

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 Appliquée

### THEME

*L'effet de *Ruta chalepensis* et de *Beta vulgaris* sur le métabolisme des carbohydrates et quelques enzymes du système antioxydant chez des rats Wistar diabétiques recevant un régime alimentaire pauvre en zinc*

Présentée par: HAMDIKEN Malika

Directeur de thèse : M. KECHRID Zine

Pr. Université Badji Mokhtar Annaba

Membres de Jury:

Président : M. SAKA Saad

Pr. Université Badji Mokhtar Annaba

Examineurs : M. ATTALAH Salah

Pr. Université Mentouri Constantine

M. BOUSSEKINE Samira

MCA. Université Larbi Tébessi Tébessa

N° DBCH...../2018

Année universitaire : 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# REMERCIEMENTS

*Avant tous mes plus sincères remerciements à Allah qui ne cesse de faire ses merveilles dans ma vie, en me donnant la force et le courage pour réaliser ce travail.*

*Ce travail a été effectué au laboratoire de biochimie appliquée de l'université de Guelma sous la direction du Professeur BENOUARET Djamel eddine. Je le suis tout particulièrement reconnaissante de la confiance qu'il a su me témoigner en m'intégrant dans son équipe de recherche.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement monsieur ZINE. KECHRID, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, qui m'a donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Je le remercie chaleureusement de la confiance qu'il m'a toujours accordée durant ces années. Je le remercie également pour sa disponibilité sans faille, ses précieux conseils scientifiques et ses encouragements qui m'ont indiscutablement permis d'évoluer*

*Mon respect, ma reconnaissance ainsi que mes vifs remerciements vont à Monsieur S. SAKA, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de juger ce travail et m'honoré par sa présidence de jury.*

*A Monsieur M. ATTALAH, Professeur, Université Mentouri Constantine, pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je le prie de recevoir toute ma gratitude pour avoir accepté de mettre son expertise à contribution afin de juger ce travail et lui adresse mes sentiments les plus respectueux,*

*A Madame S. BOUSSEKINE, Maitre de conférences, Université Larbi Tébessi Tébessa Annaba, pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de consacrer son temps pour le juger. Je vous prie de croire en mon profond respect.*

*Je remercie également tous les membres de laboratoire qui sont été généreux et compréhensifs durant tout le parcours.*

*Je remercie vivement les techniciennes de laboratoire Madame R. HIMERE et Madame G. BOUGHAZI pour ses bonnes humeurs, ses conseils techniques, ses aides précieuses, ses disponibilité, ses gentillesse et ses confrère.*

*Je tiens à remercier A. TAHAR, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, pour son amical accueil, sa gentillesse et son aide très importante pour mes analyses statistiques. Éternelle reconnaissance.*

*Un grand merci à ma mère, pour tout l'amour et le soutien que vous m'avez apporté à tous les moments de ma vie. Vous avez toujours été une source de tendresse et un modèle de travail, de sagesse et d'humilité.*

*Ici ma gratitude et mes sincères remerciements à mon mari Monsieur CHAOUI REDOUANE pour sa compréhension, sa gentillesse, ses efforts, ses encouragements et ses aides précieuses.*

*Mes sincères remerciements aussi :*

*A mes enfants : Abderrahmane et Maria*

*A mes frères.*

*- A ma sœur et ses enfants.*

*- A mes amies et camarades.*

*- A mes étudiants.*

# *Résumés*



### Résumé

Au cours du diabète, le stress oxydant et les anomalies lipidiques sont fréquents, prononcés et représentent des facteurs importants en cause dans le développement des complications liées au diabète. Plusieurs métabolites secondaires isolés de plantes ont montré une activité antioxydante et une capacité de prévenir les effets toxiques du stress oxydant au cours du diabète. Donc l'objectif de cette étude est la recherche de l'effet antidiabétique de deux espèces locales *Ruta chalepensis* et *Bêta vulgaris var cicla* chez des rats mâles Wistar recevant un régime alimentaire pauvre en zinc.

Les résultats obtenus dans la présente étude ont montré clairement que la streptozotocine a induit chez l'animal un diabète caractérisé par des perturbations métaboliques (glucidiques, protéiques et lipidiques), modifications de statut du zinc, une élévation des marqueurs du stress oxydant avec une diminution du système de défense antioxydant et des altérations histologique du pancréas.

Cependant, la carence en zinc dans l'alimentation a provoqué un déficit pondéral, et une diminution de la concentration du zinc dans les différents tissus. Ainsi l'insuffisance du zinc a induit une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, des lipides totaux, des triglycérides, de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique avec une diminution de la concentration sérique des protéines totales. De plus, l'activité des transaminases (TGO, TGP) est augmentée. En outre, la carence en zinc a augmenté le stress oxydatif qui traduit par une augmentation de la teneur de malondialdéhyde (MDA), une diminution de taux du glutathion réduit (GSH) et de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px) et du glutathion-S-transférase (GST), Ainsi que l'histologie du pancréas de ces rats a montré une nécrose au niveau des îlots de Langerhans conduisant à leur disparition totale.

Par contre, l'administration orale de l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* et de *Bêta vulgaris* a entraîné une nette amélioration des paramètres biochimiques, de statut du zinc et du statut antioxydant

En conclusion, les résultats ont montré que les deux plantes (*Ruta chalepensis* et *Bêta vulgaris*) sont doués d'une activité antidiabétique remarquable. De ce fait elles peuvent constituer une ressource naturelle pour les futures études sur le diabète sucré et ses complications.

**Mots clés:** *Bêta vulgaris*, *Ruta chalepensis*, zinc, diabète, stress oxydatif.

## Abstract

In diabetes, oxidative stress and lipid abnormalities are common, so they are important factors in the development of diabetes-related complications. Several secondary metabolites isolated from plants have shown antioxidant activity and ability to prevent the toxic effects of oxidative stress in diabetes. So the objective of this study is to investigate the antidiabetic effect of two local species, *Ruta chalepensis* and *Beta vulgaris var cicla*, in male Wistar rats fed on low zinc diet.

The results obtained in the present study have clearly shown that the administration of streptozotocin resulted in a diabetes which characterized by metabolic disturbances (carbohydrate, protein and lipid), changes in zinc status, an increase in the markers of oxidative stress with a decrease in the antioxidant defense system and histological changes in pancreas.

Moreover, zinc deficiency in diet had caused a weight loss, and a decrease in the concentration of zinc in different tissues. Zinc deficiency induced also a significant increase in glucose concentration, total lipids, triglycerides, urea, creatinine, uric acid with a decrease of total protein and an augmentation of transaminases (TGO, TGP) activities. Beside that, low zinc diet had increased oxidative stress, which characterized by an increase in malondialdehyde content (MDA), a reduction in reduced glutathione level (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione-S-transferase (GST) activities. As well as the histology of the pancreas of these rats showed necrosis in the islets of Langerhans leading to their approximately total disappearance.

However, oral administration of the methanolic extract of *Ruta chalepensis* and *Beta vulgaris* led to a marked amelioration in biochemical parameters, zinc and antioxidant status.

In conclusion, the findings indicated that both plants (*Ruta chalepensis* and *Beta vulgaris*) have a remarkable antidiabetic powerfull. so, they can be a natural resource for future studies on diabetes mellitus and its complications.

**Key words:** *Beta vulgaris*, *Ruta chalepensis*, zinc, diabetes, oxidative stress.

## المُلخَص

يعتبر الاجهاد التأكسدي والاختلال في ميتابوليزم الليبيدات عند المصابين بمرض السكري من الامور المعتادة ومن الواضح ان هذه الاضطرابات تعتبر من العوامل الهامة التي تؤدي الى ظهور المضاعفات المصاحبة للداء السكري. ان عدد كبير من المركبات الثانوية المستخلصة من النباتات تمتلك تأثير مضاد للاكسدة وقدرة في تفادي تأثير الاجهاد التأكسدي اثناء الاصابة بداء السكري.

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة يتمثل في دراسة التأثير المضاد للسكري باستعمال المستخلص الميثانولي لنباتي السلق (*Beta vulgaris var cicla*) والفيجل

(*Ruta chalepensis*) عند جرذان مصابة بالداء السكري و موضوعة على نظام غذائي منقوص لعنصر الزنك.

النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة أظهرت بوضوح ان مركب الستيربتوزوتوسين ادى الى حدوث مرض السكري و الذي تميز بالاضطرابات الأيضية (الكربوهيدرات والبروتين والدهون) ، وتغيرات في نسبة الزنك ، وزيادة في مؤشرات الإجهاد التأكسدي مع انخفاض في نظام الدفاع المضادة للاكسدة وتغيرات نسيجية في البنكرياس.

كما ان نقص الزنك في النظام الغذائي تسبب في نقص في الوزن، وانخفاض في تركيز الزنك في الأنسجة المختلفة. وكذلك أدى نقص الزنك إلى زيادة في تركيز كل من الجلوكوز ، والدهون الكلية ، والدهون الثلاثية ، واليوريا ، والكرياتينين ، وحامض اليوريك مع انخفاض في تركيز البروتينات الكلية. بالإضافة إلى ذلك ، هناك زيادة في نشاط انزيمات ناقلات الامين

. من جهة اخرى لاحظنا ان نقص الزنك في الغذاء ادى إلى زيادة الإجهاد التأكسدي المتمثل في زيادة كمية مؤشر الاكسدة الليبيدية (MDA)، وانخفاض في مستويات الجلوتاثيون المختزل (GSH) وانخفاض في نشاط كل من انزيم الجلوتاثيون بيروكسيداز (GSH-Px) وانزيم الجلوتاثيون الناقل (GST). كذلك أظهر أنسجة البنكرياس عند هذه الفئران نخرًا في جزر لانغرهانس مما أدى إلى اختفائها كليًا.

لكن المعالجة بالمستخلص الميثانولي *Ruta chalepensis* و *Beta vulgaris* ادى إلى تحسن ملحوظ في المعايير البيوكيميائية ونسبة الزنك وحالة مضادات الأكسدة.

خلاصة يمكن القول ان كلتا النبتتين *Ruta chalepensis* و *Beta vulgaris* يتمتعان بنشاط مضاد لمرض السكر. ونتيجة لذلك ، يمكن أن تكون مصدرا طبيعيا للدراسات المستقبلية على مرض السكري ومضاعفاته.

الكلمات المفتاحية: السلق , الفيجل , الزنك , مرض السكر, الاجهاد التاكسدي .





# *Liste des Abréviations*



## Liste des abréviations

Abréviation	Signification
<b>AGE</b>	: Advanced Glycation End product
<b>BHT</b>	: Butylhydroxyanisole
<b>CDNB</b>	: 1-Chloro-2,4 di nitrobenzene
<b>DID</b>	: Diabète insulino-dépendant
<b>DNID</b>	: Diabète non insulino-dépendant.
<b>DPPH</b>	: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>DTNB</b>	: Acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque
<b>EM</b>	: Extrait méthanolique
<b>EMBV</b>	: Extrait méthanolique de <i>Béta vulgaris</i>
<b>EMRC</b>	: Extrait méthanolique de <i>Ruta chalepensis</i>
<b>EOA</b>	: Espèces Oxygénées Activées
<b>ERO</b>	: Espèce Réactifs de l'Oxygène
<b>GAD</b>	: Acide Glutamique Décarboxylase.
<b>GLUT2</b>	: Transporteur de glucose 2.
<b>GK</b>	: Goto-Kakizaki.
<b>GSH</b>	: Glutathion réduit
<b>GSH-Px</b>	: Glutathion peroxydase
<b>GSSG</b>	: Glutathion oxydée
<b>GsT</b>	: Glutathion S transférase
<b>HbA1c</b>	: Hémoglobine glyquée
<b>HOBr</b>	: Hypobromique
<b>HOCl</b>	: Acide hypochlorique.
<b>HDL</b>	: Lipoprotéines de haute densité
<b>HO<sup>•</sup></b>	: Radicaux hydroxyles
<b>IC50</b>	: Concentration inhibitrice de 50%
<b>LDL</b>	: Lipoprotéine de basse densité
<b>MDA</b>	: Malondialdéhyde
<b>NO<sup>•</sup></b>	: Monoxyde d'azote
<b>1O<sub>2</sub></b>	: Oxygène singulet
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	: Radical superoxyde
<b>OH<sup>•</sup></b>	: Radical Hydroxyle

---

<b>OMS</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	:	Nitroperoxyde
<b>PKC</b>	:	Protéine kinase C
<b>RCS</b>	:	Reactive chlorine species
<b>RL</b>	:	Radicaux Libres
<b>RNS</b>	:	Reactive Nitrogen Species
<b>RO<sup>•</sup></b>	:	Radical Alkoxyde
<b>ROO<sup>•</sup></b>	:	Radical Peroxyle
<b>ROS</b>	:	Reactive oxygen species
<b>SOD</b>	:	Superoxide dismutase
<b>STZ</b>	:	Streptozotocine
<b>TRX</b>	:	Thiorédoxine
<b>MODY</b>	:	Maturity Onset Diabetes of the Young

---

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule $\beta$ dans le diabète de type 1	06
2	Résumé de la physiopathologie du diabète type 2	08
3	Balance entre les prooxydant et les antioxydnt.	13
4	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	18
5	Voie des polyols et autre voies du catabolisme du glucose	21
6	Relation entre diabète et stress oxydative	23
7	<i>Ruta chalepensis</i>	36
8	<i>Beta vulgaris var cicla</i>	37
9	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH .	43
10	Schéma récapitulatif du Protocole expérimental	48
11	Teneur des polyphénols et des flavonoïdes dans les deux extraits	69
12	Effet antiradicalaire de l'EMBV et l'EMRC sur le radical DPPH°.	70
13	évaluation de l'activité hypoglycémiant sur les souris normo-glycémiques traités par l'EMBV et l'EMRC.	71
14	Pourcentage de la diminution de la glycémie par rapport à la glycémie basale des rats.	71
15	Test Anti-Hyperglycémique de l'EMRC	73
16	Test Anti-Hyperglycémique de l'EMBV	73
17	Suivie du poids de rats durant le traitement	75
18	Gain ou perte du poids des rats à la fin du traitement.	76
19	Courbe du suivie de la glycémie durant le traitement chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).	77
20	Pourcentage de la variation de la Glycémie chez chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).	78
21	Variation de la concentration du zinc dans le Fémur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et	79

- traités par l'EMBV (D-ZN+R).
- 22** Variation de la concentration du zinc dans le foie chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 79
- 23** Variation de la concentration du zinc dans le rein chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC(D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 80
- 24** Concentration sérique des lipides totaux chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 81
- 25** Concentration sérique du cholestérol chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 81
- 26** Concentration sérique des triglycérides chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 82
- 27** Concentration sérique des protéines totales chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 83
- 28** Concentration sérique de l'urée chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 83

- 29** Concentration sérique de l'acide urique chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 84
- 30** Concentration sérique de la créatinine chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 84
- 31** Variation de l'activité enzymatique de TGO chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 85
- 32** Variation de l'activité enzymatique de TGP chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 86
- 33** Le taux de l'MDA tissulaire au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 87
- 34** Le taux de GSH tissulaire au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 89
- 35** L'activité de GSH-Px au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en 91

zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).

- 36** L'activité de GST tissulaire au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRV (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). 93
- 37** Les coupes histologiques du pancréas des rats non diabétiques (ND), rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRV (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). chez les rats témoins, DNT et diabétique traite avec l'EA et l'EM. 94



# *Liste des Tableaux*



## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Composition de la nourriture.	46
2	La quantité des métaux	46
3	Le rendement d'extrait méthanolique de <i>Ruta chalepensis</i> et <i>Beta vulgaris</i>	67
4	Résultats des tests phytochimiques	68
5	Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMBV et l'EMRC	69
6	le poids initial et final chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).	75
7	Concentration du glucose chez chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).	77

Introduction	01
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	
I. Diabète	04
1. Définition	04
2. Classification	05
2.1. Diabète de type 1	05
2.2. Diabète de type 2	07
2.3. Diabète gestationnel	08
2.4. Diabète secondaires	08
3. Diabète expérimental	09
3.1. Diabète induit par la Streptozotocine	09
4. Facteurs déclenchant le diabète	10
4.1. L'hérédité	10
4.2. L'obésité	10
4.3. Le stress	10
4.4. L'âge	10
4.5. Les facteurs alimentaires	10
4.6. L'infection virale	11
5. Les complications liées au diabète	11
6. Le traitement médicamenteux du diabète	11
II. Le stress oxydatif	13
1. Définition du stress oxydatif	13
2. Origine du stress oxydant	14
3. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène	14
3.1. Les espèces radicalaires	14
3.2. Les espèces non-radicalaires	15
4. Les cibles biologiques du stress oxydant	15
4.1. Les lipides	15

## Table des matières

4.2. Les acides nucléiques	15
4.3. Les protéines	15
4.4. Les sucres	16
5. Systèmes de défenses antioxydants	16
5.1. Les antioxydants enzymatiques	16
5.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)	16
5.1.2. La catalase	17
5.1.3. Les glutathions peroxydases et réductases	17
5.2. Les antioxydants non enzymatiques	18
5.2.1. Glutathion	18
5.2.2. Vitamine E et vitamine C	19
5.2.3. L'acide urique	19
5.2.4. La bilirubine	19
5.2.5. $\beta$ -carotènes	19
5.3. Autres molécules antioxydantes	19
5.3.4. Les oligo- éléments	19
5.3.5. Polyphénols	20
5.4. Les antioxydants synthétiques	20
6. Implication du stress oxydant dans le développement du diabète	20
6.1. L'augmentation du flux de la voie des polyols	20
6.2. L'activation de la voie des Protéines Kinases C (PKC)	22
6.3. La Glycation des protéines et génération des radicaux libres	22
6.4. La voie auto-oxydation du glucose	23
III. Zinc	24
1. Historique du zinc	24
2. Les sources alimentaires du zinc	24
3. Les apports quotidiens du zinc	24
4. Répartition du zinc dans l'organisme	25
5. Transport sérique du zinc	25
5.1. L'Alpha 2 macroglobuline	25
5.2. L'albumine	25

## Table des matières

5.3. La transferrine	25
5.4. La glycoprotéine riche en histidine	26
5.5. Métallothionéine	26
5.6. Les acides aminés	26
6. Absorption du zinc	26
7. Excrétion du zinc	27
7.1. Excrétion fécale	27
7.2. Excrétion rénale	27
7.3. Excrétion par la sueur	28
7.4. Autres voies d'élimination	28
8. La carence en zinc	28
9. Rôle du zinc	28
9.1. Rôle biochimique	28
9.1.1. Enzymes	28
9.1.2. Métabolisme des acides nucléiques	29
9.1.3. Métabolisme des glucides	29
9.1.4. Métabolisme des lipides et des acides gras	29
9.1.5. Biosynthèse des hormones	29
9.1.6. Rôle antioxydant du zinc	29
9.2. Rôle physiologique	30
9.2.1. Croissance et multiplication cellulaire	30
9.2.2. Reproduction et fertilité	30
9.2.3. Immunité	30
9.2.4. Inflammation	30
10. Zinc et diabète	31
IV : La phytothérapie	32
1. Généralités	32
2. Définition de la phytothérapie	32
3. Différents types de la Phytothérapie	32
4. Les formes d'utilisation des plantes	33
5. Les effets antidiabétiques des principes actifs des plantes	34
5.1. Les flavonoïdes	34

# Table des matières

5.2. Les saponosides	34
5.3. Les alcaloïdes	35
5.4. Les tanins	35
6. Les plantes sélectionnées	35
6.1. <i>Ruta chalepensis</i>	35
6.1.1. Systématique	35
6.1.2. Description botanique	36
6.1.2. Utilisation médicinale	36
6.2. <i>Bêta vulgaris</i> « var. cicla »	37
6.2.1. Systématique	37
6.2.2. Description botanique	37
6.2.3. Utilisation médicinale	38
<b>Matériel et méthodes</b>	
I. Matériel	39
1. Matériel végétal	39
2. Les animaux	39
II. Méthodes	39
1. Etude phytochimique	39
1.1. Préparation de l'extrait méthanolique	39
1.2. Tests préliminaires de la composition chimique	39
1.3. Analyse de l'extrait méthanolique de <i>Bêta vulgaris</i> et <i>Rutachalepensis</i>	41
1.3.1. Dosage des polyphénols	41
1.3.2. Dosage des flavonoïdes	42
1.3.3. L'évaluation de l'activité anti-oxydante : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	42
2. Etude pharmacologique	43
2.1. Le test de toxicité (Test d'innocuité)	43
2.2. Test de l'activité hypoglycémiant sur des souris normo-glycémiques	44
2.3. Test de l'activité anti-hyperglycémiant	44
2.4. L'étude sur les rats diabétiques	44
2.4.1. Induction du diabète sucré chez des rats	44
2.4.2. La préparation de la nourriture	45

## Table des matières

2.4.3. Traitement des animaux	47
2.4.4. Prélèvement sanguin	47
2.4.5. Prélèvement des organes	47
2.4.6. Dosage du zinc	49
2.4.7. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques	49
2.4.7.1. Dosage du glucose	49
2.4.7.2. Dosage de cholestérol	51
2.4.7.3. Dosage Des triglycérides	53
2.4.7.4. Dosage des protéines totales dans le sérum	54
2.4.7.5. Dosage de l'urée	55
2.4.7.6. Dosage de la créatinine	56
2.4.7.7. Dosage de l'acide urique	57
2.4.7.8. Dosage de l'activité d'Aspartate amino transférase	58
2.4.7.9. Dosage de l'activité d'Alanine amino transférase	59
2.4.8. Analyse des paramètres tissulaire	60
2.4.8.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA)	60
2.4.8.2. Dosage du glutathion réduit (GSH)	61
2.4.8.3. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx)	62
2.4.8.4. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GSTs)	63
2.4.8.5. Dosage des protéines	63
<b>Résultats et discussion</b>	
1. Etude phytochimique	67
1.1. Rendement d'extraction	67
1.2. Tests phytochimiques	67
1.3. Dosage des polyphénols et de flavonoïdes	68
2. L'évaluation de l'activité anti-oxydante (DPPH)	69
3. Investigation expérimentales sur les animaux	70
3.1. Test de toxicité	70
3.2. Test de l'activité hypoglycémiant sur des souris normo-glycémiques	70
3.3. Test de l'activité anti-hyperglycémiant	72
3.4. L'étude sur les rats diabétiques	74
3.4.1. Etude de la croissance corporelle des rats pendant le traitement	74

## Table des matières

3.4.2. Le suivie de la glycémie pendant le traitement	76
3.4.3. Statut du zinc dans l'organisme	78
3.4.4. Les paramètres biochimiques	80
3.4.4.1. Profil lipidique (lipides totaux, triglycérides, cholestérol)	80
3.4.4.2. Profil protéique (protéines totales, urée, créatinine et acide urique)	82
3.4.5. Les paramètres tissulaires	86
3.4.5.1. MDA	86
3.4.5.2. Glutathion	88
3.4.5.3. Glutathion peroxydases (DPPH)	90
3.4.5.3. Glutathion S-Transférase	92
3.4.6. Analyse des coupes histologiques	94
Discussion	95
Conclusion et perspectives	111
Références bibliographiques	
Publication et communications	
Annexe	



# *Introduction*



### Introduction

Le diabète est une maladie considérée par l'OMS comme une épidémie et dont la prévalence a augmenté de façon très importante de ces dernières années. Actuellement, près de 285 millions personnes dans le monde sont atteints de diabète. Selon la fédération internationale du diabète (FID), si le taux de croissance actuel se poursuit le nombre total de diabétiques dépassera les 435 million, d'ici 2030. (**Fédération internationale du diabète, 2015**)

Le diabète sucré n'est pas une maladie homogène. Il s'agit en fait d'un ensemble hétérogène de désordres métaboliques caractérisé par la présence d'une hyperglycémie chronique accompagnée d'une perturbation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique, et résultant d'un défaut de sécrétion d'insuline, de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (**American Diabetes Association, 2017**).

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**). Le zinc est un oligo-élément important. Il est indispensable à un certain nombre de fonctions biochimiques et physiologiques, il intervient dans l'activité de près de 300 enzymes (**Wolfgang Maret, 2012 ; Sommer et al., 2018**). Il joue également un rôle dans la plupart des métabolismes (glucides, lipides, protéines et acides nucléiques). Il agit aussi au niveau du métabolisme hormonal, il joue un rôle important dans le stockage et la sécrétion d'insuline. La carence en zinc induit une augmentation des troubles métaboliques du diabète et favorise les complications de cette maladie (**Fukunaka et Fujitani, 2018**).

Il est maintenant admis que des concentrations élevées en glucose dans les milieux extra et intracellulaires induisent un stress oxydant défini comme un déséquilibre de la balance entre les prooxydants et les antioxydants et qui est considéré comme le moteur mobilisant des différents facteurs pathologiques vers les complications du diabète (**Malardé, 2012**).

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

Le traitement pharmacologique actuel du diabète est représenté essentiellement par l'insuline et les hypoglycémiantes oraux qui visent à soigner et non à guérir la maladie (Eddouks et al., 2007 ; Marchand et Thivolet, 2016) en plus, on remarque que l'utilisation continue des drogues antidiabétiques synthétiques causes des effets secondaires néfastes et la toxicité (Hwang et al., 2005; Zhang, 2006;).

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

Par conséquent, les plantes médicinales sont largement utilisées, en raison de leur efficacité, des effets secondaires limités, et des coûts relativement bas (Hwang et al., 2005). Il est aujourd'hui largement reconnu que le monde végétal constitue la source majeure de médicament grâce à la richesse en composés bioactifs (Eddouks et al., 2007).

Plus de 1200 plantes sont utilisées actuellement dans le traitement de diabète, plusieurs études ont été effectuées pour identifier les composés bioactifs des plantes médicinales et diététiques responsables de l'activité hypoglycémique, certains composés sont isolés tel que : tanins, saponosides, mucilages, alcaloïdes, oses et holosides. et parmi lesquels les flavonoïdes qui sont les principaux composants actifs responsables de diverses activités biologiques ((Hilal Zaid et al., 2018),).

L'Algérie, riche par sa biodiversité et son climat, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules hypoglycémiantes et/ou antioxydantes originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication. (Kambouche et al., 2009).

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier les activités pharmacologiques de l'extrait méthanolique lyophilisé de deux plantes algériennes : *Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris var cicla* sur le développement du diabète chez des rats diabétiques alimentés par un régime carencé en zinc.

Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur le diabète, le stress oxydant, le zinc ainsi que les deux plantes sélectionnées.

Dans la partie expérimentale, nous développerons dans le premier chapitre le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour le screening phytochimique, l'extraction, le dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes, et finalement l'activité antioxydante et antidiabétique. Le deuxième chapitre sera consacré aux résultats obtenus dans notre étude et leur discussion. Puis nous terminerons par une conclusion.

# *Synthèse Bibliographiques*



## Chapitre I : Le diabète

### 1. Définition

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Cela se traduit par un taux de sucre élevé dans le sang: on parle d'hyperglycémie (Cheng et Fantus, 2005 ; Buyschaert, 2012).

Selon l'OMS, un patient est diagnostiqué diabétique lorsqu'il présente une glycémie supérieure à 1.26 g/l (7 mmol/L), caractéristique à jeun (> 8heurs), confirmée par deux prises de sang consécutives ou qu'une mesure de l'hémoglobine glyquée est supérieure à 6 % (Buyschaert, 2012).

L'hyperglycémie chronique liée au diabète est associée à d'importantes séquelles à long terme, particulièrement à des lésions, des anomalies et une insuffisance de divers organes, surtout les reins, les yeux, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (l'Association canadienne du diabète, 2008).

L'insuline est en effet la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme, elle est produite par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas (Capeau et al., 1996). Elle stimule l'absorption du glucose sanguin par les tissus dits insulino-dépendants (foie, muscles squelettiques et tissu adipeux) et son stockage sous forme de glycogène. De plus, elle inhibe les voies de production hépatique de glucose (néoglucogénèse et glycogénolyse) (Denis, 2002). Elle intervient enfin dans la régulation du métabolisme lipidique en inhibant la lipolyse des triglycérides adipocytaires et en facilitant leur synthèse, ainsi que celle de protéines dans le foie et le tissu adipeux (Capeau et al., 1996). Dans les tissus non insulino-dépendant comme le cerveau ou la rétine, l'absorption et le métabolisme glucidique sont au contraire proportionnels à la concentration sanguine en glucose et sont donc plus élevés au cours du diabète.

## 2. Classification de diabète

### 2.1. Diabète de Type 1 : (diabète insulino-dépendant «DID»)

Le diabète de type 1 également appelé diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète juvénile, qui touche 10% de diabétiques à travers le monde (**Gallagher et al., 2011**). Le DID est caractérisé par une production insuffisante d'insuline et exige une administration quotidienne de cette dernière (**Lecompte, 2012**). Ce type de diabète prend son origine suite à une destruction progressive des cellules bêta ( $\beta$ ) du pancréas qui produisent l'insuline. Cette destruction est le résultat d'une agression auto-immune impliquant les lymphocytes T, observée chez des sujets génétiquement prédisposés. Néanmoins, la composante génétique ne suffit pas à expliquer la progression de ce diabète et on reconnaît que les facteurs environnementaux jouent un rôle certain dans l'établissement d'un diabète de type 1 (**MacFarlane, 2009**).

#### ➤ Le diabète de type 1 et auto-immunité

Le diabète de type 1 c'est une maladie auto-immune conduisant à une destruction sélective et progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques, productrices de l'insuline (**Boitard, 2002 ; Thivolet, 2002**). Le processus auto-immun des cellules  $\beta$  débute plusieurs années (5 à 10 ans voir plus) avant le début du diabète. L'évaluation de la glycémie suppose une destruction de 80% à 90% des cellules  $\beta$  (**Grimaldi et al., 2001**).

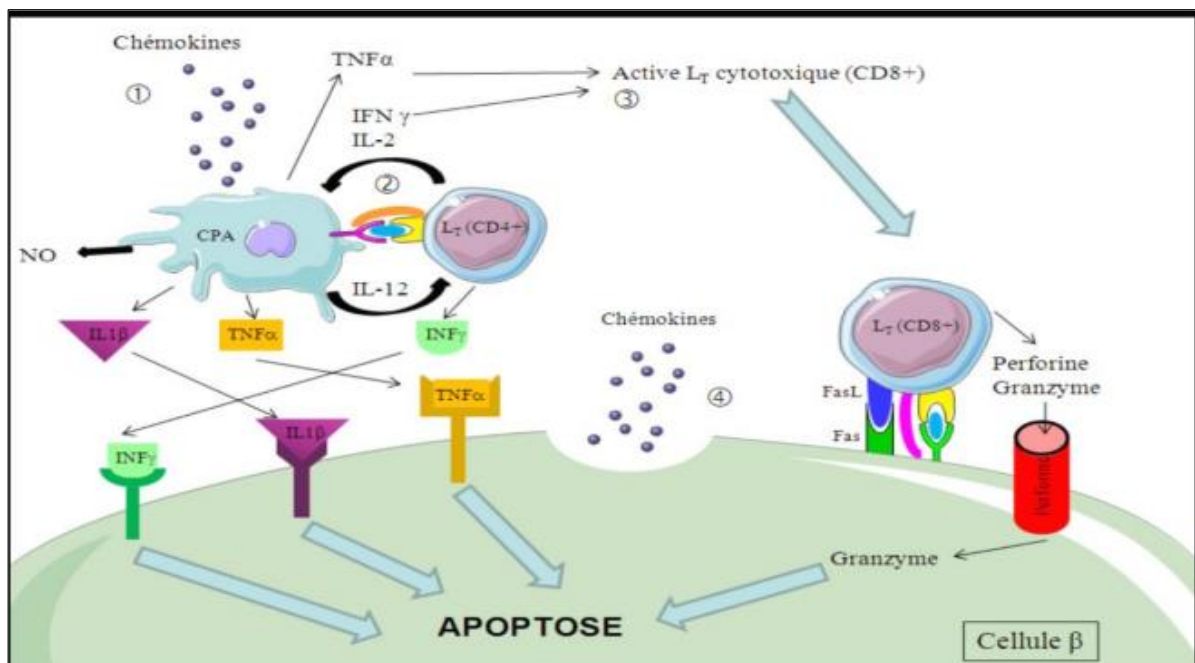
Cette destruction résulte de la production d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes des cellules  $\beta$  (**Boitard, 2002**). Elle semble apparaître chez des sujets génétiquement prédisposés, c'est-à-dire possédant des gènes de susceptibilité liées au système HLA mais le processus auto-immun serait déclenché par un facteur environnemental encore mal connu (**Boitard, 2002**). Il pourrait correspondre à une infection virale (**Horwitz, 2002**). Ce processus de destruction entraîne une carence en insuline absolue et définitive responsable de l'apparition d'une hyperglycémie chronique permanente. Le pancréas étant incapable de produire l'insuline, la survie de ces malades dépend entièrement d'injection quotidienne de cette hormone, d'où son nom de diabète insulino-dépendant. Ce traitement est associé à un régime alimentaire en glucose finement contrôlé (**Grimaldi et al., 2001**).

La destruction de la cellule est essentiellement due à une infiltration des îlots par des lymphocytes T helper CD4 et des lymphocytes T cytotoxiques CD8. Ce processus se déroule à, bas bruit pendant plusieurs années. Au cours de cette réaction des auto-anticorps dirigés contre certains antigènes pancréatiques sont produits. Ces auto-anticorps n'ont pas en eux-

mêmes de rôle pathogène mais sont des marqueurs fiables du déroulement du processus auto-immun pathologique (Figure 1) (Grimaldi, 2000).

Ces anticorps sont essentiellement au nombre de 4 :

- ✓ Auto-anticorps anti-cellules des îlots (ICA) : Ils sont très spécifiques du diabète de type I et sont détectables chez les sujets jeunes. Ils disparaissent par la suite chez la majorité des patients.
- ✓ Auto-anticorps anti-insuline : Ils sont présents avant tout traitement par insuline, à distinguer de ceux qui apparaissent sous insulinothérapie. On les retrouve en particulier chez l'enfant et notamment chez les sujets HLA DR4.
- ✓ Auto-anticorps anti-décarboxylase de l'acide glutamique : Anti GAD présents dans 85% des cas de diabète de découverte récente.
- ✓ Auto-anticorps anti-IA2 : Témoins de l'imminence de la maladie clinique. Le processus auto-immun est étalé sur plusieurs années avant et après l'apparition du diabète (Grimaldi, 2003).



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



## **2.2. Diabète de Type 2 : (diabète non insulino-dépendant «DNID»)**

Ce type de diabète débute généralement après l'âge de 40 ans et représente 90% de l'ensemble des cas mondiaux (**Buysschaert et al., 1998 ; Raccah, 2004**) et sa prévalence augmente avec l'âge (**Peter-Riesch et al., 2002**). Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline. L'insuline est soit basse ou soit élevée (insulinorésistance prédominante ou insulino-pénie prédominante) (**Calop et al., 2008 ; Auberval, 2010**)

En l'absence de traitement, le diabète se reconnaît par une élévation chronique de la glycémie. Celle-ci s'accompagne parfois par les symptômes suivants : polydipsie, polyurie, la fatigue, polyphagie, amaigrissement ou obésité, et des troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel (**Sharma et al., 1993 ; Buysschaert et al., 1998 ; Raccah, 2004 ; Calop et al., 2008**).

L'hyperglycémie des diabétique de type 2 est la conséquence de deux grands mécanismes physiopathologiques. Le premier correspond à une diminution de la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline (insulino-résistance) touchant les tissus périphériques que sont le muscle, le tissu adipeux et le foie (**Dagogo et Santiago, 1997 ; Féry et Paquot, 2005**). Cette résistance découle d'une altération de la signalisation de l'insuline qui toucherait notamment le nombre de récepteurs à insuline et/ou leur affinité pour l'hormone et le nombre de transporteurs membranaires dépendants de l'insuline qui permettent l'entrée du glucose dans les cellules (**Dagogo et Santiago, 1997 ; Féry et Paquot, 2005**). Le deuxième phénomène consiste en une anomalie de l'insulino-sécrétion. La production de l'insuline est tout d'abord augmentée pour palier son efficacité et l'hyperinsulinémie permet dans un premier temps de maintenir une glycémie normale (**Féry et Paquot, 2005**). Plus la maladie progresse et plus la sensibilité à l'insuline baisse (**Ferrannini et al., 2005**). L'hyper-sécrétion d'insuline ne suffit alors plus à compenser l'insulino-résistance ce qui manifeste à la fois par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie. Peu à peu, les cellules  $\beta$  deviennent moins sensibles au stimulus du glucose. De plus, leur nombre et leur masse diminuent à cause de la toxicité du glucose. La sécrétion d'insuline finit alors par diminuer et les diabétiques de type 2 deviennent à terme, comme les diabétiques de type 1, insulino-pénie (**Guillausseau et Laloi-Michelin, 2003**). Avec cette baisse de l'insulino-sécrétion, l'hyperglycémie se fait plus sévère. Ces désordres du métabolisme glucidique sont associés à des troubles importants du

métabolisme lipidique résultant à une dyslipidémie avec augmentation des triglycérides, acides gras libres, LDL et baisse du HDL cholestérol (Figure 02) (Vergès, 2007).

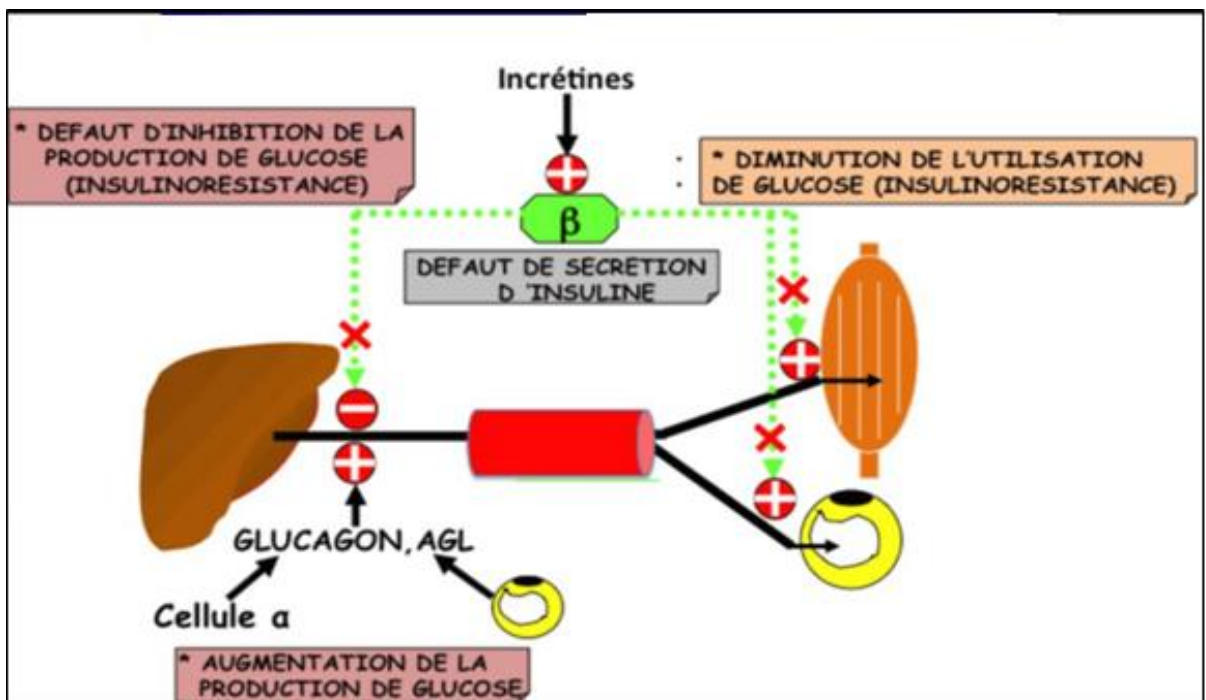


Figure 02. Résumé de la physiopathologie du diabète type 2 (Guillaume, 2004).

### 2.3. Diabète gestationnel

Chez certaines femmes enceintes, suite à l'augmentation de l'insulino-résistance au cours de la grossesse, des cas de diabète gestationnels peuvent être observés. Ces diabètes peuvent être contractés au cours du 2ème trimestre de grossesse et surviennent chez environ 4% des femmes enceintes mais, contrairement aux DT1 et DT2, ils disparaissent après l'accouchement. Cependant, il est essentiel de surveiller les cas de diabète gestationnels car à long terme, les femmes ayant contracté cette maladie risquent de développer un DT2 (Buchanan et al., 2012).

### 2.4. Diabètes secondaires

Il existe des diabètes dits secondaires correspondant à des formes plus rares de diabète. Ils sont dus à des défauts génétiques des cellules  $\beta$ -pancréatiques tels que les diabètes de type MODY ou de l'action de l'insuline tels que le syndrome de Rabson Mendenhall ou le diabète lipoatrophique, des maladies du pancréas exocrines telles que la pancréatite, la néoplasie, la

fibrose kystique ou encore l'hémochromatose, des endocrinopathies tels que l'acromégalie, l'hyperthyroïdisme, le syndrome de Cushing, des diabètes induits par des drogues, des produits chimiques ou encore des infections (Alberti et Zimmet, 1999)

### 3. Diabète expérimental

Afin d'étudier l'étiologie de ce diabète et en raison de la gravité de ces nombreuses répercussions métaboliques et dégénératives, l'utilisation de modèles expérimentales représente autant de voies d'accès dans la compréhension de la genèse et la complication de cette pathologie (Duhault, 1997 ; Frøde et Medeiros, 2008).

Les études visant la mise au point des modèles adéquats de diabète chez l'animal, diabète non insulino-dépendant ont abouti à différents types de modèles obtenus essentiellement chez le rat (Cefalu, 2006).

L'exploitation de ces modèles de diabète apporte des confirmations en faveur de l'idée selon laquelle les anomalies de l'insulinosécrétion et de la sensibilité à l'insuline (Duhault, 1997 ; Rees et Alcolado, 2005).

L'installation du diabète chez les modèles animaux se fait par diverses méthodes :

- ✓ Diabète induit par des méthodes de génie génétique (Frøde et Medeiros, 2008).
- ✓ Diabète induits par le régime alimentaire (Malaisse et Sener, 2008).
- ✓ Diabète induit par des substances médicamenteuses (la pentamidine) (Sai and Boillot, 1983).
- ✓ Diabète induit par inoculation des virus (Rees et Alcolado, 2005).
- ✓ Diabète induit chirurgicalement (Shafrir, 1992).
- ✓ Diabète induits par des substances chimiques :
  - Diabète induit par l'Alloxane (Lenzen et al., 1996).
  - Diabète induit par la cyclophosphamide (Charlton et Bacely, 1989).
  - Diabète induit par la Streptozotocine (Hwang et al., 2005).

#### 3.1. Diabète induit par la Streptozotocine

La Streptozotoïne (STZ, 2-deoxy-2-(3-méthyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) est un antibiotique anti-tumoral de synthèse utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse. Ce médicament, toxique pour le pancréas endocrine, est indiqué dans le traitement des

adénocarcinomes métastatiques des îlots de Langerhans. Comme les autres agents alkylants la Streptozotocine inhibe l'initiation de la synthèse de l'ADN et est faiblement active sur la synthèse de protéine et de l'ARN. Le mécanisme de l'action diabéto-gène est encore incomplètement connu (**Hwang et al., 2005**).

La Streptozotocine induit un diabète chez l'animal non prédisposée. Les mécanismes impliqués dans l'agression des cellules  $\beta$  sont toujours sujets à controverse, certains auteurs plaident en faveur d'une réaction auto-immune à médiation cellulaire, d'autres en faveur d'une toxicité directe provoquant l'insulite. L'un des mécanismes proposés, suggère l'action de la Streptozotocine au niveau de l'ADN, cette dernière traverse la membrane des cellules  $\beta$  via le transporteur GLUT 2 et cause l'alkylation de l'ADN. Par la suite, la Streptozotocine induit l'activation de la polymérase (ADP-ribose) et la libération de l'oxyde nitrique. Le résultat de cette action est la destruction des cellules  $\beta$  par nécrose cellulaire (**Mythili et al., 2004**).

#### 4. Facteurs déclenchant le diabète

**4.1. L'hérédité :** les différents types de diabète peuvent être induits par des facteurs héréditaires donc : la génétique à une action sur la présentation du diabète (**Bakour et Sioune, 2007**).

**4.2. L'obésité :** est défini par un excès de la masse adipeuse qui représente le facteur de résistance de l'action d'insuline le plus fréquent (**Bakour et Sioune, 2007**).

**4.3. Le stress :** le stress peut déclencher un diabète chez certaines personnes prédisposées génétiquement, il entraîne :

- ✓ L'excrétion des catécholamines qui activent la néoglucogenèse et la glycogénolyse.
- ✓ L'augmentation de l'activité de l'hypophyse qui a un effet anti-insuline périphérique. Ainsi l'effet du stress sur la glycémie peut varier d'une personne à l'autre (**Gribe et Mersougui, 2009**).

**4.4. L'âge :** plus l'âge est avancé, plus le risque d'apparition du diabète est important dans la population, la sécrétion de l'insuline par le pancréas s'use chez certaines personnes (**Gribe et Mersougui, 2009**).

**4.5. Les facteurs alimentaires :** Le diabète peut résulter d'une suralimentation et surtout d'un déséquilibre alimentaire, les modifications des habitudes alimentaires, provoquant une

augmentation des apports caloriques, accroissement de la consommation de graisse saturée et de sucre simple ainsi qu'une carence alimentaire favorise l'apparition du diabète (**Bakour et Sioune, 2008**).

**4.6. L'infection virale :** le virus Caxsackie B impliqué dans le déclenchement du DID et les virus des oreillons et la rubéole dans l'infection congénitale qui attaque les cellules Bêta du pancréas (**Bakour et Sioune, 2008**).

## **5. Les complications liées au diabète**

Malgré le développement des molécules normalisant la glycémie et l'amélioration des méthodes thérapeutiques, le diabète reste soumis à une surmorbidity et à une surmortalité liée essentiellement à des atteintes dégénératives tissulaires notamment au niveau des nerfs, des reins, de la rétine et du cœur. Le diabète sucré induit fréquemment l'apparition des complications aiguës ou chroniques (**Jakuš et Rietbrock, 2004**).

Les principales complications diabétiques aiguës est un coma causé soit par une hyperglycémie (acido-cétose) soit par une hypoglycémie due par exemple à une prise trop importante d'un médicament hypoglycémiant.

Les complications chroniques du diabète consistent surtout en des maladies vasculaires dégénératives dont les caractéristiques principales sont l'obstruction progressive de la lumière des vaisseaux et, au niveau de la microcirculation, le passage anormal de protéines de la circulation sanguine vers les tissus. Ces complications concernent à la fois les gros vaisseaux (macroangiopathie) et les microvaisseaux (microangiopathie) (**Jakuš et Rietbrock, 2004**).

## **6. Le traitement médicamenteux du diabète**

Le premier objectif du traitement de diabète consiste à maintenir une glycémie plasmatique aussi près que possible de la normale, sans provoquer d'hypoglycémie. L'atteinte et le maintien d'une maîtrise adéquate de la glycémie permettent de prévenir les complications à long terme de diabète.

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs thérapeutiques sont à notre disposition. Un régime alimentaire bien équilibré en glucides, en protéines et en lipides (**Gin et Rigalleau, 1999**), ainsi que l'exercice physique (**Charbonnel et Cariou, 1997**) sont des composantes essentielles du traitement de diabète sucré.

Les années 90 ont été marquées par des avancées majeures dans le domaine des médicaments hypoglycémiant oraux, qui peuvent être regroupés en trois classes :

- ✓ Les sulfamides hypoglycémisants (sulfonylurées), qui stimulent la production d'insuline ; par les cellules  $\beta$  du pancréas en les sensibilisant à l'action du glucose. Leur action sur la cellule bêta se fait par le biais de l'inhibition des canaux potassiques et de l'activation des canaux calciques aboutissant à l'insulino-sécrétion (**Cozma et al., 2002**).
- ✓ Les biguanides classés en deuxième lieu n'agissent pas sur la sécrétion insulinaire, ce sont des potentialisateurs d'effets de l'insuline. La seule metformine représente la famille d'antidiabétiques dont le mode d'action se situe au niveau du foie et des tissus cibles de l'insuline (diminution de la production hépatique du glucose et augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline) (**Cheng et Fantus, 2005**).
- ✓ L' $\alpha$ -glucosidase est une enzyme située dans l'intestin grêle. Elle transforme les polysaccharides en monosaccharides. L'inhibition de cette enzyme ralentit la digestion des glucides et diminue leur absorption, aboutissant à une baisse des glycémies post-prandiales et de l'HbA1c (**Cheng et Fantus, 2005 ; Henquin, 2005**).

Encore, l'insulinothérapie occupe une place importante dans l'arsenal thérapeutique du diabète de type 1. L'insulinothérapie sous-cutanée adaptée sur les résultats des glycémies capillaires. La plupart des insulines actuellement utilisées sont des insulines dites "humaines" biosynthétiques, produites par génie génétique dont la structure est identique à celle de l'hormone native (**Rodier, 2001**).

Dans le cas de diabète de type 2 l'insulinothérapie est donnée en association avec d'autres antidiabétiques oraux, en cas d'obésité morbide, et en cas de carence insulinaire (maladie évoluée) (**Henquin, 2005**).

## Chapitre II : Le stress oxydatif

### 1. Définition du stress oxydatif

La notion de stress oxydant a été évoquée en 1956 par Denham Harman lorsqu'il émit l'hypothèse que le vieillissement serait dû en partie à une accumulation de dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) (Claeyssen, 2009). Le concept de stress oxydant fut développé par Sies et ses collaborateurs (1991) avec des termes synonymes tels que «stress pro-oxydant» ou «stress réducteur», décrivant le stress oxydant comme un déséquilibre entre prooxydants et antioxydants en faveur des premiers (figure 03) (Coste et al., 2007). Cette notion était modifiée en se définissant comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Browne et al., 2008; Powers et al., 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink et al., 2008). L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren, 2007).

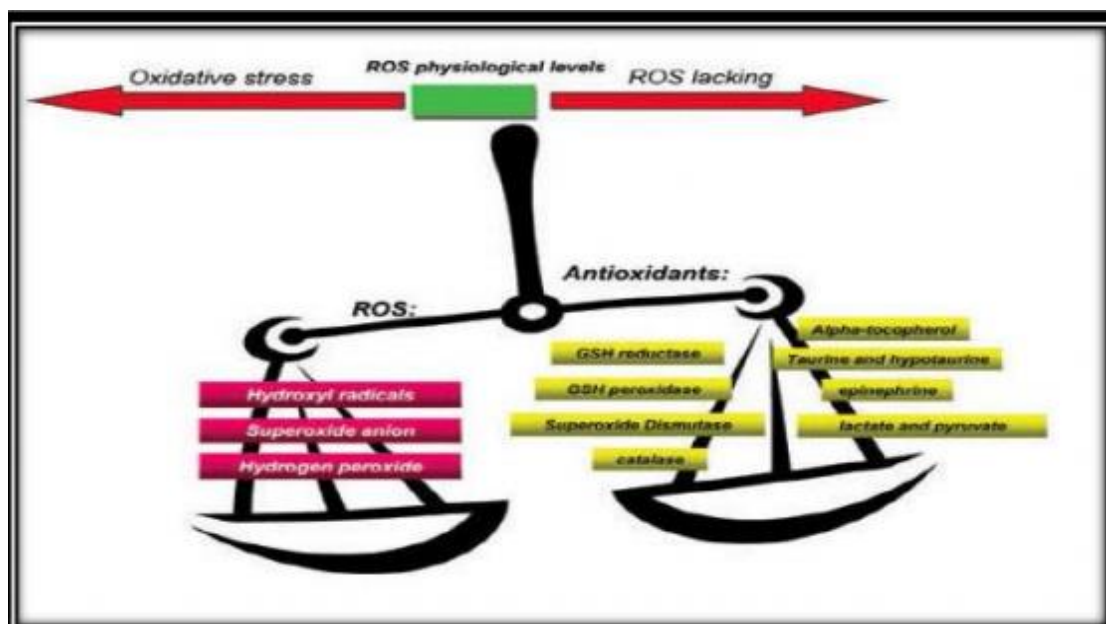


Figure 3. Balance entre les prooxydant et les antioxydnt (Fontaine, 2007).

## 2. Origine du stress oxydant

La rupture de l'équilibre antioxydant-pro-oxydant, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines (**Favier, 2003**). En effet, le stress oxydant peut provenir soit :

- ✓ D'une production endogène massive des radicaux libres par activation de macrophages, de polynucléaires, des cellules endothéliales et de la mitochondrie, ou par une exposition à des générateurs environnementaux (soleil, radioactivité, pollution atmosphérique, tabac, alcool, médicaments...etc.).
- ✓ D'une défaillance du système antioxydant provoquée, d'une part, par un affaiblissement des défenses enzymatiques due d'une carence en cofacteur oligoélément ou à une anomalie génétique ou acquise touchant leurs gènes correspondant. D'une autre part, cette déficience antioxydante peut aussi être causée par une carence en molécules non-enzymatiques antioxydantes surtout celles apportées par la nutrition. (**Favier, 2006**)

## 3. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène

Les Espèces Oxygénées Activées (EOA) sont des molécules contenant de l'oxygène et qui ont une grande réactivité dans les réactions biochimiques. Ce sont des molécules dotées de propriétés oxydantes et requièrent la présence des métaux de transition (**Favier, 2003**). .

On distingue deux catégories d'EOA : espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires.

### 3.1. Les espèces radicalaires

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe (**Halliwell, 1989**). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote ERA). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (**Delattre et al., 2005**).

Les différents radicaux libres sont :

- Anion superoxyde ( $O_2^{\cdot}$ )
- Radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ )
- Radical peroxyde ( $ROO^{\cdot}$ )
- Radical alkoxyde ( $RO^{\cdot}$ )
- Monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ )



Dans la formule du radical peroxyde et du radical alkoxyde, **R** représente un substrat organique ayant subi une oxydation.

### **3.2. Les espèces non-radicalaires**

Ces molécules sont généralement les précurseurs des radicaux libres. Ce sont des molécules d'une toxicité importante (**Favier, 2003**). Les espèces non-radicalaires sont :

- Oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )
- Peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

## **4. Les cibles biologiques du stress oxydant**

Les entités oxydantes étant très réactives, elles réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cibles les lipides, les acides nucléiques, les protéines et les sucres (**Beckman et Ames, 1998**).

### **4.1. Les lipides**

Les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence de nombreuses doubles liaisons, comme l'acide linoléique ou l'acide eicosapenténoïque. Les réactions radicalaires sont à l'origine de la peroxydation lipidique qui se traduit *in vitro* par le rancissement. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (**Halliwell et Gutteridge, 1989**).

### **4.2. Les acides nucléiques**

Les dommages médiés par le stress oxydant au niveau de l'ADN sont de cinq types : l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques, d'adduits intra-caténaux, des cassures des brins et des pontages ADN-protéines (**Cadet et al., 2002**).

### **4.3. Les protéines**

Les protéines subissent des modifications au cours du stress oxydant, soit sous l'action des radicaux libres oxygénés, soit en présence de métaux de transition (**Stadtman, 1990**). Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (**Bonnefont et al., 2001**).

Tous les acides aminés peuvent être oxydés ; ainsi la méthionine peut se transformer en méthionine sulfoxyde et la tyrosine en nitrotyrosine (**Tratner, 2003**)

#### **4.4. Les sucres**

En présence de métaux, l'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des anions superoxydes (OH<sup>·</sup>), et entraîner la coupure de protéines et leur glycation par attachement du céto-aldéhyde (**Wolff et al., 1989**) formant un dérivé de produit de glycation avancée (AGE, Advanced Glycation End product).

### **5. Systèmes de défenses antioxydants**

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (**Halliwell et Gutteridge, 1990**). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydro- ou liposolubles. Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Delattre et al., 2005**).

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**). Il existe différents types de molécules qu'elles soient naturelles ou synthétiques et dont le mode d'action repose sur un système enzymatique (premières lignes de défense) ou non (molécules piègeuses d'électrons).

#### **5.1. Les antioxydants enzymatiques**

Le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (**Kanoun, 2010**).

##### **5.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)**

Les SOD sont les premières enzymes à intervenir dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène, selon la réaction suivante :



Il en existe trois isoformes décrites chez les mammifères (**Fridovich, 1995**) : la SOD à Manganèse (Mn) dans les mitochondries, à cuivre (Cu) et à zinc (Zn) dans le cytoplasme, et des formes Cu/Zn SOD extracellulaires. Les deux dernières sont retrouvées dans les vaisseaux sanguins. Il existe des molécules chimiques de synthèse qui possèdent cette activité enzymatique et sont perméables aux membranes cellulaires. Elles sont appelées SOD mimétiques (**Fridovich, 1995**).

### **5.1.2. La catalase**

La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) en eau et oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (pour les cellules qui ne possèdent cette organelle ex ; érythrocytes) (**Lindau- Sehpard et Shaffer, 1993**). La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



La catalase est une enzyme tétramérique, chaque sous unité comporte un groupement ferriprotophyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état  $\text{Fe}^{+++}$  et une molécule de NADPH.

La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Delattre et al., 2005**).

La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (**Cantin, 1999**).

### **5.1.3. Les glutathions peroxydases et réductases :**

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GSH-Px) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (**Marfak, 2003**).

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants et leurs cofacteurs métalliques sont résumés dans la figure 04.

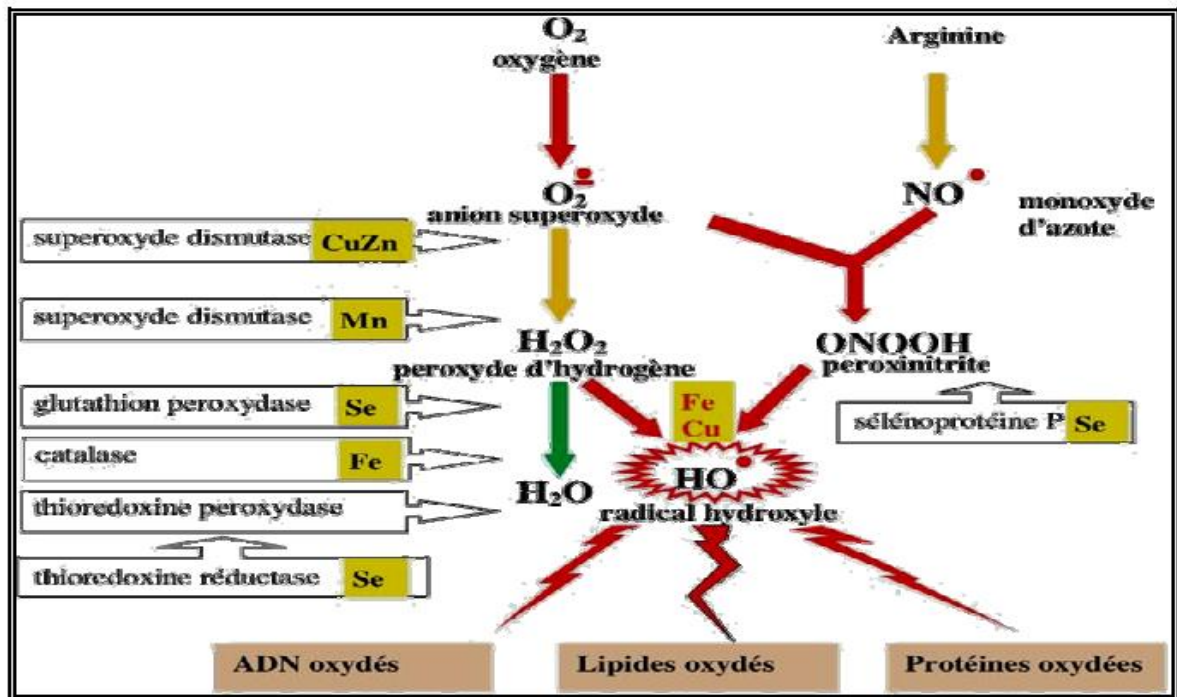


Figure 4. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Nicolosis, 1999).

## 5.2 Les antioxydants non enzymatiques

### 5.2.1. Glutathion

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' $H_2O_2$  est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté. La glutathion agit comme co-substrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase (Ravi et al., 2004).

### 5.2.2. Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Evans, 2000).

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'O<sub>2</sub><sup>•</sup> et l'OH<sup>•</sup> Elle peut aussi réduire le radical α-tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (**Evans, 2000**).

### **5.2.3. L'acide urique**

L'acide urique constitue le produit terminal majeur du métabolisme des purines chez les primates. Possédant des propriétés antioxydantes, il peut interagir avec les espèces oxygénées actives (EOA), et tout particulièrement avec le radical hydroxyle. Il apparaît comme étant l'antioxydant plasmatique le plus efficace en termes de réactivité avec les EOA (**Durackova, 2008**).

### **5.2.4. La bilirubine**

Protection des acides gras libres et de l'albumine contre l'attaque radicalaire. (**Beaudeau, 2005**).

### **5.2.5. β-carotènes**

Contrôlent efficacement la génération des radicaux libres notamment en captant l'oxygène singulet (**Beaudeau, 2005**).

## **5.3. Autres molécules antioxydantes**

### **5.3.1. Les oligo-éléments**

Les oligo-éléments, appelés aussi éléments traces sont des éléments métalliques indispensables à l'organisme, mais en toute petite quantité.

#### ➤ **Le sélénium**

Le sélénium est nécessaire à l'activité de nombreuses sélénoenzymes antioxydantes : GSH-Px, TRX...etc. (**Baskin, 1994**).

#### ➤ **Le zinc**

La prise de zinc conduit à long terme à l'induction de protéines antioxydantes comme les métallothionéines. L'importance du zinc dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. En effet, le zinc joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes (**Baskin, 1994**).

### **5.3.2. Polyphénols**

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins, les coumarines, et les phénols. Ce sont des composés que l'on retrouve dans les plantes. Depuis quelques années les Polyphénols attirent l'attention des chercheurs à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique et de réduire les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques comme le fer, car ils ont des propriétés chélatrices (**Delattre, 2005**).

### **5.4. Les antioxydants synthétiques**

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels.

## **6. Implication du stress oxydant dans le développement du diabète (Glutotoxicité liée à l'hyperglycémie)**

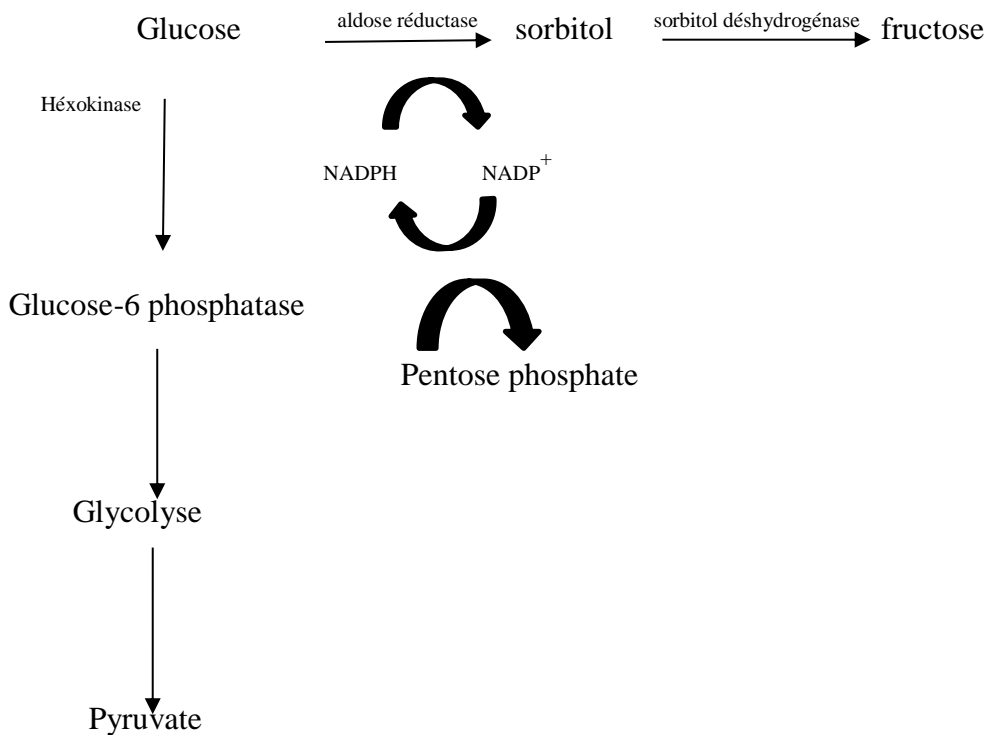
Le glucose exerce son effet toxique et forme des ROS par différents mécanismes: le phénomène d'auto oxydation du glucose, la voie des polyols, la voie de la PKC et la glycation des protéines avec formation des produits avancés de fin de glycation (AGEs)

### **6.1. L'augmentation du flux de la voie des polyols**

A l'état de normoglycémie, le glucose est transformé par l'hexokinase en glucose 6-phosphate pour rejoindre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Cependant, dans le cas d'une hyperglycémie, l'hexokinase est saturée (**Gonzalez et al., 1984**). Le glucose, de ce fait, s'accumule dans les tissus périphériques et active une voie accessoire, la voie des polyols.

Dans cette voie, le glucose est transformé en sorbitol par l'aldose réductase, qui n'est activée qu'en présence d'une hyperglycémie, car elle possède une faible affinité pour le glucose (**King et Brownlee, 1996**). La réaction a lieu en présence du cofacteur NADPH, H<sup>+</sup> issu de la voie des pentoses phosphates. Le sorbitol est ensuite transformé en fructose par le sorbitol déshydrogénase, dont le cofacteur est le NAD<sup>+</sup>. Le sorbitol, qui ne peut pas franchir la membrane plasmique, s'accumule dans la cellule, et augmente la pression osmotique, entraînant une hyperosmolarité intracellulaire. La production accrue de fructose par cette voie peut également stimuler la formation des AGEs grâce au plus grand pouvoir réducteur du

fructose par rapport au glucose (Figure 5) (Suarez *et al.*, 1988).



**Figure 5.** Voie des polyols et autre voies du catabolisme du glucose (Janeul, 2003)

L'activation de cette voie peut avoir des effets délétères (Brownlee, 2001). La principale conséquence est la modification du statut redox intracellulaire résultant de la baisse en NADPH, H<sup>+</sup>, au détriment du fonctionnement de nombreuses enzymes antioxydants comme la glutathion réductase, l'ascorbate-réductase qui utilisent ce cofacteur (Bravi *et al.*, 1997). Aussi cette baisse de cofacteur et de GSH augmente la sensibilité de la cellule au stress oxydant (Brownlee, 2005).

## 6.2. L'activation de la voie des Protéines Kinases C (PKC).

Le mécanisme responsable de l'activation de la protéines kinases C (PKC) semble être principalement lié à une production accrue du DAG(Diacylglycérol) à partir des intermédiaires de la glycolyse par l'activation de la Phospholipase C et l'inhibition de la DAG Kinase (Xia *et al.*, 1994 ; Keogh *et al.*, 1997). Les conséquences de l'activation de la PKC par l'hyperglycémie sont multiples. Il a été rapporté qu'une activation de la phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) cytosolique, entraîne une libération des acide gras, la formation de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et l'inhibition des pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (Brownlee, 2005). De plus, l'activation de la PKC est capable, entre autres, d'augmenter la prolifération cellulaire

(Koya et King, 1998), la production des cytokines et de protéine de matrice cellulaire (Studer et al., 1993), ainsi que la contractibilité et la perméabilité des vaisseaux (Hempel et al., 1997).

### **6.3. La Glycation des protéines et génération des radicaux libres**

Une des conséquences essentielles de l'hyperglycémie est la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines. La glycation des protéines résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose et les groupements amines libres des protéines (fonction amine N-terminale et/ou fonction  $\epsilon$ -aminée des résidus lysine) (Ramasamy et al., 2006). Cette liaison (réaction de Maillard), après réarrangements, donne naissance à des produits dits d'Amadori qui présente la particularité de posséder un groupement cétole (Yim et al., 1995). Cette fonction cétole peut, en présence de métaux de transition, céder un électron à l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation d'anions superoxydes  $O_2^{\cdot-}$  (Delattre et al., 2005). La propriété des protéines glyquées de produire des anions superoxydes a été mise en évidence par la première fois par (Gillery et al. (1988), et a été confirmée par d'autres auteurs tels (Sakurai et Tsuchiya, 1988).

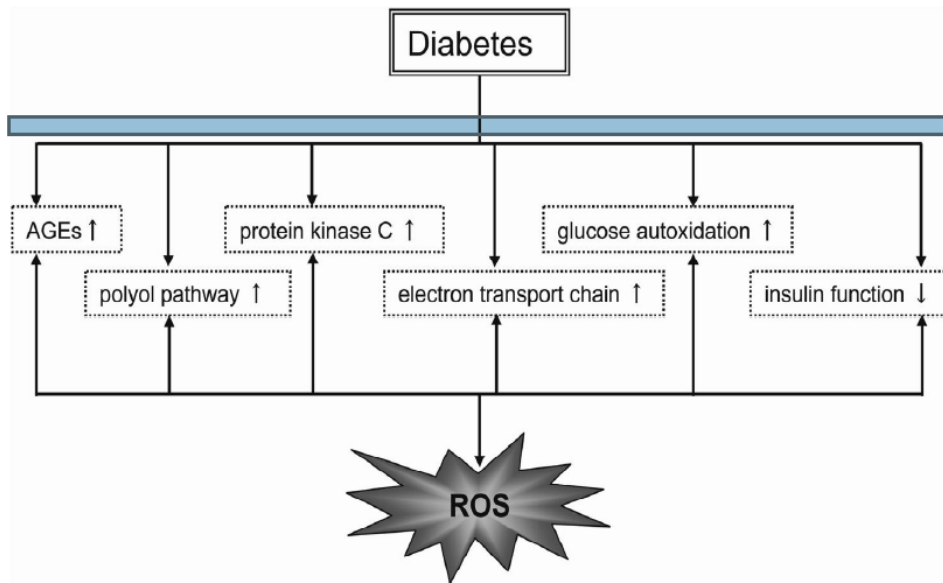
Il est important de noter que les  $\alpha$ -cétoaldéhydes ainsi que les produits d'Amadori peuvent également s'oxyder en présence de métaux de transition, et générer des ERO. Ce mécanisme amplifiant l'attaque radicalaire aboutit à la formation des complexes multimoléculaires, à la modification de la conformation des protéines ou à la fragmentation des protéines en peptides (Jakuš et Rietbrock, 2004).

### **6.4. La voie auto-oxydation du glucose**

Le glucose peut subir une auto-oxydation : il s'agit d'une réaction catalysée par les métaux de transitions et au cours de laquelle sont produits des anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) des dicarbonyles et des AGE (Produits de glycation avancés). Le glucose dans sa forme ouverte est en effet capable de s'énoliser et de réduire des métaux de transition. Le radical énediol formé peut être ensuite oxydé en dicarbonyle et induire la formation d'anions superoxydes, précurseurs du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et du radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) très réactif (réaction de Fenton et Haber- Weiss) (Hunt et al., 1988 ; Wolff, 1993). La réaction du dicarbonyle avec les protéines mène à la formation des AGE. Les radicaux libres formés sont



capables d'altérer la fonction protéique, en particulier enzymatique (figure 06) (Santini et al., 1996).



**Figure 6.** Relation entre diabète et stress oxydative (Yasuhiro et al., .2009).

## **Chapitre III : Zinc**

### **1. Historique du zinc**

Le zinc est un oligo-élément essentiel qui fait partie du groupe II b de la classification de Mendeleïv. Il possède le numéro atomique 30 et une masse de 65.37 (**Arnoud et al., 1984**). La découverte du zinc dans les milieux biologiques est forte ancienne : en 1869, Raulin montrait la nécessité du zinc pour la croissance d'*Aspergillus niger*. En 1877, cette découverte était confirmée par des travaux chez les végétaux (**Lechartier et Bellamy, 1877**) et sur le foie humain (**Raoult et Breton, 1877**). Puis en 1934, on mettait simultanément en évidence le caractère indispensable de cet élément pour la souris et le rat, et que sa déficience a eu comme conséquence le retard de croissance, la perte de cheveux, l'épaississement et l'hyperkeratinization de l'épiderme et atrophie testiculaire (**Bertrand et Bhattacharjee, 1934 ; Todd et al., 1934**). En 1961, Prasad a montré que l'insuffisance du zinc chez les Iraniens a causé le nanisme, l'hypogonadisme, l'hépatosplénomégalie, la peau sèche et l'anémie ferriprive (**Prasad et al., 1961**). L'US Food and Nutrition Board a finalement déclaré en 1974 que le zinc était un nutriment essentiel et des recommandations officielles ont ensuite été faites sur son apport (**Imoberdorf et al., 2010**). Depuis cette date, de nombreux travaux ont été publiés concernant le métabolisme, le rôle ou le lien avec des pathologies humaines.

### **2. Les sources alimentaires du zinc**

On trouve du zinc dans une grande variété d'aliments. Il se retrouve à des concentrations élevées dans les viandes et les poissons ainsi que dans les fruits de mer, les céréales et les légumes secs. Les viandes rouges sont toutefois plus riches en zinc que les viandes blanches. Les huîtres constituent l'aliment le plus riche en zinc (1mg/g) (**Arnoud, 1987; Revy et al., 2003**).

### **3. Les apports quotidiens du zinc**

La biodisponibilité est fonction de la présence de molécules facilitant ou au contraire inhibant l'absorption intestinale dans l'aliment. Ainsi les céréales sont riches en zinc, mais un régime à base de pain complet provoque des carences, en raison des effets chélateurs puissants des phytates et des fibres végétales du blé. Les apports conseillés en zinc sont d'environ 5 mg par jour chez le nourrisson, 10 mg chez

l'enfant, 15 mg chez l'adulte, 20 à 25 mg chez les femmes enceintes et allaitantes (**Schelenz et al., 1985**).

#### **4. Répartition du zinc dans l'organisme**

Le zinc est l'élément trace le plus abondant après le fer. Le corps contient environ 2.5 g de zinc dont 30 % dans les os et 60 % dans les muscles (**Jackson, 1989**). Les organes les plus riches en zinc sont : la prostate, le rein, le foie, les muscles, le cœur, le pancréas, l'ovaire, la rate et les testicules (**Eggleton, 1940**). Les concentrations tissulaires varient en fonction de l'âge. Chez le nouveau-né, le foie et les os sont plus riches en zinc que chez l'adulte et le muscle en contient des quantités moindres.

Les liquides de l'organisme ne représentent en quantité qu'une faible part du zinc total, les éléments figurés du sang étant bien plus riches que le plasma (**Arnoud, 1998**). Le zinc se répartit de la façon suivante dans le sang : Erythrocytes 85 %, Leucocytes 3% et le sérum 12 % (**Valee, 1962**).

#### **5. Transport sérique du zinc**

Le transport actif du zinc n'est pas assuré par une protéine spécifique, mais par plusieurs transporteurs capables de capter plus ou moins de zinc selon leurs concentrations et leurs affinités respectives (**Jackson et al., 1984**). Parmi ces transporteurs :

##### **5.1. L'Alpha 2 macroglobuline**

L'alpha 2 macroglobuline est une glycoprotéine de poids moléculaire 725000 Daltons. Elle est formée de quatre sous-unités identiques fixant chacune deux atomes de zinc. Environ 20 % du zinc est lié très fortement à cette protéine (**Osterberg et Malmensten, 1984**).

##### **5.2. L'albumine**

Le zinc se fixe de façon non spécifique sur la molécule d'albumine par les résidus histidinyl de cette protéine (**Cousin, 1985**). L'albumine transporte environ 60 à 65 % du zinc sérique total (**Foure, 1986**).

##### **5.3. La transferrine**

L'extrémité N terminale possède une affinité suffisante pour fixer le zinc. Environ 12 % du zinc serait lié à cette protéine (**Phillips et Azari, 1974**).

#### **5.4. La glycoprotéine riche en histidine**

C'est une protéine de poids moléculaire 58000 Daltons et dans laquelle l'histidine représente 10 % de la composition. L'affinité de cette protéine pour le zinc est très forte, et pour certains auteurs elle transporterait plus de zinc que l'albumine (**Morgan, 1985**).

#### **5.5. Métallothionéine**

Les métallothionéines sont des protéines de petit poids moléculaire formées de 61 acides aminés dont 25 à 30 % de cystéine. Chaque molécule de métallothionéine peut fixer 5 à 7 atomes de métaux (cadmium, cuivre, zinc), et joue un rôle important dans leur transport (**Cousin, 1983**).

#### **5.6. Les acides aminés**

Dans le sérum humain, 2 à 3 % du zinc sont liés à des acides aminés. La cystéine et l'histidine sont les deux acides aminés intervenant avec le citrate comme principaux ligands de faible poids moléculaire (**Berthon et al., 1978**).

### **6. Absorption du zinc**

L'absorption intestinale est une étape clé du métabolisme du zinc car elle assure en grande partie la régulation de la concentration de ce métal dans le corps humain. Les études chez le rat et l'homme semblent désigner l'intestin grêle et particulièrement le jéjunum comme le lieu privilégié d'absorption, celle-ci semble très faible au niveau de l'estomac et du duodénum (**Methfessel et spencer, 1966**).

L'absorption peut se décomposer en plusieurs étapes :

#### **❖ Captation par la bordure en brosse**

Le mécanisme exact en demeure inconnu. Il semble que le zinc soit capté sous forme d'un complexe. Plusieurs composés ont été proposés : les prostaglandines, les acides aminés (cystéine, histidine) et le citrate (**Evans, 1980**).

#### **❖ Distribution dans la cellule intestinale**

Le zinc qui a pénétré à l'intérieur de la cellule intestinale rejoint le pool du zinc labile. Une partie de zinc est utilisée par la cellule intestinale, se fixant sur des métaloenzymes natives ou sur des protéines membranaires. La partie du pool de zinc non utilisée est soit excrétée par la

membrane basolatérale, soit fixée sur des protéines de petit poids moléculaire : les métallothionéines (Cousin, 1985).

❖ **Transfert vers le sang**

Le passage à travers la membrane basolatérale a été peu étudié. Il ferait intervenir un transporteur protéique couplé à un mécanisme consommant de l'ATP. Le zinc est pris en charge par des protéines de faible affinité. Le passage dans le sang débute 15 minutes après administration du zinc (Arnoud et Favier, 1998).

❖ **Sécrétion dans l'intestin**

Une partie du zinc endogène se retrouve dans les selles, même après arrêt des sécrétions biliaires ou pancréatiques suggérant une sécrétion intestinale. Ce transfert a été vérifié par plusieurs auteurs à l'aide de Zn65 (Arnoud et Favier, 1998).

## **7. Excrétion du zinc**

Le zinc peut être excrété par différentes voies : la voie fécale est prépondérante dans les conditions physiologiques. Les voies secondaires peuvent, dans des circonstances pathologiques ou particulières, être responsables de carence par fuites (diarrée).

### **7.1. Excrétion fécale**

Le zinc fécal correspond au zinc non absorbé des aliments et au zinc endogène. Le zinc endogène provient de l'excrétion par la salive, les sécrétions gastriques, biliaires et pancréatiques (Jackson et al., 1984). L'excrétion fécale est en moyenne de 10 mg/j et participe de façon importante à la régulation de l'homéostasie zincique (Milne et al., 1983; Jackson et al., 1984).

### **7.2. Excrétion rénale**

L'élimination rénale est une voie mineure d'élimination. Elle ne représente qu'environ 5 % des apports quotidiens normaux. La concentration de zinc dans les aliments a peu d'effet sur la zincurie qui est entre 6 et 16 mg/j (Spencer et al., 1976).

### **7.3. Excrétion par la sueur**

La quantité de zinc éliminée par la sueur représente environ 0.5 mg/j. La quantité éliminée par cette voie est diminuée en cas d'apports faibles (Milne et al., 1983).

#### **7.4. Autres voies d'élimination**

La desquamation, le sperme, le lait sont également des voies d'élimination du zinc (**Prasad, 1983**).

### **8. La carence en zinc**

Les carences en zinc se traduisent par un certain nombre de signes cliniques, fonction de la gravité de la maladie. Les carences sont d'origines variables (diminution des apports, augmentation des besoins, malabsorption ou augmentation des pertes) (**Prasad, 1996; King et Keen, 1999**). Les signes d'une déficience sont : un retard de croissance, l'anémie, une perte des cheveux, une maturation sexuelle retardée et l'impuissance, une perte de l'appétit (**Henkin et al., 1972**), des lésions oculaires ou de la peau (**Baer et al., 1985**), des troubles de la vision (**Solomons et Russell, 1980**), la diminution de l'immunité cellulaire (baisse du nombre de lymphocytes T, diminution de l'efficacité des lymphocytes tueurs NK (**Prasad et al., 1977**) et une hyperglycémie modérée (**Quarterman et Florence, 1971**).

### **9. Rôle du zinc**

#### **9.1. Rôle biochimique**

##### **9.1.1. Enzymes**

Le zinc intervient dans l'activité de près de 200 enzymes (**Christianson, 1991; Coleman, 1992**). Il joue également un rôle dans l'expression des gènes et stabilise la structure de protéines. Le rôle du zinc au niveau de ces enzymes peut être structural ( $\alpha$ -amylase), régulateur (fructose 1-6 biphosphatase) ou catalytique.

Son rôle peut être mixte : structure/catalyse comme avec l'alcool déshydrogénase ou les phosphatases alcalines ou régulation/catalyse comme c'est le cas pour l'aminopeptidase (**Kirchgessner et Roth, 1983; Vallee, 1983; Auld, 2001**).

##### **9.1.2. Métabolisme des acides nucléiques**

Le zinc intervient dans l'activité des enzymes clé de la synthèse et de la dégradation des acides nucléiques (ADN et ARN polymérase, ARNt synthétases, déoxyribonucléotidyl

transférase, ribonucléases, thymidine kinase, nucléoside phosphorylase) (**Riordan et Vallee, 1976**).

### **9.1.3. Métabolisme des glucides**

Le zinc intervient au niveau de la voie de la glycolyse, de la voie des pentoses et de la néoglucogénèse (amylase, aldolase, émolase, phosphofructokinase, lactique déhydrogénase, pyruvate carboxylase, oxaloacétate décarboxylase, fructose 1-6 diphosphatase) (**Riordan et Vallee, 1976**).

### **9.1.4. Métabolisme des lipides et des acides gras**

Le zinc intervient dans la synthèse des prostaglandines (delta 6 désaturase cyclooxygénase). La carence en zinc diminuerait l'activité de la phospholipase A2 et de la lipoprotéine lipase (**Samman et Roberts, 1988**).

### **9.1.5. Biosynthèse des hormones**

Le zinc agit au niveau de la biosynthèse des hormones, il peut stabiliser la structure tertiaire d'hormones peptidiques, leur conférant une forme active ou une plus grande stabilité comme l'insuline et la gustine, qui contient deux atomes de zinc d'affinité différente, et n'est active qu'en présence de zinc (**Henkin et al., 1988**).

Le zinc joue aussi un rôle très important dans des autres métabolismes. Il intervient au niveau de la synthèse de l'hème, dans la détoxification des radicaux libres (superoxyde dismutase).

### **9.1.6. Rôle antioxydant du zinc**

Le rôle antioxydant du Zn s'exerce indirectement en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD (**Forman et Fridovich, 1973**). Le rôle du zinc semble toutefois bien moins important que celui de l'autre cofacteur, le cuivre. Au-delà de cette fonction, le zinc possède d'autres propriétés antioxydantes pour lesquelles le mécanisme précis reste encore incomplètement connu (**Powell, 2000 ; 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, 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 (Koukay *et al.*, 1987).
- ✓ Le zinc joue un rôle important au niveau membranaire en ayant un effet stabilisateur.
- ✓ Le zinc induit la production des métallothionéines, riches en cystéine, qui peuvent piéger les radicaux hydroxyyles (Maret, 1995).

## **9.2. Rôle physiologique**

Le zinc est indispensable à un certain nombre de fonctions physiologiques :

### **9.2.1. Croissance et multiplication cellulaire**

En l'absence de zinc toute croissance cellulaire est arrêtée. La multiplication des cellules s'arrête en phase S et G2 des mitoses (Brandão-Neto *et al.*, 1995).

### **9.2.2. Reproduction et fertilité**

La carence en zinc est associée à une atrophie des testicules et de l'épithélium séminifère. Le poids de la prostate et de l'épididyme est réduit et le nombre de cellules de Leydig diminué (Bunce, 1989).

### **9.2.3. Immunité**

Le rôle important du zinc dans le métabolisme des acides nucléiques pourrait en partie expliquer le rôle du zinc dans la prolifération lymphocytaire (Chandra, 1985; Rink et Haase, 2007).

### **9.2.4. Inflammation**

La diminution du zinc plasmatique observée dans les syndromes inflammatoires n'est probablement due qu'à une modification de la répartition du zinc dans l'organisme et pourrait constituer un des mécanismes de défense de l'organisme vis-à-vis de l'inflammation (Neve et Peretz, 1988).



## **10. Zinc et diabète**

Le zinc joue un rôle important dans la synthèse et la sécrétion de l'insuline (**Combs et al., 1971**). Chez l'animal, la carence en zinc induit une diminution de la concentration de zinc du pancréas qui conduit à la diminution de la biosynthèse d'insuline dans les cellules bêta des îlots de Langerhans, et augmenterait aussi la résistance des tissus périphériques à l'insuline (**Grodsky et Schmid, 1985**).

Le zinc pourrait également jouer un rôle dans l'utilisation du glucose par les muscles et les cellules adipeux (**Song, 1998**). Il intervient au niveau de la voie de la glycolyse, des pentoses, de la néoglucogenèse (**Riordan et Vallee, 1976**). Donc l'absence ou la carence de ce métal favorise les complications du diabète.

## Chapitre IV : La phytothérapie

### 1. Généralités

Pour se soigner, l'homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes (tisanes, poudres, décoctions), administrées par inhalations, cataplasmes, massages ou par voie orale. L'OMS, (2010) définit la médecine traditionnelle comme « la somme des connaissances, des compétences et des pratiques basées sur les théories, les croyances et les expériences propres aux différentes cultures, et qui sont utilisées pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des souffrances physiques et mentales ». Actuellement, plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays sous-développés, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires (OMS, 2008).

### 2. Définition de la phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : *phuton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement".

La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen des plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe.

### 3. Différents types de la Phytothérapie :

**3.1. Aromathérapie :** est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau (Strang, 2006).

**3.2. Gemmothérapie :** se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racelles (Strang, 2006).

**3.3. Herboristerie :** correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale (Strang, 2006).

**3.4. Homéopathie :** a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive ; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale (Strang, 2006).

**3.5. Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme des sirops, des gouttes, des gélules, des lyophilisats... (**Strang, 2006**).

## **4. Les formes d'utilisation des plantes**

### **4.1. Les tisanes : utilisation des plantes sèches**

Les tisanes sont obtenues par macération, digestion, infusion ou décoction en utilisant de l'eau.

#### **4.1.1. L'infusion**

Elle consiste à verser sur la plante de l'eau bouillant, couvrir et laisser refroidir 2 à 15 minutes. Elle convient aux plants fragiles (fleurs et feuilles).

#### **4.1.2. La décoction**

Elle consiste à maintenir la drogue avec l'eau ébullition pendant une durée de 15 à 30 minutes. Elle convient aux plantes dures (écoces, racines, fruit et certaines feuilles).

#### **4.1.3. La macération**

Il s'agit de maintenir la plante en contact avec l'eau (température ambiante) pendant 30 minutes à 4 heures.

#### **4.1.4. La digestion**

On maintient la plante en contact avec l'eau (température inférieure à celle de l'ébullition, mais supérieur à la température ambiante) pendant 1 à 5 heures.

### **4.2. Les poudres**

Préparées par pulvérisation suivie d'un tamisage, elles entrent directement dans la composition des gélules mais servent aussi à la fabrication d'autres formes galéniques comme les extraits et les teintures.

### **4.3. Les extraits**

Les extraits sont obtenus en traitant la plante dans une solution vaporisable (éther, eau alcool,...) par divers procédés d'extraction (macération, digestion, infusion, lixiviation) puis en évaporant ces solutions jusqu'à obtenir une consistance fluide, molle ou sèche. On les classe donc selon leurs consistances (**Sabai et Boudali, 2012**).

#### **4.4. Les huiles essentielles**

Le terme huile s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins fort dégagée par la plante

Il s'agit d'un certains tissus de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés physiquement tels l'hydro distillation à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique des plante aromatiques (**Laib, 2001**).

### **5. Les effets antidiabétiques des principes actifs des plantes**

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires, dont plus de 200 présentent une activité hypoglycémiant. Ainsi un certain nombre de groupes, tels que des alcaloïdes, des saponines, des flavonoïdes, des glycosides, des polysaccharides, des peptidoglycanes, acides aminés et d'autres obtenus à partir de diverses sources végétales, semblent avoir des effets, d'une importance particulière, dans le traitement du diabète (**Soumyanath, 2006**).

#### **5.1. Les flavonoïdes**

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes), assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets (**Rajnerayanama et al., 2001**).

#### **5.2. Les saponosides**

Les saponosides sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, appartenant aux stérols ou triterpènes. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes, ils sont caractérisés par leur action tensioactive (abaissement de la tension superficielle). La plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques, certains sont des matières premières pour l'hémi-synthèse de molécules médicamenteuses stéroïdiques (**Bouhadjera, 2005**).

### 5.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes.

Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane. Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes.

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante. (Mauro, 2006)

### 5.4. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation. Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Hemingway, 1992).

## 6. Les plantes sélectionnées

### 6.1. *Ruta chalepensis*

*Ruta chalepensis*, appelée aussi Rue de Chalep, est une plante aromatique, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale «Fidjel ». C'est une espèce méditerranéenne, relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale (Baba Aissa, 1999), au nord-est de l'Afrique, sud de l'Europe et le sud-ouest de l'Asie (Mioulane, 2004).

La rue est citée sous le terme de *sadzab* par Abdulbasset et Abde Tawab (2008), elle est aussi dite en berbère : *aouermi*, *Issel*, *Issin* (Baba Aissa, 1999). Autres noms sont indiqués *Al Shathap* , *Bou Ghans* (Duke et al ., 2008)

#### 6.1.1. Systématique : (Wiart, 2006; Takhtajan, 2009)

*Règne* : Plantae

*Sous règne* : Tracheobionta (plantes vasculaires)

*Super division : Spermatophyta (plantes à graine)*

*Division : Magnoliophyta (plantes à fleurs)*

*Sous division : Angiospermae*

*Classe : Magnoliopsida (dicotylédons)*

*Sous classe : Rosidae*

*Super ordre : Rutanae*

*Ordre : Sapindales*

*Famille : Rutaceae*

*Genre : Ruta*

*Espèce : chalepensis*

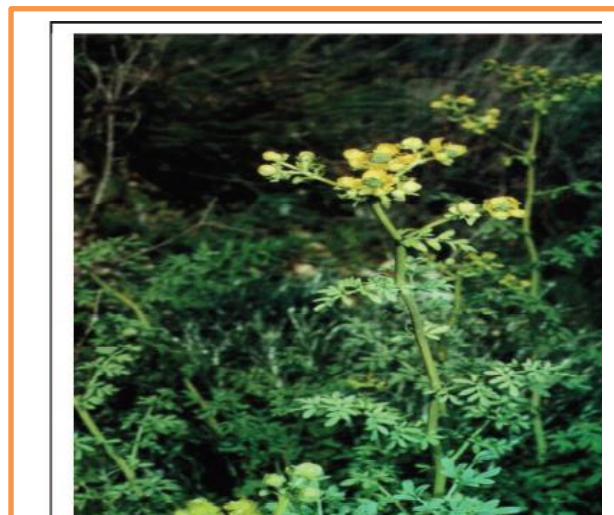


Figure 7 : *Ruta chalepensis* (prise par l'auteur)

### 6.1.2. Description botanique

La rue d'Alep, plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m (Baba Aissa, 1999). Les feuilles de 6 à 12 cm de long, sont aromatiques, ovales, larges, pennatiséquées, bleu-vert, elles présentent de nombreux lobes oblongs, lancéolés ou aborales. En été, s'épanouissent des fleurs de 1 à 2 cm de diamètre, en coupe, de couleur jaune foncé, portant quatre ou cinq pétales frangés de longs poils. Elles sont réunies en cymes lâches (Mioulane, 2004).

### 6.1.3. Utilisation médicinale

*Ruta chalepensis* est une plante aromatique médicinale utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme antiinflammatoire, et pour le traitement de pathologies cutanées. Elle est spontanée, largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. En Algérie, cette plante est aussi cultivée dans les jardins (Merghache et al., 2009).

*Ruta chalepensis* « la rue », est largement exploitée pour ces huiles essentielles destinées à la parfumerie et l'industrie agroalimentaire (Merghache et al., 2009). Elle contient des alcaloïdes, des flavonoïdes, de la vitamine C et des furo-coumarines (Zeichen, 2000). En effet la rue exerce une action excito-motrice nette sur l'utérus (Raghav, 1973). Sa sève irrite les peaux sensibles. On l'emploie pour les problèmes oculaires et en gargarisme pour les maux de gorge. Les feuilles soignent les phlébites et les varices. Plusieurs espèces de *Ruta* sont sources de diverses classes de produits naturels avec des activités : antifongique, antioxydante, phytotoxique et antivénéneux (Oliva et al., 2003). Autres activités sont confirmées : abortif; analgésique; anti fertilité; antiinflammatoire; antiseptique ;

antispasmodique; bactéricide; candidicide; cardiotonique; decongestant; Digestive; embryotoxique; emménagogue; fébrifuge; immunomodulateur; insectifuge; molluscicide; sédative; vulnérable ; antipyrétique, antiparasitaire (Aly Abdullah et Qarawi, 2005; Duke et al., 2008)

## 6.2. *Bêta vulgaris* « var. *cicla* »

*Bêta vulgaris* «var. *cicla*», connue sous le nom de « bette à carde » est une espèce du *Bêta vulgaris* de la famille des chénopodiacées tribu des *Cyclolobae* (située dans les Amaranthacées par la classification phylogénétique).

Nom commun : bette à cardes, blette, côte de blette, côte de bette, poirée à cardes cette plante, dicotylédone, apétale, dériverait de la betterave maritime (actuellement classée comme *Bêta vulgaris* L) qui est spontanée sur les rivages maritimes en Europe.

C'est une plante très proche de la betterave. Ce sont en fait des formes dérivées de la même sous-espèce (Pyo et al, 2004).

### 6.2.1. Systématique

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Caryophyllales*

Famille : *Chénopodiacée*

Genre : *Beta*

Espèce : *vulgaris*



Figure 08 . *Bêta vulgaris*. Var *cicla* (prise par l'auteur)

### 6.2.2. Description botanique

Bette à carde (espèce *Bêta vulgaris*) est une plante herbacée bisannuelle de légumes feuilles cultivés dans de nombreuses régions du monde pour sa disponibilité toute l'année, peu coûteux et largement utilisés dans de nombreux plats traditionnels

(Gao et al., 2009). La plante est plus robuste et plus facile à cultiver que les épinards et le céleri. Les feuilles de bette à carde contiennent des concentrations significatives sur le plan nutritionnel de vitamines A, C et B, en calcium, en fer et en phosphore (Pyo et al., 2004).

### 6.2.3. Utilisation médicinale

Chard (*Bêta vulgaris*. «var. *cicla*»:Chenopodiaceae) a indiqué avoir des propriétés hypoglycémiques et antioxydantes (**Bolkent et al., 2000**). Cette espèce est utilisée comme un remède folklorique populaire pour le foie et les reins, pour la stimulation des systèmes immunitaires et hématopoïétiques, et comme un régime spécial dans le traitement du cancer (**Kanner et al., 2001**).

L'études phytochimiques de blettes ont révélé la présence de certains acides gras (acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique), des phospholipides, des glycolipides, des polysaccharides, l'acide ascorbique, l'acide folique, de la pectine, des saponines, des flavonoïdes, des acides phénoliques (**Bolkent et al., 2000**), des bétalaïnes (**Kugler et al., 2004**) et de l'épigénies (**Gao et al., 2009**).





# *Matériels & Méthodes*



## **Matériels et Méthodes**

### **I. Matériels**

#### **1. Matériel végétal**

Les espèces sélectionnées (*Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris* var *cicla*) ont été collectées le mois de décembre 2012. La récolte est effectuée dans la région hadjar Mangoube (wilaya de Guelma). La partie aérienne (les feuilles et les tiges) des plantes récoltées a été séchée à l'abri de la lumière du soleil puis broyée en poudre. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à la préparation de l'extrait méthanolique.

#### **2. Les animaux**

Cette étude a été réalisée sur des rats males Wistar albinos âgés de 10 à 12 semaines et dont le poids varie de 120 à 200g. Ces animaux sont maintenus dans l'animalerie de département des sciences de la nature et de la vie de l'université 08 mai 1945 – Guelma. Les rats sont logés dans des cages avec accès libre de nourriture et d'eau et à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité. Des souris males provenant de l'institut de pharmacie à l'université Mentouri ; Constantine sont utilisées pour des tests de toxicité des deux plantes.

## **II. Méthodes**

### **1. Etude phytochimique**

#### **1.1. Préparation de l'extrait méthanolique**

L'extrait méthanolique est préparé selon la méthode de Markhan (1982). 250 g de la poudre de chaque plante (*Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis*) est débarrassé des cires et des lipides par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole. Le résidu obtenu après filtration est débarrassé de la chlorophylle par trois lavages successifs avec le chloroforme. L'extraction et s'effectue par macération dans le méthanol (80%) avec agitation de temps en temps. Après filtration, le filtrat est évaporé dans un rotavapor à 45°C puis lyophilisé, le lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction.

#### **1.2. Tests préliminaires de la composition chimique**

Les tests phytochimiques sont réalisés sur une solution de l'extrait méthanolique dissout dans du méthanol selon les méthodes décrites par **Trease et Evans (1983)**.

##### **1.2.1. Alcaloïdes**

Deux réactifs sont utilisés : réactif de Mayer et réactif de Wagner qui sont préparés comme suit :

**Réactif de Mayer:** 5g de KI et 1,358g de HgCl<sub>2</sub> solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

**Réactif de Wagner:** 2g de KI et 1,27g d'I<sub>2</sub> solubilisé dans 100 ml d'eau distillée. Evaporer 20 ml de l'extrait méthanolique de chaque plante à sec, ajouter 5 ml d'HCl (2N) au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Mayer ou de Wagner.

Introduire 1 ml de filtrat dans un tube à essais puis ajouter 5 gouttes de réactif. La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc jaunâtre.

### 1.2.2. Tanin

Agiter 2 ml de la solution à tester avec 2ml eau distillée, ajouter 2 à 3 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire ou verdâtre

### 1.2.3. Flavonoïdes

Traiter 5 ml de l'extrait avec quelques gouttes d'HCl concentré. Ajouter une quantité de tournures de magnésium (laisser agir). La présence des flavones aglycone est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou rose.

### 1.2.4. Saponosides

5 ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides.

### 1.2.5. Stérols et triterpènes

Dans un bécher, introduire 5ml de l'extrait à analyser, ajouter 5ml d'anhydride acétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré dans la paroi de bécher sans agiter. Laisser reposer 20 min. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence de stérols et triterpènes.

### 1.2.6. Composés réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 1ml de liqueur de Fehling (0,5ml réactif A et 0,5ml réactif B) à 1ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

### 1.2.7. Les coumarines

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 %, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

### 1.2.8. Mucilages

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube à essai et ajouté 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages.

### 1.2.9. Terpénoïdes

Dans un tube à essai, ajouter à 2 ml d'extrait, 2ml de chloroforme et 2 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

## 1.3. Analyse de l'extrait méthanolique de *Bêta vulgaris* et *Rutachalepensis*

### 1.3.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques des deux extraits de *Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis* (EMBV et EMRC) a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon **Li et al (2007)** basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstic ( $\text{WO}_4^{2-}$ ) phosphomolybdic ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) duré actif de Folin par les groupements oxydables des composés polyphénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**). Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200  $\mu\text{l}$  d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800  $\mu\text{l}$  d'une solution de carbonate de sodium (0,75%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200  $\mu\text{g/ml}$ ) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (Annexe).

### 1.3.2. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les deux extraits selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**). Brièvement, les échantillons sont préparés par la dissolution de 1mg extrait /1ml méthanol. 1 ml de chaque échantillon est ajouté à 1 ml

de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2%, dans le méthanol). Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 µg/ml) (Annexe) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de lyophilisat.

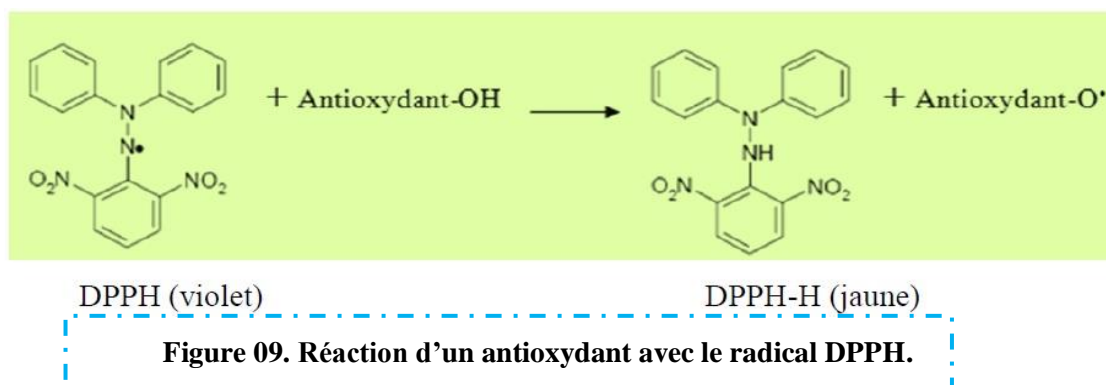
### 1.3.3. L'évaluation de l'activité anti-oxydante : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Pour étudier l'activité antiradicalaire des deux extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement instable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites anti oxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphénylpicryl-hydrazine: de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (**Sanchez-moreno, 2002**).

Selon le protocole décrit par **Mansouri et al (2005)**, la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol ( $6 \times 10^{-5}$  M). 25 µl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975 µl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{(\text{Abs contrôle}) - (\text{Abs échantillon})}{(\text{Abs contrôle})} \times 100$$

L'activité antioxydante de l'EMBV et l'EMRC *vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.



Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions allant de 0 à 2 mg/ml pour l'acide ascorbique et des deux EM.

Les différentes densités optiques ont permis de tracer pour chaque extrait, une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.

#### ❖ Calcul des IC<sub>50</sub>

IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC<sub>50</sub> (*Efficient concentration*50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (Torres et al, 2006).

**N.B :** L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

## 2. Etude pharmacologique

### 2.1. Le test de toxicité (Test d'innocuité)

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité. Pour cela, six doses des deux extraits méthanoliques de *Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis* ont été testées sur des lots de sept souris de poids homogène. Les doses de ; 100, 250, 500, 1000,2000 et 5000mg/kg sont administrées par voie orale (gavage). Les souris sont misent à l'observation continue durant 72h concernant les symptômes de toxicité, le changement de comportement et la mortalité (Litchfield et Wilcoxon, 1949).

### 2.2. Test de l'activité hypoglycémiant sur des souris normo-glycémiques

Afin de tester l'activité hypoglycémiant des deux extraits une dose de 500 mg/kg est administrée par gavage aux souris normo-glycémiques étaient à jeun depuis 16 heures. A l'aide d'un glycomètre, la glycémie est déterminée immédiatement après l'administration de l'extrait ( $t_0$ ), puis après 1, 2 et 3 heures. Le pourcentage de la variation de la glycémie par rapport à la glycémie initiale ( $t_0$ ) est calculé chaque heure pendant 3 heures. Des souris traitées avec 10ml/kg d'eau physiologique à 0.9% sont utilisés comme témoins.

### 2.3. Test de l'activité anti-hyperglycémiant

Afin de tester l'activité anti-hyperglycémiant et de choisir une dose à effet remarquable des deux extraits, on a évolué l'effet anti-hyperglycémiant de trois doses croissantes 100, 250, 500 mg/kg pendant trois heures.

#### 2.3.1. Induction de l'hyperglycémie

L'hyperglycémie est provoquée par l'administration de glucose aux souris à raison de 4g/kg per os selon la méthode de **N'Diaye et al (2008)**.

**2.3.2. Protocole du traitement des souris :** Pour ce test, un total de 49 souris répartis en sept lots de sept souris est traité ainsi :

- ❖ **Lot1** : Représente le groupe contrôle qui reçoit 10 ml/kg d'eau physiologique (EP) + 4g/kg de glucose après 90 minutes.
- ❖ **Lot 2** : Reçoit 100mg/10 ml/kg de EMBV+ 4g/kg de glucose après 90 minutes.
- ❖ **Lot 3** : Reçoit 250mg/10 ml/kg de EMBV + 4g/kg de glucose après 90 minutes.
- ❖ **Lot 4** : Reçoit 500mg/10 ml/kg de EMBV+ 4g/kg de glucose après 90 minutes.
- ❖ **Lot 5** : Reçoit 100mg/10 ml/kg de EMRC+ 4g/kg de glucose après 90 minutes.
- ❖ **Lot 6** : Reçoit 250mg/10 ml/kg de EMRC + 4g/kg de glucose après 90 minutes.
- ❖ **Lot 7** : Reçoit 500mg/10 ml/kg de EMRC+ 4g/kg de glucose après 90 minutes.

La glycémie des sept lots est évoluée à l'aide d'un glycomètre sur un intervalle de 60 minutes pendant trois heures.

### 2.4. L'étude sur les rats diabétiques

#### 2.4.1. Induction du diabète sucré chez les rats

Le diabète sucré est induit chez des rats maintenus à jeun pendant une nuit par une injection intrapéritonéale unique d'une solution de streptozotocine à raison de 50mg/kg



(Palsamy et Subramanian, 2008). La solution de la streptozotocine est fraîchement préparée dans une solution froide de tampon citrate 0,01M (pH 4,5).

La streptozotocine est capable d'induire une hypoglycémie fatale résulte d'une sécrétion pancréatique massive de l'insuline. Après l'administration de la streptozotocine et pour prévenir son effet fatal, les rats reçoivent une solution glucosée à 5 % pendant 48 heures. Généralement, le diabète se stabilise chez les rats après trois jours de l'injection. Après 72 heures de l'administration de la STZ, la glycémie est mesurée à jeun à l'aide d'un glucomètre (Chandra et al., 2007). Les rats qui ont montré une glycémie supérieure à 200 mg/dl ont été sélectionnés (Singh et al., 2005) et répartis en cinq groupes représentant les groupes diabétiques.

### 2.4.2. La préparation de la nourriture

La préparation de la nourriture est basée sur les matières premières mentionnées dans le tableau 01 selon la méthode suivante :

- ✓ Peser chaque métal et le broyer.
- ✓ Peser les éléments alimentaires (amidon, saccharose, cellulose, protéines (Ovalbumine) et vitamines) et les mélanger pendant 15 minutes.
- ✓ Ajouter les métaux avec les quantités mentionnés dans le tableau 02.
- ✓ Répartir la nourriture préparée en deux parties, ajouter le zinc à la première partie (régime alimentaire normal) et conserver la deuxième partie sans zinc (régime alimentaire carencé en zinc).
- ✓ Ajouter la quantité adéquate de l'huile dans chaque partie et la mélanger pendant 15 minutes.
- ✓ Stocker le régime dans des sacs noirs en plastique marqués et les conserver dans un endroit frais.
- ✓ Prélever des échantillons de 2g de chaque régime pour l'analyse du zinc.

Le dosage du zinc dans l'alimentation se fait selon la méthode de Southon et al, (1984), en utilisant le spectrophotomètre d'absorption atomique. Après le dosage on a trouvé que le régime alimentaire normal contient approximativement 54 mg du zinc par Kg et le régime alimentaire carencé en zinc contient environ 1.2 mg du zinc par Kg.

**Tableau 01:** Composition de la nourriture(Southon *et al.*, 1984).

Les matières premières	La quantité (g/kg nourriture)	Le pourcentage (%)
Amidon	326	32,6
Saccharose	326	32,6
Protéines	168	16,8
Cellulose	40	4
Mélange des Métaux	40	4
Vitamines	20	2
l'huile de maïs	80	8

**Tableau 02 :** La quantité des métaux (Southon *et al.*, 1984).

Le métal (mg /kg)	Régime alimentaire normale	Régime alimentaire carencé en zinc
Zinc	52.1	-
Cuivre	6.0	6.0
Iode	0.6	0.6
Manganèse	58.5	58.5
Fer	28.6	28.6
Calcium	7.11	7.11
Phosphate	14.02	14.02
Chlore	3.68	3.68
Potassium	3.34	3.34
Magnésium	0.70	0.70
Sodium	2.39	2.39

### 2.4.3. Traitement des animaux

35 rats sont répartis en cinq lots égaux (07rats /lot) :

- **Lot 1** : Rats non diabétiques sous un régime alimentaire normal (ND).
- **Lot 2** : Rats diabétiques sous un régime alimentaire normal (D).
- **Lot 3** : Rats diabétiques sous à un régime pauvre en zinc (D-Zn).
- **Lot 4**: Rats diabétiques sous un régime alimentaire pauvre en zinc traités par l'EM *Rûta chalepensis* 500 mg/kg (D-Zn+R).
- **Lot 5** : Rats diabétiques sous un régime alimentaire pauvre en zinc traités par l'EM *Bêta vulgaris* 500 mg/kg (D-Zn+B).

Le traitement a été effectué par gavage pendant 21 jours.

### 2.4.4. Prélèvement sanguin

Après 21 jours de traitement les six groupes sont sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans des tubes secs étiquetés, puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Le sérum est séparé en trois fractions dans des tubes éppendorfs et stockés au congélateur à une température de (-20° C) jusqu'au moment de dosage.

### 2.4.5. Prélèvement des organes

Après la dissection le foie, les reins, le cœur, le pancréas et le fémur sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium (Na Cl) à 0.9 % et pesés. Le rein, le fémur, 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, le cœur et le rein sont coupés en petits morceaux et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur dans une solution de Kcl (1,15%) à raison de 10% (p/v). Les homogénats obtenus sont centrifugés à 4000 tours/min pendant 10min pour éliminer les débris cellulaires .Ensuite, les surnagent sont récupérés dans des tubes secs et stockés à -20° C jusqu'à l'utilisation pour le dosage du paramètres de stress oxydatif. Le pancréas est conservé dans une solution de formol 10% jusqu'au moment de réalisation des coupes histologiques. La figure 10 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

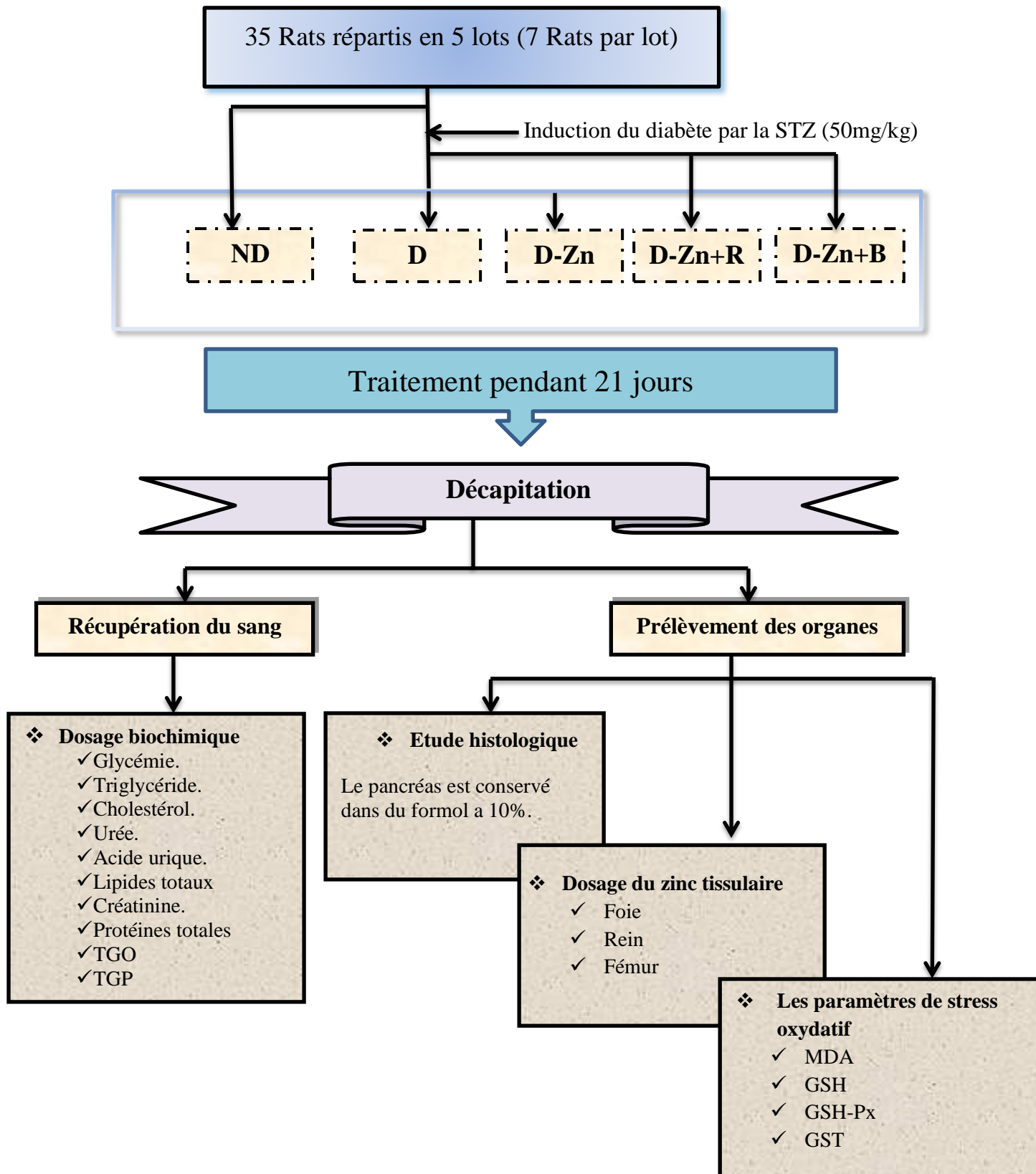


Figure 10. Schéma récapitulatif du Protocole expérimental

### 2.4.6. Dosage du zinc

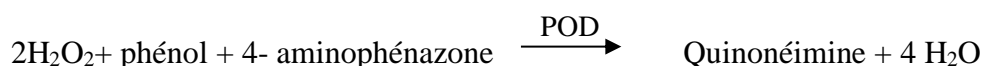
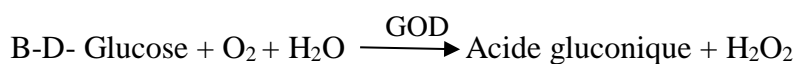
Les organes préalablement séchés sont mis au four (moufle fournaise) à 480°C après 48 heures ils se sont transformés en cendres. Après les avoir placés sur une plaque chauffante, on leur a ajouté l'acide nitrique. L'ensemble est agité jusqu'à ce qu'il devienne homogène. Enfin, les échantillons sont filtrés à l'aide de papier filtre (Whatman N° 542). Le dosage du zinc dans le sérum et les organes se fait à l'aide de spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme (Pye Unicam SP 9000, Hitchin, UK) (Southon et al., 1984). La concentration du zinc est déterminée par comparaison à une gamme étalon de nitrate de zinc (1mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (Annexe).

### 2.4.7. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques

#### 2.4.7.1. Dosage du glucose : selon la fiche technique Spinreact

##### ❖ Principe

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



##### ❖ Echantillon : Sérum

##### ❖ Les réactifs utilisés

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

##### ❖ Préparation de réactif de travail (RT)

## Matériels et Méthodes

- Dissoudre le contenu de réactif (R2) dans la fiole de réactif (R1).
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable un mois à 2-8 °C, ou 7 jours à 15-25 °C.

### ❖ Mode opératoire

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

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

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

### ❖ Calcul

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

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

### 2.4.7.2. Dosage des lipides totaux (selon la fiche technique spinreact)

#### ❖ Principe

Les lipides totaux forment avec le phosphovainilline et en présence de l'acide sulfurique un complexe coloré, l'intensité de sa couleur est proportionnelle à la concentration des lipides totaux dans les échantillons (**Kaplan et al., 1984**).

❖ **Echantillon** : Sérum.

❖ **Réactif**

Réactif	Composition	Concentration
Réactif	Phosphovainilline	235 mmol/L
Etalon	Lipides totaux	750 mg/dl
Réactif optionnel	Acide sulfurique	80%

❖ **Mode opératoire**

	<b>Blanc</b>	<b>Etalon</b>	<b>Echantillon</b>
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ml)</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>
<b>Etalon (µl)</b>	-	<b>100</b>	
<b>Echantillon (µl)</b>	-	-	<b>100</b>
<b>Eau (µl)</b>	<b>100</b>		

- ✓ Mélanger bien et incuber les tubes à essai pendant 10 min dans un bain marie à 100 °C.
- ✓ Refroidir les tubes dans l'eau congelée.

<b>Surnagent (µl)</b>	-	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>Phosphovaniline (ml)</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>

- ✓ Agiter et incuber pendant 15 min à 37 °C. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 520 nm. La coloration finale est stable pendant une heure.

❖ **Calcul de la concentration**

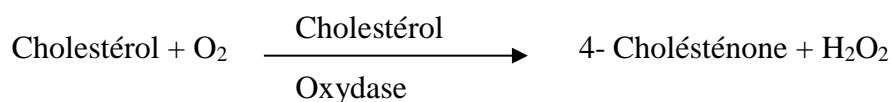
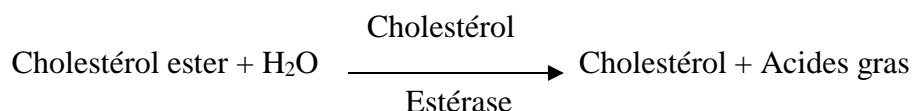
La concentration des lipides totaux sériques est calculée par la formule suivante :

$$\text{Lipides totaux (mg / dl)} = \frac{\text{Do échantillon}}{\text{Do étalon}} \times 750 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

**2.4.7.3. Dosage de cholestérol** (selon la fiche technique Spinreact)

❖ **Principe**

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



❖ **Echantillon : Sérum.**

❖ **Les réactifs utilisés**

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

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

Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole du réactif R1.

Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif est stable 4 mois à 2-8°C ou 40 jours à 15-25°C.

❖ **Mode opératoire**

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

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

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

❖ **Calcul**

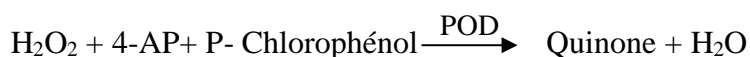
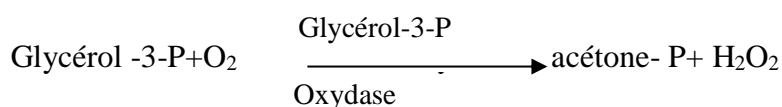
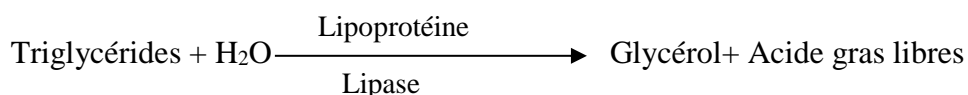
$$[\text{Cholestérol}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 200 \text{ (concentration de l'étalon).}$$



#### 2.4.7.4. Dosage des triglycérides (selon la fiche technique Spinreact)

##### ❖ Principe

Les triglycérides sont déterminés après une hydrolyse enzymatique par les lipases. L'indicateur est une quinone formée d'après les quatre réactions suivantes (Fossati, 1980) :



##### ❖ Echantillon : Sérum

##### ❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>1</sub>	GOOD pH 7,5	50 mmol/L
Tampon	P- chlorophénol	2 mmol/ L
R <sub>2</sub>	Lipoprotéine Lipase (LPL)	150000 U/L
Enzymes	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3- P- Oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase	440U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,1 m mol/ L
	ATP	0,1 m mol/ L
Etalon	Triglycérides	200 mg/dl

#### Préparation du réactif de travail (RT)

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole de réactif R1.

- Mélanger bien la solution jusqu'elle devient homogène. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à la température ambiante.

### ❖ Mode opératoire

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

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

### ❖ Calcul

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

#### 2.4.7.5. Dosage des protéines totales dans le sérum (selon la fiche technique Spinréact)

### ❖ Principe :

Les protéines du sérum forment dans un milieu alcalin avec les ions de cuivre, un complexe coloré en bleu violet. L'intensité de la couleur violette est proportionnelle à la quantité des protéines présentées dans l'échantillon (Burtis et al., 1999).



### ❖ Echantillon : Sérum

### ❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
RT (Biuret)	-Sodium Potassium Tartrate. -Sodium iodique. -Potassium iodique. - Sulfate de cuivre	15 mmol /l 100 mmol /l 5 mmol/l 19 mmol/l
Etalon	-Sérum Bovin Albumine	7 g/dl

### ❖ Préparation du réactif de travail (RT) : Le réactif est prêt à l'emploi.

❖ **Mode opératoire**

	<b>Blanc</b>	<b>Etalon</b>	<b>Echantillon</b>
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	25	-
Echantillon (µl)	-	-	25

-Mélanger et incuber les tubes pendant 5min à 37 °C ou 10 min à 15-25°C.

-Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 540 nm contre le blanc, la couleur est stable pendant 30 min.

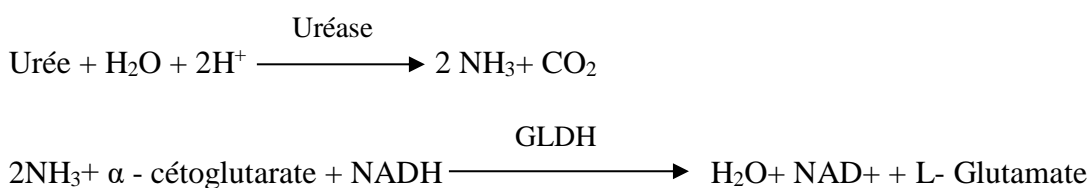
❖ **Calcul**

$$[\text{Protéines}] \text{ (g/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 7 \text{ (concentration de l'étalon).}$$

**2.4.7.6. Dosage de l'urée** (selon la fiche technique Spinreact)

❖ **Principe**

La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode cinétique utilisant l'uréase selon les réactions suivantes(Kaplan, 1984) :



La concentration de l'urée sérique est proportionnelle à la disparition du NADH<sup>+</sup>.

❖ **Echantillon : Sérum**

❖ **Les réactifs utilisés**

<b>Réactifs</b>	<b>Composition</b>	<b>Concentration</b>
R <sub>1</sub> Tampon	Tris pH 7,8 α- kétoglutarate	80 mmol/ L 6 mmol/ L
R <sub>2</sub> Enzymes	Uréase Glutamate déshydrogénase GLDH NADH	3750 U/L 6000 U/L 0,32 m mol/ L
Etalon	Urée	50 mg/ dl

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

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole du réactif R1.
- Mélanger bien jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif préparé est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à 15-25°C.

❖ **Mode opératoire**

	<b>Blanc</b>	<b>Étalon</b>	<b>Echantillon</b>
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

- Agiter bien les tubes et lire l'absorbance après 30 secondes (A1) et après 90 s (A2) à la longueur d'onde 340 nm.

❖ **Calcul**

$$[\text{Urée}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(\Delta A)_{\text{échantillon}}}{(\Delta A)_{\text{étalon}}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

**2.4.7.6. Dosage de la créatinine :** selon la fiche technique Spinreact

❖ **Principe**

La créatinine présentée dans l'échantillon réagit avec le picrate en milieu alcalin pour donner un complexe dans des périodes initiales courtes en évitant ainsi l'interférence d'autre composé (Murray et Kaplan, 1980).

❖ **Echantillon : Sérum**

❖ **Les réactifs utilisés**

<b>Réactifs</b>	<b>Composition</b>	<b>Concentration</b>
R <sub>1</sub>	Acide picrique	17,5 m mol/ L
R <sub>2</sub>	Hydroxyde de sodium	0,29 m mol/ L
Étalon	Créatinine	2 mg/ dl

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

- Mélanger des volumes égaux des réactifs R1 et R<sub>2</sub>. Ce réactif de travail est stable 10 jours à 15-25°C.

❖ **Mode opératoire**

	<b>Blanc</b>	<b>Etalon</b>	<b>Echantillon</b>
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	100	-
Echantillon (µl)	-	-	100

- Mélanger bien puis lire l'absorbance après 30 sec (A1) et après 90 sec (A2) à la longueur d'onde 492 nm.

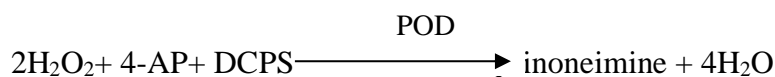
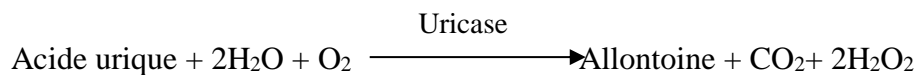
❖ **Calcul**

$$[\text{Créatinine}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\Delta A_{\text{éch}} - \Delta A_{\text{blanc}}}{\Delta A_{\text{étalon}} - \Delta A_{\text{blanc}}} \times 2 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

**2.4.7.8. Dosage de l'acide urique :** selon la fiche technique Spinreact

❖ **Principe**

L'acide urique présent dans l'échantillon donne selon les réactions décrites ci-dessous un complexe coloré : quinoneimine où l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique sérique (**Schultz et al., 1984**).



❖ **Echantillon : Sérum**

❖ **Les réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>1</sub> Tampon	Phosphate pH 7,4 2-4 Dichlorophénolsulfonate (DCPS)	50 mmol/ L 4 mmol/ L
R <sub>2</sub> Enzymes	Uricase Peroxydase (POD) Ascorbate oxydase 4- Aminophénazone (4- AP)	60 U/L 660 U/L 200 U/L 1 m mol/ L
Etalon	Acide urique	6 mg/dl

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

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole du réactif R1.
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif est stable pendant un mois à 2-8°C ou 10 jours à 15-25°C.

❖ **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µl)	-	25	-
Echantillon (µl)	-	-	25

- Mélanger et incuber les tubes pendant 10 min à la température ambiante.
- Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 520 nm contre le blanc dans les 30 minutes.

❖ **Calcul**

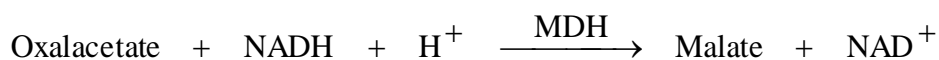
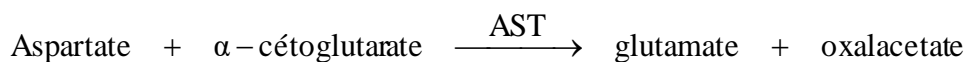
$$[\text{Acide urique}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{étalon}}} \times 6(\text{concentration de l'étalon})$$

**2.4.7.9. Dosage de l'activité d'Aspartate amino transférase** (selon la fiche technique spinreact)

❖ **Principe**

L'aspartate amino transferase (AST) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transférase

(GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -cétooglutarate formant le glutamate et l'oxalacetate. L'oxalacetate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Murray, 1984).



❖ **Echantillon** : sérum

❖ **Réactifs**

Réactif	composition	concentration
R1 Tampon	Tris pH 7.8 L- Aspartate	80 mmol/L 200 mmol/L
R2 Substrat	NADH Lactate déshydrogenase (LDH) Malate déshydrogenase (MDH) $\alpha$ -cétooglutarate	0.18 mmol/L 800 U/L 600 U/L 12 mmol/L

❖ **Préparation de réactif du 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.

❖ **Mode opératoire**

RT (ml)	1.0
Echantillon ( $\mu$ l)	100

On mélange et/ ou incube pendant 1 minute puis on lit l'absorbance (A), la densité optique DO à 340 nm contre le blanc réactif. Avec trois répétitions (à chaque fois 1 min d'incubation).

❖ **Calcul de l'activité**

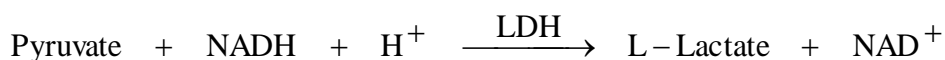
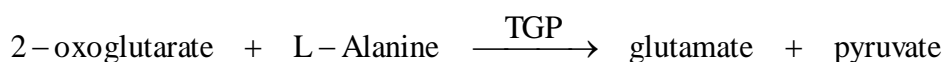
L'activité d'aspartate amino transférase sérique est calculée par la formule suivante :

$$\text{AST U/L} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

**2.4.7.10. Dosage de l'activité d'Alanine amino transférase** (selon la fiche technique spinreact)

❖ **Principe**

Le principe est présenté par le schéma réactionnel suivant (Murray, 1984):



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase dans l'échantillon.

❖ **Echantillon** : sérum

❖ **Réactifs**

Réactif	composition	concentration
R1 Tampon	Tris pH 7.8 L- Alanine	100 mmol/L 500 mmol/L
R2 Substrat	NADH Lactate déshydrogenase (LDH) Oxoglutarate	0.18 mmol/L 1200 U/L 15 mmol/L

❖ **Préparation de réactif de travail (RL)**

Dissoudre le contenu de R2 dans le flacon R1. Ce réactif est stable 2 semaines à 2-8°C

❖ **Mode opératoire**

<b>Réactif (ml)</b>	1.0
<b>Echantillon (µl)</b>	100

Mélanger, incuber les tubes préparés pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance (A) à 340 nm avec trois répétitions (à chaque fois 1 min d'incubation).

❖ **Calcul de l'activité**

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

$$\text{ALAT U/L} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

## 2.4.8. Analyse des paramètres tissulaires

### 2.4.8.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique dans le foie, rein et cœur est évaluée par le dosage de



malondialdéhyde (MDA) selon la méthode d'**Ohkawa et al (1979)**. Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. Une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose. Pour le dosage du MDA, 0,5 ml de l'homogénat, 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/minute, l'absorbance est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 532 nm. La concentration de MDA est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec une solution de « 1,3,3,3-tétratoxypropane » qui donne le MDA après son hydrolyse (Annexe).

### 2.4.8.2. Dosage du glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode d'**Ellman (1959)** modifiée par **Jollow et al (1974)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion. La procédure expérimentale de dosage du glutathion réduit est la suivante :

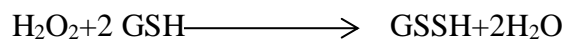
- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat ;
- ✓ Ajouter 0.2 ml de solution d'acide salicylique (0.25%) ;
- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace ;
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min ;
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant ;
- ✓ Ajouter 1 ml de tampon Tris, pH 9.6 ;
- ✓ Mélanger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

$$GSH(n \text{ mol/mg protéine}) = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \text{mg protéine}}$$

- 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

### 2.4.8.3. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante :



Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✓ Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- ✓ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- ✓ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✓ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- ✓ Ajouter 0.2ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✓ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- ✓ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✓ Prélever 0.48 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- ✓ Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM)
- ✓ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GSH - Px } (\mu \text{ mol GSH/min/mg protéine}) = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}} \times \frac{5}{\text{mg protéine}}$$

0.04 : Concentration de substrat GSH.

### 2.4.8.4. Dosage de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs) :

La mesure de l'activité des GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de **Habiget al (1974)** ; celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (CDNB-GSH) à une température de 37°C et à un pH de 6.5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
CDNB (0.02M)	50	50
GSH (0.1M)	100	100
Homogénat	-	20

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

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

$$\text{GST (nmol CDNB – GSH/min/mg protéine)} = \frac{\left( DO \frac{\text{échantillon}}{\text{min}} - DO \frac{\text{Blanc}}{\text{min}} \right)}{9.6 \times \text{mg de protéine}}$$

9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

9.7

### 2.4.8.5. Dosage des protéines :

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (–NH<sub>2</sub>) 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).

Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✓ 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 (Annexe).

### 2.4.9. Etude histologique

Les coupes histologiques du pancréas ont été réalisées suivant la technique classique du **Hould (1984)**.

Pour chaque rat, on prélève un fragment du pancréas de 0,5 cm<sup>3</sup>, ces fragments sont mis directement dans du formol, fixateur couramment utilisé. Puis ces morceaux sont retirés et coupés à l'aide du couteau tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1-2 cm<sup>2</sup> et une épaisseur proche de 1,5 mm. Les pièces obtenues sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

- **Déshydratation**

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

- **Inclusion**

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

- **Coloration**

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

- 1- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau de robinet puis rincer à l'eau distillé.
- 2- Immerger dans un bain d'hématoxyline de Harris (15 min) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- 3- Différencier les coupes dans l'alcool acide (100 ml éthanol à 70% + 50 ml HCl) puis les rincer à l'eau de robinet.
- 4- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale (100 ml d'eau distillé + 2 ml d'ammoniaque).
- 5- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 min) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
- 6- Déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau de robinet.
- 7- Enfin, passer à l'observation au microscope photonique, lequel est équipé d'un appareil photographique.

### 2.5. Etude statistique

L'étude statistique est réalisée à l'aide du système Origin Pro 8 en utilisant le test de variance univariée (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey.

Pour l'étude expérimentale sur les animaux, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M et en comparant les différents groupes où :

- a : Comparaison du lot D avec le lot ND.
- b : Comparaison du lot D-Zn avec le lot D.
- c : Comparaison du lot D-Zn+R et D-Zn+B avec le D-Zn.

Les différences sont considérées comme :

- (a, b, c) significatives lorsque ( $p < 0.05$ ).
- ( $a_1, b_1, c_1$ ) hautement significative lorsque ( $p < 0.01$ ).
- ( $a_2, b_2, c_2$ ) très hautement significative lorsque ( $p < 0.001$ ).

Avec  $p < 0,05$  : Seuil de signification.

# *Résultats & Discussion*



## Résultats

### 1. Etude phytochimique

#### 1.1. Rendement d'extraction

L'opération de l'extraction à partir de 250 g du matériel végétal à l'aide du méthanol et après lyophilisation a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut tel que y est mentionnée dans le **Tableau 03**.

L'extrait méthanolique récupéré après évaporation à sec et sous pressions réduite suivis d'une lyophilisation a été pesé pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les flavonoïdes et les composés phénoliques. Le rendement exprimé en pourcentage a été déterminé par rapport à 250g de la poudre fine. Subissant une extraction douce à température ambiante durant 24 heures. *Ruta chalepensis* a donné une masse en extrait sec méthanolique égale à 23,45g correspondant à un rendement de **9,38%** alors que *Beta vulgaris* a donné une masse égale à 21,45g correspondant à un rendement de **8,58%**.

**Tableau 03:** Le rendement d'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris*.

La quantité d'extrait à partir de 250 g	<i>Bêta vulgaris</i>	<i>Ruta chalepensis</i>
Rendement (g)	21,45	23,45
Rendement %	8,58	9,38

#### 1.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur l'EMRC et l'EMBV révèlent la présence de plusieurs familles de composés. Les résultats montrent la présence des flavonoïdes, tanins, mucilages, coumarines, stérols, terpènes, saponosides et des composés réducteurs dans les deux plantes, tandis que la présence des alcaloïdes uniquement chez *Ruta chalepensis* (**Tableau 04**).

Tableau 04 : Résultats des tests phytochimiques.

	<i>Bêta vulgaris</i>	<i>Ruta chalepensis</i>
<b>Flavonoïdes</b>	+	+
<b>Tanins</b>	+	+
<b>Mucilages</b>	+	+
<b>Coumarines</b>	+	+
<b>Stérols</b>	+	+
<b>Terpènes</b>	+	+
<b>Saponosides</b>	+	+
<b>Composés réducteurs</b>	+	+
<b>Alcaloïdes</b>	-	+

(+) présence, (-) Absence

### 1.3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalciu montre, en plus de sa sensibilité, une reproductivité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon,  $r = 0.99$  (**Annexe**).

Les résultats de dosage de polyphénols révèlent que l'EMRC et l'EMBV contiennent respectivement 43,40 mg et 31,23 mg d'équivalent d'acide gallique/g de lyophilisat.

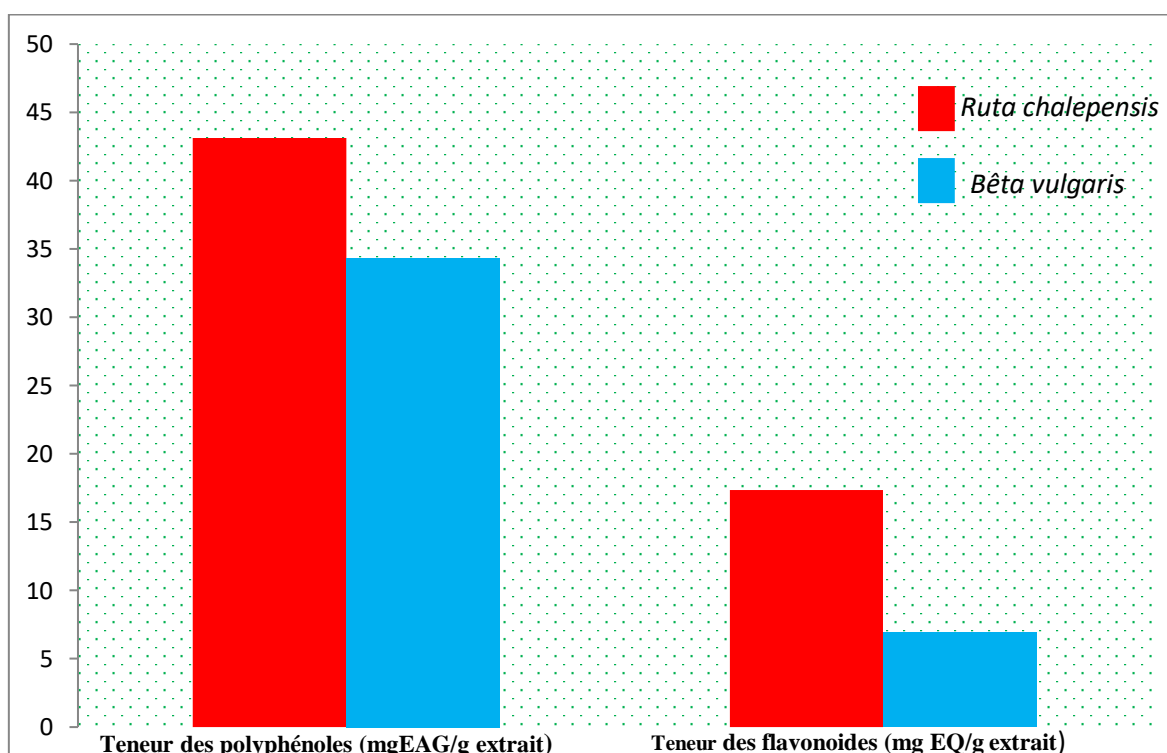
L'évaluation quantitative des flavonoïdes (la quercétine sert de standard) montre une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde (0 à 40  $\mu\text{g/ml}$ ) et l'absorbance avec un

coefficient de corrélation  $r = 0.99$  (**Annexe**). Les teneurs en flavonoïdes varient dans les mêmes proportions que celle des polyphénols: les résultats révèlent la présence de 17,34 mg EQ/g extrait et 6,93mg EQ/g extrait dans *Ruta chalepensis* et *Bêta vulgaris* respectivement **Tableau (05)** et **figure (11)**.



**Tableau 05:** Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMBV et l'EMRC.

	Teneur en polyphénols (mg EAG /g)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g extrait)
<i>Bêta vulgaris</i> «var. cicla»	31,231 ± 0.0066	6,85 ± 0,087
<i>Ruta chalepensis</i>	43,405± 0.0122	17,34±0.042



**Figure 11.** Teneur des polyphénols et des flavonoïdes dans les deux extraits

## 2. L'évaluation de l'activité anti-oxydante (DPPH)

L'activité antiradicalaire *in vitro* des flavonoïdes est évaluée par la diminution du taux de DPPH° dosé après l'addition de l'extrait à différentes concentrations. Le pouvoir antiradicalaire le plus élevé est observé pour *Ruta chalepensis* (65,811%) contre 58,68% pour *Bêta vulgaris* mais il reste un pouvoir inférieur à celui qu'exerce l'acide ascorbique (95,72%).

Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piégeant 50% du radical DPPH° (IC<sub>50</sub>) qui était de (1,5 mg/ml) pour l'EMRC et (1,74 mg/ml) pour l'EMBV contre (0,12 mg/ml) pour l'acide ascorbique (**Figure12**).

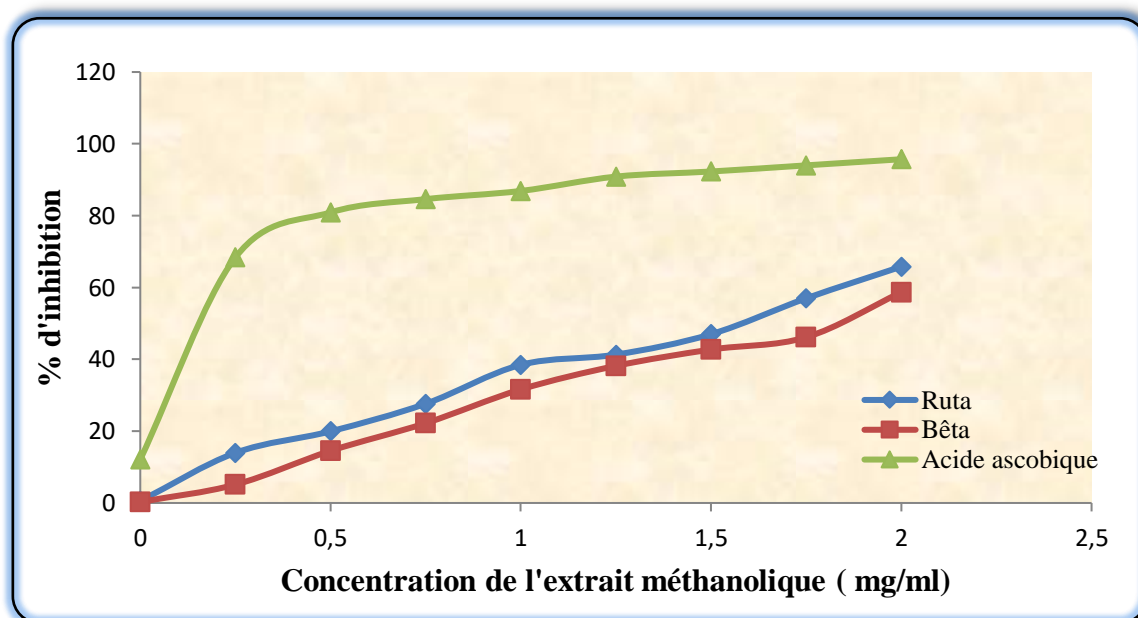


Figure 12. Effet antiradicalaire de l'EMBV et l'EMRC sur le radical DPPH°.

### 3. Investigations expérimentales sur les animaux

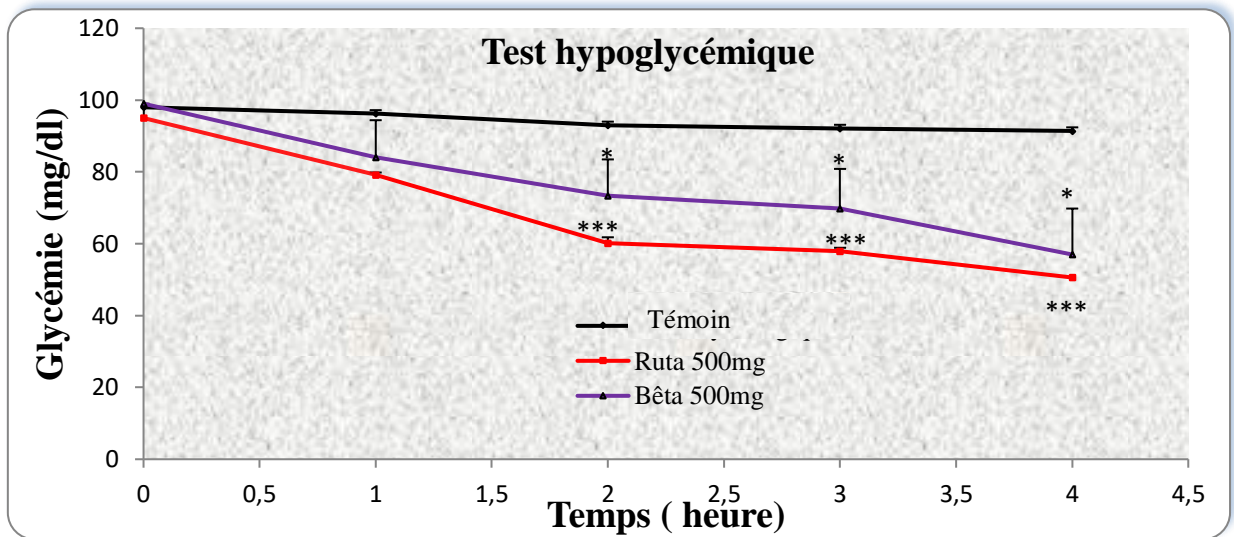
#### 3.1. Test de toxicité

Avec les différentes doses testées; 100, 250, 500, 1000, 2000 et 5000 mg/kg aucune perte de souris n'a été constatée, ainsi toutes les souris étaient calmes, avec une respiration soutenue, aucune paralysie n'a été déplorée. On a constaté que les deux extraits ne sont pas toxiques jusqu'à 5000 mg/kg.

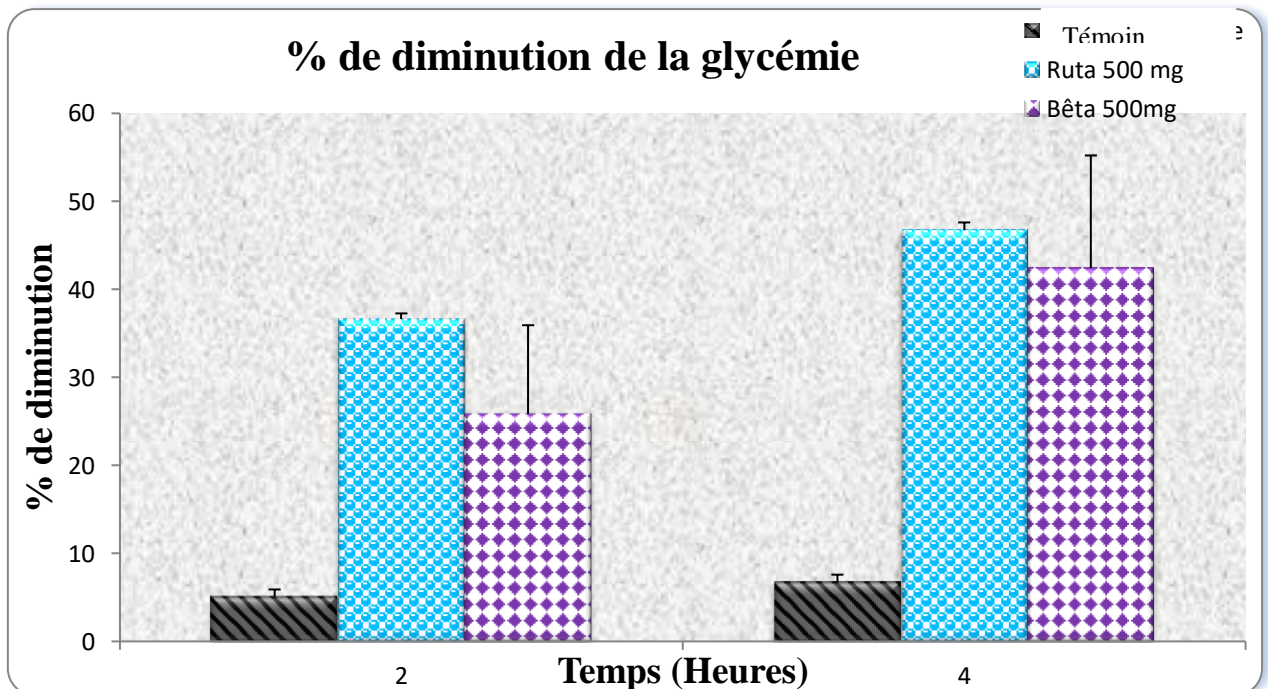
#### 3.2. Test de l'activité hypoglycémiant sur les souris normo-glycémiques

Les résultats de l'évaluation de l'activité hypoglycémiant sur les souris normo-glycémiques traitées par l'EMBV et l'EMRC sont illustrés dans les figures 13 et 14.

Nous constatons que la glycémie basale chez les souris témoins ( $98 \pm 3,44$  mg/dl) n'a pas été diminuée au bout de 4 heures ( $91,418 \pm 0,47$  mg/dl), tandis que la dose de l'EMRC à 500 mg/kg a un effet hypoglycémiant très hautement significative ( $p < 0,001$ ) ( $95 \pm 0,37$  mg/ml) après quatre heures d'observation ( $50,6 \pm 0,50$  mg/dl) et la dose de l'EMBV à 500 mg/kg a aussi un pouvoir hypoglycémiant significative ( $p < 0,05$ ) ( $99 \pm 10,4$  mg/ml) après 04 heures d'observation ( $57 \pm 3,36$  mg/dl) (Figure 13). Les pourcentages de la diminution de la glycémie par rapport à la glycémie basale sont montrés sur la figure 14.



**Figure 13.** Évaluation de l'activité hypoglycémiant sur les souris normo-glycémiques traités par l'EMBV et l'EMRC (n = 7 souris par lot).



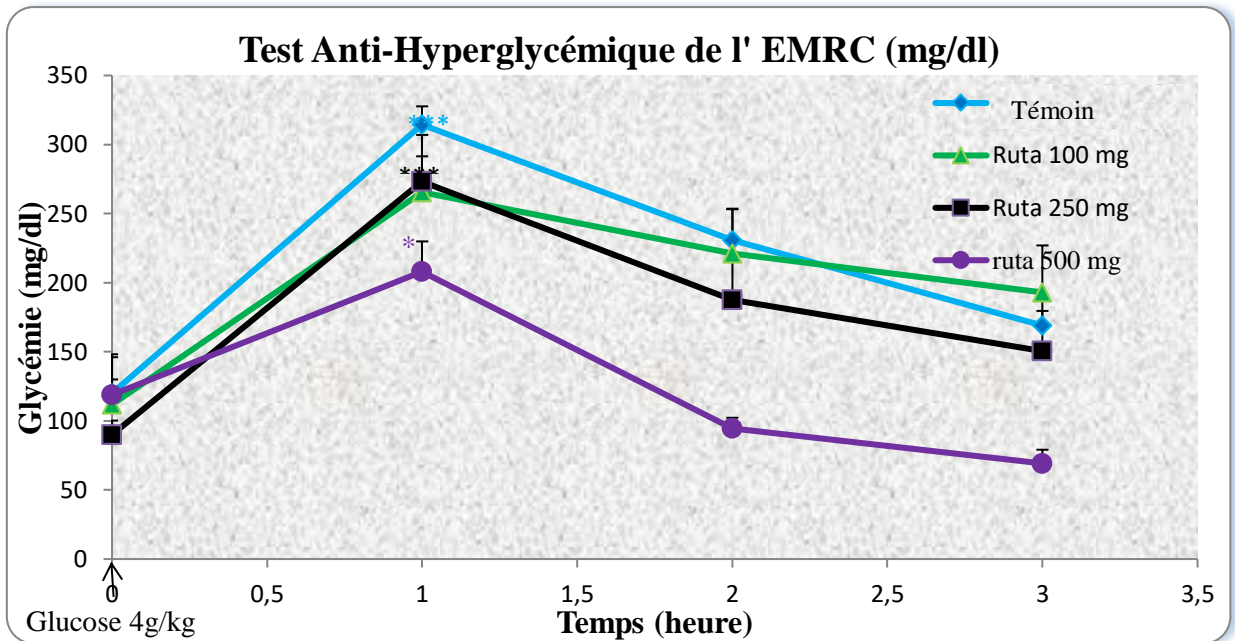
**Figure 14.** Pourcentage de la diminution de la glycémie par rapport à la glycémie basale des souris (n=7 souris par lot).

### 3.3. Test de l'activité anti-hyperglycémiant

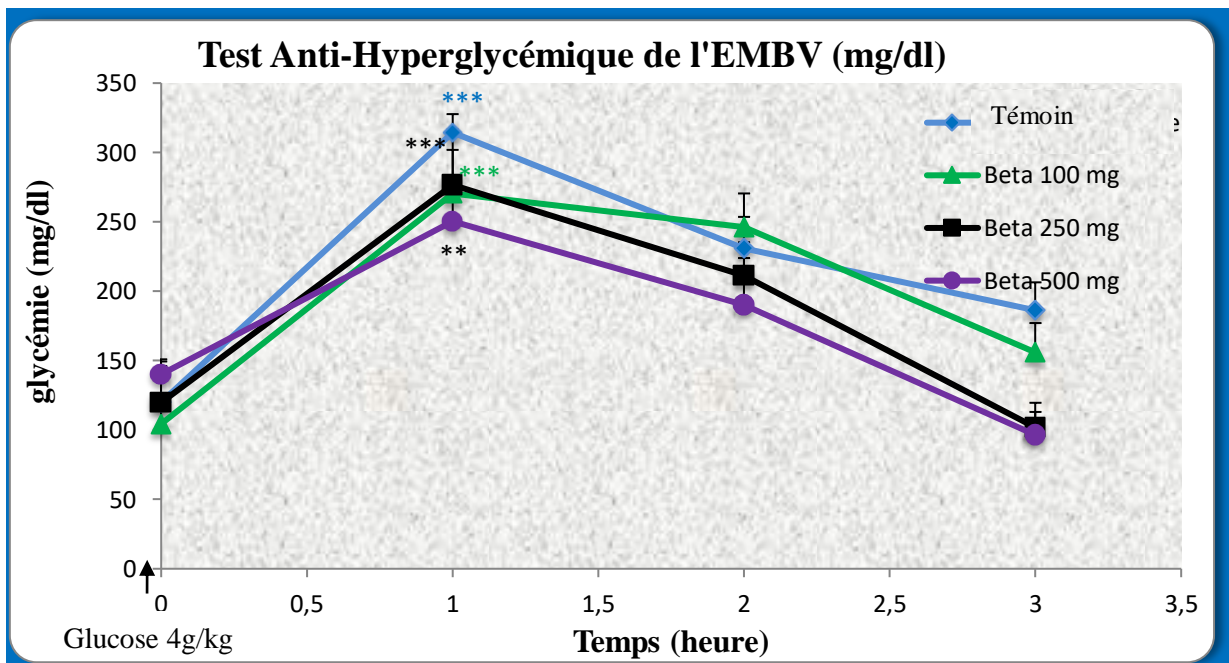
La figure 15 montre l'effet de trois doses croissantes de l'EMBV et de l'EMRC chez des souris rendus hyperglycémiques par gavage de 4g/kg de glucose. Puisque une diminution significative de la glycémie a été observée à la deuxième heure chez les souris normo-glycémiques traités par 500 mg/kg de l'extrait, ce dernier est administré oralement à différentes doses une heure et demi (1h:30min) avant l'administration du glucose de manière que l'effet significatif de la dose déjà testée coïncide avec la glycémie maximale des rats hyperglycémiques contrôles au même temps que les animaux testés. Les autres doses sont utilisées pour être comparées à la dose de 500 mg/kg afin de choisir la moindre dose avec le meilleur effet.

Chez le groupe de rats contrôle, l'administration de glucose à la dose de 4g/kg entraîne une hyperglycémie significative avec un pic qui apparaît au bout de 60 minutes (Figure15, 16). La glycémie varie en effet de  $1.20 \pm 0.26$  à  $3.14 \pm 0.51$  g/l ( $p < 0.001$ ). Chez les rats préalablement traités avec l'EMRC et l'EMBV à différentes doses, l'augmentation de la glycémie obtenue après administration du glucose est moins importante que celle du groupe contrôle pour la dose de 500 mg/kg, soit  $1.18 \pm 0.29$  à  $2.08 \pm 0.19$  ( $p < 0.05$ ) et  $1.40 \pm 0.03$  à  $2.50 \pm 0.12$  g/l ( $p < 0.01$ ) respectivement, mais elle reste significative.

Après les résultats obtenus par le test de l'activité hypoglycémiant et le test de tolérance, on a choisi la dose de 500 mg/kg pour évaluer l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* et de *Beta vulgaris var cicla*



**Figure 15.** Test Anti-Hyperglycémique de l'EMRC. La comparaison est faite avec la glycémie initiale de chaque lot, (\*): $p < 0,05$  ; (\*\*\*) :  $p < 0,001$  (n=7 souris par lot).



**Figure 16.** Test Anti-Hyperglycémique de l'EMBV. La comparaison est faite par rapport à la glycémie initiale de chaque lot, (\*\*) $p < 0,01$  ; (\*\*\*)  $p < 0,001$  (n=7 souris par lot).

### 3.4. L'étude sur les rats diabétiques

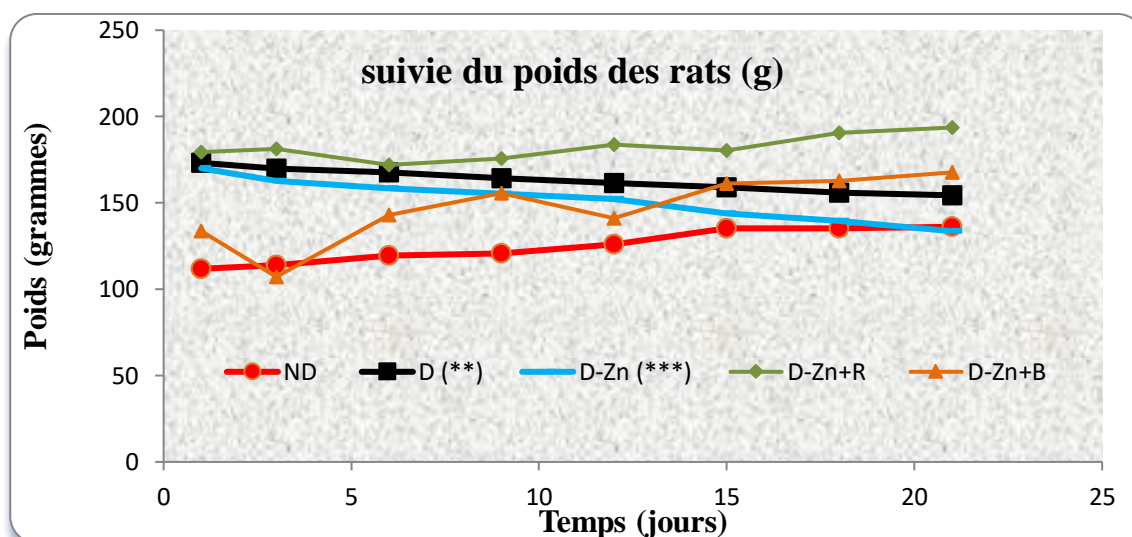
Après l'installation du diabète, on a commencé le traitement des différents lots selon le protocole précédemment décrit. Durant les premiers jours du traitement, on a noté un état de polyurie chez tous les rats diabétiques par rapport aux rats normaux avec augmentation de la consommation de l'eau et de la nourriture. Après trois semaines de traitement, ces symptômes tendent à se diminuer chez les rats diabétiques traités avec l'EMRC et ceux traités avec l'EMBV alors qu'il n'y a aucune amélioration chez les rats diabétiques contrôles. Les variations de la glycémie et du poids des rats des différents lots sont notées dès la première semaine, alors que les paramètres biochimiques sériques et tissulaires ainsi que les coupes histologiques sont analysés après le sacrifice des animaux.

#### 3.4.1. Etude de la croissance corporelle des rats pendant le traitement

Le suivi de la variation de la masse corporelle des rats au cours de l'expérience, nous a permis de constater les variations par la comparaison du poids des lots par rapport à leurs poids initiaux. Les résultats sont illustrés dans le **tableau 06** et la **figure 17**.

Nous constatons une diminution très hautement significative du poids des rats diabétiques soumis à un régime pauvre en zinc, une diminution hautement significative du poids des rats diabétiques soumis à un régime normal et une augmentation non significative chez les lots : (D-Zn+R) et (D-Zn+B) par rapport au poids initial de chaque lot.

Notons qu'il y a une acquisition de poids pour les rats diabétique traités par l'EMRC ( $14,26 \pm 3,28$ ) et l'EMBV ( $12,6 \pm 3,36$ ) soumis à un régime pauvre en zinc tandis qu'une perte de poids considérable chez les rats diabétiques soumis à un régime alimentaire normal ( $-18 \pm 6,64$ ) et une perte plus conséquente pour les rats diabétiques soumis à un régime pauvre en zinc ( $-36,4 \pm 5,84$ ) (**figure 18**).



**Figure 17.** Suivie du poids de rats durant le traitement {la comparaison est faite par rapport au poids initial de chaque lot : (\*\*) :  $p < 0,01$  ; (\*\*\*) :  $p < 0,001$  ( $n = 7$  rat par lot).

**Tableau 06:** le poids initial et final chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).

Paramètres Lots	Poids initial (g)	Poids final (g)
ND	134 ± 6,4	159.20 ± 3.36
D	173,2 ± 9,76	154.40 <sup>a</sup> ± 8.72
D – Zn	170 ± 8,4	133.60 <sup>b1</sup> ± 14.48
D– Zn+R	179,4 ± 13,12	193.66 <sup>c1</sup> ± 10.53
D– Zn+ B	133,8 ± 22,64	159.30 <sup>c2</sup> ± 7,46

Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$

<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b1</sup> $p < 0.01$  : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c1</sup> $p < 0.01$ , <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.

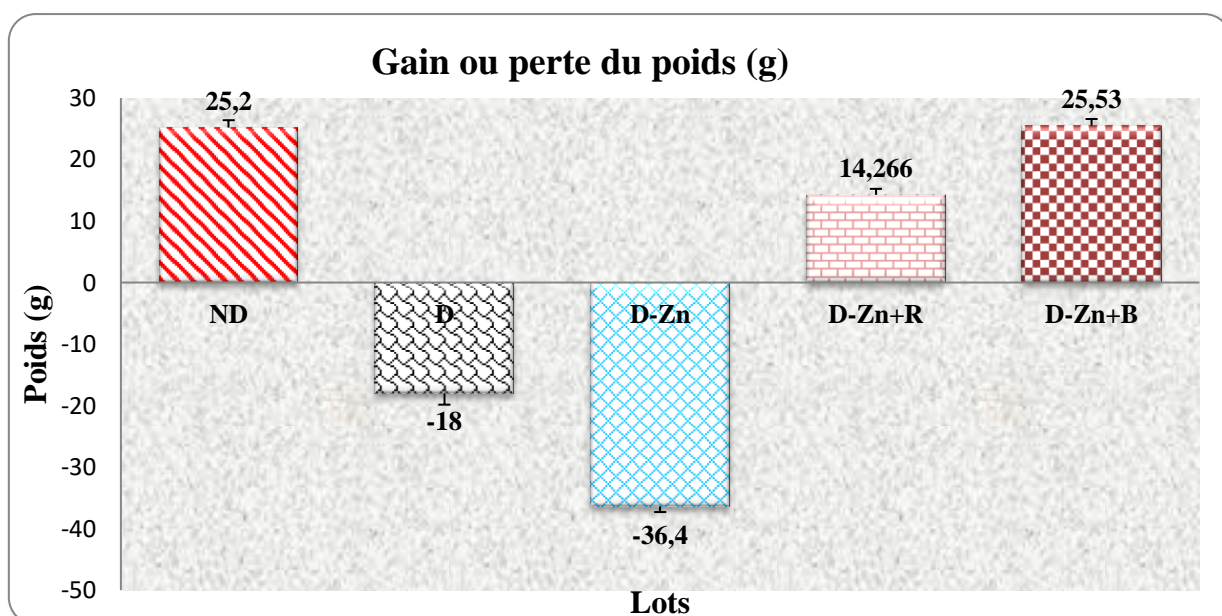


Figure 18. Gain ou perte du poids des rats à la fin du traitement (n=7).

### 3.4.2. Le suivi de la glycémie pendant le traitement

Pendant le traitement, nous avons suivi les variations de la glycémie des rats qui sont illustrées dans la **Figure 19** et le **Tableau 07**.

Nous constatons une augmentation très hautement significative ( $p < 0,001$ ) de la glycémie des rats diabétiques ( $287 \pm 24 \text{ mg/dl}$ ) par rapport aux rats non diabétiques ( $102 \pm 4,4 \text{ mg/dl}$ ) au bout de 21 jours de traitement.

Une augmentation très hautement significative ( $p < 0,001$ ) de la glycémie est notée chez les rats diabétiques soumis à un régime pauvre en zinc ( $432,4 \pm 42,2 \text{ mg/dl}$ ) par rapport aux rats diabétiques soumis à un régime normal ( $287 \pm 24 \text{ mg/dl}$ ) au bout de 21 jours de traitement.

Les résultats obtenus révèlent aussi une diminution très hautement significative chez les rats diabétiques traités par l'EMRC ( $125,6 \pm 3,52 \text{ mg/dl}$ ) et chez les rats diabétiques traités par l'EMBV ( $249,2 \pm 22,5$ ) par rapport aux rats diabétiques soumis à un régime carencé en zinc ( $p < 0,001$ ).

Notons que le pourcentage de la diminution de la glycémie établie par le l'EMRC à 500 mg sur les rats diabétiques soumis à un régime pauvre en zinc (-65,9%) est plus élevé à celui qu'est effectué par l'EMBV à 500mg (-36,75 %) sur ces rats (**Figure 20**).

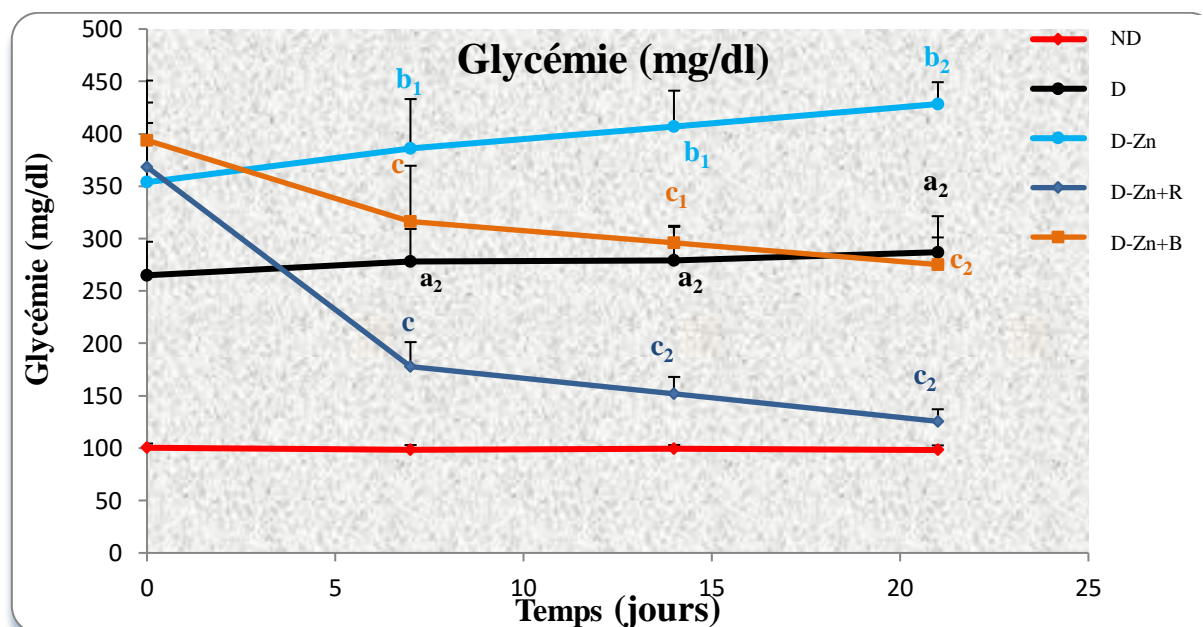


**Tableau 07:** La concentration du glucose chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).

Paramètres Lots	Glycémie initiale (mg/dl)	Glycémie finale (mg/dl)
ND	100,4 ± 5,25	98,20 ± 2,56
D	355,8 ± 33,36	381,40 <sup>a2</sup> ± 23,92
D – Zn	353,8 ± 156,56	484,80 <sup>b2</sup> ± 54,56
D– Zn+ R	368,4 ± 61,44	125,60 <sup>c2</sup> ± 11,52
D– Zn+ B	392,8 ± 207,04	272,4 <sup>c2</sup> ± 22,10

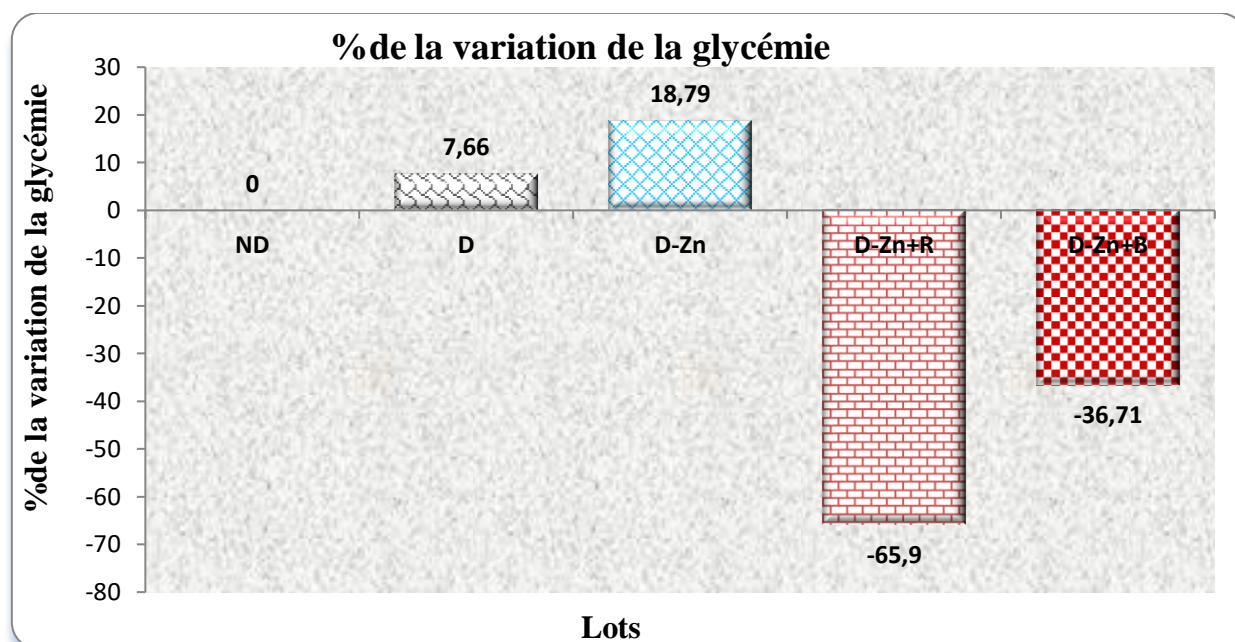
Les résultats sont exprimés en: M ±SEM , n= 7

<sup>a2</sup>p<0.001: comparaison D avec ND; <sup>b2</sup>p<0.001 : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c2</sup>p<0.001: comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.



**Figure 19.** Courbe du suivi de la glycémie durant le traitement chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en: M ±SEM , n= 7.

<sup>a2</sup>p<0.001: comparaison D avec ND; <sup>b1</sup>p<0.01 ; <sup>b2</sup>p<0.001 : comparaison D-Zn avec D; <sup>c</sup>p<0.05 , <sup>c1</sup>p<0.01, <sup>c2</sup>p<0.001: comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.



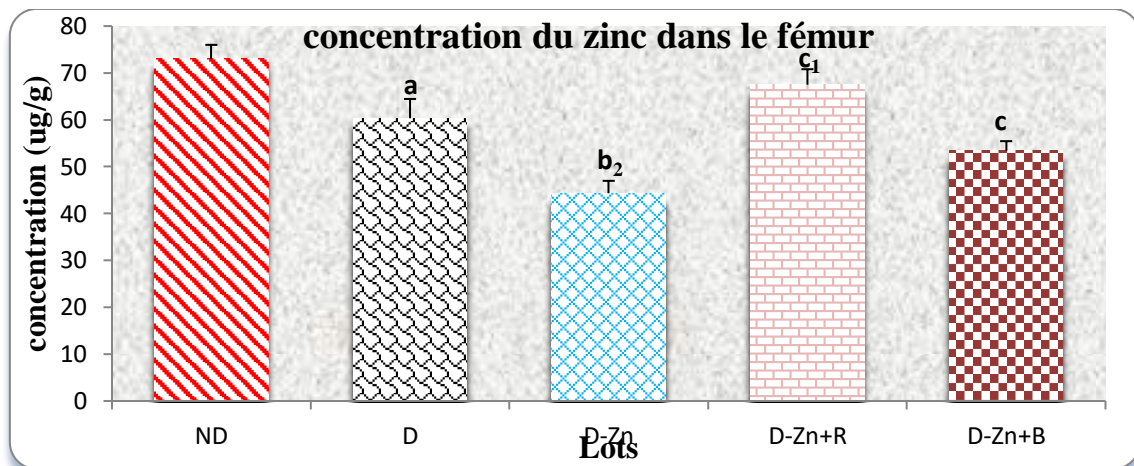
**Figure 20.** Pourcentage de la variation de la Glycémie chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .

### 3.4.3. Statut du zinc dans l'organisme

Les figures (21, 22, 23) présentent une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de la concentration de zinc dans le fémur, le foie et le rein chez les rats diabétiques par rapport aux rats témoins.

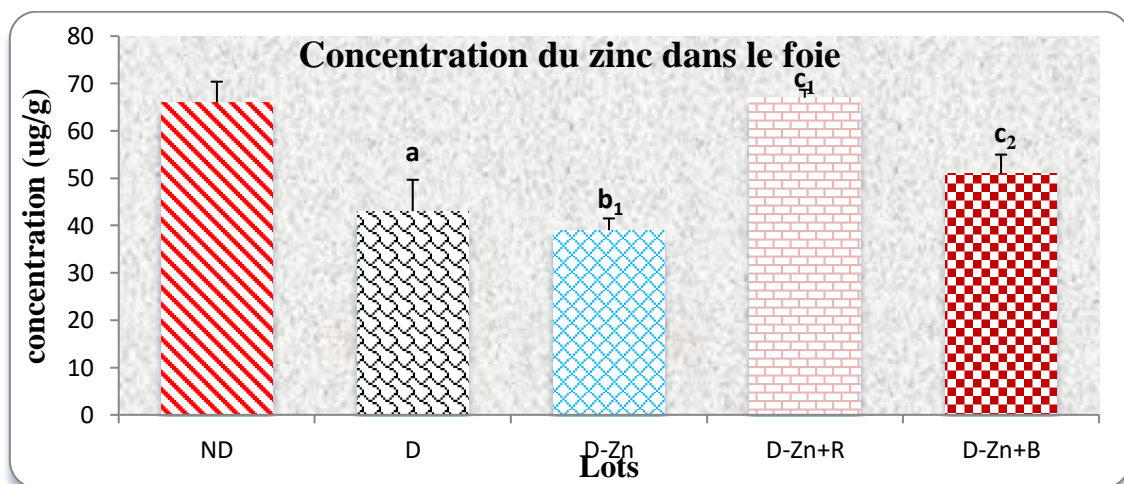
La carence du zinc dans l'alimentation des rats diabétiques a induit une diminution très hautement significative de sa concentration dans le fémur ( $p < 0.001$ ), hautement significative ( $p < 0.01$ ) dans le foie et significative ( $p < 0.05$ ) dans le rein.

Après le traitement par l'EMRC des rats diabétiques alimentés par un régime carencé en zinc, on remarque une augmentation hautement significative ( $p < 0.01$ ) de la concentration du zinc dans le fémur, le foie et le rein comparant à ceux non traités et carencés en zinc, ainsi pour les rats de régime carencé en zinc qui sont traités par l'EMBV, on constate une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la concentration du zinc dans le fémur et une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de la concentration du zinc dans le foie et hautement significative ( $p < 0.01$ ) dans le rein par rapport aux rats diabétiques de régime carencé en zinc non traités.



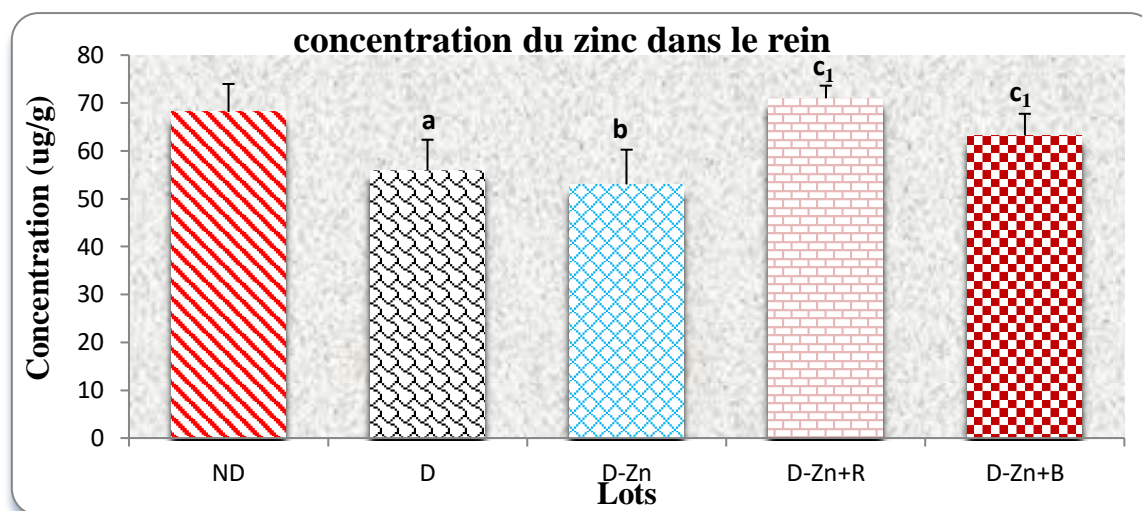
**Figure 21.** Variation de la concentration du zinc dans le Fémur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l’EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l’EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n= 7$

(<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b2</sup> $p < 0.001$  : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ , <sup>c1</sup> $p < 0.01$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.



**Figure 22.** Variation de la concentration du zinc dans le foie chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l’EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l’EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n= 7$ .

(<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b</sup> $p < 0.05$ , <sup>b1</sup> $p < 0.01$ , <sup>b2</sup> $p < 0.001$  : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ , <sup>c1</sup> $p < 0.01$ , <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).



**Figure 23.** Variation de la concentration du zinc dans le rein chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l’EMRC(D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l’EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n= 7$

(<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b</sup> $p < 0.05$  : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c1</sup> $p < 0.01$ , : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).

### 3.4.4. Les paramètres biochimiques

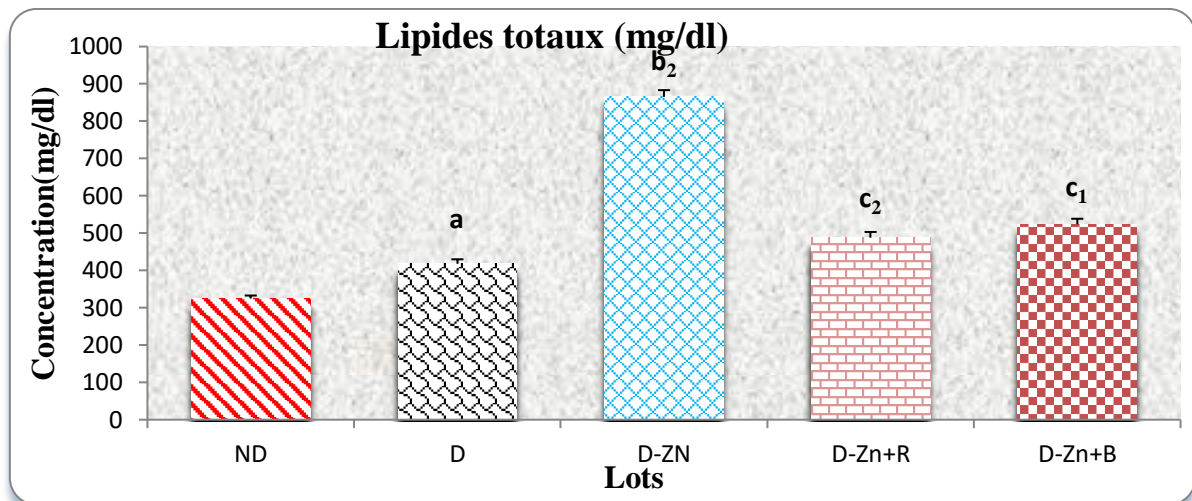
#### 3.4.4.1. Profile lipidique (lipides totaux, triglycérides, cholestérol)

L’interprétation des résultats démontre une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la concentration sérique des lipides totaux et du cholestérol avec une augmentation non significative des triglycérides chez le groupe diabétique par rapport au groupe non diabétique.

Nos résultats illustrent aussi qu’il existe une augmentation très hautement significative de la concentration sérique des lipides totaux et du cholestérol ( $p < 0.001$ ) et significative des triglycérides ( $p < 0.05$ ) chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par rapport à ceux alimentés par un régime alimentaire normal.

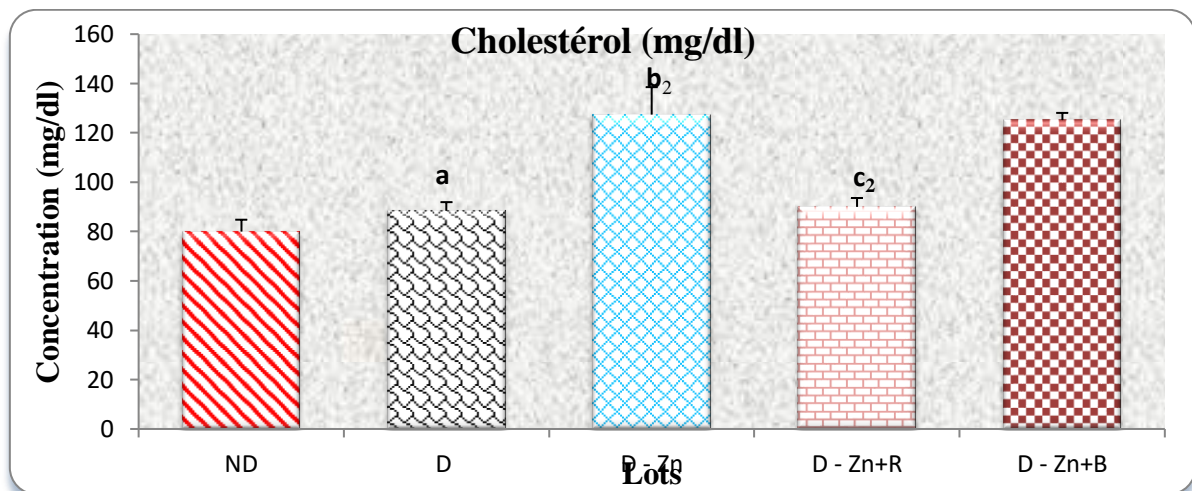
D’autre part on note chez les rats diabétiques alimentés par un régime pauvre en zinc et traités par l’EMRC une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de la concentration sérique des lipides totaux et du cholestérol avec une diminution non significative des triglycérides comparant aux rats diabétiques carencés en zinc non traités.

Par ailleurs, le traitement des rats diabétiques par l’EMBV a induit aussi une diminution hautement significative des lipides ( $p < 0.01$ ) et non significative du cholestérol et de triglycérides (**figure 24, 25 et 26**).



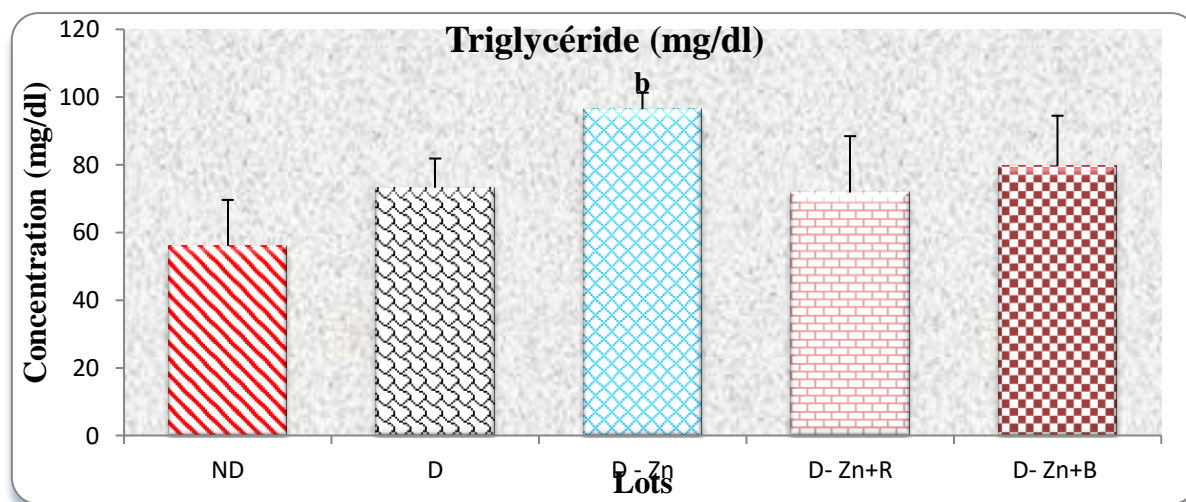
**Figure 24.** Concentration sérique des lipides totaux chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n=7$

. (<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b2</sup> $p < 0.001$  : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c1</sup> $p < 0.01$ , <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).



**Figure 25.** Concentration sérique du cholestérol chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n=7$

. (<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b2</sup> $p < 0.001$  : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).



**Figure 26.** Concentration sérique des triglycérides chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n=7$ .

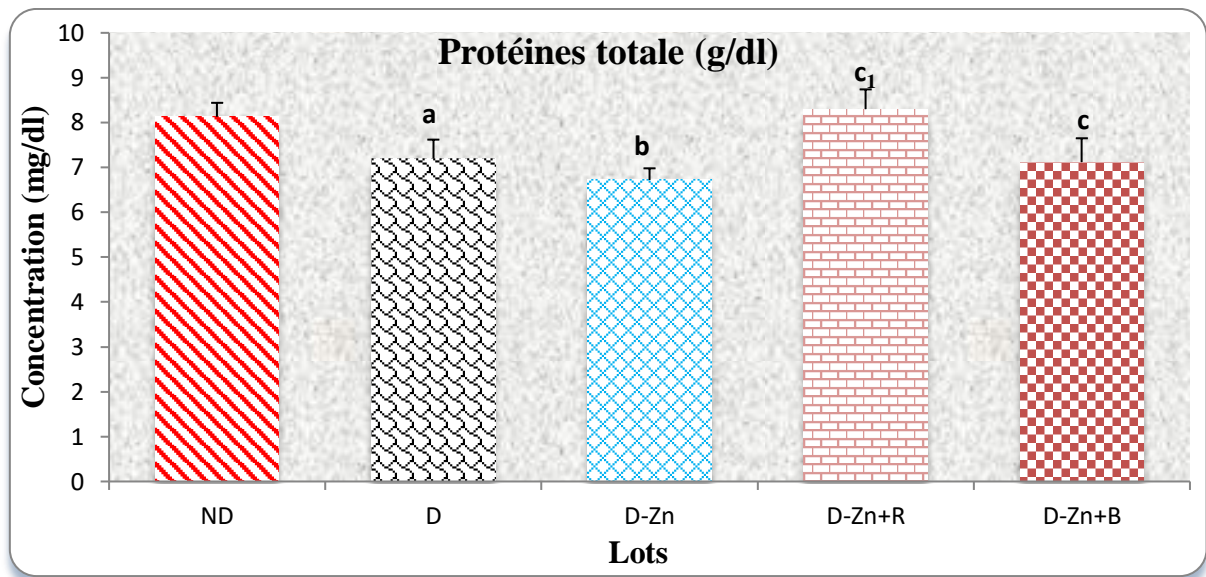
<sup>b</sup> $p < 0.05$  : comparaison D-Zn avec D)

### 3.4.4.2. Profile protéique (protéines totales, urée, créatinine et acide urique)

Nous avons constaté que l'injection de la STZ a provoqué une diminution significative de la concentration sérique des protéines totales ( $p < 0.05$ ) avec une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'urée et une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de l'acide urique.

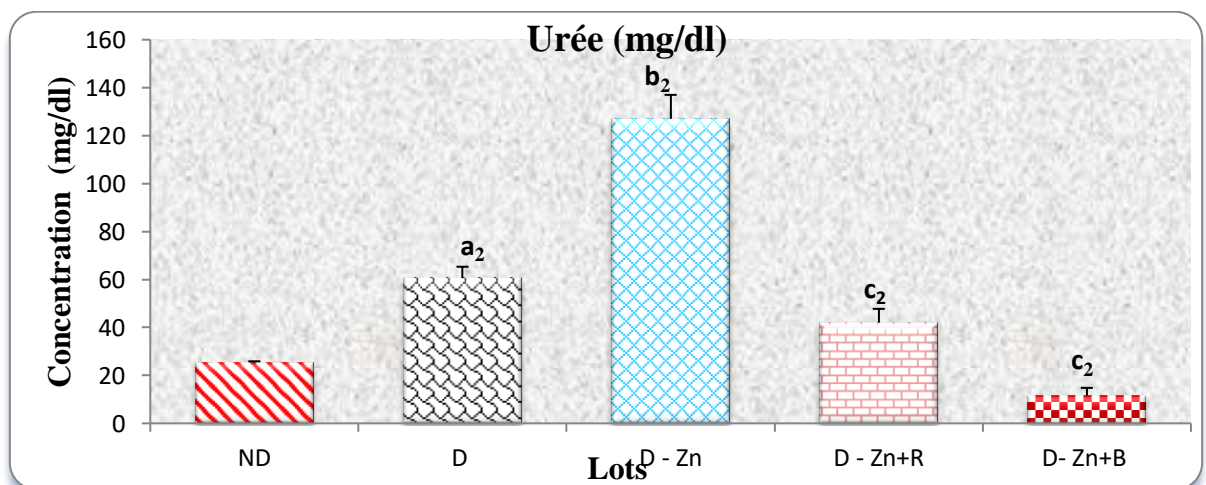
Nos résultats montrent aussi une diminution significative des protéines ( $p < 0.05$ ) avec une augmentation de la concentration sérique de l'urée ( $p < 0.001$ ), de la créatinine ( $p < 0.001$ ) et de l'acide urique ( $p < 0.05$ ) chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par rapport à ceux qui sont sous un régime alimentaire normal. Nous constatons aussi que le traitement par l'EMRC aux rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc, a induit une augmentation statistiquement hautement significative des protéines totale ( $p < 0.01$ ) et une diminution très hautement significative de la concentration de l'urée ( $p < 0.001$ ), de l'acide urique ( $p < 0.01$ ) et non significative pour la créatinine

Notons aussi que le traitement par l'EMBV a amélioré ces variables altérées (augmentation des protéines ( $p < 0.05$ ) avec diminution de l'urée ( $p < 0.001$ ) et de l'acide urique ( $p < 0.01$ ) (figure 27,28 ,29 et 30).



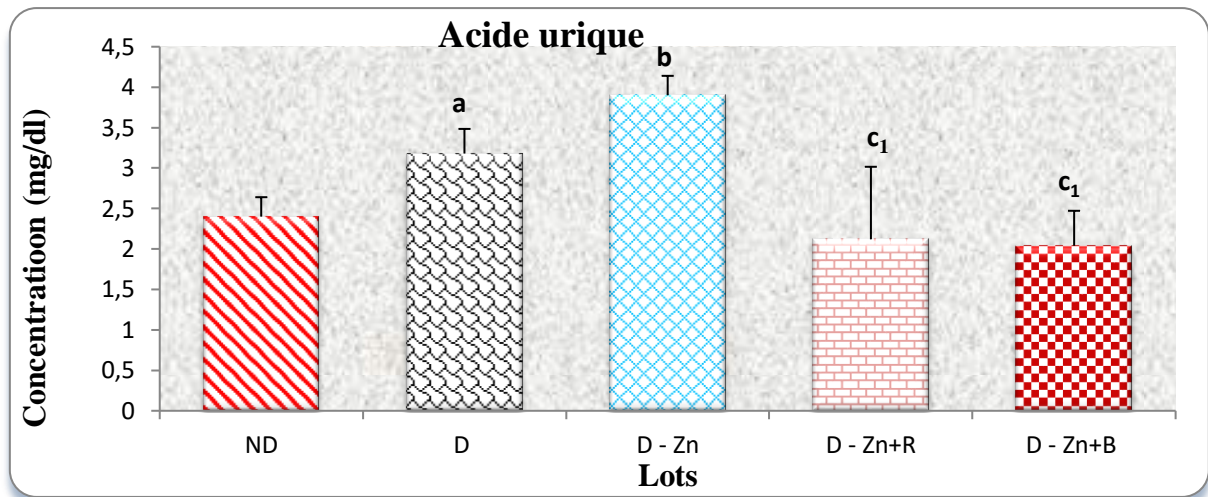
**Figure 27.** Concentration sérique des protéines totales chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en: M ±SEM , n= 7.

(<sup>a</sup>p<0.05: comparaison D avec ND; <sup>b</sup>p<0.05 : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c</sup>p<0.05, <sup>c1</sup>p<0.01: comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.)



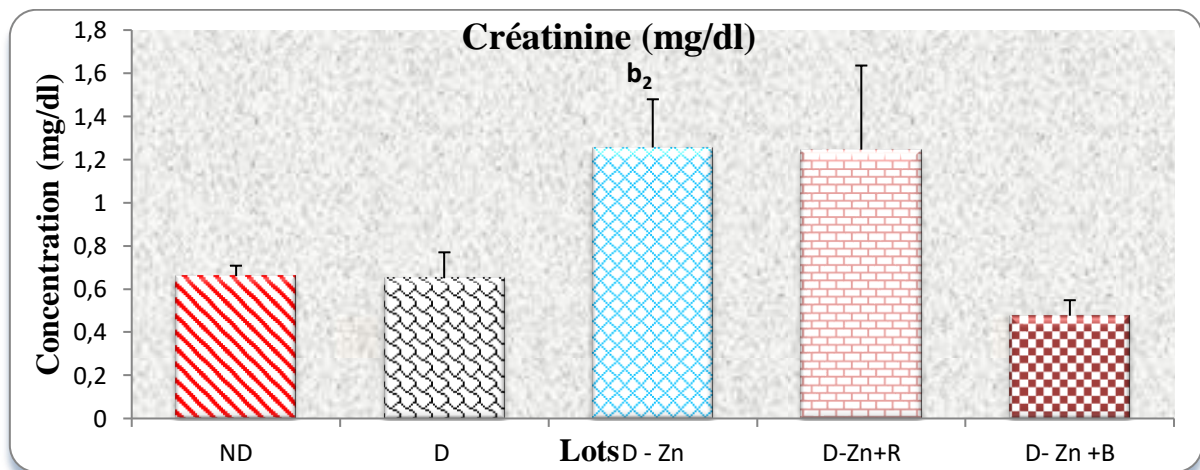
**Figure 28.** Concentration sérique de l'urée chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en: M ±SEM , n= 7.

(<sup>a2</sup>p<0.001: comparaison D avec ND; <sup>b2</sup>p<0.001 : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c2</sup>p<0.001: comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).



**Figure 29.** Concentration sérique de l'acide urique chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .

(<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b</sup> $p < 0.05$ : comparaison D-Zn avec D; <sup>c1</sup> $p < 0.01$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).



**Figure 30.** Concentration sérique de la créatinine chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .

(<sup>b1</sup> $p < 0.01$  : comparaison D-Zn avec D).

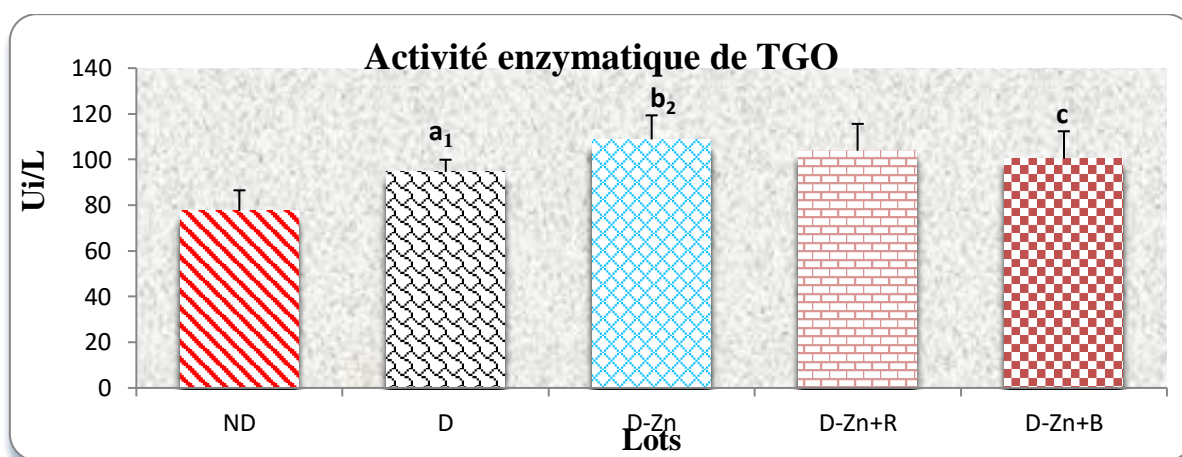


### 3.4.4.3. Transaminases

En ce qui concerne la fonction hépatique, nous avons remarqué une augmentation statistiquement significative de l'activité des transaminases TGO ( $p < 0.01$ ) et TGP ( $p < 0.05$ ) dans le sérum des rats diabétiques non traités par rapport à celle des rats non diabétiques.

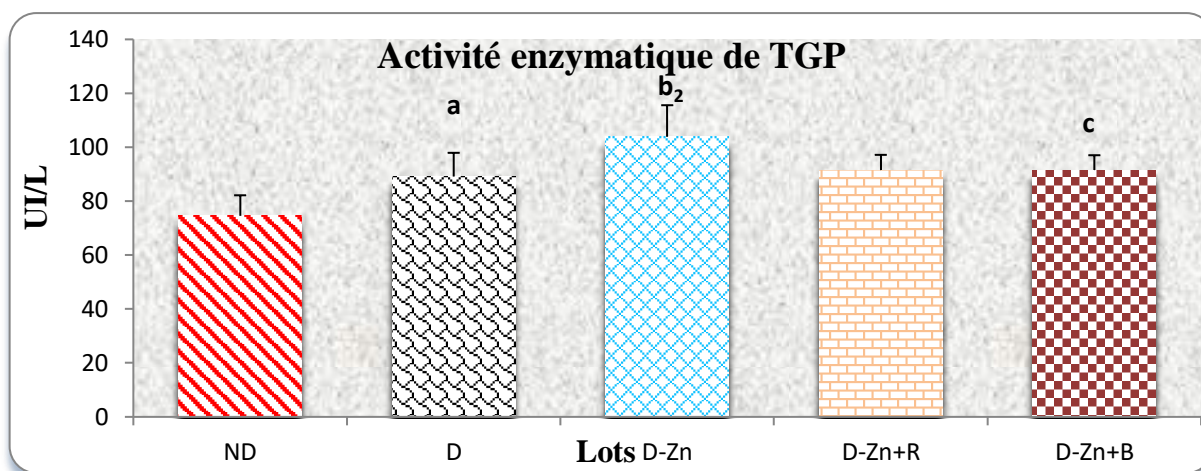
Nos résultats révèlent aussi une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique de TGP et de TGO chez les rats diabétiques carencés en zinc par rapport à ceux de régime normale.

Par conséquent, les résultats indiquent que l'administration de l'EMBV chez le groupe diabétique de régime pauvre en zinc a provoqué une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de l'activité enzymatique de TGO et de TGP par rapport à celui carencé en zinc non traité. D'autre part on enregistre une diminution non significative de l'activité enzymatique de TGO et de TGP chez les rats diabétiques traités par l'EMRC et qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par rapport aux autres carencés en zinc non traités (figures 31, 32).



**Figure 31.** Variation de l'activité enzymatique de TGO chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .

(<sup>a1</sup> $p < 0.01$ : comparaison D avec ND; <sup>b2</sup> $p < 0.05$ : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).



**Figure 32.** Variation de l'activité enzymatique de TGP chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .

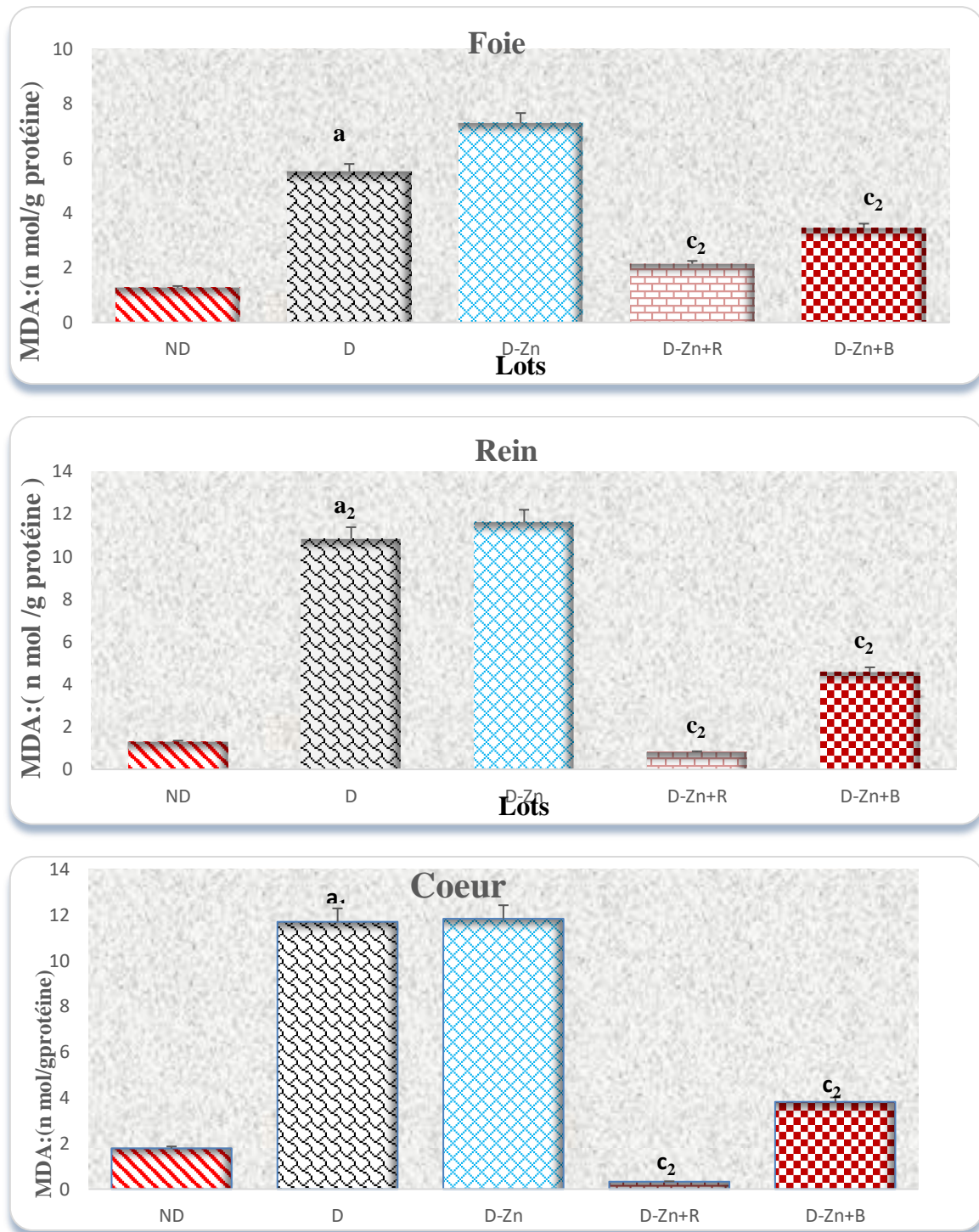
(<sup>a</sup> $p < 0.05$ : comparaison D avec ND; <sup>b</sup> $p < 0.05$ : comparaison D-Zn avec D ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.

### 3.4.5. Les paramètres tissulaires (MDA et antioxydants)

#### 3.4.5.1. MDA

Le dosage de MDA a montré qu'il a subi une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) au niveau du foie et hautement significative ( $p < 0.01$ ) au niveau du cœur et très hautement significative ( $p < 0.001$ ) au niveau du rein chez les rats diabétiques par rapport au rats non diabétiques. On a noté aussi une augmentation non significative au niveau du foie du rein et du cœur chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par rapport à ceux qui sont sous un régime normal.

Les deux extrais méthanoliques ont un effet très hautement significatif ( $p < 0.001$ ) sur le taux de l'MDA au niveau du foie, du cœur et du rein. Les résultats sont rassemblés dans la figure(33).



**Figure 33.** Le taux de l'MDA tissulaire au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-Zn+B). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n=7$ .

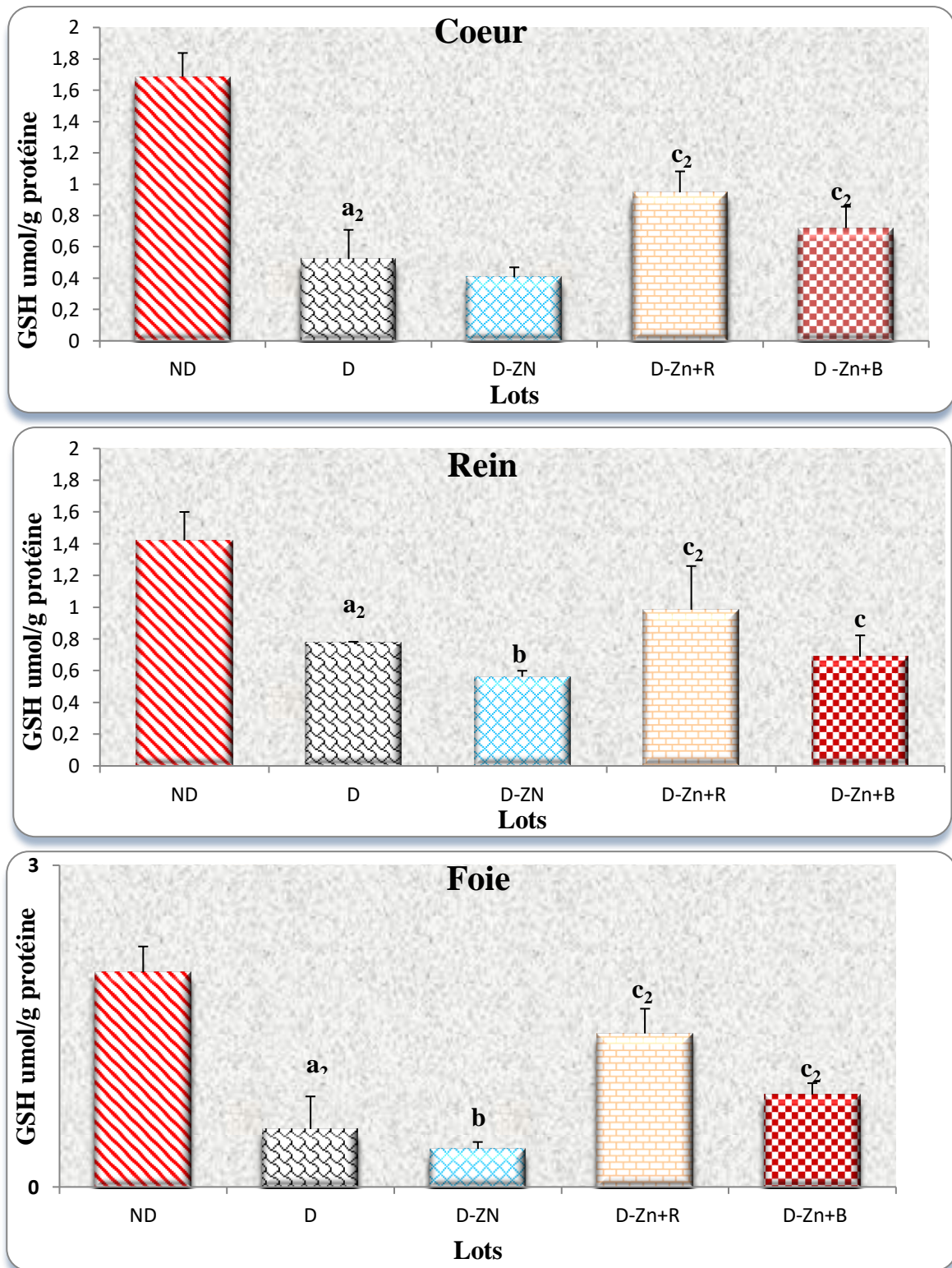
(<sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>a1</sup> $p < 0.01$ , <sup>a2</sup> $p < 0.001$  : comparaison D avec ND; <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn).

### 3.4.5.2. Glutathion (GSH)

Les résultats illustrés dans la **figure 34**, montrent que le taux du glutathion présente une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) chez les rats diabétiques par rapport aux rats non diabétiques.

La carence du zinc dans l'alimentation des rats diabétiques a provoqué une diminution du glutathion par rapport aux rats diabétiques alimentés par un régime alimentaire normal. Cette diminution est significative dans le foie et les reins ( $p < 0.05$ ).

Après le traitement par l'EMRC et l'EMBV aux rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc, on constate une augmentation très hautement significative du glutathion dans les différents organes.



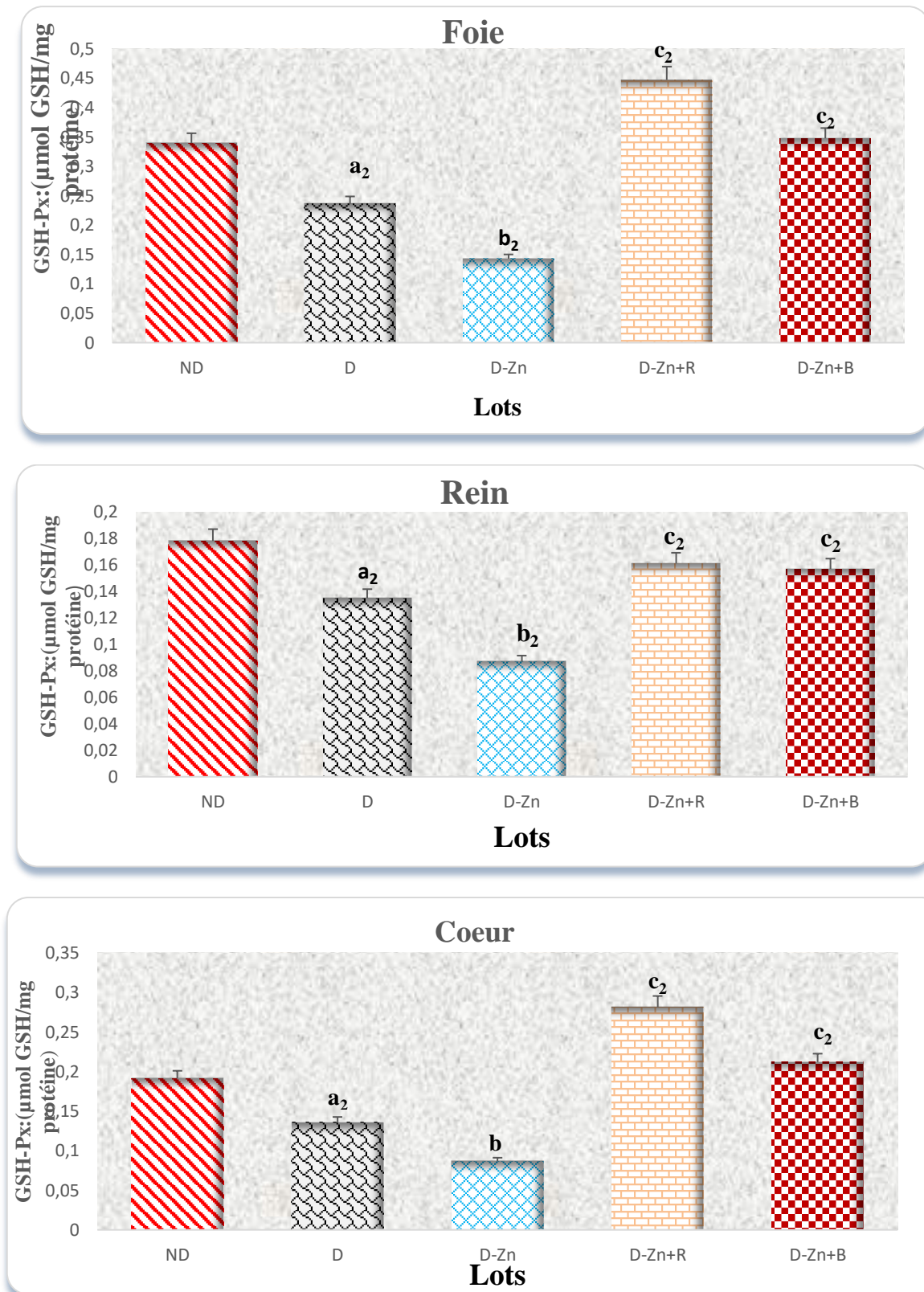
**Figure 34.** Le taux de GSH tissulaire au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-Zn+B). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm \text{SEM}$ ,  $n = 7$ .

<sup>a2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D avec ND; <sup>b</sup> $p < 0.05$ : comparaison D-Zn avec D; <sup>c</sup> $p < 0.05$ , <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.

### 3.4.5.2. Glutathion peroxydases (GSH-Px)

L'estimation de l'activité de GSH-Px a montré qu'il a subi une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) au niveau du foie, du cœur et du rein chez les rats diabétiques par rapport aux rats non diabétiques. On a noté aussi une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) au niveau du foie et rein, et significative ( $p < 0.05$ ) au niveau du cœur chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par rapport à ceux qui sont sous un régime normal.

Le traitement des rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par l'EMRC et par l'EMBV semble avoir un effet très hautement significatif ( $p < 0.001$ ) sur l'activité du GSH-Px. Les résultats sont rassemblés dans la **figure 35**.



**Figure 35.** L'activité de GSH-Px au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRC (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-Zn+B). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .  
<sup>a2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D avec ND; <sup>b2</sup> $p < 0.05$ , <sup>b2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn avec D; <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.

### 3.4.5.2. Glutathion S-Transférases

L'évaluation de l'activité de GST a montré qu'il a subi une diminution significative ( $p < 0.05$ ) au niveau du cœur, hautement significative ( $p < 0.01$ ) au niveau du foie et non significative au niveau du rein chez les rats diabétique par rapport aux rats non diabétiques.

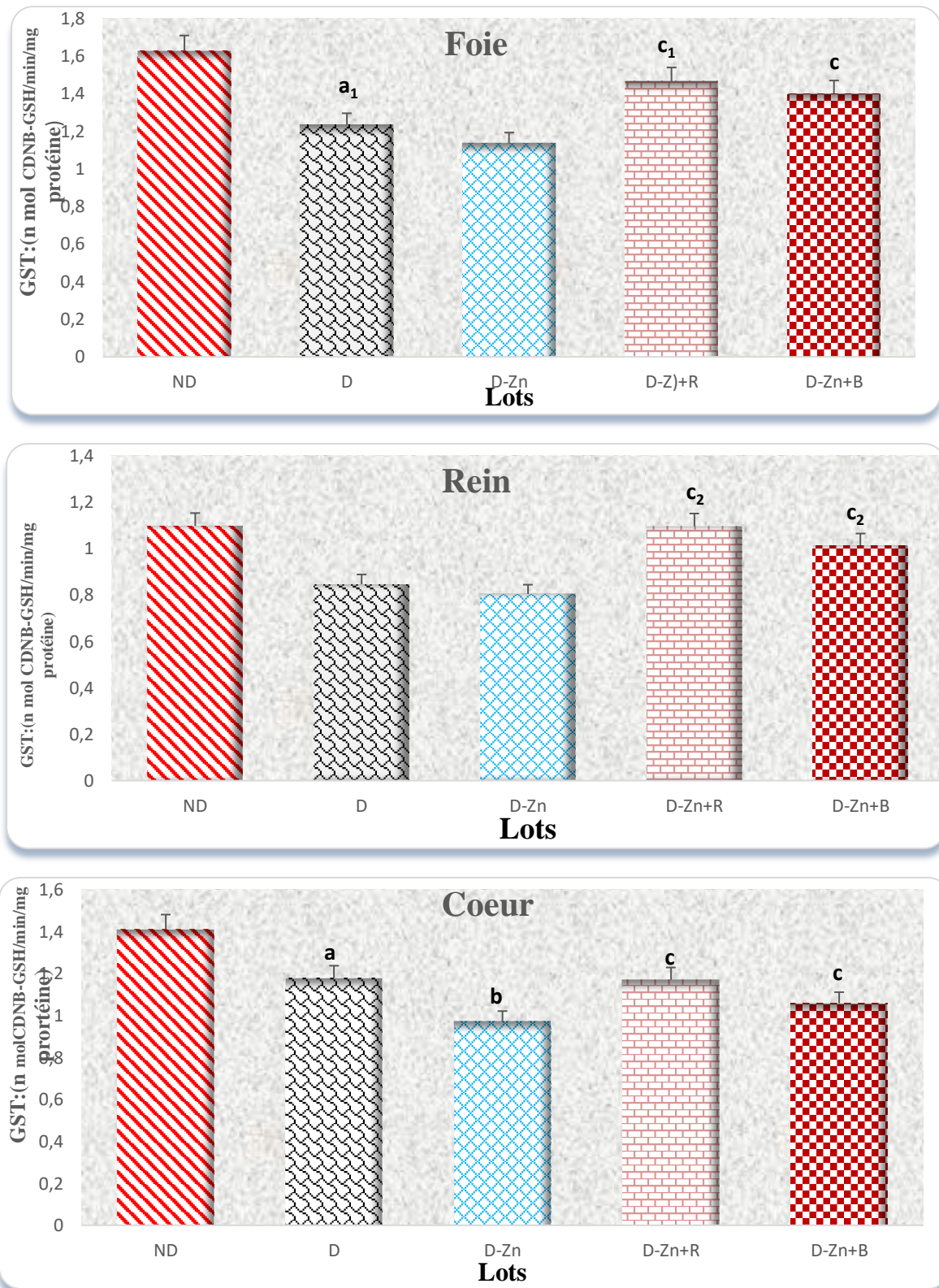
Les résultats ont montré aussi une diminution de l'activité de GST chez les rats diabétiques carencés en zinc par rapport à ceux alimentés par un régime alimentaire normale. Cette diminution est significative ( $p < 0.05$ ) au niveau du cœur et non significative au niveau du foie et rein.

Le traitement des rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par l'EMRC et par l'EMBV semble avoir des effets déférents sur l'activité du GST dont on a noté :

-Une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) au niveau du rein, hautement significatif ( $p < 0.01$ ) au niveau du foie et significative ( $p < 0.05$ ) au niveau du cœur pour l'EMRC.

-Une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) au niveau du foie et cœur et très hautement significative ( $p < 0.001$ ) au niveau du rein pour l'EMBV. Les résultats sont rassemblés dans **la figure 36**.





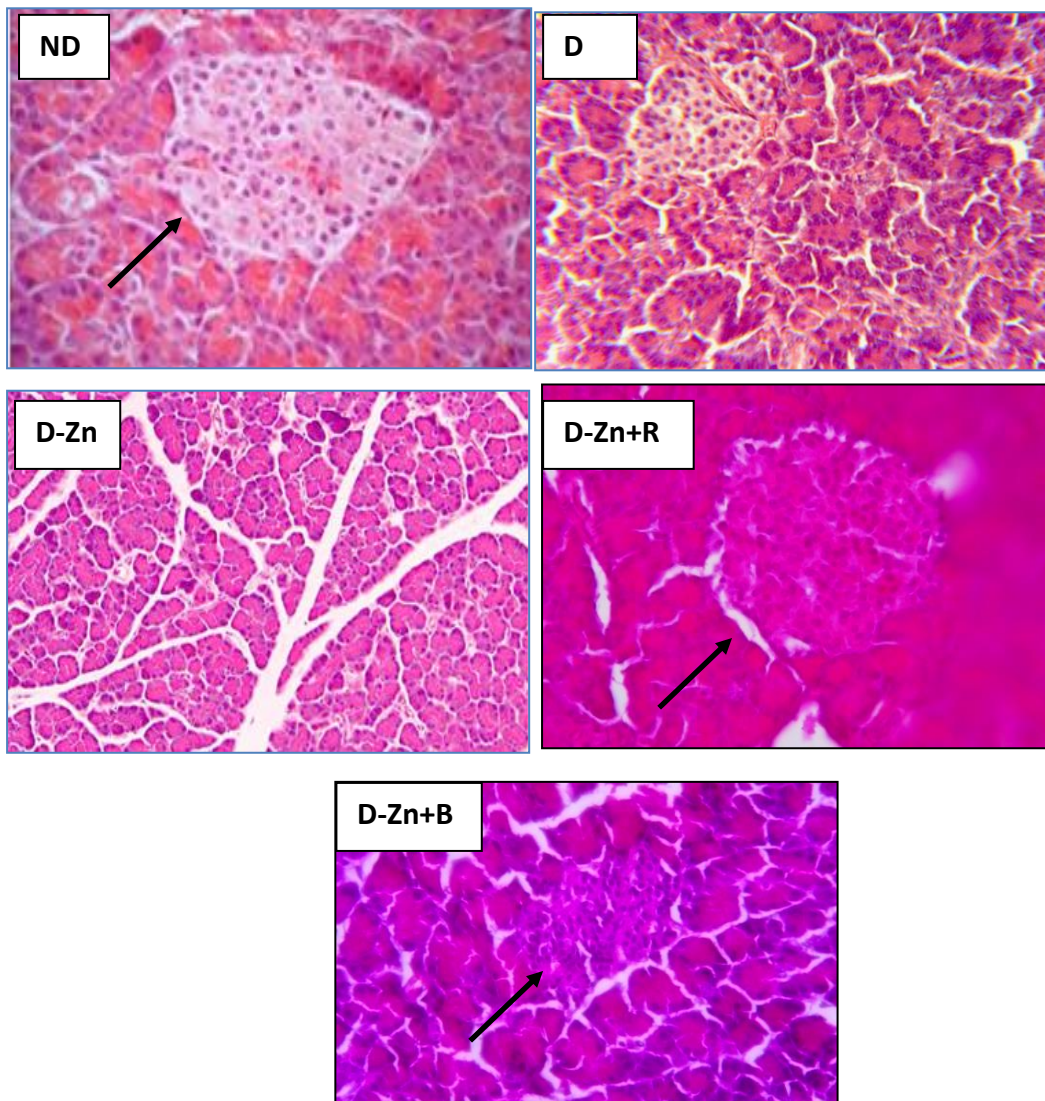
**Figure 36.** L'activité GST tissulaire au niveau du foie, des reins et du cœur chez les rats non diabétiques (ND), les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRV (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R). Les résultats sont exprimés en:  $M \pm SEM$ ,  $n=7$ .

<sup>a</sup> $p < 0.05$ ; <sup>a1</sup> $p < 0.01$ : comparaison D avec ND; <sup>b</sup> $p < 0.05$ : comparaison D-Zn avec D; <sup>c</sup> $p < 0.05$ , <sup>c1</sup> $p < 0.01$ , <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparaison D-Zn+R et D-Zn+B avec D-Zn.

### 3.4.6. Analyse des coupes histologiques :

On note la présence des îlots de langerhance intacts uniquement chez le groupe non diabétique (ND), Les îlots de la coupe D (groupe diabétique) sont un peu endommagés avec une zone nécrosée très claire mais ils sont plus intacts que ceux montrés par la coupe D-Zn où ils sont fortement endommagés et les îlots sont complètement absents.

L'observation microscopique du pancréas montre que le traitement avec les deux extraits (EMRC, EMBV) a protégé les îlots de langerhans contre les radicaux libres générés par la STZ chez les deux groupes traités (**Figure 37**).



**Figure 37.** Les coupes histologiques du pancréas des rats non diabétiques (ND), rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire normale (D), diabétiques carencés en zinc (D-Zn), diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMRV (D-Zn+R) et les diabétiques carencés en zinc et traités par l'EMBV (D-ZN+R).

## Discussion

Le diabète sucré est un désordre métabolique chronique résultant d'une variété d'interactions entre des facteurs héréditaires et environnementaux. Il est caractérisé par une perturbation de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de leurs récepteurs ce qui affecte, par conséquent, le métabolisme des carbohydrates, des protéines et des lipides (**Singh et Kakkar, 2009 ; Zhou et al., 2009**). Le diabète est relié au stress oxydant ; le diabète augmente la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des radicaux libres qui causent le développement et la progression des complications diabétiques (**Barbosa et al., 2008**).

Le zinc est un oligo-élément important. Il est indispensable à un certain nombre de fonctions biochimiques et physiologiques, il intervient dans l'activité de près de 300 enzymes (**Sommer et al., 2018**). Il joue également un rôle dans la plupart des métabolismes (synthèse et dégradation des glucides, lipides, protéines et acides nucléiques). Il agit aussi au niveau du métabolisme hormonal, il joue un rôle important dans le stockage et la sécrétion d'insuline. La carence en zinc induit une augmentation des troubles métaboliques du diabète et favorise les complications de cette maladie (**Fukunaka et Fujitani, 2018**).

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

Les médicaments antidiabétiques ont généralement des effets secondaires, une diminution de l'efficacité au fil du temps, une inefficacité contre les complications diabétiques à long terme et un faible rapport coût-efficacité (**Grover et al., 2002**). En conséquence, la découverte et le développement de nouveaux médicaments antidiabétiques est encore plus qu'indispensable.

La médecine populaire pratiquée par l'homme à travers le monde est basée essentiellement sur l'utilisation des plantes comme sources de substances naturelles actives. Parmi ces substances, les composés phénoliques et notamment les flavonoïdes qui occupent une place importante dans le traitement de nombreuses pathologies entre autres le diabète sucré.

L'utilisation des plantes médicinales et diététiques est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche de nouvelles substances à activité biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des secrets des plantes dont la présente étude qui est consacrée à étudier les activités pharmacologiques de l'extrait méthanolique lyophilisé de deux plantes algériennes (*Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris var cicla*) sur le développement du diabète chez des rats diabétiques alimentés par un régime carencé en zinc.

### D) La partie phytochimique

Les deux plantes utilisées dans cette recherche sont récoltées dans la région de Guelma (Est de l'Algérie), elles sont de deux familles botaniques, douées de différentes caractéristiques. Ces plantes sont : *Bêta vulgaris* «var. *cicla*» appartenant à la famille de Chénopodiacée et *Ruta chalepensis* de la famille de *Rutaceae*.

Le rendement en extrait méthanolique est variable selon les espèces des deux plantes. Cependant, le rendement le plus important est enregistré dans *Ruta chalepensis* (9,38 %) contre (8,58 %) de *Bêta vulgaris*.

Selon une étude menée par **Mansour et al (1990)** sur la même espèce *Ruta chalepensis*, le rendement en extrait brut de la partie aérienne entière est de 3.75%. Rendement nettement inférieure à celui obtenu dans notre étude. Cela est peut être dû à l'utilisation de soxhlet où la température élevée pendant plusieurs heures qui peut dégrader certains constituants sensibles (tels les polyphénols...), ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction est réalisée à froid par simple macération.

L'analyse phytochimique est réalisée sur la base des tests de coloration caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques présents dans *Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis*.

Le screening phytochimique a montré la présence des groupes chimiques suivants: les flavonoïdes, les saponosides, les tanins, les mucilages, les composées réducteurs et les coumarines dans les deux plantes. En note aussi la présence des alcaloïdes dans *Ruta chalepensis*. Tandis que l'absence de ces composées chez *Bêta vulgaris*.

Plusieurs travaux ont été portés sur l'étude de *Ruta chalepensis* en tant que source de composés phytochimiques d'importance médicinale tels que les alcaloïdes, les quinoléines, les acridones, les coumarines et les flavonoïdes (Bouajaj et al., 2014, Salib et al., 2014, Bouabidi et al., 2015, Park et Lee, 2015 et Bennaoum et al., 2017 Krayni et al., 2018).

De façon général, les familles chimiques détectées dans *Beta vulgaris* viennent confirmer les travaux de **Bolkent et al (2000); Kugler et al (2004) ; Gao et al (2009)** sur la même espèce.

## II. L'analyse de l'EMBV et l'EMRC

### 1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

La méthode modifiée de Folin-ciocalteu s'est avérée efficace pour le dosage des polyphénols totaux dans les deux extraits méthanoliques. Cette méthode a été choisie car elle satisfait aux critères de reproductibilité et de faisabilité. L'évaluation quantitative de ces composés phénoliques a montré que la quantité de polyphénols dans l'extrait méthanoïque de *Ruta chalepensis* ( $43,405 \pm 0.012 \mu\text{g EQ/g}$ ) est plus importante que celle de *Beta vulgaris* ( $31,231 \pm 0.006 \text{ mg EQ/g}$ ). Il a été rapporté que la quantité de composés phénoliques totaux dans la famille *Rutacea* est plus élevée que dans des autres familles. En effet, ces différences peuvent être dues à la variabilité du métabolisme phénolique dans différentes plantes mais aussi à la différence dans les conditions climatiques (température, l'exposition solaire, la sécheresse et la saison de croissance).

En conclusion, tous ces résultats ont montré la richesse de ces plantes en contenu phénolique permettant d'étudier leurs activités biologiques potentielles

Il est intéressant de déterminer la quantité de flavonoïdes dans les extraits méthanoliques d'afin de mieux les caractériser. Le dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium a révélé ( $6,85 \pm 0,087 \text{ mg EQ/g}$  extrait) pour *Bêta vulgaris* contre ( $17,34 \pm 0.042 \text{ mg EQ/g}$  extrait) pour *Ruta chalepensis*, ce résultat des flavonoïdes pour *Ruta Chalepensis* et supérieur à la quantité retrouvée dans les travaux de **Daycem et al (2013)** qui était de ( $12,78 \pm 0,08$ ), est cela due probablement a l'utilisation d'une extraction au soxhlet pendant 48h a  $65^\circ\text{C}$  qui peut détruire les composés des flavonoïdes.

Selon **Djeridane et al (2006)**, les flavonoïdes représentent un groupe important des composés phénoliques chez le genre *Ruta*.

L'étude de **Hussam Zein et al (2015)** a montré que *Beta vulgaris var cicla* est très riche en composés phénoliques tels que la quercétine, la rutine, vanillylique, salicylique, acide protocatchoïque, la narigine, la catéchine, l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique, qui sont des substances végétales possédant des propriétés antioxydantes importantes

Dans un travail de **Loizzo et al (2017)**, l'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* a révélé la présence de la quercitine, d'hésperidine et de rutine en tant que flavonoïdes abondants, suivis de la rhamnétine.

Vingt composés phénoliques ont été identifiés par HPLC dans l'étude de **Ouerghemmi et al (2016)**, inclus 12 acides phénoliques avec trois acides hydroxycinnamiques (caféique, transhydroxycinnamique, férulique) et neuf acides hydroxybenzoïques (acide protocatéchuique, acide 3,4-dihydroxybenzoïque, acide 2,5-dihydroxybenzoïque, acide gallique, acide chlorogénique, acide syringique, acide carnosique, acide salicylique, acide vanillique). En outre, sept flavonoïdes ont été identifiés: apigénine, hydrate de catéchine, flavone, lutéoline, naringine, kaempférol et naphthorésorcinol.

### 2. L'évaluation de l'activité anti-oxydante (DPPH)

Le modèle de balayage le radical DPPH instable est une méthode largement utilisée pour évaluer les activités anti-oxydantes dans relativement peu de temps par rapport à d'autres méthodes. DPPH est un radical libre instable et accepte un électron ou un radical hydrogène pour devenir un diamagnétique stable molécule.

L'évaluation de l'effet de deux plantes dans la diminution du stress oxydant est un objectif principal dans notre étude, raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier in vitro avant de passer à l'étude in vivo. Pour cela on a réalisé le test de DPPH qui a montré une IC<sub>50</sub> de 1,74mg/ml pour *Bêta vulgaris*, valeur inférieure à celle trouvée dans l'étude de **Pyo et al (2004)** et de 1,5mg/ml pour *Ruta chalepensis*, valeur inférieure à celle trouvée dans l'étude de **Daycem et al (2013)** et de **Ghazghazi et al (2015)** sur l'activité antiradicalaire DPPH de la même espèce.

Une étude pareille réalisée sur l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta chalepensis* a jugé qu'il possède un effet scavenger avec une IC<sub>50</sub> de 60 µg/ml (Loizzo et al., 2017). Fakhfakh et al (2012) ont trouvé des valeurs de IC<sub>50</sub> de 1,2 et 2,2 mg/ml pour l'extrait éthanolique et aqueux de *Ruta chalepensis*, respectivement. Plus récemment, Ereifej et al (2015) ont rapporté une capacité de piégeage des radicaux DPPH de l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* avec une valeur de IC<sub>50</sub> de 70,01 µg/ml. Des résultats similaires ont été obtenus par Rached et al (2010) qui ont trouvé une valeur de IC<sub>50</sub> de 61,41 µg/ml en utilisant l'extrait éthanolique de la même plante. Des valeurs intéressantes de IC<sub>50</sub> dans le test DPPH ont été trouvées pour les extraits éthanoliques *R. chalepensis* d'El Hamma (Tunisie) (IC<sub>50</sub> de 2,26 mg/mL) (Khadhri et al., 2017).

Oki et al (2002) ont conclu qu'une bonne corrélation linéaire (R = 0,943) entre la teneur totale en phénols et le piégeage du radical DPPH dans les extraits de *Beta vulgaris*.

Par comparaison à ces travaux, on peut dire que l'effet scavenger de l'EMRC et l'EMBV est aussi très élevé. Les résultats obtenus ont montré que les deux extraits méthanoliques ont une activité antiradicalaire très importante. Ces activités antioxydantes constatées, sont dues aux métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes). L'action de ces antioxydants est reposée principalement sur les propriétés redox de leurs groupes hydroxyles et la relation structurelle entre les différents groupes fonctionnels dans leur structure qui leur permet de servir activement de agents piégeurs des radicaux, agents réducteurs, désactiveurs d'oxygène singulet, chélateurs de métaux et donneurs d'hydrogène (Barreca et al., 2011 ; Penyaringan et al., 2016).

### III. Investigations sur les animaux

#### 1. Test de toxicité

Dans nos conditions expérimentales l'extrait de *Ruta chalepensis* et de *Beta vulgaris* jusqu'à 5000 mg/kg, n'a pas induit, ni des lésions tissulaires macroscopiques ni perte de poids ni la mortalité des souris au cours de la période d'observation (3 jours). Étant donné que les effets létaux n'ont pas été observés à l'une des doses administrées, la LD50

orale de deux extraits doit être supérieure à 5000 mg /kg. Les résultats de la toxicité de *Ruta Chalepensis* sont en accord avec le travail de **Gonzalez-Trujano et al (2006)**.

### 2. L'effet antidiabétique

La perte de poids corporel chez les rats rendus diabétiques par la STZ est observée dans notre étude où le groupe des rats diabétiques témoins a subi une perte de (18 g) par rapport à leur poids initial après trois semaines de la confirmation du diabète (durée de l'expérimentation), alors que les rats non diabétiques ont gagnés (25,2 g) durant la même période.

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, l'injection de la STZ provoquait en trois semaines une diminution significative de poids corporel accompagnée d'une polyphagie et ils ont indiqué ces conditions sont dues à la perte excessive des protéines tissulaires. De même, **Sathishsekar et Subramanian (2005)** et **Taleb-Senouci et al (2009)** ont eux aussi enregistré des résultats similaires et suggèrent que la perte de poids corporel chez le groupe diabétique peut être expliquée par le résultat du catabolisme des lipides et des protéines structuraux due au manque des carbones hydratés qui sont utilisés comme source d'énergie (**Bouldjadj, 2009**)

Les résultats ont montré aussi un déficit pondéral chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc (D-Zn) par rapport à ceux alimentés par une nourriture normale (D). Ceci est en accord avec les constatations de **Kumari et al (2011)** et **Kechrid et al (2012)**, qui ont remarqué que la carence du zinc dans l'alimentation des rats est accompagnée par une réduction du gain de poids corporel en comparaison avec le groupe de régime normal.

La carence du zinc est associée avec des troubles de l'ingestion de nourriture, particulièrement l'anorexie chez l'animal et l'homme (**Ploysangam et al., 1997 ; Lee et al., 2003**). **Levin et al (1992)** ont également justifié l'anorexie dans le cas d'une carence en zinc dans l'alimentation des rats 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 (Choecystokinin (CCK), Ghrelin, sérotonine). Ces peptides sont synthétisés par l'hypothalamus (**Williams, 2004**). Il a été signalé que l'hypophyse est responsable de moduler l'ingestion de nourriture ; elle reçoit des signaux de



l'hypothalamus et puis elle transmet ces signaux à d'autres tissus ou organes périphériques cibles (Song *et al.*, 2000; Bjurset *et al.*, 2005).

D'autre façon l'insuffisance du zinc mène invariablement aux désordres digestifs graves comme l'appétit, la perte du poids, principalement dus à la détérioration du goût et de l'odorat (Shay et Mangian, 2000). Le dispositif semblable a été observé par plusieurs auteurs dans différentes espèces animales et on a suggéré que l'insuffisance du zinc a été associée avec beaucoup de désordres de développement comprenant l'appétit, le manque de prospérer et le retardement de croissance (Merrells *et al.*, 2009).

L'administration orale et journalière de 500 mg/kg de l'extrait méthanolique lyophilisé de *Ruta chalepensis* et de *Beta vulgaris* pendant trois semaines a permis de protéger les rats diabétiques de la perte massive de poids corporel, encore mieux, elle a même permis d'augmenter d'une manière significative le poids corporel des rats diabétiques alimentés par un régime pauvre en zinc. Les résultats de poids corporel sont en accord avec ceux publiés par Shah *et al* (1991) sur *Ruta chalepensis*. L'extrait de *Ruta chalepensis* et de *Beta vulgaris* pourraient avoir la capacité comme *Artemisia herba-alba* et *Nymphaea stellata* d'inverser la gluconéogenèse et de contrôler la perte de protéines en augmentant le poids corporel des rats (Tastekin *et al.*, 2006 ; Rajagopal *et al.*, 2008).

Les résultats de notre expérimentation suggèrent que la carence en zinc dans l'alimentation a provoqué une diminution importante de sa concentration dans les différents organes : le foie, le rein et le fémur. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Kechrid *et al* (2006). Cette diminution peut s'expliquer par la sensibilité de ces tissus à la quantité du zinc dans l'alimentation (Williams et Mills, 1970). D'autre part, la présence de l'hyperzincurie et la baisse 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)

Par contre, nous avons remarqué une augmentation significative de la concentration du zinc dans les différents tissus chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire carencé en zinc et qui sont traités par l'EMRC et l'EMBV, Ceci est probablement dû à l'effet antioxydant de ces deux extraits contre le développement de l'état diabétique entraînant une diminution de la zincurie (Hussam *et al.*, 2015; Kacem *et al.*, 2015 )

L'analyse des résultats a montré que la carence en zinc a induit une augmentation plus élevée de la concentration du glucose chez les rats diabétiques. Cette hyperglycémie est due à des troubles dans l'utilisation du glucose par les tissus ce qui traduit l'effet positif du zinc sur le métabolisme glucidique (**Hendricks et Mahoney, 1972 ; Schauder et al., 1983**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Fairweather et al (1985)** qui ont observé une augmentation de la concentration sérique du glucose chez des rats au cours de la gestation, après une consommation alimentaire pauvre en zinc. **Hall et al (2005)** ont indiqué aussi que l'insuffisance du zinc induit une hyperglycémie. Cependant, plusieurs études ont montré que la carence du zinc est liée à l'insulinorésistance (**Yaghmaei et al., 2013**).

De plus, le taux de glucose sanguin était réduit chez les animaux carencés en zinc et traités avec *R. chalepensis*, par rapport aux animaux carencés en zinc non traités. Ce résultat était en corrélation avec les études histologiques du pancréas, où l'extrait préservait les cellules des îlots. Dans ce cas, l'effet hypoglycémiant de *R. chalepensis* peut être dû à la présence de flavonoïdes et d'autres substances, telles que les glycosides, les alcaloïdes, la saponine, les tanins et les triterpènes. Ces composés ont été signalés comme étant responsables de l'action hypoglycémiant (**Essawy et al., 1995**) ou du résultat d'une sécrétion améliorée d'insuline (**Al-Sagair, 2004**), et le screening phytochimique a confirmé la richesse de cette plante avec ces composés actifs.

Nous avons constaté aussi que l'EMBV a pu jouer un rôle crucial dans la baisse de la concentration sérique de glucose. Les expériences réalisées par **Yanardag et al (1998)** ont démontré l'effet hypoglycémiant de l'extrait de *Beta vulgaris var cicla* chez des rats diabétiques. Cette hypothèse a été confirmée par d'autres études du même groupe, qui ont démontré une réduction de 40% de la glycémie, sans perte de poids ni altération des fonctions hépatiques (**Ozsoy-Sacan et al., 2004 ; Trifunovic et al., 2015**). Le mécanisme de l'action hypoglycémiant de l'extrait a été attribué aux saponines inhibant la gluconéogenèse et la glycogénolyse (**Massiot et al., 1994**). Cependant, d'autres voies moléculaires potentiellement impliquées dans les effets hypoglycémiques restent à approfondir. En fait, certaines preuves suggèrent que l'activité hypoglycémique de l'extrait de cette plante pourrait être due aux flavonoïdes par l'inhibition des transporteurs du glucose. Par exemple, la quercétine présente chez *Beta vulgaris* montre des signes d'effets antihyperglycémiques via l'inhibition du transporteur de glucose intestinal GLUT2 (**Song et al., 2002**). Un autre mécanisme hypoglycémique complémentaire est l'inhibition induite par

les flavonoïdes vis-à-vis des activités de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase (Yilmazer et al., 2012). L'inhibition de ces enzymes pourrait retarder la digestion et l'absorption des carbohydrates et en conséquence, diminue l'hyperglycémie post-prandiale (Bischoff, 1995). Certaines C-glycosylflavones, à savoir la vitexine et le vitexine-2-O-glycoside contenus dans les feuilles de *Beta vulgaris*, se sont révélés fortement inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase et pourraient être la cause la plus probable de l'effet hypoglycémique (Trifunovic et al., 2015).

Le diabète sucré est aussi associé avec une hyperlipidémie et provoque de profondes anomalies dans la concentration et la composition des lipides (Cooperstin et Watkin, 1981). Ces anomalies représentent un important facteur de risque de maladies cardiovasculaires (Al-Shamaony et al., 1993). Il a été indiqué que l'élévation des lipides sérique chez les rats rendus diabétiques par STZ joue un rôle important dans la pathologie du diabète (Sharma et al., 2008). Dans notre étude, on a enregistré une augmentation significative de la concentration sérique des lipides totaux, du cholestérol et des triglycérides chez les rats diabétiques.

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Eddouks et al (2005), Ravi et al (2005) et Sharma et al (2008) où ils suggèrent que la forte concentration anormale des lipides sériques observée chez les sujets diabétiques est essentiellement due à l'augmentation de la mobilisation des acides gras à partir des tissus adipeux. En effet, Betteridge (2002) indique que la carence en insuline ou l'insulinorésistance peut être responsable d'une hyperlipidémie, car l'insuline, a une action inhibitrice sur 3-hydroxy-3-méthyle-glutaryl coenzyme A réductase (HMG-COA reductase), une enzyme clé pour la biosynthèse du cholestérol. D'autre part, le glucagon, les catécholamines ainsi que d'autres hormones augmentent la lipolyse. Au cours du diabète, l'hyperlipidémie peut être considérée comme un résultat de la non-inhibition de l'action des hormones lipolytiques sur les tissus adipeux (Goodman et Gilman, 1985).

Nous avons constaté également une augmentation bien claire des lipides totaux, du cholestérol et des triglycérides chez les rats qui sont sous un régime alimentaire carencé en zinc. Ces résultats sont en accord avec ceux de kechrid et al (2012). Cette augmentation peut s'expliquer par la dégradation intense des composés lipidiques des tissus adipeux. D'autre part, l'hyperglycémie provoque un désordre métabolique traduit par des

changements de la voie normale du glucose, où une partie du glucose est transformée en acides gras et glycérol et puis la synthèse des triglycérides et cholestérol (**Patricia et al., 1995**). Une autre étude a confirmé que la carence en zinc dans l'alimentation des rats a induit une augmentation de la pénétration de glucose marqué par le carbone radioactif ( $C^{14}$ ) dans les tissus adipeux et transformé en acides gras (**O'dell et Reeves, 1982**). **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.

Les résultats ont démontré aussi une réduction significative de la concentration sérique des lipides totaux, du cholestérol et des triglycérides après le traitement des rats diabétiques carencés en zinc par l'EMRC et l'EMBV. Ces résultats sont en accord avec le travail de **Nuraliev et Avezov (1992)**, qui a démontré les effets de la rutine (un métabolite de *R. chalepensis*) sur la diminution du cholestérol et du HDL. De plus, l'effet hypolipidémiant de l'extrait de *R. chalepensis* peut également être expliqué par l'inactivation de la 5-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, qui est une enzyme clé dans la synthèse du cholestérol. Cela coïncide avec les travaux de **Jung et al (2006)**, et de **Naziroğlu et al (2014)** qui ont remarqué que les flavonoïdes diminuent l'activité hépatique de HMGCoA réductase chez les souris atteintes de diabète de type 2.

Pour *Beta vulgaris*, le potentiel de la diminution des lipides, du cholestérol et des triglycérides peut être dû à la teneur en composés phénoliques et à la capacité antioxydante qui ont été trouvés dans cette plante, ainsi que *Bêta vulgaris* a une teneur plus élevée en flavonoïdes et/ou en saponines qui ont la capacité d'agir sur le métabolisme du cholestérol (**Naceem Rabeh et Marwa Ibrahim, 2014**). Un grand nombre de travaux de recherche ont montré l'effet hypolipidémique de plusieurs flavonoïdes, terpènes et d'autres composés phénoliques (**Sarkhail et al., 2007**).

Cette étude a mentionné que la carence du zinc dans l'alimentation des rats diabétique a provoqué une diminution des protéines totales avec une augmentation de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine. Ce qui explique la dégradation des protéines en acides aminés puis en urée et créatinine (**Prangthip et al., 2012**) et la dégradation des acides nucléiques en acide uriques, ce qui induira une diminution des composés protéiques du corps (**Valdiguié, 2000**). A ce titre, **Asayama et al (1993)** ont montré que la diminution

des protéines chez les animaux diabétiques est due à la réduction de leur synthèse dans le foie. **Oteiza et al (1996)** ont démontré que la carence du zinc chez les rats pourrait être associée aux dommages oxydatifs des protéines et de l'ADN. **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. Simultanément, nos résultats ont indiqué une augmentation significative de la concentration sérique des protéines totales et une diminution de la concentration sérique d'urée, de créatinine et d'acide urique après le traitement des rats par l'EMRV et l'EMBV. Ces résultats peuvent refléter l'effet de ces deux extraits en stimulant la sécrétion d'insuline. Cette augmentation de la concentration d'insuline diminue le catabolisme des protéines, la dégradation des acides aminés et favorise la synthèse des protéines

Pour l'activité enzymatique, nos résultats ont montré une augmentation plus élevée de l'activité des transaminases (TGO et TGP) dans le sérum des rats qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par rapport à celui des rats qui sont sous un régime alimentaire normal. Ce qui explique l'accumulation des acides aminés comme l'alanine et l'acide glutamique dans le sérum, provenant de la dégradation des composés protéiques. Ainsi ces acides aminés peuvent se transformer sous l'action des transaminases sériques en composés carboxyliques tels que l'acide  $\alpha$  céto glutamique et l'acide pyruvique puis en glucose. Ce qui implique alors une forte activité enzymatique de TGO et TGP. Cependant, ce qui confirme vraiment cette hypothèse c'est l'augmentation de la concentration sérique du glucose chez les rats qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc. Alors, dans ce cas on peut suggérer que la forte activité des transaminases c'est pour fournir une nouvelle source d'énergie et spécialement à partir des acides aminés (**Kechrid et al., 2007**). A ce titre **Grefly et Sandstead (1993)** ont observé dans le cas d'une carence en zinc dans l'alimentation des rats, une diminution dans l'oxydation d'alanine, ce qui est induit leur accumulation dans le sang.

Au contraire, l'activité de transaminases (TGO et TGP) est diminuée après le traitement par l'EMRV et l'EMBV. Cette diminution est expliquée par l'effet de l'extrait sur la production d'insuline par les îlots de Langerhans, et la régulation de la concentration sérique du glucose ((**Bolkent et al., 2000 ; Osama Mohamed et al., 2009**). Ce qui induit une diminution de la dégradation des protéines et d'accumulation des acides aminés dans le sang, et par conséquent l'activité enzymatique de transaminases sera réduite.

La STZ est toxique pour les cellules  $\beta$  pancréatique, elle est largement utilisée pour induire un diabète expérimental, et comme résultat la genèse d'un stress oxydant causé par une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Mazunde et al., 2005**). La production accrue des ERO induit des dommages oxydatifs tissulaires qui peuvent jouer un rôle important dans de nombreux troubles cliniques y compris le diabète (**Feillet et al., 1999**). Le stress oxydant provoque une forte production des ERO qui sont très toxiques pour les cellules, particulièrement pour les membranes cellulaires. Toutefois, des antioxydants endogènes enzymatiques tels que GSH-Px et GST sont responsables de la détoxification de l'organisme de ces radicaux libres délétères (**Cho et al., 2002**).

L'hyperglycémie est la manifestation clinique clé du diabète sucré. L'augmentation du niveau de glucose peut induire un stress oxydatif par l'intermédiaire de la formation des ERO (**Prakasam et al., 2005**). Il existe de nombreuses voies par lesquelles l'hyperglycémie peut augmenter la production des ERO, tels que l'autoxydation de glucose, la voie des polyols, la glycation des protéines et la formation des produits de glycation avancés (**Armstrong et al., 1996**). De plus, l'élévation de la concentration de glucose peut déprimer le mécanisme de défense antioxydant endogène tel que le GST (**Yoshida et Kondo, 1998**). Le déséquilibre entre la production des ERO et le système de défense antioxydant peut augmenter le stress oxydant et conduire à des dommages des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides (**Prakasam et al., 2005**).

Un but principal de notre étude c'est d'évaluer l'effet de l'EMRC et de l'EMBV sur la peroxydation lipidique et le taux du GSH, GST et GSH-Px affectés par le stress oxydant associé au diabète sur des rats rendus diabétiques par la STZ et qui sont alimentés par un régime carencé en zinc.

Plusieurs études réalisées sur des modèles animaux utilisant le dosage de la TBARS ont constaté une augmentation du malonyldialdéhyde (MDA) dans le sang et les tissus (le foie, les reins et le cœur) des sujets diabétiques (**Baynes, 1991**). Cette condition est adéquate avec nos résultats où on a constaté une augmentation significative de la concentration du MDA dans le foie, le cœur et les reins chez le groupe des rats diabétiques par rapport au groupe des non diabétique.

L'augmentation du taux de MDA est le résultat de l'augmentation des ERO qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoque la peroxydation lipidique (**Battacharya et al., 1997**). L'augmentation des ERO pourrait

être due, soit à l'augmentation de leur production, soit à la réduction de leur élimination suite à l'épuisement des systèmes antioxydants piègeurs tel que rapportent (Cho et al., 2002). La STZ peut aussi augmenter le niveau des ERO chez les rats diabétiques en raison de l'augmentation de la glycémie (Mazunder et al., 2005). Lors d'un diabète, l'hypoinsulinémie augmente l'activité de l'enzyme acyl-CoA oxydase, qui initiée la  $\beta$  oxydation lipidique des acides ce qui provoque une augmentation de la peroxydation lipidique (Sivajothi et al., 2008)

Les résultats de cette investigation ont révélé une augmentation significative de la concentration en MDA chez les rats diabétiques qui sont sous un régime alimentaire pauvre en zinc par rapport à ceux alimentés par un régime normal, ce résultat est similaire à celui de Chen et Young (1998), qui ont démontrés que l'insuffisance du zinc induit une génération accrue des radicaux libres et de la peroxydation des lipides dans le sang et le foie des souris et des 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 (Yin et al., 2013).

Les résultats obtenus ont montré aussi une diminution de la concentration du glutathion réduit hépatique (GSH) chez les rats diabétiques de régime pauvre en zinc par rapport à ceux de régime alimentaire normal. Ceci est accordé par Sayed (2012) qui a démontré une diminution de la concentration de GSH chez les rats diabétiques. La diminution des taux tissulaires de GSH a clairement suggéré son utilisation accrue par les cellules hépatiques qui pourrait être le résultat de la réduction de la synthèse ou du renforcement de la dégradation de GSH par l'augmentation de stress oxydant au cours de diabète (Furfaro et al., 2012) et par la carence en zinc (Kechrid et al., 2007 ; Miao et al., 2013).

L'administration quotidienne de l'extrait méthanolique lyophilisé *Bêta vulgaris* pendant trois semaines a permis de réduire d'une manière significative le taux du MDA et d'augmenter le taux de GSH dans le foie, le cœur et les reins chez les rats diabétiques de régime carencé en zinc par rapport à ceux non traités. Il a été rapporté que plusieurs composés de polyphénols isolés de *Beta vulgaris* possèdent de fortes propriétés antioxydantes, qui réduisent la formation de ROS en inhibant directement les enzymes génératrices d'oxygène réactif (Liu et al., 2014). El-Gamal et al (2014) ont indiqué que le traitement par *Beta vulgaris* diminuait le taux de MDA rénale dans la néphrotoxicité

induite par la gentamicine chez les rats. **Jain et Singhai (2012)** ont rapporté aussi que l'administration de *Beta vulgaris var cicla* diminuait significativement le taux de MDA et augmentait la concentration de GSH chez les rats et suggérait que l'effet antioxydant de cette plante joue un rôle protecteur important contre la toxicité induite par l'éthanol. En outre, **Sacan et Yanardag (2010)** ont mentionné une diminution significative du taux de MDA dans le foie et une augmentation des taux de GSH chez les rats diabétiques traités par *Beta vulgaris*. Il a été suggéré que les activités anti-oxydantes et anti-radicalaires peuvent être dues à la présence de terpénoïdes dans *Beta vulgaris*. **Pyo et al (2004)** ont montré une corrélation linéaire entre l'effet antiradicalaire et la concentration polyphénolique de *Beta vulgaris*. Les acides phénoliques et les flavonoïdes contenant plusieurs groupes hydroxyles ont des activités antioxydantes plus élevées contre les espèces radicalaires.

Le traitement quotidien par *Ruta chalepensis* a nettement amélioré les taux de MDA et de GSH ce qui suggère que ce traitement possède une puissante activité de piégeage des radicaux libres. L'activité de piégeage radicalaire de la rutine (principe actif de *Ruta chalepensis*) a été confirmée chez les rats diabétiques (**Mahmoud et Soliman, 2013 ; Mahmoud et al., 2015**).

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques (**Halliwell, 2009**). Parmi ces antioxydants enzymatiques la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la glutathion-S-transférase (GST).

Le rôle de la glutathion peroxydase (GSH-Px) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools.

Les glutathion peroxydases constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion. Le glutathion oxydé sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH,H<sup>+</sup>, formé principalement par la voie des pentoses (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).



Dans notre étude, on a constaté une diminution significative de l'activité de GSH-Px des rats carencés en zinc par rapport aux rats alimentés par un régime alimentaire normal. Ceci est en accord avec les résultats de **Tomat et al (2013)**. La baisse activité de GSH-Px pourrait être directement expliquée par la faible concentration du glutathion ; car ce dernier est un substrat et cofacteur de GSH-Px (**Ramachandran et Saravanan, 2013**). D'autre part l'hyperglycémie peut produire les ROS et empêcher également l'activité des enzymes antioxydantes telles que le SOD, le CAT et le GSH-Px par l'inhibition des sites actives de ces enzymes (**Sindhu et al., 2004**).

En ce qui concerne la glutathion-S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans l'intoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition aux RL (**Hayes et Pulford, 1995**). La fonction des GSTs la plus connue est leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre, le glutathion et des substances nocives pour diminuer leurs réactivités avec les macromolécules intracellulaires.

Les GST complètent l'action des glutathion peroxydases (GSH-Px) dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante, les GSTs préviennent les dommages cytotoxiques et génétoxiques causés par les composés électrophiles générés comme produits de dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Hayes et Pulford, 1995**).

D'après les résultats obtenus, on constate une diminution significative de l'activité de GST hépatique, cardiaque et rénale chez les rats alimentés par un régime pauvre en zinc en comparaison avec ceux alimentés par un régime riche en zinc. Il est intéressant de signaler que l'insuffisance du zinc provoque un stress oxydant, pendant lequel les cellules tendent à compenser ce déséquilibre en activant les éléments du système de défense antioxydant comme la GST. Simultanément dans nos expériences, on a remarqué que l'extrait de *Ruta chalepensis* a augmenté de manière significative l'activité de GST et de GSH-Px chez les rats diabétiques alimentés par un régime pauvre en zinc. Il a été rapporté que plusieurs composés polyphénoliques isolés de *R. chalepensis*, tels que la rutine, possèdent de fortes propriétés antioxydantes, qui réduisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène en inhibant directement les enzymes réactives produisant de l'oxygène. En outre, il a été mentionné que *R. chalepensis* peut induire l'expression de plusieurs gènes d'enzymes antioxydantes, y compris GSH-Px et GST (**Daycem et al., 2013**).

D'autre part, les résultats ont montré que le traitement par l'extrait de *Beta vulgaris* a augmenté l'activité de GST et de GSH-Px. Ceci peut être dû à la capacité antioxydante de la plante à piéger les radicaux libres et améliorer l'activité des enzymes antioxydantes (Fusun Oztay et al., 2015)

En ce qui concerne l'histologie; le pancréas des rats rendus diabétiques présente des îlots nécrotiques avec une destruction des populations cellulaires, notamment les cellules  $\beta$ . Ceci est dû à l'effet cytotoxique de la streptozotocine ayant des conséquences négatives sur la sécrétion exocrine et endocrine pancréatique, procès accompagné par un diabète typique dû à la défection apparue de la sécrétion insulinique.

Le pancréas des rats diabétiques alimentés par un régime pauvre en zinc a présenté aussi une destruction complète des îlots de langerhans. En revanche, l'histologie pancréatique des rats alimentés par un régime carencé en zinc et traités par l'EMRC et l'EMBV a présenté une bonne distribution et une forme intacte des îlots de Langerhans. Il est, peut-être, constatable que les deux extraits possèdent des effets préventifs sur la dépréciation du pancréas. Cette conclusion trouve son utilité également dans d'autres études où ils ont visualisé l'efficacité de ces extraits sur la protection du tissu pancréatiques (Bolkent et al., 2000 ; Osama Mohamed et al., 2010)



*CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES*



### *Conclusion et perspectives*

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

Notre étude a été consacré à l'effet de l'extrait méthanolique lyophilisé de deux plantes algériennes : *Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris var cicla* sur le développement du diabète chez des rats diabétiques alimentés par un régime carencé en zinc et à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que:

- ✓ Le screening phytochimique a montré la richesse de *Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris var cicla* en plusieurs principes actifs tel que flavonoïdes, les saponosides, les tanins, les mucilages, les composées réducteurs et les coumarines.
- ✓ L'investigation phytochimique quantitative a dévoilé que les deux plantes étudiées sont riches en polyphénols totaux et en flavonoïdes.
- ✓ Les deux plantes sont douées d'une activité anti-radicalaire prouvée in vitro en utilisant l'effet scavenger du radical stable (DPPH).
- ✓ La carence en zinc dans l'alimentation est clairement influée sur le poids pondéral mais le traitement par les deux extraits a amélioré ce paramètre d'aspect physiologique.
- ✓ La concentration du zinc dans les différents tissus (le foie, le rein et le fémur) est diminuée dans le cas d'une carence en zinc dans la nourriture. Alors que le traitement par *Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris* a rétabli leur concentration presque aux valeurs normales.
- ✓ La carence en zinc dans l'alimentation a induit des troubles dans le métabolisme glycidique et lipidique traduisant par une augmentation de la concentration du glucose, des lipides totaux, du cholestérol et des triglycérides mais les deux plantes ont réduit ces troubles.

- ✓ De plus, les deux plantes utilisées ont montré un remarquable effet cytoprotecteur du pancréas contre les radicaux superoxydes générés par la streptozotocine en préservant probablement la capacité de la sécrétion de l'insuline.
  - ✓ Pour le métabolisme protéique et dans le cas d'une carence en zinc, les protéines sériques sont clairement diminuées avec une augmentation de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique. Alors que l'EMRC et l'EMBV a joué un effet positif dans l'amélioration de ces paramètres.
  - ✓ Pour l'activité enzymatique, la pauvreté du zinc dans la nourriture a provoqué une augmentation de l'activité des transaminases (TGO et TGP). Mais le traitement par l'extrait méthanolique a amélioré ces activités enzymatiques.
- En ce qui concerne les paramètres de stress oxydatif, nos résultats montrent que l'insuffisance du zinc dans la nourriture des rats diabétiques a provoqué :
- ✓ Une augmentation de taux de peroxydation lipidique (MDA).
  - ✓ Une diminution de la concentration du glutathion réduit (GSH).
  - ✓ Une diminution de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px).
  - ✓ Une diminution de l'activité enzymatique du glutathion-S-transférase (GST).
- Alors que le traitement par *Ruta chalepensis* et *Beta vulgaris* a protégé les cellules contre l'attaque radicalaire en :
- ✓ Diminuant le taux de peroxydation lipidique (MDA).
  - ✓ augmentant la concentration du glutathion réduit (GSH), et l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) et du glutathion-S-transférase (GST).

En effet, il ressort du présent travail que *Ruta chalepensis* et *Bêta vulgaris* sont des produits forts intéressants et riches en possibilités thérapeutiques. Nos résultats sont pour nous remarquables car ils ouvrent dans le future des perspectives expérimentales qui devraient nous permettre d'identifier clairement les molécules impliquées dans l'effet hypoglycémique, hypolipidémique et antioxydant de ces plantes et d'avancer vers une meilleure connaissance du (des) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans les effets pharmacologiques observés.

# *Références Bibliographiques*



### Références bibliographiques

#### A

- **Abdulbasset M.E.S and AbdeTawabA.H. (2008).** Médicinal Herbal Guide. Ed: ALFA–PUBLISHING; p: 428 - 429.
- Alberti, K.G., Zimmet, P.Z. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. World Health Transplantation WHO/NCD/NCS/99.2.
- **Al-Sagair O.** Persistent hyperinsulinemia as a result of infusion with *Ruta Chalepensis*. *J Appl Res* 2004;4:625–9
- **Al-Shamaony L, Al Khazraji M.S., Twaij Ha. (1994).** Hypoglycemic effects of *Artemisia herba-alba*. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. *J Ethnopharmacol*, 43(3); p: 167 - 171.
- **Aly Abdullah Al Qarawi.** Stimulatory Effect of the Aqueous Extract of *Ruta chalepensis* on the Sex Organs and Hormones of Male Rats. *The Journal of Applied Research*. 2005; 5(1): 206-11.
- **American Diabetes Association.** Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2017; 27 : S15-S35
- **Association canadienne du diabète. (2008).** Lignes directrices de pratique clinique pour la prévention et le traitement du diabète au Canada. *Canadian Journal of Diabetes* 32 : 1
- **Armstrong AM, Young IS (1996).** The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependant diabetes. *Free Radic Biol Med*, 21 : 719 - 735.
- **Arnoud, J. (1987).** Etude du zinc du lait maternel. Thèse de doctorat, Science pharmaceutiques. *Grenoble*.
- **Arnoud, J and Favier, A. (1998).** Les oligoéléments en médecine et biologie .p.p: 351. *Lavoisier. Tec & Doc*.
- Auld, D.S. (2001). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*. 14: 271–313.

#### B

- **Baba Aissa. (1999).** Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d’Algérie et du Maghreb. Ed: LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA ; p : 243 - 244.



- **Baer, M.T., King, J.C., Tamura, T., Margen, S., Bradfield, R.B and Dougherty, N.A.** (1985). Nitrogen utilization, enzyme activity, glucose in tolerance and leucocyte chemotaxis in human experimental zinc depletion. *Am. Clin. Nutr.* **41**: 1220 – 1235.
- **Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C. and Pinkas, M.** 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089
- **Bakour F et Sioune Z. (2007).** L'apport du dosage de HbA1c dans le diagnostic de diabète insulino-dépendant. MEMOIRE LICENCE biochimie, université Badji Mokhtar, Annaba. P: 39.
- **Barbosa, N.B., Rocha, J.B., Soares, J.C., Wondracek, D.C., Goncalves, J.F., Schetinger, M.R., Nogueira, C.W.** (2008). Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* **46** (1): 186-94.
- **BARRECA D., BELLOCCO E., CARISTI C., LEUZZI U., KUMQUAT G.G.,** 2011- Fortunella japonica Swingle juice: Flavonoïd distribution and antioxidant properties. *Food Research International*. Vol. (44): 2190-2197.
- **Baskin S.I and Salem H. (1994).** Oxidant, antioxidant and free radicals. *Academic press Inc.* 363 ; p : 25-62.
- **Battacharya SK, Satyan KS, Ghosal S (1997).** Antioxidant activity of glycowithanolides from *Withania somnifera*. *Indian Journal of Experimental Biology*, **35** : 236 - 239.
- **Baynes J.W. (1991).** Perspectives in diabetes, role of oxidative stress on development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40; p: 405 - 412.
- **Beaudeau J.L et Dominique B.R. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Edition médicales. *Internationales* ; p : 550.
- **Beckman K.B., Ames B.N.(1998).**The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78(2); p: 547-81.
- **Bennaoum Z, Benhassaini H, Falconieri D, Piras A, Porcedda S.** 2017. Chemical variability in essential oils from *Ruta* species among seasons, and its taxonomic and ecological significance. *Nat Prod Res.* 3:1–6.
- **Berthon, G., May, P.M and Williams, D.R.** (1978). Formation constants for zinc citrate – cysteinate binary and ternary complexes and improved models of low molecular weight species in blood plasma. *Chem. Soc. Dalton Trans.* **2**: 1433 – 1438.

- **Bertrand, G., Bhattacharjee, R.C.** (1934). L'action combinée du zinc et des vitamines dans l'alimentation des animaux. *CR. Acad. Sci. Pris.* **198**: 1823-1827.
- **Betteridge J.** (2002). Lipid disorders in diabetes mellitus. In: Pickup J and Williams G. (eds.) *Textbook of Diabetes. Blackwell Science, London*; p: 551 - 553.
- **Bischoff H.** The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin Invest Med* 1995;18:303–11.
- **Bjursell M., Egecioglu E., Gerdin A.K and Svensson, L.** (2005). Importance of melanin-concentrating hormone receptor for the acute effects of ghrelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**; p: 759-765.
- **Boitard C.** (2002). The origin of type 1 diabetes: an autoimmune disease?. *Diabetes Metab*, 28 : 263 – 265.
- **Bolkent S., Yanardag R., Tabakoglu-Oguz A and Ozsoy-Sacan O.** (2000). Effects of Chard (*Beta vulgaris L var. cicla*) extract on pancreatic B cells in streptozotocindiabetic Rats: a morphological and biochemical study. *J. Ethnopharmacol.* **73** ; p : 251–259.
- **Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J.** (2003). Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes & Metabolism (Paris)*, 26 : 163-176.
- **Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J.L., Thérond, P., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J.** (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **62** : 147-157.
- **Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Beaudoux J.L., Peynet J., Legrand A and Delattre J.** (2001). Aging and oxidative stress. Which potential markers. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*; 59(4) ; p: 453-9.
- **Bouabidi W, Hanana M, Gargouri S, Amri I, Fezzani T, Ksontini M, Jamoussi B, Hamrouni L.** 2015. Chemical composition, phytotoxic and antifungal properties of *Ruta chalepensis L.* essential oils. *Nat Prod Res.* 29:864–868.
- **Bouajaj S, Romane A, Benyamna A, Amri I, Hanana M, Hamrouni L, Romdhane M.** 2014. Essential oil composition, phytotoxic and antifungal activities of *Ruta chalepensis L.* leaves from High Atlas Mountains (Morocco). *Nat Prod Res.* 28:1910–1914.
- **Bouhadjera K.,** (2005). Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* et *Aristida pungens*. thèse Diplôme de Doctorat d'état université abou bekr belkaid Algérie 149p.

- **Bouldjadj R.** (2009). Étude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba* Asso chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par streptozotocine. Thèse de Magistère. Université Mentouri, Constantine ; p: 111.
- **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.
- **Brandão-Neto, J., Stefan, V., Mendonça, B.B., Bloise, W., Castro, A.V.** (1995). The essential role of zinc in growth. *Nutr. Res.* **15**: 335.
- **Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cass one Faldetta M, Ferri C, De Mattia, G** (1997). Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin dependent diabetic patients. *Metabolism*, 46; 1194 - 1198.
- **Browne, R.W., Bloom, M.S., Schisterman, E.F., Hovey, K., Trevisan, M., Wu, C., Liu, A., Wactawski-Wende, J.** (2008). Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers* **13** (2): 160-83.
- **Brownlee M** (2001). Biochemistry and molecular cellular biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813 - 20.
- **Brownlee M** (2005). The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism, *Diabetes*, 54: 1615 - 1625.
- **Buchanan, T.A., Xiang, A.H., Page, K.A.** (2012). Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8** (11): 639-649.
- **Bunce, G.E.** (1989). Zinc in endocrine function. In: Zinc in human biology. Mills. C.F. (Ed). *Springer verlag. Londres.* pp: 249 – 258.
- **Burtis, A., Ashwood, E., Bruns, D.** (1999). *Tiets textbook of clinical chemistry*, 3rd edition. Saunders Company. p: 1917.
- **Buyschaert M, Bergman M.** (2012). Definition of prediabetes. *Med. Clin. N. Am.* **95**(2):289–297

C

- **Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat AG., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L and Sauvaigo S.** (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.*, **383**(6); p: 933-43.
- **Cantin PA** (1999). Oxidant and antioxidants in lung injury. In: Lam and other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation, Moss J. New York: Dekker, 519 – 531

- **Capeau J, Desbois-mouthon C, magré J, caron M, vigouroux C, Lascols O, Cherqui G. (1996).** Mécanisme moléculaires et cellulaires de l'action de l'insuline. Appllication à la physiologie et à la pathologie. *Nutr. Clin. Métabol*, 10; 231 - 242.
- **Cefalu W. T. (2006).** Animal Models of Type 2 Diabetes: Clinical Presentation and Pathophysiological Relevance to the Human Condition. *ILAR Journal*; 47 (3); p: 186-198.
- **Chandra, R.K. (1985).** Trace elements regulation of immunity and infection. *Am. Coll. Nutr.* 4: 5 – 16.
- **Chandra A., Mahdi A.A., ahmed S., sigh R.K. (2007).** Indian herbs result in hypoglycemic responses in STZ induced diabetic rats. *Nutrition research* 27; p: 161-168.
- Charbonnel, B., Cariou, B. (1997). Diabète non insulino-dépendant: indications thérapeutiques. *Médecine Thérapeutique* 3: 103-111.
- **Charlton B and Bacely A. (1989).** Cyclophosphamide induced diabetes in NOD/WEHI mice. Evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes mellitus. *Diabetes*; 38; p: 441-447.
- **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.
- **Cheng A.Y.Y and Fantus I.G. (2005).** Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal.* 172: 213-226.
- **Cho SY, Park JY, Park EM, Choi MS, Lee MK, Jeon SM, Jang MK, Kim Mj, Park YB (2002).** Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clinica Chimica Acta*, 317: 109 - 117.
- **Christianson, D.W. (1991).** The structural biology of zinc. *Adv. Prot. Chem.* 42: 281–335.
- **Claeysen, R. (2009).** Zinc et brûlure : Etude du statut en zinc et de l'influence de la supplémentation sur un modèle animal de brûlure sévère. Approche métabolique et moléculaire. Thèse de doctorat, Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement. *Grenoble*.
- **Coleman, J.E. (1992).** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins. In: *Annual Review of Biochemistry* (Richardson, C.C., Abelson, J.N., Meister, A and Walch, C.T., eds) .pp: 897 – 946.

- **Comhair SAA, Erzurum SC** (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283: 246 - 255.
- **Combs T .C., Grant P.T and Frank R.H.** (1971) .Differences in the binding of zinc ion by insulin and pro-insulin . *Bioch.*125; p: 62.
- **Cooperstin S.J and Watkin D.** (1981). Action of toxic drugs on islet cells. In the Islets of Langerhans. *Academic Press, New York*; p: 387 – 425.
- **Coste, T.C., Armand, M., Lebacq, J., Lebecque, P., Wallemacq, P., Leal, T.** (2007). An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clin. Biochem.* **40**: 511-520.
- **Cousin, R.J.** (1983). Metallothionein. Aspects related to copper and zinc metabolism. *Inher. Metab. Dis. 6. Suppl. 1*: 15 – 21.
- **Cousin, R.J.** (1985). Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* **65**: 238 – 309.
- **Cozma, L. S., Luzio, S.D., Dunseath, G.J., Langendorg, K .W., Pieber, T., Owens, D.R.** (2002). Comparison of the effects of three insulinotropic drugs on plasma insulin levels after a standard meal. *Diabetes Care* **25** (8): 1271-1276.

### D

- **Daycem K., Rabiaa M.S., Sameh A., Dhafer L., Mokhtar H and Bouajila J.** (2013). Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalepensis L.* and *Peganum harmala L.* *Food and Chemical Toxicology*; 55; p: 202–208.
- **Delattre J.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres- Paris –New york ; p:620.
- **Denis, U.** (2002). Etude pharmacologique de la voie de signalisation impliquée dans l'apoptose des péricytes rétinien induite par les produits avancés de glycation (albumine bovine modifiée par le méthylglyoxal). Thèse de doctorat, L'institut National des Sciences Appliquées. Lyon I.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P and Vidal N.** (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97; p: 654–660.
- **Dagogo-Jack S, Santiago JV** (1997). Physiopathology of type 2 diabetes and modes of action of therapeutic interventions. *Arch intern med*, 157:1802 - 1817.

- **Duhault J and Koenig-Berard E. (1997).** Diabetes mellitus and its animal models. *Thérapie*; 52; p: 375-84.
- **DUKE A.J, DUKE P.A.K. et DUCCELLIE J.L. (2008).** DUKE'S HANDBOOK of Medicinal Plants of the Bible, Ed: *CRC PRESS*; p: 394 – 397.
- **Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N and Avimadj M. (2008).** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (ed); p: 19- 43.
- **Duzguner, V., Kaya, S. (2007).** Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radical Biology and Medicine* **42**: 1481-1486.

### E

- **Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A. (2007).** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 5 ; p: 194–203.
- **Eggleton, W.G.T. (1940).** The zinc and copper contents of the organs and tissues of Chinese subjects. *Bioch.* **34**: 991 – 997.
- **El-Gamal AA, Alsaid MS, Raish M, Al-Sohaibani M, Al-Massarani SM, Ahmad A, et al.** Beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rodent model. *Med Inflamm* 2014;10:1155-62
- **Ellman, G.L. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1): 70-77.
- **Ereifej KI, Feng H, Rababah T, Almajwal A, Alu'datt M, Gammoh SI, et al. 2015.** Chemical composition, phenolics, anthocyanins concentration and antioxidant activity of ten wild edible plants. *Food Nutr Sci.* 06:581–590.
- **Essawy GS, Sobhhy HM, El-Banna HA.** The hypoglycemic effect of volatile oil of some Egyptian plants. *Vet Med J* 1995;43:167–72.
- **Evans, G.W. (1980).** Normal and abnormal zinc absorption in man and animals: the tryptophan connection. *Nutr. Rev.* **38**: 137 – 141.
- **Evans J.L. (2000).** Goldfine ID. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.*, 2(3); p: 401-13.

F

- **Fairweather-Tait S.J., Wright, A.J.A., Cook, J. (1985).** Studies of zinc metabolism in pregnant and placating rats. *Brit. Nutr.* 54 ; p : 401-413.
- **Fakhfakh N, Zouari S, Zouari M, Loussayef C, Zouari N. 2012.** Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (*Rutacea*). *J Med Plants Res.* 6:593–600.
- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*; p:103-109.
- **Favier A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* Vol 64, N° 6; p: 64 ,390-396.
- **Feillet CC, Rock E, Coudray C, Grzelkowska K, Azais BV, Dardevet D (1999).** Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clinica Chimica Acta*, 284 : 31 - 43.
- **Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y (2005).** Beta cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 493 - 500.
- **Féry F, Paquot N (2003).** Etiopathogénie et physiopathologie du diabète de type 2. *La revue de médecine interne*, 24: 730 - 737.
- **Flohe, L., Gunzler, W.A. (1984).** Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105** : 114–121.
- **Fontaine, É. (2007).** Radicaux libres - Stress oxydatif. *Cah. Nutr. Diét.* **42**: 2.
- **Fossati P. (1982).** Triglycérides. *Clin Chem*; 28(10) ; p: 2077-2080.
- **Forman, H.J., Fridovich, I. (1973).** On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *Biol. Chem.* **248**: 2645-2649.
- **Foure, H. (1986).** Dosage des fractions libres et liées du zinc sérique. Intérêt de ces fractions. Thèse de 3e cycle en pharmacie. *Grenoble*.
- **Fridovich, I. (1995).** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97±112.
- **Frøde T.S. and Medeiros Y.S. (2008).** Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*; 115; p: 73-183.

- **Fukunaka A and Fujitani y.** (2018). Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 476
- **Fusun Oztay, Ozlem Sacan, Ozgecan Kayalar, Sehnaz Bolkent, Yesim Ipci, Levent Kabasakal, Goksel Sener and Refiye Yanardag.** 2015. Chard (*Beta vulgaris* var. *cicla*) extract improved hyperglycemia-induced oxidative stress and surfactant-associated protein alterations in rat lungs. *Pharm Biol*, 53(11): 1639–1646
- **Furfaro, A.L., Nitti, M., Marengo, B., Domenicotti, C., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N.** (2012). Impaired synthesis contributes to diabetes-induced decrease in liver glutathione. *Molecular Medicine* **29**: 899-905.

### G

- **Gallagher, M.P., Goland, R.S., Greenbaum, C.J.** (2011). Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1243: 119-134.
- **Gao, Z.J., Han, X.H., Xiao, X.G.** (2009). Purification and characterization of polyphenoloxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chem.* 117; p: 342–348.
- **Georgé S., Brat P., Alter P and Amiot J.M.** (2005) .Rapid determination of polyphénols and Vitamin C in plant-derived products. *J. Agr. Food Chem.* 53; p: 1370-1373.
- **Gillery P, Monboise JC, Maquart FX, Borel JP (1988).** Glycation of proteins as a source of superoxide. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris*, 353 - 376.
- **Gin, H., Rigalleau, V.** (1999). Diabétiques et diabète. *EMC- Endocrinology Nutrition 10 366-R.10*: 6.
- **González RG P, Barnett J, Aguayo HM, Cheng LT, Chylack J** (1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens, *Diabetes*, 33 : 196 199.
- **Gonzalez-Trujano M.E., Carrera D., Ventura-Martinez R., Cedillo-Portugal E., Navarrete A.** (2006). Neuro-pharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 106; p:129–135.
- **Goodman L.S and Gilman A.** (1985). *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Macmillan. *New York*; p; 1490 – 1510.



- **Gribe A et Merzougui I. (2009)**. Mémoire de master biochimie : étude de l'effet antidiabétique de l'extrait aqueux de la graine de *lipinus albus*. Université Badji Mokhtar, Annaba; p: 2-5.
- **Grodsky G.M and Schmid Y.F. (1985)**. Kinetics and quantitative relationship between insulin release and Zn<sup>65</sup> efflux from perfused islet. *Endocr.* 117; p: 704-711.
- **Grover J.K., Yadav S., Vats V. (2002)**. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 81–100.
- **Guillaume T, De Flines J.** Diabète du sujet âgé : aspects épidémiologique, physiopathologique et clinique. *Revue médicale de Liège*, 2005 ; 5-6: 429-32
- **Guillausseau, P.J, Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Ambonville, C., Kevorkian, J.P. (2008)**. Insulinosécrétion et diabète de type 2, *Médecine des maladies Métaboliques* 1 : s21-s24.

### H

- **Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974)**. Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *Biol. Chem.* **249** (22): 7130-7139.
- **Hall, A.G., Kelleher, S.L., Lonnerdal, B., Philipps, A.F. (2005)**. A graded model of dietary zinc deficiency: effects on growth, insulin-like growth factor-I, and the glucose/insulin axis in weanling rats. *Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **4**: 72-80.
- **Halliwell B. (2009)**. The wanderings of a free radical. *Free radical biology et Medicine*; 46; p: 531-542.
- **Halliwell B., Gutteridge JMC. (1989)**. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Second edition, Clarendon Press, Oxford.
- **Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007)**. *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn. New York: Oxford Univ. Press Inc. p: 187.
- **Hayes, J.D., Pulford, D.J. (1995)**. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 445-600.
- **Hemingway, R.W. (1992)**. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Lipid polyphenols: synthesis, properties, significance*. Laks P.E, Hemingway R W New York
- **Hempel A (1997)**. High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ. Res*, 81: 363 - 371.

- **Hendricks, D.G and Mahoney, A.W. (1972).** Glucose tolerance in zinc loss, hypogeusia, anorexia and hyposmia. *Clin. Invest.* **51**; p: 44.
- **Henkin R.L., keiser, H.R and Bronzert D.A. (1972).** Histidine dependent zinc loss, hypogeusia, anorexia and hyposmia. *Clin. Invest.* **51** ; p : 44.
- **Henkin, R.L., Law, J.S and Nelson, N.R. (1988).** The role of zinc on the trophic growth factors, nerve growth factor and gustin. In: Trace element in man and animals. Hurley, L.S., Keen, C.L., Lonnerdol, B and Rucker, R.B. (EDs). *Plenum press. New York.* **6**: pp: 385 – 387.
- **Henquin, J.C. (2005).** Le traitement pharmacologique du diabète de type 2 : Mode d'action des médicaments d'aujourd'hui et demain. *Louvain Médical.* **124**: 39-46.
- **Hilal Zaid , Akhilesh K. Tamrakar , Mohammed S. Razzaque, and Thomas Efferth. 2018 Diabetes and Metabolism Disorders Medicinal Plants: A Glance at the Past and a Look to the Future 2018**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2018, Article ID 5843298, 3 pages
- **Hould, R.(1984).**Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed Maloine. 19-21 and 225-227.
- **Hunt JV, Dean RT, Wolff SP (1988).** Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J,* **256**: 2052 - 212.
- **Hussam Zein, Abd El-Moneim S. Hashish and Ghada H.H. Ismaiel. 2015.** The antioxidant and Anticancer Activities of Swiss Chard and Red Beetroot Leaves. *Curr. Sci. Int.,* **4(4)**: 491-498.
- **Hwang H.J., Kim S.W., Lim J.M., Joo J.H., Kim H.M and Yun J.W. (2005).** Hypoglycémie effect of crude exopolysaccharides product by aedical mushroom phellinusbaummi in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life sciences* **76**; p: 3069-3080.

I

- **Imoberdorf, R., Rühlin, M., Ballmer, P.E. (2010).** Zinc – un oligoélément vital à grand potentiel. *Forum Med. Suisse* **10** (44): 764–768.

K

- **Jackson, M.J., Jones, D.A., Edwards, R.H et al.** (1984). Zinc homeostasis in man: studies using a new stable isotope – dilution technique. *Br. Nutr.* **51**: 199 – 208.
- **Jackson, M.J.** (1989). Physiology of zinc: general aspects. In: Zinc in human biology. Mills. C.F. (Ed). pp: 1 – 14.
- Jain NK, Singhal AK. Protective role of Beta vulgaris L. leaves extract and fractions on ethanol-mediated hepatic toxicity. *Acta Pol Pharm* 2012;69:945–50.
- **Jakuš V, Rietbrock N (2004)**. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol. Res.* **53** : 131 - 142.
- **Januel C.** (2003). Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4, thèse de doctorat, Université de Lyon I, France.
- **Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, Z., Gillette, J.R.** (1974). Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology* **11** (3): 151–159.
- **Jung UJ, Lee MK, Park YB.** Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1134–45.

K

- **Kacem M, Simon G, Leschiera R, et al.** Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ruta chalepensis* L. extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015;51:128–41.
- **Kambouche N, Merah B , Derdour A, Bellahouel S, Benziane MM , Younos C, Firkioui M, Bedouhene S, Soulimani R. (2009)**. Etude de l'effet antidiabétique des saponines extraites d'*Anabasis articulata* (Forssk) Moq, plante utilisée traditionnellement en Algérie. *Phytothérapie*, 7: 197-201.
- **Kanner J., Harel S and Granit R. (2001)**. Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food. Chem.* 49; p: 5178–5185.
- **Kaplan L.A and Kaplan A. (1984)**. *Glucose. ClinChem* the C.V Mosby CO. St Louis.

- **Kaplan, L.A et al.** (1984). Lipids. *Clin. Chem.* 918-919.
- **Kaplan A.** (1984). Urea. *ClinChem the C.V*; p: 1257-1260 and 437 and 418.Toronto. Princelon; p: 1032-1036.
- **Krayni H, Fakhfakh N, Kossentini M and Zouari S.**(2018). Fruits of *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) as a Source of 2-undecanone. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 21 (3): 789-795
- **Kechrid, Z., Amamra, S., Bouzerna, N.** (2006). The effect of zinc deficiency on zinc status, carbohydrate metabolism and progesterone level in pregnant rats. *Turk. Med. Sci.* **36**: 337–342.
- **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.
- **Kechrid, Z., Derai, E.H., Layachi, N.** (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. Diab. Metab.* **15**: 46-50.
- **Keogh RJ, Dunlop ME, Larkins RG** (1997). Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation, *Metabolism*, 46 : 41 - 47.
- **Khadhri A, Bouali I, Belkhir S, Mokded R, Smiti S, Falé P, Araújo ME, Serralheiro ML.** 2017. *In vitro* digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharm Biol.* 55:101–107
- **King, G.L., Brownlee, M.** (1996). The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **25** (2): 255-270.
- **King, J.C and Keen, C.L.** (1999). Zinc. In : Shils, M., Olson, J.A., Shike, M and Ross, A.C. EDs. Nutrition in health and disease. 9th ed. Baltimore. *Williams & Wilkins* . pp: 223 – 239.
- **Kirchgessner, M and Weigand, E.** (1983). Zinc absorption and excretion in relation to nutrition. In: Metal ions in biological systems. Sigel, H. (Ed). *Marcel Dekker. New York.* 15: pp: 319 – 361.
- **Kirschvink, N., De Moffarts, B., Lekeux, P.** (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary* **177**: 178–191.

- **Koukay, N., Laporte, F., Favier, A.** (1987). Zinc et radicaux libres (étude in vitro). In : Le zinc en médecine et biologie. Favier, A., Arnaud, J., Faure, H. eds. Paris: Editions Médicales Internationales. pp :64-68.
- **Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL** (1997). Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats, *J. Clin. Invest.*,100: 115 - 126.
- **Krayni H, Fakhfakh N, Aloui L, Zouari N, Kossentini M, Zouari S.** 2015. Chemical composition and chelating activity of *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) essential oil as influenced by phenological stages and plant organs. *J Essent Oil Res.* 27:514–520
- **Kugler F., Stintzing F.C and Carle R.** (2004). Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss Chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L]. Alef. Cv. Brightlights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionizationmass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52; p: 2975–2981.
- **Kumari, D., Nair, N., Bedwal, R.S.** (2011). Effect of dietary zinc deficiency on testes of Wistar rats: Morphometric and cell quantification studies. *Trace Elements in Medicine and Biology* 25: 47–53.

### L

- **Laib, I.** (2011). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, diplôme de Magister en Sciences Alimentaires, université Mentouri Constantine. p23, 25-27
- **Lee, S.L., Kwak, E.H., Kim, Y.H., Choi, J.Y., Kwon, S.T., Beattie, J.H., Kwun I.S.** (2003). Leptin gene expression and serum leptin levels in zinc deficiency: implications for appetite regulation in rats. *Med. Food* 6 (4): 281-289.
- **Lechartier, G., Bellamy, F.** (1877). Sur la présence du zinc dans le corps des animaux et dans les végétaux. *CR. Acad. Sci. Pris.* 84: 687-690.
- **Lecompte, S.** (2012). Etude du rôle du gène PROX1 dans le diabète de type 2. Thèse de doctorat, Sciences de la Vie et de la Santé. Lille 2.
- **Lenzen S and Drinkgern J.** (1996). Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.*, 20(3); p: 463-6.

- **Levin G., Cogan, V and Makady, S.** (1992). Food restriction and membrane fluidity. *Mech. Aging. Dev.* 62; p: 137-141.
- **Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F and Jiang Y.** (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Foodchem.* 102; p: 771-776.
- **Litchfield J.T., Wilcoxon F.** (1949). A simplified method of evaluating dose-effect. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96; p: 99-113.
- **Liu X, Zhu L, Tan J, Zhou X, Xiao L, Yang X, et al.** Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and the triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa* Ledeb. *BMC Complementary Altern Med* 2014;14:1–12.
- **Loizzo M. R, Falco. T, Bonesi. M, Sicari. V, Tundis .R and Bruno. M.** 2017. *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) leaf extract: chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities. *Natural Product Research.* 32:5, 521-528

### M

- **MacFarlane A.J, Strom A and Scott F.W.** (2009). Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes. *Mamm Genome.*;20 (9-10); p: 624-32.
- **Mac Laren, D.** (2007). *Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport.* 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- **Mahmoud. A M , Rasha R. Ahmed, Hanan A. Soliman, Marwa Salah.** 2015. *Ruta graveolens* and its active constituent rutin protect against diethylnitrosamine induced nephrotoxicity through modulation of oxidative stress. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5 (10); 2015: 016-021
- **Mahmoud AM and Soliman AS.** Rutin attenuates hyperlipidemia and cardiac oxidative stress in diabetic rats. *Egypt J Med Sci,* 2013; 34: 287-302.
- **Mauro, N. M.** (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.
- **Malaisse W.J and Sener A.** (2008 ). *Animal Models of Diabetes.* Dans: *Sourcebook of Modes for Biomedical Research.* Edition *Humana Press Inc.* , Totowa , NJ; p: 651.

- **Malardé, L. (2012).** Activité physique et produits dérivés du soja : intérêts dans la prise en charge du stress oxydant associé au diabète de type 1. Thèse de doctorat, Sciences Humaines et Sociales. L'Université européenne de Bretagne.
- **Mansour S. (1990).** Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine; *Journal of Ethnopharmacology* 28; Ed: *ELSEVIER SCIENTIFIC*; p: 305-3012.
- **Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E and Kefalas P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); *Food Chemistry* 89; p: 411-420.
- **Marchand et Thivolet. (2016).** Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *Endocrinologie-Nutrition*. 10:366- 370
- **Maret, W. (1995).** Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochem. Int.* **27**: 111-117.
- **Markham, KR. (1982).** Techniques of flavonoids identification. Ed. Academic Press, London,15:234-243.
- **Massiot G, Dijoux MG, Lavaud C, Men-Olivier L, Connolly JD, Sheeley DM, et al.** Seco-glycosides of oleanolic acid from *Beta vulgaris*. *Phytochem* 1994;37:1667-70.
- **Mazunder UK, Gupta M, Rajeshwar Y 2005.** Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of *phyllanthus niruri* (euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *European Bulletin of Drug Research*, **13 (1)** : 13 - 23 .
- **Merghache, S., Hamza, M., & Tabti, B. (2009).** Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. De Tlemcen, Algérie. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 5(1).
- **Merrells, K.J., Blewett, H., Jaamieson, J.A., Taylor, C.G., Suh, M. (2009).** Relationship between abnormal sperm physiology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. *Br. Nutr.* **102**: 226-232.
- **Methfessel, A.H and Spencer, H. (1966).** Intestinal site of absorption and secretion of  $Ca^{++}$  in adult. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* 25: 483.
- **Miao, X., Sun, W., Miao, L., Fu, Y., Wang, Y., Su, G.,Liu, Q. (2013).** Zinc and Diabetic Retinopathy. *Diabetes Research* **42**: 1-8.
- **Milne, D., Canfield, W.K., Mahalko, J.K and Sandstead, H.H. (1983).** Effect of dietary zinc on whole body surface loss of zinc: impact on estimation of zinc retention by balance method. *Am. Clin. Nutr.* **45**: 877 – 895.

- **Mioulane , P. (2004).** Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; *Larousse* ; Ed : PROTEA ; p : 7-50.
- **Morgan, W.T. (1985).** The histidine rich glycoprotein of serum has a domain rich in histidine praline and glycine that binds heme and metals. *Biochemistry*. **24**: 1496 – 1501.
- **Murray R.L et Kaplan A. (1984).** **Creatinine.** *ClinChem*; p: 1261-1266 and 418.
- **Murray, R. (1984).** Aspartate aminotransferase. *Clin. Chem.* 1112-1116.
- **Mythili, M.D., R. Vyas, G. Akila and S. Gunasekaran, 2004.** Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microsc. Res. Tech.*, 63: 274-281.

### N

- **Naeem Rabeh M and Marwa Ibrahim E.** Anti-hypercholesterolemic effects of beet ( *Beta vulgaris* L.) root waste extract on hypercholesterolemic rats and its antioxidant potential properties. *Pakistan Journal of Nutrition*, 13(9):500-505, 2014.
- **Naito, H.K. (1984).** Cholesterol. *Clin. chem.* 1194-11206 and 437.
- **Nazıroğlu M, Güler M, Özgül C, Sözbir E.** Apple cider vinegar modulates serum lipid profile, erythrocyte, kidney, and liver membrane oxidative stress in ovariectomized mice fed high cholesterol. *J Membr Biol* 2014;247:667–73
- **N’Diaye M., Diatta W., Syg Y., Falla D., Faye B et Bassene E. (2008).** Activité antihyperglycémiant de l’extrait éthanolique des feuilles d’*Icacina senegalensis* juss (*Icacinaceae*).
- **Neve, J et Peretz, A. (1988).** Importance nutritionnelle et physiopathologie du zinc chez l’homme. *Pharm. Belg.* **43**: 466 – 477.
- **Nicolosi R.J., Lawton C.W et wilsonT.A. (1999).** Vitamin E reduced plasma LDL-C, LDL oxidation, and early aortic atherosclerosis compared with black tea in hypercholesterolemic Hamsters. *Nutrition research* vol 19 n 8; p: 1201-1214.
- **Nuraliev IN, Avezov GA.** The efficacy of quercetin in alloxan diabetes. *Eksp Klin Farmakol* 1992;55:42–4.

### O

- **O’Dell, B et Reeves P. (1982).** The effect of zinc deficiency on glucose metabolism in meal-fed rats. *Brit. Nutr.* 49; p: 441-452.



- **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem*;95: 351–8.
- **Oki, T., M. Masuda, S. Furuta, Y. Nishiba, N. Terahara, and I. Suda,** 2002. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *J. Food Sci.*, 67: 1752–1756.
- **Oliva A., K.M. Mee pagala and D.E Wedge.** (2003). Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves including a new quinolone alkaloid. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (4), 890-896.
- **Osterberg, R and Malmensten, B.** (1984). Methylamine induced conformational change of alpha<sub>2</sub>-macroglobulin and its zinc (II) binding capacity. An X-ray scattering study. *Eur. Biochem. J.* 143: 541 – 544.
- **OMS.** (2011). Global status report on non communicable diseases 2010. Description of the global burden of NCDs, their risk factors and determinants 2011 [[http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report2010/en/index.html](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/index.html)]
- **Osama M.A., Adel A.M, Ibrahim A.Y et Ayman M. M.** (2010). Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide streptozotocin-induced diabetic rats. *diabetologia croatica* 39-1; p:19-35.
- **Oteiza, P.L., Olin, K.L., Fraga, C.G., Keen, C.L.** (1996). Oxidant defense systems in testes from zinc-deficient rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **213** (1):85-91.
- **Ouerghemmi Ines, Bettaieb Rebey Iness , Rahali Fatma Zohra , Bourgou Soumaya , Pistelli Luisa , Ksouri Riadh , Marzouk Brahim, Saidani Tounsi Moufida.** 2016. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *J Food Drug Anal.* 327 (2): 1-10
- **Ozsoy-Sacan O, Karabulut-Bulan O, Bolkent S, Yanardag R, Ozgey M.** Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var cicla) on the liver of the diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:1640–8.

P

- **Palsamy P et Subramanian S.** (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, Normalizes hyperglycemia in STZ-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine pharmacotherapy*.62; p: 598-605.

- **Pari L., Latha M. (2005).** Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. *Gen Physiol Biophys*, 24; p: 13 - 26.
- **Park J-H, Lee H-S.** 2015. Inhibitory effects of quinoline isolated from *Ruta chalepensis* and its structurally related derivatives against  $\alpha$ -amylase or  $\alpha$ -glucosidase. *J Appl Biol Chem*. 58:5–8
- **Patricia I.O., Wtherine L.O., Cesar C.F et Carl L.K. (1995).** Zinc deficiency causes oxidative damage to protein, lipids and DNA in rats testes. *Nutr.* 125 ; p : 823-829.
- **Penyaringan F, Jumlah Asai K** 2016. Phytochemical screening, total flavonoid and phenolic content assays of various solvent extracts of tepal of *Musa paradisiaca*. *Malaysian Anal Sci*;20:1181–90.
- **Phillips, J. L and Azari, P.** (1974). Zinc transferrin: enhancement of nucleic acid synthesis in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. *Cell. Immunol.* **10**:31–37.
- **Ploysangam, A., Falciglia, G.A., Brehm, B.J.** (1997). Effect of marginal zinc deficiency on human growth and development. *Trop. Pediatr.* 43: 192–197.
- **Powell, S.R.** (2000). The antioxidant properties of zinc. *Nutr.* **130**: 1447S-1454S.
- **Powers, S.K., Smuder, A.J., Kavazis, A.N., Hudson, M.B.** (2010). Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *Sport Nutrition and Exercise Metabolism* **20**: 2-14.
- **Prakasam A, Sethupathy S, Pugalendi KV (2005).** Antiperoxidative and Antioxidant Effects of *Casaria Esculenta* Root Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats *yale journal of biology and medicine*, **78** : 15 - 23.
- **Prangthip, P., Surasiang, R., Charoensiri, R., Leardkamolkarn, V., Komindr, S., Yamborisut, U., Vanavichit, A., Kongkachuichai, R.** (2012). Amelioration of hyperglycemia, hyperlipidemia, oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet by riceberry supplement. *Functional Foods* **5** (1): 195–203.
- **Prasad, A.S.** (1996). Zinc deficiency in women, infants and children. *Am. Col.Nutr.* **15**: 113 – 120.
- **Prasad, A.S.** (1983). Clinical, biochemical and nutritional spectrum of zinc deficiency in human subjects: an update. *Nutr. Rev.* **41**: 197.
- **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.

- **Prasad, A.S., Beck, F.W., Grabowski, S.M., Kaplan, J and Mathog, R.H.** (1977). Zinc deficiency, changes in cytokine and T –cell, subpopulations in patient with head and neck cancer and in man cancer subject. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **109**: 68 – 77.
- **Prasad, A.S., Halsted, J.A., Nadimi, M.** (1961). Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am. Med.* **31**: 532-546.
- **Pyo, Y., Lee, T., Logendra, L et Rosen, R.T.** (2004). Antioxidant activity and phenolic Compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chem.* **85**; p: 19–26.

### Q

- **Quarterman, J and Florence, E.** (1971). Observation on glucose tolerance and plasma levels of free fatty acids and insulin in the zinc deficiency rat. *Brit. Nutr.* **28**: 75 – 97.

### R

- **Rached W, Benamar H, Bennaceur M, Marouf A.** 2010. Screening of antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J Biol Science.* **10**:316–324.
- **Raghav SK, Gupta B, Agarwal K, et al** (2005). Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *J Ethnopharmacol*, **104**, 234-9.
- **Rajagopal K et Sasikala K.** (2008). Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rats. *Singapore Med J*, **49** (2); p: 137 - 142.
- **Rajnerayanama K., Reddy M., Charluvadi M. R., Krishna D. R.,** 2001. Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, **33**: 2-16.
- **Ramachandran, V., Saravanan, R.** (2013). Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Functional Foods* **5**: 1077-1087.
- **Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM** (2006). Glycation and RAGE: Common Links in the Pathogenesis of Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, **30** (4): 422 – 429
- **Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM** (2006). Glycation and RAGE: Common Links in the Pathogenesis of Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, **30** (4): 422 – 429

## Références Bibliographiques

- **Raoult, F., Breton, M.** (1877). Sur la présence ordinaire du cuivre et du zinc dans le corps de l'homme. *CR. Acad. Sci. Pris.* **85**: 40-42.
- **Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S** (2004). Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*, 75: 2717 – 2731.
- **Ravi K, Rajasekaran S, Subramanian S.** (2005). Antihyperlipidemic effect of Eugenia Jambolana seed Keinel on STZ induced diabetic rats. *Food chemical Toxicologie.*43; p:1433-1439.
- **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. *INRA. Prod. Anim.* 16: 3-18.
- **Rink, L and Haase, H.** (2007). Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol.***28**: 1-4.
- **Riordan J.F, Vallee B.L.** (1976). Structure and function of zinc metalloenzymes. *In: Trace elements in human health and disease-1- zinc and copper.* Prasad, A.S and Oberleas, D. (Ed). *Academic Press.* New York. 1; p: 227-256.
- **Rodier M.** (2001). Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire vol.25 - n°2* ; p: 91-93.

### S

- **Sacan O, Yanardag R.** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla). *Food Chem Toxicol* 2010;48:1275–80
- **Samman, S and Roberts, D.C.J.** (1988). Zinc and cholesterol metabolism. *Nutr. Res.* **8**: 559 – 570.
- **Schultz, A.** (1984). Uric acid. *Clin. Chem.* 1261-1266 and 418.
- **Sanchez-moreno C.** (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology* .8; p: 121-137.
- **Sandstead, H.H., Frederickson, C.J., Penland, J.G.** (2000). History of zinc as related to brain function. *Nutr.* **130** (2): 496-502.

## Références Bibliographiques

- **Sakurai T, Tsuchiya S** (1988). Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. In Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 353 - 376.
- **Salib JY, El-Toumy SA, Hassan EM, Shafi NH, Abdel-Latif SM, Brouard I.** 2014. New quinoline alkaloid from *Ruta graveolens* aerial parts and evaluation of the antifertility activity. *Nat Prod Res.* 28:1335–1342.
- **Sarkhail P., Rahmanipour S., Fadyevatan S., Mohammadirad A., Dehghan G., Amin G., Shafiee A and Abdollahi M. (2007).** Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacological Research*, **56**; p: 261 - 266.
- **Sathishsekar D and Subramanian S. (2005).** Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr*, 14 (2) ; p:153 - 158.
- **Sayed, A.A.** (2012). Ferulsinaic acid modulates SOD, GSH, and antioxidant enzymes in diabetic kidney. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **58**: 01-04.
- **Schauder, P., Schroder, K., Matthaei, D. (1983).** Influence of insulin on blood levels of branched chain keto and amino acids in man. *Metabolism.* 32; p: 323- 327.
- **Schlegel, P.** (2010). Facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc, ajouté sous forme organique ou inorganique, chez deux espèces monogastriques en croissance (poulet et porcelet). Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech. Paris.
- **Sebai M., Boudali M.,** 2012. La Phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel, infirmier de la sante publique. Institut de formation paramédical CHETTIA.pp. 56.
- **Shah A.H., Qureshib S and Ageelb A.M.** (1991). Toxicity studies in mice of ethanol extracts of *Foeniculum vulgare* fruit and *Ruta chalepensis* aerial parts “*Central khoratory for Drug and Food Analysis, Acute Journal of Ethnopharmacology.* 34; p: 167- 172.
- **Shahidul, M.I and Loots, D.T.** (2007). Diabetes, metallothionein and zinc interactions: a review. *Biofactors* 29: 203-212
- **Shafir E. (1992).** Animal models of non-insulin-dependant diabetes. *Diabetes MetabRev* ; 8; p:179-208.
- **Sharma S.B., Balomajumder C and Roy P. (2008).** Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46; p: 2376 – 2383.

- **Shay, N.F., Mangian, H.F. (2000).** Neurobiology of zinc-influenced eating behavior. *Nutr.* **130**: 1493S-1499S.
- **Sindhu, R.K., Koo, J.R., Roberts, C.K., Vaziri, N.D. (2004).** Dysregulation of hepatic SOD, CAT and GSH-Px in diabetes: response to insulin and antioxidant therapy. *Clin. Exp. Hypertens.* **26**: 43-53.
- **Singh J and Kakkar P. (2009).** Antihyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. *J.Ethnopharmacol.* **22**; p: 22-26.
- **Singh N, Kamath V and Rajini P.S. (2005).** AH enuuation of hyperglycemia and associated biochemical parameter in STZ induced diabetic rats by detary supplementation of potato peel powder. *Clinca chemical Acta.* **353**; p: 165-175.
- **Sivajothi V, Dey A, Jayakar B, Rajkapoor B (2008).** Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effect of *Phyllanthus rheedii* on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **7** (1) : 53 - 59.
- **Solomons, N.W and Russell, R.M. (1980).** The interaction of vitamin A and zinc: implications for human nutrition. *Am. Nutr.* **33**: 2031 – 2040.
- **Sommer T, Bjerregaard-Andersen K, Uribe L, Etzerodt M, Diezemann G, Gauss J, Cascella M and Preben N. (2018).** A fundamental catalytic difference between zinc and manganese dependent enzymes revealed in a bacterial isatin hydrolase. *Scientific reports.* **8**:13104
- **Song H.D., Hu, R.M., PengY and Huang Q.H. (2000).** Study on the gene expression profiling in the normal human pituitary. *Chin. Endocrinol Metab.* **16**; p: 292-296.
- **Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, et al.** Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and Glucose. *Biol Chem* **2002**;277:15252–60.
- **Song M.K., Rosenthal M.J., Naliboff B.D., Phanumas L and Kang K.W. (1998).** Effect of bovine prostate powder on zinc, glucose and insulin metabolism in old patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* **47**(1); p: 39-43.
- **Soumyanath A (2006).** Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic plants. C.R.C. Press, **6**: 19-82.
- **Southon, S., Geo, J and Jhoson, T.T. (1984).** System diet for mice and rats. *Brit Nutr.* **58**; p: 371-380.

- **Spencer, H., Osis, D., Kramer, L and Norris, C.** (1976). Intake excretion and retention of zinc in man. In: Trace elements in human health and disease. Oberleas, D. (Ed). *Academic Press. New York.* 1: pp: 345 – 361.
- **Stadtman ER.** (1991). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.*, 10(3-4); p: 249.
- **Strang C.** (2006). Larousse medical. Ed Larousse.
- **Studer RK, Craven PA, Derubertis FR** (1993). Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium, *Diabetes*, 42: 118 - 126.

### T

- **Takhtajan, A.** (2009). Flowering Plants; Ed 2: *SPRINGER*; p: 33 - 41, 375.
- **Taleb-Senoucia D., Ghomaria H., Kroufa D., Bouderbalaa S., Probst J., Lacaille-Dubois M.A and Bouchenaka M.** (2009). Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 25; p: 221-235.
- **Tastekin D., Atasever M., Adigüzel G., Keles M and Tastekin A.** (2006). Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50 ; p : 235-238.
- **Todd, W.R., Elvelyem, C.A., Hart, E.B.** (1934). Zinc nutrition in the rat. *Am. Physiol.* 107: 146-156.
- **Tomat, A.L, Veiras Miss, L.C., Aguirre Miss, S., Fasoli, H., Elesgaray, R., Caniffi Miss, C., Costa, M.A., Arranz, C.T.** (2013). Mild zinc deficiency in male and female rats: Early postnatal alterations in renal nitric oxide system and morphology. *Nutrition* 29: 568-573.
- **Torres R.** (2006). Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*; *Phytochemistry* 67; Ed: ELSEVIER; p: 984-987.
- **Tratner I.** (2003). Chacun souhaite vivre longtemps, mais personne ne veut être vieux. *Médecine/Sciences* n°12. Vol 19 ; p: 1291-1292.
- **Trease GE, Evans IC.** (1983). Text book of pharmacognosy. 12th edn. London: Bailliere Tindall, p: 21–2.
- **Trifunovic S, Topalovic A Knezevic M, Vajs V.** Free radicals and antioxidants: antioxidative and other properties of swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*). *Agric For* 2015;61:73–92

### V

- **Vallee, B.L.** (1959). Biochemistry, physiology and pathology of zinc. *Physiol. Rev.* **39**: 443-490.
- **Valee, B.L.**(1983). Zinc in biology and biochemistry. In: Zinc enzymes. Spiro, T.G. (Ed).*Wiley Interscience Publication. John Wiley. New York.* pp: 1 – 24.
- **Valdigué P.** (2000). Biochimie Clinique. Edition Médicales internationales (2ème édition). Paris. p: 340.
- **Vergès, B.** (2007). Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21: 9-16.
- **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.

### W

- **Wiert, C.** (2006). Medicinal Plants of the Asia – Pacific: Drugs for the future? Ed: *WORLD SCIENTIFIC*; p: 401 - 416.
- **Williams, A.R and 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 and Harold J.A.** (2004). Anabolic neuropeptides. *Physiol. Behav.* **81**; p: 211-222.
- **Wolfgang Maret.** 2012. Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.* 4: 82–91
- **Wolff S.P., Bascal Z.A and Hunt J.V.** (1989). "Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 304; p: 259-75.
- **Wolff SP** (1993). Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British Medical Bulletin*, **49** (3): 642 - 632.



X

- **Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL** (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43: 1122 - 1129.

Y

- **Yaghmaei, P., Esfahani-Nejad, H., Ahmadi, R., Hayati-Roodbari, N., Ebrahim-Habibi, A.** (2013). Maternal zinc intake of Wistar rats has a protective effect in the alloxan-induced diabetic offspring. *Physiol. Biochem.* 69: 35-43.
- **Yanardag R, Colak H.** Effect of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. *Pharm Pharmacol Commun* 1998;4:309–11.
- **Yasuhiro H, Hideki F, Masafumi F.** (2009). Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone.* 45:35-38.
- **Yilmazer-Musa M, Griffith AM, Michels AJ, Schneider E, Frei B.** Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of alpha-amylase and alpha-glucosidase activity. *Agric Food Chem* 2012;60:8924–9.
- **Yim SH, Kang SA, Hah YC, P. Chock B, Yim MB** (1995). Free Radicals Generated during the Glycation Reaction of Amino Acids by Methylglyoxal. *The Journal of Biological Chemistry*, 47: 28228 - 28233.
- **Yin, L. L., Zhang, Y., Guo, D. M., Ann K., Yin, M. S., Cui, X.** (2013) Effects of Zinc on Interleukins and Antioxidant Enzyme Values in Psoriasis-Induced Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **155**: 411–415.
- **Yoshida K, Kondo I** (1998). Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia*, **88** : 201 - 211.

Z

- **Zeichen R, Rey A, Arganaraz,E, Bindsto E.** Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. *J Ethnopharmacol.* 2000; 69:93-98.

## *Références Bibliographiques*

- **Zhang J., Huang Y., Hou T and Wang Y. (2006).** Hypoglycaemic effect of *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *Swiss Med Wkly* 136; p: 529-532.
- **Zhou I., Zhou S., Tang J., Zhang K., Guang L., Huang Y., Xu Y., Ying Y., Zhang L and Li D. (2009).** Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/ high-fat diet-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 606; p: 262–268.

# *Communications et Publication*



## **Publications**

- ❖ Effect of *Ruta chalepensis* on Zinc, Lipid Profile and Antioxidant Levels in the Blood and Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats Fed Zinc-Deficient Diets.
- ❖ Chard (*Beta vulgaris var cicla* extract modulates zinc status, glucose level and antioxidant values in diabetic rats fed zinc deficiency diet.

## **Communication**

- ❖ 5<sup>ème</sup> symposium international des plantes aromatiques et médicinales, Marrakech, Maroc 14-16 Novembre 2013. M. Hamdiken and Z. kechrid. Antidiabetic effect of methanolic extracts of *Ruta chalepensis* in streptozotocin diabetic rats fed low zinc diet.



Contents lists available at [ScienceDirect](http://ScienceDirect)

Canadian Journal of Diabetes

journal homepage:  
[www.canadianjournalofdiabetes.com](http://www.canadianjournalofdiabetes.com)

**DIABETES  
CANADA**



## Original Research

# Effect of *Ruta chalepensis* on Zinc, Lipid Profile and Antioxidant Levels in the Blood and Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats Fed Zinc-Deficient Diets

Malika Hamdiken MSc, Samira Bouhalit MSc, Zine Kechrid PhD \*

Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Annaba, Annaba, Algeria

### Key Messages

- 1) Despite the continuing introduction of hypoglycemic drugs, diabetes and related complications is still a major global medical problem.
- 2) The modern hypoglycemic drugs including insulin and other oral hypoglycemic agents such as thiazolidinediones, biguanides, sulphonylureas, control the glucose blood level as long as they are regularly administered, but they also produced lots of undesirable effects.
- 3) The search for appropriate hypoglycemic agents has been focused on plants used in traditional medicine. In other words, finding effective compounds with fewer side effects to treat diabetes and its complications.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 February 2017

Received in revised form

3 July 2017

Accepted 15 August 2017

#### Keywords:

antioxidant  
experimental diabetes  
rat

*Ruta chalepensis*  
zinc deficiency

### ABSTRACT

In diabetes, oxidative stress and lipid abnormalities are common and pronounced and represent important factors that are involved in the development of complications of diabetes. Zinc deficiency generally induces oxidative stress, but it is well known that the antioxidant *Ruta chalepensis* has an effective modulator role in oxidative stress in metabolic diseases. The aim of this study was to investigate the effect of *R. chalepensis* extract on blood biochemical parameters, tissue zinc status and antioxidant systems in rats with diabetes that were fed zinc-deficient diets.

We divided 28 male albino Wistar rats into 4 groups: 2 groups, 1 group with diabetes, 1 group without diabetes, were fed zinc-sufficient diets, while the other 2 groups of rats with diabetes were fed zinc-deficient diets. One group was not treated, and the other was treated with the extract of *R. chalepensis*. After 3 weeks of dietary manipulation, the fasting animals were killed.

The body-weight gains of the zinc-deficient animals with diabetes were lower than those of the zinc-adequate animals with diabetes. It was noticed also that inadequate dietary zinc intake increased the glucose, cholesterol, triglyceride, urea, uric acid, creatinine and lipid peroxidation levels. In addition, the zinc-deficient diet led to a decrease in zinc tissues (femur, liver, kidney), glutathione concentration and both glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activities. However, *R. chalepensis* treatment ameliorated all the previous parameters approximately to their normal levels.

It seems that *R. chalepensis* supplementation is a potent factor in reducing the oxidative severity of zinc deficiency in experimental diabetes through its hypoglycemic and antioxidant actions.

© 2017 Canadian Diabetes Association.

\* Address for correspondence: Zine Kechrid, PhD, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Annaba, Sidi Amar BP 12, 23000 Annaba, Algeria.  
E-mail address: [kechridzine@yahoo.fr](mailto:kechridzine@yahoo.fr)

## R É S U M É

Mots clés :  
antioxydant  
diabète expérimental  
rat  
*Ruta chalepensis*  
carence en zinc

Lors de diabète, le stress oxydatif et les anomalies lipidiques sont fréquents et prononcés, et représentent les facteurs importants qui participent à l'apparition des complications du diabète. La carence en zinc induit généralement un stress oxydatif. Lors de maladies métaboliques, l'antioxydant *Ruta chalepensis* est bien connu pour son rôle efficace de modulateur du stress oxydatif. L'objectif de la présente étude était d'examiner les effets de l'extrait de *R. chalepensis* sur les paramètres biochimiques du sang, le statut en zinc tissulaire et les systèmes antioxydants chez les rats diabétiques qui suivent un régime carencé en zinc.

Nous avons réparti 28 rats Wistar albinos mâles en 4 groupes : 2 groupes, dont 1 groupe de rats diabétiques et 1 groupe de rats non diabétiques, qui ont suivi un régime suffisant en zinc, alors que les 2 autres groupes de rats diabétiques ont suivi un régime carencé en zinc. Un groupe n'a pas reçu de traitement, et l'autre groupe a reçu un traitement à l'extrait de *R. chalepensis*. Après 3 semaines de manipulation alimentaire, les animaux à jeun ont été abattus.

La prise de poids des animaux diabétiques carencés en zinc était plus faible que ceux des animaux diabétiques dont l'apport en zinc était adéquat. On a également remarqué qu'un apport alimentaire inadéquat en zinc augmentait le glucose, le cholestérol, les triglycérides, l'urée, l'acide urique, la créatinine et les taux de peroxydation lipidiques. De plus, le régime carencé en zinc menait à une diminution du zinc dans les tissus (fémur, foie, reins), de la concentration en glutathion et des activités de la glutathion-peroxydase et de la glutathion-S-transférase. Toutefois, le traitement par *R. chalepensis* rendait approximativement à tous les paramètres précédents leur taux normal.

Il semble que la supplémentation en *R. chalepensis* soit un facteur puissant de réduction de la gravité oxydative de la carence en zinc lors de diabète expérimental du fait de son action hypoglycémique et antioxydante.

© 2017 Canadian Diabetes Association.

## Introduction

Diabetes mellitus is a serious and complicated metabolic disorder. Worldwide, 415 million adults were living with diabetes in 2015 (global prevalence, 8.8%), and the estimate is projected to rise to more than 642 million by 2040 (1). Diabetes is widely reported to be accompanied by increased levels of oxidative damage, which are associated with hyperglycemia, hypoinsulinemia, hypercholesterolemia and insulin resistance (2,3). The vast majority of cases of diabetes fall into 2 broad etiopathogenic categories: patients with type 1 diabetes have a deficiency of insulin secretion, whereas those with type 2 diabetes have a combination of resistance to insulin action and inadequate compensatory insulin secretory response (4). Patients with diabetes have increased oxidative stress and impaired antioxidant defense systems, which appear to contribute to the initiation and progression of diabetes-induced complications (5). Zinc is the most abundant trace intracellular element required for a number of cellular processes, including cell proliferation, reproduction, immune function and defense against free radicals (6). It is a component of more than 1000 zinc-associated transcription factors, including DNA-binding proteins with zinc fingers, and is required for more than 300 zinc-containing metalloenzymes (7). Zinc is required for normal insulin metabolism. Zinc is concentrated in the islet cells that are related to the synthesis, storage and secretion of insulin (8). It seems to be reasonable, therefore, that changes in body zinc status could affect the production, storage and secretion of insulin (9). Zinc is an important cofactor of many antioxidant enzymes. In other words, it is an essential component of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) and also helps to minimize the effects of inflammatory substances, thereby preserving cell health and insulin sensitivity (10). Another mechanism that explains the antioxidant role of zinc in diabetes refers to its ability to compete with iron and copper for binding sites on cell membranes. The iron and copper ions can catalyze the production of lipid peroxides, and the replacement of these metals by zinc in the plasma membrane could prevent lipid peroxidation in patients with diabetes (11). Therefore, zinc deficiency increases the risk for several chronic disease states, such as diabetes (12), and this risk may be associated with an increased vulnerability to oxidative stress (13). Indeed, increasing evidence suggests that zinc plays an important role as an antioxidant and protects cellular components from oxidation (14).

Several studies have demonstrated increases in oxidative stress in cases of low cellular zinc content (15). The plant *Ruta chalepensis* has been used in many treatments, such as against obesity (16), as an antibacterial (17) and as a stimulatory for reproduction (18). So this study was carried out to examine the modulator effects of *R. chalepensis* administration for prevention of the development of diabetic pathology observed in zinc deficiency by evaluating body weight gain, zinc status, carbohydrate metabolism and the antioxidant system in rats with streptozotocine-induced diabetes.

## Methods

## Animals

Male albino Wistar rats weighing 200 to 250 g, 10 to 12 weeks of age, were obtained from the Pasteur Institute in Algiers. Prior to experiments, the animals were allowed to acclimate to their surroundings for 2 weeks. Rats were housed in individual plastic cages with bedding. Standard rat food and tap water were available ad libitum for the duration of the experiments unless otherwise noted. The temperature was maintained at 22°C±2°C. A 12/12-hour light/dark cycle was maintained, with lights on at 6 AM, unless otherwise noted. The Ethical Committee of Annaba University, Algeria, approved the study protocol. The animals were maintained and used in accordance with the Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory animals prepared by Annaba University, Algeria.

## Preparation of extract

*R. chalepensis* aerial parts were collected in December 2012 from the Guelma region (east of Algeria). The samples were dried in a ventilated place at room temperature. The dry plant was then powdered in an electric grinder, and 250 grams of powder were extracted 3 times with 80% methanol. The extract was filtered, concentrated in a vacuum evaporator (Büchi, New Castle, Delaware, United States) at 40°C and then lyophilized. The yield of the lyophilized extract was 23.45% of the initial crude material. This extract was stored in the dark at room temperature.

### Phytochemical screening

Preliminary screening of secondary metabolites, such as alkaloids, flavonoids, saponins, tannins and terpenoids, were carried out according to the common phytochemical methods described by Trease and Evans (19). All tests were realized in a solution of the extract of *R. chalepensis* dissolved in methanol with a concentration of 10%, and the methods were as follows.

#### Test for flavonoids

The methanol extract (5 mL) was added to a concentrated of HCl (1 mL) and 0.5 g of Mg. A pink or red coloration that disappear on standing (3 min) indicated the presence of flavonoids.

#### Test for saponins

Five mL of the extract was shaken vigorously with 10 mL of distilled water in a test tube and warmed. The formation of stable foam was taken as an indication of the presence of saponins.

#### Test for tannins

About 2 mL of the extract was stirred with 2 mL of distilled water, and few drops of ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>) solution were added. Formation of green precipitate was an indication of the presence of tannins.

#### Test for alkaloids

An evaporate of 20 mL of methanol extract, the dry residue, was dissolved in 5 mL of HCl (2N) and filtered. A few drops of Mayer reagent and Wagner were added. The presence of precipitate indicated the alkaloids.

#### Test for terpenoids

Then 2 mL of the organic extract were dissolved in 2 mL of CHCl<sub>3</sub> and evaporated to dryness, and 2 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were then added and heated for about 2 minutes. Development of a grayish color indicated the presence of terpenoids.

### Acute toxicity study

Animals were randomly allotted to control and test groups. The acute toxicity of each extract (lethal dose, 50%) (LD<sub>50</sub>) was estimated by the oral route using the procedure reported by Lorke (20). The method estimates the dose of the extract that will kill 50% of the population by a given route. The investigation was carried out with a minimum number of experimental animals. Extract was given at doses of 100, 250, 500, 1000, 2000 and 5000 mg/kg. Rats were kept under observation for 72 hours. Body weights, symptoms of toxicity, behaviour changes and mortality were controlled.

### Induction of experimental diabetes

Diabetes was induced by a fresh streptozotocine solution, which was intraperitoneally administered at a dose of 50 mg/kg body weight after being dissolved in citrate buffer (0.01 M, pH 4.5). Blood glucose levels were measured 7 days after induction of diabetes in samples taken from the tail vein. The diabetic state was confirmed by a glucose meter (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Paris, France) when the glucose concentration exceeded 14 mmol/L. The diet for rats consisted (in grams per kg of diet) of cornstarch 326, sucrose 326, protein 168 (egg-white solids), lipids 80 (corn oil), fibre 40 (cellulose), vitamin mix (sigma) and mineral mix 40. The latter was formulated to contain either adequate (54 mg/kg) (21) or inadequate (1.2 mg/kg) quantities of zinc, as determined by atomic absorption spectroscopy. The mineral mix was supplied (in grams per kilogram of diet) by calcium hydrogen orthophosphate, 13; disodium hydrogen orthophosphate, 7.4; calcium carbonate, 8.2;

potassium chloride, 7.03; magnesium sulphate, 4; ferrous sulphate, 0.144; copper sulphate, 0.023; potassium iodide, 0.001; manganese sulphate, 0.180; and zinc carbonate, 0.1. The zinc-deficient diet contained no additional zinc carbonate.

### Experiment design

The 28 rats were divided into 4 groups of 7 each. The first group included rats *without* diabetes that were fed a zinc-sufficient diet containing 54 mg zinc/kg (ND). The second group included rats *with* diabetes that received a zinc-sufficient diet (DSZ). The third group included rats *with* diabetes that were fed a zinc-deficient diet containing 1.2 mg zinc/kg diet (DZD). The fourth group included zinc-deficient rats *with* diabetes that were treated orally with methanolic extract of *R. chalepensis* at doses of 500 mg/kg (DZD-R). The treatment of the animals was carried out for 3 weeks.

### Blood collection and preparation of blood and tissue samples

Rats were killed by cervical cuts under ether anesthesia. Then 2 mL of blood were drawn and used for determination of serum glucose, triglyceride, urea, uric acid, creatinine and cholesterol levels. The heart, kidneys and liver were excised, washed with isotonic saline and blotted to dry. The right femur was taken, and the connective tissues and muscles were removed. After that, the kidneys, femurs and 1 fragment of the livers were weighed and dried at 80°C for 16 hours, and the zinc concentration in each tissue was determined. Hearts, kidneys and the second fragment of livers were processed immediately for assaying reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione-S-transferase (GST).

### Measurement of biochemical parameters

Urea, uric acid, creatinine, cholesterol and triglyceride concentrations were measured using commercial kits (Spinreact, Girona, Spain).

### Tissues zinc analyses

The dried kidneys, livers and femurs were heated in silica crucibles at 480°C for 48 hours, and the ash was dissolved in hot 12 M HCl acid for zinc analysis utilizing a flame atomic absorption spectrophotometer (Pye Unicam SP 9000, Hitchin, United Kingdom). Standard reference materials: bovine liver and wheat flour were used to check the accuracy of zinc recovery, which exceeded 96% in the reference materials. Zinc standards were prepared from 1 mg/mL zinc nitrate standard solution using 5% glycerol to approximate the viscosity characteristics. All tubes were soaked in HCl (10% v/v) for 16 hours and rinsed with doubly distilled water to avoid zinc contamination from exogenous sources.

### Lipid peroxidation and antioxidant analyses

#### Tissue preparation

About 1 gram of liver, heart and kidney was homogenized in 2 mL ice-cold TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7.4). Then the homogenates were centrifuged at 10 000×g for 15 minutes at 4°C, and the resultant supernatant was used for the determination of MDA, GSH, proteins, GST and GSH-Px.

#### Lipid peroxidation estimation

MDA, a terminal product of lipid peroxidation, was measured to estimate the extent of lipid peroxidation in liver, heart and kidney homogenate by using the method described by Ohkawa et al (22), which was based on thiobarbituric acid (TBA) reactivity. Briefly, 0.5 mL of 20% trichloroacetic acid, 0.5 mL of homogenate and 1 mL of 0.675% TBA were mixed in tubes. Then the mixture was warmed

for 15 minutes at 100°C. The tubes were cooled at room temperature and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes; 4 mL of n-butanol were then added. The optical density of the supernatant was measured at 532 nm, and the MDA was expressed as nmol/mg protein.

#### Estimation of reduced glutathione

The reduced glutathione was estimated utilizing the colorimetric technique of Jollow et al (23) based on the development of a yellow color when Ellman reagent (5, 5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) was added to compounds containing sulfhydryl groups. The GSH concentration (nmol GSH/mg protein) was obtained from the absorbance at 412 nm.

#### Determination of antioxidant enzymes

The enzymatic activity of GSH-Px was measured by the method of Flohe and Günzler (24), and the GST activity of tissues was measured spectrophotometrically by the method of Habig et al (25).

#### Protein determination

The protein concentration in the tissues' homogenates was determined by the Bradford method, using bovine serum albumin as a standard (26).

#### Histologic studies

Pancreas obtained by dissection was washed with isotonic saline (0.9%). Then it was immediately fixed in Bouin solution for 24 hours, processed by using a graded ethanol series and embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5 µm slices and stained with hematoxylin and eosin (27). All pictures were taken using optic microscopy; the magnification was 400×.

#### Statistical analysis

Data were reported as mean ± SEM. Results comparisons were carried out by using 1-way analysis of variance followed by the Student t test to compare means among the groups. Differences were considered statically significant at p<0.05.

## Results

#### Phytochemical screening

The phytochemical analysis of the methanol extract of *R. chalepensis* showed the presence of various groups of secondary metabolites, such as alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, terpenoids, steroid and sterols, which are of medicinal importance.

**Table 1**

Body weight gain, tissue zinc levels in non-diabetic rats (ND), diabetic zinc-sufficient rats (DSZ), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Ruta chalepensis* (DZD-R)

Parameters	Experiment groups			
	ND	DSZ	DZD	DZD-R
Initial body weight (g)	134.00±6.40	173.20±9.76	170.00±8.40	179.40±13.12
Final body weight (g)	159.20±3.36	154.40*±8.72	133.60§±14.48	193.66**±10.53
Femur zinc (µg/g dry weight)	73.00±3.00	60.34†±4.11	44.34‡±2.64	67.50**±4.24
Kidney zinc (µg/g dry weight)	68.13±5.85	56.00*±6.33	53.00‡±7.25	71.00**±2.62
Liver zinc (µg/g dry weight)	66.00±4.37	43.00†±6.65	39.00§±2.49	67.00**±1.67

Note: Values are mean ± SEM; number of samples = 7.

\* p<0.05.

† p<0.001: comparison of DSZ with ND.

‡ p<0.05.

§ p<0.01.

¶ p<0.001: comparison of DZD with DSZ.

\*\* p<0.001: comparison of DZD-R with DZD.

#### Acute toxicity study

Under the present experimental conditions, *R. chalepensis* methanol extract up to 5000 mg/kg did not produce mortality, macroscopic tissue injury or weight loss during the observation period. Given that lethal effects were not observed at any of the administered doses, the oral LD50 of the methanol extract estimated in rats must be above 5000 mg/kg.

#### Body weight gain

Body weight gain is shown in Table 1. The results indicated a very significant reduction in the body weights of rats with diabetes compared to those without diabetes. Meanwhile, the body weights of the rats with diabetes that were fed zinc-deficient diets (DZD) were lower (p<0.01) than those of rats with diabetes that were given adequate-zinc diets (DSZ), but body weights were significantly lower in the rats treated with zinc (DZD-R).

#### Femur, kidney and liver zinc concentrations

The zinc concentrations in femur, kidney and liver are also indicated in Table 1. The zinc levels in the 3 organs of rats with diabetes (DSZ) were generally lower (p<0.05, p<0.001) than those in rats without diabetes. On the other hand, zinc concentrations in liver (p<0.01), femur (p<0.001) and kidney (p<0.05) were significantly lower in the DZD group than in the DSZ group. However, tissue contents of zinc were significantly higher in the DZD-R group (p<0.001) as compared to the DZD group.

#### Blood biochemical values

The findings are illustrated in Table 2. As expected, the diabetes state affected the biochemical parameters most significantly. The results obtained also indicated that zinc deficiency led to an increase in glucose (p<0.001), cholesterol (p<0.001), urea (p<0.001) and creatinine (p<0.001), uric acid (p<0.05), triglyceride (p<0.05), aspartate aminotransferase (AST, or GOT) (p<0.001) and alanine aminotransferase (ALT, or GPT) (p<0.001) levels, whereas the methanol extract of *R. chalepensis* restored the altered variables.

#### MDA, GSH and GSH-Px values

MDA, GSH and GSH-Px values are shown in Figures 1, 2, 3 and 4, respectively. The rats with diabetes had high MDA levels and low GSH content and GSH-Px activity in all studied organs than did the rats without diabetes. Moreover, it was noticed that zinc deficiency caused a slight but obvious augmentation of MDA in liver, heart and



**Table 2**

Mean blood glucose, serum creatinine, serum cholesterol, serum uric acid, serum urea, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT) and serum triglycerides concentrations in nondiabetic rats (ND), diabetic zinc-sufficient rats (DSZ), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Ruta chalepensis* (DZD-R)

Parameters	Experimental groups			
	ND	DSZ	DZD	DZD-R
Glucose (mg/dL)	98.20±2.56	381.40 <sup>†</sup> ±23.92	484.80 <sup>§</sup> ±54.56	125.60 <sup>‡</sup> ±11.52
Creatinine (mg/dL)	0.66±0.20	0.65 <sup>*</sup> ±0.12	1.25 <sup>§</sup> ±0.22	1.24±0.37
Cholesterol (mg/dL)	80.00±4.80	60.60 <sup>*</sup> ±4.72	127.00 <sup>§</sup> ±10.00	90 <sup>‡</sup> ±9.60
Uric acid (mg/dL)	2.40±0.24	3.18 <sup>*</sup> ±0.30	3.90 <sup>‡</sup> ±0.24	2.12 <sup>‡</sup> ±0.89
Urea (mg/dL)	25.40±4.80	60.00 <sup>†</sup> ±4.72	127.00 <sup>§</sup> ±10.00	42.00 <sup>‡</sup> ±13.60
Triglycerides(mg/dL)	56.00±13.60	73.20 <sup>*</sup> ±8.64	96.40 <sup>‡</sup> ±4.88	71.80±14.16
GOT (IU/L)	77.50±9.00	94.56 <sup>†</sup> ±5.34	108.75 <sup>§</sup> ±10.57	98.56±5.44
GPT (IU/L)	74.56±7.62	89.14 <sup>†</sup> ±8.79	103.88 <sup>§</sup> ±11.71	91.56±5.62

Note: Values are mean ± SEM; number of samples = 7.

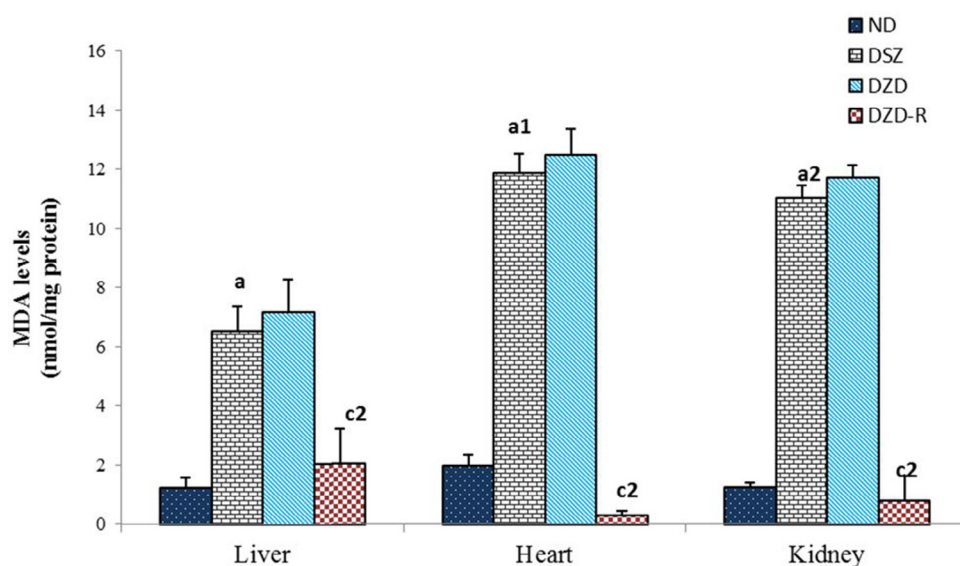
\* p<0.05.

† p<0.001: comparison of DZS with ND.

‡ p<0.05.

§ p<0.001 comparison of DZD with DSZ.

¶ p<0.001: comparison of DZD-R with DZD.



**Figure 1.** MDA level in nondiabetic rats (ND), diabetic zinc-sufficient rats (DZS), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Ruta chalepensis* (DZD-R), malondialdehyde (MDA), standard error of the mean (SEM). a, a<sup>1</sup>, a<sup>2</sup>, c<sup>2</sup>: alphabetical for statistical differences. <sup>a</sup>p<0.05. <sup>a1</sup>p<0.01. <sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DZS with ND. <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-R with DZD. Note: Values are mean ± SEM; number of samples = 7.

kidney of diabetic animals as well as a significant decrease in GSH content and the activities of both GSH-Px and GST. However, *R. chalepensis* administration resulted in improvements in the hepatic, cardiac and renal oxidative stress parameters.

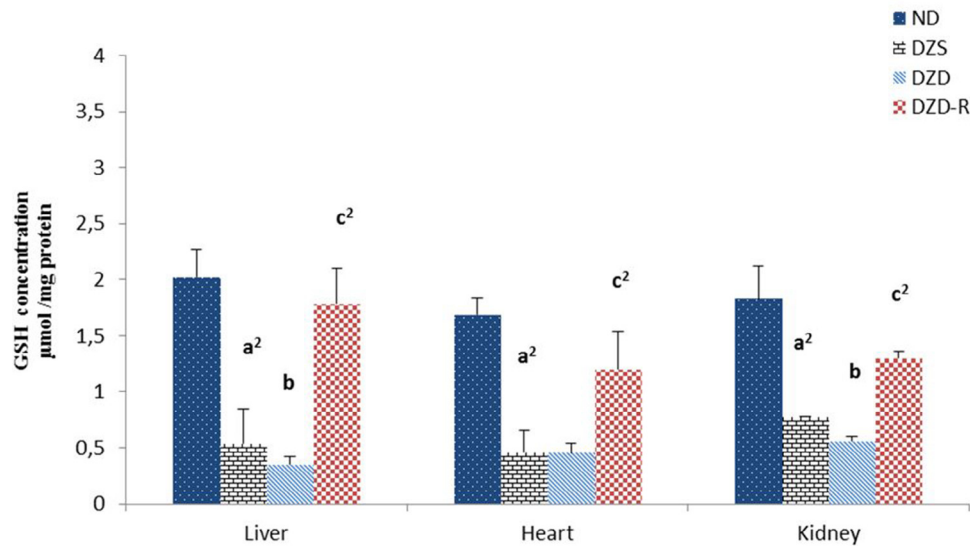
#### Pancreatic histopathologic results

The histology of the pancreas (Figure 5) revealed that the rats without diabetes had intact pancreatic islets. However, both the zinc-sufficient rats with diabetes (DSZ) and the zinc-deficient rats with diabetes (DZD) showed depleted islet cells. Rats with diabetes that had been treated with the extract of *R. chalepensis* (DZD-R) showed preserved islet cells, which is an improvement over the state of the untreated rats with diabetes.

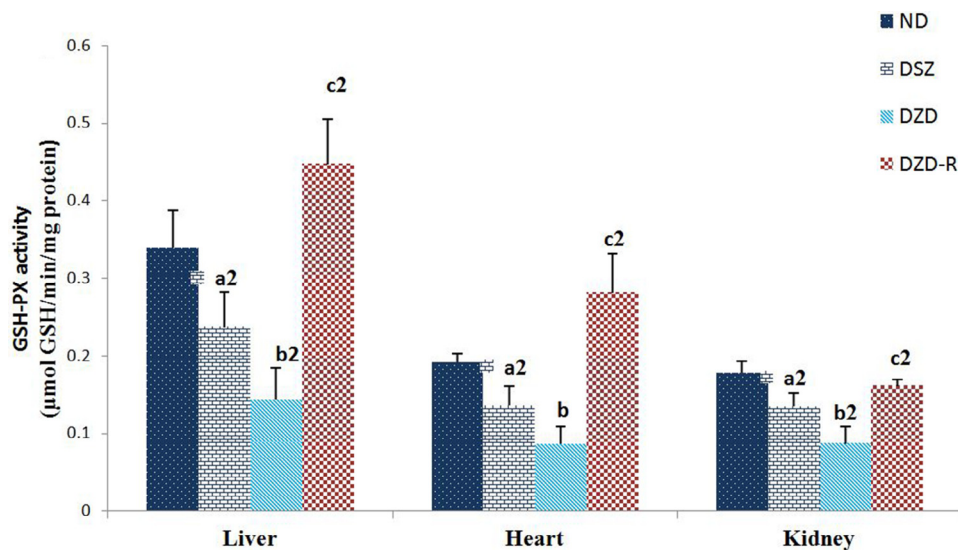
#### Discussion

The use of medicinal and dietetic plants today is the most widespread medicine worldwide. In other words, the use of herbal

treatment and finding new substances with biological activity is 1 of the largest scientific concerns. Therefore, several studies have been conducted to evaluate the secrets of plants. Among them this study, which was devoted to searching for the potential antidiabetic effects of the aerial methanol extract part of *R. chalepensis* in animals fed low-zinc diets. According to the findings obtained, *R. chalepensis* extract up to 5000 mg/kg did not induce any tissue damage, weight loss or mortality in the rats during the period of the experiment, and lethal effects were not observed at any of the administered dosages. Therefore, the oral LD50 of the extract must be greater than 5000 mg/kg to cause harm. In the current study, rats with diabetes weighed less than rats without diabetes; this is consistent with a previously published report (28). It raises the possibility of disturbance of the metabolic state of the animals, suggesting that diabetes had reduced the ability of those rats to utilize food intake as normal subjects do. On the other hand, rats fed a zinc-deficient diet had less body weight gain than did rats fed a zinc-adequate diet, which is in agreement with a previously published investigation (29). It has been well documented that rats fed low-zinc diets voluntarily decrease consumption (reduce appetite) and maintain a very



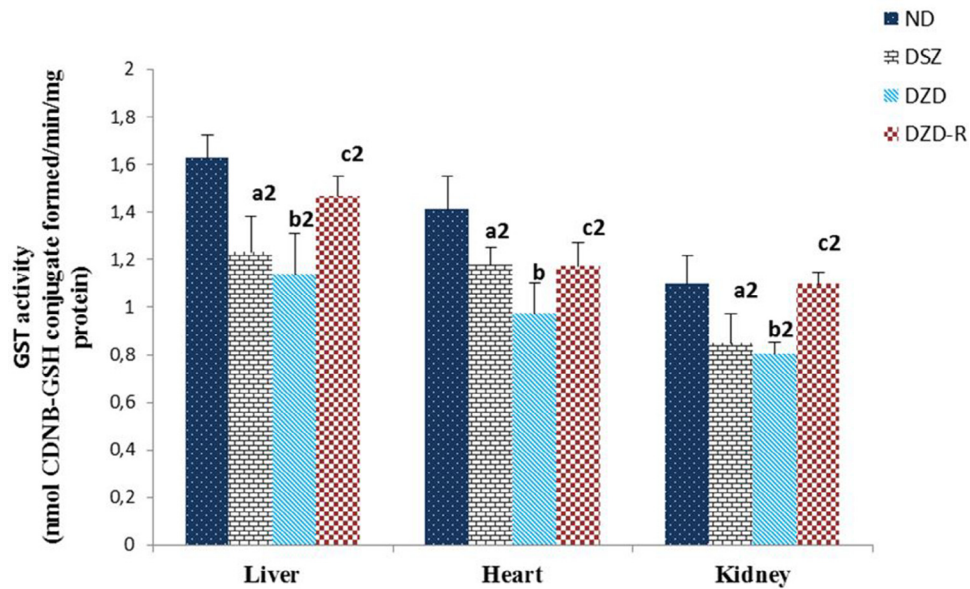
**Figure 2.** GSH level in nondiabetic rats (ND), diabetic zinc-sufficient rats (DSZ), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Ruta chalepensis* (DZD-R), reduced glutathione (GSH), standard error of the mean (SEM). a<sup>2</sup>, b, c<sup>2</sup>: alphabetical for statistical differences. <sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND. <sup>b</sup>p<0.05: comparison of DZD with DSZ. <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-R with DZD. Note: Values are mean ± SEM; number of samples = 7.



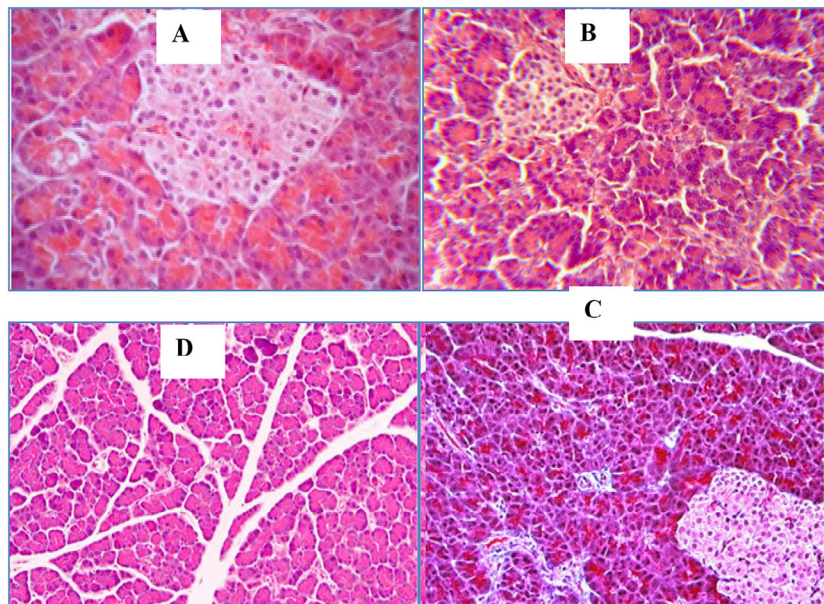
**Figure 3.** GSH-Px activity in nondiabetic rats (ND), diabetic zinc-sufficient rats (DSZ), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Ruta chalepensis* (DZD-R), glutathione peroxidase (GSH-Px), standard error of the mean (SEM). a<sup>2</sup>, b, b<sup>2</sup>, c<sup>2</sup>: alphabetical for statistical differences. <sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND. <sup>b</sup>p<0.05. <sup>b2</sup>p<0.001: comparison of DZD with DSZ. <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-R with DZD. Note: Values are mean ± SEM; number of samples = 7.

low growth rate (30). However, the body weight gains of rats with diabetes fed a low-zinc diet and administrated *R. chalepensis* extract were higher than those of zinc-deficient rats with diabetes. The greater gain in body weight of these animals probably resulted from an increase in daily food consumption and promotion of protein synthesis (31). Moreover, *R. chalepensis* extract might have the ability (as do *Artemisia herba-alba* and *Nymphaea stellata*) to reverse gluconeogenesis and control protein loss (32). Tissue concentrations of zinc in the livers, femurs and kidneys of rats with diabetes were lower than those of rats without diabetes. These findings indicate the effect of diabetes on a body's zinc status. It has been postulated that low levels of zinc in patients with diabetes may be due to excessive urinary output and gastrointestinal malabsorption (33). The results of this investigation show also that there was a significant decrease in zinc content in the previously mentioned organs of animals with diabetes that were fed zinc-inadequate diets

compared to the rats with diabetes that were fed zinc-adequate diets; this finding coincides with the findings of previous investigations (34). On the other hand, zinc concentrations in various tissues of zinc-deficient rats with diabetes that were treated with methanol extract were restored. This was undoubtedly due to the antioxidant effect of this plant extract against the development of the diabetic state, resulting in a decline of zinc loss through urine (35). The mean fasting blood glucose concentrations in animals fed the low-zinc diet were found to be higher than those of the animals receiving adequate dietary zinc. This may be related to altered glucose utilization by tissues or to an increased rate of endogenous glucose production (36). Moreover, blood glucose levels were reduced in zinc-deficient animals with diabetes that were treated with *R. chalepensis* as compared to zinc-deficient animals that were untreated. This finding correlated with the histologic studies of the pancreas, where the extract preserved islet cells. In that case, the



**Figure 4.** GST activity in nondiabetic rats (ND), diabetic zinc-sufficient rats (DSZ), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Ruta chalepensis* (DZD-R), glutathione transferase (GSH-Px), standard error of the mean (SEM). a<sup>2</sup>, b, b<sup>2</sup>, c<sup>2</sup>: alphabetical for statistical differences. a<sup>2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND. b<sup>2</sup>p<0.05. b<sup>2</sup>p<0.001: comparison of DZD with DSZ. c<sup>2</sup>p<0.001: comparison of DZD-R with DZD. Note: Values are mean ± SEM; number of samples = 7.



**Figure 5.** Effect of *Ruta chalepensis* extract on histopathologic damage in the pancreas after 3 weeks of treatment in experiment groups: A, Section of pancreas tissue from nondiabetic rats (ND) showing normal architecture. B, Section of pancreas tissue from diabetic zinc-sufficient rats (DSZ) showing degenerative vascular changes in the islets. C, Section of pancreas tissue from diabetic zinc-deficient rats (DZD) showing more degenerative vascular changes in the islets. D, Section of pancreas tissue from diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Ruta chalepensis* (DZD-R) showing apparently normal population of pancreatic islets. Optic microscopy: sections were stained using the hematoxylin-eosin method (400×).

hypoglycemic effect of *R. chalepensis* might be due to the presence of flavonoids and other substances, such as glycosides, alkaloids, saponin, tannins and triterpenes. These compounds have been reported to be responsible for the hypoglycemic action (37) or a result of ameliorative insulin secretion (38), and the phytochemical screening confirmed the richness of this plant in these active compounds. The cholesterol, triglyceride, creatinine, urea and uric acid levels of zinc-deficient rats were higher than in those with sufficient zinc intake. This might be due to the catabolism of lipids and proteins as a result of increased demand for energy (39). The

treatment of zinc-deficient rats with diabetes with *R. chalepensis* extract produced potential improvement of these altered serum lipid parameters. These results are in agreement with the work of Nuraliev and Avezov (40), who demonstrated the effects of rutin (a metabolite of *R. chalepensis*) on the diminishing of both cholesterol and low-density lipoprotein-cholesterol. In other words, the rutin might have an effect on insulin release through quercetin, which is a metabolite of rutin. Moreover, the hypolipidemic effect of *R. chalepensis* extract might also be mediated via inactivation of 5-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which is a key

enzyme for cholesterol synthesis. This coincides with the work of Jung et al (41), who noticed that flavonoids decrease liver HMG-CoA reductase activity in mice with type 2 diabetes, and the work of Nazıroğlu et al (42), who noticed that apple cider vinegar modulated lipids profiles in ovariectomized mice fed high-cholesterol diets. Meanwhile, the normalized concentrations of urea, creatinine and uric acid were possibly due to the improvement of protein synthesis and/or metabolism. In this experiment, significant rises in serum GOT and GPT activities in rats with diabetes were also found, which could relate to excessive accumulation of amino acids (glutamic and alanine) in the serum of animals with diabetes as a result of amino acid mobilization from protein stores (43). These excessive amino acids are then converted to ketonic bodies (alpha keto-glutaric and pyruvate), for which the enzymes GOT and GPT are needed. In other words, the gluconeogenic action of GOT and GPT plays the role of providing new supplies of glucose from other sources such as amino acids. It is interesting to note that Grefley and Sandstead (44) found evidence of decreased oxidation of the carbon chain of alanine when zinc was restricted and led to alanine accumulation in blood.

In general, the present investigation indicated that some symptoms associated with zinc deficiency in rats with diabetes can be prevented by treatment with *R. chalepensis*, which normalized some biochemical parameters and brought them closer to those of the zinc-sufficient group with diabetes. This finding is in agreement with the results of Osama Mohamed (45) who reported that *Ruta graveolens* treatment had antihyperglycemic and antihyperlipidemic efficacy, which may be mediated via pancreatic and extrapancreatic effects. The reduced antioxidant capability in diabetes was the result of increased production of oxygen metabolites, which curbs the activity of the antioxidant defense system (46). In addition, several studies demonstrated increased free-radical production or increased oxidative damage in response to zinc deficiency in vitro and in vivo (47). According to the results obtained, there was an increase in MDA, which confirms the deleterious effect of zinc deficiency by increasing lipid peroxidation. The reason for the depletion of glutathione might be a result of the higher consumption of glutathione and the higher oxidative damage in zinc deficiency (48). The observed decline in GSH-Px and GST activities might be due to modification of the sulfhydryl groups in these enzymes by oxygen free radicals (49). Elevated glucose and hydrogen peroxide levels have also been found to inactivate GSH-Px and GST (50). This study confirmed a beneficial effect of *R. chalepensis* in attenuating oxidative stress and oxidative damage. In other words, the findings showed a significant reduction in the formation of thiobarbituric acid reactive substances and an augmentation of GSH concentrations plus an improvement in GSH-Px and GST activities in animals given *R. chalepensis*. Thus, it has been reported that several polyphenol compounds isolated from *R. chalepensis*, such as rutin, possess strong antioxidant properties, which reduce the formation of reactive oxygen species by directly inhibiting the reactive oxygen-generating enzymes. In addition, it has been mentioned that *R. chalepensis* can induce expression of several antioxidant enzyme genes, including GSH-Px and GST (51).

## Conclusions

This study revealed that the combination of zinc deficiency and diabetes affected growth rate, zinc status, carbohydrate metabolism and the antioxidant system. The administration of methanol extract of *R. chalepensis* reduced the severity of these complications via its antioxidant benefits. Further clinical studies are required to assess the efficacy of this plant in protecting against the development of diabetes associated with increased free radical activity as a result of zinc deficiency.

## Acknowledgements

This work was supported by research project FOI 120070054, funded by the Ministry of Higher Education, Algeria. The authors thank members of Algiers Pasteur Institute for providing the rats.

## References

- International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas, 7th edn, 2015 update. <http://www.diabetesatlas.org/>. Accessed August 30, 2016.
- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, et al. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 2009;89:27–71.
- Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun S. Role of oxidative stress and Ca<sup>2+</sup> signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: Focus on TRP channels. *Neurochem Res* 2012;37:2065–75.
- American Diabetes Association. Prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2016;39:36–8.
- Rudge MV, Damasceno DC, Volpato GT, et al. Effect of *Ginkgo biloba* on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:1095–9.
- Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000;130:1447–54.
- Kumera G, Awoke T, Melese T, et al. Prevalence of zinc deficiency and its association with dietary, serum albumin and intestinal parasitic infection among pregnant women attending antenatal care at the University of Gondar Hospital, Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Nutr* 2015;1:31.
- Lemaire K, Chimienti F, Schuit F. Zinc transporters and their role in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Diabetes Invest* 2012;3:202–11.
- Slepchenko KG, James BL, Li YV. Inhibitory effect of zinc on glucose-stimulated zinc/insulin secretion in an insulin-secreting  $\beta$ -cell line. *Exp Physiol* 2013;98:1301–11.
- Kim J, Lee S. Effect of zinc supplementation on insulin resistance and metabolic risk factors in obese Korean women. *Nutr Res Pract* 2012;6:221–5.
- Foster M, Samman S. Zinc and redox signaling: Perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:1549–73.
- Hongmei Z, Chonghuai Y, Zhen Y, et al. Alterations of serum trace elements in patients with type 2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol* 2017;40:91–6.
- Mirandy S, Sherry E, Adesina CL, et al. NADPH oxidase-2 mediates zinc deficiency-induced oxidative stress and kidney damage. *Am J Physiol* 2016;312:47–55.
- Özcelik D, Nazıroğlu M, Tunçdemir M, et al. Zinc supplementation attenuates metallothionein and oxidative stress changes in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 2012;150:342–9.
- Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NF $\kappa$ B and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16770–5.
- Mehmood Y, Muhammad IA. *Ruta chalepensis* L: Considerable action against obesity or hyperlipidemia in body. *J Bioequiv Availab* 2015;7:197–201.
- Sathya PP, Sasikumar JM, Gowsigan G. Antibacterial activity of methanol extract of *Ruta chalepensis* (L., quercus infectoria, Oliver. and *Canthium parviflorum* Am. *Anc Sci Life* 2009;29:28–31.
- Al Qarawi AA. Stimulatory effect of the aqueous extract of *Ruta chalepensis* on the sex organs and hormones of male rats. *J Appl Res* 2005;5:206–11.
- Trease GE, Evans IC. *Textbook of pharmacognosy*. 12th edn. London: Bailliere Tindall, 1983, pg. 21–2.
- Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol* 1983;54:275–87.
- Southon S, Kechrid Z, Wright AJA. Effect of reduced dietary zinc intake on carbohydrate and zinc metabolism in the genetically diabetic mouse (C57BL/KsJdb+/db+). *Br J Nutr* 1988;60:499–507.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione Z, Gillette JR. Bromobenzene-induced liver necrosis: Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology* 1974;11:151–9.
- Flohe L, Gunzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114–21.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130–9.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Houlot R. *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Editions Maloine. 1984, pg. 225–7.
- Derouiche S, Kechrid Z. Zinc supplementation overcomes effects of copper on zinc status, carbohydrate metabolism and some enzyme activities in diabetic and non-diabetic rats. *Can J Diabetes* 2016;40:342–7.
- McNall AD, Etherton TD, Fosmire GJ. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin like growth factor I and growth hormone receptor genes. *Nutrition* 1995;125:874–9.

30. Nishi Y. Zinc and growth. *J Am Coll Nutr* 1996;15:340–4.
31. Al-Okbi SY, El-Sayed EM, Ammar NM, et al. Effect of *Ruta graveolens* L. and *Euphorbia pepylus* L. anti-inflammatory extracts on nutritional status of rats and the safety of their use. *Indian J Exp Biol* 2002;40:45–8.
32. Rajagopal K, Sasikala K. Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rats. *Singapore Med J* 2008;49:137–42.
33. Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, et al. Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am J Med* 1983;75:273–7.
34. Kechrid Z, Amamra S, Bouzerna N. The effect of zinc deficiency on zinc status, carbohydrate metabolism and progesterone level in pregnant rats. *Turk J Med Sci* 2006;36:337–42.
35. Kacem M, Simon G, Leschiera R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ruta chalepensis* L. extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015;51:128–41.
36. Kechrid Z, Hamdi M, Nazıroğlu M. Vitamin D supplementation modulates blood and tissue zinc, liver glutathione and blood biochemical parameters in diabetic rats on a zinc deficient diet. *Biol Trace Elem Res* 2012;148:371–7.
37. Essawy GS, Sobhy HM, El-Banna HA. The hypoglycemic effect of volatile oil of some Egyptian plants. *Vet Med J* 1995;43:167–72.
38. Al-Sagair O. Persistent hyperinsulinemia as a result of infusion with *Ruta Chalepensis*. *J Appl Res* 2004;4:625–9.
39. Kechrid Z, Amamra S, Dahdouh F. The Effect of CaNa2-EDTA on metabolism of zinc and carbohydrate as well as some biochemical factors in experimental diabetes. *Iran Public Health* 2007;36:15–21.
40. Nuraliev IN, Avezov GA. The efficacy of quercetin in alloxan diabetes. *Eksp Klin Farmakol* 1992;55:42–4.
41. Jung UJ, Lee MK, Park YB. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1134–45.
42. Nazıroğlu M, Güler M, Özgül C, Sözbir E. Apple cider vinegar modulates serum lipid profile, erythrocyte, kidney, and liver membrane oxidative stress in ovariectomized mice fed high cholesterol. *J Membr Biol* 2014;247:667–73.
43. Kechrid Z, EL-Hadjla D, Naima L. 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 Diabet Metab* 2007;15:46–50.
44. Grefley S, Sandstead H. Oxidation of alanine and B-hydroxybutyrate in late gestation by zinc restricted in rats. *Nutrition* 1993;113:1803–10.
45. Ahmed OM, Moneim AA, Yazid IA, et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetol Croat* 2010;10:39–41.
46. Bonnefont-Rousselot D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol* 2004;3:41–52.
47. Hidalgo MC, Exposito A, Palma JM, Higuera M. Oxidative stress generated by dietary Zn deficiency: Studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:183–93.
48. Shaheen AA, el Fattah AA. Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:89–95.
49. Gueroui M, Kechrid Z. Evaluation of some biochemical parameters and brain oxidative stress in experimental rats exposed chronically to silver nitrate and the protective role of vitamin E and selenium. *Toxicol Res* 2016;32:301–9.
50. Aragno M, Tamagno E, Gato V, et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1467–74.
51. Daycem K, Rabiaa MS, Sameh A. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalepensis* L and *Peganumharmala* L. *Food Chem Toxicol* 2013;55:202–8.

**Original Article**

**CHARD (*BETA VULGARIS VAR. CICLA*) EXTRACT MODULATES ZINC STATUS, GLUCOSE LEVEL AND ANTIOXYDANT VALUES IN DIABETIC RATS FED ZINC DEFICIENCY DIET**

**MALIKA HAMDIKEN, ZINE KECHRID**

Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Annaba, Algeria  
Email: kechridzine@yahoo.fr

Received: 20 Apr 2017 Revised and Accepted: 31 Aug 2017

**ABSTRACT**

**Objective:** Oxidative stress which comes from hyperglycemia, it accelerates the development of cellular and vascular damage complications in diabetes, but the antioxidants may play a beneficial role in its prevention. Several plants extracts have an antioxidant activity and the ability to reduce oxidative stress in diabetes. Thus this study was conducted to investigate the effect of *Beta vulgaris var cicla* extract on zinc status, glucose concentration and antioxidant parameters in streptozotocin-diabetic rats fed zinc deficiency diet.

**Methods:** Twenty-eight male albino (Wistar) rats were divided into four groups: two groups fed a zinc-sufficient diet one non-diabetic and the other diabetic, while the others two diabetic groups were fed a zinc-deficient diet, one non-treated group and the other treated with the extract of *Beta vulgaris var cicla*. After 21 d of dietary manipulation, fasting animals were scarified. Blood glucose, tissues zinc (femur, liver, kidney), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione-S-transferase (GST) were evaluated.

**Results:** Body weight gain of zinc-deficient diabetic animals was lower than that of zinc-adequate diabetic animals. It was noticed also that inadequate dietary zinc intake increased glucose and MDA levels. In addition, zinc deficiency diet led to a decrease in zinc tissues, GSH concentration both GST and GSH-Px activities. However, Oral administration of *Beta vulgaris* extract significantly decreased both serum glucose and MDA ( $p < 0.001$ ) levels, with a significant increase in body weight gain ( $p < 0.001$ ), GSH concentration ( $p < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), GST ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ) and GSH-Px ( $p < 0.001$ ) activities.

**Conclusion:** The present study showed that *Beta vulgaris var cicla* supplementation presumably acting as an antioxidant, and it can be a natural source for the reduction of diabetes development caused by zinc deficiency.

**Keywords:** Diabetes, Rat, Zinc deficiency, *Beta vulgaris var cicla*, Antioxidant

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open-access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i10.19315>

**INTRODUCTION**

Diabetes mellitus is a hereditary, chronic disorder in the endocrine system that constitutes a major public health problem throughout the world [1]. It is characterized by absolute or relative deficiencies in insulin secretion and/or insulin action associated with chronic hyperglycemia and disturbances of carbohydrate, lipid and protein metabolism [2, 3]. As a consequence of the metabolic derangements in diabetes, many complications develop including coronary artery disease, nephropathy, retinopathy, and neuropathy [4]. Oxidative stress is thought to play a major role in the development of most of these complications [5]. Oxidative stress may occur when antioxidant mechanisms are not working properly as in dietary deficiencies of vitamin E, vitamin C or the essential elements such as selenium, zinc, and manganese among others. Another important cause of oxidative stress is the excessive endogenous production of free radicals by diseases progression as in diabetes mellitus and cancer [6]. Elevated glucose levels were recognized as a pathogenic factor of chronic diabetic complications by generating reactive oxygen species (ROS) and attenuating the antioxidative machinery via glycation of the antioxidant enzymes. The major ROS sources in the diabetic complications were: autooxidation of glucose, the activation of polyol pathways, mitochondrial respiratory chain deficiencies, xanthine oxidase activity, NAD (P)H oxidase, advanced glycation end products (AGEs) and nitric oxide synthase (NOS) [7]. Zinc is an essential component of numerous proteins, which play crucial roles in growth and development. It showed potent antioxidant and anti-inflammatory properties and was involved in the defence against oxidative stress [8]. Diabetic patients often suffer from zinc deficiency at the late stage, particularly in the patients whose glucose was poorly controlled [9]. In addition, zinc has been reported to exert antidiabetic effects in various experimental

models [10]. Thus, it seems that zinc deficiency increases the risk for several chronic disease states such as diabetes [11], and this risk may be associated with an increased vulnerability to oxidative stress [12]. *Beta vulgaris var. cicla* (chard) is an herbaceous biennial leafy vegetable cultivated in many parts of the world. This plant belongs to *chenopodiaceae* family. It is a low cost plant that has widespread use in many traditional dishes. Modern pharmacologists addressed the importance of bioactive molecules from *Beta vulgaris var cicla* extracts and demonstrated their antidiabetic, anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activities. Different types of oral hypoglycemic agents such as *biguanides* and *sulphonylurea* are available along with insulin for the treatment of diabetes mellitus, but have side effects associated with their uses [13]. Therefore, there is an urgent need to search for the drugs of a natural origin with fewer side effects. Flavonoids, a class of natural drugs with high biological activity are abundant in plants. They are reported to have protective effects against the development of diabetes as well as a mitigation effect of diabetes consequences [14]. Therefore, the present investigation was aimed at evaluating the modulator effects of *Beta vulgaris var cicla* (chard) administration for prevention the development of diabetic pathology observed in zinc deficiency by evaluating body weight gain, zinc status, glucose level and antioxidant system in streptozotocine diabetic rats.

**MATERIALS AND METHODS**

**Preparation of extract**

*Beta vulgaris var cicla* (chard) aerial parts were collected in December 2012 from Guelma region (East of Algeria 36 ° 27' 58" North, 7 ° 26' 2" East). The collected aerial part of the plant material was washed thoroughly and dried in shade. The powdered plant material (250 g) was soaked in 80 % methanol and kept for three

days. The extract was concentrated to dryness by rotary evaporator in low pressure yielding the dried extract (21.45 g).

#### Determination of total polyphenols content

Total polyphenols in chard extract were determined with Folin-Ciocalteu reagent, according to the method of Li *et al.* [15]. Briefly, 200  $\mu$ l of the chard extract was mixed with 1 ml of Folin-Ciocalteu phenol reagent (10 x dilutions) and allowed to react for 4 min. Then 800  $\mu$ l of saturated  $\text{Na}_2\text{-CO}_3$  solution was added and allowed to stand for 2 h before the absorbance of the reaction mixture was read at 765 nm. The total polyphenol contents of the extract were expressed as mg gallic acid equivalents per gram of extract.

#### Determination of total flavonoids content

Total flavonoids contents were estimated according to the Dowd method which was modified by Bahorun *et al.* [16]. Briefly, a diluted solution (1 ml) of each extract was mixed with an equal volume of aluminum trichloride ( $\text{AlCl}_3$ ) in methanol (2%). The absorbance was read at 430 nm after 10 min. Quercetin was used as reference compound to produce the standard curve and the results were expressed as g of quercetin equivalents (QE)/kg of dry mass

#### Determination of DPPH radical scavenging activity

The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of the chard extract was measured according to the procedure described by Mansouri *et al.* [17]. Appropriate dilution series of extract (0–2 mg/ml) were prepared in methanol 25  $\mu$ l of each dilution was added to 975  $\mu$ l of a 6x10<sup>-5</sup>M methanolic solution of DPPH followed by vortexing. The mixture was shaken vigorously and allowed to stand in the dark at room temperature for 30 min. The decrease in absorbance of the resulting solution was then measured spectrophotometrically at 517 nm against methanol. All measurements were made in triplicate and averaged. The DPPH radical scavenging activity was calculated using the following equation:

$$\% \text{ scavenging activity} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100$$

Where  $A_0$  is the absorbance of control and  $A_1$  is the absorbance of test or standard.

#### Animals

Male albino Wistar rats weighing 200–250g with age 10–12 w, were obtained from Pasteur institute; Algiers, Algeria. Prior to experiments, the animals were allowed to acclimate to their surroundings for two weeks. Rats were housed in individual plastic cages with bedding. Standard rat food and tap water were available *ad-libitum* for the duration of the experiments. The temperature was maintained at 22 $\pm$ 2 °C. A 12/12-h light/dark cycle was maintained, with lights on at 06.00 AM, unless otherwise noted.

#### Induction of experimental diabetes and diet preparation

Diabetes was induced with fresh streptozotocine (STZ) solution using a previously described method [18]. STZ was intraperitoneally administered at a dose of 50 mg/kg body weight dissolved in citrate buffer (0.01 M, pH 4.5). Blood glucose was measured seven days after induction of diabetes on samples taken from tail vein. The diabetic state was confirmed by a glucose-meter (ACCU-CHEK, Roche Diagnostics, Paris, France) when the glucose concentration exceeded 14 mmol/l. The diet for rats consisted of (in grams per kilogram diet): cornstarch 326, sucrose 326, protein 168 (egg white solids), lipids 80 (corn oil), fiber 40 (cellulose), vitamin mix (sigma) and mineral mix 40. The latter was formulated to contain either adequate (54 mg/kg) [19] or inadequate (1.2 mg/kg) quantities of Zn, as determined by atomic absorption spectroscopy. The mineral mix supplied (in grams per kilogram diet) calcium hydrogen orthophosphate 13; disodium hydrogen orthophosphate 7.4; calcium carbonate 8.2; potassium chloride 7.03; magnesium sulphate 4; ferrous sulphate 0.144; copper sulphate 0.023; potassium iodide 0.001, manganese sulphate 0.180 and zinc carbonate 0.1. The zinc deficiency diet contained no additional zinc carbonate.

#### Experimental design

Twenty eight rats were divided into four groups seven each. The first group was non-diabetic rats fed with sufficient zinc diet containing 54 mg Zn/kg diet (ND). The second group diabetic rats received sufficient zinc diet (DSZ). The third group diabetic zinc deficient rats given a diet containing 1.2 mg Zn/kg diet (DZD). The fourth group diabetic zinc deficient rats treated orally with methanolic extract of *Beta vulgaris* at dose of 500 mg/kg (DZD-B). The treatment of animals was carried out for 21 days. Body weight was recorded regularly and blood was collected after overnight-fasting from the tail vein at 0, 7, 14 and 21 days for glucose determination using the glucose-meter.

#### Tissue samples preparation

On day 21 rats were sacrificed under ether anesthesia. Heart, kidneys and liver were excised, washed with isotonic saline, and blotted to dry. The right femur was taken, and the connective tissues and muscle were removed. After that, one kidney of each animal, femur, and one fragment of liver were weighed and dried at 80 °C for 16 h and zinc concentration in each tissue was determined. Heart, the second kidney and the second fragment of liver were processed immediately for assaying reduced glutathione (GSH), Malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione S-transferase (GST).

#### Tissues zinc analyses

The dried kidneys, livers and femurs were heated in silica crucibles at 480 °C for 48 h and the ash dissolved in hot 12 M hydrochloric acid for zinc analysis utilizing a flame atomic absorption spectrophotometer (Pye Unicam SP 9000, Hitchin, UK). Standard reference materials: bovine liver and wheat flour were used to check the accuracy of zinc recovery, which exceeded 96 % in the reference materials. Zinc standards were prepared from 1 mg/ml zinc nitrate standard solution using 5% glycerol to approximate the viscosity characteristics [20]. All tubes were soaked in HCL (10% v/v) for 16 h and rinsed with doubly distilled water to avoid zinc contamination from exogenous sources.

#### Lipid peroxidation and antioxidant analyses

##### Tissue preparation

About 1 g of liver, heart and kidney was homogenized in 2 ml ice cold TBS (50 mmol Tris, 150 mmol NaCl, pH 7.4). Then the homogenates were centrifuged at 10000 $\times$  g for 15 min at 4 °C, and the resultant supernatant was used for the determination of MDA, GSH, proteins, GSH-Px and GST.

##### Lipid peroxidation estimation

Malondialdehyde (MDA), a terminal product of lipid peroxidation, was measured to estimate the extent of lipid peroxidation in liver, heart and kidney homogenate by using the method described by Ohkawa *et al.* [21], which was based on TBA reactivity. Briefly, 0.5 ml of 20% trichloroacetic acid, 0.5 ml of homogenate and 1 ml of 0.675% TBA were mixed into tubes. Then the mixture was warmed for 15 min at 100 °C. Tubes were cooled in room temperature and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. 4 ml ml of n-butanol was added. The optical density of supernatant was measured at 532 nm and the malondialdehyde (MDA) was expressed as nmol/mg protein

##### Estimation of reduced glutathione

The reduced glutathione was estimated utilizing a colorimetric technique as mentioned by Ellman [22] and modified by Jollow *et al.* [23] based on the development of a yellow color when DTNB is added to compounds containing sulfhydryl groups. The GSH concentration (nmol GSH/mg protein) was obtained from the absorbance at 412 nm.

##### Assay of glutathione-S-transferase

GST activity was estimated according to the method of Habig *et al.* [24], using p-nitrobenzyl chloride as substrate. The absorbance was measured

at 340 nm at 30-second intervals for 3 min. The enzyme activity was expressed as  $\mu\text{mol CDNB-GSH conjugate formed}/\text{min}/\text{mg protein}$ .

#### Assay of glutathione peroxidase

The enzymatic activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) was measured by the method of Flohe and Günzler [25]. This method was based on the reduction of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in the presence of reduced glutathione (GSH), the latter is transformed into (GSSG) under the influence of GSH-Px and the reading absorbance was at 412 nm. The enzyme activity was expressed as  $\mu\text{moles of reduced GSH}/\text{min}/\text{mg protein}$ .

#### Protein determination

Protein concentration in the tissue homogenates was determined by Bradford method [26], using bovine serum albumin as a standard.

#### Statistical analysis

Results were expressed as  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ . Statistical significance of the results obtained for various comparisons was estimated by applying one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's *t*-test to compare means between the different groups and the level of significance was set at  $p < 0.05$ .

### RESULTS

#### Total polyphenol and flavonoid

Total polyphenol content ( $\text{mg}/\text{g}$ ) determined by Folin-Ciocalteu colorimetric method was  $31.231 \pm 0.0066$  (GAE  $\text{mg}/\text{g}$  of extract) for methanol extract of chard. Polyphenol content was determined by a linear regression equation of gallic acid and expressed as GAE of extract ( $y = 0.0069x + 0.0105$ ,  $r^2 = 0.999$ ). The flavonoid content determined by aluminum chloride method was found to be  $6.85 \pm 0.087$  (QE  $\text{mg}/\text{g}$  of extract). Flavonoids content was determined by a linear regression equation of quercetin and expressed as QE of extract ( $y = 0.0049x + 0.0034$ ,  $r^2 = 0.999$ ).

#### DPPH radical scavenging activity

The extract was capable of scavenging DPPH radicals in a concentration dependent manner. Ascorbic acid was used as reference for radical scavenger. The scavenging activity of chard extract and ascorbic acid on DPPH radicals increased between 0–2  $\text{mg}/\text{ml}$  and were 58.68% and

95.72% at a concentration of 2  $\text{mg}/\text{ml}$ , respectively. DPPH scavenging activity is best presented by EC50 value, defined as the concentration of the antioxidant needed to scavenge 50% of DPPH present in the test solution. A higher DPPH radical scavenging activity was associated with a lower EC50 value. EC50 values for chard extract on DPPH radical scavenging activity was found as 1.74  $\text{mg}/\text{ml}$  (fig. 1).

#### Body weight gain

Body weight gain is shown in table 1. The results indicated a very significant reduction in body weight of diabetic rats compared to non-diabetic rats. Meanwhile, body weight of diabetic animals fed zinc deficiency (DZD) was lower ( $p < 0.001$ ) than diabetic rats given adequate zinc diet (DSZ). However, the treatment with the extract was ameliorated the growth rate in DZD (table 1).

#### Femur, kidney and liver zinc concentrations

Zinc level in the three organs (kidney, liver; femur) of diabetic rats (DSZ) was generally lower ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ) than non-diabetic rats. On the other hand zinc concentration in liver ( $p < 0.01$ ), femur ( $p < 0.001$ ) and kidney ( $p < 0.05$ ) were significantly lower in DZD group than in DSZ group. However, zinc tissues contents were significantly restored in DZD-B group (table 1).

#### Fasting blood glucose level

The determination of fasting blood glucose level (FBG) on 0, 7th, 14th and 21th day, showed that STZ injection in rats led to a significant increase in FBG level. It was also noticed that a significant increase in FBG concentration in Zn-deficient diabetic animals. Meanwhile, a clear reduction in FBG levels was observed from the 7th day after the treatment of Zn-deficient diabetic animals with the methanol extract (fig. 2).

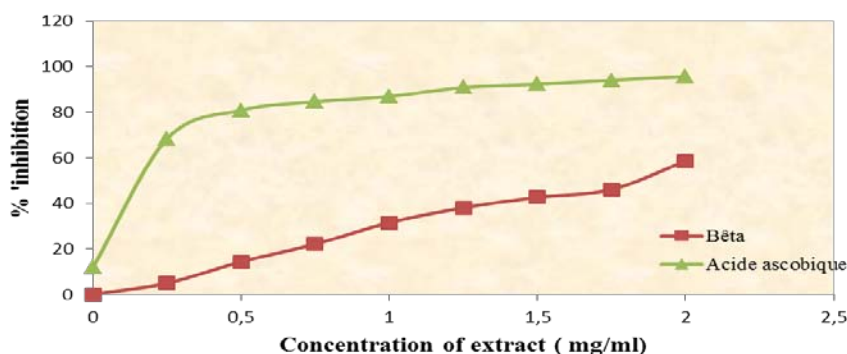
#### MDA, GSH, GSH-Px and GST values

MDA, GSH, GSH-Px, and GST values are shown in fig. 3, 4, 5 and 6 respectively. The control diabetic rats had high MDA level and low GSH content, GSH-Px activity and GST activity in all studied organs as compared to non-diabetic rats. Moreover, it was observed that zinc deficiency caused high MDA in liver, heart and kidney of diabetic animals with a decrease in GSH, GST and GSH-Px. Whereas, *Beta vulgaris var cicla* administration resulted an improvements of the previous hepatic, cardiac and renal oxidative stress markers.

**Table 1: Body weight gain, tissue zinc levels in non-diabetic rats (ND), diabetic zinc sufficient rats (DSZ), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Beta vulgaris* (DZD-B)**

Groups	Initial body weight (g) mean $\pm$ SEM	Final body weight(g) mean $\pm$ SEM	Femur zinc ( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry wt) mean $\pm$ SEM	Kidney zinc ( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry wt) mean $\pm$ SEM	Liver zinc ( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry wt) mean $\pm$ SEM
ND	134 $\pm$ 6.4	159.2 $\pm$ 3.36	73 $\pm$ 3	68.13 $\pm$ 5.85	66 $\pm$ 4.37
DSZ	173.2 $\pm$ 9.76	154.4 $\pm$ 8.72	60.34 $\pm$ 4.11	56 $\pm$ 6.33	43 $\pm$ 6.65
DZD	170 $\pm$ 8.4	133.6 $\pm$ 14.48	44.34 $\pm$ 2.64	53 $\pm$ 7.25	39 $\pm$ 2.49
DZD-B	133.8 $\pm$ 22.64	159.3 $\pm$ 10.53	53.4 $\pm$ 3.54	63.23 $\pm$ 4.52	51 $\pm$ 3.97

<sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>a2</sup> $p < 0.001$ : comparison of DSZ with ND; <sup>b</sup> $p < 0.05$ , <sup>b1</sup> $p < 0.01$ , <sup>b2</sup> $p < 0.001$  comparison of DZD with DSZ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ , <sup>c1</sup> $p < 0.001$  <sup>c2</sup> $p < 0.001$ : comparison of DZD-B with DZD., number of samples=7.



**Fig. 1: Antioxidant activity of *Beta vulgaris* extract by DPPH free radical method**



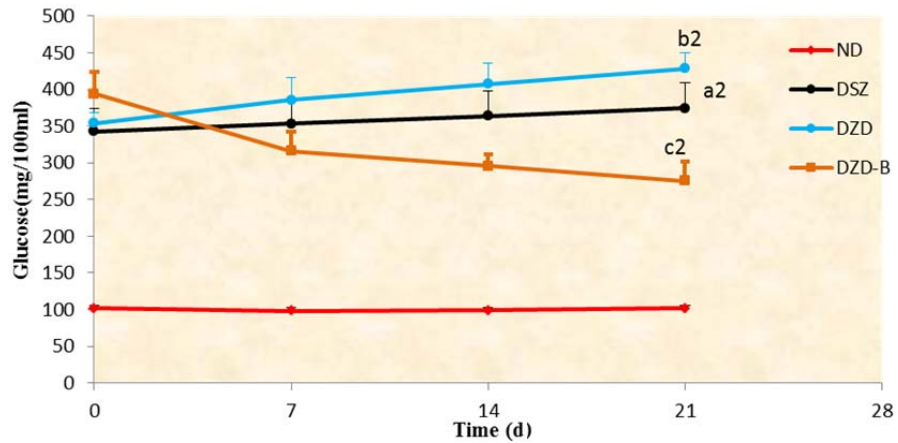


Fig. 2: Blood glucose levels in non-diabetic rats (ND), diabetic zinc sufficient rats(DSZ), diabetic zinc deficient rats (DZD)and diabetic zinc deficient rats were given methanol extract of *Beta vulgaris var cicla* (DZD-B)

<sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND; <sup>b2</sup>p<0.001 comparisons of DZD with DSZ; <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-B with DZD. Values are mean±SEM, a number of samples = 7.

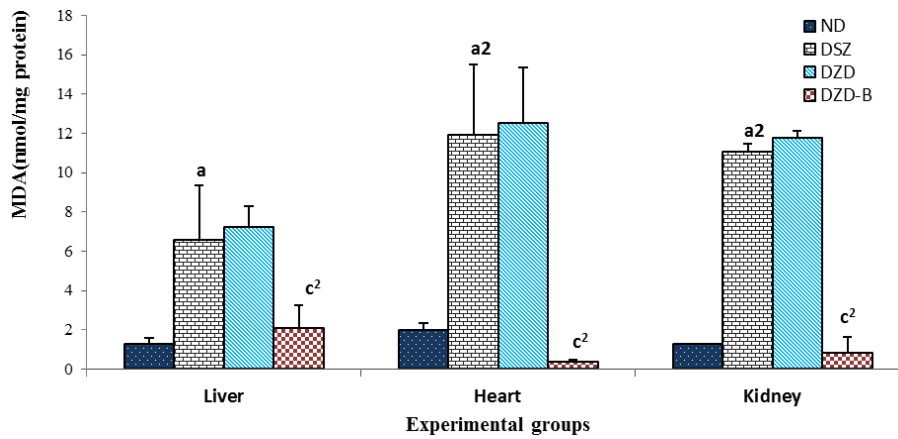


Fig. 3: MDA level in non-diabetic rats (ND), diabetic zinc sufficient rats(DSZ), diabetic zinc deficient rats (DZD)and diabetic zinc deficient rats were given methanol extract of *Beta vulgaris var cicla* (DZD-B)

<sup>a</sup>p<0.05, <sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND; <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-B with DZD. Values are mean±SEM, number of samples = 7.

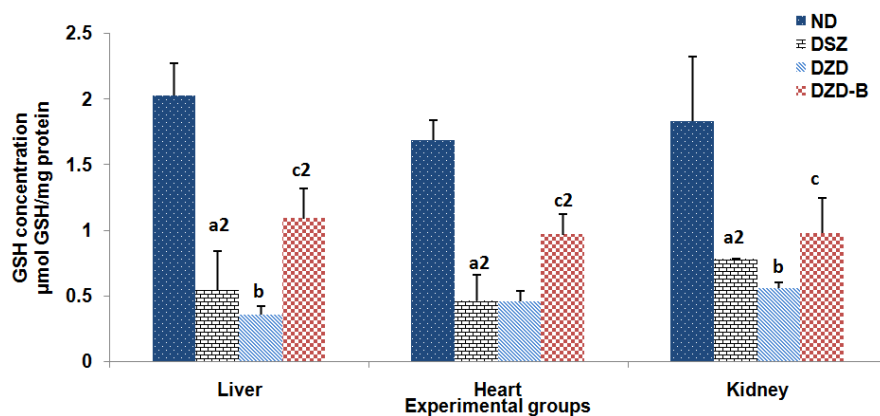


Fig. 4: GSH level in non-diabetic rats (ND), diabetic zinc sufficient rats(DSZ), diabetic zinc deficient rats (DZD)and diabetic zinc deficient rats given methanol extract of *Beta vulgaris var cicla* (DZD-B)

<sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND; <sup>b</sup>p<0.05 comparison of DZD with DSZ; <sup>c</sup>p<0.05 <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-B with DZD. Values are mean±SEM, number of samples = 7.

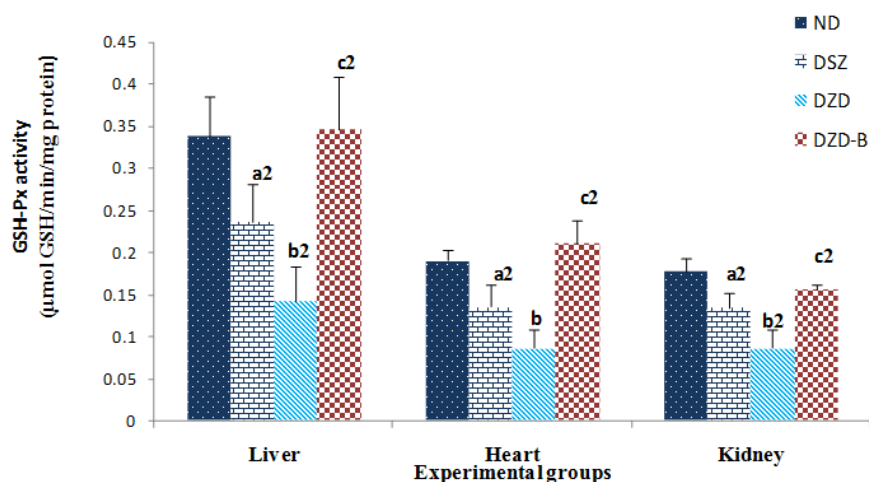


Fig. 5: GSH-Px activity in non-diabetic rats (ND), diabetic zinc sufficient rats (DSZ), diabetic zinc deficient rats (DZD) and diabetic zinc deficient rats given methanol extract of *Beta vulgaris var cicla* (DZD-B)

<sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND; <sup>b</sup>p<0.05, <sup>b2</sup>p<0.001 comparison of DZD with DSZ; <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-B with DZD. Values are mean±SEM, a number of samples = 7.

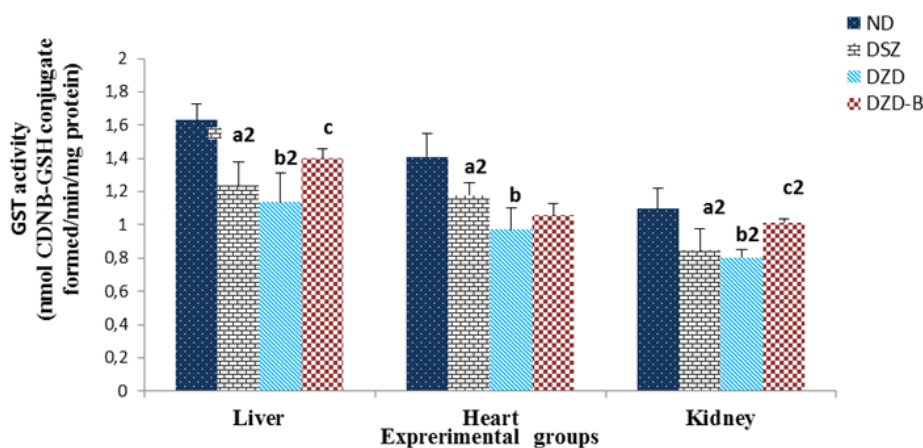


Fig. 6: GST activity in non-diabetic rats (ND), diabetic zinc sufficient rats (DSZ), diabetic zinc-deficient rats (DZD) and diabetic zinc-deficient rats given methanol extract of *Beta vulgaris var cicla* (DZD-B)

<sup>a2</sup>p<0.001: comparison of DSZ with ND; <sup>b</sup>p<0.05, <sup>b2</sup>p<0.001 comparison of DZD with DSZ; <sup>c</sup>p<0.05, <sup>c2</sup>p<0.001: comparison of DZD-B with DZD. Values are mean±SEM, number of samples = 7.

## DISCUSSION

Plants have been used for many years as a source of traditional medicine to treat various diseases and conditions. Many of these medicinal plants are also excellent sources for phytochemicals, many of which contain potent antioxidant and antidiabetic factors. Therefore, several studies were conducted to evaluate the secrets of plants among them this study, which is devoted to search for the potential antioxidant and antidiabetic effects of methanol extract aerial part of *Beta vulgaris var cicla* in animals fed a low zinc diet. According to the findings obtained *Beta vulgaris var cicla* is rich in phenolic compounds and flavonoids. Phenolic compounds such as quercetin, rutin, narigin, catechin, caffeic acid, gallic acid and chlorogenic acid, which are very important plant constituents [27]. Medicinal plants are known to produce diverse substances possessing antioxidant properties having ability to protect the human body against cellular oxidation. Anti-oxidation are vital substances which possess the ability to protect the body from damage caused by free radicals inducing oxidative stress [28]. Antioxidant compounds like phenolic acids, polyphenols and flavonoids scavenge free radicals such as peroxide, hydroperoxide of lipid hydroxyl and halt the oxidative mechanism that leads to degenerative diseases [29]. Flavonoids are proactive

polyphenolic compounds found in most plants and cannot be synthesized or produced by the humans [30]. They were found to be effective in controlling various biological activities. In other words, they are anti-inflammatory, anti-angiogenic, antimicrobial, antioxidant, hypertension reduction and have anti-cholesterol properties [31]. In recent times, research interest has been paid to polyphenols and flavonoids as a result of their antioxidant capacity which is principally based on the redox properties of their hydroxyl groups and the structural relationship between different functional groups in their structure which enable them to actively serve as free radical scavengers, reducing agents, singlet oxygen quenchers metal chelators, and hydrogen donors [32]. *B. vulgaris var cicla* is rich in minerals, vitamins and phytochemicals and is one of the healthiest vegetables. Main identified secondary metabolites are flavonoids, flavonoid glycosides and saponins. Antioxidative activity of different Swiss chard extracts and their components is proven in several tests, as well as anti-mitotic activity on MCF-7 human breast cancer cells, antiproliferative activity on human colon cancer and hypoglycemic activity [33]. Phenolic content and antioxidant activities have been most frequently studied. In comparison with other largely consumed vegetables in the Mediterranean diet, Swiss chard displays high antioxidant activity [34]. In the current study, diabetic rats weighed

less than non-diabetic rats, this is consistent with some previously published reports [35]. This raises the possibility of the metabolic state disturbance of animal, suggesting that the diabetic condition had exacerbated reduced the ability of the diabetic rats to utilize food intake as normal subjects. On the other hand, rats fed a zinc deficiency diet had less body weight gain compared with rats fed a zinc adequate diet, which is concomitant with previously published investigations [36]. It has been well documented that rats fed low zinc diet voluntarily decrease diet consumption (reduce appetite) and maintain a very low growth rate [37]. Body weight gain of diabetic rats fed a low zinc diet and administrated with *Beta vulgaris* extract was higher than that of zinc deficient diabetic rats. The ameliorative in body weight of these animals might be as a result of an increase in daily food consumption and promotion of protein synthesis. Moreover *Beta vulgaris* extract has the ability to reverse gluconeogenesis and control protein loss [38]. Zinc tissues concentrations including liver, femur and kidney in diabetic rats were lower than that of non-diabetic rats. These findings, indicating the effect of diabetes on body zinc status. It has been postulated that low level of zinc in diabetic patients may be due to excessive urinary output and gastro intestinal malabsorption [39, 40]. The results of this investigation showed also that there was a significant decrease of zinc content in the previous organs of diabetic animals fed inadequate zinc diet compared to their diabetic fed adequate zinc diet, which was coincide with previous investigations [37, 41]. On the other hand zinc concentration in various tissues of zinc deficient diabetic rats treated with methanol extract was restored. This is probably due to the antioxidant effect of this plant extract against the development of diabetic state resulting in a decline of urine zinc loss. The mean fasting blood glucose concentration in animals fed low zinc diet was found to be higher than that of those receiving adequate dietary zinc during the experiment period. This may be related to altered glucose utilization by tissues or to increased rate of endogenous glucose production [42]. Moreover, blood glucose was reduced in Zn-deficient diabetic animals that were treated with chard as compared to Zn-deficient animals. Experiments performed by Yanardag *et al.* [43] demonstrated the hypoglycemic effect of *Beta vulgaris var cicla* extract in diabetic rats. This hypothesis was substantiated by further studies of the same group, who demonstrated a 40% reduction of glycaemia, without any loss of weight or impairment of liver functions [34, 44]. The mechanism for the hypoglycemic action of the extract has been tentatively attributed to saponins that inhibit gluconeogenesis and glycogenolysis [45]. However, other molecular pathways potentially involved in hypoglycemic effects remain to be deeply investigated. In fact, some evidences suggested that the hypoglycemic activity of chard extract might be due to flavonoids through the inhibition of glucose transporters. For instance, quercetin which is present in chard, showed evidence of anti-diabetic effects via inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 [46]. Another complementary hypoglycemic mechanism could be the flavonoid induced inhibition of the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities [47]. The inhibition of this enzyme could delay the digestion and absorption of carbohydrates and consequently suppress post-prandial hyperglycemia [48]. Some C-glycosylflavones, i.e. vitexin, vitexin-2-O-glycoside and VOR contained in *Beta vulgaris* leaves and seeds, were found to be strongly inhibit  $\alpha$ -glucosidase and could be the most probable cause of the hypoglycemic effect [34]. In general, the reduced antioxidant capability in diabetes was the result of increased production of oxygen metabolites, which curbs the activity of the antioxidant defense system [49]. Moreover, several studies demonstrated increased free radical production or increased oxidative damage in response to zinc deficiency *in vitro* or *in vivo* [50]. Zinc status has been shown to affect glutathione concentrations in tissues. It was found an increase in MDA and a reduction of GSH, GSH-Px and GST in liver, heart and kidney of diabetic rats fed a low zinc diet. The increase of MDA confirms the deleterious effect of zinc deficiency in increasing lipid peroxidation as already reported in animals [51]. Glutathione acts synergistically with zinc in protecting sulfhydryl groups, the reason for depletion of glutathione might have contributed to the higher consumption of glutathione and higher oxidative damage in zinc deficient rats [52]. The observed decline in GSH-Px and GST activities probably due to modification of the sulfhydryl groups in these enzymes by oxygen free radicals [53]. Elevated glucose and hydrogen peroxide levels have also been found to inactivate GST and GSH-Px [54]. This study confirmed a beneficial effect of *Beta vulgaris var cicla* in attenuating oxidative stress and

oxidative damage. In other words, the findings showed a significant reduction in the formation of TBARS level and an augmentation of GSH concentration with an improvement of both GSH-Px and GST activities. Thus, it has been reported that several polyphenol compounds isolated from *Beta vulgaris* possess a strong antioxidant properties, which reduce the formation of ROS by directly inhibiting the reactive oxygen generating enzymes [31]. El-Gamal *et al.* [55] indicated that chard treatment decreased the renal MDA levels and increased the CAT activity in gentamicin induced nephrotoxicity in rats. Jain and Singhai [56] reported that chard administration significantly decreased the MDA level and increased the GSH concentration in rats and suggested that the antioxidant effect of chard plays an important protective role against ethanol-mediated toxicity. In addition, Ozsoy-Sacan *et al.* [57] mentioned significantly decreased liver MDA and increased GSH levels in chard administered diabetic rats. Chakole *et al.* [58] reported also that chard administration reduced the LPO and prevented necrosis in the paw of rats. It has been suggested that the antioxidant and free radical-scavenging activities might be also due to the presence of terpenoids in chard. Pyo *et al.* [59] showed a linear correlation between radical-scavenging effect and polyphenolic concentration of chard. Phenolic acids and flavonoids containing multiple hydroxyl groups have higher antioxidant activities against free radical species.

## CONCLUSION

The present study indicated that the combination of zinc deficiency and diabetes affected the growth rate, zinc status, carbohydrate metabolism and antioxidant system. Whereas, the administration of methanol extract of *Beta vulgaris var cicla* reduced these severity complications, suggesting that *Beta vulgaris var cicla* has an important effect as a most potent agent in protecting against the clinical disease associated with increased free radical activity as a result of zinc deficiency.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by a research project under the number: F01120140045 funded by the Ministry of Higher Education, Algeria. Authors thank Pasteur Institute, Algiers for providing rats and declare that there is no conflict of interest.

## AUTHORS CONTRIBUTION

Zine Kechrid formulated the present hypothesis. Zine Kechrid with Malika Hamdiken were responsible for writing the report. Malika Hamdiken was also responsible for the analysis of the data.

## CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

## REFERENCES

1. Khatiri SK, Rathnanand M, Nikhila R. Formulation and evaluation of wound healing activity of Linezolid topical preparations on diabetic rats. *Int Appl Pharm* 2016;8:30-6.
2. Amin AH, El-Missiry MA, Othman AI. Melatonin ameliorates metabolic risk factors, modulates apoptotic proteins, and protects the rat heart against diabetes-induced apoptosis. *Eur Pharmacol* 2015;747:166-73.
3. Modilal MR, Daisy P. Hypoglycemic effects of *Elephantopus scaber* in alloxan-induced diabetic rats. *Indian J Novel Drug Delivery* 2011;3:98-103.
4. Dilek P, Betul U, Hatice B. Lycopene protects the diabetic rat kidney against oxidative stress-mediated oxidative damage induced by furan. *Braz Arch Biol Technol* 2016;59:1-12.
5. Elmarakby A, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther* 2012;30:49-59.
6. Almalki WH, Arafa EA, Abdallah AY, Mahfoz AM, Osman AO, Abd El-Latif HA, *et al.* Zinc chloride protects against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Pharmacol Pharm* 2016;7:331-42.
7. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Bas Dis* 2011;1812:719-31

8. Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes: clinical links and molecular mechanisms. *Nutr Bioch* 2009;20:399-417.
9. Jansen J, Rosenkranz E, Overbeck S, Warmuth S, Mocchegiani E, Giacomoni R, *et al.* disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by *in vitro* and *in vivo* analysis of the insulinomimetic activity of zinc. *Nutr Bioch* 2012;23:1458-66.
10. Asri-Rezaei S, Tamaddonfard E, Ghasemsoltani-Momtaz B, Erfanparast A, Gholamalipour S. Effects of crocin and zinc chloride on blood levels of zinc and metabolic and oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Avicenna Phytomed* 2015;5:403-12.
11. Hongmei Z, Chonghuai Y, Zhen Y, Weiwei Z, Yixin N, Xiaoyong L, *et al.* Alterations of serum trace elements in patients with type 2 diabetes. *J Trace Elements Med Biol* 2017;40:91-6.
12. Mirandy SL, Sherry EA, Jennifer LG, Robert SH, Clintoria RW. NADPH oxidase-2 mediates zinc deficiency-induced oxidative stress and kidney damage. *Am Physiol* 2016;312:47-55.
13. Jing L, Fayong G, Fenglin L. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoids from tatar buckwheat in type 2 diabetic rats. *Biomed Res* 2016;27:132-7.
14. Gupta RK, Kesari AN, Watal G, Murthy PS, Chandra R, Maithal K, *et al.* Hypoglycaemic and antidiabetic effect of aqueous extract of leaves of *Annona squamosa* (L.) in the experimental animal. *Curr Sci* 2005;88:1244-345.
15. Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 2007;102:771-6.
16. Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Din T, Luyckx M, *et al.* Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung* 1996;46:1086-9.
17. Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem* 2005;89:411-20.
18. Southon S, Kechrid Z, Wright AJA, Fairweather-Tait SJ. Effect of reduced dietary zinc intake on carbohydrate and zinc metabolism in the genetically diabetic mouse (C57BL/KsJdb+/db+). *Br Nutr* 1988;60:499-507.
19. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol, a natural phytoalexin, Normalizes hyperglycemia in STZ nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed Pharm* 2008;62:598-605.
20. Kechrid Z, Bouzerna N, Zio MS. Effect of low zinc diet on Zn turnover in non-insulin dependent diabetic mice. *Diabet Metab* 2001;27:580-3.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Bioch* 1979;95:351-8.
22. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
23. Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione Z, Gillette JR. Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacol* 1974;11:151-9.
24. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-transferase the first step in mercapturic acid formation. *Biol Chem* 1974;249:7130-9.
25. Flohe L, Gunzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:14-121.
26. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
27. Samatha T, Shyamsundarachary R, Srinivas P, Swamy R. Quantification of total phenolic and total flavonoids contents in extracts of *Oroxylum Indicum* L. *Kurz. Asian Pharma Clin Res* 2012;5:177-9.
28. Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev N. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem* 2008;110:571-83.
29. Subramanian H, Gupta K, Guo Q, Price R, Ali H. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *Biol Chem* 2011;286:44739-49.
30. McCullough ML, Peterson J, Patel R. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults 1-4. *Am Clin Nutr* 2012;95:454-64.
31. Liu X, Zhu L, Tan J, Zhou X, Xiao L, Yang X, *et al.* Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and the triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa* Ledeb. *BMC Complementary Altern Med* 2014;14:1-12.
32. Penyaringan F, Jumlah Asai K. Phytochemical screening, total flavonoid and phenolic content assays of various solvent extracts of tepal of *Musa paradisiaca*. *Malaysian Anal Sci* 2016;20:1181-90.
33. Unsal Veli U, Sevim T, Burcin A, Hazal I, Emekli-Alturfan E, Akbay TT, *et al.* Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var *cicla*) on cardiac damage in valporoid acid induced toxicity. *Food Biochem* 2016;40:132-9.
34. Trifunovic S, Topalovic A, Knezevic M, Vajs V. Free radicals and antioxidants: antioxidative and other properties of swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*). *Agric For* 2015;61:73-92.
35. Bronislava R, Gedulin M, Svetlana E, Nikoulina PA, Smith GG, Loretta LN, *et al.* Exenatide (Exendin-4) improves insulin sensitivity and cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight. *Endoc* 2005;146:2069-76.
36. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharm Res* 2005;52:313-20.
37. Nishi Y. Zinc and growth. *Am Coll Nutr* 1996;15:340-4.
38. Rajagopal K, Sasikala K. Antihyperglycaemic and antihyperlipidemic effects of *Nymphaea laticornis* in alloxan induced diabetic rats. *Singapore Med* 2008;49:137-42.
39. Kechrid Z, Amamra S, Bouzerna N. The effect of zinc deficiency on zinc status, carbohydrate metabolism and progesterone level in pregnant rats. *Turk Med Sci* 2006;36:337-42.
40. Islam MS, Loots DT. Diabetes: metallothionein, and zinc interactions review. *Biofactors* 2007;29:203-12.
41. Naziroglu M. Role of selenium on calcium signalling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009;34:2181-91.
42. Kechrid Z, Hamdi M, Naziroglu M, Flores-Arce M. Vitamin D supplementation modulates blood and tissue zinc, liver glutathione and blood biochemical parameters in diabetic rats on a zinc-deficient diet. *Biol Trace Elem Res* 2012;148:371-7.
43. Yanardag R, Colak H. Effect of chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. *Pharm Pharmacol Commun* 1998;4:309-11.
44. Ozsoy-Sacan O, Karabulut-Bulan O, Bolkent S, Yanardag R, Ozgey M. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var *cicla*) on the liver of the diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:1640-8.
45. Massiot G, Dijoux MG, Lavaud C, Men-Olivier L, Connolly JD, Sheeley DM, *et al.* Seco-glycosides of oleanolic acid from *Beta vulgaris*. *Phytochem* 1994;37:1667-70.
46. Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, *et al.* Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and Glucose. *Biol Chem* 2002;277:15252-60.
47. Yilmazer-Musa M, Griffith AM, Michels AJ, Schneider E, Frei B. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of alpha-amylase and alpha-glucosidase activity. *Agric Food Chem* 2012;60:8924-9.
48. Bischoff H. The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin Invest Med* 1995;18:303-11.
49. Bonnefont-Rousselot D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol* 2004;3:41-52.
50. Ozcelik D, Naziroglu M, Tunçdemir M, Çelik O, Ozturk M, Flores-Arce MF. Zinc supplementation attenuates metallothionein and oxidative stress changes in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 2012;150:342-9.
51. Hidalgo MC, Exposito A, Palma JM, Higuera M. Oxidative stress generated by dietary Zn deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int Biochem Cell Biol* 2002;34:183-93.
52. Kraus A, Roth HP, Kirchgessner M. Influence of vitamin C, vitamin E and  $\beta$ -carotene on the osmotic fragility and the primary antioxidant system of erythrocytes in zinc-deficient rats. *Arch Anim Nutr* 1997;50:257-69.

53. Pigeolet E, Remacle J. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Radical Biol Med* 1991;11:191-5.
54. Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 1999;26:1467-74.
55. El-Gamal AA, Alsaid MS, Raish M, Al-Sohaibani M, Al-Massarani SM, Ahmad A, *et al.* Beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rodent model. *Med Inflamm* 2014;10:1155-62.
56. Jain NK, Singhal AK. Protective role of *Beta vulgaris L.* leaves extract and fractions on ethanol-mediated hepatic toxicity. *Acta Pol Pharm* 2012;69:945-50.
57. Chakole R, Zade S, Charde M. Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Beta vulgaris(Linn.)* roots. *Int Biomed Adv Res* 2011;2:124-30.
58. Sacan O, Yanardag R. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris L. var. cicla*). *Food Chem Toxicol* 2010;48:1275-80.
59. Pyo Y, Lee T, Logendra L, Rosen RT. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris subspecies cicla*) extracts. *Food Chem* 2004;85:19-26.

**How to cite this article**

- Malika Hamdiken, Zine Kechrid. Chard (*Beta vulgaris var. cicla*) extract modulates zinc status, glucose level and antioxidant values in diabetic rats fed zinc deficiency diet. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9(10):297-304.

# *ANNEX*



## 1. Courbes d'étalonnage

### 1.1. Courbe d'étalonnage d'acide gallique

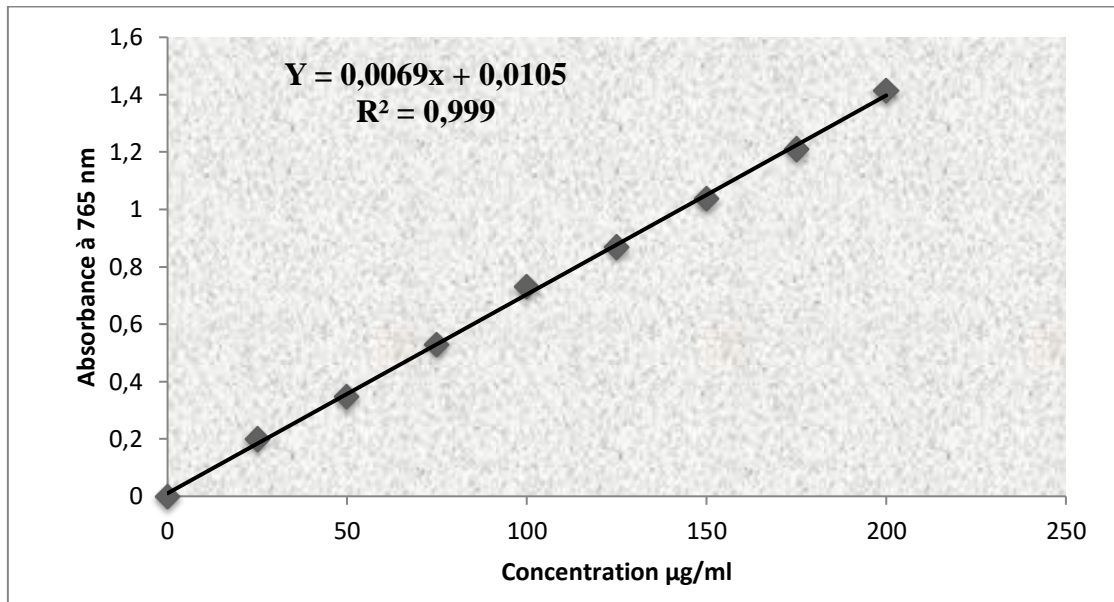


Figure 1. Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

### 1.2. Courbe d'étalonnage de la quercétine

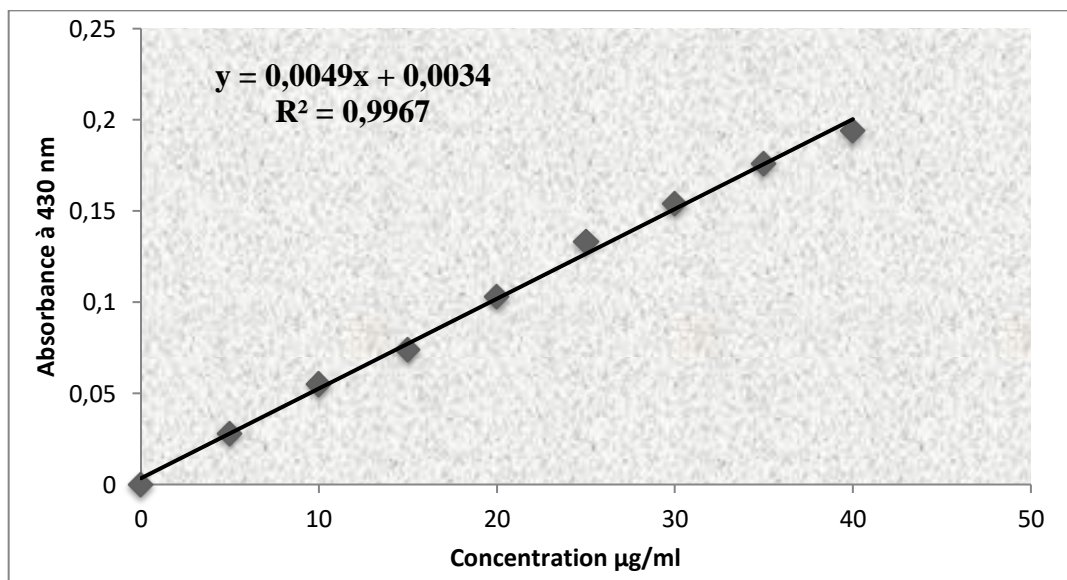
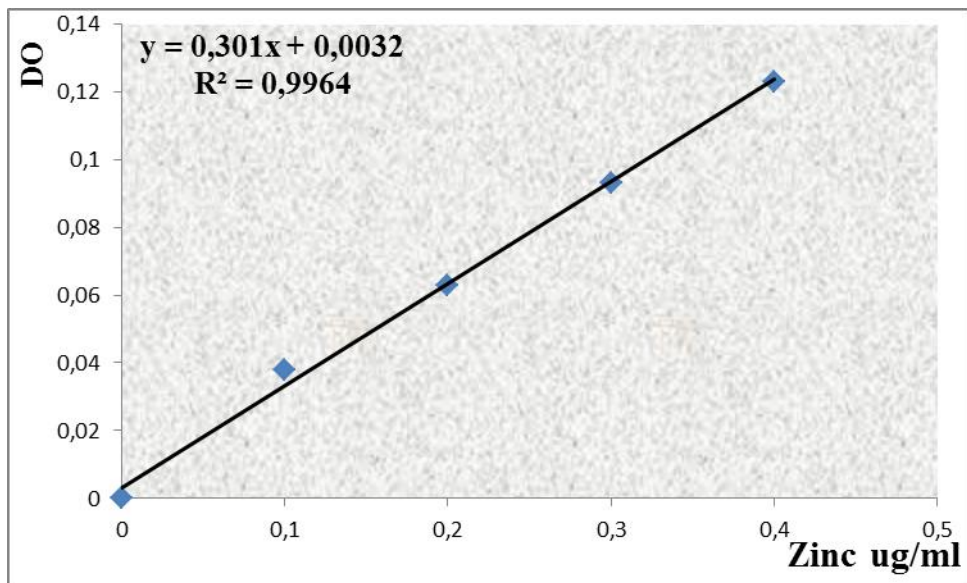


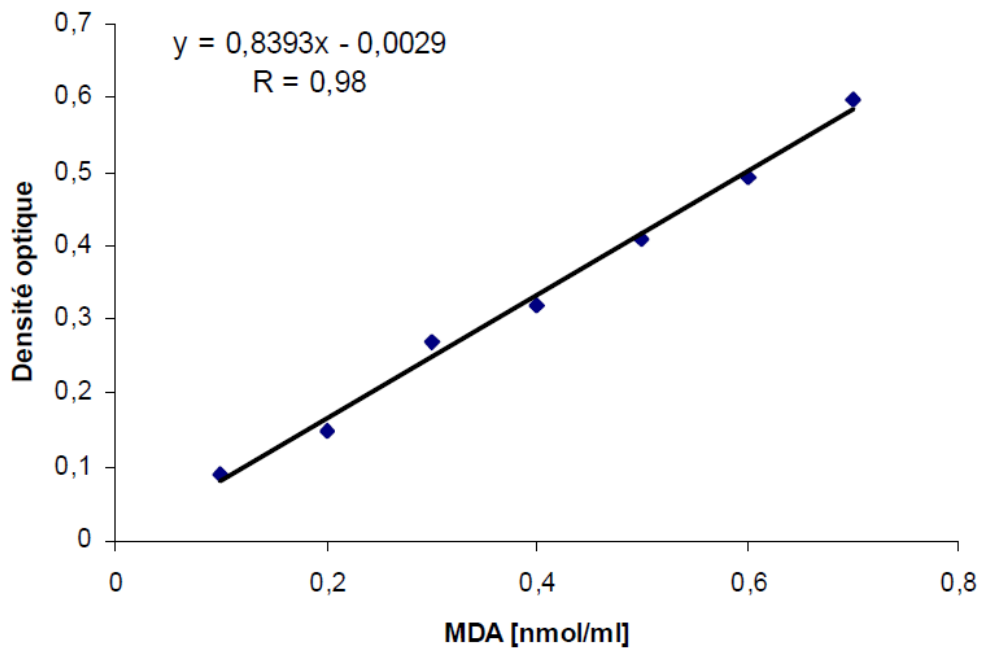
Figure 2. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux

### 1.3. Courbe d'étalonnage du zinc



**Figure3.** Courbe d'étalonnage pour le dosage du zinc.

### 1.4. Courbe d'étalonnage de l'MDA



**Figure 4 .** Courbe d'étalonnage du MDA avec le réactif TBA.