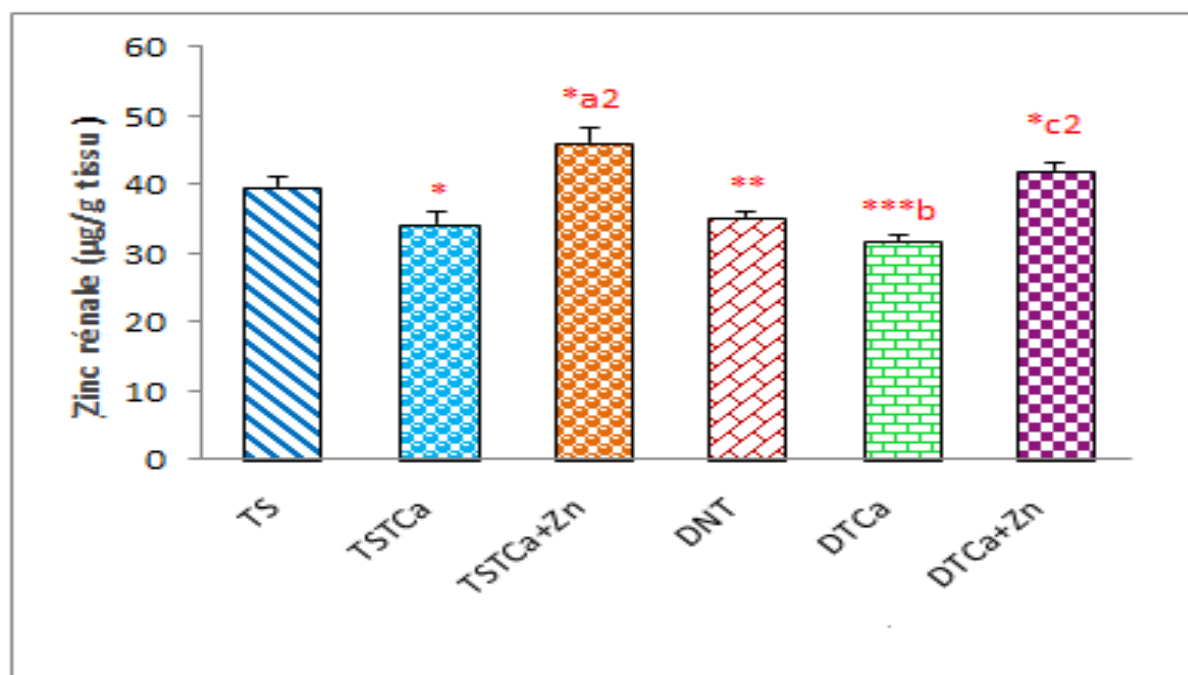
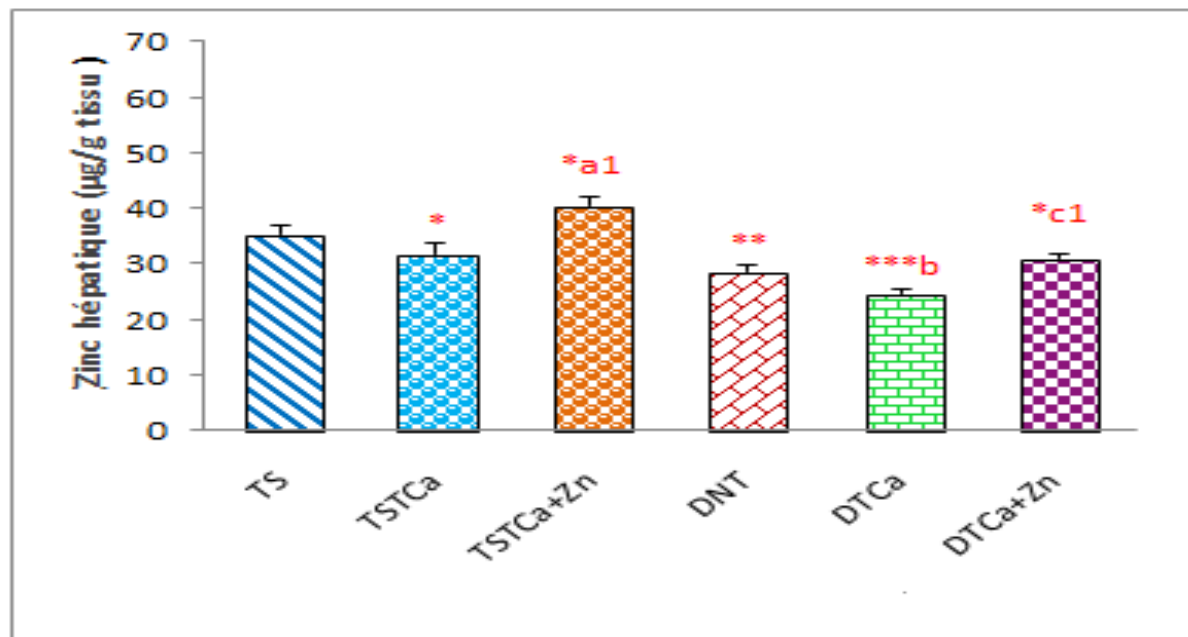
2.2. Etude de statut du zinc dans l'organisme

2.2.1. Concentration du zinc sérique et tissulaire

La figure 32 présente une diminution significative de la concentration du zinc dans le sérum et testicule ($p < 0.001$), dans le foie et le rein ($p < 0.01$) et dans le pancréas ($p < 0.05$) chez les rats diabétiques non traité (DNT) par rapport au rats témoin sain (TS). Un ajout de calcium chez les rats sains (TSTCa) et diabétique (DTCa) diminue la concentration de zinc sérique ($p < 0.05$; $p < 0.01$), hépatique ($p < 0.05$), rénale ($p < 0.05$), pancréatique ($p < 0.05$; $p < 0.01$) et testiculaire ($p < 0.05$; $p < 0.001$) en comparaison avec les groupes témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

Par contre chez les lots, rats sains traités par le calcium et le zinc (TSTCa+Zn) et rats diabétiques traités par le calcium et le zinc (DTCa+Zn) nous avons remarqué une amélioration significative de la concentration de zinc dans le sérum ($p < 0.001$) (+17.67% et +26.15%), foie ($p < 0.01$) (+27.26% et +25.75%), reins ($p < 0.001$) (+34.49% et +31.25%), pancréas ($p < 0.01$) (+14.39% et 15.26%) et testicules ($p < 0.01$; $p < 0.001$) (+15.55% et 44.24%) par rapport aux lots des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traité par calcium (DTCa) respectivement.





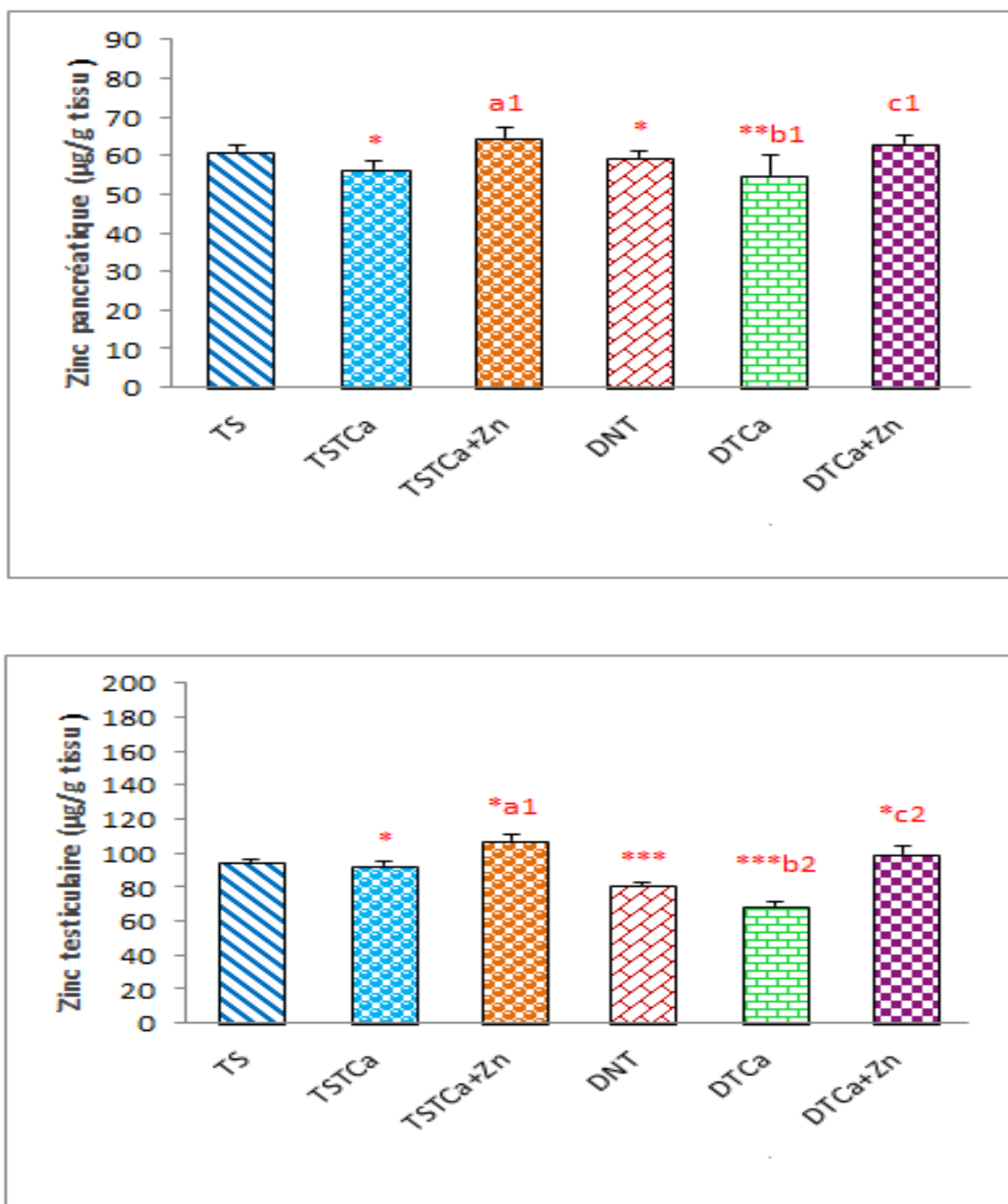


Figure 32: Variation de la concentration de zinc dans le sérum, le foie, les reins, le pancréas et les testicules chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

^{a1} $p < 0.01$; ^{a2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot TSTCa

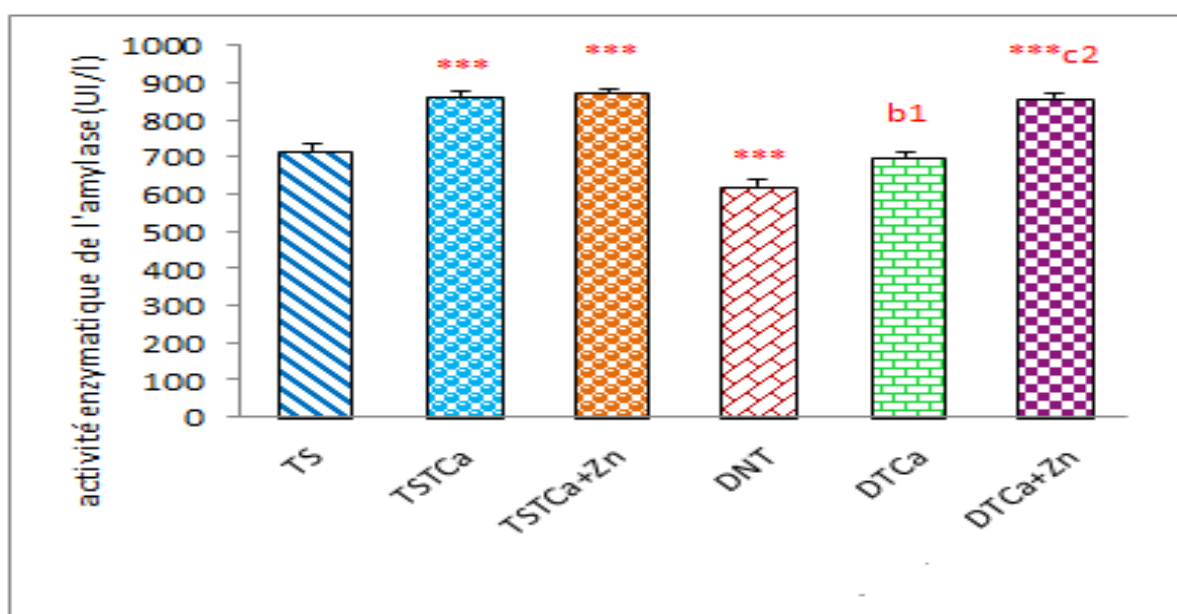
^b $p < 0.05$; ^{b1} $p < 0.01$ comparaison avec le lot DNT

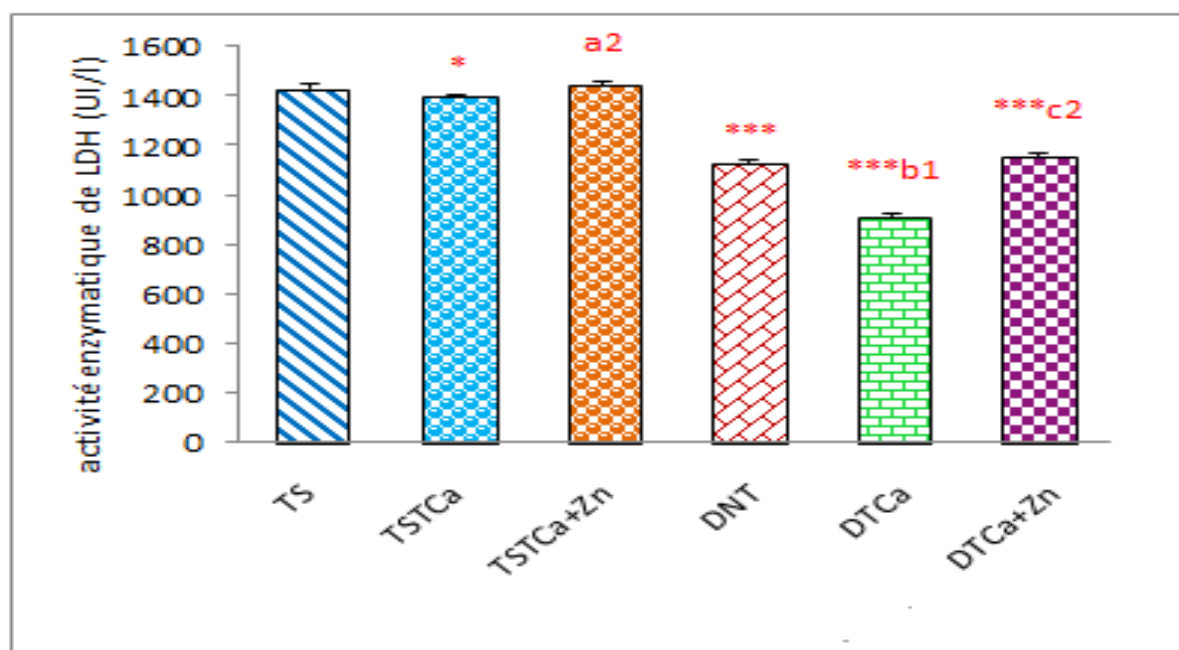
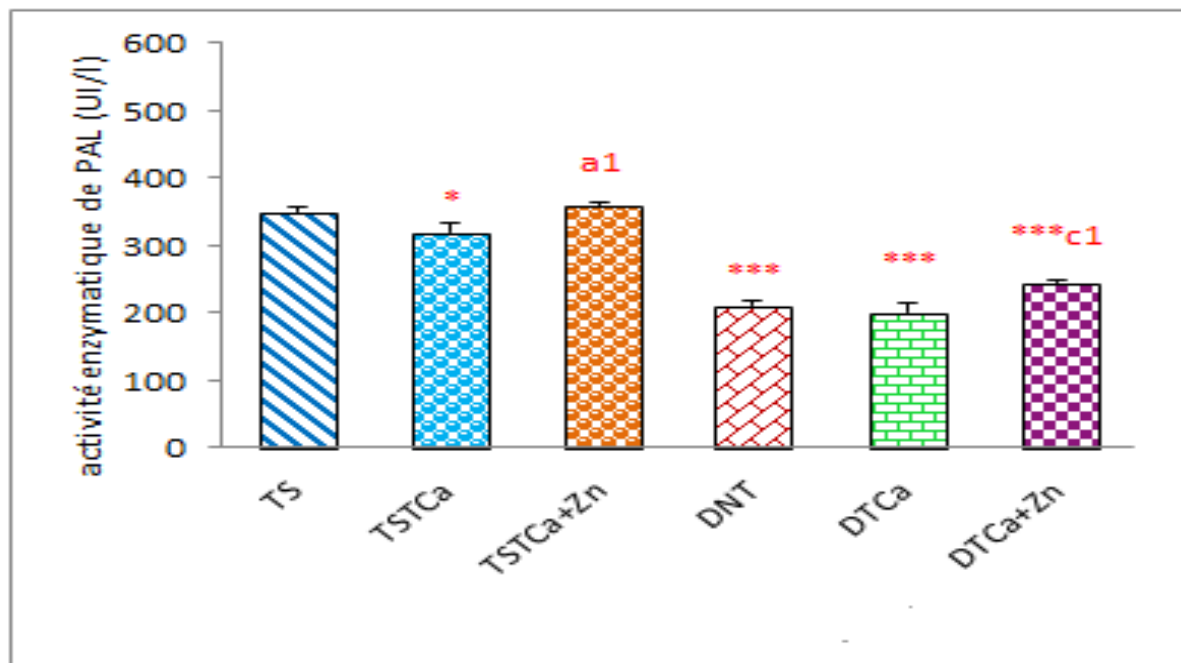
^{c1} $p < 0.01$ ^{c2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCa

2.2.2. Activité de certains enzymes à zinc

Les résultats de l'effet d'un supplément de calcium et de zinc sur l'activité des enzymes à zinc sont mentionnés dans la figure 33. En effet nos résultats montrent une diminution significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique de l'amylase, PAL, LDH et l'aldolase dans le sérum des rats diabétiques non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). De plus chez le lot des rats sains traités par calcium (TSTCa) on a constaté une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité de l'amylase et une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité sérique de PAL et LDH et pas de variation significative pour l'activité de l'aldolase en comparaison avec le lot témoin sains (TS). Alors que chez le lot des rats diabétiques traités par le Ca (DTCa) on a remarqué une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) de l'activité de l'amylase, une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de l'activité de LDH et aldolase et pas de variation significative pour l'activité de PAL par rapport au lot diabétique non traité (DNT).

Par contre chez le lot des rats sains traités par le calcium et le zinc (TSTCa+Zn) et le lot des rats diabétiques traités par le calcium et le zinc (DTCa+Zn) on a enregistré une amélioration de l'activité enzymatique de l'amylase ($p \geq 0.05$; $p < 0.001$) (+1.29% et +22.19%), la phosphatase alcaline ($p < 0.01$) (+12.57% et +21.72%), lactate déshydrogénase ($p < 0.001$) (+3.42% et +26.83%) et l'aldolase ($p < 0.01$; $p < 0.001$) (+3.24% et +24.13%) lorsque en comparaison avec les lots des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traité par calcium (DTCa) respectivement.





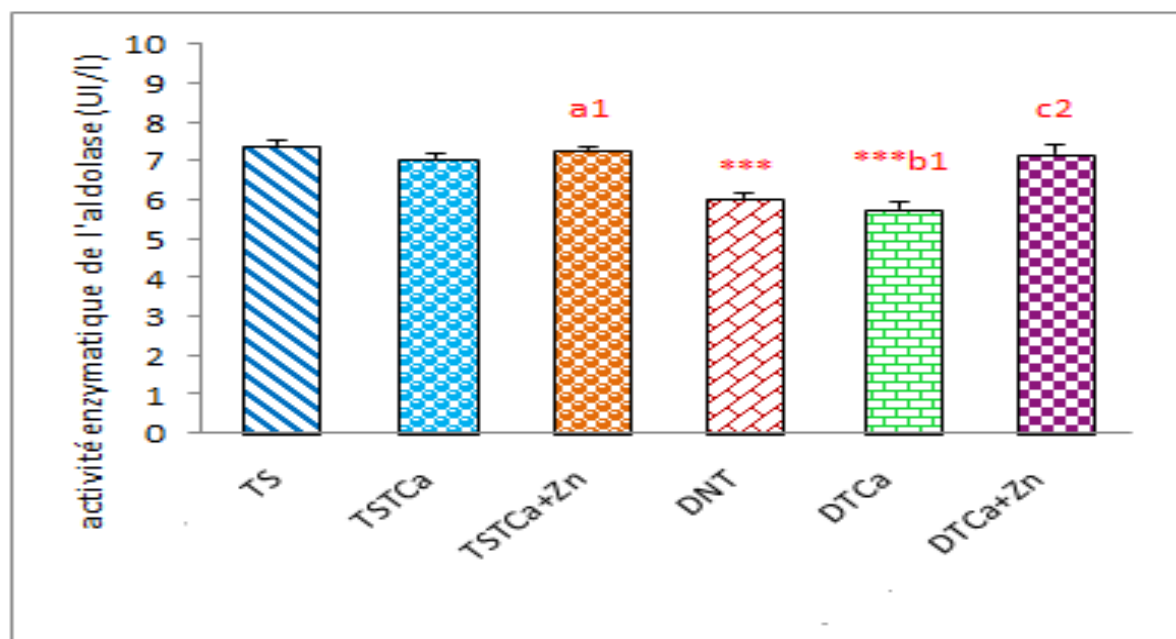


Figure 33: Variation de l'activité enzymatique de l'amylase, de la phosphatase alcaline (PAL), de lactate déshydrogénase (LDH) et de l'aldolase chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS
^{a1} $p < 0.01$; ^{a2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot TSTCa
^b $p < 0.05$; ^{b1} $p < 0.01$; ^{b2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DNT
^{c1} $p < 0.01$; ^{c2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCa

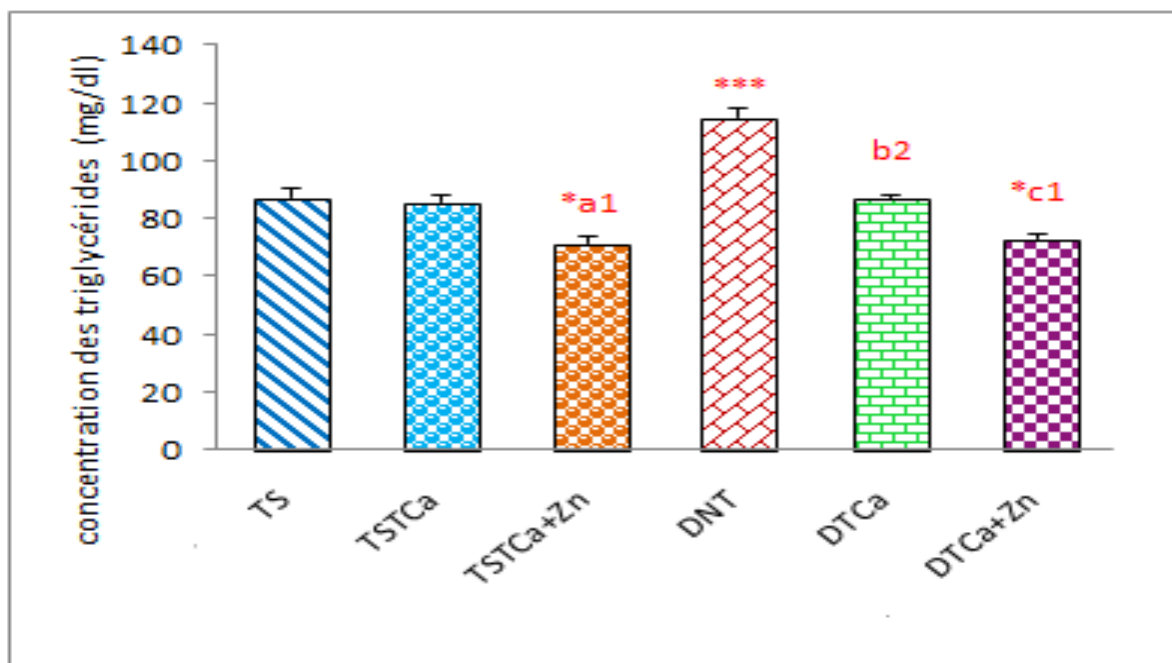
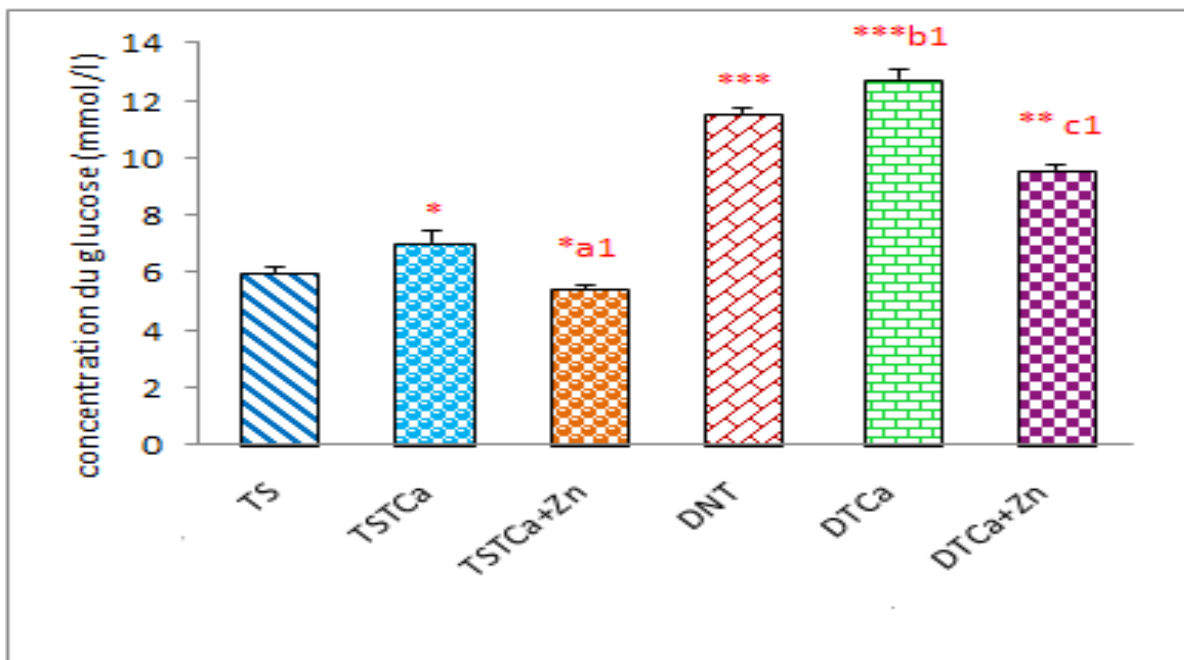
2.3. Etude des paramètres biochimiques

2.3.1. glucose, triglycérides et cholestérol

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration sérique du glucose, triglycérides et du cholestérol chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). En revanche, on a remarqué une augmentation significative de la concentration sérique du glucose et cholestérol ($p < 0.05$) chez le lot des rats sains traités par calcium (TSTCa) par rapport au lot témoin sain (TS). Mais pour le lot des rats diabétiques traité par calcium (DTCa) on a signalé une augmentation significative de la concentration du glucose et cholestérol ($p < 0.01$) et une diminution significative de la concentration des triglycérides ($p < 0.001$) par rapport au lot diabétique non traité (DNT).

Par contre chez les lots supplémentés de calcium et traités par le zinc pour les rats sains (TSTCa+Zn) et diabétiques (DTCa+Zn), nous remarquons une diminution significative de la concentration du glucose ($p < 0.01$) (-22.83% et -24.74%), des triglycérides ($p < 0.01$) (-16.52%

et -16.09%) et du cholestérol ($p < 0.05$; $p < 0.001$) (-3.77% et -10.05%) en comparaison avec le lot des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traité par calcium (DTCa) respectivement (figure 34).



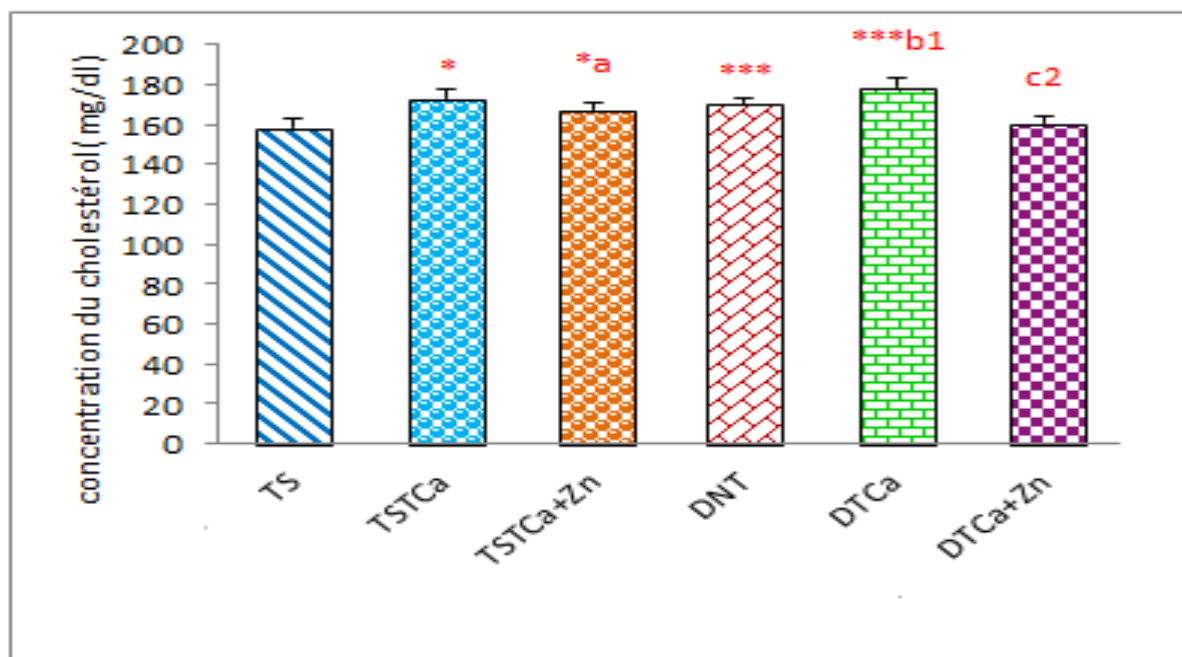


Figure 34: Variation de la concentration sérique de glucose, des triglycérides et du cholestérol chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

^a $p < 0.05$; ^{a1} $p < 0.01$ comparaison avec le lot TSTCa

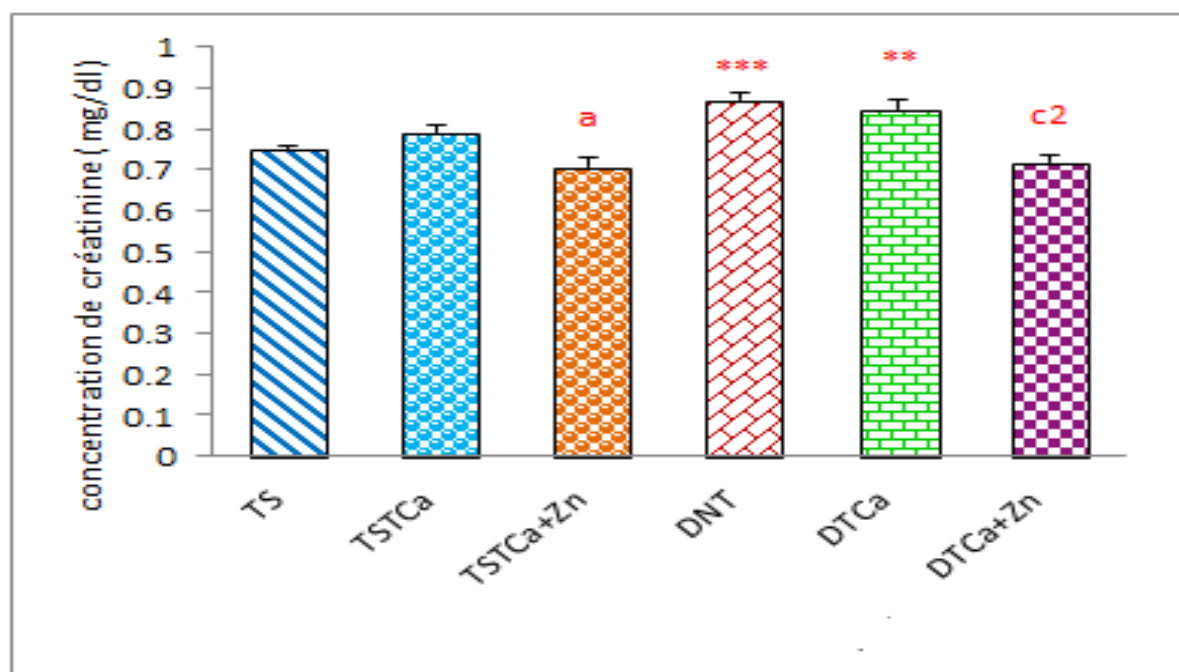
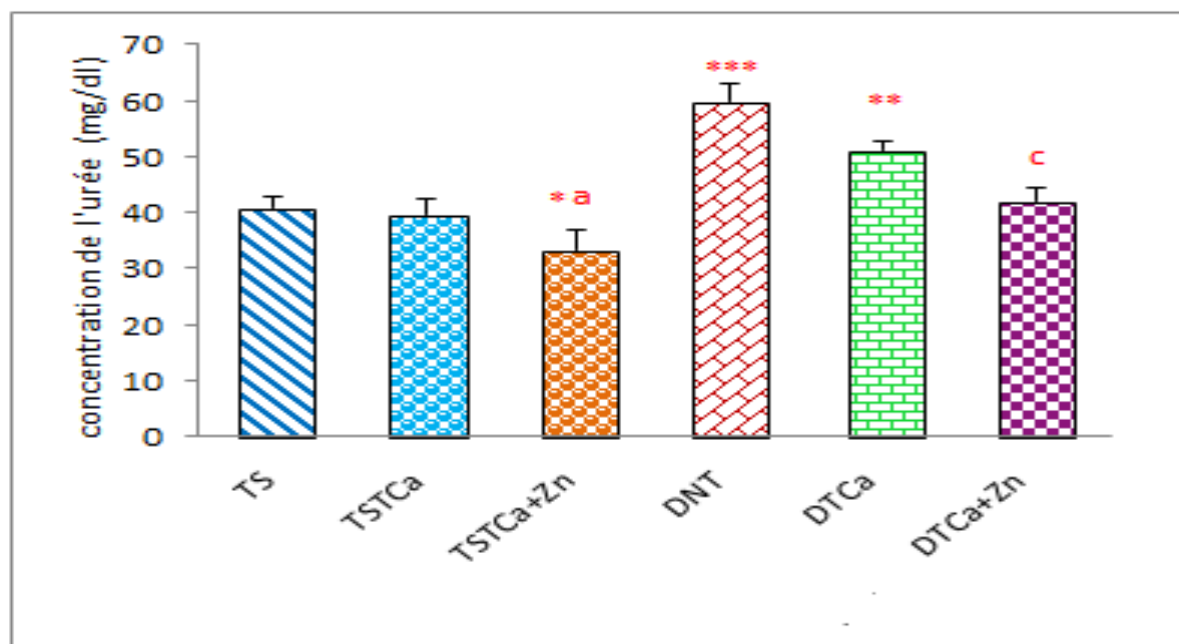
^{b1} $p < 0.01$; ^{b2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DNT

^{c1} $p < 0.01$; ^{c2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCa

2.3.2. Urée, créatinine, acide urique et protéines totales

La figure 35 illustre une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration sérique de l'urée, créatinine et l'acide urique et une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration des protéines totales chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). Par ailleurs, nos résultats indiquent que le l'ajout de calcium chez les rats sains (TSTCa) et diabétique (DTCa) induit une augmentation significative ($p < 0.05$ et $p < 0.01$) de la concentration sérique de l'acide urique en comparaison avec le lot témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement.

En revanche l'administration du zinc chez les rats sains et diabétiques alimentés par un régime supplémenté de calcium (lot TSTCa+Zn et lot DTCa+Zn) a provoqué une diminution remarquable de la concentration sérique d'urée ($p < 0.05$) (-15.83% et -17.64%), de la créatinine ($p < 0.05$ et $p < 0.001$) (-10.12% et -15.29%) et de l'acide urique ($p < 0.05$ et $p < 0.01$) (-4.56% et -5.96%) et une légère augmentation de la concentration des protéines totales ($p \geq 0.05$ et $p < 0.05$) (+1.79% et +11.03%) par rapport au lot des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traité par calcium (DTCa) respectivement.



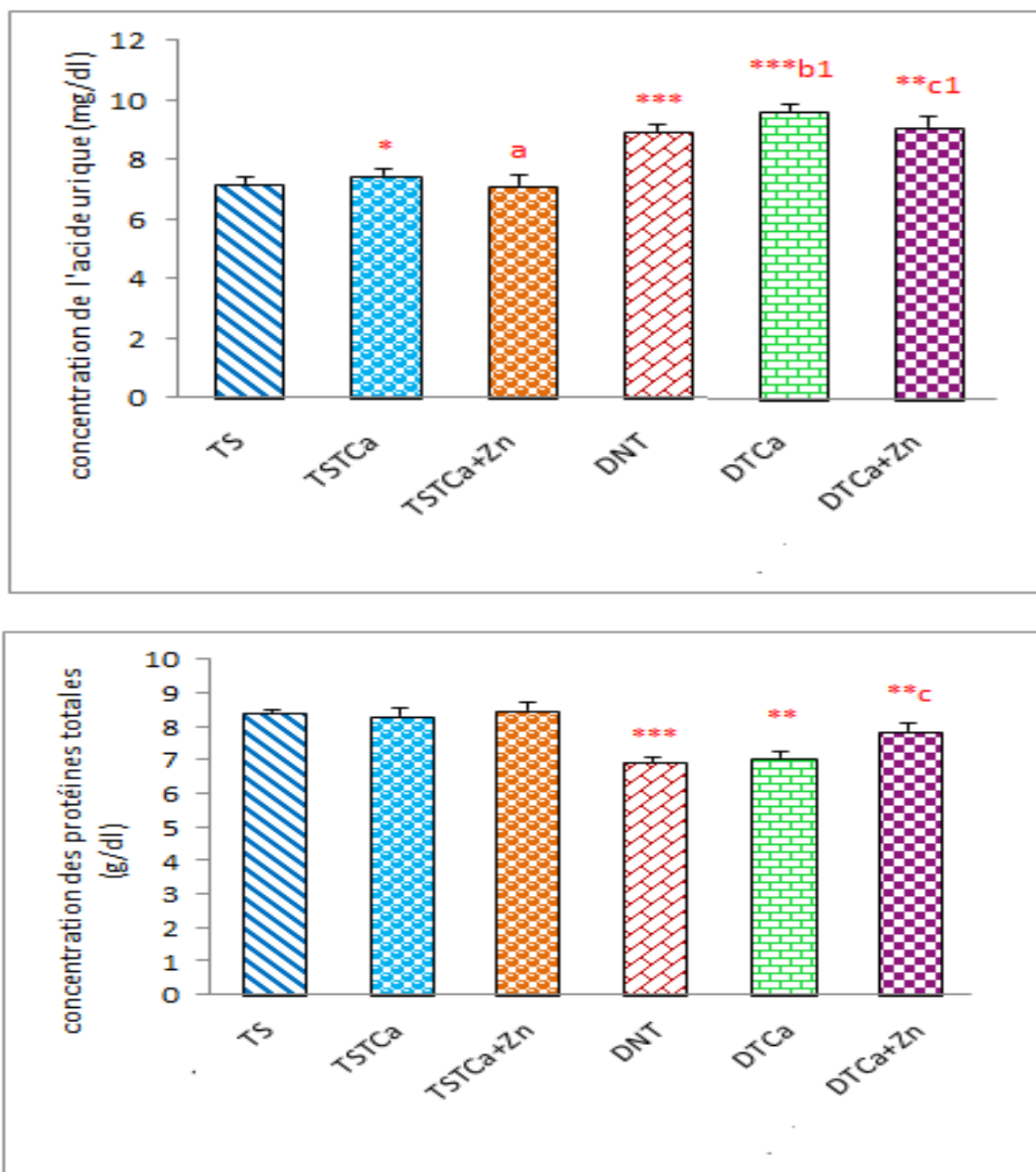


Figure 35: Variation de la concentration sérique de l'urée, la créatinine, l'acide urique et les protéines totales chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

^a $p < 0.05$ comparaison avec le lot TSTCa

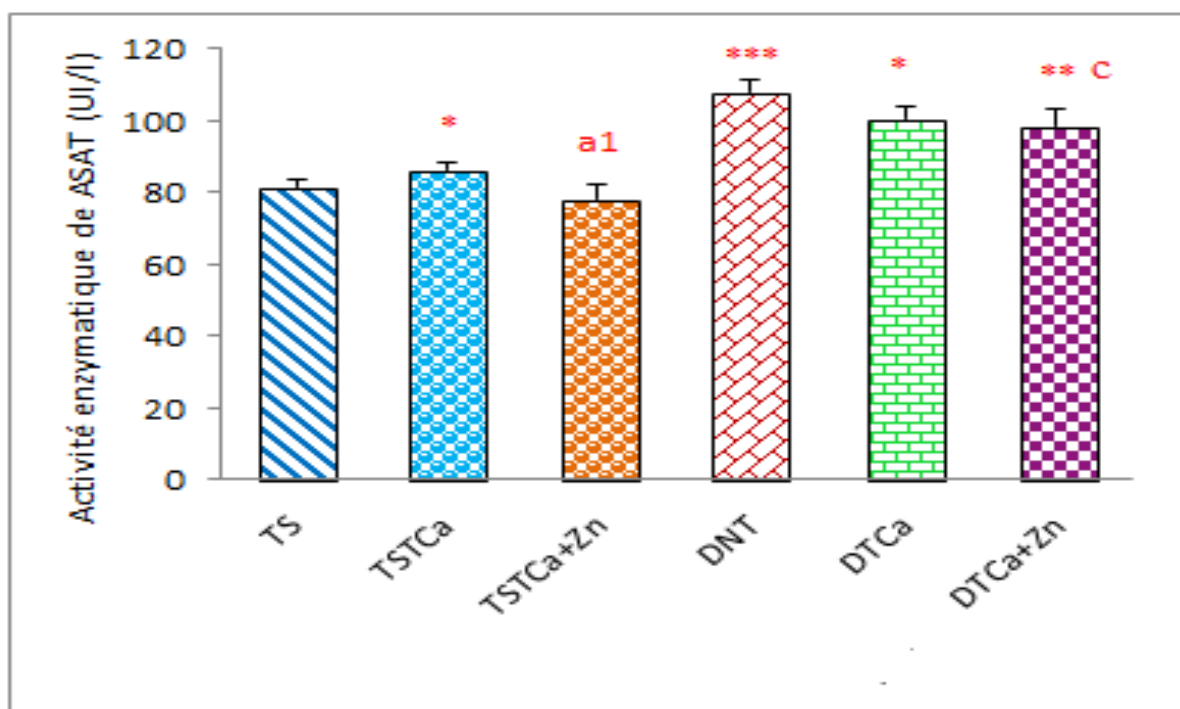
^{b1} $p < 0.01$ comparaison avec le lot DNT

^c $p < 0.05$; ^{c1} $p < 0.01$ ^{c2} $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCa

2.3.3. Activité des transaminases (ASAT, ALAT)

Les résultats obtenus présentés dans la figure 36 révèlent une augmentation de l'activité des transaminases (ASAT, ALAT) avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$) chez les rats diabétiques non traités (DNT) par rapport aux rats témoins sains (TS). Une augmentation de l'activité enzymatique de ASAT avec une différence significative ($p < 0.05$), a été enregistrée chez le lot des rats sains traités par calcium (TSTCa) par rapport au lot des rats témoins sains (TS).

D'autre part, l'ajout du zinc chez les groupes ; sains traités par calcium (TSTCa+Zn) et diabétique traité par calcium (DTCa+Zn) a provoqué une diminution significative de l'activité enzymatique de ASAT ($p < 0.01$ et $p > 0.05$) et ALAT ($p < 0.05$) par rapport au lot des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traités par calcium (DTCa) respectivement.



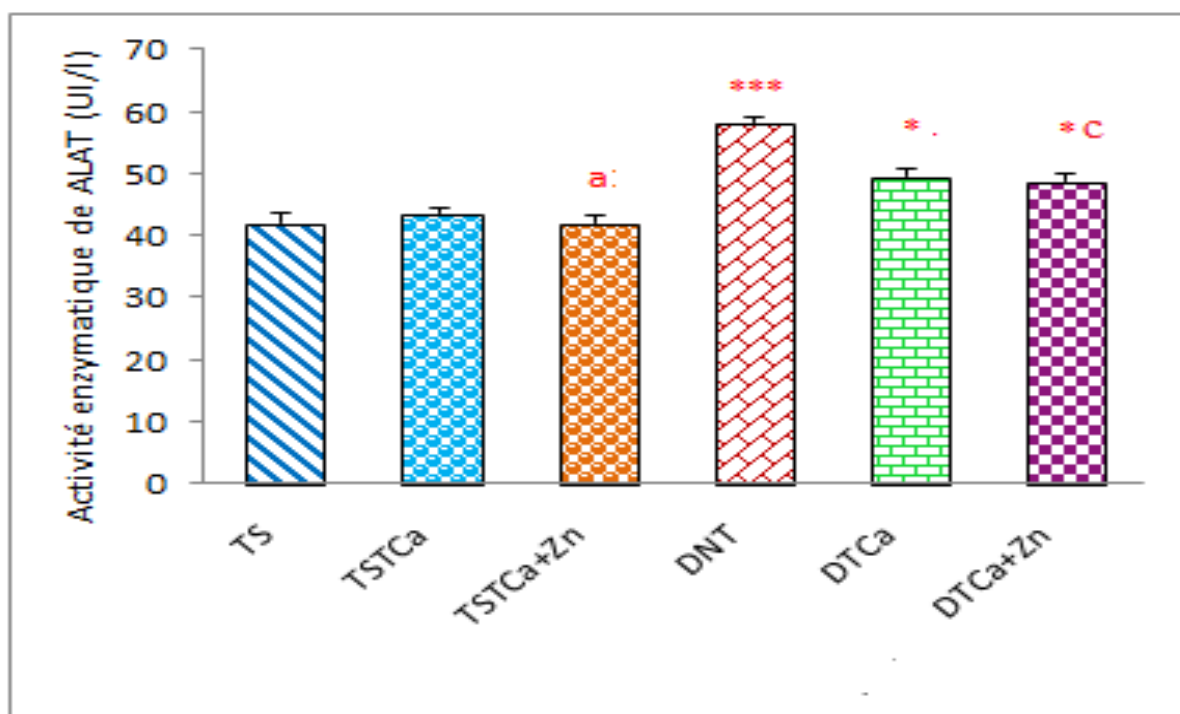


Figure 36: variation de l'activité enzymatique sérique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

^a $p < 0.05$; ^{a1} $p < 0.01$ comparaison avec le lot TSTCa

^c $p < 0.05$ comparaison avec le lot DTCa

2.3.4. Malondialdehyde (MDA) et Glutathion réduit (GSH) hépatique

D'après les résultats obtenus (figure 37), on observe une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du taux hépatique de MDA chez le groupe diabétique non traité (DNT) comparé au groupe témoin sain (TS). De même l'interprétation des résultats indique qu'il n'y a aucune variation significative du taux de MDA chez les lots des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traités par calcium (DTCa) par rapport au lot témoin sain (TS) et diabétique non traité (DNT) respectivement. De même on a enregistré une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la teneur hépatique en MDA (- 47.92%) chez le lot des rats diabétiques traités par le calcium et le zinc (DTCa+Zn) par rapport au lot diabétique traité par calcium (DTCa).

De plus les résultats (figure 38) montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la teneur hépatique du glutathion réduit (GSH) chez le lot diabétique non traité (DNT) par rapport au témoin sain (TS). En revanche, on a remarqué qu'il n'y a aucune variation significative de la concentration de GSH chez les lots supplémentés par le calcium pour les rats

sains (TSTCa) et diabétiques (DTCa) par rapport au lot témoin sain (TS) et lot diabétique non traité (DNT) respectivement.

Par contre chez les lots ; rats sains traités par le calcium et le zinc (TSTCa+Zn) et rats diabétiques traités par le calcium et le zinc (DTCa+Zn) nous remarquons une augmentation significative ($p < 0.001$; $p < 0.05$) de teneur hépatique en GSH (+50.11% et +7.87%) par rapport au lot des rats sains traités par calcium (TSTCa) et des rats diabétiques traités par calcium (DTCa) respectivement.

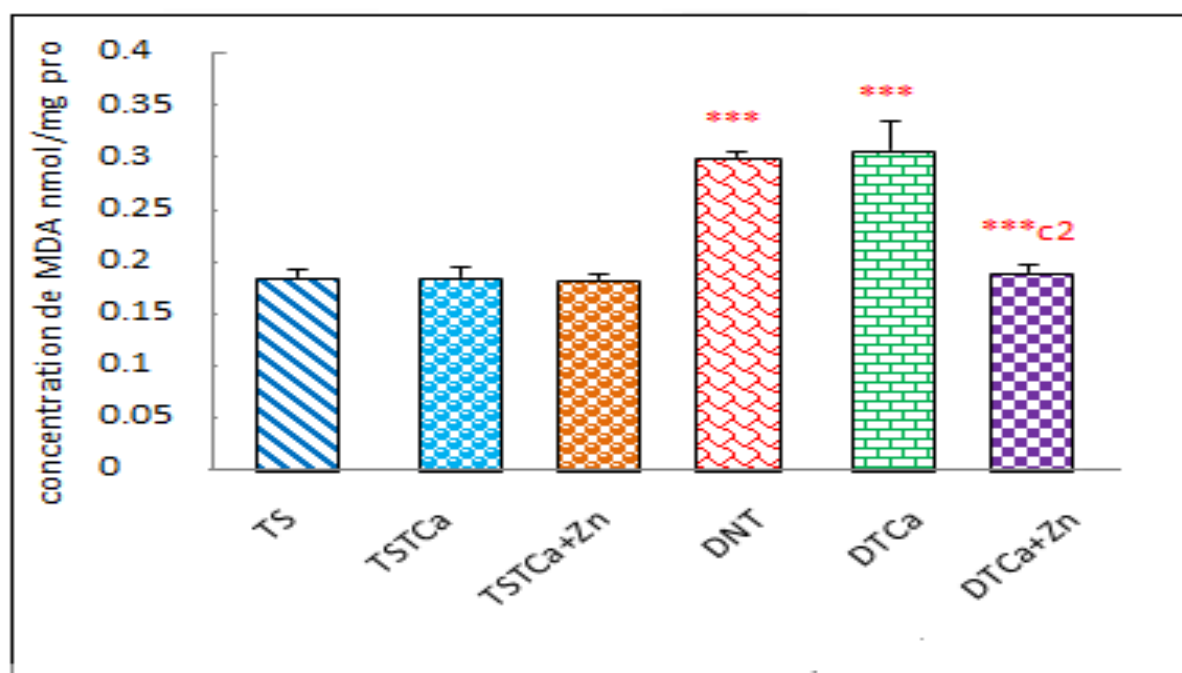


Figure 37: Variation de la teneur hépatique de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

*** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

c2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DTCa

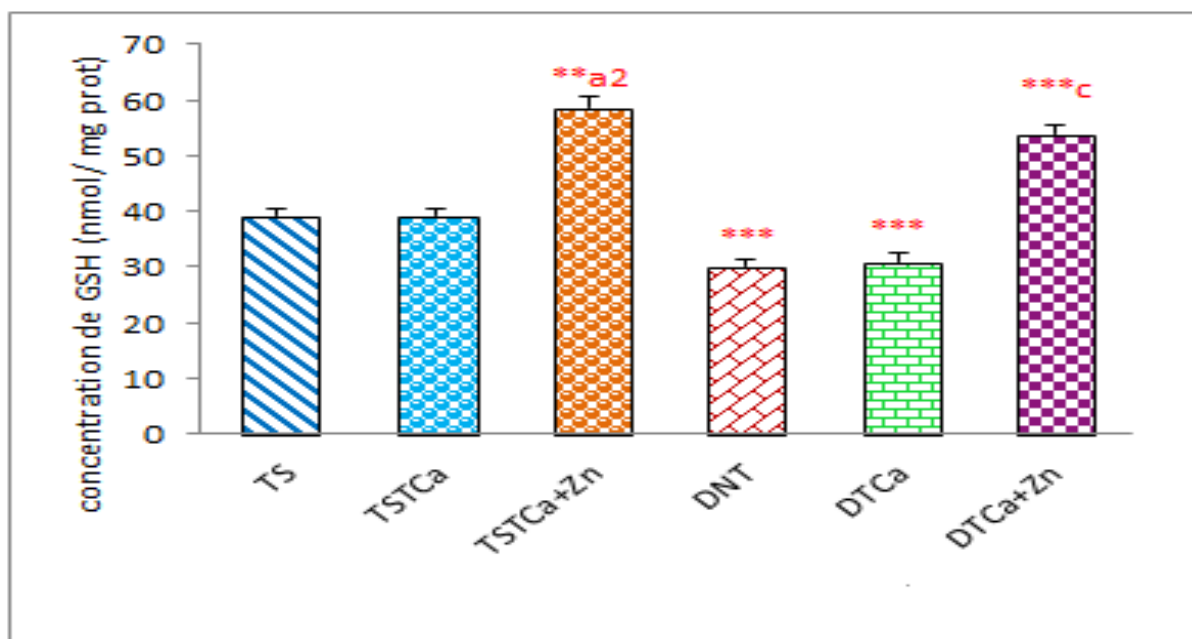


Figure 38 : Variation de la teneur hépatique du glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux après 21 jours de traitement.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot TS

a2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot TSTCa

b2 $p < 0.001$ comparaison avec le lot DNT

c $p < 0.05$ comparaison avec le lot DTCa

CHAPITRE III

Discussion

Discussion

Le diabète sucré est un syndrome métabolique chronique résultant d'une Variété d'interactions entre des facteurs héréditaires et environnementaux (Boynes et al., 1991). L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à des dommages à long terme, un dysfonctionnement en différents organes, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (Alberto et al., 2015). La relation entre le diabète et divers minéraux se caractérise par un haut degré de réciprocité. L'hyperglycémie chronique incontrôlée peut provoquer des modifications importantes dans l'état de ces éléments nutritifs, et inversement (Arshag et al., 1994). Le zinc est connu pour être un oligo-élément essentiel, qui est nécessaire pour la santé et la croissance et est également essentiel pour la fonction et l'activité de plus de 200 métalloenzymes (Debjit et al., 2010). Ces enzymes sont impliqués dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Afkhami et al., 2008).

Dans nos conditions expérimentales, nous avons remarqué un déficit pondéral et une augmentation de la consommation alimentaire chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire standard par rapport aux témoins sains. Nos résultats sont en accord avec ceux apportés par (Pari et Latha, 2005) qui ont constaté que, chez des rats mâles de la souche Wistar albinos, l'injection de la streptozotocine (STZ) provoquait en trois semaines une diminution significative de poids corporel. On peut expliquer la perte du poids corporel chez les rats diabétiques probablement par l'augmentation du catabolisme des lipides et des protéines due par le manque des carbohydrates utilisées comme source d'énergie. Par ailleurs on peut expliquer la perte de poids par la manque d'insuline qui conduit à la dégradation des protéines structurales qui sont connues par leur contribution au poids corporel (Rajkumar et Govindarajulu, 1991 ; Vats et al., 2004). L'augmentation de la consommation alimentaire est expliquée par l'hyperphagie due au diabète expérimentale, cet hyperphagie est une réaction compensatoire à un manque de graisse combustibles associe à une perturbation métabolique au cours de diabète sucré (Barry et Deborah, 2006).

Les résultats de notre expérimentation suggèrent que le traitement alimentaire par le cuivre ou le calcium provoque une diminution de la quantité d'aliment consommé et de poids corporel chez les rats sains ou diabétiques. Ceci est confirmé par les travaux de Chen et al., (1996) et Kathryn et al., (2004) . Chen et al., (1996) ont constaté que chez des poulets un supplément de 500 mg Cu/ kg d'aliment diminue significativement du poids corporel. Kathryn et al., (2004) ont

montré aussi une diminution du poids corporel par supplément de 25µg/jours de cuivre chez des rats ont une alimentation standard de 13µg Cu/g d'aliment.

On peut expliquer ces résultats par le bas niveau de zinc tissulaire et sérique sous l'effet de l'alimentation riche en cuivre ou calcium entraînant une diminution de l'appétit et de la synthèse protéique (Kechrid et al., 2007) et donc conduit aux diminutions de la consommation alimentaire et du poids chez les rats étudiés. Ceci est en accord avec Kechrid et al. (2012), qui ont remarqué que la carence du zinc dans l'alimentation des rats est accompagnée par une réduction de poids corporel en comparaison avec le groupe de régime normal.

En outre, le mécanisme par lequel le cuivre a exercé son effet sur le poids corporel semble être par une altération au niveau du duodénum ce qui est influencé sur l'absorption des nutriments (Rahman et al., 2001).

Par ailleurs, on peut expliquer l'effet de calcium sur la perte de poids comme suite: les adipocytes possèdent un récepteur membranaire à la vitamine D (1,25(OH)₂D), qui, lié à cette vitamine, favorise l'entrée intracellulaire de Ca²⁺, suivie de l'augmentation de l'expression de la Fatty Acid Synthetas (FAS) induisant une lipogenèse de novo. L'inhibition de l'expression de l'UnCoupling Protein 2 (UCP2), protéine de phosphorylation et d'oxydation des acides gras, paraît dépendre à la fois du taux de Ca²⁺ intracellulaire et de la liaison de la vitamine D circulante à un second récepteur nucléaire (Bhat et al., 2014). Un supplément de calcium peut diminuer le taux de vitamine D circulante ainsi deux conséquences : l'une sur la liaison de la vitamine D sur son récepteur membranaire avec diminution de l'entrée de Ca²⁺ dans l'adipocyte (freinant la lipogenèse) et l'autre sur la liaison de la vitamine D sur son récepteur nucléaire (augmentant la lipolyse) ce qui permet de diminuer la masse grasse et conduit à la perte du poids corporel (Ian et al., 2005).

D'autre part le traitement des rats sains ou diabétiques riche en Cuivre ou Calcium par le Zinc a entraîné une restauration du poids corporel et la consommation alimentaire. Levin et al. (1992) ont également justifié l'anorexie par le rôle central du zinc dans l'activation des nombreux systèmes enzymatiques qui synthétisent et dégradent certains peptides biologiquement actifs, également appelés les neuropeptides qui sont impliqués dans le règlement de l'ingestion de nourriture tels que (Choecystokinine (CCK), leptine, sérotonine). Ces peptides sont synthétisés par l'hypothalamus (Williams et al., 2004). Il a été signalé que l'hypophyse est responsable de moduler l'ingestion de nourriture ; elle reçoit des signaux de l'hypothalamus puis elle transmet ces signaux

à d'autres tissus ou organes périphériques cibles (Song et al., 2000 ; Bjursell et al., 2005). De plus, le zinc peut augmenter le niveau de facteur de croissance (IGF) et contribue aussi à l'élévation de la concentration sérique de testostérone, ces deux facteurs sont considérés comme des agents anaboliques ce qui contribue à l'amélioration du poids corporel (Velloso, 2008) .

Les résultats de notre expérimentation suggèrent aussi que le diabète a provoqué une diminution importante de la concentration de zinc dans le sérum et les différents organes : le foie, le rein, le pancréas et le testicule. La présence de l'hyperzincurie et la baisse d'absorption intestinale du zinc au cours de diabète ont approuvé la spéculation que les diabétiques sont plus susceptibles à la carence du zinc (Shahidul et Loots, 2007 ; Vidović et al., 2013).

L'analyse des résultats a montré que l'administration journalière de 30 mg Cu/kg d'aliment ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ou de 35g Ca/kg d'aliment (CaCO_3) pendant trois semaines a induit une baisse significative de la concentration sérique et tissulaire en zinc chez les groupes des rats sains et diabétiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Samanta et al. (2011). Ces derniers ont montré une supplémentation journalière de 75 ppm en cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) pendant 21 jours provoque une diminution de la concentration de zinc plasmatique chez les poulets. Ces résultats sont en accord aussi avec ceux obtenus par Chao-Xia et al. (2006) et Mace et Shannonm (2000). Ces derniers ont montré une supplémentation journalière de calcium provoque une diminution de la concentration de zinc plasmatique et tissulaire chez les poissons. De plus, l'étude de Raschke et Jahreis (2002) sur des hommes sains montre qu'un supplément de phosphate de calcium (1800mg / j) pendant deux semaines provoque une diminution de la concentration de zinc plasmatique.

Le cuivre a pu réduire le taux sérique et tissulaire de zinc par compétition sur les sites de fixation au niveau de l'intestin (Dimitrova et al., 2010). Il est bien connu que le cuivre empêche l'absorption de zinc et donc affecte leur biodisponibilité dans l'organisme ce qui confirme par les bas niveaux en zinc sériques. De plus, l'excès de cuivre peut conduire à la dysrégulation de l'homéostasie du Zn moléculaire (Yang et al., 2000) et donc peut provoquer son abaissement dans les tissus. Par ailleurs le cuivre se lie aux MT, présent dans les entérocytes et une fois transféré dans le milieu intérieur, il est transporté vers le foie, majoritairement par les albumines. Une présence en cuivre excessive, par rapport à celle du zinc, provoque ainsi une carence en zinc, car les MT et les albumines sont aussi nécessaires pour la régulation du métabolisme du zinc. (Revy et al., 2003).

Le calcium et le zinc ont le même site d'absorption au niveau intestinale donc un supplément de calcium à forte dose entre en compétition avec le zinc ce qui réduit son absorption (Spencer et

al., 1987). De plus le calcium a tendance de former des complexes avec le phytate et de zinc qui sont insolubles et ont par conséquent un effet inhibiteur sur l'absorption du zinc (Nazanin et al., 2013). D'autre par l'étude de Espinoza et al. (2012) montre que le DMT1 (Divalent Metal Transporter) est un transporteur de plusieurs ion divalent dans l'entérocyte impliqué dans le transport actif des ions de zinc dans l'intestin ce qui contribue dans leur absorption, un supplément de calcium inhibe l'expression de DMT1 et diminue leur synthèse (Shawki et Mackenzie, 2010) ce qui est probablement fait partie de mécanisme moléculaire de l'inhibition de l'absorption de zinc par excès de calcium.

Dans cette étude, le traitement par le zinc augmente significativement la concentration du zinc dans le sérum et les différents organes étudiés chez les rats sains et diabétiques traités par le cuivre et de calcium. Cet effet de zinc est expliqué par la sensibilité de ces tissus à la quantité du zinc dans l'alimentation (Williams et Mills, 1970) ce qui nous permet de remarquer l'efficacité de traitement par le zinc pour la correction de perturbation du taux de zinc dans l'organisme induit par des minéraux antagonistes comme le cuivre et le calcium notamment au cours du diabète.

Nos résultats montrent une diminution significative de l'activité des enzymes à zinc étudiés dans le sérum des rats diabétiques par rapport aux témoins sains. Chez les diabétiques, on peut s'attendre à une zincurie importante qui peut entraîner un appauvrissement en zinc. Le taux de zinc dans le sérum est généralement plus bas chez les diabétiques que chez les personnes de contrôle. Le rôle de zinc dans ces enzymes est comme suite : La phosphatase alcaline est une enzyme dimériques de type métalloglycoprotéique, l'enzyme nécessite 4 atomes de zinc par molécule de protéine pour leur activité catalytique (Jamshid et al., 2011). L'amylase est une métalloenzyme a un site catalytique subdivisé en plusieurs sous sites. Les spécificités des enzymes amylolytiques pourraient également s'expliquer par l'existence d'ion de zinc dans leur structure (Chappuis et Favier, 1991). Lactate déshydrogénase (LDH) est une métallo-enzyme de la famille d'oxydoréduction, nécessite un atome de zinc comme cofacteur (rôle structurale) (Parvaneh et al., 2009). L'aldolase aussi est une métalloenzyme zinc dépendante dans la structure de protéine, donc le manque de zinc associé au diabète c'est l'origine peut être de la diminution de l'activité de ces enzymes.

D'autre part on a constaté, chez les rats sains et diabétiques, une diminution significative de l'activité sérique de l'amylase, PAL, LDH et l'aldolase lorsque les rats sont traités par le cuivre et une augmentation de l'activité sérique de l'amylase et diminution de l'activité de LDH et aldolase lorsque les rats sont traités par le calcium.

Le mécanisme par lequel le cuivre affect l'activité de ces enzymes est comme suite : Le cuivre permet d'interagir avec de nombreuses protéines dépendantes de métaux essentiels. Cela est illustré notamment par l'intervention de zinc via les métallothionéines sur lesquelles le Cu se fixe ; ou via les facteurs de transcription à doigts de Zn (Huang et al., 2004). Les altérations de l'activité des enzymes seraient dues au remplacement du zinc par le cuivre (Pillai et Gupta, 2005). Les mécanismes de remplacement d'un métal par un autre peut être réalisé dans un rapport stœchiométrique, une règle générale pour tous les cations divalents fixés sur les MTs avec le rapport 7 atomes de métal par métallothionéines. En effet, des échanges entre le Zn fixé aux MTs et d'autres protéines ou facteurs de transcription ont été démontrés (Maret, 1994). Le cuivre (Cu) est fixé sur les MTs sous forme d'ion monovalent et le ratio métal/protéine étant alors de 10 atomes de Cu par MT. La très forte affinité du Cu pour les MTs fait que le Zn est très facilement remplacé de ces protéines (Parks et al., 1997) ce qui permet une diminution de l'activité des protéines à zinc dont les enzymes sous l'effet d'un supplément de cuivre.

Concernant l'effet de calcium sur les enzymes à zinc, On peut expliquer les résultats comme suite : Les amylases peuvent être considérées comme étant des métalloenzymes ; enzymes nécessitant un ion métallique (Ca^{++} et Zn^{++}) pour leur structure et activité. (Savchenko et al., 2002), Donc la grande majorité des amylases, l'ion calcium Ca^{++} a un effet stimulateur sur leur activité enzymatique (Lévêque et al., 2000). Le Zinc entrent en compétition avec le Calcium dans le site actif de cette enzyme (Savchenko et al., 2002). Le Ca^{++} joue aussi un grand rôle dans le maintien et la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme ainsi que dans son activité catalytique (Boel et al., 1990). Ce qui probablement explique l'augmentation de l'activité de l'alpha amylase par un supplément de calcium. LDH, PAL et l'aldolase aussi sont des métalloenzymes zinc dépendantes dans la structure de protéine (Matthias et Georg, 1996). Il a été montré qu'un excès de calcium inhibe l'absorption du zinc (Pascale et Richard, 2000), donc probablement une carence en zinc induite par un supplément de calcium entraîne la diminution de l'activité de ces enzymes.

Par ailleurs, nos résultats montrent que le traitement par le Zn réduit les effets néfastes de cuivre et calcium par stimulation de l'activité de la phosphatase alcaline, l'alpha amylase, lactate déshydrogénase et l'aldolase chez les rats sains et diabétiques, ce qui nous permet de montrer bien l'efficacité de traitement par le zinc pour l'amélioration de l'activité de ces enzymes.

Dans cette étude un supplément de 30 mg/kg d'aliment de cuivre ou de 35g /kg d'aliment de calcium pendant 21 jours a augmenté significativement la glycémie chez les rats sains et

diabétiques. Le zinc est un des composants de l'insuline et il est indispensable à son synthèse, stockage, sécrétion et action sur la cellule (Katleen et al., 2012). La diminution de la concentration de zinc plasmatique et tissulaire suite aux traitements par le cuivre ou le calcium probablement affect la capacité des cellules bêta de la synthèse et sécrétion de l'insuline (Chausmer, 1998), ce qui favorise l'augmentation de la glycémie. De plus, il a été montré que le cuivre diminue l'utilisation de glucose par les tissus et augmente la production endogène (Kechrid et al., 2007) ce qui probablement l'origine de l'hyperglycémie associée au supplément de cuivre. Par ailleurs, il a été montré aussi que le calcium est associée au développement du diabète, de l'intolérance au glucose et de résistance à l'insuline (Elizabeth et Brendan, 1994).

Des concentrations élevées de calcium pourraient induire une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Il est bien connu que la libération de l'insuline est un processus dépendant du calcium (Chunqiu et al., 2009). La libération de l'insuline, qui est stockée dans les granules de sécrétion dans les cellules β pancréatiques, dépend de l'influx de calcium à travers des canaux calciques voltage-dépendants. Des altérations dans le flux de calcium peuvent avoir des effets néfastes sur la fonction sécrétoire des cellules β (Rorsman et al., 2011). D'autre part, une augmentation des taux de calcium peut diminuer l'expression des transporteurs du GLUT4 ce qui diminue l'entrée cellulaire du glucose et, par conséquent, une augmentation des concentrations plasmatiques de glucose (Becerra-Tomás et al., 2014).

Les résultats obtenus ont montré que la glycémie a été restaurée après le traitement par le zinc chez les rats sains et diabétiques nourris par un régime riche en cuivre ou calcium. Dans notre étude un supplément de zinc corrige de façon remarquable le statut de zinc dans l'organisme ce qui favorise la biodisponibilité de zinc dans les différents tissus et organes y compris le pancréas et donc joue le rôle de la régulation de la glycémie. Plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du taux de glucose sanguin après le traitement par le zinc. La protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP 1B), un régulateur clé de phosphorylation de récepteur de l'insuline cette enzyme est connue pour être une cible d'ions zinc pour l'activation (cofacteur). Aussi d'autres études ont montré que le zinc peut jouer un rôle dans l'amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline (Jayawardena et al., 2012), d'autre part le zinc réduit la synthèse du glucose, tout en favorisant le métabolisme et le stockage du glucose. Ceci est principalement par l'activité accrue des enzymes clés impliquées dans ces processus métaboliques, tels que l' α -glucosidase, la PFK, PK et de la glycogène synthase (Priyanga et al., 2015).

Nos résultats montrent, chez les rats supplémentés par le cuivre ou le calcium, une augmentation de profil lipidique sérique (cholestérol et des triglycérides), ce qui montre la perturbation de métabolisme lipidique par excès de cuivre et calcium. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Osman, (2004), Tanaka et al., (2009) et Songtao et al., (2013). Osman, (2004) est constaté une augmentation de taux de cholestérol sous l'effet d'une augmentation de la concentration de cuivre chez l'homme (groupes sains et groupes obèses). Tanaka et al., (2009) ont montré aussi une diminution significative du taux des triglycérides plasmatiques par un régime carencé en cuivre chez les rats. D'autre part Songtao et al., (2013) montrent dans ces études une augmentation de la concentration de cholestérol totale suite à un supplément de calcium chez les femmes.

Il a été établi que le zinc peut jouer un rôle important dans l'activation des enzymes impliqués dans le métabolisme des lipides et des protéines (Ashima et al., 2012), donc notre résultats indiquent que le métabolisme des lipides de ces animaux est très sensible à la variation de statut de zinc. Un rapport entre le cuivre et les lipoprotéines par l'augmentation de l'activité d'une enzyme 3-hydroxy-3-méthyle-glutaryl-CoA réductase (HMGCoA R), cette enzyme joue un rôle principale dans la synthèse du cholestérol dans le foie (Rahman et al., 2001).

En d'autres termes, l'augmentation de profil lipidique est expliquée probablement par la baisse de l'activité de l'insuline sous l'effet d'une carence en zinc induit par l'excès de cuivre et calcium retarde le catabolisme des triglycérides, surtout du fait d'une activité réduite de l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL) qui permet l'hydrolyse des particules riche en triglycérides, les VLDL et les chylomicrons. L'hyperglycémie provoque la glycation des apoprotéines, AI, AII, C et E qui est un facteur déterminant, ainsi la glycation de l'apo B des VLDL ralentit son catabolisme physiologique (Halimi, 2000).

Le traitement par le zinc chez les rats sous un régime riche en cuivre ou calcium à un effet bénéfique sur le profil lipidique. Reiterer et al. (2005) ont rapporté une augmentation de la concentration du cholestérol et des triglycérides dans les fractions de VLDL et de HDL chez les souris alimentés par un régime carencé en zinc et ont indiqué que la supplémentation du zinc a diminué ces perturbations. Ce traitement permet de remplacer la perte de zinc induit par le diabète et par l'excès de cuivre et calcium ce qui active les processus biologiques zinc dépendants dans l'organisme, ce qui permet aussi d'améliorer les paramètres lipidiques et diminuer le risque de complication cardiovasculaire de diabète.

Nos résultats montrent une diminution claire des protéines totales sériques chez les rats diabétiques non traités par rapport aux rats témoins sains ceci peut être interprété par un déficit en insuline (Potemkine, 1989) et peut être par protéinurie (microalbuminurie), qui est un important marqueur clinique du diabète néphropathie (Gross et al., 2005). Au cours du diabète, les cellules doivent trouver un autre substrat biologique pour produire de l'énergie. Elles vont alors utiliser les acides gras et les acides aminés glycoformateurs à partir de la dégradation des protéines ce qui décline la synthèse protéique (Moller et Nair, 2008).

D'autre part, on a constaté que le cuivre provoque une élévation significative de la concentration sérique de l'urée, créatinine et l'acide urique sérique et une diminution significative des protéines totales chez les rats sains et diabétiques. Mais pour le calcium les résultats montrent qu'il provoque l'augmentation seulement de la concentration sérique de l'acide urique et pas d'effet sur les autres paramètres de métabolisme protéique chez des rats sains ou diabétiques.

Sandstead et al. (2000) ont rapporté que le zinc est indispensable pour la synthèse des coenzymes qui sont responsables du métabolisme et de la biosynthèse d'amine. L'insuline plasmatique, l'IGF-1 et l'apport en acides aminés agissent sur plusieurs circuits d'enzymes de régulation du type phosphatase ou kinase qui réactivent des facteurs de régulation de la synthèse protéique, comme la traduction des ARNm qui est ainsi activée via les facteurs d'élongation et de traduction eEF4 (eucaryote elongation factor 4) et 4E-BP1 (4E-binding protein), favorisant une synthèse protéique (Poortmans et Boisseau, 2009). Donc, la diminution de la synthèse protéique probablement due de l'insulinopénie résulte de la carence en zinc induit par le supplément de cuivre ou le calcium. De même le cuivre en excès induit une modification des structures en doigts de zinc de certains facteurs de transcription (Guiraud et Horn, 2003) qui peuvent altérer la synthèse des protéines. La Dopamine β -hydroxylase est une enzyme à cuivre, cette enzyme sert à la production de catécholamines, ces dernières sont classiquement, considérées comme catabolisantes des protéines (Linder et al., 1999), donc probablement la supplémentation de cuivre induit une forte activité de catabolisme protéique par activité catalytique de Dopamine β -hydroxylase et donc diminution de leur concentration sérique.

La créatinine et l'urée sont considérées comme des déchets résultant de la dégradation des protéines en acides aminés, le catabolisme de ce dernier provoque la synthèse de l'urée (William et al., 1999). Aussi la concentration de l'urée sanguine est dépendante non seulement de la filtration glomérulaire mais aussi de l'apport en protéines alimentaires, du catabolisme protéique de

l'organisme, de la capacité de production du foie et de la perfusion rénale. La créatinine est un indicateur plus spécifique de la fonction glomérulaire que l'urée (Whelton et al., 1994).

Pour la présente étude, une accumulation remarquable de l'urée et créatinine a été notée dans le diabète expérimental. Nos résultats sont en accord avec ceux apportés par (Almdal et al., 1986) qui ont constaté que, chez des rats Wistar, l'injection de 75 mg/kg de la streptozotocine (STZ) provoquait en deux semaines une augmentation de l'urée. Ça peut être expliqué soit par la dégradation accélérée des protéines (Brunner et Suddarth, 2006), soit par la transformation de protéine en glucide, ou par l'altération de l'homéostasie du nitrogène qui conduit à l'augmentation de l'élimination hépatique du nitrogène sous forme d'urée. Pour ces raisons l'augmentation de la concentration de l'urée et de la créatinine par supplément de cuivre chez les rats sains ou diabétiques peut être due à une activité catabolique accrue des protides confirmé par la diminution de protidémie (Potemkine, 1989).

L'augmentation de la concentration d'acide urique suite au traitement par le cuivre ou calcium peut expliquer soit par la production accélérée, soit par la diminution de son excrétion (Modan et al., 1987). Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être interprété lors d'une lésion cellulaire, une dégradation rapide des acides nucléiques libérant en grande quantité des purines qui seront par la suite transformées en acide urique (Kanevets et al., 2009). Cette explication peut être confirmée par la diminution de la concentration des protéines sériques observée dans nos résultats.

Le traitement par le zinc corrige la diminution des protéines induite par le cuivre et améliore la perturbation des paramètres de l'urée et créatinine. Le zinc est un cofacteur d'ADN polymerases, transcriptase inverse, ARN polymérase, ARNt synthétase et de la chaîne de la protéine du facteur d'élongation. En outre, il est nécessaire pour l'activité de la thymidine kinase et il entre également dans la régulation de l'activité des ribonucléases (Guillaume, 2013). Par conséquent, il a été suggéré que des changements dans l'activité de ces enzymes sont responsables de la diminution de la synthèse des protéines et d'un retard de croissance observée chez les animaux carencés en zinc (Southon et al., 1985).

En ce qui concerne l'activité des transaminases (ASAT et ALAT), nous avons remarqué une augmentation significative de l'activité sérique de ces enzymes chez les rats diabétiques ou sains supplémentés par le cuivre à raison de 30 mg Cu/kg d'aliment et une légère augmentation de l'activité de ASAT chez les rats sains traités par 35g/kg d'aliment de calcium. Ces résultats

confirment le résultat d'une forte concentration de la glycémie sous l'effet d'un supplément de cuivre et calcium.

Le diabète active la néoglucogenèse pour fournir le glucose à partir d'autres sources telles que les acides aminés (Fatmi et al., 2013), ces acides aminés sont ensuite convertis en corps cétoniques (un cétooglutarate et pyruvate) pour lesquels l'enzyme ASAT et ALAT sont nécessaires, conduisant enfin à l'élévation de l'activité de ces enzymes pour la production d'énergie (Derai et Kechrid, 2014). L'augmentation de l'activité des transaminases peut expliquer par un supplément de cuivre et calcium qui provoque la diminution de statut de zinc et diminue l'oxydation de la chaîne carbonée de l'alanine et entraîne une accumulation de l'alanine dans le sang (Grefley et Sandstead, 1993).

Les changements de l'activités des transaminases sont contrôlés par un supplément de zinc, chez les rats sains et diabétiques, qui a un effet préventif contre les pathologies hépatiques induites par un excès de cuivre ou calcium (Lisa et Gaetkea, 2003). Ces changements sont expliquée par l'effet de zinc sur l'augmentation de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans (Hannan et al., 2007 ; Al-Mousawi, 2013). L'insuline diminue le catabolisme des protéines (Moller et Nair, 2008), l'accumulation des acides aminés dans le sang et par conséquence, l'activité enzymatique des transaminases diminue. Les résultats de Tingting et al. (2015) suggèrent qu'il y avait des anomalies fonctionnelle, structurelle et biochimiques dans le foie des souris diabétiques OVE26 à l'âge de 6 mois; Cependant, tous ces changements pourraient être prévenues avec un traitement par le zinc, qui a été associée à la régulation d'expression de la métallothionéine hépatique.

Le stress oxydatif peut progresser aux dommages oxydatifs impliquant des protéines cellulaires (contractiles, structurelles, et enzymatiques), des lipides, l'ADN et d'autres molécules d'une manière qui pourrait conduire à la fonction cellulaire anormale (Powers et Jackson, 2008).

Nos résultats montrent une augmentation de la concentrations hépatique de MDA et une diminution de taux de GSH hépatique chez les rats diabétiques par rapport au témoin. MDA est un biomarqueur de la peroxydation lipidique (Saka et al., 2011), utilisé comme indicateur des dommages oxydatifs (Zhang et al., 2008). De plus le glutathion (GSH) est un tripeptide connu par son rôle antioxydant important pour la protection cellulaire, détoxification, la conjugaison et l'excrétion des molécules toxiques (Brown et al., 2004; Aouacheri et al., 2009).

Le stress oxydant est augmenté dans les différents tissus dans le cas de diabète (Korshunov et al., 1997). En effet, en présence d'hyperglycémie chronique, les protéines ayant une demi-vie

supérieure à dix semaines subissent des modifications irréversibles, générant un stress oxydant (Gillery, 2001). L'augmentation du stress oxydant au cours du diabète a donc été principalement démontrée par une augmentation des dommages causés par les radicaux libres sur les protéines et les lipides. Le principal marqueur de l'augmentation des radicaux libres est l'augmentation de la peroxydation lipidique (MDA) et une diminution de la concentration de GSH (Stephens et al., 2006).

Notre recherche montre que le cuivre augmente le taux de MDA et diminue le GSH hépatique, ces résultats est en accord à ceux publier par Wilfried et al. (2005) et Zhang et al. (2000). Wilfried et al. (2005) ont montré qu'un supplément de 25 ou 100µg/l de sulfate de cuivre provoque une diminution du taux de GSH hépatique. Zhang et al. (2000) ont rapporté une augmentation de la concentration de MDA hépatique chez des rats alimentés par un régime supplémenté par sulfate de cuivre (500mg /kg p.c). Le traitement par le cuivre empêche l'absorption de zinc ce qui affect leur biodisponibilité et conduit a la carence remarquable en zinc , cette carence en zinc probablement est le responsable de l'etats de stress oxydative. Chen et Young (1998), ont démontrés que l'insuffisance du zinc induit une génération accrue des radicaux libres et de la peroxydation des lipides dans le foie des souris et des rats. De plus, le cuivre est un métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement des réactions de production des radicaux hydroxyle (réactions de Fenton) (Delattre et al., 2005) ce qui favorise l'oxydation des lipides et augmente le taux de MDA.

Notre résultats montrent aussi qu'un supplément de zinc améliore l'états de stress oxydant induit par le cuivre et le diabète ce qui en accord avec ce publié par Kandaz et al. (2009) et Duzguner et Kaya (2007). Kandaz et al. (2009) ont rapporté q'un supplement de sulfate de zinc (10 mg/kg/j) pendant 10 jours, provoque une diminution de la concentration de MDA chez les rats. D'autre part, Duzguner et Kaya (2007) ont constaté une diminution du niveau de MDA après le traitement des lapins diabétiques par le zinc. La diminution de la peroxydation lipidique par le Zinc pourrait être attribuée à sa propriété antiperoxydative. Des études ont montré que le zinc provoque l'inhibition de la peroxydation lipidique ce qui favorise la stabilité des membranes biologiques (Sidhu et al., 2004). En outre il a été démontré que le zinc antagonise les propriétés catalytiques des métaux de transition, notamment le cuivre ayant une activité rédox ce qui limite l'aptitude à favoriser la formation des radicaux hydroxyle (OH·) (Powell, 2000).

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Le travail que nous avons mené est consacré à l'étude de l'effet du zinc sur l'évolution du poids corporel, le statut de zinc, l'activité d certaines enzymes à zinc ainsi que des aspects biochimiques et paramètres de stress oxydatif chez des rats sains et diabétiques alimentés par un régime riche en cuivre et calcium. Notre objectif était de savoir si la supplémentation du zinc sous la forme minérale à un effet sur la prévention des dégâts de l'excès de cuivre, de calcium et des complications du diabète. A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

- un supplement de cuivre ou de calcium dans l'alimentation est clairement influée sur le poids corporel et la consommation alimentaire chez les rats sains et diabétiques mais le traitement par le zinc a amélioré ces paramètres d'aspect physiologique.
- La concentration du zinc dans le sérum et les différents organes (le foie, le rein, le testicule et le pancréas) est diminuée en cas d'un supplément de cuivre ou de calcium dans la nourriture. Alors que le traitement par le zinc a rétabli sa concentration presque au valeur normale.
- Pour l'activité de la phosphatase alcaline (PAL), l'aldolase, l' α -amylase et de lactate déshydrogénase (LDH), l'excès de cuivre ou de calcium dans l'alimentation a provoqué une diminution de l'activité de ces enzymes dans l'état normale ou au cours de diabète mais le traitement par le zinc a amélioré l'activité de ces enzymes.
- L'excès de cuivre ou de calcium dans l'alimentation a induit des troubles dans le métabolisme glucidique et lipidique traduisant par une hyperglycémie, une augmentation de la concentration sérique des lipides, mais le traitement par le zinc a réduit ces troubles à l'états normale ou au cours du diabète.
- En ce qui concerne le métabolisme protéique, l'excès de cuivre conduit à une diminution de la concentration des protéines sériques accompagné d'une augmentation de la concentration sérique de l'urée, la créatinine et l'acide urique. Alors que l'ajout du zinc joue un effet positif dans l'amélioration de ces paramètres.
- Pour l'activité des transaminases, l'excès de cuivre ou de calcium dans l'alimentation a provoqué une augmentation de l'activité des transaminases (ASAT et ALAT) Par contre le traitement par le zinc a réparé l'activité de ces enzymes.
- En ce qui concerne les paramètres de stress oxydatif, nos résultats montrent que l'excès de cuivre dans la nourriture des rats diabétiques a provoqué:

- Une augmentation de taux de peroxydation lipidique (MDA) et une diminution de la concentration du glutathion réduit (GSH) ;

Mais le traitement par le zinc a protégé les cellules contre l'attaque radicalaire en :

- Diminuant le taux de peroxydation lipidique (MDA) et augmentant la concentration du glutathion réduit (GSH).

Enfin, nous pouvons dire que l'excès de cuivre ou de calcium a provoqué un état de carence en zinc présentée par des sérieux perturbations ; affecte le taux de croissance, le statut du zinc, l'activité des enzymes à zinc, le métabolisme des glucides, lipides et protéines, le taux de l'MDA et le niveau du glutathion réduit notamment au cours de diabète. Le traitement par le zinc a diminué la sévérité de ces troubles, suggérant que le zinc exercent un effet antidiabétique et antioxydant important contre l'hyperproduction des radicaux libres, ce qui contribue à la réduction des complications de diabète ou les maladies liée à l' excès de cuivre ou calcium.

PERSPECTIVES

Vu l'importance de ces résultats, il serait intéressant de poursuivre la recherche, en prenant en considération les recommandations suivantes :

Doser d'autres paramètres du stress oxydant enzymatique notamment (le glutathion réductase, catalase, GPx, SOD,...).

Doser de glycogène et l'insuline au niveau tissulaire et sérique

Etudier l'effet de zinc au niveau d'ADN génomique

Etudier l'effet de zinc sur l'activité des autres enzyme à zinc

Réaliser une étude invitro de l'effet de zinc sur l'absorption de cuivre et calcium

Réaliser une étude de l'effet préventif de zinc contre le développement de diabète de type 2.

Références

Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Abrams, S.A. (2003). Normal acquisition and loss of bone mass. *Horm Res.* 60(3): 71-76.
- Adrian, J., Potus, J., Frangne, R. (2003). La science alimentaire de A à Z. 3^{ème} éd. Paris: *Lavoisier Tec & Doc.* P: 579.
- Afkhami, M.A., Mahdi, K., Seid, M.M., Forough, N. (2008). Effect of zinc sulfate supplementation on lipid and glucose in type 2 diabetic patients. *Pak. J. Nutr.* 7(4): 550-553.
- Agett, P.J., Favier, A. (1993). Zinc. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 63: 247-316.
- Aguilera M., Vaughan R. (2000). Calcium and the anesthetist. *Anaesthesia* 55: 79-90.
- Alberto, Y.W., Tannhauser-Barros, H.M., Vargas, C.R. (2015). GABAergic Modulation in Diabetic Encephalopathy-Related Depression. *Curr. Pharm. Des.* 21(34): 4980-4988.
- Alias, C., Linden, G., Miclo, L. (2003). Biochimie alimentaire. 5^{ème} éd. Paris : *Dunod.* P: 250.
- Alias, C., Linden, G., Miclo, L. (2008). Biochimie alimentaire. 6^{ème} éd. Paris: *Dunod.* P: 260.
- Almdal, T.P., Petersen, K.F., Hanses, B.A., Vilstrup, H. (1986). Increased capacity of urea synthesis in STZ diabetes in rats. *Diabetologia* 29(6): 812-6.
- Al-Mousawi, Z.A.H. (2013). Effect of vitamin c and zinc on some biochemical parameter in alloxan induced diabetic rabbits. *Bas. Vet. Res.* 12(1): 77-86.
- Alvarez-Santos, S., Gonzalez-Lafont, A., Luch, J.M. (1994). On water promoted mechanism of peptide cleavage by carboxypeptidase A. A theoretical study . *Can. J. Chem.* 72: 2077-2083.
- American Diabetes Association.(2015). Cardiovascular Disease and Risk Managem. *Diabetes Care* 38(1): S49-S57
- Andreas, M. G., Magali, R., Craig, C.G. (2011). Brain-Delivery of Zinc-Ions as Potential Treatment for Neurological Diseases: Mini Review. *Drug. Deliv. Lett.* 1(1): 13–23.
- Ankur, R., Shahjad, A. (2012).Alloxan induced diabetes : mechanism and effects. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences* 3(2) :819-823.

- Antoni, B., Karine, G., Darryl, H., Ileana, C.S., Flavia F. (2009). Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: Insights into the COX assembly process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793(1): 97–107.
- Aouacheri, O., Saka, S., Djafer, R.(2009). The toxic effect of an insecticide (alphamethrin) on the activity of detoxifying glutathione enzymatic system. *Ann. Toxicol. Anal.* 21(3): 125-129.
- Aouacheri, O., Saka, S., Krim, M., Messaadia, A., Maidi, I.(2015). The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *Can. J. Diabetes* 39: 44-49.
- Apfelbaum, M., Romon, M., Dubus, M. (2004). Diététique et nutrition. 6ème éd. Paris: *Masson*. P:535.
- Ariyan, C.E., Sosa, J.A. (2004). Assessment and management of patients with abnormal calcium. *Crit. Care. Med.* 32(4): 146-154.
- Arnaud, J. (1995). Zinc. in: Dossier Scientifique de l'IFN n°7, Les minéraux. *Institut Français pour la Nutrition*. Paris. pp: 59-64.
- Arnaud, J., Favier, A. (1991). Le zinc. In Les oligoéléments en médecine et biologie. Paris: *Tec et Doc Lavoisier*. pp: 344-348.
- Arredondo, M., Munoz, P., Mura, C.V., Nunez, M.T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284(6): 1525-1530.
- Arshag, D., Mooradian, M.D., Chair, W.C., Failla, M., Hoogwerf, B., Maryniuk, M., Wylie-Rosett, J. (1994). Selected Vitamins and Minerals in Diabetes. *Diabetes care* 17(5): 464-479.
- Ashima, P., Abhishek, S., Rathore, V., Pathak, R. (2012). Role of Zinc on Antioxidative Enzymes and Lipid Peroxidation in Brain of Diabetic Rats. *J. Drug. Metab. Toxicol.* 3(3): 5.

-B-

- Bancila, V., Cens, T., Monnier, D., Chanson, F., Faure, C., Dunant, Y., Bloc, A. (2005). Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat KATP. *channel. J. Biol. Chem.* 280: 8793-9.

- Barry, E. L., Deborah, J. C.(2006). Etiology of Obesity: The Problem of Maintaining Energy Balance. *Overweight and the Metabolic Syndrome* 26: 83-103.
- Becerra-Tomás, N., Estruch, R., Bulló, M., Casas, R., Díaz-López, A., Basora, J., Fitó, M., Serra-Lluis, M., Salas-Salvadó, J. (2014). Increased Serum Calcium Levels and Risk of Type 2 Diabetes in Individuals at High Cardiovascular Risk. *Diabetes Care* 37(11): 3084-3091
- Benoist, B., Darnton-Hil, I., Davidsson, L. (2007). Interagency Meeting on Zinc Status Indicators. *Food Nutr. Bull.* 28(3):S480-S484.
- Bentley, P.J., Grubb, B.R. (1991). Experimental dietary hyperzincemia tissue disposition of excess zinc in rabbits. *Trace Elem. Med.* 8(12): 202-207.
- Bhat, M., Noolu, B., Qadri, S.S., Ismail, A. (2014). Vitamin D deficiency decreases adiposity in rats and causes altered expression of uncoupling proteins and steroid receptor coactivator3. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144: 304-12.
- Bhatnagar, S., Taneja, S. (2001). Zinc and cognitive development. *Br. Nutr.* 85 (supl2): S139-S145.
- Bianchetti, M. (1983). Calcium and blood pressure regulation in normal and hypertensive subject. *Hypertension* 5 (2): 1157-1165.
- Biesalski, H.K., Grimm, P. (2004). Atlas de poche de nutrition. Paris: *Maloine*. p: 341.
- Bjursell, M., Egecioglu, E., Gerdin, A.K., Svensson, L., Oscarsson, J., Morgan, D., Snaith, M., Törnell, J., Bohlooly-Y, M. (2005). Importance of melanin- concentrating hormone receptor for the acute effects of ghrelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 759-765.
- Boel, E., Brady, L., Brozowski, A.,M., Derewanda, Z., Dodson, G.G., Jensen, V.J., Petersen, S.,B., Swift, H., Thim, L. & Woldike, H.F. (1990). Calcium binding in amylase: an X-ray diffraction study at 2,1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus* . *Biochem.* 29: 6244-6249.
- Bonjour, J.PH., Chevalley, T., Ferrari, S., Rizzoli, R. (2005). Lait et santé osseuse : Rôle essentiel de calcium et des protéines. *Cah. Nutr. Diet.* 40(1): 12-19.
- Bonnie, R.S, Marc, S., Danie, K., Peter, A., Tar-Ching, A., Scott, B., Kenny, C., Michael, D., Lynne H., Rick, H., Carl, K., Bette, M., Larisa, R., Rita, S., Wout, S., Tom, S. (2007).

- Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. Part B.* 10(3): 157–222.
- Bourgeois, M. (2003). Le pied diabétique. Ed. *Ilya, Bruxelles*. P: 99.
- Bouysset, M. (2004). Pathologie ostéo-articulaire du pied et de la cheville. France: *springer*. P:552.
- Boynes, J.W. (1991). Perspectives in diabetes: role of oxidative stress on development of complication in diabetes. *Diabètes* 40 (2): 405-412.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bray, J., Creagg, P., Macknight, A.D., Mills, G.R. (1992). Lecture Notes on Human Physiology. 2th ed. Blackwell Science Ltd. P: 360.
- Bremner, I. (1998). Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1069S-1073S.
- Bremner, I., Young, B.W., Mills, C.F. (1976). Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in Sheep. *Br. J. Nutr.* 36: 551-561.
- Breuil, V., Euller-Ziegler, L. (2004). Nutrition et vieillissement osseux-L'ostéoporose. *Nutr. Clin. Metabol.* 18(4): 212-218.
- Bronner, F.(2003). Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J. Cell Biochem.* 88(2): 387-93.
- Brown, E.M. (1999). Physiology and pathophysiology of the extracellular Calcium-sensing receptor. *Am. J. Med.* 106: 238-53.
- Brown, L.A., Harris, F.L., Ping, X.D., Gauthier, T.W. (2004). Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: A role for glutathione availability. *Alcohol* 33: 191-197.
- Bruce, A., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R., Peter, W. (2002). Molecular Biology of the Cell, 4th edition. New York: *Garland Science*. P: 314.
- Brunner, L.S., Suddarth, D.S. (2006). Soins infirmiers en médecine et en chirurgie: 2. Fonctions respiratoire, cardiovasculaire et hématologique. Canada: *De Boeck*. P: 680
- Burtis, A., Ashwood, E., Bruns, D. (1999). Tiets textbook of clinical chemistry (3^{ème} éd). *Saunders Company*. P: 1917.
- Buysschaert, M. (2006). Diabétologie Clinique. Belgique: *Boeck*. P: 180.

-C-

- Capeau, J. (2003). Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *Médecine Sciences* 19(8-9): 834-839.
- Capeau, J., Desbois, M.H., Magre, J., Caron, M., Vigouro, C., Lascols, O., Gisele, C.H. (1996). Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'action de l'insuline. *Nutr. Clin. Métabol.* 10(4): 227-346.
- Carolyn, M., Slupsky, B.D. (1995). NMR solution structure of calcium-saturated skeletal muscle troponin C. *Biochemistry* 34(49): 15953-15964.
- Chao-Xia, Y., Yong-Jian, L., Li-Xia, T., Kang-Sen, M., Zhen-Yu, D., Hui-Jun, Y., Jin N. (2006). Effect of dietary calcium and phosphorus on growth, feed efficiency, mineral content and body composition of juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 255: 263-271.
- Chappuis, P., Bost, M., Misrahi, M., Duclos-Vallée, J.C., Woimant, F. (2005). La maladie de Wilson : aspects clinicobiologiques. *Ann. Biol. Clin.* 63(5): 457-466.
- Chappuis, P., Favier, A. (1991). Les oligoéléments en médecine et biologie. Paris: *Lavoisier*. pp:60-360.
- Chausmer, M.D. (1998). Zinc, insulin and diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.* 17: 109-115.
- Chen, C., Bo S., Jia-Jia, X., Rong, W., Sarah, J. D.C, and Xiao-Ping, W. (2015). Currently Clinical Views on Genetics of Wilson's Disease. *Chin. Med. J.* 128(13): 1826–1830.
- Chen, K.L., Wu, C.P., Lu, J.J. (1996). Effects of dietary copper levels on performance, tissues and serochemistry value of Taiwan country chicken. *J. Biomass Energy Soc. Chin.* 15: 70-5.
- Chen, S.M., Young, T.K. (1998). Effects of zinc deficiency on endogenous antioxidant enzymes and lipid peroxidation in glomerular cells of normal and five-sixths nephrectomized rats. *Formos Med. Assoc.* 97(11): 750-756.
- Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A., Seve, M. (2004). Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53: 2330-2337.
- Chunqiu, J. H., Min L., Pessin, J.E. (2009). Insulin Granule Biogenesis, Trafficking and Exocytosis. *Vitam. Horm.* 80: 473–506.

- Claeyssen, R., Andriollo-Sanchez, M., Arnaud, J., Touvard, L., Alonso, A., Chancerelle, Y., Roussel, A.M., Agay, D. (2009). Effect of sub-deficient zinc status on insulin sensitivity after burn injury in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 127: 132-42.
- Comelade, E. (1995). Technologie et hygiène alimentaire - 1^{er} cahier : les nutriments. (7^{ème} éd). Paris: *Jacques Lanor*. P: 144.
- Constantine, S.M., Mrcpi, M., Mrcpch, D., Klip, A. (2008). L'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2 : l'interaction entre les cellules adipeuses et les cellules musculaires. *Hôpital St. Michael* 8(7): 1-6.
- Cooper, M.S., Gittoes, N.J. (2008) .Diagnosis and management of hypocalcaemia. *B.M.J.* 336:1298–1302.
- Corinne, V., Jocelyne, M., Christèle, D.M., Olivier, L., Gisèle, C., Martine, C., Jacqueline, C. (1999). Les syndromes d'insulinorésistance extrême. Formes cliniques et bases moléculaires. *Médecine thérapeutique / Endocrinologie* 1(1): 39-46.
- Corinne, V., Jocelyne, M., Christèle, D.M., Olivier, L., Gisèle, C., Martine, C., Jacqueline, C. (2011). Syndromes d'insulinorésistance majeure : clinique et physiopathologie. *Sang Thrombose Vaisseaux* 13(1): 21-9.
- Cornet, M. (2009). Biologie 5e-Manuel: Sciences générales. Belgique: *Boeck*. P: 304
- Conor, R. (2004). The Nutritional Trace Metals. *Blackwel* Edition . p: 103.
- Cousins, R.J., Liuzzi, J.P., Lichten, L.A. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* 281: 24085–24089.
- Coxam, V., Davicco, M.J. (2006). Nutrition et métabolisme osseux. *Ann. Endocrinol.* 67(2): 131-137.
- Cuatrecasa, P. (1971). Insulin-Receptor Interactions in Adipose Tissue Cells: Direct Measurement and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68(7): 1264-1268.
- D-**
- David, L., Watts, D.C., F.A.C.E.P.i. (1988). The Nutritional Relationships of Zinc. *J. Orthomol. Med.* 3(2): 63-67.

- Davies, K.M., Heaney, R.P., Recker, R.R., Lappe, J.M., Barger-Lux, M.J., Rafferty, K., Hinders, S. (2000). Calcium intake and body weight. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(12): 4635-4638.
- David, J.E.(2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763 (7): 711–722.
- Davis, S.R., Cousins, R.J. (2000). Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.* 130: 1085-1088.
- De Bie, P., Muller, P., Wijmenga, C., Klomp. L. (2007). Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J. Med. Genet.* 44: 673-688.
- De Fronzo, R.A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5: 877-94.
- De Meyts, P. (2005). The insuline receptor: structure and function. *Rev. Med. Liege.* 60(5-6): 286-290.
- Debjit, B., Chiranjib, K.P., Sampath, K. (2010). A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic disease. *Int. Pharm. Biomed. Sci.* 1: 05-11.
- Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. 1^{ère} éd. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris. P: 547.
- Demotes-Mainard, J. (2003). Communication cellulaire. In Kamoun P, Lavoine A. et De Verneuil H. Biochimie et biologie moléculaire. Paris: *Flammarion Médecine-Sciences*. pp: 419-447.
- Derai, H., Kechrid, Z. (2014). Combined effect of vitamins C and E on zinc status, carbohydrate metabolism and antioxidant values in diabetic rats fed zinc-deficient diet. *Med. J. Nutr. Metab.* 7(1): 55-65.
- Derek, L.E.A. (2004). Diabetes Mellitus, A fundamental and Clinical Text. 3^{ème} éd. *D. LeRoith. Philadelphia*. P: 1540.
- Dimitrova, A., Russeva, A., Atanasova, M., Strashimirov, D. (2010). Effect of zinc supplementation on some hematological parameters of spontaneously hypertensive rats. *Trakia J. Sci.* 8(2):61-65.

- Dipali, S., Frances, S.S., Peter, N.W. (1987). Role of calcium ions and the heavy chain of factor XIa in the activation of human coagulation factor IX. *Biochemistry*. 26 (13): 3768-3775.
- Długaszek, M., Kaszczuk, M., Mularczyk-Oliwa, M. (2011). Magnesium, Calcium, and Trace Elements Excretion in 24-h Urine. *Biological Trace Element Research* 142(1): 1-10.
- Dorota, S., Barbara, B., Andrzej, T., Marzena, K., Pawel, R., Marek, W. (2011). The effect of zinc-and sulphate supplementation on tumor and hair concentrations of trace element (Zn, Cu, Fe, Ca, Mg, P) in Rats with DMBA-Induced Breast Cancer. *Pol. J. Environ. Stud.* 20(6): 1585-1592.
- Drouin, P., Blicke, J.F., Charbonnel, B., Eschwege, E., Guillausseau, P.J., Plouin, P.F., Daninos, J., Balarac, N., Sauvanet, J.P. (1999). Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères. *Diabétologie* 25(1):72- 83.
- Duclos, M. (2003). Physiologie endocrinienne. In Ader, J.L., Carre, F., Dinh-Xuan, A.T., Duclos, M., Kubis, N., Mercier, J., Mion, F., Prefaut, C. et Roman, S. *Physiologie*. Paris: Masson. pp: 271-330.
- Dudev, T., Lim, C. (2003). Principles governing Mg, Ca, and Zn binding and selectivity in proteins. *Chem. Rev.* 103(3):773-88.
- Dufner-Beattie, J., Kuo, Y.M., Gitschier, J., Andrews, G.K. (2004). The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. *Biol. Chem.* 279: 49082-49090.
- Dunn, M.F. (2005). Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer. *Biomaterials*. 18(4): 295-303.
- Duron, F. (2006). Endocrinologie. Ed. *Université pierre et marie curie*, Paris. P: 311.
- Duzguner, V., Kaya, S. (2007). Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 1481-1486.

-E-

- Elizabeth, A.F., Brendan, L. (1994). Effects of Calcium Antagonists on Insulin-Mediated Glucose Metabolism in Skeletal Muscle. *Diabetes* 43: 73-79.

- Espinoza, A., Le Blanc, S., Olivares, M., Pizarro, F., Ruz, M., Arredondo, M. (2012). Iron, copper, and zinc transport: inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol. Trace Elem. Res.* 146(2): 281-6.
- Estefanía, C.G., Miguel, S. and Isabel M.L. (2014). Role of Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Glioblastoma. *Cells* 3(2): 199-235.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jungens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 341.
- Etcheverry, P., Michael, A. G., Lisa, E. F.(2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Front Physiol.* 3: 317.
- F-
- Faa, G., Nurchi, V.M., Ravarino, A., Fanni, D., Nemolato, S., Gerosa, C., Van Eyken, P., Geboes, K. (2008). Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coordination Chemistry* 252: 1257-1269.
- Fatemi, N., Sarkar, B., (2002). Molecular mechanism of copper transport in Wilson disease. *Environ. Health Perspectol.* 110: 695-698.
- Fatmi, W., Kechrid, Z., Nazıroğlu, M. (2013). Selenium supplementation modulates zinc levels and antioxidant values in blood and tissues of diabetic rats fed zinc-deficient diet. *Biol. Trace Elem. Res.* 152(2): 243-50.
- Faure, P., Roussel, A., Coudray, C., Richard, M.J., Halimi, S., Favier, A. (1992). Zinc and insulin sensitivity. *Biol. Trace Elem. Res.* 32, 305-10.
- Favier, A. (1992). Hormonal effects of zinc on growth in chilgren. *Biol. Trace Elem. Res.* 32: 383-398.
- Feissli, S., Forster, G., Laudahn, G. (1966). Normal werte und Alterung von Hauptketten Enzymen im Serum. *Klin. Wschr.* 44: 390-396.
- Ferenci, P. (1999). Wilson's disease. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 31: 416-25.
- Fraker, P.J., King, L.E. (2004). Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 277-298.

- Fraker, P.J, King, L.E., Laakko, T. (2000). The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J. Nutr.* 130: 1399-1406.
- Frenot, M., Vierling, E. (2001). Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant. 2^{ème} éd. Centre Régional de Documentation Pédagogique d' Aquitaine, France. P: 305.
- Freychet, P., Roth, J., Neville, D.M. (1971). Insulin Receptors in the Liver: Specific Binding of [125I] insulin to the Plasma Membrane and Its. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68(6): 1833-1837.
- G-
- Gambling, L., Kennedy, C., Mcardle, J. (2011). Iron and copper in fetal development. *Sernin. Cel. Dev. Biol.* 22(6): 637-644.
- Garabedian, C.H., Deruelle, P.H., Borson, C.F., Boumaud, C., Brac, A., Crand, A., Cugnet, C.H., Moret, M., Moulin, P.H., Peretti, N., Raverot, G., Simone, C.H., Villar-Fimbel, S. (2010). Gynécologie endocrinologie nutrition. France: *Pradel*. P: 243.
- Garcia, H.C., Vrignaud, C., Garcia, C., Ceppa, F. (2009). From gene to disease: copper transporting P ATPases alteration. *Pathologie Biologie* 57(3) : 272-279.
- Gayet, B., Cazet, A.R. (2002). Les clés de la nutrithérapie: précis de nutrition orthomoléculaire. France: Quintessence. P: 341.
- Georges, H.(2001).Endocrinologie. De Boeck Université. P: 449
- Ghada, M.N. (2015). Human Leukocytes Antigens in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) Type I. *Middle-East Journal of Scientific Research* 23(9): 1990-1995.
- Gillery, P. (2001). Produits avancés de glycation (AGE), radicaux libres et diabète. *J. Soc. Biol.* 195: 387-390.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P., Rizzuto, R. (2008). Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* 8:119–130.
- Giuseppe, I., Rajendra, P., Francesco, T.(2014). Biochemical characterization of P-type copper ATPases. *Biochem. J.* 463(2): 167–176.
- Gordon, E.F., Gordon, R.C., Passal, D.B. (1981). Zinc metabolism: basic, clinical, and behavioral aspects. *J. Pediatr.* 99(3): 341-349.

- Grefley, S., Sandstead, H. (1993). Oxidation of alanine and B-hydroxybutyrate in late gestation by zinc restricted in rats. *Nutrition* 113: 1803-1810.
- Grimaldi, A. (2000). Diabétologie. Ed. *Université pierre et marie curie*, Paris. P: 142.
- Grimaldi, A. (2001). Guide pratique du diabète. Paris: *Masson*. P: 415.
- Gross, J.L, Azevedo, M.J., Silveiro, SP. (2005). Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention . *Diabetes Care* 28(1): 164-176.
- Guenard, H., Bioulac, B., Boisseau, M.R., Carre, F., Demotes-Mainard, J., Devillier, P., Hanoune, J., Harf, A., Lacour, J.R., Lamour, Y., Le Naour, R., Levy, B., Marthan, R., Mion, F., Paillard, M., Swynghedauw, B., Varene, P., Vincent, J.D. (2009). Physiologie humaine. (3ème éd). Paris: *Pradel*. pp: 407-444.
- Guillaume, F.C. (2013). Zinc'ing down RNA polymerase I. *Transcription* 4(5): 217-220.
- Guillausseau, P.J. (2003). Diabète sucré de type 1 et 2, 2ème partie : diabète de type 2. *Rev. Prat.* 53(5): 1463-1471.
- Guiraud, P., Favier, A., Horn, N. (2003). Métabolisme du cuivre. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. *Endocrinologie-Nutrition*. 10(359): 1-10.
- Guiraud, P., Horn, A.F.N. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis . *Int. J. Oncol.* 22: 15-20.
- Guitton, G., Renard, B., Gabillet, L., Villers, D. (2002). Dyscalcémie aux urgences. *Réanimation* 11: 493-501.

-H-

- Hajo, H., Lothar, R. (2009). The immune system and the impact of zinc during aging. *Immun Ageing*. 6: 9.
- Hajo, H., Silke, O., Lothar, R. (2008). Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: Current status and future perspectives. *Experimental Gerontology* 43: 394-408.
- Halimi, S. (2000). Dyslipidémies des diabètes et des états d'insulino-résistance: *Néphrologie* 21(7): 345-346.
- Hannan, J.M., Ali, I., Rokeya, B., Khaleque, J., Khater, M., Flatt, P.R., Abdel Wahab, H.A. (2007). Soluble dietary fiber fraction of fenugreek seed improve glucose homeostasis in animal

- models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. *Br. J. Nutr.* 97: 514-521.
- Hans-Peter, R. (2003). Development of Alimentary Zinc Deficiency in Growing Rats Is Retarded at Low Dietary Protein Levels. *J. Nutr.* 133: 2294–2301.
- Hansen, S.L., Trakooljul, N., Liu, H.C., Moeser, A.J., Spears, J.W. (2009). Iron transporters are differentially regulated by dietary iron, and modifications are associated with changes in manganese metabolism in young pigs. *J. Nutr.* 139: 1474-1479.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E. (1998). Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. (9^{ème} éd). France: (Relié) Mac Graw Hill. P: 166.
- Harris, Z.L., Klomp, L.W., Gitlin, J.D. (1998). Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(5): 972-977.
- Haase, H., Maret, W. (2003). Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp. Cell Res.* 291: 289-98.
- Haase, H., Maret, W. (2005). Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals* 18: 333-338.
- Heaton, D., Nittis, T., Srinivasan, C., Winge, D. R. (2000). Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J. Biol. Chem.* 275: 37582–37587.
- Hennen, G. (2001). Endocrinologie. Espagne: Boeck. P: 520.
- Hepler, P.K. (1994). The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 16(4):322-330.
- Hernandez, S., Tsuchiya, Y., Garcia-Ruiz, J.P. (2008). ATP7B copper-regulated traffic and association with the tight junctions : Copper excretion into the bile. *Gastroenterology* 134 : 1215-1223.
- Hille, F., Yadvinder, G., Alan, J. M., Mafalda, C., Karen, D., Frank, G. v. S., Bart, S., Ted, S. G. A. M. (2016). The Menkes and Wilson disease genes counteract in copper toxicosis in Labrador retrievers: a new canine model for copper-metabolism disorders. *Disease Models and Mechanisms* 9: 25-38.
- Houillier, P. (2002). Hypercalcémie: diagnostique et traitement. *Rev. Prat.* 52:1474-1480.

- Huang, M., Krepiy, D., Hu, W., Petering, D.H. (2004). Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes. *J. Inorg. Biochem.* 98: 775-85.
- Huber, A.M., Gershoff, S.N. (1973). Effect of zinc deficiency in rats on insulin release from the pancreas. *J. Nutr.* 103: 1739-1744.
- Huffman, D.L, O'Halloran, T.V. (2001). Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 677–701.
- Huster, D., Lutsenko, S. (2007). Wilson disease: not just a copper disorder. Analysis of a Wilson disease model demonstrates the link between copper and lipid metabolism. *Mol. Biosyst.* 3: 814-816.

-J-

- Ian, R., Anne, H., Barbara, M., Ruth, A., Usha, B., and Gregory D. G. (2005). Effects of Calcium Supplementation on Body Weight and Blood Pressure in Normal Older Women: A Randomized Controlled Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(7): 3824–3829
- Ian, R., Ruth, A., Barbara, M., Mark, J.B., Catherine, J.B., Helen, E.R., Campbell, K., Gregory, D.G., Andrew, G., Anne, H. (2010). Effects of calcium supplementation on lipids, blood pressure, and body composition in healthy older men: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 91: 131-139.
- Imoberdorf, R., Rühlin, M., Ballmer, P.E. (2010). Zinc – un oligoélément vital à grand potentiel. *Forum Med. Suisse.* 10(44): 764-768.
- Inzucchi, S.E. (2004). Understanding hypercalcemia. Its metabolic basis, signs, and symptoms. *Postgrad. Med.* 115(4): 69-70, 73-6.

-J-

- Jaïdane, H., Goffard, A., Gharbi, J., Hober, D. (2008). Vers une meilleure compréhension de la relation entre entérovirus et diabète de type 1. *Virologie* 12(3): 187-200.
- James, C. F., Joseph, R. P., Mitchell, D. K. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev.* 68(3): 133–147.

- James, C. F., Ryan, D. S. (2010). Molecular Mechanisms for Regulation of Intestinal Calcium Absorption by Vitamin D and Other Factors. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 47(4): 181–195.
- Jamshid, G.,G., Karamouz, H., Agdam, H., Shahriar, H., Zadeh, A.,N., Rahim, B., Nima, K. (2011). Effect of Inorganic Zinc Supplement on Activity of Alkaline Phosphatase Enzyme as an Index of Mucosal Functional in Small Intestine of Male Broilers. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 11(5):622-625.
- Jaya, D., Umesh, V., Karamjeet, R. S., Anil, K. B. (2009). Role of insulin as a growth promoter in regulating the response of curcumin in human primary gingival fibroblasts: An in vitro study. *J. Indian Soc. Periodontol.* 13(3): 133-137.
- Jayawardena, R., Ranasinghe, P., Galappaththy ,P., Malkanthi, R.L.D.K, Constantine, G.R., and Katulanda, P. (2012). Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol. Metab. Syndr.* 4: 13.
- Jean-louis, B., Geneviève, D. (2011). Biochimie médicale marqueurs actuels et perspectives. 2eme édition lavoisier. p: 382.
- Jemaia, H., Messaoudib, I., Chaouchc A., Kerkeni, A. (2007). Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *J Trace Elem. Med. Biol.* 21(4): 269-273.
- Jeremy, F., Aliya, K. (2012). Hypocalcémie. *Can Fam Physician.* 58(2): 92-97.
- Jiang, Z., Qingjiang, W., Xiaoyan, H., Xingyou, D., Liang, W., Qian, L., Zhou, L., Longkun, L. (2016). Comparative study of serum zinc concentrations in benign and malignant prostate disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 6: 25778.
- Jonathan, H., Freedman, M.R.C., Jack, P. (1989). The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity. *J. Biol. Chem.* 264(10): 5598-5605.
- Jondreville, C., Revy, P.S., Jaffrezic, A., Dourmad, J.Y. (2002). Le cuivre dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel, facteur de croissance et risque potentiel pour l'Homme et l'environnement. *INRA Production Animale* 15: 247-265.

-K-

- Kahn, C.R., Folli F. (1993). Molecular determinants of insulin action, *Horm. Res.* 39(9): 93-101.

- Kahn, S.E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 46: 3-19.
- Kaku, K. (2010). Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *J.M.A.J.* 53(1): 41-46.
- Kambe, T., Hashimoto A., Fujimoto, S. (2014). Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 71(17):3281-95.
- Kandaz, M., Ertekin, M.V., Erdemci, B., Kızıltunç, A., Koçer, I., Özmen, H. K., Aktan, M. I., Vildan, A. B.(2009). The Effects of Zinc Sulfate on the Levels of Some Elements and Oxidative Stress Occurring in Lenses of Rats Exposed to Total Cranium Radiotherapy. *Eurasian J.Med.* 41(2): 110–115.
- Kanevets, U., Sharma, K., Dresser, K., Shi, Y. (2009). Role of IgM antibodies in monosodium urate crystal formation and associated adjuvanticity. *The Journal of Immunology* 182(4): 1912-1918.
- Kaplan, L.A. (1984). Urea. *Clin. Chem.* 1257-1260.
- Kaplan, L.A. et al. (1984). Lipids. *Clin. Chem.* 918-919.
- Kathryn, A., Bauerly, S., Kelleher, L., Bo Lönnerdal. (2005). Effects of copper supplementation on copper absorption, tissue distribution, and copper transporter expression in an infant rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 288: 1007-1014.
- Katleen, L., Fabrice, C., Frans, S. (2012). Zinc transporters and their role in the pancreatic β -cell. *J. Diabetes Investig.* 3(3): 202-211.
- Kechrid, Z., EL-Hadjla, D., Naima, L. (2007). The beneficial effect of vitamin E supplementation on zinc status, carbohydrate metabolism, transaminases and alkaline phosphatase activities in alloxan-diabetic rats fed on zinc deficiency diet. *Int. J. Diabetes Metab.* 15:46-50.
- Kechrid, Z., Hamdi, M., Nazıroğlu, M., Flores-Arce, M. (2012). Vitamin D supplementation modulates blood and tissue zinc, liver glutathione and blood biochemical parameters in diabetic rats fed on a zinc-deficient diet. *Biol. Trace Elem. Res.* 148: 371–377.
- Kenji, T., Fumiaki, I. (2011). Receptor Tyrosine Kinases and Targeted Cancer Therapeutics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34(12): 1774-1780

- Kenner, K.A, Anyanwu, E., Olefsky, J.M., Kusari, J. (1996). Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J. Biol. Chem.* 271:19810-19816.
- Kimura,T., Kambe, T.(2016). The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 17:336-358.
- Kindermann, B., Doring, F., Budczies, J., Daniel, H. (2005). Zinc-sensitive genes as potential new target genes of the metal transcription factor-1 (MTF-1). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 83: 221-229.
- Kira, G., Slepchenko, C.B., James, L., Yang, V.L. (2013). Inhibitory effect of zinc on glucose-stimulated zinc/insulin secretion in an insulin-secreting β -cell line. *Exp. Physiol.* 98(8): 1301-1311.
- Kirchgessner, M., Kreuzer, M., Roth, F.X. (1994). Age and sex dependent variation in the content of Fe, Zn, Cu and Mn in different body parts and their retention in fattening pigs. *Arch. Tierernahr.* 46: 327-37.
- Kodama, H., Murata, Y., Kobayashi, M. (1999). Clinical manifestations and treatment of Menkes disease and its variants. *Pediatr. Int.* 41: 423-9.
- Kolenko, V.M., Uzzo, R.G., Dulin, N., Hauzman, E., Bukowski, R., Finke, J.H. (2001). Mechanism of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes. *Apoptosis* 6: 419-429.
- Korshunov, S.S. Skulachev, V.P., Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters* 416: 15-18.
- Krebs, N.F. (2000). Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 130: 1374-1377.
- Kumar, N., Butz, J., Burritt, M. (2007). Clinical significance of the laboratory determination of low serum copper in adults. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45: 1402-1410.
- Kuo, Y.M., Zhou B., Cosco D., Gitschier, J. (2001). The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6836-6841.

-ℒ-

- Labarthe, M.C. (2005). Nutrition pratique. Toulouse: *Groupe liaisons*. P: 117.
- Lacolley, P. (2007). Biologie Et Pathologie Du Cœur Et Des Vaisseaux. Paris: *John Libbey Eurotext*: p: 677.
- Lagente; M. (2000). Métabolisme phosphocalcique. In Valdiguié P. Biochimie clinique. (2^{ème} éd). Paris : *Tec & DocLavoisier*. pp: 61-98.
- Lambert-Lagace, L. (2004). Ménopause: nutrition et santé. Les éditions de l'homme. Québec. P:206.
- Lederder, J. (1985). Encyclopédie moderne de l'hygiène alimentaire. Tome 1. 3^{ème} éd. Paris: Maloine. p: 202.
- Lemoine, A. (2003). Les vitamines : rôles nutritionnels chez l'homme. In BOURGEOIS C. Les vitamines dans les industries agro-alimentaires. Paris : *Tec & Doc - Lavoisier*. pp: 147-164 .
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2): 216–226.
- Lenzen, S., Panen, V. (1988). Alloxan: History and mechanism of action. *Diabetologia* 31: 337-342.
- Lévêque, E., Haye, B., Belarbi, A. (2000). L'amidon et ces dérivés applications industrielles, éditions Lavoisier, pp: 17- 35.
- Levin, G., Cogan, U., Mokady, S. (1992). Food restriction and membrane fluidity. *Mech. Ageing. Dev.* 62: 137-141.
- Linder, M.C., Lomeli, N.A, Donley, S., Mehrbod, F., Cerveza, P., Cottopn, S., Wotten, L. (1999). Copper transport in mammals. *Advances in experimental medicine and biology* 448: 1-16.
- Lisa, M., Gaetkea, C.K.C. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 189(1-2): 147-163.
- Lisbeth, B., Anne, S. M., Søren, K. R. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Zhejiang Univ. Sci. B.* 9(3): 165–191.

- Liuzzi, J.P., Cousins, R.J. (2004). Mammalian zinc transporters. *Ann. Rev. Nutr.* 24: 151-172.
- Lönnerdal, B. (2000). Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *J. Nutr.* 130(5): 1378S-1383S.

-M-

- Ma, J., Betts, N.M. (2000). Zinc and copper intakes and their major food sources for older adults in 1994-1996 continuing survey of food intakes by individuals (CSFII). *J. Nutr.* 130: 2838-2843.
- Mace, G.B., Shannon, A. (2000). Calcium control of zinc uptake in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 50: 257-264.
- Madubunyi, I., Onoja S., Asuzu, I. (2012). In vitro antioxidant and in vivo antidiabetic potential of the methanol extract of *Ficus glumosa* Del (Moraceae) stem bark in alloxan-induced diabetic mice. *Comp. Clin. Path.* 21(4): 389-394.
- Magnan, C., Ktorza, A. (2005). Production and secretion of insulin by the pancreatic β -cell. *EMC-Endocrinologie Elsevier* 2: 241-264.
- Maret, W. (1994). Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 237-41.
- Maret, W. (1995). Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochem. Int.* 27: 111-117.
- Marwaha, R.K., Garg, M.K., Tandon, N., Kanwar, R., Narang, A., Sastry, A., Saberwal, A., Bhadra, K. (2013). Glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) & tissue transglutaminase (anti-TTG) antibodies in patients with thyroid autoimmunity. *Indian J. Med. Res.* 137(1): 82-6.
- Masayoshi, U., Toshimasa, s., Hiroyuki, S., Takashi, O., Toshio, K., Tamami, M., Hiroki, T., Keiji, Y., Jun, I., Midori, M. and Shuh, N. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 990-994.
- Matthias, K.D., Georg, E. (1996). Schulz Catalytic Mechanism of the Metal-dependent Fuculose Aldolase from *Escherichia coli* as Derived from the Structure. *J. Mol. Biol.* 259:458-466.

- Maynard, A.T., Covell, D.G. (2001). Reactivity of zinc finger cores: analysis of protein packing and electrostatic screening. *J. Am. Chem. Soc.* 123(6): 1047-58.
- McCormick, C.C. (2002). Passive diffusion does not play a major role in the absorption of dietary calcium in normal adults. *J. Nutr.* 132: 3428-3430.
- McLetchie, N.G.B. (2002). Alloxan diabetes: A discovery, albeit a minor one. *R. Coll. Physicians Edinb.* 32: 134-142.
- Medart, J. (2009). Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative. Belgique: Boeck. P: 314.
- Medjdoub, H., Selles, C., Tabti, B.(2013). Medicinal plants: a methodology for studying their anti-diabetic activity. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences* 3(4): 169-178.
- Melloul, D., Marshak, S., Cerasi, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia.* 45(3): 309-326.
- Miguel, A., Marco, T.N. (2005). Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* 26: 313-327.
- Miguel, A., Ronny, M., Marco, T. Núñez, M. R., Manuel, O. (2006). Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc Biol. Res. 39: 95-102.
- Miller, L.V., Krebs, N.F., Hambidge, K.M. (2007). A mathematical model of zinc absorption in humans as a function of dietary zinc and phytate. *J. Nutr.* 137: 135-141.
- Min, L., Lu-Jun, S. and Xin-Yu, Q. (2014). Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J. Cell. Mol. Med.* 18(5): 749–758.
- Modan, M., Halkin, H., Karasik, A., Lusky, A. (1987). Elevated serum uric acid-a facet of hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 75(3):713-8.
- Moller, L.B., Carsten, P.B., Connie, L.A., Horn, N. (2000). Characterization of the hCTR1 gene: genomic organization, functional expression, and identification of a highly homologous processed gene. *Gene.* 257(1) : 13-22.
- Moller, N., Nair, K.S. (2008). Diabetes and protein metabolism. *Diabetes. American Diabetes Association* 57(1): 3-4.
- Molnar, J. A., Underdown, M. J., Clark, W., A.(2014). Nutrition and Chronic Wounds. *Adv. Wound Care* 3(11): 663–681.

- Mootz, D., Jeffrey, G.A. (1965). The crystal structure of 5,5-dihydroxybarbituric acid trihydrate. *Acta Cryst.* 19: 717- 725.
- Morrison, J. A., Friedman, L. A., Wang , P., Glueck, C. J.(2008). Metabolic Syndrome in Childhood Predicts Adult Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus 25 to 30 Years Later. *The Journal of Pediatric* 152(2): 201–206.
- Moussard, C. (2006). Biochimie structurale et métabolique. Belgique: *Boeck*,. P: 368.
- Mundy, G.R., Martin, T.J. (1993). Physiology and pharmacology of bone. Handbook of experimental pharmacology. Berlin: *Springer-verlag*. P: 762.
- Munro, P. (2010). Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5(1): 23-30.
- Murray, R.L (1984). Alanine aminotransferase. *Clin chem.* The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1088-1090.
- Murray, R.L (1984). Aspartate aminotransferase..*Clin chem.* The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1112-1116.
- Murray, R.L. (1984). Creatinine. *Clin. Chem.* 1261-1266 et 418.

-N-

- Naito, H.K. (1984). Cholesterol. *Clin. chem.* 1194-11206 et 437.
- Nathan, D.M. (2007). Finding new treatments for diabetes – how many, how fast how good N. Engl. J. Med. 356(5): 437–440.
- Nauck, M. (2016). Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism: A Journal of Pharmacology and Therapeutics* 18(3): 203–216.
- Nävert, B., Sandström, B., Cederblad, Å. (1985). Reduction of the phytate content of bran by leavening in bread and its effect on absorption of zinc in man. *Bri. J. Nutr.* 53:47-53.
- Nazıroğlu, M., Yürekli, V.A. (2013). Effects of antiepileptic drugs on antioxidant and oxidant molecular pathways: focus on trace elements. *Cell Mol. Neurobiol.* 33:589-599.

- Nazanin, R., Richard, H., Roya, K. and Rainer, S. (2013). Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J. Res. Med. Sci.* 18(2): 144–157.
- Nelson, R.L, Tanure, J.C., Andrianopoulos, G. (1987). The effect of dietary milk and calcium on experimental colorectal carcinogenesis. *Dis. Colon. Rectum.* 30: 947.
- Newsome, D.A., Swartz, M., Leone, N.C., Elston, R.C., Miller, E., (1988). Oral zinc in macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 106:192–198.
- Nicolai, M. D., Qing L., Changhong, L., Jie, C., Pan, C., Chengyang, L., David, W. F., Joseph, A. B., Michael, J. B., Ali N.(2015). Accumulation of 3-hydroxytetradecenoic acid: Cause or corollary of glucolipotoxic impairment of pancreatic β -cell bioenergetics. *Molecular Metabolism. Elsevier* 4(12): 926-939.
- Nisa; M. Maruthur, J.M. Clark, M.F, W.H. Linda K., Alan, R. (2015). Shuldiner. Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish. *Diabetologia* 58(2): 295-303.
- Noonan, C.W., Kathman, S.J., Sarasua, S.M., White, M.C. (2003). Influence of environmental zinc on the association between environmental and biological measures of lead in children. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 13:318–23.

-O-

- Organisation mondiale de la Santé. (2016). Rapport mondial sur le diabète, Genève.
- Osman, E. (2004). Correlation of serum Cu , zn, Mg, and HbA1c in type 2 and type 1 diabetes Millitus. *Turk J Endocrinol. Metab.* 2: 75-79.
- Osredkar, J., Sustar, N. (2011). Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *Clinic. Toxicol.* 3: 1-18.
- Ozougwu, J.C., Obimba, K.C., Belonwu, C.D., Unakalamba, C.B.(2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 4(4): 46-57.

-P-

- Pari, L., Latha, M. (2005). Antidiabetic effect of Scopariadulcis: Effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. *Gen. Physiol. Biophys.* 24(1): 13-26.
- Parikh, S.J., Yanovski, J.A. (2003). Calcium intake and adiposity. *Am. J. Clin. Nutr.* 77(2): 281-7.
- Park, H. Kim, C.W. Kim, S.S., Park, C.W. (2009). The therapeutic effect and the changed serum zinc level after zinc supplementation in alopecia areata patients who had a low serum zinc level. *Ann. Dermatol.* 21(2): 142-6.
- Parkin, G. (2004). Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. *Chem. Rev.* 104(2): 699-767.
- Parks, D., Bolinger, R., Mann, K. (1997). Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic acids research* 25: 1289-1295.
- Parvaneh, N.,A., Parichehr, H., Shokofeh, G. (2009). Effect of Zinc Supplement on the Upper and Lower Trunk Strength on Athletics Women. *Res. J. Int. Stud.* 9: 59-64
- Pascale, P., Richard, H. (2000). Dermatoses d'origine nutritionnelle et apport de la diététique en dermatologie. *Nutrition Encyclopédie de Clinique Canine*. P: 65.
- Patricia, I.O.(2012). Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* 53(9): 1748–1759.
- Pesce, A. (1984). Lactate dehydrogenase. *Clin. Chem.* 1117-1124, 438.
- Pierre, A. (2000). Les médicaments. 3^{ème} éd. Broché . p: 33.
- Pillai, A., Gupta, S. (2005). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: effects of vitamin E and Mn²⁺. *Free radical research*. 39: 707-12.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini ,E., Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27(50): 6407–6418.
- Poortmans, J.R., Boisseau, N. (2009). Biochimie des activités physiques et sportives. Belgique: Boeck. P: 592.

- Portnoy, M.E., Rogers, R.S., Culottam V.C. (2001). Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces*. *Mol Genet Genomics*. 265: 873-882.
- Potemkine, V. (1989). Endocrinologie. Paris: *Mir Mouscou*. P: 383.
- Potts, J.T.J. (1998). Diseases of the parathyroid gland and other hyper and hypocacalcemic disorders. In: Harrison TR, Ed. Principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill. pp: 2227-2247.
- Powell, S.R.. (2000). The Antioxidant Properties of Zinc. *J. Nutr*. 130(5): 1447-1454.
- Powers, S.K., Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev*. 88: 1243-1276.
- Prasad, A.B., F.W. Endre, L., Handschu, W., Kukuruga, M., Kamar, G. (1996). Zinc deficiency affects cell cycle and deoxythymidine kinase gene expression in HUT-78 cells. *J. Clin. Med*. 128: 51-60.
- Prasad, A.S. (1993). Clinical spectrum of human zinc deficiency. In: Prasad AS, editor. Biochemistry of zinc. New York: *Plenum Press*. pp: 219–258.
- Prasad, A.S. (2008). Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental Gerontology* 43: 370-377.
- Prasad, A.S., Bao, B., Beck, F.W., Kucuk, O., Sarkar, F.H. (2004). Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic. Biol. Med*. 37: 1182-1190.
- Priyanga, R., Shehani, P., Priyadarshani, G., Prasad, K., Godwin, R., Constantine. (2015). Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. *DARU J. Pharm. Sci*. 23:44.
- Prost, A.L., Bloc, A., Hussy, N., Derand, R., Vivaudou, M. (2004). Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of KATP channel function. *J. Physiol*. 559, 157-67.
- Pugliese, A., Eisenbarth, G.S. (2004). Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance. *Adv. Exp. Med. Biol*. 552: 170-203.
- Puig, S., Thiele, D.J. (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 6(2) : 171-180.

-Q-

Quamme, G.A. (1982). Effect of hypercalcemia on renal tubular handling of calcium and magnesium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1275-1280.

-R-

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

Rahman, Z., Faiza, B., Ali, M.A. (2001). Effects of Copper Supplement on Haematological Profiles and Broiler Meat Composition. *Int. Agric. Biol.* 3: 203-205.

Rajkumar, L., Govindarajulu, P. (1991). Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 29:1081-1083.

Raschke, M., Jahreis, G. (2002). The influence of calcium supplement s on the metabolism of calcium and other minerals. *Focus on nutrition* 2(5): 110-113.

Raverot, G. (2005). Diabète sucré de types 1 et 2 de l'enfant et de l'adulte. Paris: *Hippocrate* pp: 6-20.

Reddy, M.C., Majumdar, S., Harris, E.D. (2000). Evidence for a Menkes-like protein with a nuclear targeting sequence. *Biochem. J.* 350:855-863.

Reinhard, I., Maya, R., Peter, E.B. (2010). Zinc un oligoélément vital à grand potentiel. *Forum Med. Suisse*. 10(44): 764-768.

Reinhardt, T.A., Horst, R.L., Goff, J.P. (1988). Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 4(2): 331-50.

Reiterer, G., MacDonald, R., Browning, J.D., Morrow, J., Matveev, S.V., Daugherty, A., Smart, E., Toborek, M., Hennig, B. (2005). Zinc deficiency increases plasma lipids and atherosclerotic markers in LDL-receptor-deficient mice. *Nutr.* 135(9): 2114-2118.

Revy, P.S., Jondreville, C., Dourmad, J.Y., Nys, Y. (2003). Le zinc dans l'alimentation du porc : oligoélément essentiel et risque potentiel pour l'environnement. *INRA Prod. Anim.* 16(1): 3-18.

Rink, L., Gabriel, P. (2001). Extracellular and immunological actions of zinc. *Biometals* 14: 367-383.

- Robert, J.C. (2010). Gastrointestinal Factors Influencing Zinc Absorption and Homeostasis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 80: 243–248.
- Robertson, R.P., Jamiem, H., Phuong, O.T., Tran, Vincent, P. (2004). β -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 53(1): S119-S124.
- Rodier, M. (2001). Le diabetes de type1. *Med. Nucl.* 25: 95-101.
- Roger, F.B. (2010). Metal Toxicity, Liver Disease and Neurodegeneration. *Neurotoxicity Research* 18(1): 100–105.
- Rorsman, P., Braun M., Zhanga, Q. (2011). Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. *Cell. Calcium* 51(3-4): 300–308.
- Rosalki, S. (1993). Alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* 39 (4): 648-652.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 362: 59-62.
- Rotilio, G., Carri, M. T., Rossi, L., Ciriolo, M.R. (2000). Copper-dependent oxidative and Neurodegeneration. *IUBMB Life*. 50: 309–314.
- Ruasse, J.P. (2002). Les nouveaux choix alimentaires : pour plus de vitamines et minéraux dans moins de calories. Paris: *Iprédis*. P: 139.
- Rucker, R.B., Lönnerdal, B., Keen, C.L. (1994). Intestinal absorption of nutritionally important trace elements. In Physiology of the gastrointestinal tract . *LR Johnson*. pp: 2183-2202.
- Ruslan, T., John, F.E., Jack, H. K., Svetlana, L. (2002). Functional Properties of the Copper-transporting ATPase ATP7B (The Wilson's Disease Protein) Expressed in Insect Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 976-983.
- Rutter, GA. (2004). Visualising insulin secretion. The Minkowski lecture 2004. *Diabetologia* 47: 1861-72.

-S-

- Saka, S., Bahi, A., Aouacheri, W. (2011). The effect of oxidative stress induced by lead acetate on the glutathione enzymatic system in rats. *Ann. Toxicol. Anal.* 23(3): 139-145.

- Samanta, B., Ghosh, P., R., Biswas, A., and Das, S., K. (2011). The Effects of Copper Supplementation on the Performance and Hematological Parameters of Broiler Chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(7) : 1001 – 1006.
- Samsonov, (1973). The oxide handbook edited by G V. 1^{ème} éd. New York: *Plenum Press*. p: 183.
- Sandstead, H.H., Frederickson, C.J., Penland, J.G. (2000). History of zinc as related to brain function. *Nutr.* 130 (2): 496-502.
- Savchenko, A., Vielle, C., Kang, S., Zeikus, G.G. (2002). *Pyrococcus furiosus* α - amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry* 41: 6193-6201.
- Scanlon, V.C., Sanders, T. (2007). Essentials of anatomy and physiology. 5^{ème} éd. USA : *F.A. Davis Company*. P: 603.
- Schlienger, J.L. (2013). Type 2 diabetes complications. *Presse Med.* 42(5): 839- 848.
- Schultz, A. (1984). Uric acid. *Clin. Chem.* 1261-1266 et 418.
- Seok, M. S. (2012) . C-Peptide and Vascular Complications in Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Metab. J.* 36(5): 345–349.
- Shahidul, M.I., Loots, D.T. (2007). Diabetes, metallothionein and zinc interactions: a review. *Biofactors*. 29: 203-212.
- Sharon, M.M. (2008). Disorders Involving Calcium, Phosphorus, and Magnesium. *Prim Care*. 35(2): 215–221.
- Shawki, A., Mackenzie, B. (2010). Interaction of calcium with the human divalent metal-ion transporter-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 393(3): 471-475.
- Shils, M. Olson, J.A, Shike, M. (1998). Modern nutrition in health and disease. 9th ed. *Williams & Wilkins, Baltimore*. pp: 223-239.
- Shu-Ming, C., Jyh-Fei, L., Cheng-Deng K., Low-Tone H.(2004). Intestinal Absorption and Biliary Secretion of Zinc in Rats with Chronic Renal Failure. *Nephron Physiology* 96(4): 113-120 .
- Sidhu, P., Garg, M.L., Dhawan, D.K. (2004). Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats. *Nutr. Hosp.* 19(6): 341-347.
- Silbernagl, S., Despopoulos, A. (2001). Atlas de poche de physiologie. (3^{ème} éd). Paris Flammarion Médecine - Sciences. P: 436.

- Simon, D. (2008). Définition, dépistage et épidémiologie du diabète de type 2. Paris: Elsevier Masson SAS. P: 67.
- Simon, S.F., Taylor, C.G. (2001). Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 226: 43-51.
- Simonis-Bik, A.M.C., Eekhoff, E.M.W., de Moor, M.H.M., Kramer, M.H.H., Boomsma, D.I., Heine, R.J. (2010). Génétique du diabète de type 2 : comment évaluer l'héritabilité de la capacité sécrétoire de la cellule B. *Diabetologia* 2:11-12.
- Smith, W.H., Plumlee, M.P., Beeson, W.M. (1961). Zinc requirement of the growing pig fed isolated soybean protein semi-purified rations. *J. Anim. Sci.* 20: 128-132.
- Song, H.D., Hu, R.M., Peng, Y., Huang, Q.H. (2000). Study on the gene expression profiling in the normal human pituitary. *Chin. Endocrinol. Metab.* 16: 292-296.
- Songtao, L., Ying, L., Hua, N., Lixin, N., Yucun, N., Maoqing, W., Rennan, F., Liyan, L., Fuchuan, G., Shaoying, H., Xia, C., Yemei, W., Yunbo, Z., Huaqi, Z., Lina, H., Mingxin, B., Yifan, H., Liuyi, H., Yan, Z., Cheng, W., Yanwen, W., Yonghan, H., Changhao, S. (2013). Calcium supplementation increases circulating cholesterol by reducing its catabolism via GPER and TRPC1-dependent pathway in estrogen deficient women. *Int. J. Cardio.* 168(3): 2548–2560.
- Souberbielle, J.C., Friedlander, G., Cormier, C. (2006). Aspects pratiques des dosages de PTH. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 21(2): 110-118.
- Southon, S., Gee, J., Johnson, I.T. (1984). Hexose transport and mucosal morphology in the small intestine of the zinc-deficient rat. *Br. J. Nutr.* 52(2): 371-380.
- Southon, S., Kechrid, Z., Wright, A.J.A., Fairweather-Tait, S. (1988). Effect of reduced dietary zinc intake on carbohydrate and zinc metabolism in the genetically diabetic mouse (C57BL/KsJdb/db). *Br. J. Nutr.* 60: 499-507.
- Southon, S., Livesey, G., Gee, J.M., Johnson, I.T. (1985). Intestinal cellular proliferation and protein synthesis in zinc-deficient rats. *Brit. Nutr.* 53(3): 595-603.
- Spencer, H., Rubio, N., Kramer, L., Norris, C., Osis, D. 1987. Effect of zinc supplements on the intestinal absorption of calcium. *J. Am. Coll. Nutr.* 6(1): 47-51.
- Stephen, L. Aronoff, M.D, FACP, FACE; Kathy, B., Barb S. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum* 17 (3): 183-190.

- Stephens, J.W., Gable, D.R., Hurel, S.J., Miller, G.J., Cooper, J.A., Humphries, S.E. (2006). Stress and neurodegeneration. *I.U.B.M.B. life* 50: 309-314.
- Sturniolo, G.C., Mestriner, C., Irato, P., Albergoni, V., Longo, G. D’Inca, R. (1999). Zinc therapy increases duodenal concentrations of metallothionein and iron in Wilson’s disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 942: 334-338.
- Suhy, D.A., Simon, K.D., Linzer, D.I.H., O’Halloran, T.V. (1999). "Metallothionein is Part of a Zinc-Scavenging Mechanism for Cell Survival Under Conditions of Extreme Zinc Deprivation" *J. Bio. Chem.* 274: 9183-9192.
- Suki, W., Ekonoyan, G., Rector, F.J., Seldin, D. (1969).The renal diluting and concentration mechanism in hypercalcemia. *Nephron* 6: 50-61.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50(6): 537-546.

-T-

- Tamames, B., Sousa S.F., Tamames J., Fernandes P.A., Ramos M.J. (2007). Analysis of zinc-ligand bond lengths in metalloproteins: Trends and patterns. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 69 (3): 466-475.
- Tanaka, A., Kaneto, H., Miyatsuka, T., Yamamoto, K., Yoshiuchi, K., Yamasaki, Y., Shimomura, I., Matsuoka, T.A., Matsuhisa, M. (2009). Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. J.* 56(5):699-706.
- Tapiero, H., Tew, K.D. (2003).Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* 57: 399-411.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003) Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother.* 57(9): 386-398.
- Tingting, L., Quan, Z., Weixia, S., Ying, X., Zhiguo, Z., Yi, T., Shanshan, Z., Chi, Z., Lu, C., Xuemian, L., Mingliang, C. (2015). Zinc treatment prevents type 1 diabetes-induced hepatic oxidative damage, endoplasmic reticulum stress, and cell death, and even prevents possible steatohepatitis in the OVE26 mouse model: Important role of metallothionein. *Toxicol. Lett.* 233(2): 114–124.

- Tome, D., Bos, C., Mariotti, F., Gaudichon, C. (2002). Protein quality and FAO/WHO recommendations. *Sciences des aliments*. 22: 393-405.
- Tripp, B.C., Smith, K., Ferry, J.G. (2001). Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme. *J. Bio. Chem.* 276: 48615-48618.
- Trocelloa, J.M., Chappuisb, P., El bakhia, S., Pouponc, C.J., Leyendeckera, A., Chaine A.P., Woimanta F. (2010). Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. *La Revue de medecine interne*. 31(11) : 750-756.
- Tzagoloff, A., Nobrega, M., Gorman, N., Sinclair, P. (1993). On the functions of the yeast COX10 and COX11 gene products. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31: 593-598.
- V-
- Valdiguie, P. (2000). Biochimie clinique. 2^{ème} éd. U.E , France. P: 355.
- Vallee, B.L., Auld, D.S. (1993). Zinc: biological function and coordination motifs. *Acc. Chem. Res.* 26: 543-551.
- Vallee, B.L., Auld, D.S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29(24): 5647-5659.
- Vassiliev, V., Haitis, Z.L., Zatta, P. (2005). Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 49(3): 633-640.
- Vats, V., Yadav, S.P., Grover, J.K. (2004). Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J. Ethnopharmacol.* 90(1): 155-60.
- Velloso, C.P. (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-1. *Br J Pharmacol.* 154: 557-568.
- Vidović, B., Đorđević, B., Milovanović, S., Škrivanj, S., Pavlović, Z., Stefanović, A., Kotur-Stevuljević, J. (2013). Selenium, Zinc, and Copper Plasma Levels in Patients with Schizophrenia: Relationship with Metabolic Risk Factors. *Biol. Trace Elem. Res.* 156(1-3): 22-28.
- Voet, D., Voet, J.G. (2005). Biochimie. Espagne: Boeck . p: 1600.

-W-

- Walker, J.M., Huster, D., Ralle, M., Morgan, C.T., Blackburn, N.J., Lutsenko, S. (2004). The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilsons disease protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1. *J. Biol. Chem.* 279:15376-15384.
- Wang, Q. (2008). L'insulinorésistance due à la dysfonction des cellules béta contribue à l'apparition du diabète. *Hôpital St. Michael.* 8(5): 1-5.
- Wang, Y., Thiele, C., Huttner, W.B. (2000). Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic.* 1(9): 952-962.
- Wardman, P., Candeias, L.P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res.* 145(5): 523-531.
- Weckbeker, G., Cory, J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathoine-depleted mous leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters.* 40: 257-264.
- Whelton, A., Watson, A.J., Rock, R.L. (1994). Nitrogen Metabolites and Renal Function, Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Burtis, C.A. and Ashwood E.R. ed., W.B. Saunders Co. pp: 1513-1575.
- Wilfried, S., Olivier, P., Laurent, M., Marina, C., Jean-Marc, P., Sélim, A. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19(1): 177-183.
- William, F.G. (2001). Review of Medical Physiology. 20^{ème} éd. *Appleton & Lange.* P: 870.
- William, L.A., Jeffrey, M.L., Glen, C.S., George, L.F., Patrick, W.B., James W.S. (1999). Influence of diet on hematology and serum zinc intoxication in mallard. Center for Wild life Ecology, *Illinois Natural History Survey.* pp: 38-47.
- Williams, A.R., Mills, C.E. (1970). The experimental production of zinc deficiency in the rats. *Brit. Nutr.* 24: 989-1003.
- Williams, G., Cai, X.J., Elliott, J.C., Harold, J.A. (2004). Anabolic neuropeptides. *Physiol. Behav.* 81: 211-222.
- Willianne, I.M., Prim De Bie, V., Catharina, G.K., Wichers Peter, V.E., Berghe, V.D., Van Der Plaats, R., Berger, R., Wijmenga, C., Leo, W.J., Klomp. (2012). The copper-transporting capacity of ATP7A mutants associated with Menkes disease is ameliorated by

- COMMD1 as a result of improved protein expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 149-163.
- Windisch, W. (2003). Development of zinc deficiency in ⁶⁵Zn labelled, fully grown rats as a model for adults individuals. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 17(2): 91-96.
- Winge, D.R. (1991). Copper coordination in metallothionein. *Methods Enzymol.* 205:458-469.
- Winge, D.R., Mehra, R.K. (1990) . Host defenses against copper toxicity. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 31:47-83.
- Wise, A., Gilbert, D.J. (1982). In vitro competition between calcium phytate and the soluble fraction of rat small intestine contents for cadmium, copper and zinc. *Toxicology Letters ELSEVIER* 11(1-2): 49-54.
- Woo, M. (2004). Nouveaux avancements dans le diabète de type 1: Espoirs pour l'avenir. *Endocrinologie* 4(3): 1-6.
- Wutzke, K.D., Lorenz, H. (2004). The Effect of l-Carnitine on Fat Oxidation, Protein Turnover, and Body Composition in Slightly Overweight Subjects *Metabolism*,. 53(8): 1002-1006.

-Y-

- Yang, M.S., Lai, K.P., Cheng, K.Y., Wong, C.K. (2000). Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after administration of a single sublethal dose of CdCl₂. *Toxicology.* 154(1-3): 103-111.
- Ying, F.A (1998). Amylase measurement with 2-chloro-4 nitrophenyl maltotrioxide as substrate. *Clin. Chim.* 272: 137-147.
- Yu, Y., Lu, L., Luo, X.G., Liu, B. (2008). Kinetics of zinc absorption by in situ ligated intestinal loops of broilers involved in zinc transporters. *Poultry Science* 87: 1146-1155.

-Z-

- Zalewski, P.D., Millard, S.H., Forbes, I.J., Kapaniris, O., Slavotinek, A., Betts, W.H., Ward, A.D, Lincoln, S.F., Mahadevan, I. (1994). Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *Histochem. Cytochem.* 42: 877-884.
- Zeynep ,T., Lisbeth B.M. (2010). Menkes disease . *Eur J Hum Genet.* 18(5): 511–518..

- Zhang, F., Xu, Z., Gao, J., Xu, B., Deng, Y. (2008). In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26: 232-236.
- Zhang, S.S., Noordin, M.M., Rahman, S.O., Haron, J.(2000). Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet. Hum. Toxicol.* 42(5):261-264.
- Zheng, Y., Xiaohang, C., Alexander, B., T., Hart, P. J. and Rodney, L. L. (2010). Characterization of a Covalent Polysulfane Bridge in Copper–Zinc Superoxide Dismutase. *Biochemistry* 49 (6): 1191–1198.
- Zhuo F., Elizabeth, R.G., Dongmin, L. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 9(1): 25-53.

Annexes

1. Fiches techniques « Spinreact » pour le dosage des paramètres biochimiques et des enzymes sériques

1.1. Dosage des triglycérides

- Echantillon : **Sérum**

1.1.1. Réactifs utilisés

Réactif (R1)	GOOD pH 7.5	50 mmol/l
Tampon	P-Chlorophenol	2 mmol /l
Réactif (R2) (enzymes)	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/l
	Glycérol kinase (GK)	500 U/l
	Glycérol-3-oxidase (GPO)	2500 U/l
	Peroxydase (POD)	440 U/l
	4-Aminophénazone (4-AP)	0.1 mmol/l
	ATP	0.1 mmol/l
Etalon	Triglycéride aqueux primaire (standard)	200 mg/dl

- Réactif de travail: dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement. Ce réactif (RT) est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à 15-25°C.

1.1.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (RT) (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	—	10	—
Echantillon (µl)	—	—	10

- Mélanger et incubé les tubes pendant 5 min à 37°C ou 10 min à 15-25°C. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

1.1.3. Calcul de la concentration

La concentration des triglycérides dans l'échantillon est calculée par la formule suivante :

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (200mg/dl)}$$

1.2. Dosage du cholestérol

- Echantillon : **Sérum**

1.2.1. Réactifs utilisés

Réactif (R1)	Pipes pH 6.9	90 mmol /l
Tampon	Phénol	26 mmol /l
Réactif (R2) (enzymes)	Cholestérol estérase.	300 U/l
	Cholestérol oxydase.	300 U/l
	Peroxydase.	1250 U/l
	4-Aminophénasone (4-AP)	0.4 mmol/l
Etalon	Cholestérol aqueux primaire (standard).	200 mg/dl

- Réactif de travail : dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement. Ce réactif (RT) est stable pendant 4 mois à 2-8 °C ou 40 jours à 15-25 °C.

1.2.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (RT) (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	—	10	—
Echantillon (µl)	—	—	10

- Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à 15-25°C. Lire la densité optique de l'échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm.
La coloration finale est stable au moins 60 minutes.

1.2.3. Calcul de la concentration

La concentration du cholestérol dans l'échantillon est calculée par la formule suivante :

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (200mg/dl)}$$

1.3. Dosage des protéines totales

- Echantillon : **Sérum**

1.3.1. Réactifs utilisés

Réactif (R)	Tartrate de potassium sodium	15 mmol /l
	Iodure de sodium	100 mmol/l
	Iodure de potassium	5mmol/l
	Sulfate de cuivre	19 mmol/l
Etalon	Sérum Bovin Albumine	7 g/dl

1.3.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (R) (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	—	25	—
Echantillon (µl)	—	—	25

- Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à 15-25°C. Lire les densités optiques des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 540 nm. La couleur est stable pendant 30 min.

1.3.3. Calcul de la concentration

La concentration des protéines totales dans l'échantillon est calculée par la formule suivante :

$$\text{Protéine totale (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (7g/dl)}$$

1.4. Dosage d'urée

- Echantillon : **Sérum**

1.4.1. Réactifs utilisés

Réactif (R1)	Phosphate pH 6.7	50 mmol /l
Tampon	EDTA	2 mmol /l
	Salicylate de sodium	400 mmol/l
	Nitroprusside de sodium	10 mmol/l
Réactif (R2)	Hypochlorite de sodium (NaClO)	140 mmol/l
NaClO	Hydroxyde de sodium	150 mmol/l
Réactif (R3) (enzymes)	Uréease	30000 U/l
Etalon	Urée aqueux primaire (standard)	50 mg/dl

- Réactif de travail : Dissoudre un comprimé de R3 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif (RT) est stable pendant 4 semaines à 2-8 °C ou 7 jours à 15-25 °C.

1.4.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (RT) (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	—	10	—
Echantillon (µl)	—	—	10

- Mélanger et incuber 5 minutes à 37°C.

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (R2) (ml)	1.0	1.0	1.0

Mélanger et incuber 5 minutes à 37°C . Lire les densités optiques contre le blanc à 580 nm. La coloration est stable pendant 30 minutes.

1.4.3. Calcul de la concentration

La concentration de l'urée est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{Concentration de l'étalon (50 mg/dl)}$$

1.5. Dosage de créatinine

- Echantillon : **Sérum**

1.5.1. Réactifs utilisés

Réactif (R1)	Acide picrique	17.5 mmol/l
Réactif (R2)	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/l
Etalon	Créatinine aqueux (solution)	2 mg/dl

- Réactif de travail : dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement. Ce réactif (RT) est stable pendant 10 jours à 15-25 °C.

1.5.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (RT) (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	—	100	—
Echantillon (µl)	—	—	100

- Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (DO₁) après 30 secondes et la densité optique (DO₂) après 90 secondes.

1.5.3. Calcul de la concentration

La concentration de la créatinine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{DO}_{\text{échantillon}} - \Delta \text{DO}_{\text{blanc}}}{\Delta \text{DO}_{\text{étalon}} - \Delta \text{DO}_{\text{blanc}}} \times \text{Concentration de l'étalon (2 mg/dl)}$$

$$\Delta \text{DO} = (\text{DO}_2 - \text{DO}_1)$$

1.6. Dosage d'acide urique

- Echantillon : **Sérum**

1.6.1. Réactifs utilisés

Réactif (R1)	Phosphate pH 7.4	50 mmol /l
(Tampon)	2-4 Dichlorophenol sulfonate (DCPS)	4 mmol/l
Réactif (R2)	Uricase	60 U/l
(Enzymes)	Peroxydase(POD)	660 U/l
	Ascorbate oxydase	200 U/l
	4-Aminophenaseone (4-AP)	1 mmol/l
Etalon	Acide urique aqueux	6 mg/dl

- Réactif de travail : Mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2. Ce réactif (RT) est stable pendant un mois à 2-8 °C ou 10 jours à 15-25 °C.

1.6.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (RT) (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	—	25	—
Echantillon (µl)	—	—	25

- Mélanger et incubé les tubes pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à 15-25°C. Lire les densités optiques des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 520 nm. La couleur est stable pendant 30 min.

1.6.3. Calcul de la concentration

La concentration de l'acide urique est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{étalon}}} \times \text{Concentration de l'étalon (6 mg/dl)}$$

1.7. Dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase ASAT (TGO)

- Echantillon : **Sérum**

1.7.1. Réactifs utilisés

Réactif (R ₁) (Tampon)	Tris pH 7.8	80 mmol/l
	L-Aspartate	200 mmol/l
Réactif (R ₂) (substrat)	NADH	0.18 mmol/l
	Lactate déhydrogenase (LDH)	800 U/l
	Malate déhydrogenase (MDH)	600 U/l
	α -cétoglutarate	12 mmol/l

- Réactif de travail (RT) : Dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

1.7.2. Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (µl)	100

- Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 340 l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ DO/min) pour l'utiliser dans les calculs.

1.7.3. Calcul de l'activité

L'activité enzymatique d'aspartate aminotransférase est calculée par la formule suivante:

$$\text{ASAT (UI/L)} = \Delta \text{DO/min} \times 1750$$

1.8. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (ALAT)

- Echantillon : **Sérum**

1.8.1. Réactifs utilisés

R1 Tampon	Tris pH 7.8	100 mmol/l
	L- alanine	500 mmol/l
R2 Substrat	NADH	0.18 mmol/l
	Lactate déhydrogenase (LDH)	1200 U/l
	Oxoglutarate	15 mmol/l

- Réactif de travail (RT) : Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1. Ce réactif est stable pendant 2 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

1.8.2. Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (µl)	100

- Mélanger, incuber pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance initiale à 340 nm. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ DO/min) pour l'utiliser dans les calculs.

1.8.3. Calcul de l'activité

L'activité enzymatique d'alanine aminotransférase est calculée par la formule suivante :

$$\text{ALAT (UI/L)} = \Delta \text{DO/min} \times 1750$$

1.9. Dosage de l'activité de phosphatase alcaline (ALP)

- Echantillon : **Sérum**

1.9.1. Réactifs utilisés

Réactif (R1)	Diethanolamine (DEA) pH 10.4	1 mmol /l
(Tampon)	Chlorure de magnésium	0.5 mmol /l
Réactif (R2)	P-nitrophényl-phosphate (pNPP)	10 mmol/l
(Substrat)		

- Réactif de travail (RT): Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

Ce réactif (RT) est stable pendant 21 jours à 2-8 °C ou 5 jours à 15-25 °C.

1.9.2. Mode opératoire

Réactif (RT) (ml)	1.2
Echantillon (µl)	20

- Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405 nm l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ DO/min) pour l'utiliser dans les calculs.

1.9.3. Calcul de l'activité

Pour calculer l'activité enzymatique de PAL, on utilise la formule suivante :

$$\text{PAL (UI/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3300$$

1.10. Dosage de l'activité de lactate déshydrogénase (LDH)

- Echantillon : **Sérum**

1.10.1. Réactifs utilisés

Réactif (R1) (Tampon)	Pyruvate	0.6 mmol /l
	Imidazole	65 mmol /l
Réactif (R2) (Substrat)	NADH	0.18 mmol/l

- Réactif de travail (RT): Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1. Ce réactif est stable pendant 2 jours à 2-8°C ou 12 heures à 15-25 °C.

1.10.2. Mode opératoire

	25-30°C
Réactif (RT) (ml)	3.0
Echantillon (µl)	100

- Mélanger, et incuber pendant une minute. Lire à 340 nm l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ DO/min) pour l'utiliser dans les calculs.

1.10.3. Calcul de l'activité

Pour calculer l'activité enzymatique de LDH, on utilise la formule suivante :

$$\text{LDH (UI/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 4925$$

1.11. Dosage de l'activité de l' α -amylase

- Echantillon : **Sérum**

1.11.1. Réactifs utilisés

Réactif (R)	Tampon MES pH 6.0	100 mmol /l
	CNPG ₃	2.25 mmol/l
	Chloride de Sodium (NaCl)	350 mmol /l
	Acétate de calcium	6 mmol/l
	Thiocyanate de Potassium	900 mmol/l
	Azoture de sodium	0.95 gr/l

1.11.2. Mode opératoire

Réactif (R) (ml)	1.0
Echantillon (µl)	20

- Mélanger, incuber pendant une minute à 37°C. Lire à 405 nm l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes ($\Delta DO/min$) pour l'utiliser dans les calculs.

1.11.3. Calcul de l'activité

Pour calculer l'activité enzymatique de l' α -amylase, on utilise la formule suivante :

$$\alpha\text{-amylase (UI/L)} = \Delta DO/min \times 3954$$

1.12. Dosage de l'activité de l'aldolase

Echantillon : Sérum

1.12.1. Réactifs utilisés

Réactif 1 (R1)	Tampon Collidine, pH 7.4	51 mmol/l
	Mono-iodoacétate	0.27 mmol/l
	F-1,6-DP	2.7 mmol/l
Réactif 2 (R2)	NADH	0.23 mmol/l
Réactif 3 (R3)	GDH	= 326 mU/ml
	TIM	= 4.35 U/ml
	LDH	= 616 mU/ml
	Sulfate Ammonium	> 35 %

1.12.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Echantillon (ml)	0.2	0.2	0.2
R1	-	2.5	2.5
NaCl 9g/l (ml)	2.5	-	-
R2	-	0.05	0.05
R3	-	0.01	0.01

• Mélanger, incuber pendant 5 minute à 37°C. Lire à 340 nm l'absorbance A1 contre le blanc et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 20 minutes l'absorbance A2 contre le blanc ..

1.13.3. Calcul de l'activité

Pour calculer l'activité enzymatique de l'aldolase, on utilise la formule suivante :

$$\text{Activité de l'aldolase} = \frac{(A1 - A2)}{(A1 - Aet) - (A2 - Aet)} \times \text{Conc. De étalon}$$

Aet : absorbance de l'étalon

2. Préparation de réactif de Bradford

- Dissoudre 100 mg de bleu de coomassie dans 50 ml d'éthanol (95%).
- Agiter le mélange pendant 2 heures avec un agitateur à l'abri de la lumière.
- Ajouter 100 ml de l'acide orthophosphorique (H₃PO₄) (85%).
- Compléter le volume jusqu'à 1 litre avec l'eau distillée.
- Filtrer la solution obtenue avec un papier filtre.

Ce réactif est stable pendant 2 semaines à 4°C.

3. Courbes d'étalonnages

3.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage du zinc

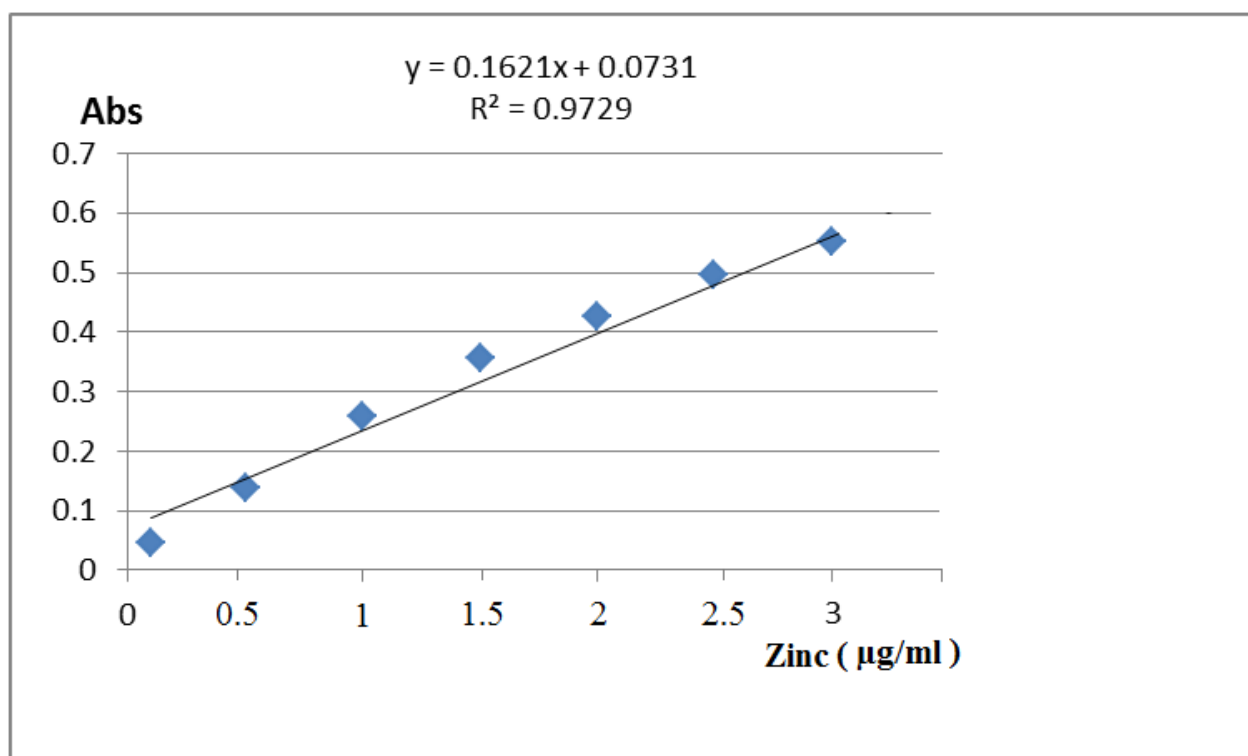


Figure : Courbe d'étalonnage du zinc.

3.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatiques

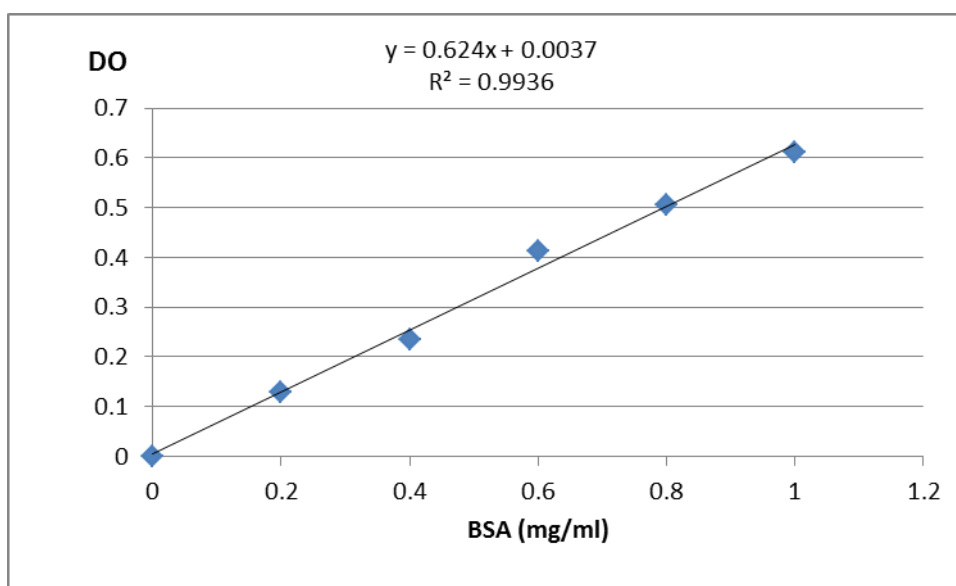


Figure : Courbe d'étalonnage de BSA.