

Université des Frères Mentouri Constantine1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° d'ordre :

N° de série :



Thèse de Doctorat  
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle  
Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière: Biotechnologie, Biologie et Environnement  
Spécialité: **Physio-Toxicologie Cellulaire**

*Présentée et soutenue par :*

**ZAOUI heyem**

**Intitulé :**

**Modulation des altérations physiopathologiques  
hépatiques et rénales par *Thymus algeriensis* chez le  
rat rendu diabétique**

**Membres du jury :**

**16/02/2023**

<b>Président :</b>	Pr. LALAOUI Korichi	Université des Frères Mentouri Constantine1
<b>Directeur de thèse :</b>	Pr. AMMEDAH Souad	Université des Frères Mentouri Constantine1
<b>Examineurs :</b>	Pr. BENCHEIKH Fatima	Université de Ferhat Abbas University Setif 1
	Dr. ZOUAGHI Youcef	Université des Frères Mentouri Constantine1
	Dr. HANFAR Mourad	Université de Mustapha Ben Boulaid Batna 2

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَأَقْرَبَ أَجْسَادًا وَسِرًّا (اللَّهُمَّ اجْعَلْ لِي

وَأَسْوَاقًا وَأَسْوَاقًا وَأَسْوَاقًا)

صدق الله العظيم

الآية 105 - سورة التوبة -

## DEDICACE

*Je dédie ce travail,*

*À mes chers parents Karim et Malika, pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour votre confiance permanente. Pour tous les sacrifices et les encouragements que vous avez consentis pour moi, J'en suis consciente et très reconnaissante. J'espère que cette thèse sera à la hauteur de vos attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous vos efforts. Que Dieu vous garde.*

*À mon cher mari ABDERRAHENE, pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitude.*

*À mon fils M<sup>ed</sup> IYED, aucune dédicace, ne peut valoir pour exprimer toute ma tendresse et mon affection vis-à-vis de lui. Puisse le bon DIEU daigne le faire grandir dans la sagesse, la bonne santé et l'intelligence nécessaire.*

*À mon cher frère unique M<sup>ed</sup> DHIAE EDDINE, tu as toujours offert soutien et réconfort, j'exprime envers toi une profonde admiration, reconnaissance et attachement inconditionnels, sans oublier ma chère nièce CHAHD, que dieu la protège.*

*À mes chères sœurs ROFI et HALA, je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler. Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.*

*À mes chères amies Nesrine et Kenza, pour leurs encouragements, et leurs soutiens.*

**ZAOUI HEYEM**

## **REMERCIEMENTS**

*Premièrement, je remercie Allah, le bon Dieu, qui m'a donné l'ambitieux, le défi, la patience et le courage durant ces longues années d'étude.*

*Je remercie très chaleureusement Madame le Professeur AMEDDAH Souad, ma directrice de thèse durant ces années. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre soutien. Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous m'avaient témoigné tout au long de cette étude. Malgré vos importantes obligations, vous aviez toujours été présente pour recadrer mes recherches dans la bonne direction et ceci été fondamental dans la bonne réalisation de cette thèse. Soyez assurées de ma profonde gratitude.*

*Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et en être les examinateurs de cette thèse : Monsieur le Professeur LALAOUI Korichi, d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*Je tiens à remercier Madame le Professeur BENCHEIKH Fatima, Monsieur le Dr ZOUAGHI Youcef, et Monsieur le Dr HANFAR Mourad d'avoir accepté de juger ce travail et de participer aux jurys de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.*

*Mes sincères remerciements s'adressent plus spécialement à Monsieur le Professeur MANED Ahmed pour son aide concernant les statistiques, pour sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Je vous suis reconnaissante, je ne saurais jamais vous remercier assez.*

*Je tiens à remercier spécialement Monsieur BOULDJEDJ Redouane, pour son aide précieuse, sa compétence scientifique et ces conseils techniques. Merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre gentillesse.*

*Je tiens à remercier très particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à Monsieur BAHRI, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêts qu'il m'a fait vivre durant la réalisation de mon expérimentation avec les rats au niveau de l'animalerie.*

*C'est avec un grand plaisir que je témoigne ici toute ma reconnaissance à Monsieur ERENLER Ramazan, d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire pour la réalisation de mon stage.*

*Merci pour votre accueil chaleureux et votre générosité.*

*Un grand merci s'adresse à ma chère amie la doctorante IBTISSEM, ma chère sœur qui a eu la patience de me supporter durant toutes ces années d'étude, et qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus, je t'aime beaucoup ma chère.*

*Mes remerciements sont aussi dirigés à tous mes enseignants, depuis le primaire, qui ont contribué et influencé dans l'élaboration de ma formation. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire de Biologie et environnement.*

*Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.*

## Résumé

Le présent travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique, anti-dyslipidémique ainsi que le rôle limitant des complications majeures, telles les dysfonctionnements hépatorénaux de la plante *Thymus algeriensis*. Les études *in vitro* (utilisant les modèles : DPPH°, l'ABTS°, le pouvoir réducteur, phosphomolybdène) ainsi que l'évaluation de l'activité anti-péroxydation lipidiques (blanchissement  $\beta$ -carotène/acide linoléique, système  $Fe^{2+}$ /acide ascorbique et thiocyanate ferrique) ont montré que l'extrait *n*-BuOH de *T. algeriensis* (BETA) est associé à une activité antioxydante très intéressante. L'activité antidiabétique a été effectuée *in vitro*, en mesurant l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase et l'activité antiglycation (anti-AGE), et *in vivo*, en utilisant le modèle animal rat-streptozotocine (60 mg/kg). Les rats diabétiques traités par le BETA (200 mg/kg pendant 28 jours) ont manifesté une amélioration significative du poids corporel, une diminution significative de la concentration de glucose dans le sang et des taux de l'HbA1C. Le BETA a amélioré d'une façon significative la fonction rénale (diminution des taux de la créatinine et de l'urée) et la fonction hépatique (diminution des taux des AST et ALT). Le BETA a également diminué d'une façon significative les taux du MDA et a corrigé les paramètres du statut redox hépatique et rénale (SOD, CAT et le système glutathion, GSH, GPX, GST). Les résultats histologiques ont renforcé les résultats biochimiques en indiquant que le co-traitement avec le BETA a pu améliorer les anomalies structurales hépatiques (stéatose) et rénales (altération glomérulaires et tubulaires) induites par la STZ. Il ressort de ces résultats que l'extrait *n*-BuOH de la plante *Thymus algeriensis*, vu sa richesse qualitative et quantitative en polyphénols confirmée par l'analyse chimique (LC-MS), serait doté d'un effet anti-dyslipidémique, antioxydant, antidiabétique et il pourrait jouer un rôle néphroprotecteur et hépato-protecteur.

**Mots clés :** Diabète, Streptozotocine, *Thymus algeriensis*, Hyperglycémie, Dyslipidémie, Stress oxydant.

## Abstract

The present work aims to evaluate the antioxidant, antidiabetic, anti-dyslipidemic activity as well as the limiting role of major complications, such as hepatorenal dysfunctions of the plant *Thymus algeriensis*. *In vitro* studies (using the models: DPPH°, ABTS°, reducing power, phosphomolybdenum) as well as the evaluation of the anti-lipid peroxidation activity (bleaching  $\beta$ -carotene/linoleic acid, Fe<sup>2+</sup> system/ascorbic acid and ferric thiocyanate) showed that the extract *n*-BuOH from *T. algeriensis* (BETA) is associated with very interesting antioxidant activity. The antidiabetic activity was carried out *in vitro*, by measuring the inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase and antiglycation (anti-AGE) activity, and *in vivo*, using the rat-streptozotocin (60 mg/kg) animal model. Diabetic rats treated with BETA (200 mg/kg for 28 days) showed a significant improvement in body weight, a significant decrease in blood glucose concentration and HbA1C levels. BETA significantly improved renal function (decrease in creatinine and urea levels) and liver function (decrease in AST and ALT levels). BETA also significantly decreased MDA levels and corrected hepatic and renal redox status parameters (SOD, CAT and glutathione system, GSH, GPX, GST). The histological results reinforced the biochemical results by indicating that the co-treatment with BETA could improve the hepatic (steatosis) and renal (glomerular and tubular damage) structural abnormalities induced by STZ. These results show that the *n*-BuOH extract of the *Thymus algeriensis* plant, given its qualitative and quantitative richness in polyphenols confirmed by chemical analysis (LC-MS), would have an anti-dyslipidemic, antioxidant, antidiabetic and it could play a nephroprotective and hepatoprotective role.

**Keywords:** Diabetes Streptozotocine, *Thymus algeriensis*, Hyperglycaemia, Dyslipidaemia, Oxidative Stress

## الملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد لداء السكري والمضاد للتراكم الدهني لنبات *Thymus algeriensis* إضافة إلى اختبارها في الحد من بعض مضاعفات داء السكري الرئيسية مثل الخلل الكبدي والكلوي. أظهرت الدراسات المختبرية (باستخدام نماذج  $^{\circ}$ DPPH،  $^{\circ}$ ABTS، الفعل الاختزالي، اختبار فسفوموليبيدينوم ) وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة الدهنية (تبيض  $\beta$ -كاروتين / حمض اللينوليك ، نظام  $Fe^{2+}$  / حمض الأسكوربيك وثيوسيانات الحديدك) أن المستخلص يمتاز بنشاط مضاد للأكسدة معتبر كما أكدت الدراسات المختبرية مدى فعالية هذه النبتة تجاه داء السكري لما يعكسه من أثر تثبيطي لنشاط كل من  $\alpha$ -amylase،  $\alpha$ -glucosidase وكذا ال anti-AGE. كما أثبتت نتائج الدراسات داخل الجسم الحي المستحدثة بنموذج الستربتوزوتوسين (60 ملغم/كغم) أن الفئران المصابة بالسكري المعالجة ب BETA (200 مجم/كجم لمدة 28 يومًا) قد أظهرت تحسنًا كبيرًا في وزن الجسم، وانخفاضًا كبيرًا في تركيز الجلوكوز في الدم ومستويات HbA1c، بالإضافة إلى ذلك ساهم حقن المستخلص BETA بشكل فعال في تحسين وظائف الكلى (انخفاض مستويات الكرياتينين واليوريا) ووظيفة الكبد (انخفاض مستويات AST و ALT). كما أدى كما أدى حقن نفس المستخلص إلى خفض الاجهاد التأكسدي باختزال ال MDA و تحسين النظام الجلوتاثيوني (GST) ، GPX، GSH) وكذا نشاط كل من CAT و SOD. لقد عززت النتائج النسيجية نتائج الدراسات البيوكيميائية من خلال الإشارة إلى أن استخدام المستخلص BETA كان له دور إيجابي في تحسين التشوهات البنيوية للكبد (تشحم الكبد) والكلى (التغيير الكببي والأنبوبي). تظهر هذه النتائج أن مستخلص النبتة *Thymus algeriensis*، نظرًا لثراء البوليفينول النوعي والكمي الذي يؤكد التحليل الكيميائي (LC-MS)، له تأثير مضاد للأكسدة، مضاد للتراكم الدهني، ويمكن أن يلعب دورًا في التقليل من مضاعفات داء السكري

الكلمات المفتاحية: داء السكري، *Thymus algeriensis*، الستربتوزوتوسين، ارتفاع السكر في الدم، التراكم الدهني، الاجهاد التأكسدي.



## Liste des Abréviations

---

<b>12(S)-HETE</b>	12 (S)- acide hydroxyeicosatétraoïque
<b>12(S)-HPETE</b>	12 (S)-acide hydroperoxyeicosatétraoïque
<b>4HNE</b>	4-hydroxynonéal
<b>8-Isp</b>	8-isoprostane
<b>ADA</b>	American diabetes association
<b>ag</b>	atrophie glomérulaire
<b>AGE</b>	Advanced glycation end products
<b>Akt</b>	Protein kinase B
<b>AMPC</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AMPK</b>	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
<b>AOMI</b>	Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
<b>AP-1</b>	Activator protein 1
<b>AR</b>	Aldose réductase
<b>BETA</b>	Butanolic extract of thymus algeriensis
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CEB/Ps</b>	CCAAT enhancer-binding proteins
<b>CML</b>	Carboxyméthyllysine
<b>CTGF</b>	Connective tissue growth factor
<b>CV</b>	Central vein
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DG</b>	Diabète gestationnel
<b>DID</b>	Diabète insulino-dépendant
<b>DNID</b>	Diabète non insulino-dépendant
<b>DPP4</b>	Dipeptidyl peptidase-4
<b>g</b>	glomérule
<b>GFAT</b>	Glutamine fructose-6-phosphate-amidotransférase
<b>GIP</b>	Glucose-dependent insulin releasing polypeptide
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like peptide-1
<b>GLUT</b>	Glucose transporter proteins
<b>GSK-3</b>	Glycogen synthase kinase 3
<b>HbA1 C</b>	Hémoglobine A 1 C
<b>HGPO</b>	Hyperglycémie provoquée par voie orale
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$

## Liste des Abréviations

---

<b>HR</b>	Hémorragie
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule 1
<b>IKK-<math>\beta</math></b>	IkappaB kinase beta
<b>IRE1</b>	Inositol-requiring enzyme 1
<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
<b>IRT</b>	Insuffisance rénale terminale
<b>JNKs</b>	C-Jun N-terminal kinases
<b>MafA</b>	Mammalian homologue of avian
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase
<b>MAS</b>	Macrovesicular steatosis
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>MEF2</b>	Myocyte enhancer factor 2
<b>MGO</b>	Methylglyoxal
<b>MIS</b>	Microvesicular steatosis
<b>MODY</b>	Maturity-onset diabetes of the young
<b>mTOR</b>	mammalian target of rapamycin
<b>N</b>	Nécrose
<b>ND</b>	Néphropathie diabétique
<b>NFE2</b>	Nuclear factor-erythroid 2
<b>Nf-<math>\kappa</math>b</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>p38 MAPK</b>	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator inhibitor-1
<b>Pdx-1</b>	Pancreatic and duodenal homeobox 1
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>P-NPG</b>	P-nitrophenyl glucopyranoside
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	peroxisome proliferator-activated receptors $\gamma$
<b>RAGE</b>	Receptor for advanced glycation end products
<b>RI</b>	Résistance à l'insuline
<b>RT</b>	Renal tubule
<b>SAPK</b>	Stress-activated protein kinase
<b>SDH</b>	Sorbitol déshydrogénase
<b>SIRT-1</b>	Sirtuin 1
<b>SN</b>	Sinusoïdes

## Liste des Abréviations

---

<b>SP-1</b>	Specificity protein 1
<b>SREBP-1c</b>	Sterol regulatory element binding protein-1C
<b>SUR 1</b>	Sulfonylurea receptor 1
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric acid reactive substances
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factors
<b>TZDs</b>	Thiazolidinédiones
<b>UDP-N-acétylglucosamine</b>	Uridine-5-diphosphate-Nacétylglucosamine

## Liste des figures

Figure	Page
Figure 1.1 : Etapes de la synthèse de l'insuline	06
Figure 1.2 : Rôles physiologiques de l'insuline	08
Figure 1.3 : Hépatostéatose et insulino-résistance	16
Figure 1.4 : Mécanismes physiopathologiques de la ND	17
Figure 1.5 : Les mécanismes et les sites d'action des médicaments antidiabétiques.	19
Figure 2.1: Diabète et stress oxydant	22
Figure 2.2: Mécanisme de l'auto oxydation du glucose	23
Figure 2.3: Voie des polyols au cours du diabète	24
Figure 2.4: Voie de la PKC dans le cadre de la pathologie diabétique	25
Figure 2.5 : Les voies de formation des AGEs	26
Figure 2.6: L'activation de la voie des hexosamines	28
Figure 2.7: Les réactions enzymatiques qui produisent les ERO lors d'une hyperglycémie	28
Figure 3.1: Principaux mécanismes antidiabétiques des plantes médicinales	40
Figure 3.2: L'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	49
Figure 4.1: Organigramme schématique réalisé sur les parties aériennes de <i>Thymus algeriensis</i>	51
Figure 4.2: Réaction de test DPPH	55
Figure 4.3: Réaction d'un milieu biologique avec l'acide thiobarbiturique (TBA)....	68
Figure 4.4: Interaction entre le DTNB et le GSH	70
Figure 5.1 : Le profil LC-MS/MS de l'extrait BETA	74
Figure 5.2 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH° des antioxydants de références et de l'extrait BETA	75
Figure 5.3 : La capacité antioxydante totale de l'extrait BETA et des antioxydants de référence	75
Figure 5.4 : Effet du pouvoir réducteur de BETA et standards	76
Figure 5.5: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS•+ de l'extrait BETA et les antioxydants de référence	77
Figure 5.6 : L'effet protecteur de BETA (200mg/kg) sur la fonction rénale chez les rats rendus diabétiques par la STZ	83
Figure 5.7: L'effet protecteur de BETA (200mg/kg) sur la fonction hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ	84

## Liste des figures

---

Figure 5.8: L'effet de BETA sur le taux de l' MDA hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ	<b>86</b>
Figure 5.9: L'effet de BETA sur le taux de l' MDA rénal chez les rats rendus diabétiques par la STZ	<b>86</b>
Figure 5.10: L'effet de BETA sur les activités SOD, CAT hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ	<b>87</b>
Figure 5.11: L'effet de BETA sur les activités SOD, CAT rénale chez les rats rendus diabétique par la STZ	<b>88</b>
Figure 5.12: L'effet de BETA sur le système GSH, GPx, et GST hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ	<b>89</b>
Figure 5.13: L'effet de BETA sur le système GSH, GPx, et GST rénal chez le rat rendus diabétiques par la STZ	<b>89</b>
Figure 5.14: Micrographe de l'examen histopathologique hépatique	<b>90</b>
Figure 5.15: Photomicrographie de l'histopathologie du cortex rénale	<b>92</b>

## Liste des tableaux

Tableau	page
Tableau 1.1 : Types du diabète moins fréquents	11
Tableau 1.2. Mécanismes de la dyslipidémie diabétique	12-13
Tableau 1.3 : Les macro-angiopathies et les micro-angiopathie diabétiques	14
Tableau 2.1 : Principaux mécanismes moléculaires par lesquels le stress oxydatif induit une résistance à l'insuline	33-34
Tableau 3.1: Localisation des principales espèces du genre <i>Thymus</i> en Algérie.....	42
Tableau 3.2: Composition chimique de l'huile essentielle de différentes espèces de <i>Thymus</i>	44
Tableau 3.3: Propriétés du thymol et du carvacrol	45
Tableau 3.4: Activité antioxydante de quelques espèces du genre <i>Thymus</i>	46-47
Tableau 4.1: Classification de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	51
Tableau 4.2: Les valeurs LOD et LOQ des composés de la méthode LC-MS/MS	54
Tableau 5.1 : Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes	72
Tableau 5.2: L'analyse LC-MS des composés phénoliques de BETA	73
Tableau 5.3: Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait BETA	78
Tableau 5.4: Pourcentage de l'effet inhibiteur de l'activité $\alpha$ -amylase et de l'activité $\alpha$ -glucosidase de l'extrait BETA	79
Tableau 5.5: L'activité antiglycation de l'extrait BETA	80
Tableau 5.6: Effet du BETA sur la tolérance du glucose	81
Tableau 5.7: Effet du BETA sur les paramètres biochimiques du diabète induit chez le rat par la STZ	82
Tableau 5.8: Effet du BETA sur le profile lipidique chez les rats rendus diabétiques par la STZ	85

# Table des matières

---

Titre	Page
Liste des abréviations	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	vi
Introduction générale	01
Première partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 01 diabète sucré	
1. Le diabète sucré	04
1.1. Pancréas et sécrétion de l'insuline	04
1.1.1. L'insuline: contrôleur métabolique	05
1.1.2. Mécanisme d'action de l'insuline	06
1.1.3. Rôles physiologiques de l'insuline	07
1.1.3.1. Régulation de la fonction hépatique	07
1.1.3.2. Régulation du métabolisme lipidique	08
1.1.3.3. Régulation de la fonction du muscle squelettique	08
1.2. Classification du diabète	09
1.2.1. Diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant DID)	09
1.2.2. Diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant DNID)	10
1.2.3. Diabète gestationnel (DG)	10
1.2.4. Autres types de diabète	11
1.3. Diabète et dyslipidémie	12
1.4. Complications chroniques du diabète	13
1.4.1. Hépatostéatose et diabète	15
1.4.1.1. Hépatostéatose et insulino-résistance	15
1.4.1.2. Hépatostéatose et stress du réticulum endoplasmique	16
1.4.2. Néphropathie diabétique (ND)	17
1.5. Traitement pharmacologique du diabète	18
1.5.1. Les biguanides	19
1.5.2. Les médicaments augmentant la sécrétion d'insuline (ou insulinosécréteurs)	19
1.5.3. Les thiazolidinédiones (TZDs) (ou glitazones)	20
1.5.4. Les Inhibiteurs des $\alpha$ -glucosidases	20
1.5.5. Les analogues du GLP-1 et inhibiteurs de la DPP-4	20

## Table des matières

---

### Chapitre 02 Diabète et stress oxydant

2. Diabète et stress oxydant	21
2.1. Le stress oxydant et l'hyperglycémie	21
2.1.1. Voies de production des ERO lors de l'hyperglycémie	21
2.1.1.1. Auto-oxydation du glucose ou glycoxydation	22
2.1.1.2. Voie des polyols	23
2.1.1.3. Voie de la Protéine kinase C (PKC)	25
2.1.1.4. Production de produits terminaux de glycation (AGEs)	26
2.1.1.5. Voie des hexosamines	27
2.1.2. Réactions enzymatiques générant les ERO lors de l'hyperglycémie	28
2.1.2.1. Cyclooxygénases (COX)	29
2.1.2.2. Cytochrome P450	29
2.1.2.3. Lipooxygénase (LOX)	30
2.1.2.4. Myéloperoxydase (MPO)	30
2.1.2.5. NADPH oxydase (NOX)	30
2.1.2.6. Xanthine oxydase (XOX)	31
2.1.3. L'hyperglycémie et la peroxydation lipidique	31
2.2. Le stress oxydant et l'hyperlipidémie	32
2.3. Le stress oxydant et la résistance à l'insuline	33

### Chapitre 03 Phytothérapie et traitement du diabète

3. Phytothérapie et traitement du diabète	35
3.1. La phytothérapie	35
3.2. La composition chimique des plantes médicinales	35
3.2.1. Les terpénoïdes	36
3.2.2. Les alcaloïdes	36
3.2.3. Les Composés phénoliques	36
3.3. Plantes médicinales et traitement du diabète	37
3.4. Mode d'action des plantes médicinales antidiabétique	38
3.4.1. Augmentation de la sécrétion d'insuline	38
3.4.2. Inhibition de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase	38
3.4.3. Augmentation de la sécrétion de glucagon-like peptide-1 (GLP-1)	39
3.4.4. Inhibition de la formation des produits de glycation avancée (AGE)	39



## Table des matières

---

3.4.5. Augmentation et translocation du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4)	39
3.4.6. Réduction de la résistance à l'insuline	40
3.5. Le genre <i>Thymus</i>	41
3.5.1. Description botanique	41
3.5.2. Origine et répartition géographique du genre <i>Thymus</i>	41
3.5.3. Usage et propriétés du genre <i>Thymus</i>	43
3.5.4. Composition chimique du genre <i>Thymus</i>	43
3.5.5. Activité anti-inflammatoire	45
3.5.6. Activité antioxydante	46
3.5.7. Activité antidiabétique	47
3.5.8. L'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	48
3.5.8.1. Caractérisation botanique	48
3.5.8.2. Répartition géographique et utilisation	49

### Deuxième partie : PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

#### Chapitre 04 Matériel et méthodes

4. Matériel et méthodes	50
4.1. Matériel végétal et screening phytochimique	50
4.1.1. Récolte du <i>Thymus algeriensis</i>	50
4.1.2. Préparation de l'extrait n-BuOH	50
4.1.3. Dosage des polyphénols totaux	52
4.1.4. Dosage des flavonoïdes totaux	52
4.1.5. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	53
4.2. Screening biologique	55
4.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	55
4.2.1.1. Effet anti-radicalaire par le test au DPPH°	55
4.2.1.2. Capacité antioxydante totale (CAT)	56
4.2.1.3. Le pouvoir réducteur	57
4.2.1.4. Réduction du radical- cation ABTS°	57
4.2.2. Peroxydation lipidique (LPO) <i>in vitro</i>	58
4.2.2.1. Test de blanchissement $\beta$ -carotène/acide linoléique	58
4.2.2.2. Inhibition de la LPO induite par le système Fe <sup>2+</sup> /acide ascorbique	59

## Table des matières

---

4.2.2.3. Inhibition de la LPO par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC)	59
4.3. Évaluation de l'activité antidiabétique <i>in vitro</i>	60
4.3.1. Test d'inhibition de l'activité alpha- amylase	60
4.3.2. Test d'inhibition de l'activité alpha- glucosidase	60
4.4. Évaluation de l'activité antiglycation (anti-AGE) <i>in vitro</i>	61
4.4.1. Dosage <i>in vitro</i> du BSA-glucose	61
4.4.2. Modèle <i>in vitro</i> de BSA-méthylglyoxal (MGO)	61
4.4.3. Glycation anti-hémoglobine	61
4.5. Évaluation de la toxicité aigue	61
4.6.Évaluation de l'activité antioxydante, hépatoprotective et néphroprotective chez le rat rendu diabétique	62
4.6.1. Animaux et protocole d'expérimentation	62
4.6.2. Induction du diabète	62
4.6.3. Tolérance au glucose	64
4.6.4. Glycémie et profil lipidique	65
4.6.4.1. Dosage du glucose	65
4.6.4.2. Dosage du cholestérol total	65
4.6.4.3. Dosage des triglycérides	66
4.6.5. Marqueurs de la fonction rénale	66
4.6.5.1. Dosage de l'urée	66
4.6.5.2. Dosage de la créatinine	67
4.6.6. Marqueurs hépatiques	67
4.6.6.1. Dosage de l'AST	67
4.6.6.2. Dosage de l'ALT	67
4.7. Évaluation du statut oxydant cytosolique hépatique et rénale	68
4.7.1. La peroxydation lipidique	68
4.7.2. Dosage de la catalase (CAT) cytosolique	69
4.7.3. Dosage du superoxyde dismutase (SOD) cytosolique	69
4.7.4. Dosage du glutathion réduit (GSH) cytosolique	69
4.7.5. Dosage du glutathion-S-transférase (GST) cytosolique	70
4.7.6. Dosage du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique	71
4.8. Étude histologique	71
4.9. Analyses statistiques	71

# Table des matières

---

## Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

### Chapitre 05 Résultats

5. Résultats	72
5.1. Screening phytochimique	72
5.1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes	72
5.1.2. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	72
5.2. Screening biologique	74
5.2.1. Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> de l'extrait BETA	74
5.2.1.1. Effet scavenger du radical DPPH° de l'extrait BETA	74
5.2.1.2. Capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait BETA	75
5.2.1.3. Pouvoir réducteur de l'extrait BETA	76
5.2.1.4. Réduction du radical- cation ABTS° de l'extrait BETA	76
5.2.2. Inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait BETA	77
5.3. Évaluation de l'activité antidiabétique <i>in vitro</i> de l'extrait BETA	78
5.3.1. Inhibition de l'activité alpha- amylase et de l'activité alpha- glucosidase	78
5.3.2. Évaluation de l'activité antiglycation (anti-AGE) <i>in vitro</i> de l'extrait BETA	79
5.4. Toxicité aiguë de l'extrait BETA	80
5.5. Evaluation de l'activité antidiabétique <i>in vivo</i>	80
5.5.1. Tolérance au glucose de l'extrait BETA	80
5.5.2. Effet anti-hyperglycémiant de l'extrait BETA	81
5.5.3. Effet sur le poids relatif des organes et le poids corporel des rats	82
5.5.4. Effet sur les paramètres biochimiques	83
5.5.4.1. Marqueurs de la fonction rénale	83
5.5.4.2. Marqueurs de la fonction hépatique	84
5.5.4.3. Profil lipidique	84
5.5.5. Évaluation du statut oxydant cytosolique hépatique et rénale	85
5.5.5.1. La peroxydation lipidique	85
5.5.6. Activité antioxydante de la BETA (CAT et SOD hépatique et rénale)	87
5.5.7. Activité antioxydante de l'extrait BETA sur le système glutathion hépatique et rénale	88

## Table des matières

---

5.5.8. Étude histologique	90
Chapitre 06 discussions	
6.Discussion	93
Conclusion et perspectives	110
Références bibliographiques	



# **INTRODUCTION GENERALE**



### Introduction générale

Le diabète sucré est l'une des maladies les plus répandues dans le monde, il survient lorsque le taux du glucose est élevé dans le sang, cela est due à une carence relative ou absolue de la sécrétion d'insuline (diabète insulino-dépendant) ou à une insulino-résistance des tissus cibles (diabète non insulino-dépendant). Cette maladie métabolique connaît une expansion très significative, selon les dernières estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et de la fédération internationale du diabète (IDF), 463 millions d'adultes (un adulte sur 11) âgés de 20 à 79 ans souffraient de diabète sucré dans le monde, et ce nombre devrait atteindre 578 millions d'ici 2030 et 700 millions d'ici 2045 (**Liu et al., 2021**).

Le diabète est toujours associé à dyslipidémie, l'une des complications les plus communes observée chez environ 40% des patients diabétiques. En outre, l'hyperglycémie observée au cours du diabète peut causer un état de stress oxydant et vice versa, le stress oxydant peut être à l'origine du diabète causant ainsi ses majeurs complications (**Klusic et al., 2018**).

Le foie joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du glucose, cette dernière peut être altérée à cause du diabète par différents mécanismes y compris la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose. En plus, l'hyperglycémie chronique peut affecter les reins en causant des lésions à différents niveaux structuraux notamment les cellules endothéliales, les cellules mésangiales, et les podocytes, provoquant au final une néphropathie diabétique (**Atia et al., 2020**). Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à l'étude des complications hépatorénales associées au diabète sucré.

Actuellement, diverses matières synthétiques ont été utilisées pour le traitement du diabète et ces complications. Néanmoins, les preuves médicales actuelles ont rapporté que la plupart des médicaments antidiabétiques induisent de nombreux effets indésirables qui menacent la santé des patients diabétiques. Par exemple, la metformine, qui est recommandée comme thérapie de première ligne pour le traitement du diabète, peut provoquer des effets secondaires tels que les troubles gastro-intestinaux lors de la prise à long terme. Cependant, de nouveaux agents thérapeutiques, relativement non toxiques, seraient nécessaires pour traiter l'hyperglycémie, et par conséquent, réduire le risque des complications liées au diabète (**Luo et al., 2021**).

Depuis toujours, les propriétés curatives des herbes médicinales ont été appliquées pour l'intervention thérapeutique depuis l'aube de l'histoire humaine. Aujourd'hui, il a été rapporté que des centaines de plantes exercent des effets positifs pour le traitement du diabète en réduisant la glycémie et en diminuant l'apparition des complications causées par l'hyperglycémie (**Camaya et al., 2022**).

Selon l'OMS, environ 80 % des populations africaines utilisent la médecine traditionnelle pour leurs soins de santé primaires. En raison de son emplacement dans un climat tropical et subtropical, l'Afrique est connue pour sa richesse en diversité biologique, il dispose d'une énorme ressource végétale (40 000 à 45 000 espèces de plantes), dont 5 000 sont des espèces médicinales (**Khumalo et al., 2022**).

La variabilité des conditions écologiques et climatiques en Algérie a favorisé la montée d'une importante biodiversité végétale représentée par 3183 espèces qui constitue une occasion considérable pour l'exploration de diverses molécules actives d'intérêts biologiques (**Mechaala et al., 2021**).

Parmi les familles botaniques les plus représentées la famille des Lamiacées, qui constitue une source potentielle des agents thérapeutiques pour la gestion de troubles métaboliques, y compris le diabète. Cette famille est caractérisée par la haute teneur en composés aromatiques et huiles essentielles. Les espèces de Lamiacées ont été utilisées comme agents antidiabétiques depuis des temps immémoriaux pour leurs capacités curatives au sein de la médecine populaire (**Etsassala et al., 2021**).

Le genre *Thymus*, membre de la famille des Lamiacées, est caractérisé par de nombreuses propriétés ethnomédicinales telles que les activités antispasmodiques, antimicrobiennes, antivirales, anti-inflammatoires, et antioxydantes (**Afonso et al., 2018**). Ces propriétés dépendent fortement de leurs compositions chimiques et sont principalement attribuées à leur richesse en polyphénols et flavonoïdes. Cependant, il a été rapporté qu'il existe une différence entre les niveaux des composés phénoliques des différentes espèces, en raison des conditions environnementales, telles que l'origine géographique (**Li et al., 2019**).

Parmi les plantes les plus abondantes de ce genre, on cite *Thymus algeriensis*, qui est connue sous le nom arabe de « Zaatar », et utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses pathologies.

Le présent travail s'intéresse à l'évaluation des activités biologiques de ce végétal par la réalisation d'une série d'essais effectués sur le rat Wistar albinos rendu diabétique par la streptozotocine comme modèle du diabète expérimental.

Pour cela nous nous sommes fixés sur les objectifs suivants :

- ❖ Étude de la caractérisation des principaux constituants de l'extrait n-BuOH de la plante *Thymus algeriensis* (BETA), en utilisant l'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).
- ❖ Étude antioxydante de BETA, en utilisant plusieurs modèles *in vitro*.
- ❖ Étude de l'effet de BETA sur les marqueurs du diabète tels que la glycémie, l'hémoglobine glyquée, ainsi que l'évaluation *in vitro* pour leur activité inhibitrice vis-à-vis de l' $\alpha$  amylase et des  $\alpha$  glucosidases intestinales, la tolérance orale au glucose, et l'activité antiglycation (anti-AGE).
- ❖ Évaluation du profil lipidique afin de vérifier l'effet anti-dyslipidémique de BETA.
- ❖ Évaluation des marqueurs des complications hépatiques et rénales.
- ❖ Évaluation du statut redox hépatique et rénale
- ❖ Étude histologique des deux organes vitaux le foie et les reins.

Les résultats sont précédés d'une revue bibliographique concernant le diabète et ses complications, la relation entre le stress oxydant et l'hyperglycémie provoquée lors du diabète sucré, et comme dernière partie l'effet des plantes médicinales dans la régulation de la glycémie, et dans le traitement des complications associées au diabète.



**PREMIERE PARTIE**

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



**CHAPITRE 01**

**Le diabète sucré**



## 1. Le diabète sucré

Le diabète sucré est une maladie métabolique grave menaçant, d'une manière croissante, la santé publique dans le monde. Elle touche environ 4% de la population mondiale et on s'attend à une augmentation de 5,4% en 2045 (**Cho et al., 2018**). Cette pathologie se définit par un état d'une hyperglycémie persistante dans les conditions normales d'alimentation et en l'absence d'affection intercurrente ou de prise médicamenteuse susceptible d'induire une hyperglycémie transitoire.

Le diagnostic clinique de l'hyperglycémie est réalisé par la mesure de la glycémie plasmatique, mesurée soit à jeun ou au hasard à un moment quelconque de la journée (**Abderrahmani et al., 2018**). Les critères établis par l'OMS sont:

- Une glycémie > 1,26 g/l (7,0 mmol/l) après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises.
- Ou la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associée à une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11,1 mmol/l).
- Ou une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11,1 mmol/l) 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose.
- Ou un taux d' HbA1c (hémoglobine glyquée)  $\geq$  6,5% (11,1 mmol/l) quantifié selon des méthodes étalonnées sur des références internationales. Ce paramètre traduit la glycémie moyenne des trois derniers mois.

Des niveaux intermédiaires d'hyperglycémie (Glycémie à jeun entre 1,1 et 1,25 g/l, HGPO entre 1,4 et 1,99 g/l et HbA1c entre 5.7 et 6.4%) sont aussi observés. Ils définissent un stade d'un pré-diabète qui serait associé à une augmentation du risque de progression vers le diabète de type 2.

Les symptômes du diabète sucré sont caractéristiques et se manifestent par une polyurie, une polydipsie, un amaigrissement, et parfois par une polyphagie et des troubles de la vision. Si aucun traitement n'est administré, la situation peut se développer vers l'acidocétose, l'hyperosmolarité ou l'acidose lactique (**Hur et al., 2021**).

### 1.1. Pancréas et sécrétion de l'insuline

Le pancréas est une glande qui se situe sous le foie, d'aspect lobulé, de forme irrégulière, de consistance ferme et couleur rose-jaunâtre, il est profondément enchâssé dans

l'abdomen, en avant de l'aorte abdominale et du rein gauche. Il s'étend de la deuxième portion du duodénum jusqu'à la rate. Son poids oscille chez l'adulte entre 60 et 125 g, sa longueur varie de 15 à 20 cm, et sa hauteur maximale est de 6 à 7 cm.

C'est une glande double, elle exerce deux fonctions distinctes, exocrines et endocrines. Sa fonction exocrine (pancréas exocrine) consiste en la production par les cellules acinaires d'enzymes digestives qui dégradent les aliments, alors que la fonction endocrine (pancréas endocrine), qui est vitale pour l'organisme, consiste en la sécrétion d'hormones assurant le maintien de la glycémie (**Fischer *et al.*, 2021**).

Grâce à la microscopie électronique et à l'immunohistochimie, la coloration a permis d'identifier divers types de cellules possédant chacune une organisation fonctionnelle très particulière:

- les cellules B ou  $\beta$  (70 %) en position centrale sécrétant l'insuline.
- les cellules A ou  $\alpha$  (20 %) plus volumineuses et sécrètent le glucagon, dont la plus grande partie se trouve en périphérie.
- les cellules D ou  $\delta$  (10 %) responsables de la synthèse de somatostatine et contractant des connexions à la fois avec les cellules à insuline et les cellules à glucagon.
- les cellules F ou PP (1 à 2 %) engagées en périphériques, elles stimulent les sécrétions pancréatiques exocrines et les enzymes gastriques, et diminuent les sécrétions biliaires et la motricité intestinale (**Amar *et al.*, 2019**).

### 1.1.1. L'insuline: contrôleur métabolique

L'insuline est une hormone protéique naturellement présente dans le corps humain, elle est indiquée dans le traitement du diabète de type 1 et parfois prescrite en cas de diabète de type 2. Cette hormone polypeptidique est formée, après élimination du peptide C par hydrolyse, de deux chaînes de 21 et 30 acides aminés, reliées par deux ponts disulfures, et un pont disulfure supplémentaire est présent à l'intérieur de la chaîne A. Elle est sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas et exerce un effet hypoglycémiant (**Bouglé et Annane, 2009**). Le précurseur de l'insuline (prépro-insuline), est synthétisé au niveau des ribosomes, puis clivé en pro-insuline dans le réticulum endoplasmique des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ceci est ensuite transporté dans les appareils de Golgi où il est stocké dans des vésicules de sécrétion les granules b (**Fig 1.1**). Dans ces granules, l'insuline

mature est formée par élimination du peptide C et conservée jusqu'à son excrétion sous forme d'hexamère contenant du zinc (Bouglé et Annane, 2009).

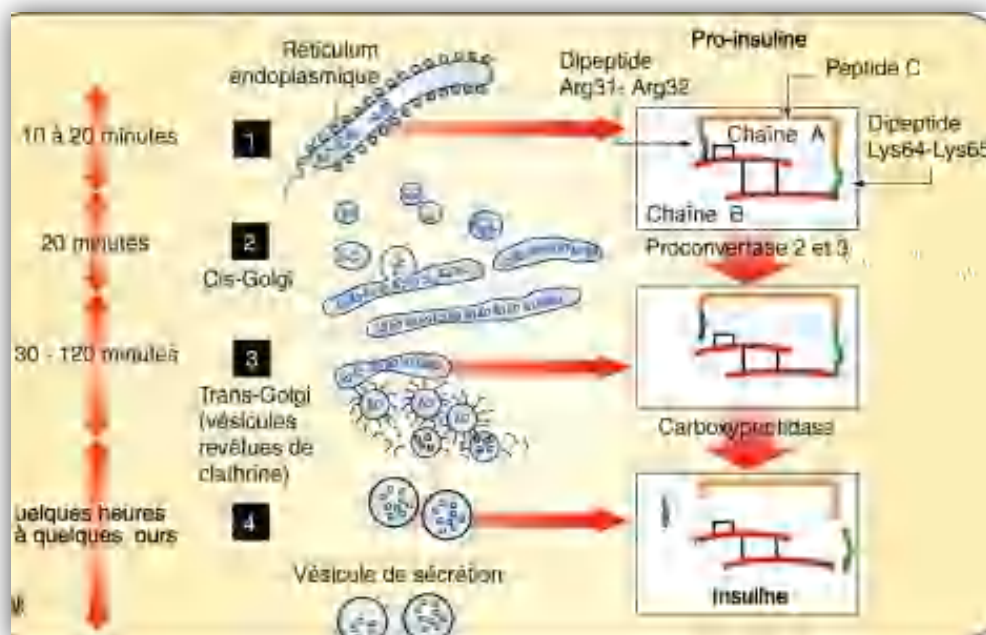


Figure 1.1 : Etapes de la synthèse de l'insuline (Magnan et Ktorza, 2005).

### 1.1.2. Mécanisme d'action de l'insuline

L'insuline est essentielle pour maintenir l'homéostasie du glucose et réguler le métabolisme des lipides, des protéides et des hydrates de carbone. Cette hormone exerce un nombre important d'effets différents grâce à la liaison à ses récepteurs spécifiques (Foretz *et al.*, 1999).

L'insuline est libérée après l'ingestion de glucose, ce processus nécessite à la fois l'absorption intracellulaire et la dégradation métabolique de glucose ingéré. Au niveau cellulaire, l'insuline a une action anabolisante en favorisant la métabolisation et le transport membranaire du glucose dans le foie, les muscles et les tissus adipeux. Elle fait migrer les transporteurs de glucose, intra cytoplasmique et donc inactifs, vers la membrane plasmique dans laquelle ils s'incorporent pour assurer la pénétration du glucose. Elle pourrait de plus activer les transporteurs du glucose dans la membrane. Ces transporteurs sont le GLUT1 et GLUT3 qui sont les principaux transporteurs, alors que le GLUT2 est considéré comme un transporteur majeur de glucose chez les rongeurs (Pilkis et Park, 1974).

Les incrétines, tels que le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le glucose-dependent insulin releasing polypeptide (GIP) sécrétées par l'intestin, jouent un rôle dans la régulation de l'homéostasie du glucose en interaction avec l'insuline. Le GIP et le GLP-1 exercent leurs effets insulinothropes en se liant aux récepteurs du GIP et aux récepteurs du GLP-1 à la surface des cellules  $\beta$ , respectivement, en activant l'adénylyl cyclase, ce qui entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ce dernier à son tour potentialise la sécrétion d'insuline en activant la signalisation médiée par la protéine kinase dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Miki *et al.*, 2005).

### 1.1.3. Rôles physiologiques de l'insuline

#### 1.1.3.1. Régulation de la fonction hépatique

L'homéostasie du glucose est étroitement régulée pour répondre aux besoins énergétiques des organes vitaux. Le foie joue un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie du glucose en contrôlant diverses voies du métabolisme du glucose, y compris la glycogénèse, la glycogénolyse, la glycolyse et la gluconéogenèse (Han *et al.*, 2016).

Simultanément, les taux élevés de glycémie reviennent à l'énorme par l'intervention de la glycogénèse en raison de l'absorption accélérée du glucose par les tissus adipeux et le muscle squelettique. L'insuline peut produire du glucose pour les réactions cataboliques par un processus appelé gluconéogenèse, qui agit directement sur le foie mais indirectement sur d'autres tissus. Par le biais de la PI3K/phosphorylation impliquée dans la voie des Akt/IRS-1, cette hormone hypoglycémiante peut inhiber la gluconéogenèse hépatique tout en améliorant la synthèse de glycogène (Barthel et Dieter, 2003).

Donc, l'insuline peut agir directement sur le foie en se liant à ses récepteurs hépatiques et par la suite active ses voies de signalisation dans le foie, ceci a été démontré à la fois *in vitro* et dans des modèles expérimentaux *in vivo*. En revanche, l'action indirecte de l'insuline est principalement régulée par la diminution de la sécrétion pancréatique de glucagon, l'inhibition de la lipolyse, et l'influence de la signalisation hypothalamique globale de l'insuline, ce qui affecte finalement la production hépatique de glucose (Fisher et Kahn, 2003).

### 1.1.3.2. Régulation du métabolisme lipidique

L'insuline joue un rôle central dans la régulation du métabolisme des lipides, en agissant à différents sites d'action. Au niveau du tissu adipeux, l'insuline inhibe la lipolyse via une inhibition de la lipase, conduisant à réduire le flux d'acides gras libres dans la circulation. En plus, elle inhibe la production de VLDL par le foie. L'insuline est un puissant activateur de la lipoprotéine lipase, favorisant le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. En effet, cette hormone hypoglycémiante stimule l'activité des récepteurs LDL et accélère la dégradation des LDL (Vergès, 2001).

### 1.1.3.3. Régulation de la fonction du muscle squelettique

Après la consommation du glucose, la concentration plasmatique de celui-ci module la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques, ce qui crée une hyperinsulinémie. Cela conduit à une diminution de la concentration plasmatique en acides gras libres tout en diminuant l'utilisation des lipides. En même temps, l'insuline stimule le muscle squelettique à absorber le glucose en activant plusieurs enzymes. Dans le contrôle des muscles squelettiques, l'absorption de glucose et le métabolisme énergétique augmentent le GLUT4. L'insuline contrôle également la quantité d'acides aminés ramifiés, d'acides gras non estérifiés, de glucose plasmatique et de la production mitochondrial d'ATP (Fig 1.2) (Karakelides *et al.*, 2007).

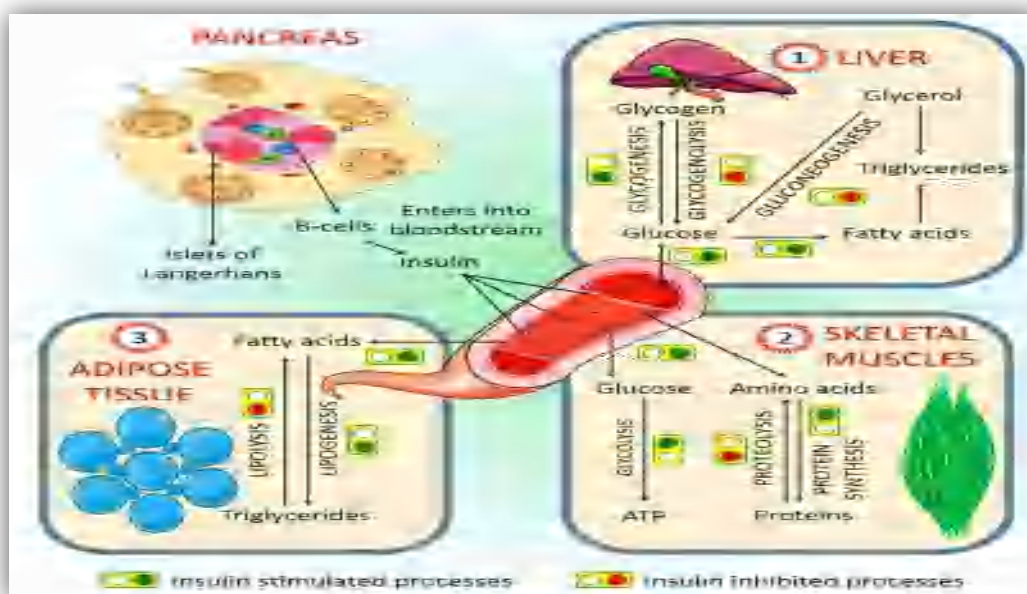


Figure1.2 : Rôles physiologiques de l'insuline (Rahman *et al.*, 2021).

## 1.2. Classification du diabète

Le diabète sucré est un trouble métabolique qui se caractérise par une hyperglycémie et une intolérance au glucose, qui est associée à une altération de la sécrétion de l'insuline, ou à un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  (Ohiagu *et al.*, 2021). Il est classique de distinguer deux grandes variétés de diabète: le diabète de type 1 et le diabète de type 2. À ces deux grandes variétés il faut ajouter d'autres types de diabète qui répondent à des situations spécifiques :

- Le diabète gestationnel découvert lors d'une grossesse.
- Des types du diabète relevant des causes diverses: déficits génétiques soit de la fonction bêta-lingerhansienne soit de la sensibilité à l'insuline, maladies du pancréas exocrine, diabètes induits par des traitements médicamenteux (ADA, 2021).

### 1.2.1. Diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant DID)

Le diabète de Type 1 est provoqué par une réaction auto-immune au cours de laquelle le système immunitaire de l'organisme attaque les cellules des îlots du pancréas qui produisent l'insuline. L'organisme devient alors incapable de produire l'insuline dont il a besoin, ou alors en quantité très faible, avec pour conséquence une déficience relative ou absolue en insuline (You et Henneberg, 2016). L'évaluation de la glycémie suppose une destruction de 80 à 90 cellules  $\beta$ , cette destruction résulte de la production d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes des cellules  $\beta$ . Ce type de diabète apparaît chez des sujets génétiquement prédisposés, c'est-à-dire possédant des gènes de susceptibilité liés au système d'histocompatibilité HLA (ADA, 2021).

En présence du glucose, et avec l'incapacité des cellules pancréatiques  $\beta$  à sécréter l'insuline, il en résulte un défaut de transduction du signal suivi par un défaut de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4), ce qui conduit finalement à une difficulté de captation du glucose par les cellules musculaire lisses, les adipocytes ou le foie. Cela va provoquer une hyperglycémie résultant d'une accumulation de glucose dans le sang (Boyer, 2016).



### 1.2.2. Diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant DNID)

Le diabète de type 2 est la forme la plus répandue, représentant près de 90 % des formes diagnostiquées de diabète. Dans cette forme de diabète, l'hyperglycémie est le résultat de deux anomalies physiopathologiques majeures : déficit progressive de l'insulino-sécrétion et de l'insulino-résistance (**DeFronzo, 2015**).

#### ➤ L'insulino-sécrétion

Après atteinte des cellules  $\beta$  pancréatiques, un déficit de l'insulino-sécrétion est observé. Ces cellules, qui permettent la sécrétion d'insuline, ont perdu en moyenne 50% de leur masse au moment du diagnostic du diabète, cette destruction des cellules serait liée à des phénomènes de glucotoxicité et de lipotoxicité. Ainsi, l'hyperglycémie étant toxique pour les cellules  $\beta$ , il existe un cercle vicieux : l'hyperglycémie majore la destruction des cellules, ce qui diminue l'insulinémie (**Guillausseau et Laloï-Michelin, 2003**).

#### ➤ L'insulino-résistance

La résistance à l'insuline se définit comme la détérioration de la réponse des tissus-cibles de l'insuline à son action, faisant apparaître la nécessité d'un excès d'insuline (hyperinsulinémie) pour obtenir une réponse à l'hormone quantitativement normale. Bien que l'insuline exerce de nombreuses actions sur les métabolismes glucidique, lipidique et protéique, la notion d'insulinorésistance repose essentiellement sur son incapacité à réguler normalement le métabolisme du glucose (**Scheen, 2005**).

### 1.2.3. Diabète gestationnel (DG)

Le diabète gestationnel est une complication grave de la grossesse, dans laquelle les femmes sans diabète précédemment diagnostiqué développent une hyperglycémie chronique pendant la gestation. Les facteurs de risque liés à ce type de diabète sont les antécédents familiaux du diabète, un âge maternel supérieur à 30 ans, une obésité, une hypertension, une évolution anormale de la grossesse ou même d'avoir un bébé de poids supérieur à 4 kg (**Gohi et al., 2017**).

La physiopathologie de ce type de diabète est similaire à celle du diabète de type 2 et fait intervenir une majoration de la résistance à l'insuline et par la suite un déficit de la fonction pancréatique  $\beta$ . La réduction de l'absorption de glucose stimulée par l'insuline contribue en outre à l'hyperglycémie, en surchargeant les cellules  $\beta$ , qui doivent produire de

l'insuline en réponse. La contribution directe du glucose à la défaillance des cellules  $\beta$  est décrite comme la glucotoxicité. Ainsi, une fois que le dysfonctionnement des cellules  $\beta$  commence, un état d'hyperglycémie, et de résistance à l'insuline est déclenché (**Plows *et al.*, 2018**).

#### 1.2.4. Autres types de diabète

Il existe principalement deux types du diabète: 1 et 2, mis à part ces deux derniers, il y a également d'autres types qui sont moins fréquents (**Tab 1.1**).

**Tableau 1.1** : Types du diabète moins fréquents.

	<b>Diabète MODY</b>	<b>Diabète mitochondrial</b>
<b>Diabètes liés à un dysfonctionnement de cellule <math>\beta</math> d'origine génétique</b>	C'est un groupe hétérogène de troubles monogéniques d'altération de la fonction des cellules $\beta$ pancréatiques ( <b>Graff <i>et al.</i>, 2021</b> ).	C'est une mutation onctuelle de l'ADN mitochondrial en position 3243 conduisant à un déficit en ATP provoquant une diminution de l'insulino-sécrétion ( <b>Buyschaert, 2014</b> ).
<b>Diabète médicamenteux</b>	Certains nombres de médicaments sont capables de provoquer une intolérance au glucose, par exemple les corticoïdes; oestroprogestatifs combinés; et les diurétiques thiazidiques ( <b>Petrov et Maxim, 2021</b> ).	
<b>Diabètes secondaires</b> Association d'un diabète sucré et d'une autre maladie	<b>Pancréatite chronique</b>	<b>Hémochromatose</b>
	C'est la présence de lésions inflammatoires chroniques responsables d'une destruction du parenchyme pancréatique exocrine puis endocrine aboutissant à une fibrose ( <b>Sharma et Ajay, 2021</b> ).	C'est une pathologie autosomique récessive liée à des mutations de gènes impliqués dans le métabolisme du fer, délétère pour divers organes et pour le métabolisme glucidique par atteinte sélective des cellules bêta ( <b>Anderson et Edouard, 2021</b> ).

### 1.3. Diabète et dyslipidémie

Le diabète est une maladie d'hyperglycémie due à une déficience de l'action de l'insuline, mais les lipides sériques sont également affectés par l'insuline, cette altération métabolique est connue sous le nom de dyslipidémie et est fréquemment observée chez a peu près 72%-85% des patients atteints du diabète type 2 (**Hirano, 2018**).

La dyslipidémie diabétique se caractérise par une élévation des triglycérides à jeun et postprandial, un faible taux de cholestérol HDL, un taux élevé de cholestérol LDL et prédominance de petites particules denses de LDL (**Jialal et Gurdeep, 2019**). La physiologie pathologique sous-jacente n'est que partiellement entendue, les altérations des voies sensibles à l'insuline, l'augmentation des concentrations des acides gras, et l'inflammation sont responsables de la dyslipidémie diabétique, et entraînent une surproduction et diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale et hépatique. Les changements observés dans les HDL et les LDL sont principalement liés à cela (**Wu, 2014**). Le tableau (1.2) résume les principaux mécanismes de la dyslipidémie diabétique.

**Tableau 1.2.** Mécanismes de la dyslipidémie diabétique.

<b>Hypertriglycéridémie</b>
<p>L'hypertriglycéridémie est multifactorielle chez les patients diabétiques, et se réfère à des concentrations élevées de triglycérides à jeun et postprandiale.</p> <p>Le taux de sécrétion de VLDL riches en triglycérides par le foie est augmenté, principalement en raison d'un flux accru de substrat (glucose, acides gras) au foie. La résistance à l'insuline en ce qui concerne la régulation de la sécrétion de VLDL et d'autres facteurs supplémentaires tels que la faible teneur en adiponectine améliorent encore la sécrétion de VLDL.</p> <p>Le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides est diminué. L'adiponectine et les changements de composition des VLDL peuvent en être responsables.</p> <p>La sécrétion non supprimée de VLDL pendant la phase postprandiale, la production accrue d'apoB48 et le catabolisme retardé des lipoprotéines riches en triglycérides améliorent encore l'hypertriglycéridémie (<b>Reaven, 2005</b>).</p>

**Diminution du taux des C-HDL**

L'interaction médiée par la protéine de transfert d'ester de cholestérol entre les HDL et les lipoprotéines riches en triglycérides (échange d'ester de cholestérol pour les triglycérides) entraîne la formation de HDL riches en triglycérides, qui sont sensibles à un catabolisme rapide.

d'autres facteurs entraînant une augmentation du catabolisme des particules contenant de l'apoA1 peuvent également contribuer à la faible concentration de HDL dans les sujets diabétiques (**Rader, 2007**).

**Augmentation du taux des C-LDL**

Les petites particules denses LDL (c'est-à-dire les LDL avec relativement peu de lipides par rapport à l'apoB100) sont une caractéristique de la dyslipidémie diabétique. Les voies qui en résultent dans la formation de petites LDL denses ne sont, à l'heure actuelle, pas complètement comprises.

Les VLDL-1 riches en triglycérides sécrétées dans le diabète de type 2 sont préférentiellement métabolisées en petites particules denses LDL.

Les LDL denses intermédiaires normaux n'interagissent probablement pas correctement avec le récepteur des LDL et sont donc métabolisés en petits dense LDL.

L'interaction médiée par la protéine de transfert des esters de cholestérol entre les lipoprotéines LDL plus grandes et les lipoprotéines riches en triglycérides (échange de cholestérol ester pour les triglycérides) conduit à la formation de LDL riches en triglycérides. Les triglycérides sont ensuite éliminés, ce qui donne de petits LDL denses (**sugden et mark, 2011**).

**1.4. Complications chroniques du diabète**

Les complications chroniques sont globalement identiques dans les deux types du diabète, cependant, leurs fréquences et leurs sévérités sont variables, elles sont classiquement divisées en deux catégories : les micro-angiopathies et les macro-angiopathies.

Les macro-angiopathies concernent l'intégralité des vaisseaux de l'organisme, quels que soient leur taille et les tissus qu'ils irriguent, on prend l'exemple de la maladie coronarienne, la maladie vasculaire périphérique et la maladie cérébrovasculaire. Cependant, la micro-angiopathie touche la microcirculation y compris la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie (**Tab 1.2**) (**Sun et al., 2021**).

Tableau 1.3: Les macro-angiopathies et les micro-angiopathie diabétiques

Les micro-angiopathies	Rétinopathie	C'est une complication fortement liée à l'hyperglycémie et la durée du diabète, elle se traduit par diverses lésions observables lors d'un examen du fond d'œil : micro-anévrysmes réiniens, hémorragies réiniennes punctiformes, exsudats et œdèmes réiniens, et œdème maculaire. Elle est responsable, à terme, de cécité ( <b>Monnier et al., 2008</b> ).
	Néphropathie	C'est un syndrome clinique caractérisé par une protéinurie discrète, couramment appelée micro-albuminurie, qui se traduit par des défauts anatomiques et biochimiques au niveau des glomérules rénaux ( <b>Selby et al., 2020</b> ).
	Neuropathie	C'est une complication très fréquente qui touche le système nerveux périphérique et le système nerveux autonome, il s'agit d'une démyélinisation segmentaire des axones associée à des dépôts lipidiques sur les cellules de Schwann entourant les axones ( <b>Monnier et al., 2008</b> ).
Les macro-angiopathies	L'insuffisance coronaire	Ce risque est présenté par une lésion des artères coronaires entraînant leur obstruction progressive avec comme conséquence une angine de poitrine puis un infarctus du myocarde ( <b>Scheen et Jean-Marie, 2009</b> ).
	L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI)	L'AOMI est corrélée à l'équilibre glycémique, et due à une athérosclérose et une artériosclérose, diffuse intéressant non seulement les gros vaisseaux mais aussi les artères de moyen et petit calibre, en particulier les axes artériels jambiers ( <b>Monnier et al., 2008</b> ).
	Les accidents vasculaires cérébraux (AVC)	Ils sont favorisés par l'hyperglycémie et les autres facteurs de risque cardiovasculaire (HTA, dyslipidémie), surviennent suite à l'Obstruction d'une artère cervicale ou conduisant au cerveau, ou par la rupture d'un vaisseau sanguin dans le cerveau ( <b>Jeanrenaud et Dreyer, 2012</b> ).

Le foie est un organe qui joue un rôle clé dans l'homéostasie glucidique. Au-delà des complications micro et macrovasculaires du diabète, le patient diabétique de type 2 présente plus fréquemment certaines complications hépatiques avec, en premier lieu, la stéatose hépatique (**Bonnet, 2019**). Cependant, le rein aussi est sans doute la cible la plus importante des dommages microvasculaires dans le diabète, une proportion importante de personnes atteintes de diabète peuvent développer des maladies rénales (**Thomas *et al.*, 2015**). C'est pour ça, les altérations hépatorénales font l'objet de nombreuses études.

#### 1.4.1. Hépatostéatose et diabète

La stéatose hépatique est définie comme une graisse intrahépatique d'au moins 5 % du poids du foie. La simple accumulation de triacylglycérols dans le foie pourrait être hépatoprotectrice; cependant, un stockage prolongé des lipides hépatiques peut entraîner un dysfonctionnement métabolique du foie, une inflammation et des formes avancées de stéatose hépatique non alcoolique. La stéatose hépatique non alcoolique est associée à l'obésité, au diabète de type 2 et à la dyslipidémie (**Nassir *et al.*, 2015**).

##### 1.4.1.1. Hépatostéatose et insulino-résistance

Au cours de la stéatose hépatique de toute origine, une résistance à l'insuline se développe également de manière secondaire. La résistance à l'insuline se développe couramment dans les lipodystrophies, au cours de l'oxydation mitochondriale, ou dans le cas d'une mauvaise sécrétion des VLDL (**Capeau, 2008**).

En plus, l'insuline active également l'élément régulateur du stérol protéine de liaison 1-c (SREBP-1c), un facteur de transcription qui stimule le pyruvate kinase hépatique, l'acétyl-CoA carboxylase, la stéaroyl-CoA désaturase, qui sont tous impliqués dans la synthèse des acides gras (**Fig 1.3**). Puisque l'insuline agit pour augmenter la lipogenèse, n'importe quelle condition de résistance à l'insuline diminuait la synthèse des acides gras Or, il a été montré que, dans des états de résistance à l'insuline, l'insuline perd sa capacité à diminuer la production de glucose, tout en conservant la capacité de stimuler la lipogenèse (**Dongiovanni *et al.*, 2016**).

En outre, la stéatose hépatique peut produire des mutations post réceptrices dans la voie de signalisation de l'insuline menant à la résistance à l'insuline, et vice versa, la résistance à l'insuline peut produire une hépatostéatose car les effets lipogéniques de l'insuline et de l'hyperinsulinémie caractéristique de cette dernière jouent probablement un

rôle dans l'accumulation de graisse dans le foie conduisant à un état d'hépatostéatose (Meex et Matthew, 2017).

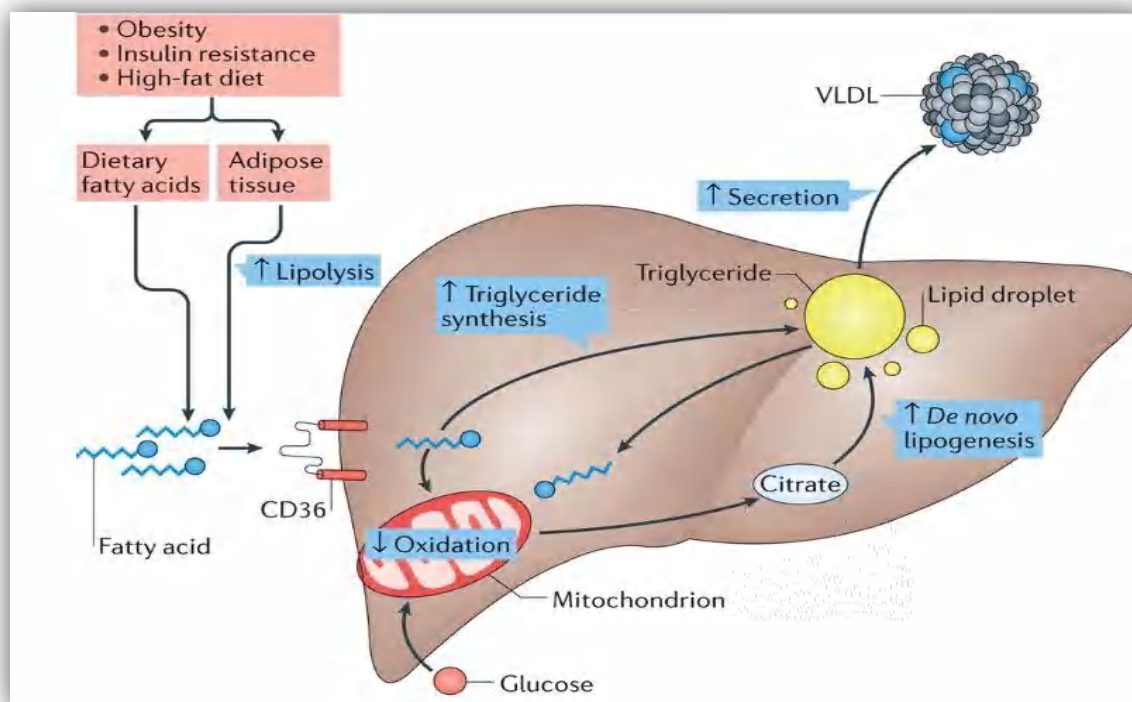


Figure 1.3: Hépatostéatose et insulino-résistance (Meex et Matthew, 2017).

#### 1.4.1.2. Hépatostéatose et stress du réticulum endoplasmique

L'activation du réticulum endoplasmique (RE) par le stress a été rapportée dans la plupart des modèles de stéatose hépatique chez les rongeurs, la lipogenèse étant la principale voie métabolique affectée. L'activation liée au stress RE, observée dans le tissu adipeux des tissus des personnes obèses, pourrait avoir des conséquences métaboliques et participer à l'accumulation de diverses espèces lipidiques dans le foie, cependant cette activation pourrait conduire à une perturbation de la signalisation de l'insuline, et donc exacerber une résistance à l'insuline (Sun et Mitchell, 2013).

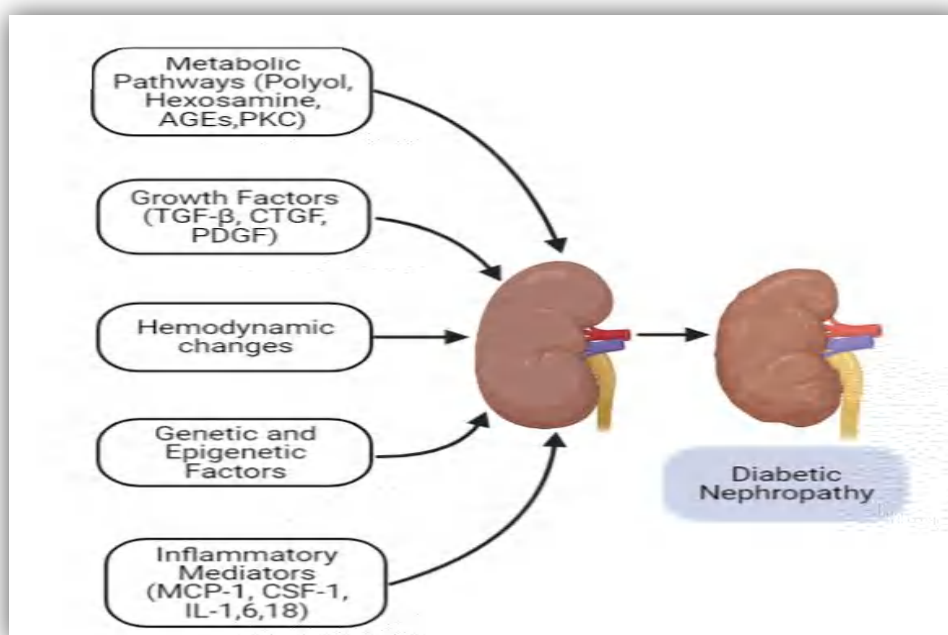
En effet, il a été démontré que l'activation du RE stress active l'inositol-requireing protein 1 (IRE1), un composant de la réponse protéique dépliée pourrait stimuler c-Jun kinase aminotermine (JNKs) ou SAPK (protéine kinase activée par le stress), qui à leurs tours, phosphorylent les résidus sérine du récepteur 1 de l'insuline, développant une résistance à l'insuline (Schwabe et David, 2006).



### 1.4.2. Néphropathie diabétique (ND)

Le diabète est la principale cause d'insuffisance rénale chronique qui, à son tour, peut entraîner une insuffisance rénale terminale (IRT) aboutissant à la dialyse. Les changements hémodynamiques et structurels consécutifs au diabète travaillent ensemble dans le processus de développement de la néphropathie diabétique (Soldatos et Cooper, 2008).

La ND est caractérisée par un épaississement de la membrane basale glomérulaire, une expansion de la matrice mésangiale et la hyalinisation des artéριοles afférentes et efférentes. Le débit de filtration glomérulaire reflète les lésions glomérulaires, alors que le pronostic et la progression globale de la ND est plus en rapport avec la fibrose interstitielle. Enfin, l'albuminurie est le reflet de l'épaississement de la membrane basale glomérulaire et de l'expansion mésangiale (Najafian *et al.*, 2011). La physiopathologie de la ND est très complexe, impliquant de nombreuses molécules et activités cellulaires y compris ; les produits terminaux de glycation avancée (AGEs), le facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ainsi que l'inflammation et le stress oxydant (Fig 1.4) (Cao *et al.*, 2021).



**Figure 1.4 :** Mécanismes physiopathologiques de la ND (adaptée et modifiée de Dagar *et al.*, 2021).

L'hyperglycémie provoque la formation des produits terminaux de glycation avancée (AGEs), qui sont les principaux acteurs moléculaires des différentes phases de la néphropathie diabétique. De nombreuses études ont démontré une corrélation positive entre



les niveaux sérique des AGEs et la gravité des complications rénales chez les patients atteints de diabète (**Parwani et Palash, 2020**).

En outre, l'activation de la chaîne de transport d'électrons induite par l'hyperglycémie peut entraîner une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont impliqués dans le déclenchement d'une néphropathie diabétique. Ce déséquilibre oxydatif, à son tour, accélère la génération d'AGE et la réaction entre les AGE et le récepteur des AGE (RAGE) (**Cao et al., 2021**).

L'interaction complexe entre le stress oxydatif et les AGE affecte de nombreuses molécules et systèmes de signalisation tels que la protéine activatrice-1 (AP-1), la protéine de spécificité du facteur de transcription-1 (SP-1) et le système rénine-angiotensine via la signalisation AGE/RAGE, qui provoque une inflammation chronique, une hypertrophie glomérulaire et tubulaire, et par conséquent augmente l'insuffisance rénale (**Parwani et Palash, 2020**).

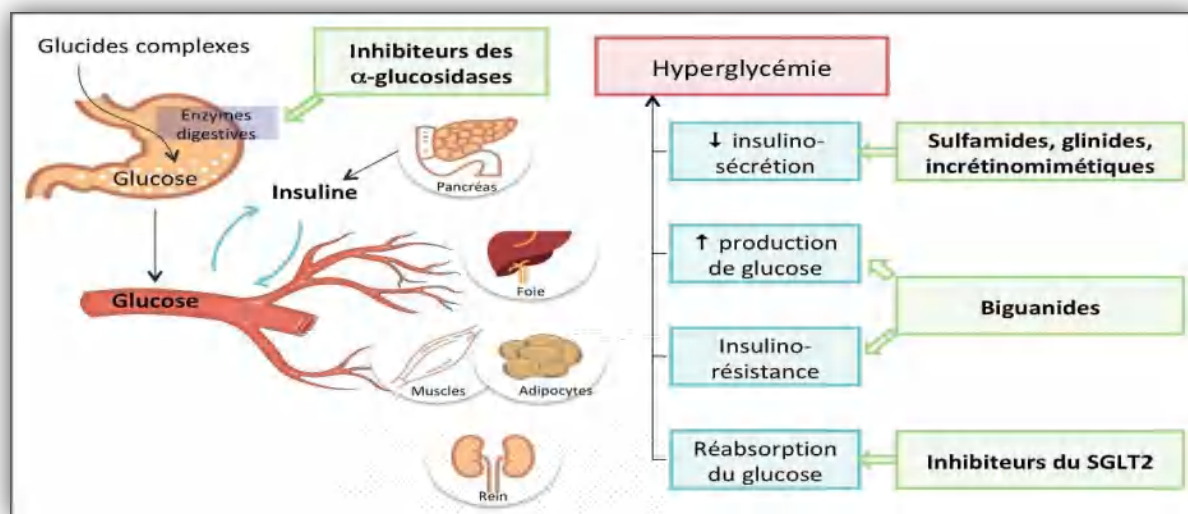
Cependant, de nombreuses études ont démontré le rôle crucial de l'inflammation dans la progression de la ND via de nombreux facteurs pro-inflammatoire impliquant le NF- $\kappa$ B, la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1), le TNF- $\alpha$  et l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). En particulier, les réponses immunitaires innées facilitent le processus inflammatoire de la ND et induisent une infiltration de macrophages et de lymphocytes T dans les glomérules et l'interstitium, ce qui favorise la libération locale de molécules d'adhésion et de chimiokines (**Sun et al., 2016**).

Les macrophages sont le principal contributeur parmi les leucocytes infiltrants à l'altération de la fonction rénale chez les patients atteints de ND, en particulier les macrophages CD68+, qui représentent 90 % de l'infiltrat total de leucocytes rénaux. Ces macrophages interagissent avec les cellules rénales résidentes et induisent une inflammation chronique, favorisant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, à savoir IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 et TNF- $\alpha$ , et MCP-1, conduisant à la glomérulosclérose et à la fibrose tubulo interstitielle au niveau des reins (**Sun et al., 2016**).

### 1.5. Traitement pharmacologique du diabète

Le diabète est une maladie chronique et un traitement à vie est nécessaire, l'adoption d'une meilleure alimentation et la pratique régulière d'une activité physique constituent toutefois un véritable mode de traitement. Cependant, l'utilisation des agents

pharmacologiques oraux pour un contrôle glycémique optimal est nécessaire afin de prévenir l'apparition des complications de cette pathologie (Fig 1.5) (Ganesan *et al.*, 2018).



**Figure 1.5 :** Les mécanismes et les sites d'action des médicaments antidiabétiques (Janardhan *et al.*, 2014).

### 1.5.1. Les biguanides

La metformine est le seul représentant de cette classe, elle est identifiée comme la principale drogue dans le traitement du diabète de type 2 (Gras *et al.*, 2006). Son action permet d'augmenter la sensibilité du foie et des tissus périphériques à l'insuline ainsi que de réduire la production hépatique de glucose en supprimant l'activité de l'enzyme glucose 6 phosphatase (G6Pase). D'autre part, elle potentialise l'effet de l'insuline sur la captation musculaire du glucose, augmentant son stockage sous forme de glycogène sans affecter son métabolisme oxydatif (Libby *et al.*, 2009).

### 1.5.2. Les médicaments augmentant la sécrétion d'insuline (ou insulinosécréteurs)

Les sulfamides hypoglycémiantes (on peut citer par exemple le Gliclazide ou encore le Glibenclamide) font partie de la classe la plus ancienne des agents antidiabétiques oraux. Ces hypoglycémiantes stimulent la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas en les sensibilisant à l'action du glucose (Altman, 2015).

Il existe aussi les glinides (dont la répaglinide est actuellement, le seul représentant de cette classe) qui ont un pouvoir hypoglycémiant proche de celui des sulfamides hypoglycémiantes (Blicklé, 2004). Ils se lient aux sites A et B du récepteur SUR 1 à la surface des cellules  $\beta$  du pancréas et stimulent, via une fermeture des canaux potassiques

ATP sensible, un influx de calcium qui induit la libération de l'insuline (**Buyschaert et al., 2010**).

### 1.5.3. Les thiazolidinédiones (TZDs) (ou glitazones)

Les TZDs représentent une classe thérapeutique importante en raison de ses effets bénéfiques sur le métabolisme glucidique, la sensibilité à l'insuline et la préservation de la cellule  $\beta$  des îlots de Langerhans. Les molécules les plus connues de cette classe sont la roziglitazone et la pioglitazone (Vergès, 2008). Les TZDs sont des agonistes PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$ ), ils diminuent la résistance à l'insuline directement par l'activation des récepteurs PPAR $\gamma$  qui facilitent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes, favorisent la lipogenèse dans les adipocytes périphériques, diminuent les triglycérides hépatiques et périphériques. Ces effets primaires des TSD améliorent considérablement la résistance à l'insuline et le syndrome métabolique et diminuent les besoins en insuline (**Lebovitz, 2019**).

### 1.5.4. Les Inhibiteurs des $\alpha$ -glucosidases

Les inhibiteurs des alpha-glucosidases (comme l'acarbose, le miglitol, ou l'émiglitate) sont des antihyperglycémiques oraux qui agissent par inhibition compétitive et réversible de l'alpha-glucosidase intestinale (**Bischoff, 1995**). Ces derniers sont des enzymes gastro-intestinales responsables de l'hydrolyse des résidus, d'amidon, d'oligosaccharides et des disaccharides afin de libérer du glucose. En inhibant ces enzymes, l'absorption du glucose est retardée, ce qui ralentit les poussées de glycémie postprandiale et contribue à améliorer le contrôle glycémique (**Van De Laar et al., 2005**).

### 1.5.5. Les analogues du GLP-1 et inhibiteurs de la DPP-4

Les hormones incrétines, le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le polypeptide insulino-tropique dépendant du glucose (GIP) sont libérés par les cellules entéroendocrines en réponse à la présence de nutriments dans l'intestin grêle. Ces hormones facilitent la régulation du glucose en stimulant la sécrétion de l'insuline d'une manière dépendante du glucose tout en supprimant la sécrétion de glucagon (**Gilbert et Richard, 2020**).



**CHAPITRE 02**

**Diabète et stress  
oxydant**



## 2. Diabète et stress oxydant

L'hyperglycémie chronique occupe une place primordiale dans la physiopathologie des complications microvasculaires du diabète. Plusieurs données récentes suggèrent aussi son rôle dans les complications macroangiopathiques. Les causes des complications et des pathologies associées au diabète sont d'une part des mécanismes directement oxydatifs du fait de l'état du stress oxydant chronique altérant les molécules biologiques, mais sont également les voies délétères pour les cellules activées par les ERO (Singh *et al.*, 2001).

### 2.1. Le stress oxydant et l'hyperglycémie

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les défenses antioxydantes et la production de radicaux libres. Il est associé à de nombreux dommages macromoléculaires, et est responsable de l'activation de plusieurs voies de mort cellulaires (Paithankar *et al.*, 2021).

Le stress oxydatif résultant de la génération accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) joue un rôle crucial dans la pathologie diabétique. En fait, en l'absence d'une réponse appropriée des mécanismes antioxydants endogènes, le déséquilibre redox provoque l'activation des voies de signalisation intracellulaires sensibles au stress. Ces derniers jouent un rôle clé dans le développement de complications tardives du diabète, ainsi que dans la médiation de la résistance à l'insuline, et dans la sécrétion altérée d'insuline (Johnson *et al.*, 2022).

Le stress oxydant agit sur le fonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques, ces dernières sont fortement exposées au stress oxydant en raison de leur forte production endogène d'espèces réactives de l'oxygène, et de leur faible capacité antioxydante (Rehman et Akash, 2017).

#### 2.1.1. Voies de production des ERO lors de l'hyperglycémie

Le diabète sucré est une maladie chronique qui altère la fonction biologique de nombreux organes du corps. Le mécanisme sous-jacent de la pathogénèse diabétique est la glucotoxicité chronique induite par l'hyperglycémie, qui altère de nombreuses voies dans le métabolisme biologique (Fig 2.1).

Ces voies comprennent la voie de la glycoxydation, la voie des polyols, la voie de la protéine kinase c, la voie des hexosamines, ainsi que la production de produits terminaux de

glycation (AGE). Toutes ces voies convergent vers l'élévation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) induisant un état de stress oxydant, qui à son tour, provoque une expression défectueuse du gène de l'insuline, une sécrétion d'insuline, ainsi qu'une apoptose accrue (Yan, 2018).



**Figure 2.1:** Diabète et stress oxydant (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2004).

### 2.1.1.1. Auto-oxydation du glucose ou glycoxydation

Le déséquilibre dans le métabolisme intracellulaire du glucose entraîne une augmentation des niveaux de ses produits de dégradation oxydatifs, le dicarbonyls glyoxal, le méthylglyoxal, et le 3-désoxyglucosone. Ces sous-produits du métabolisme cellulaire appartiennent au groupe chimique des  $\alpha$ -oxoaldéhydes mais sont plus communément classés comme espèces carbonylées réactives (Sergi *et al.*, 2021).

En plus d'être un métabolite physiologique naturel dans l'auto-oxydation du glucose, le glyoxal peut également être formé par la peroxydation lipidique, la dégradation des protéines glyquées et l'oxydation de l'ADN, entre autres réactions (Larsen *et al.*, 2012). Les groupes carbonyle hautement réactifs du glyoxal peuvent réagir avec les résidus lysine, arginine et cystéine des protéines pour former des adduits covalents connus sous le nom de produits de glycation avancée (AGE) (Fig 2.2). L'accumulation de protéines endommagées

par l'AGE a été impliquée dans plusieurs pathologies, notamment le diabète (Sergi *et al.*, 2021).

Le glyoxal est connu aussi pour sa forte capacité à induire un stress oxydant. En présence de fer, cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine (CML). Ce groupement capte facilement le cuivre, ce qui provoque le déclenchement de réactions de type Fenton avec production de radicaux libres : il s'ensuit une augmentation de la peroxydation lipidique (Haleng *et al.*, 2007).

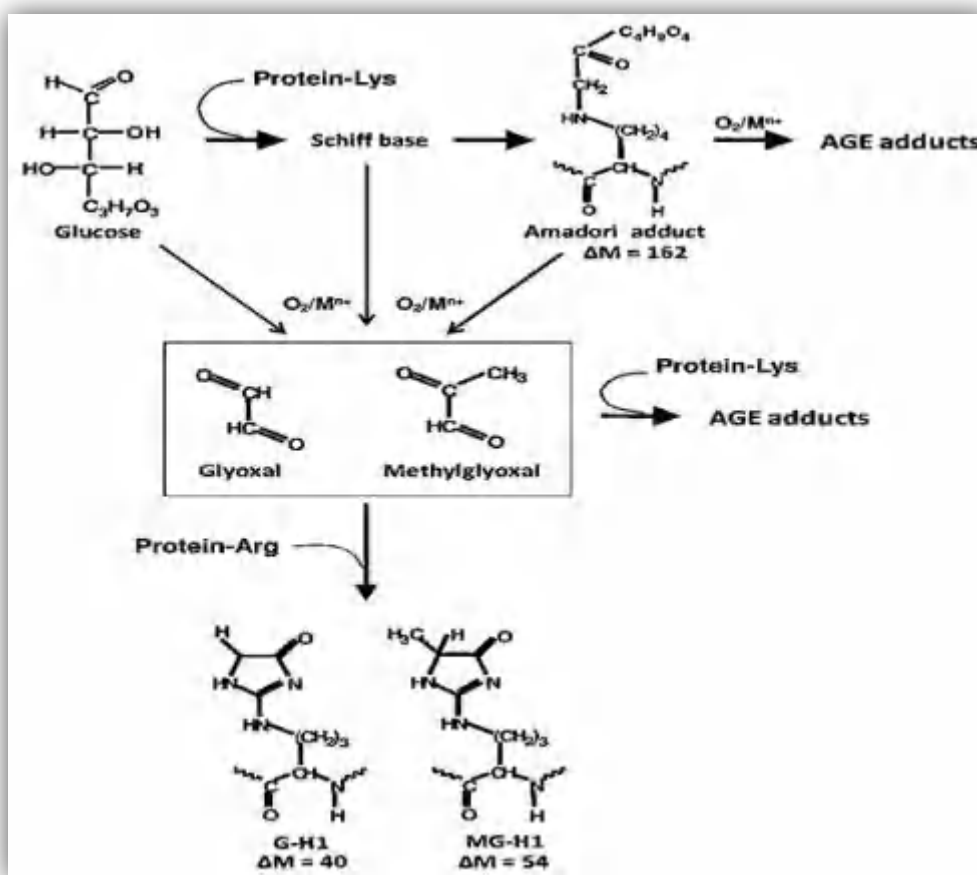


Figure 2.2: Mécanisme de l'auto oxydation du glucose (Ohiagu *et al.*, 2021).

### 2.1.1.2. Voie des polyols

La voie des polyols est une voie métabolique qui comporte deux étapes: la première étape sert à la réduction du glucose en sorbitol et est catalysée par l'aldose réductase (AR) dans un nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (NADPH) de manière dépendante, alors que la seconde étape sert à l'oxydation du sorbitol au fructose, et est catalysée par la sorbitol déshydrogénase (SDH) dans un NAD-dépendant manière (Fig 2.3). L'hyperactivité



de la voie des polyols induit de multiples déséquilibres, et est ainsi considérée comme une cause majeure des complications diabétiques (Niimi *et al.*, 2021).

Dans le cas d'une hyperglycémie, une partie du glucose est réduite en sorbitol, ce dernier va s'accumuler dans les cellules, de part son incapacité à traverser les membranes, et entraîner de multiples dommages tels que des dommages osmotiques. Une partie du sorbitol peut être oxydée en fructose à l'origine de produits avancés de glycation (Ohiagu *et al.*, 2021).

Suite à ces réactions, le rapport NADH/ NAD<sup>+</sup> s'élève, entraînant une inhibition de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et une accentuation de la formation de produits terminaux de glycation (AGE). En outre, les taux cellulaires de NADPH, coenzyme nécessaire à l'activité de la glutathion réductase (régénération du GSH) ainsi qu'à l'activité de l'ascorbate réductase et de la NO-synthase, diminuent, avec pour conséquence une diminution des capacités antioxydantes et va donc entraîner une augmentation du stress oxydant au sein de la cellule (Haleng *et al.*, 2007).

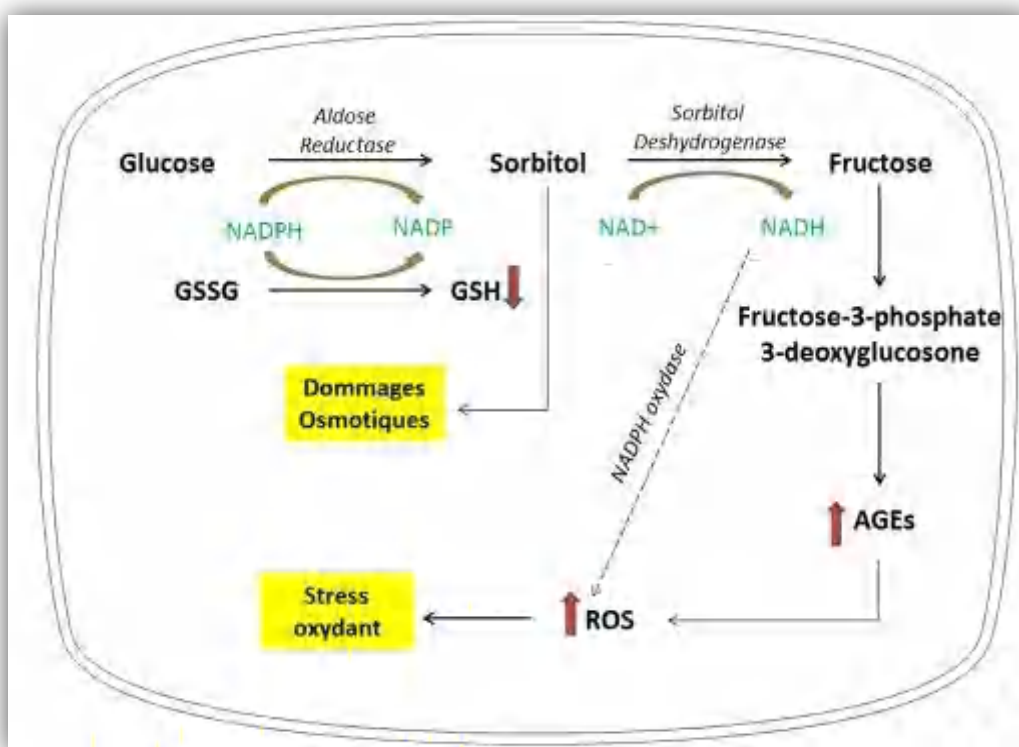


Figure 2.3: Voie des polyols au cours du diabète (Boyer, 2016).



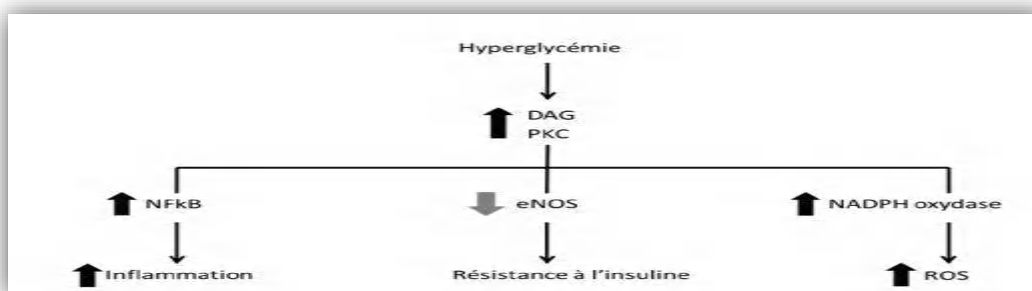
### 2.1.1.3. Voie de la Protéine kinase C (PKC)

La famille des PKC comprend 11 isoformes de sérine-thréonine kinases qui jouent un rôle majeur dans la modulation de la perméabilité des cellules endothéliales et l'activation de la prolifération cellulaire. Ces isoformes sont capables de phosphoryler différentes cibles cellulaires, dont 9 sont activées par un messager secondaire dérivé des phospholipides membranaires, le diacylglycérol (DAG). L'hyperglycémie induit une synthèse accrue de glycéraldéhyde-3-phosphate via la glycolyse, dont ce dernier est un précurseur du DAG, activateur de la protéine kinase C (**Fig 2.4**) (**Brownlee, 2005**).

L'activation de la PKC augmente l'expression du facteur de croissance transformant (TGF- $\beta$ ), qui est l'un des facteurs de croissance les plus importants régulant la production de la matrice extracellulaire en activant l'expression génique des protéoglycanes et du collagène et en diminuant la synthèse des enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice des protéines. Donc l'expression accrue de TGF- $\beta$  conduit à un épaissement de la membrane basale capillaire; l'une des premières anomalies structurelles observées dans presque tous les tissus du diabétique (**Aronson, 2008**).

L'activation de la PKC va entraîner l'augmentation de la production d'ERO par l'augmentation de l'activité NADPH oxydase, elle va aussi jouer un rôle dans l'inflammation par le biais de l'augmentation de la synthèse du facteur pro-inflammatoire NF $\kappa$ B, et également va contribuer à l'installation de l'insulino-résistance via la diminution de l'expression de l'enzyme de type oxyde nitrique synthase (eNOS) (**Haleng et al., 2007**).

L'hyperglycémie peut aussi activer la PKC de façon indirecte, à la fois par liaison des produits de glycation avancés AGE à leurs récepteurs et par augmentation du flux de la voie des polyols (**Mohora et al., 2007**).



**Figure 2.4:** Voie de la PKC dans le cadre de la pathologie diabétique (**Boyer, 2016**).

### 2.1.1.4. Production de produits terminaux de glycation (AGEs)

Les produits avancés de glycation (AGEs) représentent un vaste groupe hétérogène de composés formés par des réactions non enzymatiques entre les sucres réducteurs ou les lipides oxydés et les groupes aminés libres de protéines, de phospholipides aminés ou d'acides nucléiques. Ils sont impliqués dans la pathophysiologie de diverses maladies, en particulier le diabète et les complications liées au diabète (Sergi *et al.*, 2021).

Il existe trois mécanismes différents de la formation des AGEs (Fig 2.5), le processus initial, connu sous le nom de réaction de Maillard, conduit à la formation de molécules glyquées appelées produits d'Amadori ou produits de glycation précoce. Le réarrangement, l'oxydation, la réduction, la déshydratation, la condensation, la fragmentation et la cyclisation d'un produit d'Amadori entraînent la formation d'AGEs irréversibles pertinents. L'incubation de protéines avec des produits de peroxydation lipidique est une méthode alternative pour générer des AGEs. La voie polyolique conduit à la conversion du glucose en fructose, et favorise également la glycation; le fructose peut être converti en 3 désoxyglucose et en 3-phosphate, qui sont tous deux des agents de glycation non enzymatiques très puissants (Kuzan, 2021).

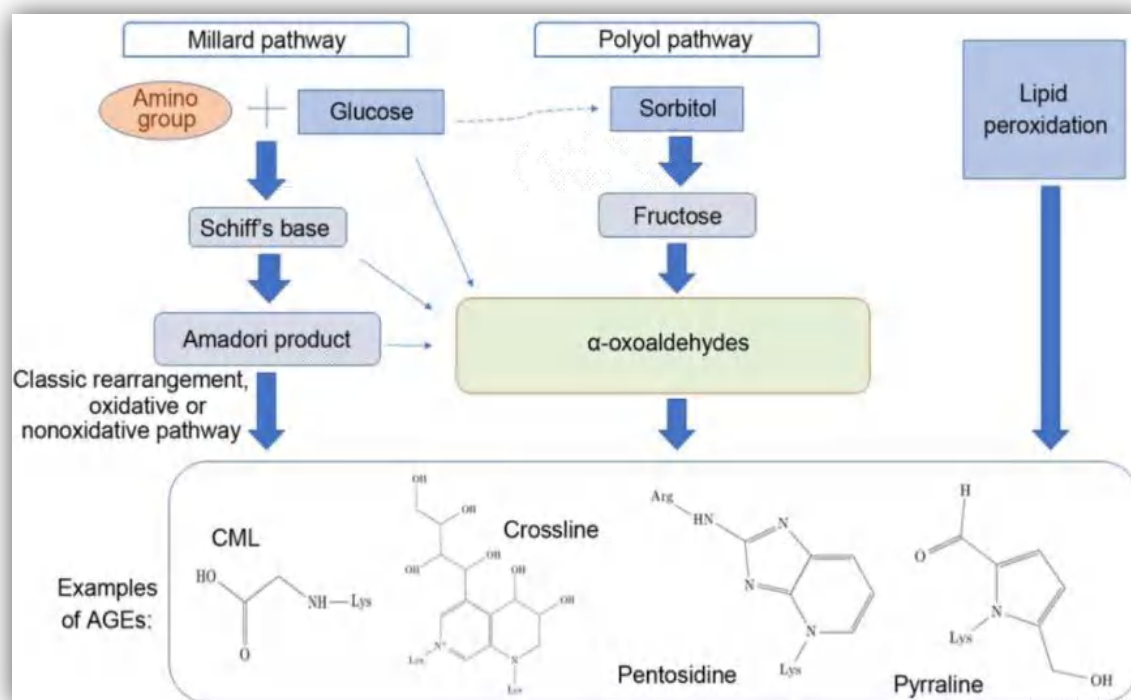


Figure 2.5 : Les voies de formation des AGEs (Kuzan, 2021).

L'hyperglycémie diabétique provoque l'augmentation des niveaux d'AGEs, ces derniers eux-mêmes activent les voies de signalisation, qui compromettent la signalisation de l'insuline et la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques, contribuant ainsi au développement du diabète de type 2 (Sergi *et al.*, 2021).

L'hémoglobine glyquée (HbA1C) sert de marqueur pour le suivi de la glycémie sur le long terme chez les personnes diabétiques, c'est une protéine glyquée par les AGEs, c'est pour cette raison il existe une relation entre l'augmentation du taux de l'Hb A1C et le taux des AGEs chez les personnes atteints du diabète (Indyk *et al.*, 2021).

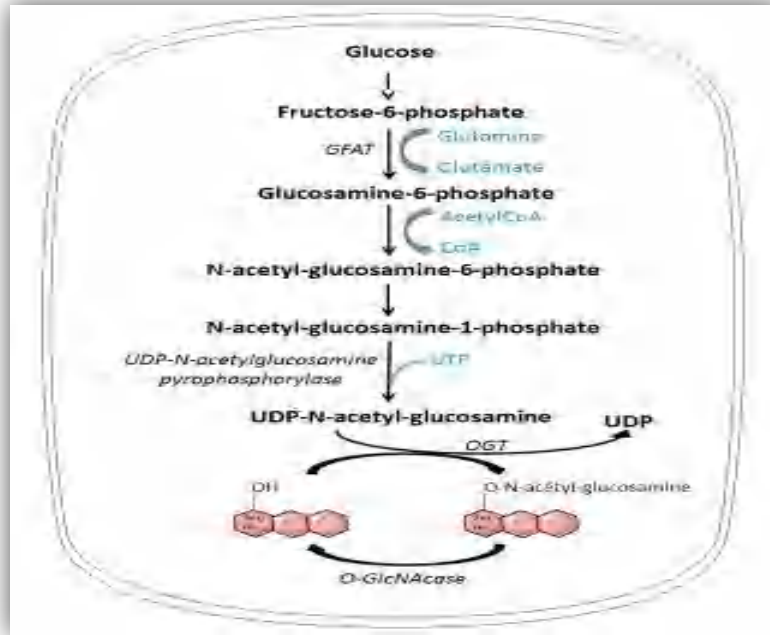
En outre, la présence des AGEs induit l'expression de ces récepteurs (RAGE), l'interaction entre les AGEs et leurs récepteurs élève la génération cellulaire du stress oxydatif, augmente la libération de cytokines et de facteurs de croissance par activation du facteur nucléaire  $\kappa$ B, et stimule les facteurs d'adhérence, ce qui mène finalement à une réponse inflammatoire (Ohiagu *et al.*, 2021).

#### 2.1.1.5. Voie des hexosamines

La voie hexosamines implique la conversion de fructose-6-phosphate (fruc-6-P) en glucosamine-6-phosphate (glucN-6-P) en utilisant la glutamine comme donneur du groupement amine. La conversion du fruc-6-P en glucN-6-P est catalysée par la glutamine : fructose-6-phosphate-amidotransférase (GFAT), qui est l'enzyme qui limite la vitesse de la voie de biosynthèse des hexosamines (Ruegenberg *et al.*, 2021).

Le GlucN-6-P est instantanément canalisé vers la synthèse de l'uridine-5-diphosphate-Nacétylglucosamine (UDP-N-acétylglucosamine). Ce dernier est le précurseur de la biosynthèse des sucres aminés nécessaires pour la production de glycoprotéines, protéoglycanes, glycosaminoglycanes et glycolipides (Fig 2.6) (Ruegenberg *et al.*, 2021).

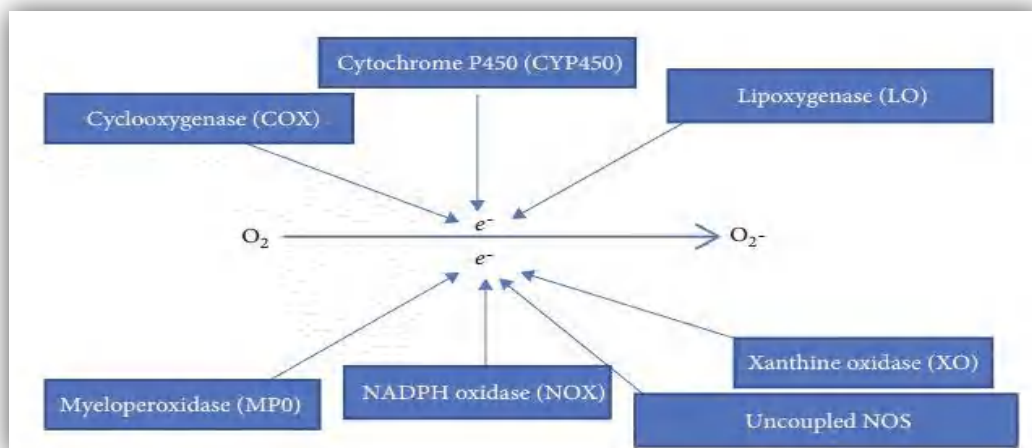
L'hyperglycémie induit le développement des complications diabétiques par l'élévation des concentrations de fructose 6-P, impliqué dans la voie des hexosamines. Cependant, l'activation de cette voie favorise, en premier lieu, la libération de cytokines telles que TGF- $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1, TNF- $\alpha$ , CTGF et PAI-1, responsables de diverses complications diabétiques, et en deuxième lieu, elle entraîne une augmentation de la génération des ERO et contribue finalement à l'installation d'un stress oxydant (Ohiagu *et al.*, 2021).



**Figure 2.6:** L'activation de la voie des hexosamines (Boyer, 2016).

### 2.1.2. Réactions enzymatiques générant les ERO lors de l'hyperglycémie

Au cours du diabète, les radicaux libres peuvent être générés par différentes réactions et peuvent également activer des enzymes oxydatives dont les plus importantes sont les cyclooxygénases (COX), le cytochrome P450 (CYP450), la lipoxygénase (LOX), la myéloperoxydase (MPO), la NADPH oxydase (NOX), et la xanthine oxydase (XOX) (Fig 2.7) (Verma *et al.*, 2016).



**Figure 2.7:** Les réactions enzymatiques qui produisent les ERO lors d'une hyperglycémie.

### 2.1.2.1. Cyclooxygénases (COX)

La cyclooxygénase (COX) est une enzyme contenant de l'hème qui produit des prostaglandines via une voie connue sous le nom de cascade de l'acide arachidonique. Deux isoformes de l'enzyme COX sont connus le COX-1 et le COX-2 mais dernièrement, il y a eu des découvertes qui confirment la présence d'un troisième isoforme le COX-3 (**Stachowicz, 2021**). Dans le cas d'une hyperglycémie, des taux élevés de COX-1 et COX-2 ont été signalés, cela est causé par l'auto-oxydation du glucose et l'activation de la voie de l'aldose réductase. Cette voie s'accompagne d'une réduction secondaire du NADPH et du NAD<sup>+</sup>, de l'activation de PKC, de la stimulation des AGEs, ainsi que l'élévation de la génération des ERO (**Pop-Busui et al., 2008**).

De nombreuses études réalisées sur des souris diabétiques ont révélés l'augmentation du taux de COX-2 dans les cellules musculaires. Une élévation de l'abondance de COX-2 dans les artérioles coronaires a également été observée et confirmé chez les sujets diabétiques. En outre, un niveau élevé de COX-2 dans les podocytes des reins diabétiques était observé (**Ohiagu et al., 2021**).

### 2.1.2.2. Cytochrome P450

Le cytochrome P450 (CYP450) est une grande famille d'enzymes, qui sont des hémoprotéines dont le seul but est de favoriser la biotransformation de composés endogènes et exogènes. Ils sont principalement positionnés dans le réticule sarcoplasmique et la membrane interne des mitochondries où ils fonctionnent dans des processus tels que le métabolisme et la synthèse. Le CYP2E1 et le CYP4A sont les deux enzymes prédominantes du CYP450 qui contribuent à la production d'oxydants comme les peroxydes d'hydrogène, les radicaux hydroxyles et le superoxyde d'anion dans l'organisme (**Wolf et al., 2022**).

Lors de l'hyperglycémie, les isoformes de CYP4A produisent le peroxyde d'hydrogène et de superoxyde. De plus, certains isoformes du CYP450 tels que le 2E1, le 2C6, le 2C7, le 3A2, le 4A3 et le 2A1 ont été activés et impliqués dans l'apparition de l'hyperglycémie par l'hydroxylation des acides gras et les corps cétoniques (**Unuofin et Sogolo, 2020**).

### 2.1.2.3. Lipooxygénase (LOX)

Les lipooxygénases (LOX) sont une famille d'enzymes généralement caractérisées par des structures dépourvues de fer hémique et participent à la catalyse de l'acide arachidonique désoxygénant les acides gras polyinsaturés pour produire des dérivés hydroperoxydes (**Meng et al., 2022**). L'hyperglycémie stimule l'activation du 12-LOX (isoforme de la lipooxygénase), ce qui favorise la libération des intermédiaires lipidiques pro-inflammatoires, le 12 (S)-acide hydroperoxyeicosatétraoïque (12(S)-HPETE) et l'acide hydroxyeicosatétraoïque (12(S)-HETE), ces derniers réagissent avec la NADPH oxydase provoquant l'activation des voies d'inflammation ce qui conduit finalement à une élévation du niveau des ERO, suivie d'un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques (**Ohiagu et al., 2021**).

### 2.1.2.4. Myéloperoxydase (MPO)

La myéloperoxydase (MPO) appartient à une superfamille d'enzymes hème peroxydases, qui comprend également la peroxydase éosinophile et la lactoperoxydase. Ils possèdent des activités antimicrobiennes et antivirales en raison de leur capacité à produire les ERO. La MPO est majoritairement exprimée dans les neutrophiles, alors qu'une expression plus faible a été observée dans les monocytes et les macrophages (**Ramos et al., 2022**). Dans un état diabétique, l'hyperglycémie persistante stimule l'activation de la MPO, ce qui entraîne une production des ERO, ces dernières exercent une activité cytotoxique et oxydative vis-à-vis des cellules  $\beta$  pancréatiques (**Unuofin et Sogolo, 2020**).

### 2.1.2.5. NADPH oxydase (NOX)

Le nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase (NOXs) est une famille composée de sept membres qui transfèrent des électrons à travers les membranes biologiques pour générer les ERO. Ces différentes isoformes stimulent la génération du superoxyde en provoquant une réduction de molécules d'oxygène via un donneur d'électrons le NADPH. En plus de leurs diverses activités, Nox1 et Nox2 sont connus pour leur production abondante d'anion superoxyde comme produit immédiat, alors que NOX4 génère des enzymes de peroxyde d'hydrogène sans moindre présence de superoxyde (**Liu et Li, 2022**).

Les NOXs font partie des sources les plus importantes de génération de ERO au cours d'un état diabétique, l'hyperglycémie chronique stimule l'activation directe des NOXs

ou par le biais de l'empêchement de l'adénosine protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMP). De plus, l'hyperglycémie favorise l'expression du NOX4 au niveau des reins favorisant ainsi la production des ERO et induisant une néphropathie diabétique (Unuofin et Sogolo, 2020).

#### 2.1.2.6. Xanthine oxydase (XOX)

La xanthine oxydase (XO) est une métalloflavoenzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine, provoquant ainsi la production de xanthine et de certains oxydants notamment le superoxyde et le peroxydite (Sekizuka, 2022). Dans un état diabétique, l'hyperglycémie provoquée est toujours associée à une hyperactivité du XO générant l'apparition des ERO notamment le superoxyde et conduit finalement à l'atténuation du stress oxydatif et des dommages au niveau des cellules pancréatiques (Unuofin et Sogolo, 2020).

#### 2.1.3. L'hyperglycémie et la peroxydation lipidique

Au cours du diabète, les marqueurs de la peroxydation lipidique sont altérés en fonction de la sévérité de la maladie, ces marqueurs comprennent le malondialdéhyde (MDA), les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), le 8-isoprastane (8-Isp), LOOH, LDL oxydées et oxystérols.

Le MDA est généré à partir de ERO qui réagissent avec les acides gras polyinsaturés et peuvent ensuite réticuler les résidus de lysine des protéines et des lipoprotéines comme les LDL. Une augmentation des TBARS, qui impliquent une augmentation des niveaux de MDA, a été détectée dans le plasma et les érythrocytes des patients diabétiques (Newsholme *et al.*, 2016).

D'autres molécules lipidiques alimentaires importées peuvent être oxydées par les ERO, notamment l'acide arachidonique, ce qui conduit ensuite à la formation de 8-Isp, ce dernier a été détecté dans les urines des patients diabétiques avec des concentrations élevées. Le 8-Isp peut également être généré par d'autres molécules réactives comme le 4-hydroxynonéal (4HNE), un aldéhyde lui-même issu de la peroxydation lipidique. De plus, les oxystérols, produits terminaux de l'oxydation du cholestérol, peuvent s'accumuler dans les cellules  $\beta$  pancréatiques provoquant un stress oxydatif. Cependant, le 4HNE et les oxystérols peuvent également activer la signalisation du NF- $\kappa$ B, entraînant une inflammation et une résistance à l'insuline (Ho *et al.*, 2013).



Simultanément, des modifications protéiques médiées par les ERO se produisent dans le contexte de la peroxydation lipidique, ces mécanismes comprennent la glycation des protéines, la carbonylation, et la nitrosylation. Le biomarqueur protéique modifié par les radicaux libres le plus courant est l'hémoglobine glyquée (HbA1c), qui est couramment utilisée pour surveiller les niveaux de glycémie à long terme (3 mois) (**Cho, 2016**).

## 2.2. Le stress oxydant et l'hyperlipidémie

Le stress oxydatif joue un rôle important dans la perturbation de l'homéostasie lipidique par l'oxydation du cholestérol et des lipides accumulés dans le plasma. En outre, l'hyperlipidémie est fortement associée au développement du stress oxydatif; de nombreuses études ont montré que l'exposition chronique aux acides gras polyinsaturés devient très toxique pour les cellules  $\beta$  pancréatiques, altère l'expression du gène de l'insuline, diminue la sécrétion d'insuline, et augmente le mécanisme de mort des cellules  $\beta$  (**Olorunnisola et al., 2021**).

L'hyperglycémie provoquée au cours du diabète est toujours associée à une altération du métabolisme lipidique et une résistance à l'insuline. Ce changement lipidique est fortement associé à une concentration plus faible des lipoprotéines de haute densité (HDL), une concentration plus élevée de triglycérides (TG) et du cholestérol total (TC). Le 8-oxo-dG est directement corrélé aux niveaux élevés de TG et également considéré comme un indicateur de dommages à l'ADN (**Ferri et al., 2008**). En outre, de nombreux travaux ont montré que les biomarqueurs du stress oxydatif, comme le 8-oxo-dG et le GSH oxydé, étaient très élevés chez les patients hyperlipidémiques. De même, la production d' $O_2^{\cdot}$  Est également positivement corrélé avec des niveaux élevés de TG sériques, LDL-C, et du cholestérol ce qui explique la relation entre le métabolisme lipidique et le stress oxydant lors de l'hyperglycémie (**Rehman et Akash, 2017**).

Un autre mécanisme, en relation avec le métabolisme lipidique, susceptible d'induire un stress oxydant implique l'intervention des acides gras libres, en particulier leur forme métaboliquement active, les esters d'acyl-CoA à longue chaîne cytosolique, contribuent au dysfonctionnement progressif des cellules  $\beta$  pancréatiques et au développement de la résistance à l'insuline, tout en augmentant la production des ERO par les mitochondries via la réduction de la disponibilité de l'ADP (**Bakker et al., 2000**). Les acides gras libres provoquent également des lésions pancréatiques par un mécanisme de lipoapoptose médiée



par des métabolites non mitochondriaux, entraînant un dysfonctionnement et une perte cellulaire (Hayden et Suresh, 2002).

### 2.3. Le stress oxydant et la résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline est l'une des premières caractéristiques pathologiques du diabète. De plus en plus de données provenant d'études précliniques indiquent que les espèces réactives d'oxygène, comme l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, sont des acteurs clés dans le développement de la résistance à l'insuline (Ayer *et al.*, 2022).

Le stress oxydant peut réduire la sensibilité périphérique à l'insuline via au moins cinq mécanismes moléculaires majeurs y compris le dysfonctionnement des cellules  $\beta$ , l'inflammation, une régulation négative de GLUT-4, un dysfonctionnement mitochondrial et une altération des voies de signalisation normales de l'insuline (Tab 2.1) (Yaribeygi *et al.*, 2020).

**Tableau 2.1** : Principaux mécanismes moléculaires par lesquels le stress oxydatif induit une résistance à l'insuline.

Mécanisme moléculaire	Effet	Références
Dysfonctionnement des cellules $\beta$	Induit un dysfonctionnement des cellules bêta par diverses voies moléculaires telles que des voies apoptotiques, altérant les canaux KATP, inhibant les facteurs de transcription tels que Pdx-1 et MafA, supprimant la néogenèse des cellules $\beta$ et induisant un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules bêta.	(White <i>et al.</i> , 2016 ; Gerber <i>et al.</i> , 2017)
Expression et/ou	Supprime les facteurs de transcription impliqués dans l'expression de GLUT-4, supprime les micro-ARN impliqués dans	(Fazakerley <i>et al.</i> ,

<b>localisation de GLUT-4</b>	l'expression de GLUT-4.	<b>2018).</b>
<b>Voies de signalisation de l'insuline</b>	Module négativement la transduction du signal d'insuline via IRS-1 et IRS-2, l'activité IKK- $\beta$ , l'activité Akt, AMPK et mTOR et les voies moléculaires dépendantes de p38 MAPK.	<b>(Balbaa <i>et al.</i>, 2017)</b>
<b>Inflammation</b>	Augmentent les réponses inflammatoires qui à leur tour induit une résistance à l'insuline dans plusieurs voies.	<b>(Yaribeygi <i>et al.</i>, 2019)</b>
<b>Dysfonctionnement mitochondrial</b>	Altère la fonction normale des mitochondries et réduit ainsi la capacité cellulaire d'absorption du glucose par les transporteurs GLUT-4	<b>(Wada et Atsuko, 2016)</b>

**CHAPITRE 03**

**Phytothérapie et  
traitement du  
diabète**

### 3. Phytothérapie et traitement du diabète

#### 3.1. La phytothérapie

La phytothérapie correspond à l'utilisation des plantes dans le but de prévenir et de traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes, qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe (**Dakuyo, 2004**).

Les plantes ont servi comme première source de médicaments pour l'homme, et elles ont continué à fournir à l'humanité, des remèdes thérapeutiques nouveaux et originaux jusqu'à aujourd'hui. L'intérêt de l'étude et de l'utilisation des plantes médicinales a mené à la caractérisation et à l'identification de molécules majeures, et à l'isolation de composés chimiques actifs d'une importance thérapeutique incontestable (**Leduc, 2006**).

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire. Et malgré les remarquables progrès en chimie organique de synthèse du vingtième siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes (**Newman et al., 2000**).

Ces plantes médicinales sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique, elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement (ou parfois un seul) sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine (**Dakuyo, 2004**).

#### 3.2. La composition chimique des plantes médicinales

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires (glucides, protides, lipides acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires ». Ces derniers sont indispensables à la nutrition, ils assurent la croissance, et le développement d'un organisme.

Les métabolites secondaires contiennent un grand groupe de composés structurellement divers provenant soit de métabolites primaires, soit d'intermédiaires dans les voies biosynthétiques de ces métabolites primaires (**Piasecka et al., 2015**). Selon leurs voies biosynthétiques, les métabolites secondaires sont généralement classés en plusieurs grandes familles moléculaires (**Kessler et Kalske, 2018**).

### 3.2.1. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent la famille de produits naturels la plus diverse structurellement, stéréochimiquement et fonctionnellement avec plus de 55 000 molécules identifiées à ce jour dans toutes les formes de vie. Des centaines de nouvelles structures sont reportées chaque année, leurs structures varient d'une simple chaîne linéaire d'hydrocarbures jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés.

Certains terpénoïdes végétaux tels que les stérols et les carotènes font partie du métabolisme primaire et sont présents dans toutes les plantes, cependant, la majorité des terpénoïdes végétaux sont des métabolites secondaires. Ils sont stockés dans les vacuoles au niveau de l'écorce, des épines, des racines ou encore des feuilles (**Kaur et Tawseef, 2021**).

### 3.2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes végétaux, l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires, sont des substances basiques qui contiennent un ou plusieurs atomes d'azote, généralement en combinaison dans le cadre d'un système cyclique (**Barbosa-Filho et al., 2006**). Ils existent principalement dans les plantes à fleurs, dans les végétaux inférieures, les insectes, les organismes marins, les micro-organismes et les animaux.

Ces composés ont un large spectre d'activité pharmacologique, en présentant des propriétés antivirales, antibactériennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (**Adamski et al., 2020**). Plusieurs alcaloïdes isolés à partir de plantes médicinales ont montré une action hypoglycémiant sur différents modèles d'animaux, la magnoflorine, alcaloïde extrait de *Tinospora cordifolia*, possède une activité hypoglycémiant *in vivo* et *in vitro*. Le mode d'action est dû à l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase (**Patel et Mishra, 2012**).

### 3.2.3. Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des molécules appartenant au métabolisme secondaire des plantes. Ils peuvent être divisés en diverses classes sur la base

de leur structure moléculaire, les plus abondants sont les acides phénols, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes, dont les flavonoïdes et les acides phénols comptent 60% et 30% respectivement (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Cette diversité leur permet d'avoir diverses propriétés biologiques importantes, notamment des activités anti-oxydantes, anticancéreuses, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-athéroscléroses ainsi qu'une protection cardiovasculaire, une inhibition de l'angiogenèse et une amélioration de la fonction endothéliale (**Han et al., 2019**).

### 3.3. Plantes médicinales et traitement du diabète

Selon le rapport de l'OMS, 80 % de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se traiter de diverses maladies. Ce taux remarquablement élevé, peut être expliqué par l'efficacité thérapeutique de ces remèdes naturels prouvée au sein de la population, et aussi par leur disponibilité et leur faible coût (**Schlienger, 2014**).

Une des remarquables applications de la phytothérapie, est l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement du diabète sucré. Ainsi plusieurs plantes sont utilisées par la population pour maintenir un taux de glucose sanguin dans les normes (**Mohamed et al., 2014**).

Environ 1200 plantes, couvrant 725 genres différents et 183 familles dans le monde sont jugées bénéfiques pour les diabétiques, ces plantes à activité antidiabétique ont pris un grand intérêt et ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche, car ces plantes sont douées d'un pouvoir de faire réguler la glycémie des patients diabétiques.

D'après les revues scientifiques, ces plantes appartiennent principalement aux familles suivantes ; Légumineuses, Lamiacées, Liliacées, Cucurbitacées, Astéracées, Moracées, Rosacées et Araliacées (**Patel et al., 2011**).

L'Algérie, de part sa situation géographique, bénéficie d'un climat très diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes. Ces plantes constituent des remèdes naturels potentiels qui peuvent être utilisés en traitement curatif et préventif (**Mahmoudi, 2013**). Elle possède un riche patrimoine d'agro ressources médicinales et alimentaires utilisées traditionnellement pour traiter plusieurs maladies, dont le diabète (**Kambouche et al., 2009**).

Les plantes médicinales ayant un effet sur le diabète semblent agir à des niveaux différents. D'après les études pharmacologiques, plusieurs mécanismes d'action des groupements actifs ont été rapportés.

### 3.4. Mode d'action des plantes médicinales antidiabétique

De multiples mécanismes sont impliqués dans la baisse du niveau de glucose dans le sang. Ceci est dû à la grande variété de classes chimiques des constituants hypoglycémiantes provenant des plantes. Certains de ces composés se révèlent véritablement hypoglycémiantes et pourraient avoir un potentiel thérapeutique, alors que d'autres produisent simplement une hypoglycémie comme effet parallèle de leur toxicité, particulièrement hépatique (**Jarald *et al.*, 2008**).

Les plantes médicinales ou leurs extraits utilisés dans le traitement du diabète peuvent agir par différents mécanismes d'action (**Fig 3.1**) (**Governa *et al.*, 2018**).

#### 3.4.1. Augmentation de la sécrétion d'insuline

Certaines plantes ou leurs constituants bioactifs peuvent agir comme antidiabétiques en stimulant la sécrétion de l'insuline. L'augmentation de l'insuline plasmatique peut être attribuée à la préservation de la survie des cellules bêta pancréatiques, ou à la stimulation de la libération de cette hormone.

Plusieurs études ont indiqué que les flavonoïdes (par exemple, quercétine, kaempférol, lutéoline et épicatechine) améliorent la libération de l'insuline stimulée par le glucose et neutralisent le dysfonctionnement des cellules bêta induit par les cytokines (**Ghorbani *et al.*, 2019**).

#### 3.4.2. Inhibition de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase

Les acides phénoliques sont l'un des polyphénols les plus courants, comprenant des phénols aromatiques de métabolites secondaires de plantes avec un groupe fonctionnel d'acide carboxylique (**Aleixandre *et al.*, 2022**). Leur activité inhibitrice contre les enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase a été liée à leur structure, qui leur permet d'interagir avec l'enzyme ou le substrat de la réaction. Cependant, certains flavonoïdes montrent plus d'efficacité dans l'inhibition des deux enzymes digestives, ils agissent par la liaison directe aux résidus d'acides aminés dans les sites actifs des enzymes et excluent la liaison du substrat (**Zhu *et al.*, 2020**).

### 3.4.3. Augmentation de la sécrétion de glucagon-like peptide-1 (GLP-1)

Le Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) est une incrétine sécrétée par les cellules L entéroendocrines. Les effets antidiabétiques des polyphénols sont particulièrement liés à la sécrétion et aux effets de l'insuline et du peptide de type glucagon 1 (GLP1).

Les polyphénols de diverses sources stimulent les cellules L à sécréter le GLP1, augmentent sa demi-vie en inhibant la peptidase dipeptidyle 4 (DPP4), stimulent les cellules  $\beta$  à sécréter de l'insuline et stimulent la réponse périphérique à l'insuline, donc d'une façon générale ces composés agissent par augmentation des effets globaux de l'axe GLP1-insuline (Domínguez *et al.*, 2017).

### 3.4.4. Inhibition de la formation des produits de glycation avancée (AGE)

Les AGE sont des biomolécules d'origine naturelle formées par l'interaction des sucres réducteurs avec d'autres molécules telles que les protéines et les lipides. La glycémie élevée et la glycation accélèrent la formation d'AGE (Anwar *et al.*, 2021). Les composants des extraits végétaux naturels ont été évalués pour leur rôle dans l'inhibition du développement des AGE. Jusqu'à présent, les antioxydants phénoliques sont considérés comme les agents les plus puissants capables d'inhiber la glycation et la formation d'AGE à de multiples niveaux (Khan *et al.*, 2020).

Certains composés polyphénoliques régulent le métabolisme de la glycémie par amplification de la résistance à l'insuline cellulaire et activation de la voie de signalisation de protéine de liaison de facteur de croissance comme l'insuline. Leur nature antioxydante, leur activité chélatrice des métaux, et leur capacité à piéger les composés dicarbonyles intermédiaires pourraient être des mécanismes possibles contre la glycation et la formation d'AGE (Anwar *et al.*, 2021).

### 3.4.5. Augmentation et translocation du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4)

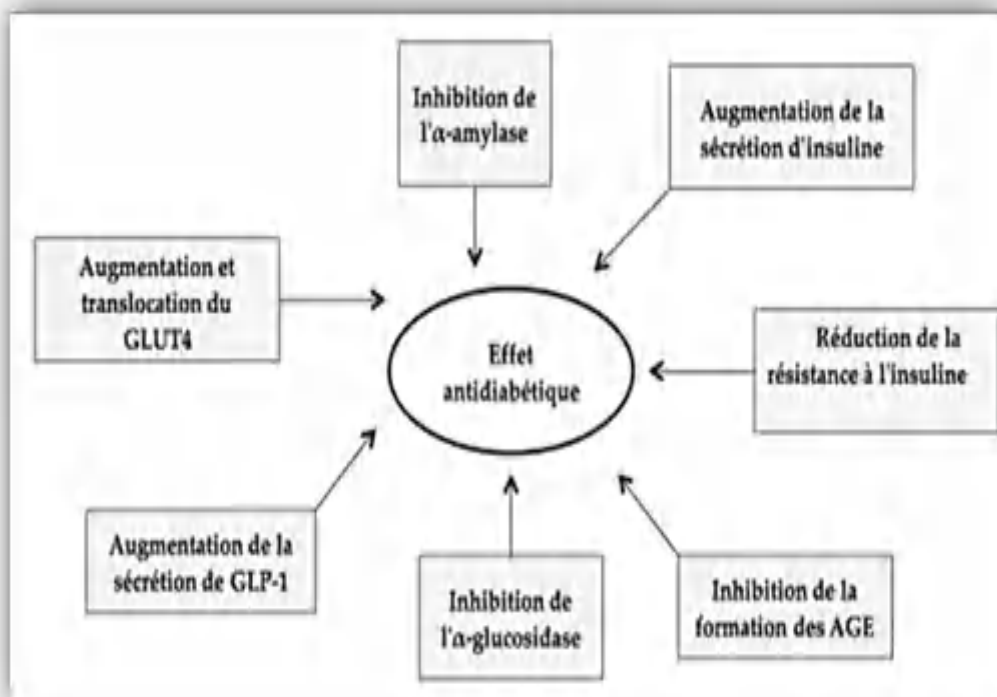
Le GLUT4 est l'un des plus importants transporteurs de glucose situés à la surface de la membrane des adipocytes, des cellules musculaires squelettiques et cardiaques. En effet, l'insuline provoque la translocation de petites vésicules intracellulaires contenant de GLUT4 vers la membrane, permettant ainsi au glucose de pénétrer dans la cellule. Par la suite, l'augmentation de l'expression de ces transporteurs aide à débarrasser le corps de l'excès de glucose en le convertissant en glycogène.



En effet, les flavonoïdes contenus dans les plantes médicinales améliorent l'expression de GLUT-4 et la translocation à la membrane plasmique par l'activation de la signalisation PI3K/Akt insulino-sensible et des voies d'activation AMPK, SIRT-1 et MOR insulino-indépendantes pour la régulation de l'homéostasie du glucose (Dinda *et al.*, 2020).

### 3.4.6. Réduction de la résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline (RI) est une condition pathologique dans laquelle les cellules ne répondent pas normalement à l'insuline. Certains polyphénols, sous forme de suppléments ou dans les aliments, peuvent améliorer la résistance à l'insuline par plusieurs mécanismes, notamment en abaissant le glucose postprandial, en modulant le transport du glucose, en affectant les voies de signalisation de l'insuline et en protégeant cellules  $\beta$  pancréatiques sécrétant de l'insuline contre les dommages (Williamson et Katherine, 2020).



**Figure 3.1:** Principaux mécanismes antidiabétiques des plantes médicinales (adapté d'El omari, 2022).

### 3.5. Le genre *Thymus*

#### 3.5.1. Description botanique

Les Labiées ou Lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 genres et de 6900 à 7200 espèces qui se répartissent sur tout le globe. C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces, ses espèces végétales sont répertoriées dans tous les territoires saharien, semi-aride, et humide (Heywood *et al.*, 2007).

La famille des Lamiacées contient une très large gamme de composés comme les terpénoïdes, les iridoïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaînes des terpénoïdes qui sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des Lamiacées (Yahia *et al.*, 2019).

Le genre *Thymus* constitue l'un des genres majeur de cette famille, il comprend environ 220 espèces aromatiques, qui sont principalement des herbacées, des vivaces, des petits arbustes que l'on trouve dans la région méditerranéenne, qui est le centre de tout le genre, et qui sont également caractéristiques en Asie, en Europe du Sud et en Afrique du Nord (Figueiredo *et al.*, 2010). Les plantes appartiennent à ce genre sont des plantes sous-ligneuses érigées ou prostrées, odorantes, ses feuilles sont plus au moins contractées, le calice est tubuleux à 2 lèvres, la supérieure à 3 dents, l'inférieure à 2, ciliées dentées, les étamines comportent 4 saillantes plus au moins divergentes avec des carpelles lisses.

#### 3.5.2. Origine et répartition géographique du genre *Thymus*

L'origine du nom est sujette à diverses interprétations : Thym proviendrait du mot latin "*Thymus*" qui signifie "Parfumé", Thym à partir du mot grec "Thumos" qui signifie parfumer à cause de l'odeur agréable que la plante dégage. Le thym, communément appelé "Zaater" en Algérie, fait partie du genre *Thymus* défini comme un ancien groupe tertiaire, ayant son origine dans le sud-est de l'Espagne.

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales à cause de sa superficie et sa diversité bioclimatique. Le thymus comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Benayache, 2013). Le tableau (3.1) montre la localisation des principales espèces de thym en Algérie.

**Tableau 3.1:** Localisation des principales espèces du genre *Thymus* en Algérie (Touhami, 2017).

Espèces	Partie de la plante	Localisation
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<i>T. munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord Algérois.
<i>Thymus Commutatu</i>	Battandier	Endémique Oran
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous-secteur de l'Atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne, Tell constantinois
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois
<i>Thymus lancéoatus</i>	Desfontaine	Rare dans : Le secteur de l'Atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous-secteur des Hauts Plateaux algérois, oranais (Tiaret) et constantinois
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous-secteur de L'Atlas Saharien et constantinois
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois et oranais
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

### 3.5.3. Usage et propriétés du genre *Thymus*

- Assaisonnement des aliments et des boissons.
- Les principaux constituants du *Thymus* montrent des propriétés vermifuges et vermicides (Bazylo et Strzelecka, 2007).
- Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2006).
- Propriétés anthelminthiques (Al-Bayati *et al.*, 2008).
- Propriétés antioxydantes en raison de ces propriétés, le thym est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons durant leur stockage (Selmi et Sadok, 2008).

### 3.5.4. Composition chimique du genre *Thymus*

Les huiles essentielles sont des composants aromatiques importants des herbes et des épices, il s'agit des liquides volatils, insolubles dans l'eau, très solubles dans l'alcool, l'éther, les huiles végétales et minérales. Leurs activités biologiques sont connues et utilisées depuis l'Antiquité dans la parfumerie, la conservation des aliments, l'aromatisation et la médecine (Herman *et al.*, 2019). Ces huiles contenues dans les plantes constituent une source potentielle de molécules bioactives.

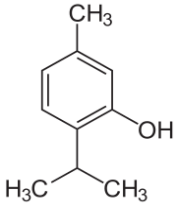
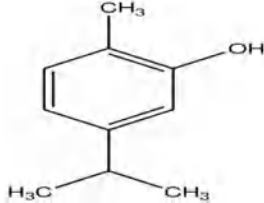
La composition chimique des huiles essentielles de *Thymus* a été étudiée par plusieurs groupes de recherche (Tab 3.2). Ce genre végétal est considéré comme une source importante des huiles essentielles. En particulier, ces huiles extraites des espèces de *Thymus* sont considérées comme les plus actives huiles à cause de la présence de terpènes et terpénoïdes aromatiques, de flavonoïdes, et en raison de leur forte concentration en composés phénoliques principalement le thymol et le carvacrol (Tab 3.3). Le thym contient aussi des tanins, des principes amers, des saponines et des antiseptiques végétaux (Mokhtari *et al.*, 2021). Il existe également d'autres composés non phénoliques plus ou moins biologiquement actifs tels que l'eugénol, le p-cymène,  $\gamma$ -terpinène, linalool, germiniol et broneol (Sidali *et al.*, 2017).

En raison de cette teneur élevée en métabolites secondaires, ses huiles sont parmi les dix meilleures huiles essentielles du monde, présentant des propriétés antibactériennes, antimycotiques, et antioxydantes (Mahdavi et Karimzadeh, 2010).

Tableau 3.2: Composition chimique de l'huile essentielle de différentes espèces de *Thymus*.

Espèces	Pays	Composition majoritaire	Références
<i>Thymus revolutus</i>	Turquie	Carvacrol 43,13% $\gamma$ - terpinène 20,86% p-cymène 13,94%	Karaman <i>et al.</i> ,2001
<i>Thymus bleicherianus</i>	Maroc	Carvacrol 70,92% p-cymène 6,34	El Ajjouri <i>et al.</i> ,2008
<i>Thymus capitatus</i>	Maroc	$\alpha$ – terpinène 42,23% Thymol 23,95	El Ajjouri <i>et al.</i> ,2008
<i>Thymus numidicus poiret</i>	Algérie	Thymol 23,92% Linalol 17,20% $\gamma$ –terpinène 10,84%	Zeghib <i>et al.</i> ,2013
<i>Thymus numidicus</i>	Algérie	Thymol 60,80% p-cymène 10,30% $\gamma$ –terpinène 7,60%	Giordani <i>et al.</i> ,2008
<i>Thymus algeriensis</i>	Algérie	Thymol 71,45% Linalool 7,89%	Chemat <i>et al.</i> ,2012
<i>Thymus algeriensis</i>	Maroc	Camphre 27,70% $\alpha$ –pinène 20,50%	Amarti <i>et al.</i> ,2008
<i>Thymus ciliatus</i>	Maroc	Thymol 44,2% E-ocimène 25,8% $\alpha$ - terpinène 12,3%	Amarti <i>et al.</i> ,2008
<i>Thymus serpyllum</i>	Slovaquie	Thymol, 18.8%; Carvacrol, 17.4%; O-cymene, 15.4%; Geraniol, 10.7%	Galovičová <i>et al.</i> , 2021
<i>Thymus vulgaris</i>	Italie	Thymol 35.84– 41.15%, p-cymene 17.50–21.73%, c- terpinene 15.06– 18.42%, linalool 2.55–5.37%, carvacrol 1.45–1.70%	Tardugno <i>et al.</i> , 2022

Tableau 3.3: Propriétés du thymol et du carvacrol (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2015).

	Thymol	Carvacrol
Nom	2-isopropyl-5-méthylphénol	5-isopropyl-2-méthylphénol
Couleur	Blanc cristallin	Blanc jaune
Structure moléculaire		
Masse moléculaire	150,22	150,21
Point d'ébullition	233 °C	236-237 °C
Indice de réfraction	1,522 dans 20 °C	1,5209 dans 20°C
solvant	Alcool et solvants organiques	Alcool et solvants organiques

### 3.5.5. Activité anti-inflammatoire

Le thym joue un rôle protecteur contre divers troubles inflammatoires. Cependant, le mécanisme d'action possible c'est l'interaction de leurs compositions phytochimiques avec des médiateurs pro-inflammatoires (Olaoye *et al.*, 2021).

Ce genre de plante contient des flavonoïdes comme le kaempferol et les dérivés de la quercétine, ainsi que des acides hydrocinnamiques, qui sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires (Tlili *et al.*, 2011). En plus cette activité anti-inflammatoire peut être attribuée à la forte teneur du *Thymus* en huiles essentielles, qui en plus de leurs capacité à piéger les radicaux libres, possèdent aussi une activité anti-inflammatoire (Miguel, 2010).

Les plantes de *Thymus* ont révélé une activité anti-inflammatoire dans divers modèles d'inflammation *in vitro* et *in vivo*, prenant l'exemple de l'étude réalisée par El Ouahdani *et al.*, (2021) qui ont montré la capacité anti-inflammatoire du *Thymus* après l'évaluation du développement de l'œdème induit par l'injection de carraginine. En outre, Chen *et al.*, (2020) ont découverts que le thymol a pu atténué la réponse inflammatoire via la régulation des sécrétions de cytokines et la suppression des voies de signalisation TNF- $\alpha$  et IL-6.

### 3.5.6. Activité antioxydante

Plusieurs molécules à propriétés antioxydantes sont isolées des plantes, il est donc louable de chercher des antioxydants naturels efficaces sans ou présentant moins d'effets secondaires pour remplacer les antioxydants synthétiques. L'activité antioxydante des extraits de plante est essentiellement associée aux composés phénoliques en particulier aux flavonoïdes (Kumaran et Karunakaran, 2007).

Les composants du *Thymus* sont assez nombreux, il constitue une véritable source de molécules bioactives naturelles en particulier dans ses huiles essentielles. Le thym contient encore des flavonoïdes comme la lutéine, l'apigénine, la naringénine, la lutéoline et la thymonin (El-Guendouz *et al.*, 2019). Ces composants phénoliques, pourraient interagir avec les radicaux libres par voie électronique ou hydrogène, montrant la capacité antioxydante du *Thymus*. Cette activité pourrait être attribuée aussi à la présence des composants phénoliques non volatils, notamment l'acide rosmarinique qui est un antioxydant puissant (Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012).

De nombreuses études antérieures ont évalué l'activité antioxydante des espèces du genre *Thymus* en utilisant différentes méthodes (Tab 3.4).

**Tableau 3.4:** Activité antioxydante de quelques espèces du genre *Thymus*.

Espèces	Huile essentielle/extrait	Méthode utilisée	Concentration	Références
<i>Thymus zygis</i>	extrait	DPPH	12,65 ± 2,30 µg/mL	Afonso <i>et al.</i> , 2018
<i>Thymus zygis</i>	Huile	DPPH	75,97 ± 0,86 µg/ml	Amarti <i>et al.</i> , 2011
<i>Thymus mastichina</i>	Extrait	ABTS	71,18 ± 1,05 µg/mL	Taghouti <i>et al.</i> , 2019
<i>Thymus riatarum</i>	Extrait	DPPH	0,091 ± 0,02 mg/ml	Aouam <i>et al.</i> , 2019
<i>Thymus Capitatus</i>	Huile	DPPH, FRAP, TAC	0,61, 2,13 et 0,78 µg/mL	Goudjil <i>et al.</i> , 2020
<i>Thymus migricus</i>	Huile	DPPH	176,8 µg/mL	Tohidi <i>et al.</i> , 2020
<i>Thymus caramanicus</i>	Huile/Extrait	Le β-carotène/acide linoléique, DPPH	43,0 µg/mL ± 19,7 µg/mL	Safaei-Ghomi <i>et al.</i> , 2010
<i>Thymus algeriensis</i>	Huile	DPPH	1800 µg/mL	Hamdani <i>et al.</i> , 2014

<i>Thymus satureioides</i>	Huile	DPPH	8.18 ± 0.07 µg/mL	Labiad <i>et al.</i> , 2017
<i>Thymus daenensis</i>	Huile/Extrait	DPPH	194 ± 0.02 µg/mL	Sabahi <i>et al.</i> , 2013
<i>Thymus pubescens</i>	Huile	DPPH	29.67±33.38µg /mL	Nickavar et Esbati, 2012
<i>Thymus sipyleus</i>	Huile	le β- carotène/acide linoléique, DPPH	2670 ± 0.5 µg/mL	Tepe <i>et al.</i> , 2005
<i>Thymus pulegioides</i>	Extrait	DPPH	11±15 µg/mL	Pérez- Tortosa <i>et al.</i> , 2012
<i>Thymus membranaceus</i>	Extrait	DPPH, ABTS, FRAP	10 µM	Pérez- Tortosa <i>et al.</i> , 2012

### 3.5.7. Activité antidiabétique

Il existe de nombreuses plantes antidiabétiques qui ont pour propriété d'aider l'organisme à gérer les pics ou les chutes de glycémie. Des efforts considérables ont été réalisés ces dernières années afin d'identifier de nouvelles substances naturelles antidiabétiques capable de diminuer l'hyperglycémie. Les effets de *Thymus* sur certaines complications du diabète induit chez les animaux, ont fait l'objet de nombreux travaux.

L'extrait aqueux de *Thymus serrulatus* administré par voie orale (à raison de 600mg/kg) a abaissé d'une façon significative la glycémie à jeun chez les souris saines et les souris dont le diabète a été induit par la streptozotocine (Haile *et al.*, 2021). Cela est dû grâce à la capacité de la plante à stimuler l'élimination du glucose, à réduire la libération de glucagon ou l'augmentation de la sécrétion de l'insuline, et à favoriser les tissus périphériques pour stimuler le processus de glycolyse (Alamgir, 2017).

D'autres recherches ont révélé que le *Thymus* exhibe, *in vitro*, une action inhibitrice sur les enzymes digestives α-amylase et α-glucosidase (Radünz *et al.*, 2021). La diminution de l'action de ces enzymes retarde l'augmentation de la glycémie dans le sang après l'ingestion d'une alimentation riche en glucides et c'est l'un des mécanismes importants pour réduire le glucose postprandial en circulation qui peut empêcher le déclenchement de complications du diabète (Lebovitz, 1997).



Des études pharmacologiques *in vivo*, ont montré d'autres propriétés, le thym possède des propriétés hypolipidémique par la stimulation de la lipogenèse et l'inhibition de la lipolyse (Yalcin *et al.*, 2020).

Sur le plan histologique, de multiples travaux ont montré la capacité de *Thymus* à améliorer les lésions histologiques de quelques organes vitales tels que le foie, les reins, le cœur, et le cerveau chez les rats diabétiques.

L'extrait alcoolique de *Thymus vulgaris* a amélioré d'une manière significative les lésions hépatiques observées au niveau du foie des rats rendus diabétiques par la STZ, cela est dû à la richesse de la plante par l'acide caféique qui, à son tour, réduit le taux des enzymes hépatiques et protégeant les hépatocytes des dommages (Azimi *et al.*, 2021). Une autre étude faite par Hajjalizadeh *et al.*, (2014) qui ont montré l'effet neuroprotecteur de l'extrait éthanolique de *Thymus caramanicus*, en causant une amélioration considérable des lésions pathologiques du cerveau en raison de la haute teneur de cet extrait en composés phénoliques.

D'autres recherches ont révélé que le thymol exerce, *in vivo*, un effet néphroprotecteur en améliorant les lésions tissulaires observées dans les reins des souris rendues diabétiques par la STZ, via la suppression de l'expansion de la matrice mésangiale extracellulaire et de la glomérulosclérose (Saravanan et Leelevinothan, 2016).

L'activité antioxydante des composés phénoliques de *Thymus* est également liée à leur effet hypoglycémique, qui agissent sur le diabète au niveau cellulaire en favorisant l'action de l'insuline (Kim *et al.*, 2017). Cet effet hypoglycémiant peut être également dû à l'action du thymol ou du carvacrole qui ont la capacité à stimuler l'élimination du glucose de la circulation, à réduire la libération de glucagon ou l'augmentation de l'insuline, à diminuer l'absorption du glucose, ou à stimuler les tissus périphériques pour entrer directement dans le processus de la glycolyse (Khafaji, 2018).

### 3.5.8. L'espèce *Thymus algeriensis*

#### 3.5.8.1. Caractérisation botanique

La *Thymus algeriensis* est une plante herbacée parfumée qui représente l'épice aromatique, il se reproduit par graines et peut atteindre 15 à 30 cm de haut par 40 cm de large, c'est un sous-arbuste à feuilles persistantes buissonnant à base de bois avec de petites

feuilles très aromatiques gris-vert et des grappes de fleurs violettes ou roses au début de l'été. En Algérie et en Afrique du Nord, cette plante aromatique est bien connue sous le nom de « Zaater » (Khadraoui *et al.*, 2016).



**Figure 3.2:** L'espèce *Thymus algeriensis* (Boutaoui *et al.*, 2018).

### 3.5.8.2. Répartition géographique et utilisation

*Thymus algeriensis* est l'espèce nord-africaine la plus répandue. Elle est endémique en Libye, en Tunisie, en Algérie et au Maroc. En Algérie, il est très commun dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Sobeh *et al.*, 2020). Le thym est largement utilisé, frais ou séché, principalement comme herbe culinaire pour assaisonner les aliments et des boissons. D'autre part, l'espèce est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les troubles respiratoires, les maladies du tube digestif, et considérée aussi comme anti-abortif (Guesmi *et al.*, 2018). La composition chimique des huiles essentielles que contiennent la plante a été préalablement étudiée avec une attention exclusive aux composants volatils, bien que les résultats de son activité biologique soient limités (Nikolic *et al.*, 2014).

**DEXIEME PARTIE**

**PROTOCOLES  
EXPERIMENTAUX**



**CHAPITRE 04**

**Matériel et méthodes**



## 4. Matériel et méthodes

### 4.1. Matériel végétal et screening phytochimique

#### 4.1.1. Récolte du *Thymus algeriensis*

La plante *Thymus algeriensis* est récoltée de la chaîne montagneuse de la wilaya de Msila. La récolte est réalisée au mois de Mai 2016 et identifiée par le professeur Mohamed Kaabeche (département de biologie, université Sétif 1). Les parties aériennes de la plante étaient séparées manuellement, séchées à une température contrôlée ( $40 \pm 1$  °C) dans l'obscurité jusqu'à obtenir un poids constant.

Ensuite, le matériel végétal a été réduit en poudre à une granulométrie uniforme et stocké dans l'obscurité à -20°C dans des bocaux fermés hermétiquement jusqu'à son utilisation.

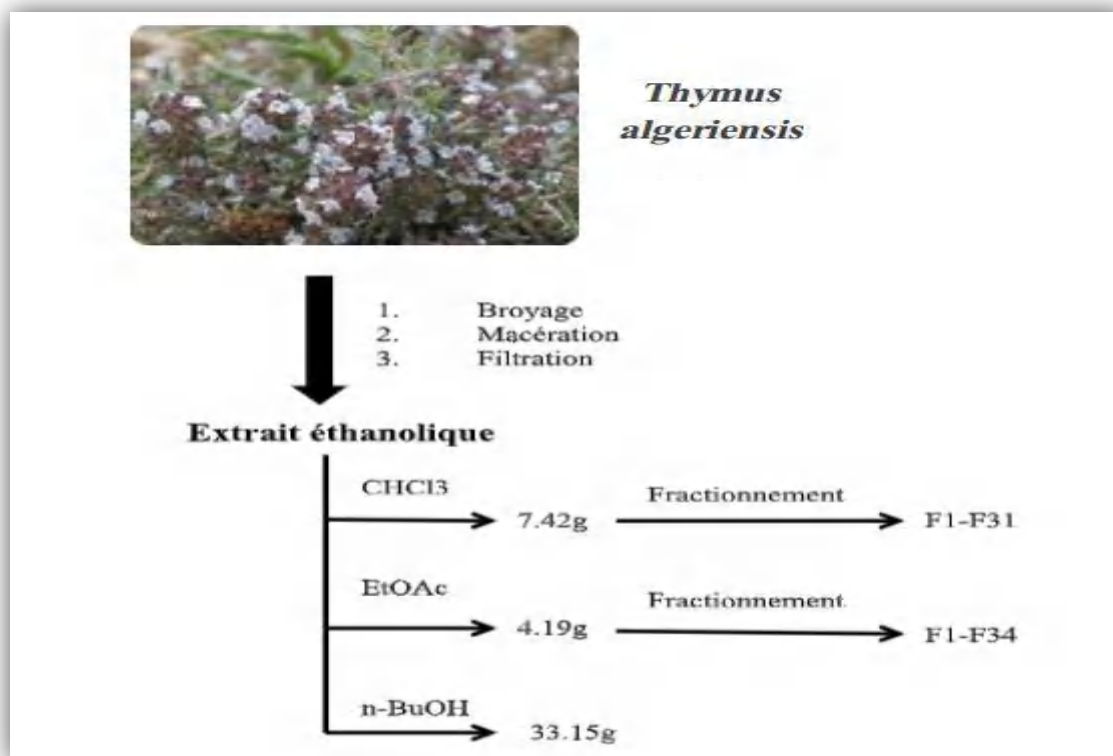
#### 4.1.2. Préparation de l'extrait n-BuOH

Les parties aériennes séchées à l'air (feuilles et fleurs, 2,0 kg) de *T. algeriensis* ont été réduites en poudre (léger broyage à température contrôlée, jusqu'à 35 °C) et macérées à température ambiante avec EtOH-H<sub>2</sub>O 70:30, (v/v) (15 L) pendant 24 h, quatre fois avec du solvant frais.

Après une étape de filtration, les extraits ont été combinés, concentrés sous pression réduite, dilués dans H<sub>2</sub>O (800 ml) sous agitation magnétique et maintenus à 4 °C pendant la nuit pour précipiter les chlorophylles.

Après une deuxième étape de filtration, la solution obtenue a été extraite avec des solvants de polarités croissantes (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol).

Chaque extrait a été séché avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtré sur Chromafil® PET 20/25 (taille de pore de 0,2 µm, Machery-Nagel AG, Oensingen, Suisse) dans des flacons en verre brun et concentré sous vide (jusqu'à 35 °C) pour donner les extraits suivants : CHCl<sub>3</sub> (7,42 g), EtOAc (4,19 g), n BuOH (33,15 g).



**Figure 4.1:** Organigramme schématique réalisé sur les parties aériennes de *Thymus algeriensis* (Boutaoui *et al.*, 2018).

Le *Thymus algeriensis* est une espèce qui s'est classée comme suit :

**Tableau 4.1:** Classification botanique de *Thymus algeriensis* (Quezel et Santa, 1963).

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotes
Sous classe	Astérides
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus algeriensis</i>

### 4.1.3. Dosage des polyphénols totaux

#### ➤ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et phosphomolibdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Harju et Martti, 2006**).

#### ➤ Mode opératoire

Le dosage des polyphénols se fait par la méthode de **Dewanto et al., (2002)** (méthode de Folin-Ciocalteu). Une prise de 125µl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 500µl d'eau distillée et de 125µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 3 min, 1250µl d'une solution de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> à 7% sont ajoutés et le mélange est ajusté à 3ml avec l'eau distillée. Le tube est placé au repos pendant 90 min à température ambiante et à l'obscurité, après quoi l'absorbance est mesurée à 760 nm.

### 4.1.4. Dosage des flavonoïdes totaux

#### ➤ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Harju et Martti, 2006**).

#### ➤ Mode opératoire

La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> légèrement modifiée a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans l'extrait (**Brighente et al., 2007**).

Brièvement, 1 ml de la solution d'extraits est ajouté à 1 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2% dans le Méthanol. Après incubation pendant 60 min à température ambiante, l'absorbance est lue à 415 nm dans un spectrophotomètre contre le blanc. L'apparition de la couleur jaune indique la présence des

flavonoïdes. Les échantillons ont été préparés en triple. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait de la plante.

#### 4.1.5. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

##### ➤ Principe

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (liquid chromatography – mass spectrometry ou LC-MS) est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

##### ➤ Mode opératoire

Les analyses qualitatives et quantitatives des composés polyphénoliques ont été effectuées par LC-MS. Thermo Scientific - Dionex Ultimate 3000 -TSQ Quantum avec Thermo ODS Hypersil 250×4,6 mm, colonne de 5µm ont été utilisés pour l'analyse quantitative. Le volume d'injection était 20 µL. La phase mobile comprenait l'éluant A, de l'eau avec 0,1 % d'acide formique et B, du méthanol. Le débit était de 0,7 ml/min à 40 °C. Le programme de gradient a été fixé comme suit : 0-1 min, 100% A, 5-20 min, 95% A, 1-22 min, 5% A, 25 min, 5% A, 30 min 0%A. La durée totale du processus était 30 min. Les extraits ont été préparés à 1 mg / 1mL puis analysés. La relation entre la surface du pic et la concentration s'est avérée linéaire de 0,5 à 10 mg/L (ppb) pour chaque composé. La linéarité a été évaluée à l'aide d'une analyse de régression linéaire de six points pour chaque composé. Le tracé linéaire consiste en trois répétitions par point. Pour tous les analytes, les coefficients de corrélation (valeurs R2) se sont avérés être  $\geq 0.99$ .

Les valeurs LOD et LOQ des composés de la méthode LC-MS/MS sont indiquées dans le tableau. La LOD et la LOQ ont été déterminées en utilisant des mesures de blancs de réactifs dopés avec de faibles concentrations d'analyte selon EURACHEM GUIDE. La solution témoin a été dopée à l'étalon de 0,1 ppm.

Calculer LOD et LOQ comme  $LOD = 3 \cdot S_0$  et  $LOQ = 10 \cdot S_0$



Tableau 4.2: Les valeurs LOD et LOQ des composés de la méthode LC-MS/MS

Parent	Produit	CE	Polarité	Nom	Parent	Produit	CE	Polarité	Nom
121,9	93,5	25	-	4-hydroxybenzaldehyde	273	147,1	20	+	Naringenin
	121,1	20	-			153	24	+	
131,1	77,3	25	+	Acide cinnamique	287	153	33	+	Kaempferol
	103,2	14	+			165	28	+	
137,9	66,6	38	-	acide p-hydroxybenzoïque	289,2	203,9	22	-	Catéchine
	94,6	17	-			245,7	17	-	
153,7	109,5	21	-	acide Gentisique	291,5	123,3	15	+	Epicatéchine
155,01	65,4	22	+	acide Protocatechuique		139,3	16	+	
	93,2	13	+		301	152,1	23	-	Quercetine
163,9	94,3	33	-	acid coumarique p-		179,9	20	-	
	120,2	17	-		353,4	86,5	43	-	acide Chlorogénique
167,8	109,4	19	-	acide Vanillique		192,1	21	-	
	153,2	16	-		359,2	134,3	44	-	acide Rosmarinique
169,7	80,5	25	-	acide Gallique		162,2	20	-	
	126,2	16	-		473,1	136,3	48	-	acide Cichorique
179,7	135,2	27	-	acide Caffeique		180,1	29	-	
	136,2	18	-		539,1	275,8	22	-	Oleuropeine
195,4	89,4	30	+	acide Ferulique		377,5	16	-	
	177,4	7	+		553,2	263	20	+	Hesperidine
228,98	107,2	22	+	Resveratrol		313	20	+	
	135,1	14	+		609,4	300,6	38	-	Rutine
						301,7	34	-	

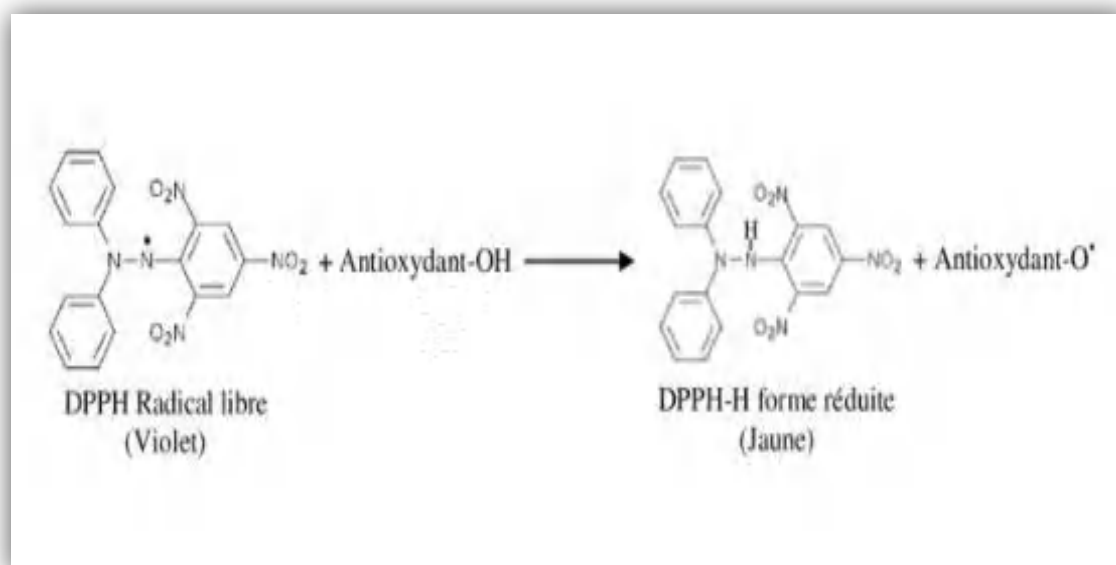
## 4.2. Screening biologique

### 4.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

#### 4.2.1.1. Effet anti-radicalaire par le test au DPPH°

##### ➤ Principe

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazyl de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Molyneux, 2004).



**Figure 4.2:** Réaction de test DPPH° (Molyneux, 2004).

##### ➤ Mode opératoire

L'activité anti radicalaire est mesurée par la dégradation du DPPH°, suivant la méthode proposée par **Ohinishi *et al.*, (1994)** avec une légère modification.

Pour mesurer cette activité, une prise d'essai 0.5ml de l'extrait à différentes concentrations est mélangée avec 0.5ml d'une solution de DPPH° (0,2 mM dans le méthanol). Après une agitation vigoureuse du mélange, il est laissé au repos pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre-UV visible, en se référant à un témoin sans extrait.

La quercétine, le trolox, et le butylated hydroxyanisole (BHA) ont été utilisés comme standards et dissous dans du méthanol pour obtenir la solution mère à la même concentration (1 mg/ml). Pour chaque concentration, le test est répété trois fois. L'activité anti radicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$PI = (DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{extrait}} / DO_{\text{témoin}}) \times 100$$

PI= pourcentage d'inhibition,

DO<sub>témoin</sub>= absorbance du témoin.

DO<sub>extrait</sub>= absorbance de la solution d'extrait.

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC<sub>50</sub>) ; la valeur d'IC<sub>50</sub> est exprimée en µg/ml.

#### 4.2.1.2. Capacité antioxydante totale (CAT)

##### ➤ Principe

Cette technique est basée sur la réduction des molybdates Mo(VI) en molybdène Mo (V) en présence d'un antioxydant avec la formation d'un complexe vert (phosphate/ Mo(V)) a pH acide (**Prieto et al., 1999**).

##### ➤ Mode opératoire

L'activité antioxydante totale des échantillons a été évaluée par la méthode du phosphomolybdène proposée par **Prieto et al., (1999)**. Une solution d'échantillon (0,4 ml) à différentes concentrations (100 -1000µg.mL<sup>-1</sup>) a été combinée avec 4 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes ont été incubés dans un bain d'eau bouillante à 95°C pendant 90 minutes. Après incubation, les échantillons ont refroidi à température ambiante, l'absorbance de la solution aqueuse de chacun d'entre eux a été mesurée à 695 nm contre le blanc. Le blanc a été préparé en utilisant du méthanol au lieu de la solution d'extrait. Tous les tests ont été effectués en trois exemplaires.

La quercétine, le trolox, et le butylated hydroxyanisole (BHA) ont été utilisés comme étalons.

#### 4.2.1.3. Le pouvoir réducteur

##### ➤ Principe

Les substances qui ont un potentiel de réduction réagissent avec le ferricyanure de potassium ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pour former le ferrocyanure de potassium ( $\text{Fe}^{2+}$ ), qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe du fer ferrique qui a un maximum d'absorption à 700 nm (Oyaizu, 1986).

Potassium ferricyanide + Ferric chloride  $\xrightarrow{\text{Antioxydant}}$  Potassium ferrocyanide + ferrous chloride

##### ➤ Mode opératoire

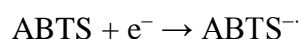
Le pouvoir réducteur de l'extrait a été déterminé selon la méthode de **Beretta *et al.*, (2005)**. Diverses concentrations des solutions d'échantillon (5-600  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) ont été mélangées avec un tampon phosphate (0,5 ml, 0,2 M, pH 6,6) et une solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 1% (0,5 ml,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 minutes. Des aliquotes d'acide trichloracétique (0,5 ml, solution aqueuse à 10 %) ont été ajoutées au mélange qui a ensuite été centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant (0,5 ml) a été mélangé avec de l'eau distillée (0,5 ml) et une solution de  $\text{FeCl}_3$  fraîchement préparée (0,1 ml, 1%).

L'absorbance a été mesurée à 700 nm. La quercétine, le trolox, et le butylated hydroxyanisole (BHA) ont été utilisés comme contrôles positifs.

#### 4.2.1.4. Réduction du radical- cation $\text{ABTS}^\circ$

##### ➤ Principe

Le test de radicale  $\text{ABTS}^\circ$  est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 - éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide) ( $\text{ABTS}^\circ$ ) (**Rop *et al.*, 2010**) :



➤ **Mode opératoire**

La méthode utilisée pour ce dosage est celle de **Re et al., (1999)**, le radical cation ABTS est généré en mélangeant à volume égal une solution de 2,45 mM de persulfate de potassium  $K_2S_2O_8$  et une solution stock d'ABTS à 2 mM, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 6 h avant utilisation. 1 ml de la solution d'ABTS<sup>+</sup> est ajouté à chaque tube contenant l'échantillon (3ml). L'absorbance a été déterminée à 734 nm.

La quercétine, le trolox et le BHA ont été utilisés comme standards.

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

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = [(\text{Abs témoin} - \text{Abs blanc}) / (\text{Abs témoin})] \times 100$$

Abs témoin : l'absorbance du radical ABTS+ méthanol.

Abs blanc : l'absorbance de l'échantillon ABTS radical + Extrait / standard

#### **4.2.2. Peroxydation lipidique (LPO) *in vitro***

##### **4.2.2.1. Test de blanchissement bêta-carotène/acide linoléique**

➤ **Principe**

Le test de blanchissement au bêta-carotène est un test pratique utilisé pour mesurer la capacité d'un composé ou d'un mélange à inhiber l'oxydation de b-carotène (**Miraliakbari et Shahidi, 2008**).

➤ **Mode opératoire**

Tout d'abord, du  $\beta$ -carotène (0,5 mg) a été préparé dans 1 ml de chloroforme, puis 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés après évaporation du chloroforme, ensuite, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés. Une aliquote de ce mélange a été transférée dans différents tubes à essai contenant l'extrait. Dès que l'émulsion a été ajoutée à chaque tube, l'absorbance au temps zéro a été mesurée à 490 nm. Le système d'émulsion a été laissé au repos à température ambiante (20 à 23°C) pendant 120 min. Le BHA et le trolox ont été utilisés comme étalons.

L'activité antioxydante (pourcentage d'inhibition) de l'échantillon a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

% d'inhibition = (Absorbance du bêta-carotène à 120 min/Absorbance initiale du bêta-carotène)  $\times$  100.

#### 4.2.2.2. Inhibition de la LPO induite par le système Fe<sup>2+</sup>/acide ascorbique

##### ➤ Principe

La mesure de la peroxydation des lipides, a été analysée par la réaction à l'acide thiobarbiturique (TRABS) selon la méthode d'**Ohkawa *et al.*, (1979)**.

##### ➤ Mode opératoire

Brièvement, le mélange réactionnel contenant l'homogénat de foie de rat (0,1 mL, 25 % p/v) dans du Tris-HCl (30 mM), du sulfate d'ammonium ferreux (0,16 mM), de l'acide ascorbique (0,06 mM) et différentes concentrations de l'extrait a été incubé pendant 1 h à 37°C et la substance réactive thiobarbiturique résultante (TBARS) a été mesurée à 532 nm.

#### 4.2.2.3. Inhibition de la LPO par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC)

##### ➤ Principe

L'activité antioxydante des extraits de plantes est mesurée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique selon la méthode décrite par **Osawa et Namiki, (1981)**.

##### ➤ Mode opératoire

Des concentrations croissantes de l'extrait diluées dans 0,5 ml d'eau distillée ont été mélangées avec l'acide linoléique 0,02 M (2,5 ml dans un tampon de phosphate 0,04 M pH 7,0) dans des tubes à essai et incubées dans l'obscurité à 37°C. pendant l'incubation, la quantité de peroxyde formée a été déterminée en lisant l'absorbance de la couleur rouge développée à 500 nm par l'ajout de 30 % de solution de thiocyanate d'ammonium (0,1 ml) et de 20 ml de chlorure ferreux dans l'acide chlorhydrique à 3,5 % (0,1 ml) au mélange réactionnel.

### 4.3. Évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro*

#### 4.3.1. Test d'inhibition de l'activité alpha- amylase

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase de l'extrait a été réalisée selon la méthode de **Liu et al., (2013)**.

Brièvement, 40 ml d' $\alpha$ -amylase de 5 U/ml ont été mélangés avec 0,36 ml de tampon de phosphate de sodium de 0,02 M (pH de 6,9 avec NaCl de 0,006 M) et 0,2 ml de l'extrait. Après incubation pendant 20 min à 37 °C, 300  $\mu$ l de la solution d'amidon (1 %) dans du phosphate de sodium 0,02 M (pH de 6,9 avec du NaCl 0,006 M) ont été ajoutés, et le mélange a été réincubé pendant 20 min, suivi de l'ajout de 0,2 ml d'acide dinitrosalicylique.

Le contenu a été bien mélangé et conservé dans un bain-marie bouillant pendant 5 min. Le mélange réactionnel a été dilué par l'ajout de 6 ml d'eau distillée, et l'absorbance a été mesurée à 580 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. L'acarbose a été utilisé comme témoin positif.

L'inhibition de l'activité enzymatique a été calculée comme suit :

Inhibition (%) = (Absorbance du contrôle – Absorbance de l'échantillon) / Absorbance du contrôle  $\times$  100.

#### 4.3.2. Test d'inhibition de l'activité alpha- glucosidase

Le test d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase a été réalisé en appliquant la procédure de **Matsuura et al., (2002)** avec des modifications mineures.

Le mélange réactionnel contenant 50  $\mu$ l de tampon phosphate, 10  $\mu$ l d'alpha-glucosidase (1 U/ml) et 20  $\mu$ l de concentrations variables d'extrait a été préincubé à 37°C pendant 15 min. Ensuite, 20  $\mu$ l de P-NPG (5 mM) ont été ajoutés comme substrat et incubés à 37 °C pendant 20 min. L'absorbance du p-nitrophénol libéré a été mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acarbose a été utilisé comme standard.

L'inhibition de l'activité enzymatique a été calculée comme suit :

Inhibition (%) = (Absorbance du contrôle – Absorbance de l'échantillon) / Absorbance du contrôle  $\times$  100

#### 4.4. Évaluation de l'activité antiglycation (anti-AGE) *in vitro*

##### 4.4.1. Dosage *in vitro* du BSA-glucose

Les anti-AGEs de l'extrait, de la metformine, et de l'aminoguanidine ont été réalisés en utilisant le dosage BSA-glucose en utilisant la méthode de **Matsuura *et al.*, (2002)**. Après l'incubation pendant 7 jours à 37°C dans l'obscurité, les échantillons ont été mesurés à l'intensité de fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 370 nm et longueur d'onde d'émission de 440 nm) à l'aide du lecteur de microplaques Omega.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation suivante:

Pourcentage d'inhibition AGE =  $[(F_0 - F_t) / F_0 \times 100]$ , où  $F_t$  et  $F_0$  représentent l'intensité de fluorescence de l'échantillon et des mélanges témoins, respectivement.

##### 4.4.2. Modèle *in vitro* de BSA-méthylglyoxal (MGO)

Ce test a été utilisé pour évaluer les effets inhibiteurs de la glycation des protéines induite par le méthylglyoxal (MGO) (solution aqueuse à 40 %), un composé intermédiaire réactif clé formé dans la réaction de Maillard. Le mélange réactionnel BSA-MGO a été incubé à 37 °C pendant 7 jours, l'aminoguanidine un inhibiteur de la glycation des protéines a été utilisé comme contrôle positif l'intensité de fluorescence des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 370 nm et une longueur d'onde d'émission de 440 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques Omega. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule ci-dessus (**Peng *et al.*, 2008**).

##### 4.4.3. Glycation anti-hémoglobine

La glycation de l'hémoglobine a été réalisée selon la méthodologie décrite par **Liu *et al.*, (2011)**. Les concentrations d'hémoglobine glyquée ont été mesurées après la période d'incubation de 72 h à l'aide d'un lecteur de microplaques Oméga à une longueur d'onde de 443 nm. Le test d'inhibition de l'hémoglobine glyquée a été calculé à l'aide de l'équation ci-dessus.

#### 4.5. Évaluation de la toxicité aigue

Pour la détermination de la toxicité aiguë, 8 rats mâles de souche Wistar albinos d'un poids compris entre 180-200 g sont utilisés pour cette étude. Ils sont mis à jeun 14 h avant le test. L'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* (BETA) est administré par voie orale à une dose de



2g/kg de poids corporel des rats (**Lagaro et al., 2001**). Les animaux doivent être observés individuellement, et quotidiennement pendant 28 jours après l'administration de l'extrait.

#### **4.6. Évaluation de l'activité antioxydante, hépatoprotective et néphroprotective chez le rat rendu diabétique**

##### **4.6.1. Animaux et protocole d'expérimentation**

Les 32 rats utilisés dans cette expérimentation sont des rats mâles adultes de souche Wistar Albinos, âgés de 8 à 10 semaines (180 et 200g), issus par élevage au niveau de l'animalerie de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Les rats sont logés dans des cages métalliques où chaque cage comporte 8 rats. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture.

Les rats sont maintenus à une température ambiante ( $22 \pm 2$ )°C et photopériode de 12h/12h. Ils ont été traités conformément au principe et directive énoncés dans le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation.

##### **4.6.2. Induction du diabète**

Après une mise à jeun pendant une nuit (privation de la nourriture pendant 16 heures mais pas de l'eau), le diabète a été induit chez les rats par injection intrapéritonéale d'une solution fraîchement préparée de streptozotocine (STZ) (Sigma ST Louis, Mo) à une dose de 60 mg/kg de poids corporel soit un volume de 2 ml/kg (qui détruit les cellule  $\beta$ ) (**Erejuwa et al., 2011**). La STZ est dissoute dans un tampon citrate de sodium (0,1M pH 4,5).

Les groupes de rats non diabétiques ont reçus par voie intrapéritonéale le même volume de tampon citrate de sodium (0,1M pH 4,5).

Après injection, les rats sont remis dans les cages et reçoivent systématiquement un libre accès à l'alimentation et une solution de 5% de glucose à boire pendant une nuit pour éviter le choc hypoglycémique.

Après 72 heures de l'injection (temps de développement du diabète), les rats rendus diabétiques par injection de STZ sont triés par dosage de la glycémie. Les rats qui présentent une glycémie supérieure à 250 mg/dl, sont transférés dans des cages métaboliques individuelles pour le contrôle de la consommation de nourriture, de l'eau et le contrôle du volume urinaire.

### ✓ Traitement des animaux

Après l'induction du diabète, l'ensemble des rats, diabétiques et non diabétiques ont été divisés en quatre groupes de huit rats chacun et gardés dans des mêmes conditions. L'identification individuelle des rats se fait par numérotation au niveau de la queue à l'aide d'un marqueur permanent.

Le début du traitement par l'extrait n-butanolique du *Thymus algeriensis*, par l'antidiabétique, ou par l'eau distillée commence 24 heures après la confirmation du diabète et dure 28 jours (durée du traitement). La répartition des groupes a été réalisée comme suit :

- Groupe **I** (8 rats) Contrôle sain ou témoin sain : qui reçoivent quotidiennement par gavage gastrique 5 ml/kg d'eau distillée pendant 28 jours.
- Groupe **II** (8 rats) Diabétique: ces rats reçoivent chaque jour par gavage gastrique 5 ml/kg d'eau distillée pendant 28 jours.
- Groupe **III** (8 rats) Diabétique+ Metformine : reçoivent chaque jour par gavage gastrique 200 mg/kg de la metformine pendant 28 jours (**Erejuwa et al., 2011**).
- Groupe **IV** (8 rats) Diabétique + extrait de la plante : des rats qui reçoivent quotidiennement par voie orale 200 mg/kg de l'extrait n-butanolique du *Thymus algeriensis* (BETA) pendant 28 jours.

Les animaux sont pesés à l'aide d'une balance de précision à des moments fixes avant l'induction de diabète (début de la manipulation) et chaque jour après l'induction du diabète, jusqu'au le jour de dissection des rats.

### ✓ Evolution de la glycémie

L'évolution de la glycémie des rats des différents groupes est contrôlée dès le premier jour du traitement, et jusqu'à la fin du traitement. Selon un programme identique à celui des pesées.

Tous les prélèvements sanguins pour le dosage de la glycémie sont effectués au niveau de la queue des rats. Après nettoyage de la queue à l'alcool, les rats sont piqués à l'aide d'une fine aiguille, une goutte de sang est récupérée puis déposée sur une bandelette pour lecture de la glycémie (glucomètre Accu Chek).

#### ✓ Prélèvement de sang chez le rat

Le prélèvement est réalisé au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil (région cartilagineuse richement vascularisée) à l'aide d'un capillaire à hématocrite préalablement plongé dans une solution d'EDTA (1%). Ces prélèvements sont effectués, sur des rats à jeun, le dernier jour du traitement (J28).

Le recueil de sang a été effectué respectivement sur tubes héparinés numérotés, centrifugé à 6000 tours/minute pendant 15 minutes puis le sérum est récupéré. Cette opération est effectuée dans le but du dosage d'autres paramètres plasmatiques de nos rats : L'HbA1C, le glucose, le cholestérol total, les TG, l'urée, la créatinine, ainsi que l'AST et l'ALT. Ces dosages sont effectués au laboratoire central de biochimie, centre hospitalo-universitaire Dr Benbadis Constantine.

#### ✓ Préparation de la fraction cytosolique de tissu

Au moment du sacrifice les organes (foie et reins) sont récupérés, rincés par l'eau physiologique saline 0.9 % puis; 1 g d'organe est additionné à 9 ml (1V/10V) de solution tampon phosphate 0.1 M pH; 7.4 contenant du KCl 1,15M, le mélange est homogénéisé à 1200 tours/minute par un homogénéiseur De dounce.

L'homogénat est ensuite centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C puis à 10000 tour/minute pendant 45 minutes à 4°C, La fraction cytosolique est récupérée et utilisée pour les dosages du taux de molonyldialdéhyde (MDA), la concentration de glutathion réduit (GSH), l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT).

#### 4.6.3. Tolérance au glucose

Le test de tolérance au glucose a été déterminé suivant la méthode proposée par **Dimo et al., (2006)**. 30 rats normaux ont été répartis en 5 groupes de 6 rats chacun et traités par voie orale comme suit:

Groupe **I** : contrôle négatif, qui reçoit uniquement le véhicule (eau distillée, 4mL/kg).

Groupes **II** et **III** : contrôles positifs, qui reçoivent de la metformine à une dose de 200 mg/kg.

Groupes **IV** et **V** : qui reçoivent l'extrait de *Thymus algeriensis*, respectivement, à une dose de 200 mg/kg et 500 mg/kg.

Après une heure d'administration par voie orale, les rats ont reçu par voie orale, une solution de glucose à la dose de (5g/kg). Des échantillons de sang ont été prélevés par la veine caudale au moment 0 h (avant l'administration orale) 30, 60, 90, 120 et 180 min après l'administration de glucose. La glycémie a été mesurée à l'aide de la méthode du glucose oxydase (glucomètre Accu-Check).

#### 4.6.4. Glycémie et profil lipidique

##### 4.6.4.1. Dosage du glucose

Méthode de référence enzymatique à l'hexokinase. Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'action de l'ATP et de l'hexokinase (HK). Ensuite, une seconde enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate par le NADP<sup>+</sup> pour former du NADPH<sup>+</sup>H<sup>+</sup> (Tsai *et al.*, 1998).

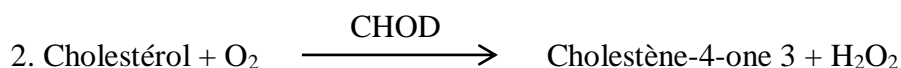


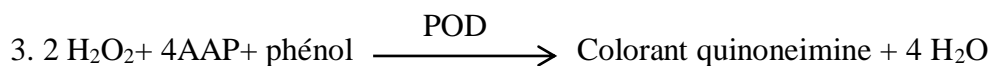
La concentration de NADH formé est directement proportionnelle à la concentration du glucose. Elle est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

##### 4.6.4.2. Dosage du cholestérol total

Méthode enzymatique colorimétrique : La cholestérol-estérase (CE) hydrolyse les esters du cholestérol pour former du cholestérol libre et des acides gras. Dans une réaction ultérieure catalysée par le cholestérol oxydase, le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en cholestène-4-one-3 avec formation d'eau oxygénée.

En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec l'amino-4phénazone (4- AAP) et le phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge (Boukhari *et al.*, 2013).



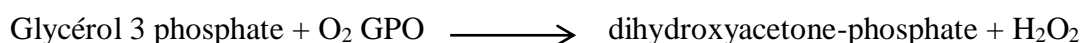
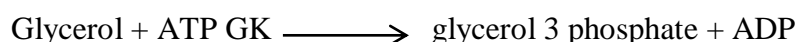


L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 512 nm.

#### 4.6.4.3. Dosage des triglycérides

Méthode enzymatique, colorimétrique utilisant la glycerol-phosphateoxydase et l' amino 4phénazone. Les triglycerides sont hydrolysés par la lipoproteine lipase (LPL) en glycérol et acides gras.

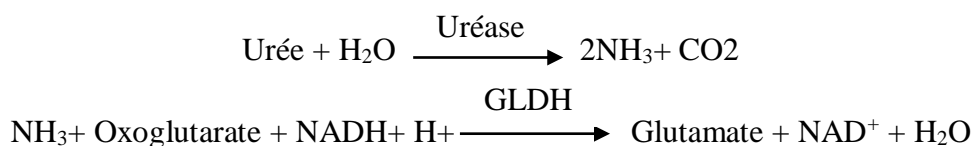
Le glycérol est alors phosphorylé en glycérol-3phosphate par l'ATP lors d'une réaction catalysée par le glycérol kinase (GK). L'oxydation du glycérol-3-phosphate est catalysée par le glycérol phosphate oxydase (GPO) pour former du dihydroxyacétone-phosphate et de l'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Steinmetz *et al.*, 1978).



#### 4.6.5. Marqueurs de la fonction rénale

##### 4.6.5.1. Dosage de l'urée

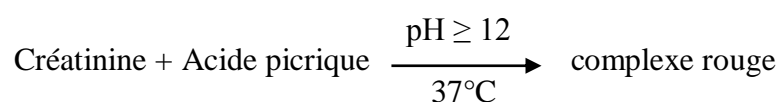
Le dosage de l'urée est une méthode enzymatique basée sur la réaction décrite par Tiffany *et al.*, (1972) qui ont montré que la concentration en urée est proportionnelle à la variation d'absorbance mesurée à 340 nm pendant un temps donné. Le schéma de la réaction est le suivant :



#### 4.6.5.2. Dosage de la créatinine

La créatine est une substance synthétisée dans l'organisme à un taux raisonnablement constant à partir de la créatine résultant de la déphosphorylation de la créatine phosphate au niveau musculaire.

La créatinine en milieu alcalin réagit avec les ions picrate formant un complexe rougeâtre. Le taux de formation du complexe mesurée par l'augmentation de l'absorbance dans un intervalle de temps prédéfini, est proportionnel à la concentration de créatinine dans l'échantillon (Young, 1997).

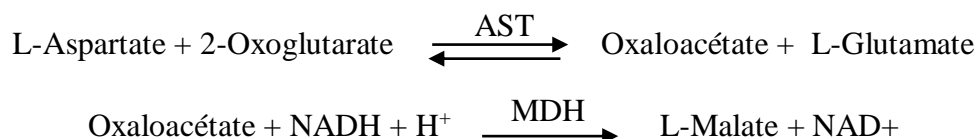


#### 4.6.6. Marqueurs hépatiques

##### 4.6.6.1. Dosage de l'AST

L'AST est répandue dans tous les tissus du corps, mais la plus forte activité est mesurée dans le foie, le cœur, les muscles squelettiques et dans les érythrocytes. L'activité de l'AST est augmentée dans le sérum lorsqu'il y a une atteinte des cellules hépatiques.

Ce type de dosage est une méthode enzymatique développée par Henry *et al.*, (1997), le schéma de la réaction est le suivant

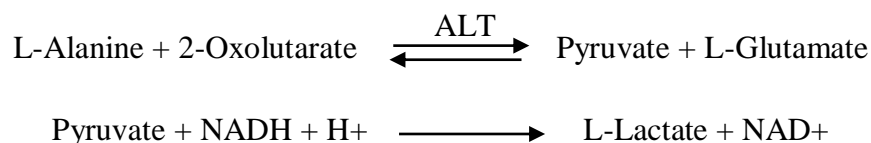


La diminution de l'absorbance proportionnelle à l'activité AST est mesurée à 340 nm.

##### 4.6.6.2. Dosage de l'ALT

L'ALT est très largement répandue dans les tissus hépatiques et rénaux, et dans une moindre mesure dans le muscle squelettique et cardiaque. Bien que l'activité de l'ALT et l'AST augmente dans le sérum quel que soit l'atteinte des cellules hépatiques, l'ALT est l'enzyme la plus spécifique.

Ce type de dosage est une méthode enzymatique développée par Henry *et al.*, (1997), le schéma de la réaction est le suivant :

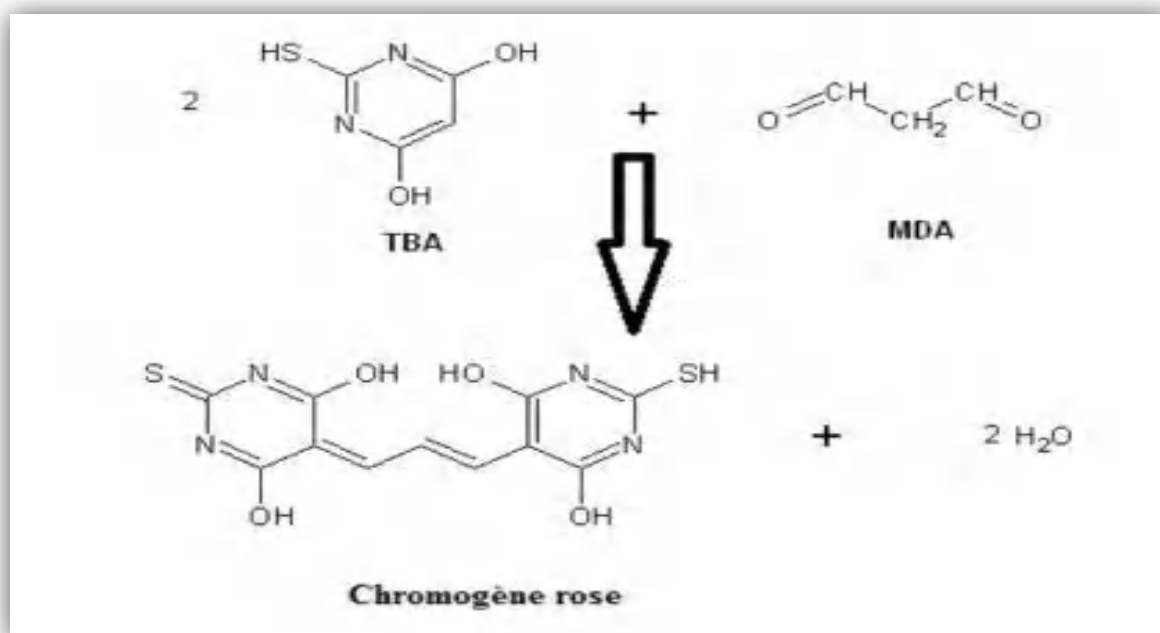


La diminution de l'absorbance proportionnelle à l'activité ALT est mesurée à 340 nm.

## 4.7. Évaluation du statut oxydant cytosolique hépatique et rénale

### 4.7.1. La peroxydation lipidique

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress oxydant. La réaction de dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100°C) entre le MDA et deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) donnant un pigment de couleur rose ayant une absorbance maximale à  $\lambda=532$  nm selon cette réaction:

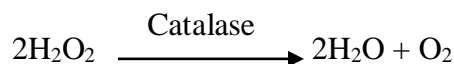


**Figure 4.3:** Réaction d'un milieu biologique avec l'acide thiobarbiturique (TBA).

Le taux de MDA a été mesuré dans les homogénats du foie et des reins des rats selon la méthode décrite par **Ohkawa *et al.*, (1979)**. L'absorption a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à  $\lambda=532$  nm et les résultats sont exprimés en nmol par milligramme de tissu intra-plantaire (nmol/mg tissu) en utilisant le coefficient d'extinction molaire  $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

#### 4.7.2. Dosage de la catalase (CAT) cytosolique

L'activité de la catalase cytosolique a été déterminée selon la méthode d'**Aebi, (1984)**. Le principe repose sur la disparition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $25^\circ\text{C}$  en présence de source enzymatique dans la fraction cytosolique selon la réaction suivante:



La quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  décomposée est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme. L'absorbance est lue à  $\lambda=240\text{ nm}$  chaque minute dans un intervalle de temps de 2 min et l'activité de l'enzyme est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire :  $0,043\text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . Les résultats sont exprimés en U/mg de protéine hépatique (U:  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommé par minute par mg de protéines).

#### 4.7.3. Dosage du superoxyde dismutase (SOD) cytosolique

L'activité enzymatique de SOD cytosolique a été déterminée selon la méthode de **Flohe, (1984)**. Le principe repose sur la capacité d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD. L'activité de l'enzyme est exprimée en U/mg de protéine du tissu hépatique (U/mg tissu). Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de (50%) de l'autooxydation du pyrogallol. L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique du blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon} \times 100}{\text{Densité optique du blanc}}$$

$$\text{U de SOD/mg de protéine} = \frac{\text{Inhibition totale}}{n \times 50}$$

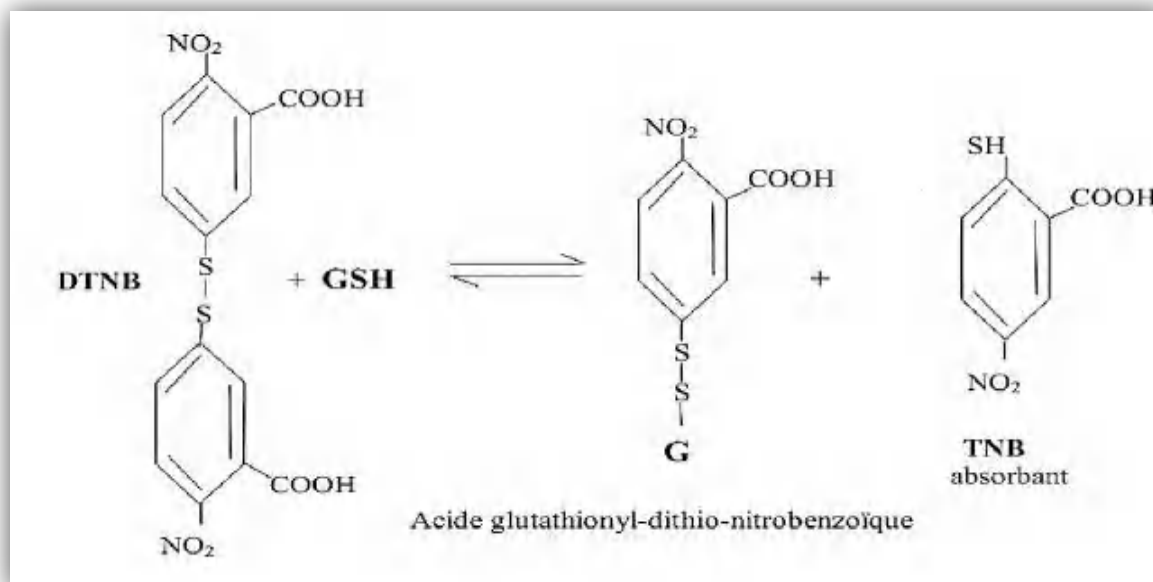
n: mg de protéines en mg présentes dans le volume de l'échantillon utilisé.

#### 4.7.4. Dosage du glutathion réduit (GSH) cytosolique

Le glutathion est le thiol intracellulaire le plus abondant dans toutes les cellules animales, il se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de (99%) de la quantité total. Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode d'**Ellman, (1959)**.



Le principe consiste à scinder la molécule d'acide 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH et la libération de l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Ce dernier, à pH (8-9), présente une absorbance maximale à  $\lambda=412$  nm selon la réaction suivante:



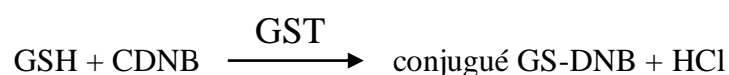
**Figure 4.4:** Interaction entre le DTNB et le GSH.

Les résultats sont déduits en se basant sur un coefficient d'extinction molaire de GSH:  $13100 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Les concentrations exprimées en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéine hépatique ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot).

#### 4.7.5. Dosage du glutathion-S-transférase (GST) cytosolique

Le dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST) cytosolique a été réalisé selon la méthode de **Seyyedi *et al.*, (2005)**. Les GST catalysent la réaction de conjugaison entre le glutathion et le 1-chloro-2,4 dinitro benzene (CDNB) comme substrat.

La conjugaison se fait par le biais du groupement thiol du glutathion selon la réaction suivante:



L'augmentation de l'absorption est directement proportionnelle à l'activité GST de l'échantillon. Cette dernière est déterminée classiquement par la mesure du produit (GS-DNB) à  $\lambda=340$  nm issu de la réaction de conjugaison du CDNB avec le glutathion réduit. Les

résultats sont déduits en utilisant un coefficient d'extinction molaire de CDNB:  $9,6\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  et exprimés en U/mg de protéine de foie (U:  $\mu\text{mol}$  de conjugué CDNB formé/min).

#### 4.7.6. Dosage du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique

Le dosage de GPx est basé sur la méthode décrite par **Rotruck *et al.*, (1973)**. Le GPx de l'homogénat tissulaire oxyde le glutathion et simultanément le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est réduit en  $\text{H}_2\text{O}$ . La quantité du glutathion restante réagit avec la solution DTNB pour donner un composé coloré qui est mesuré par spectrophotométrie à  $\lambda=420$  nm. L'activité de GPx est exprimée en U/mg protéine de foie (U:  $\mu\text{mol}$  de GSH oxydé/min).

#### 4.8. Étude histologique

Après la dissection des rats, des petits morceaux des reins et du foie sont récupérés, et stockés dans des bocaux contenant le formol aldéhyde (10 %), pour être destinés à la réalisation des coupes histologique.

#### 4.9. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les valeurs  $\text{IC}_{50}$  (Concentration inhibitrice de 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Pour les tests *in vivo* les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les comparaisons multiples sont faites par le test ANOVA à un facteur suivi du test HSD de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

**TROISIEME PARTIE**

# **RESULTATS ET DISCUSSION**



**CHAPITRE 05**

**RESULTATS**



## 5. Résultats

### 5.1. Screening phytochimique

#### 5.1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les résultats de dosage des polyphénols et flavonoïdes présents dans le tableau (5.1) révèlent que l'extrait n-BuOH de *T. algeriensis* (BETA) contient ( $299.48 \pm 1.38$  µg GAE/mg extrait) de polyphénols, et de ( $168.17 \pm 0.80$  µg QE /mg extrait) des polyphénols sous forme de flavonoïdes.

**Tableau 5.1** : Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Extrait	TPC (µg GAE/ mg extrait)*	TFC (µg QE/ mg extrait)**
BETA	$299.48 \pm 1.38$	$168.17 \pm 0.80$

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type de trois mesures.

\*Les phénoliques totaux sont exprimés en µg d'équivalents d'acide gallique/mg d'extrait ;

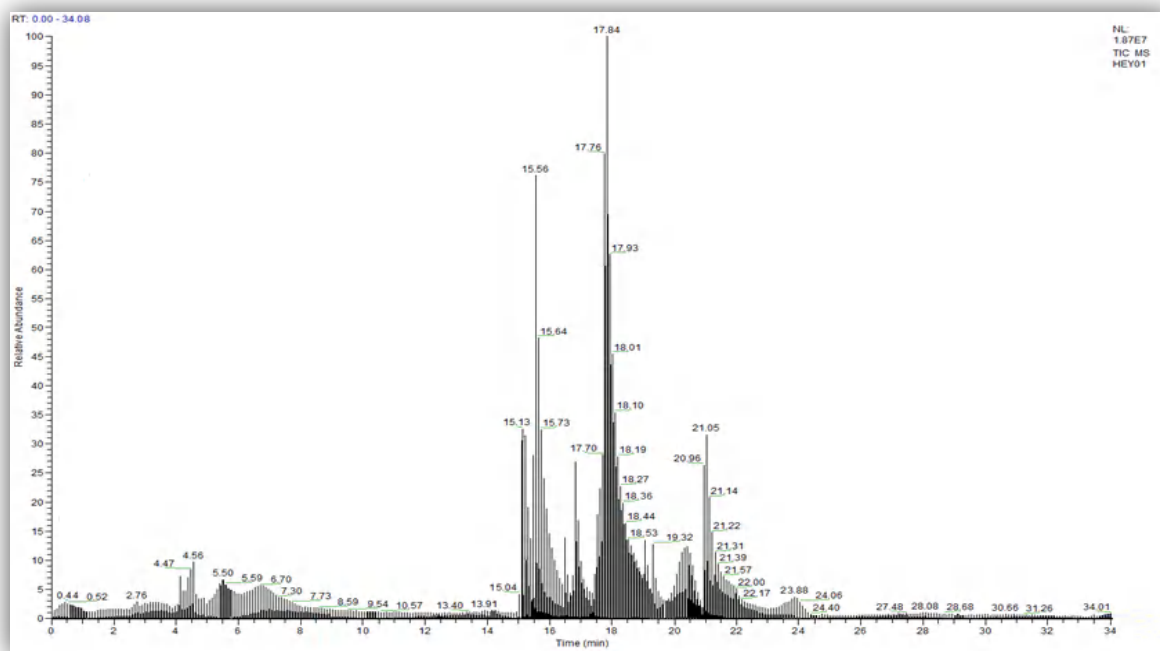
\*\*Les flavonoïdes totaux sont exprimés en µg d'équivalents de quercétine/mg d'extrait.

#### 5.1.2. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'analyse LC-MS/MS nous a permis d'identifier 11 composés phénoliques dans l'extrait n-BuOH de *T. algeriensis*. Les chromatogrammes de l'extrait BETA sont présents dans la figure (5.1). L'acide ferulique ( $59826.860$  mg/kg extrait) et l'acide rosmarinique ( $54228.711$  mg/kg extrait) sont les principaux composés phénoliques de l'extrait BETA, suivi de l'acide caféique ( $3404,063$  mg/kg d'extrait), l'acide chlorogénique ( $916,221$  mg/kg d'extrait), l'acide p-hydroxybenzoïque ( $755,211$  mg/kg d'extrait), l'acide p-cumarique ( $715,134$  mg/kg d'extrait), l'acide gentisique ( $272,822$  mg/kg extrait), l'acide gallique ( $102,786$  mg/kg extrait), le 4-OH benzaldéhyde ( $29,089$  mg/kg extrait), et les flavonoïdes, naringénine ( $141,739$  mg/Kg), quercétine ( $639,517$  mg/kg d'extrait), ces composés phénoliques sont répertoriés dans le tableau (5.2).

Tableau 5.2: L'analyse LC-MS des composés phénoliques de BETA

N°	Name	Ions MS/MS étudiés				LOD	LOQ	TR	mg phenolic/ Kg Extrait
		Parent	Produit	CE	Polarité				
1	Acide gallique	169.7	80.5	25	-	0.058	0.091	10.1	<b>102,786</b>
			126.2	16	-				
2	Acide gentisique	153.7	109.5	21	-	0.026	0.039	13.87	<b>272,822</b>
3	Acide chlorogénique	353.4	86.5	43	-	0.051	0.072	14.25	<b>916,221</b>
			192.1	21	-				
4	acide <i>p</i> -Hydroxybenzoïque	137.9	66.6	38	-	0.243	0.519	14.64	<b>755,211</b>
			94.6	17	-				
5	Acide Catecholique	179.7	135.2	27	-	0.042	0.058	15.26	<b>3404,063</b>
			136.2	18	-				
6	Acide <i>p</i> -Cumarique	163.9	94.3	33	-	0.069	0.109	16.97	<b>715,134</b>
			120.2	17	-				
7	Acide rosmarinique	359.2	134.3	44	-	0.029	0.050	17.86	<b>54228,711</b>
			162.2	20	-				
8	Acid ferulique	195.4	89.4	30	+	0.063	0.118	17.88	<b>59826,860</b>
			177.4	7	+				
9	Naringénine	273	147.1	20	+	0.052	0.068	20.46	<b>141,739</b>
			153	24	+				
10	Quercétine	301	152.1	23	-	0.141	0.181	20.51	<b>639,517</b>
			179.9	20	-				
11	4-OH benzaldehyde	121.9	93.5	25	+	0.032	0.059	15.32	<b>29,089</b>
			121.1	20	+				



**Figure 5.1** : Le profil LC-MS/MS de l'extrait BETA.

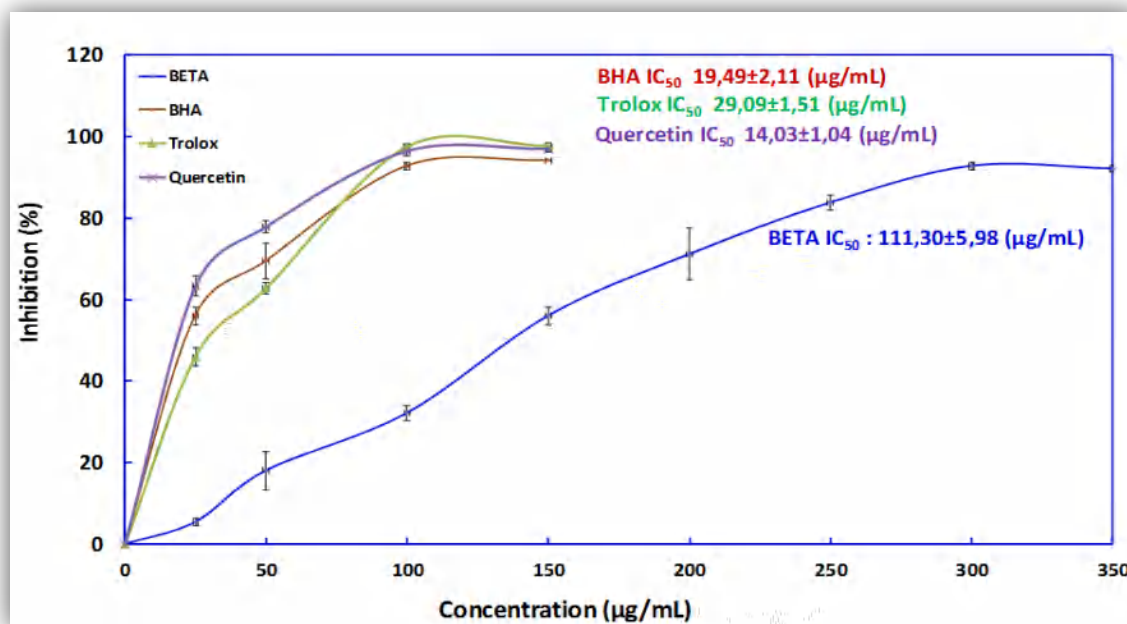
## 5.2. Screening biologique

### 5.2.1. Évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait BETA

#### 5.2.1.1. Effet scavenger du radical DPPH° de l'extrait BETA

La méthode du DPPH° est indépendante de la polarité de substrat. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH° en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. La figure ci-dessous représente la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration.

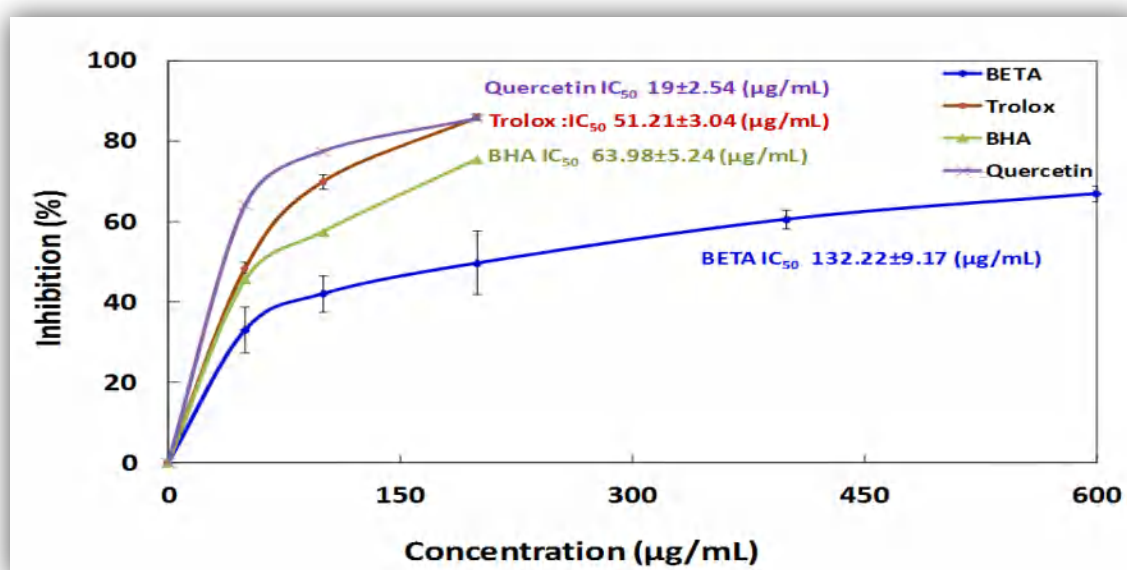
La capacité antioxydante de l'extrait BETA a été déterminée à partir de l'IC<sub>50</sub>, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH°. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. D'après les résultats présentés dans la figure (5.2), l'IC<sub>50</sub> obtenu pour le BHA (19,49±2,11 µg /ml), le trolox (29,09±1,51µg /ml), et la quercetine (14,03±1,04 µg /ml) utilisés comme des standards, est bien plus inférieur à celle de l'extrait BETA (111,30±5,98 µg /ml) et donc, ils présentent une activité antioxydante plus élevée.



**Figure 5.2 :** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des antioxydants de références et de l'extrait BETA

### 5.2.1.2. Capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait BETA

La capacité antioxydante totale de l'extrait BETA est représentée dans la figure (5.3). Cet extrait montre une capacité antioxydante ( $IC_{50}$  = 132,22 ± 9,17 µg/ml) moins efficace que celle exercée par le trolox ( $IC_{50}$  = 51,21 ± 3,04 µg/ml), le BHA ( $IC_{50}$  = 63,98 ± 5,24 µg/ml) ainsi que la quercétine (18,99 ± 2,54 µg/ml), qui sont utilisés comme références.



**Figure 5.3 :** La capacité antioxydante totale de l'extrait BETA et des antioxydants de référence.



### 5.2.1.3. Pouvoir réducteur de l'extrait BETA

Le dosage de l'activité réductrice ferrique basé sur la capacité de l'antioxydant à réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  est utilisé comme indicateur de l'activité antioxydante potentielle des produits naturels. La figure (5.4) illustre le pouvoir réducteur de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis*.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur de l'extrait BETA est dose dépendante (concentration dépendante) c'est-à-dire que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'extrait. Cependant cet extrait ( $\text{IC}_{50} = 175,71 \pm 12,67 \mu\text{g/ml}$ ) présente une capacité à réduire le fer largement inférieure à celle du trolox ( $\text{IC}_{50} = 111,46 \pm 5,99 \mu\text{g/ml}$ ), de la quercetine ( $\text{IC}_{50} = 102,99 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$ ), et du BHA ( $\text{IC}_{50} = 120,59 \pm 15,36 \mu\text{g/ml}$ ) considérés comme standards.

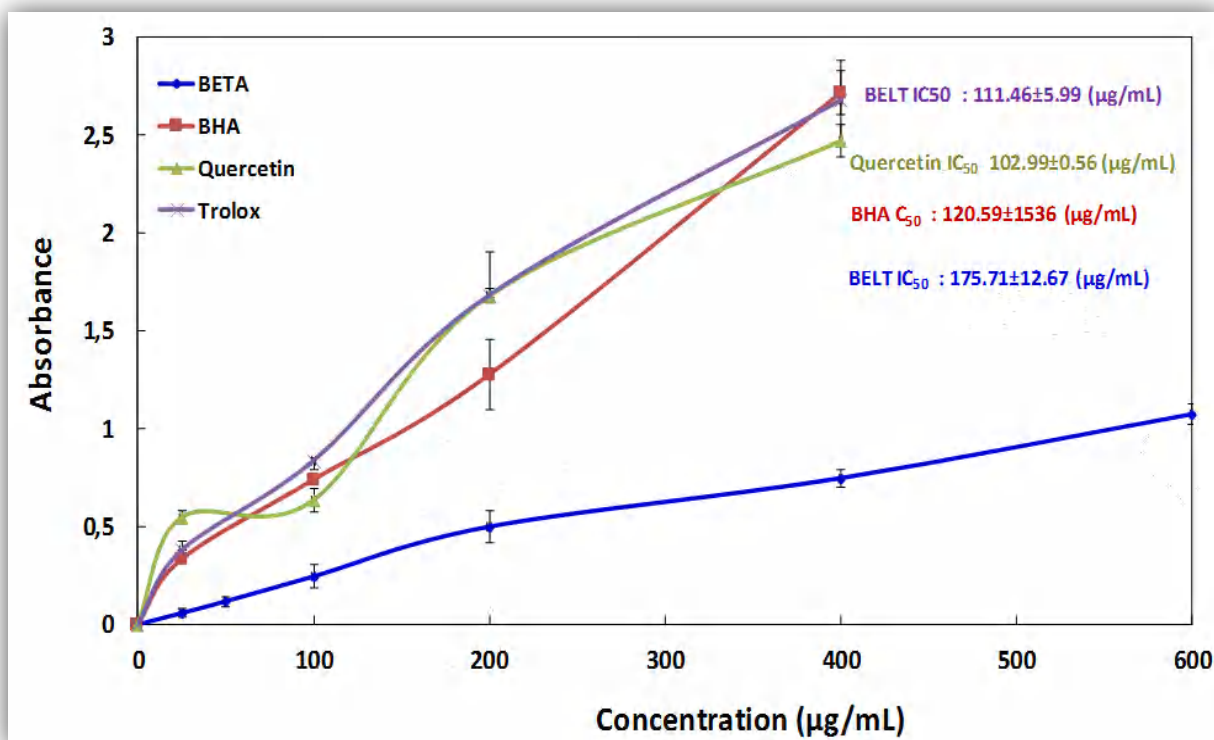


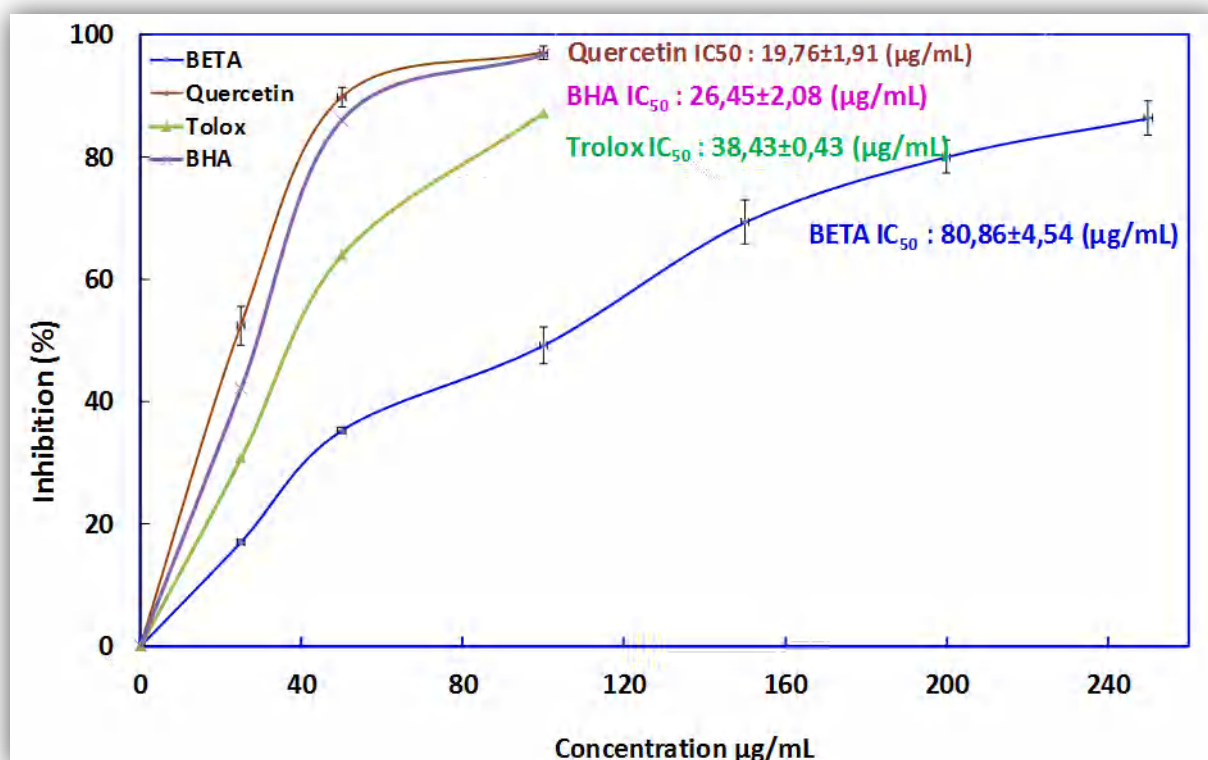
Figure 5.4 : Effet du pouvoir réducteur de BETA et standards.

### 5.2.1.4. Réduction du radical- cation ABTS° de l'extrait BETA

L'activité antioxydante de l'extrait est déduite de sa capacité à inhiber le radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline6-sulfonique) comparativement à des antioxydants de référence:

quercetine, BHA, trolox. La figure (5.5) illustre la courbe représentative du pourcentage d'inhibition du radical en fonction des concentrations.

Selon les résultats, l' $IC_{50}$  obtenu pour la quercetine ( $19,76 \pm 1,91 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), le BHA ( $26,45 \pm 2,08 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), et le trolox ( $38,43 \pm 0,43/\text{ml}$ ) utilisés comme des antioxydants de référence, est bien plus inférieur à celle de l'extrait BETA ( $80,86 \pm 4,54 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) et donc, ils montrent une activité antioxydante plus importante.



**Figure 5.5:** Courbe représentant le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>++</sup> de l'extrait BETA et les antioxydants de référence.

### 5.2.2. Inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait BETA

La peroxydation lipidique est testé par trois système, le système Fe<sup>2+</sup>/acide ascorbique, blanchissement β-carotène/acide linoléique et la méthode au thiocyanate ferrique. Ces tests montrent que l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* réduisait les ions de format TBARS d'une manière dépendante de la concentration. L'extrait BETA réduit ( $63,54 \pm 0,90 \%$ ) le MDA généré par Fe<sup>2+</sup>/acide ascorbique à une concentration de 400 µg/ml avec une valeur  $IC_{50} = 177,20 \pm 2,87 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Cet effet était comparable aux deux références standard trolox et BHA qui ont atteint  $80,65 \pm 1,55 \%$  ; et  $83,09 \pm 0,74 \%$  respectivement

uniquement à 200 µg/ml, avec une  $IC_{50} = 62,06 \pm 1,368$  µg/ml et  $68,94 \pm 12,22$  µg/ml respectivement (**Tab 5.3**).

L'oxydation d'acide linoléique produit des hydroperoxides, qui sont des radicaux libres dérivés attaquant le chromophore de  $\beta$ -carotène et aboutissent au blanchissement de son émulsion réactionnelle. Le tableau (5.3) montre qu'il y a une diminution de la valeur d'absorbance due à l'oxydation du  $\beta$ -carotène à 400 µg/ml. L'extrait BETA présentait une activité antioxydante élevée (76.811.60 % ;  $IC_{50} = 234,71 \pm 9,25$  µg/ml) en comparaison aux substances étalons BHA et Trolox ( $93,36 \pm 0,11$  % ;  $IC_{50} = 45,77 \pm 7,66$  µg/ml et  $84,43 \pm 1,19$  % ;  $IC_{50} = 64,63 \pm 18,42$  µg/ml) respectivement.

En plus, les résultats obtenus montrent que l'oxydation de l'acide linoléique a été efficacement inhibée par l'extrait BETA (**Tab 5.3**). Cet extrait a montré une activité antioxydante élevée ( $75,27 \pm 0,81$  % à 400 µg/ml, avec  $IC_{50} = 201,63 \pm 8,97$  µg/ml); en inhibant la formation d'ions ferriques. Cette inhibition a été clairement comparée aux deux références standards Trolox et BHA ( $83,55 \pm 0,46$  % ;  $IC_{50} = 47,58 \pm 8,47$  µg/ml et  $87,44 \pm 0,82$  % ;  $IC_{50} = 38,73 \pm 8,7$  µg/ml) respectivement.

**Tableau 5.3:** Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait BETA (valeur  $IC_{50}$ : µg/ml).

Extrait/Standards	Fe <sup>2+</sup> / A.Ascorbique	$\beta$ -Carotene/acide linoléique	Acide linoléique/ thiocyanate ferrique
BETA	177.20±2.87	234.71±9.25	201.63±8.97
Trolox <sup>a</sup>	62.06±1.368	64.63±18.42	47.58±8.47
BHA <sup>a</sup>	68.94±12.22	45,77±7.66	38.73±8.7

Les valeurs  $IC_{50}$  sont définies comme la concentration des pourcentages d'inhibition à 50 % et calculées par analyse de régression semi-logarithmique et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

a : composés de référence, BHA (butylated hydroxyanisole) et trolox.

### 5.3. Évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* de l'extrait BETA

#### 5.3.1. Inhibition de l'activité alpha- amylase et de l'activité alpha- glucosidase

Le pouvoir inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* et de l'acarbose est présenté dans le tableau (5.4). D'après les présents résultats,

l'extrait BETA inhibe efficacement l'action des enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase d'une manière dépendante de la concentration. Le pourcentage d'inhibition des deux enzymes variait de  $33,43 \pm 1,14$  % à  $76,57 \pm 0,45$  % et de  $26,04 \pm 0,69$  % à  $64,80 \pm 1,20$  % respectivement à une concentration allant de 50 à 600  $\mu\text{g/ml}$  par rapport à l'acarbose (de  $43,99 \pm 0,90$  % à  $90,89 \pm 0,69$  %) dans la même gamme de concentration.

Les valeurs  $\text{IC}_{50}$  de l'extrait BETA pour l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase étaient respectivement ( $132,53 \pm 10,24$   $\mu\text{g/ml}$  et  $237,79 \pm 15,20$   $\mu\text{g/ml}$ ) comparables à celle de l'acarbose ( $\text{IC}_{50} = 41,64 \pm 4,94$   $\mu\text{g/ml}$  et  $85,24 \pm 1,69$   $\mu\text{g/ml}$ ) respectivement.

**Tableau 5.4:** Pourcentage de l'effet inhibiteur de l'activité  $\alpha$ -amylase et de l'activité  $\alpha$ -glucosidase de l'extrait BETA.

Inhibition de l'activité $\alpha$ -amylase		Inhibition de l'activité $\alpha$ -glucosidase		
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	BETA	acarbose <sup>a</sup>	BETA	acarbose <sup>2a</sup>
50	$33.43 \pm 1.14$	$48.96 \pm 2.75$	$26.04 \pm 0.69$	$43.99 \pm 0.90$
100	$43.23 \pm 1.83$	$67.21 \pm 3.08$	$34.33 \pm 2.04$	$47.91 \pm 1.38$
200	$61.03 \pm 1.45$	$86.37 \pm 4.75$	$45.65 \pm 0.69$	$64.35 \pm 1.20$
400	$66.16 \pm 1.81$	$92.70 \pm 1.45$	$60.43 \pm 1.14$	$88.18 \pm 5.77$
600	$76.57 \pm 0.45$	$93.46 \pm 0.94$	$64.80 \pm 1.20$	$90.89 \pm 0.69$
$\text{IC}_{50}$	$132.53 \pm 5.24$	$41.64 \pm 4.94$	$237.79 \pm 15.20$	$85.24 \pm 6.69$

Les valeurs  $\text{IC}_{50}$  sont définies comme la concentration des pourcentages d'inhibition à 50 % et sont calculées par analyse de régression semi-logarithmique et exprimées en moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). a : composés de référence.

### 5.3.2. Évaluation de l'activité antiglycation (anti-AGE) *in vitro* de l'extrait BETA

Dans la présente étude, l'activité inhibitrice de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* sur l'AGE a été évaluée à l'aide de la protéine de glycation glucose-BSA et MGO-BSA, et du modèle Hb glycation.

Le tableau (5.5) a montré que l'extrait BETA prouvait une activité antiglycation dépendante de la dose lorsqu'il a utilisé le modèle de glycation glucose-BSA. À 600  $\mu\text{g/ml}$ , l'extrait BETA a présenté ( $75,56 \pm 2,04$  %) une inhibition de la glycation glucose-BSA avec une  $\text{IC}_{50} = 284,9 \pm 19,53$   $\mu\text{g/ml}$ . Les deux médicaments standards, la metformine et

l'aminoguanidine, ont révélé ( $80,98 \pm 2,30 \%$  ;  $85,178 \pm 3,56 \%$ ) une inhibition des AGE uniquement à  $300 \mu\text{g/ml}$  avec des  $\text{IC}_{50} = 111,18 \pm 7,71 \mu\text{g/ml}$  et  $75,72 \pm 7,12 \mu\text{g/ml}$  respectivement.

En outre, l'extrait BETA a également eu un effet inhibiteur sur la formation des AGE lorsqu'il a été testé sur la glycation du MGO-BSA à  $600 \mu\text{g/ml}$  ( $76,8 \pm 0,48 \%$  ;  $\text{IC}_{50} = 203,65 \pm 0,70 \mu\text{g/ml}$ ). L'inhibition de la glycation du MGO-BSA pour la metformine et l'aminoguanidine était de  $84,71 \pm 2,41 \%$  ;  $\text{IC}_{50} = 76,20 \pm 3,83 \%$  et  $88,71 \pm 2,41 \%$  ;  $\text{IC}_{50} = 70,16 \pm 2,72 \mu\text{g/ml}$  respectivement (**Tab 5.5**).

En plus, l'extrait BETA a réussi à limiter la glycation de l'hémoglobine lors d'une exposition à  $2 \%$  de glucose sur une période de 72 heures et a pu atteindre  $77,82 \pm 2,36 \%$  à  $600 \mu\text{g/ml}$  avec une valeur  $\text{IC}_{50}$  de  $254,35 \pm 2,43 \mu\text{g/ml}$ , par rapport à la metformine et à l'aminoguanidine ( $90,30 \pm 1,39 \%$  ;  $\text{IC}_{50} = 154,72 \pm 6,48 \mu\text{g/ml}$  et  $87,27 \pm 2,91 \%$  ;  $\text{IC}_{50} = 190,15 \pm 3,26 \mu\text{g/ml}$ ) respectivement (**Tab 5.5**).

**Tableau 5.5:** L'activité antiglycation de l'extrait BETA (valeur  $\text{IC}_{50}$ :  $\mu\text{g/ml}$ ).

Extrait/Standards	BSA- glucose	BSA-MGO	Hb-glycation
BETA	$284.9 \pm 19.53$	$203.65 \pm 5.70$	$254.35 \pm 12.43$
Aminoguanidine <sup>a</sup>	$75.72 \pm 7.12$	$70.16 \pm 2.72$	$190.15 \pm 9.26$
Metformine <sup>a</sup>	$111,18 \pm 7,71$	$76.20 \pm 3.83$	$154.72 \pm 6.48$

Les valeurs  $\text{IC}_{50}$  sont définies comme la concentration des pourcentages d'inhibition à  $50 \%$  et sont calculées par analyse de régression semi-logarithmique et exprimées en moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). a : composés de référence.

#### 5.4. Toxicité aiguë de l'extrait BETA

Aucun signe de toxicité aiguë ou de mortalité à la dose ( $2000 \text{ mg/kg}$ ) après 28 jours d'observation n'a été observé. Les animaux traités n'ont montré aucun changement dans leur comportement, ainsi, aucun changement pathologique indésirable n'a été enregistré.

#### 5.5. Evaluation de l'activité antidiabétique *in vivo*

##### 5.5.1. Tolérance au glucose de l'extrait BETA

Le tableau (5.6) présente les variations de la glycémie des rats dans un test de tolérance au glucose. L'hyperglycémie est provoquée par l'administration par voie orale de

glucose aux rats à la dose de 5g/kg, 30 minutes après l'administration orale des deux doses de l'extrait BETA, de la metformine (lots tests) ou de l'eau distillée (lot témoin). La glycémie est mesurée toutes les 30 minutes, pendant 3 heures, et la variation de la glycémie par rapport à la glycémie initiale est calculée.

Les résultats obtenus montrent que les rats du groupe contrôle, traité uniquement par le glucose, ont manifesté un taux maximal de glucose durant les premières trente minutes ( $1.38 \pm 0.01$  g/l). Cette augmentation concerne aussi les animaux des groupes traités par la metformine ( $1.18 \pm 0.03^{**}$  g/l) et les groupes traités par l'extrait BETA avec deux doses ( $1.2 \pm 0.02^{**}$  g/l et  $1.17 \pm 0.03^{**}$  g/l, respectivement). Après 180 minute les taux du glucose sont revenus aux niveaux basiques chez les rats traités par l'extrait BETA ( $0.76 \pm 0.03^{**}$  g/l et  $0.73 \pm 0.02^{**}$  g/l, respectivement), et même chez les rats traités par la metformine ( $0.71 \pm 0.01$  g/l). Par contre ceux des rats du groupe contrôle sont resté élevés ( $1.08 \pm 0.03^{**}$  g/l). Ce qui est intéressant, il n'y avait aucune différence entre les deux doses sélectionnées.

**Tableau 5.6:** Effet du BETA sur la tolérance du glucose.

Extrait/Standards	Temps (minutes)					
	T <sub>0</sub>	30	60	90	120	180
Contrôle	$0.71 \pm 0.01$	$1.38 \pm 0.01$	$1.26 \pm 0.03$	$1.22 \pm 0.01$	$1.09 \pm 0.02$	$1.08 \pm 0.03^{**}$
Metformine	$0.66 \pm 0.03^{**}$	$1.18 \pm 0.03^{**}$	$0.95 \pm 0.05^{**}$	$0.99 \pm 0.03^{**}$	$0.94 \pm 0.03^{**}$	$0.71 \pm 0.01$
BETA (200 mg/Kg)	$0.84 \pm 0.02^{**}$	$1.2 \pm 0.02^{**}$	$0.92 \pm 0.03^{**}$	$0.90 \pm 0.01^{**}$	$0.88 \pm 0.05^{**}$	$0.76 \pm 0.03^{**}$
BETA (500 mg/Kg)	$0.83 \pm 0.04^{**}$	$1.17 \pm 0.03^{**}$	$1.08 \pm 0.06^{**}$	$0.92 \pm 0.4^{**}$	$0.90 \pm 0.03^{**}$	$0.73 \pm 0.02^{**}$

Les valeurs sont exprimées en terme de moyenne arithmétique  $\pm$  écart-type (n= 6)

### 5.5.2. Effet anti-hyperglycémiant de l'extrait BETA

Les effets de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* et de la metformine utilisée comme témoin positif, sur la glycémie chez les rats diabétiques sont présentés dans le tableau (5.7). Les rats rendus diabétiques par la STZ ont marqué une augmentation significative de la glycémie ( $3.32 \pm 0.8^{**}$ g/l) par rapport aux rats sains ( $1.005 \pm 0.06$  g/l). Cependant, après un traitement par l'extrait BETA (200 mg/kg) pendant 28 jours, une diminution significative de la glycémie a été notée (74.13 %); la valeur de la glycémie exposée était similaire à celle

montrée par les rats traités par la metformine (76.72 %), mais toujours plus élevée que celle des animaux normaux.

En revanche, les taux de l'Hb glyquée ont également subi une augmentation significative chez le groupe des rats diabétiques ( $14.23 \pm 1.8^{**}$ ) comparés à ceux des rats normaux ( $3.5 \pm 0.08$ ). Alors que les rats qui reçoivent la metformine, et même ceux qui reçoivent l'extrait BETA (200 mg/kg) ont enregistrés un abaissement du taux de l'Hb glyquée (73.42 %, et 65.09 %, respectivement) (**Tab 5.7**).

### 5.5.3. Effet sur le poids relatif des organes et le poids corporel des rats

Le poids relatif des organes (poids de l'organe/poids corporel du rat  $\times 100$ ) renseigne sur la croissance pondérale de l'organe par rapport à celle de l'organisme entier. Le poids relatif du foie et des reins augmente significativement chez le groupe des rats diabétiques traités par l'extrait BETA ( $2.8 \pm 0.1^{**}$  et  $0.54 \pm 0.01^{**}$ , respectivement) (**Tab 5.7**).

Les changements du poids corporel en comparaison avec celui du premier jour de l'expérience de tous les groupes d'animaux ont été évalué (**Tab 5.7**). D'après les résultats obtenus, une perte de poids excessive a été observée chez le groupe des rats diabétiques par rapport aux rats sains ( $167.68 \pm 3.9^{**}$  g et  $266.72 \pm 6.8$  g, respectivement). Cependant après 28 jours, un gain de poids significatif a été noté chez le groupe des rats diabétiques traités par l'extrait BETA (200mg/kg), et celui des rats traités par la metformine ( $229.6 \pm 3.8^{**}$  g et  $215.6 \pm 4.6^{**}$  g, respectivement).

**Tableau 5.7:** Effet du BETA sur les paramètres biochimiques du diabète induit chez le rat par la STZ.

Extrait/Standards	Poids Initial (g)	Poids final (g)	Glucose (g/L)	Hb-glyqué	Ratio pondéral du rein	Ratio pondéral du foie
Contrôle	$193.96 \pm 4.3$	$266.72 \pm 6.8$	$1.005 \pm 0.06$	$3.5 \pm 0.08$	$0.46 \pm 0.01$	$2.45 \pm 0.1$
BETA	$206.53 \pm 5.9$	$250.53 \pm 4.8$	$1.008 \pm 0.055$	$3.43 \pm 0.06$	$0.49 \pm 0.02$	$2.73 \pm 0.05$
STZ	$241.68 \pm 6.3^{**}$	$167.68 \pm 3.9^{**}$	$3.32 \pm 0.8^{**}$	$14.23 \pm 1.8^{**}$	$0.61 \pm 0.05^{**}$	$4.49 \pm 0.2^{**}$
STZ + Metformine	$185.60 \pm 2.8^{**}$	$215.6 \pm 4.6^{**}$	$1.54 \pm 0.03^{**}$ (76.72 %)	$6.3 \pm 0.5^{**}$ (73.42 %)	$0.52 \pm 0.01^{**}$	$3.21 \pm 0.3^{**}$
STZ + BETA	$194.80 \pm 2.9^{**}$	$229.6 \pm 3.8^{**}$	$1.6 \pm 0.01^{**}$ (74.13 %)	$7.2 \pm 0.3^{**}$ (65.09 %)	$0.54 \pm 0.01^{**}$	$2.8 \pm 0.1^{**}$

Les valeurs sont exprimées en terme de moyenne arithmétique  $\pm$  écart-type (n=8),



\*: Comparaison STZ vs contrôle ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Valeurs entre parenthèses : % de protection.

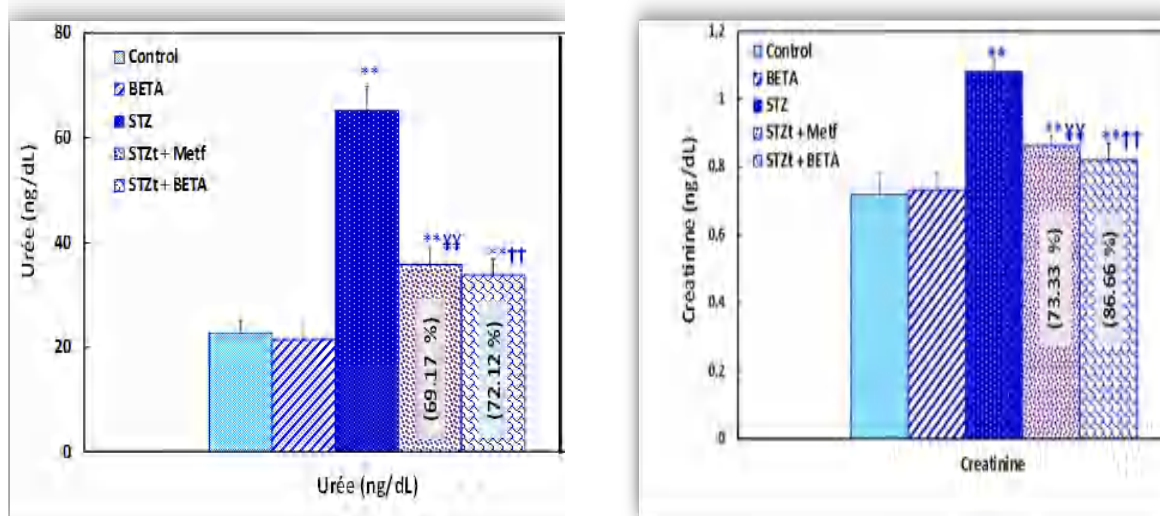
#### 5.5.4. Effet sur les paramètres biochimiques

##### 5.5.4.1. Marqueurs de la fonction rénale

L'urée et la créatinine sont considérées comme les marqueurs majeurs de la néphrotoxicité, bien que l'urée soit souvent considérée comme un prédicteur plus fiable de la fonction rénale que la créatinine. Les paramètres sériques de l'évaluation de la fonction rénale après le traitement des rats par l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* pendant quatre semaines sont présentés dans la figure (5.6).

La quantification de la créatinine a révélé qu'il y a une augmentation significative des taux chez le groupe des rats diabétiques par rapport à celui des témoins ( $1,08 \pm 0,04$  ng/dl et  $0,72 \pm 0,06$  ng/dl respectivement). À la fin de l'expérience, et après 28 jours d'administration orale de l'extrait BETA (200mg/kg), le taux de la créatinine a subi une amélioration significative (86.66%) supérieur à celle observée lors d'un traitement de même durée avec la metformine (73.33%).

L'augmentation du taux de l'urée était évidente et très significative après l'injection de la STZ ( $65,3 \pm 4,51$  ng/dl), mais par la suite, et après un traitement des rats par l'extrait BETA (200 mg/kg), pendant 4 semaines, les taux de l'urée ont tendance à se stabiliser et revenir à l'énorme (72.12%), de même l'utilisation de la metformine a exercé un effet un peu inférieur à celui de l'extrait BETA (69.17%).

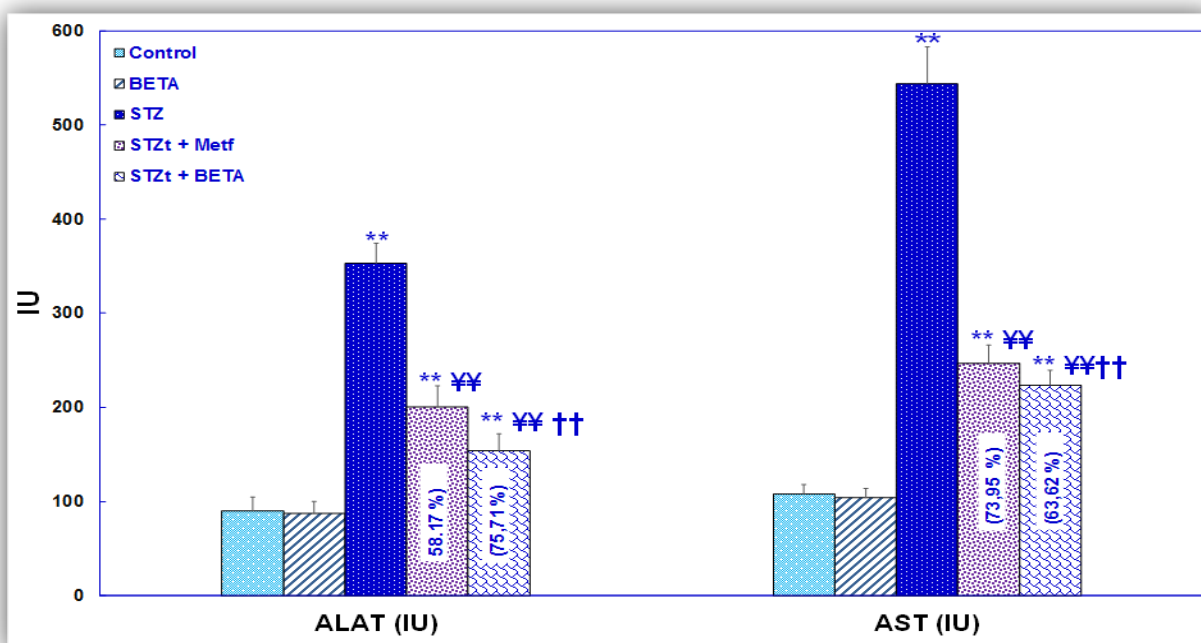


**Figure 5.6 :** L'effet protecteur de BETA (200mg/kg) sur la fonction rénale chez les rats rendus diabétiques par la STZ. Valeurs entre parenthèses: % de protection.



### 5.5.4.2. Marqueurs de la fonction hépatique

Les agents thérapeutiques utilisés dans l'induction des maladies diabétiques devraient également influencer le taux de l'AST, et l'ALT. L'effet de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* sur ces paramètres biochimiques a été étudié et les résultats sont présentés dans la figure (5.7). Concernant le taux d'AST, les résultats ont montré que le niveau d'AST des rats diabétiques est le plus élevé par rapport aux rats normaux (543,45±39,3 IU et 108,2±9,7 IU respectivement), tandis que les rats diabétiques traités avec l'extrait BETA (200 mg/kg), et par la metformine pendant 28 jours ont marqué une amélioration du taux d'ASAT (73,49 % et 68,18 % respectivement). De même, les niveaux d'ALT des rats diabétiques sont augmenté significativement par rapport aux rats témoins (353,3±21,2 IU et 89,93±14,7 IU respectivement). Cependant, le co-traitement avec l'extrait BETA a marqué une diminution du taux d'ALT (75,71 %), mieux que celle causée par l'utilisation de la metformine (58.17 %).



**Figure 5.7:** L'effet protecteur de BETA (200mg/kg) sur la fonction hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ. Valeurs entre parenthèses : % de protection.

### 5.5.4.3. Profil lipidique

Le diabète sucré était associé à une hyperlipidémie qui a provoqué des perturbations profondes de la concentration et de la composition des lipides. Au cours de notre expérimentation, deux paramètres lipidiques sont suivis, la triglycéridémie et la

cholestérolémie totale. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau (5.8). Les résultats ont montré que l'administration de STZ 60 mg/Kg a entraîné une altération significative ( $P < 0,01$ ) du lipogramme reflété par l'augmentation des taux des TG, LDL-C et TC par rapport au groupe contrôle. Par contre une diminution remarquable du taux de HDL-C a été enregistrée. Le co-traitement avec 200 mg/Kg de BETA a permis d'éviter significativement ces altérations et de maintenir les taux de TG (62,06 %);  $P < 0,01$ , LDL-C (52,74 %);  $P < 0,05$ , HDL-C (55,75 %;  $P < 0,05$ ), en comparaison à la metformine : la TG (68,96 %), le LDL-C (74,72 %), le HDL-C (73,45 %).

**Tableau 5.8:** Effet du BETA sur le profile lipidique chez les rats rendus diabétiques par la STZ.

Extrait/Standards	CT (g/L)	HDL-C (g/L)	LDL-C (g/L)	TG(g/L)
Contrôle	0.7±0.01	0.2±0.01	0.39±0.01	0.49±0.03
BETA	0.69±0.02	0.22±0.01	0.38±0.01	0.43±0.03
STZ	2.07±0.02**	0.087±0.001**	1.3±0.01**	1.65±0.02**
STZ + Metformine	1.06±0.01†† (73.72 %)	0.17±0.01† (73.45 %)	0.62±0.01† (74.72 %)	0.85±0.03†† (68.96%)
STZ + BETA	1.09±0.03†† (71.53 %)	0.15±0.02†† (55.75%)	0.82±0.02†† (52.74 %)	0.93±0.03†† (62.06%)

Les valeurs sont exprimées en terme de moyenne arithmétique ± écart-type (n=8)

\*: Comparaison STZ vs contrôle ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ;

¥: Comparaison + BETA vs STZ; ¥ $p < 0.05$ , ¥¥ $p < 0.01$ ;

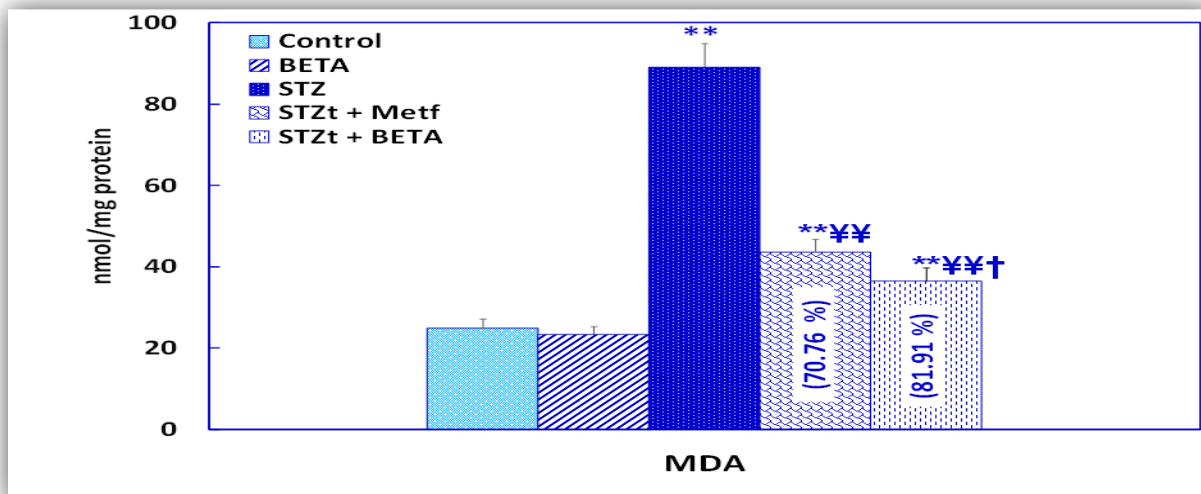
†: Comparaison STZ + extrait vs STZ; † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$ ;

Valeurs entre parenthèses : % de protection.

### 5.5.5. Évaluation du statut oxydant cytosolique hépatique et rénale

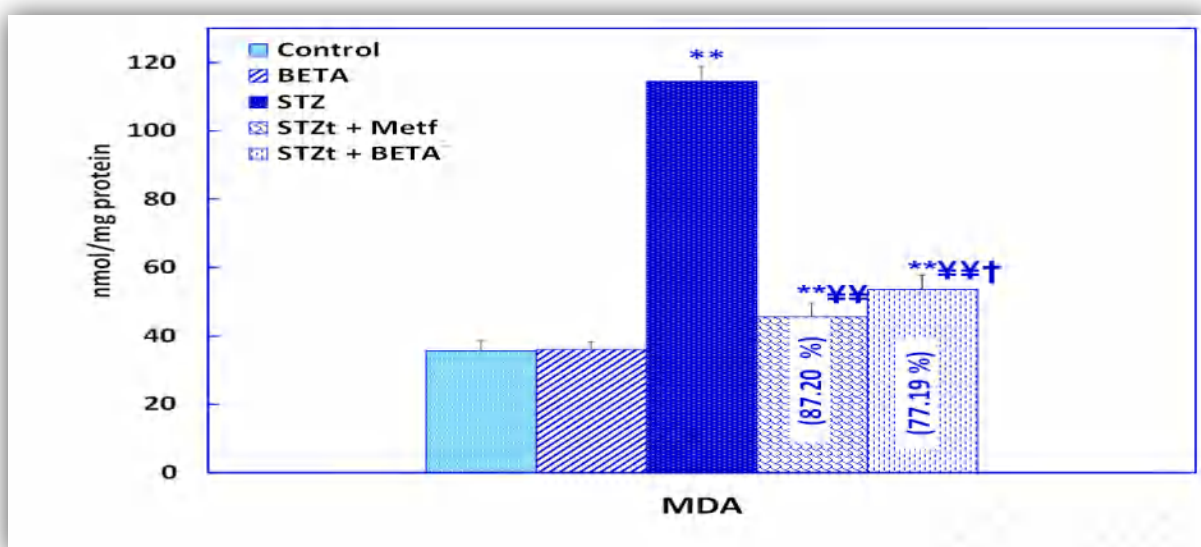
#### 5.5.5.1. La peroxydation lipidique

La figure (5.8) montre l'effet de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* sur la variation du taux de l'MDA dans les tissus hépatiques des rats rendus diabétique par la STZ. L'injection de STZ a provoqué une peroxydation lipidique traduite par une augmentation hautement significative du taux du MDA au niveau du foie (89,11±5,8 nmol/mg protéine). Le traitement des rats avec l'extrait BETA (200 mg/kg) pendant 28 jours a diminué les taux de l'MDA hépatique jusqu'à (81,91 %), un taux plus élevé que celui de l'antidiabétique utilisé dans notre expérimentation (70,76 %).



**Figure 5.8:** L'effet de BETA sur le taux de l' MDA hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ. Valeurs entre parenthèses: % de protection.

De même, l'effet de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* sur la variation du taux de l'MDA dans les tissus rénaux des rats rendus diabétiques par la STZ a été également évalué, la figure (5.9) montre les résultats obtenus. La néphrotoxicité induite par la STZ a provoqué une augmentation hautement significative du taux du marqueur de la peroxydation lipidique, le MDA ( $114,5 \pm 4,5$  nmol/mg protéine). Cependant, le co-traitement des rats avec l'extrait BETA (200 mg/kg) pendant 28 jours a minimisé le taux de MDA rénale jusqu'à (77,19 %), un taux qui pourrait être considéré comme similaire à celui de l'antidiabétique utilisé, la metformine (87,20 %).

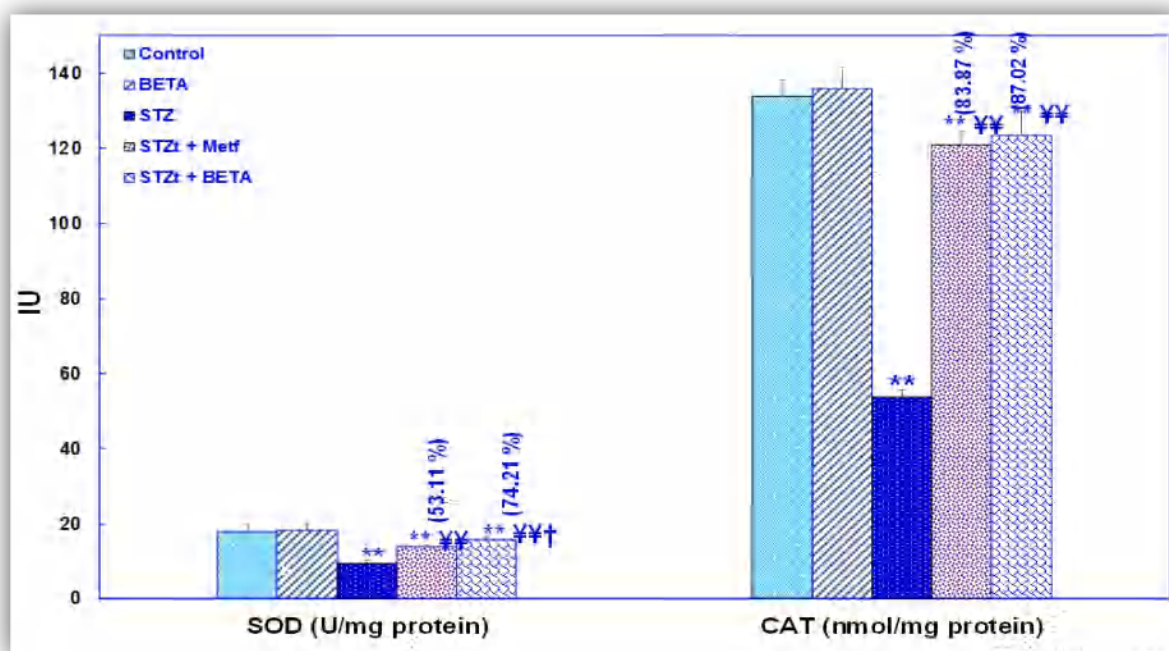


**Figure 5.9:** L'effet de BETA sur le taux de l' MDA rénal chez les rats rendus diabétiques par la STZ. Valeurs entre parenthèses: % de protection.

### 5.5.6. Activité antioxydante de la BETA (CAT et SOD hépatique et rénale)

L'activité enzymatique de la CAT et de la SOD a été déterminée sur une fraction cytosolique du foie et des reins. Les résultats obtenus montrent l'influence de l'administration de l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* pendant 28 jours sur l'activité des deux enzymes mentionnées ci-dessus.

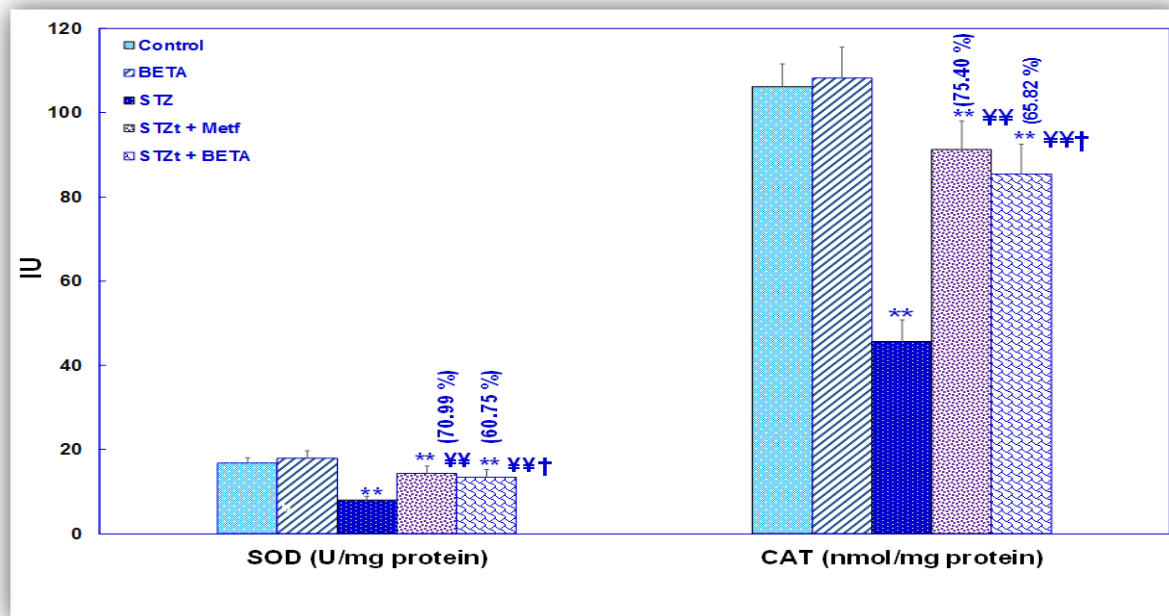
La figure (5.10) montre que l'activité enzymatique de la CAT et de la SOD dans le foie des rats rendus diabétiques par la STZ a significativement diminuée ( $53,7 \pm 1,8$  nmol/mg protéine et  $9,35 \pm 0,88$  U/mg protéine, respectivement), par rapport aux rats témoins ( $133,8 \pm 4,3$  nmol/mg protéine). L'extrait BETA (200 mg/kg) a préservé l'activité de la SOD hépatique jusqu'à (53.11 %) et celle de la CAT jusqu'à (87.02 %). L'antidiabétique oral utilisé; la metformine; a permis de préserver l'activité de la SOD et la CAT chez les rats diabétiques par un pourcentage de (53.11 %) et (83.87 %) respectivement.



**Figure 5.10:** L'effet de BETA sur les activités SOD, CAT hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ. Valeurs entre parenthèses : % de protection.

La figure (5.11) illustre l'effet du BETA sur l'activité de la SOD et de la CAT au niveau rénal. Après l'administration de la STZ, une réduction significative de l'activité de la SOD et de la CAT a été notée. Cette réduction est à l'ordre de ( $8,01 \pm 0,88$  U/mg protéine) pour la SOD, et de ( $45,63 \pm 1,09$  nmol/mg protéine) pour la CAT. Par contre un traitement de quatre semaines par l'extrait BETA a provoqué une augmentation significative de l'activité

de la SOD et de la CAT ( $13,35 \pm 0,8$  U/mg protéine) et ( $85,5 \pm 1,08$  nmol/mg protéine) respectivement. La metformine a également enregistré une réduction à l'ordre de ( $14,25 \pm 0,8$  U/mg protéine) pour la SOD, et de ( $91,3 \pm 0,8$  nmol/mg protéine) pour la CAT.

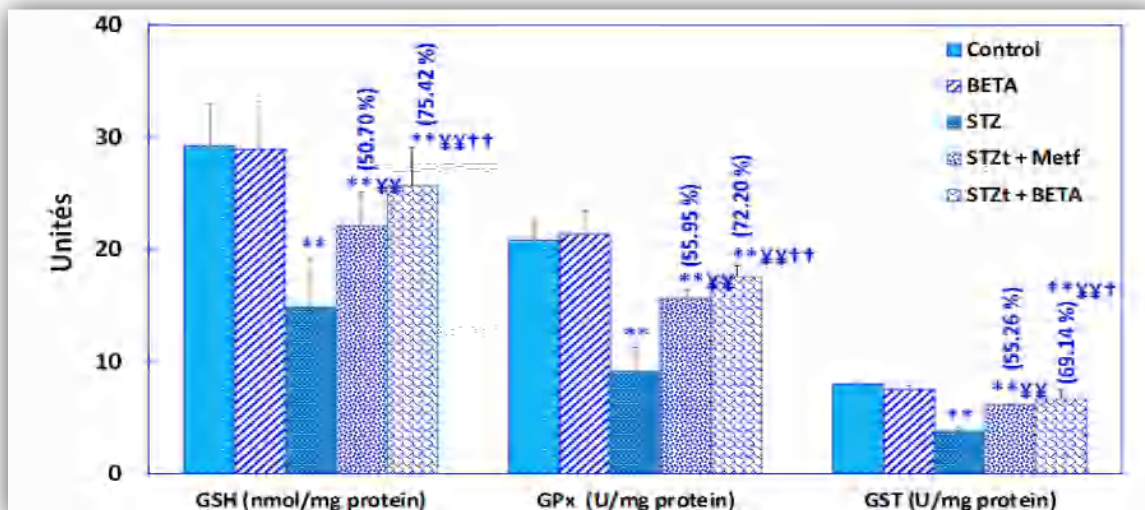


**Figure 5.11:** L'effet de BETA sur les activités SOD, CAT rénale chez les rats rendus diabétique par la STZ. Valeurs entre parenthèses: % de protection.

### 5.5.7. Activité antioxydante de l'extrait BETA sur le système glutathion hépatique et rénale

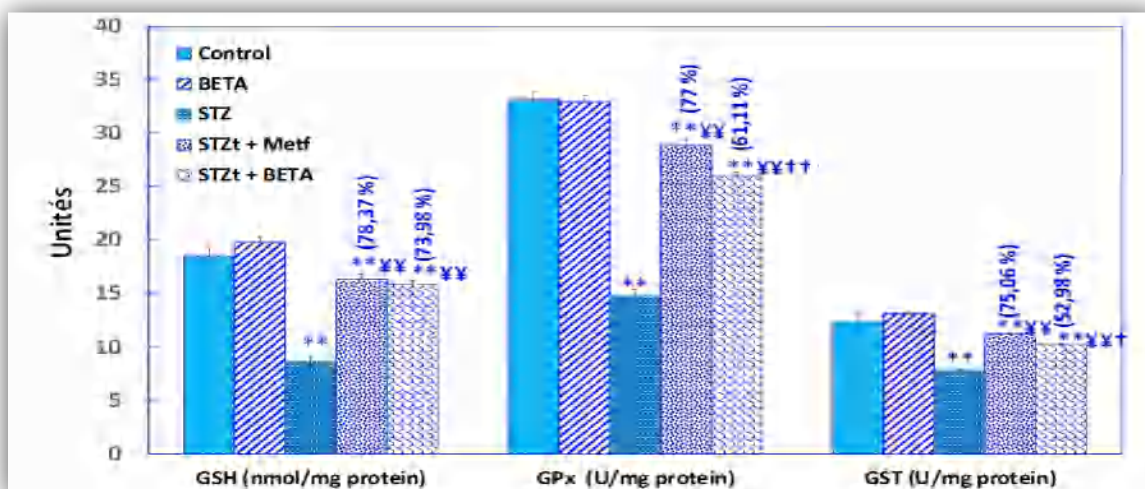
Les résultats de l'étude de l'influence d'un traitement de quatre semaines par l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* sur le taux du GSH hépatique sont rassemblés dans la figure (5.12). Les rats rendus diabétiques par la STZ présentent une déplétion du taux de GSH hépatique ( $14,83 \pm 3$  nmol/mg protéine), ainsi une réduction des activités des enzymes liées au système-GSH à savoir le GST ( $3,81 \pm 0,1$  U/mg protéine) et le GPX ( $9,11 \pm 0,8$  U/mg protéine). Cependant, le traitement avec l'extrait BETA (200mg/kg) pendant 28 jours a permis la régulation du taux du GSH (75,42 %) et la restauration des activités des enzymes du système-GSH, le GPx à (72,20 %), et le GST à (69,14 %). Le rétablissement des paramètres de ce système antioxydant par l'extrait BETA apparait même supérieur à celui observé dans le cas du traitement des rats par la metformine: GSH (50,70 %), GPx (55,95 %), et le GST (55,26 %).





**Figure 5.12:** L'effet de BETA sur le système GSH, GPx, et GST hépatique chez les rats rendus diabétiques par la STZ. Valeurs entre parenthèses: % de protection.

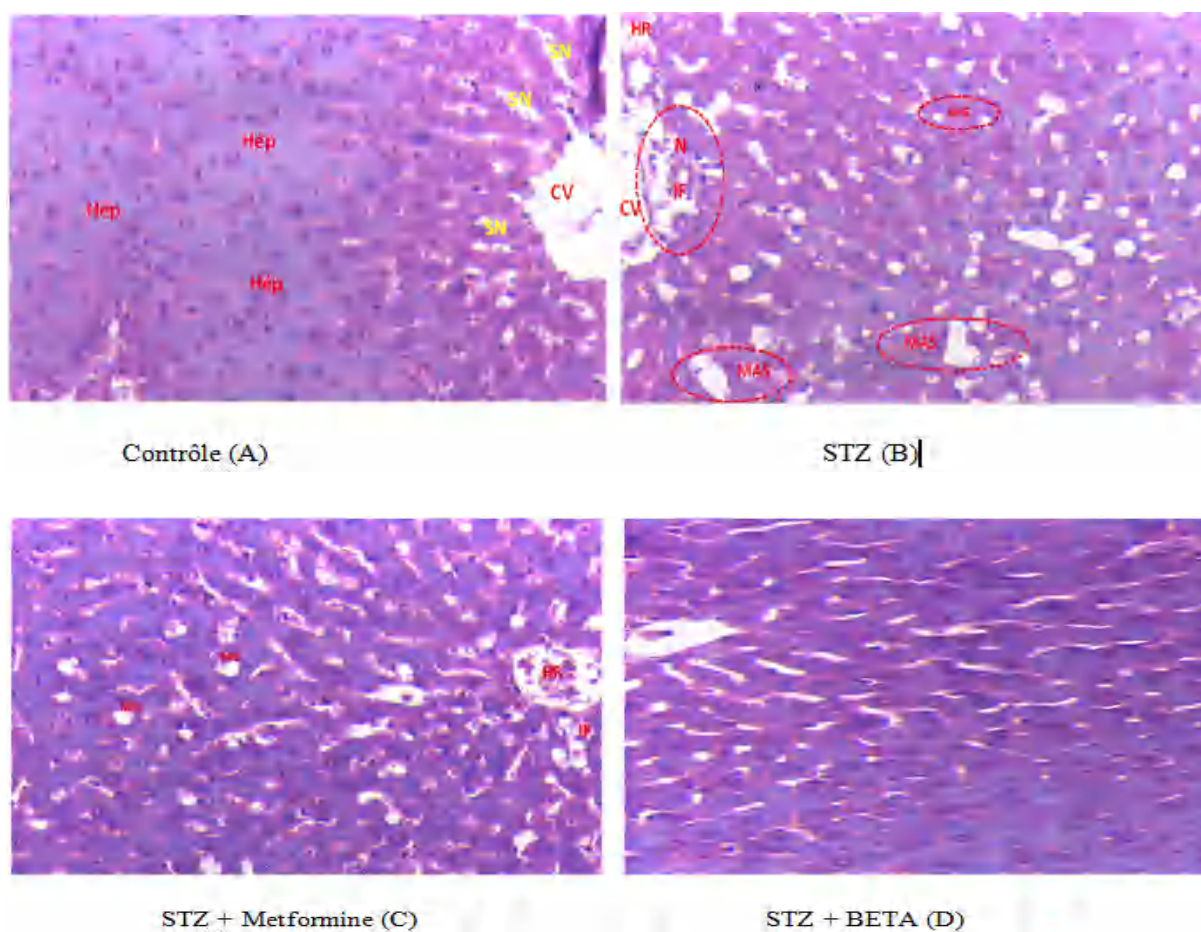
D'autre part, l'étude de l'influence d'un traitement de quatre semaines par l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* sur le taux du GSH rénal a été également testée, les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure (5.13). Une diminution significative du taux du GSH rénal a été constatée chez les rats rendus diabétiques par la STZ, suivie d'une réduction des activités des enzymes liées au système-GSH à savoir le GST et le GPx. Cependant, l'administration quotidienne de l'extrait BETA pendant 28 jours a pu restaurer le taux du GSH rénal (73,98%), ainsi que le taux de GPx (61,11%) et de GST (52,98%). L'antidiabétique utilisé à également pu restaurer le taux de ce système antioxydant à l'ordre de (78,37%) pour le GSH, et de (77%) et (75,06%) pour le GPx et le GST respectivement.



**Figure 5.13:** L'effet de BETA sur le système GSH, GPx, et GST rénal chez le rat rendu diabétiques par la STZ. Valeurs entre parenthèses : % de protection.

### 5.5.8. Étude histologique

Les coupes histologiques du foie des rats diabétiques non traités ont montré des changements dégénératifs dans les hépatocytes représentés par une désorganisation des cordons hépatiques, une hyperémie des sinusoides, une hypertrophie et une congestion des veines centrales, des veines portes et hépatiques artères avec nécrose hépatocellulaire légère accompagnée de la présence de gouttelettes lipidiques reflétant une stéatopathie (**Fig 5.14 B**). Cependant, les coupes du foie des rats diabétiques traités avec l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* ont indiqué une amélioration significative par rapport à celles des diabétiques non traités, à l'exception de la présence de quelques hépatocytes légèrement dégénérés autour des veines centrales et quelques vacuoles cytoplasmiques. De plus, il n'y avait aucune preuve d'hémorragie, d'infiltration de cellules inflammatoires ou de nécrose des cellules parenchymateuses dans le foie des rats diabétiques traités à l'extrait BETA (**Fig 5.14 D**). Le foie du groupe témoin représente une structure normale (**Fig 5.14 A**).



**Figure 5.14:** Micrographe de l'examen histopathologique hépatique (H & E  $\times$  400).

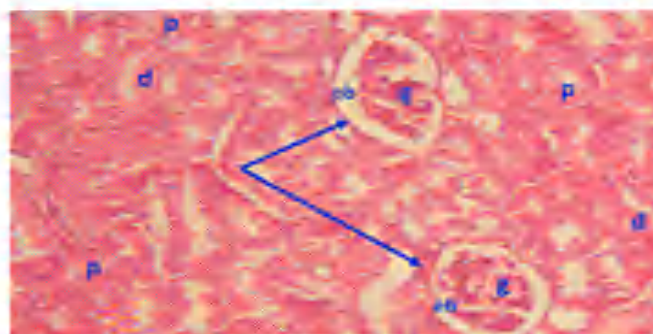
(A) (Contrôle): architecture hépatique normale avec une veine centrale normale (CV), des espaces sinusoidaux (SN) et des cordes radiées hépatocytaires,

(B) (Rats – STZ) : altérations drastiques de l'histoarchitecture, infiltration des cellules inflammatoires (IF), gouttelettes lipidiques au niveau du parenchyme. Une stéatose microvésiculaire (MIS) et une stéatose macrovésiculaire (MAS) dominant dans la zone intermédiaire et une nécrose centrolobulaire (N). Des degrés d'hémorragies (HR)

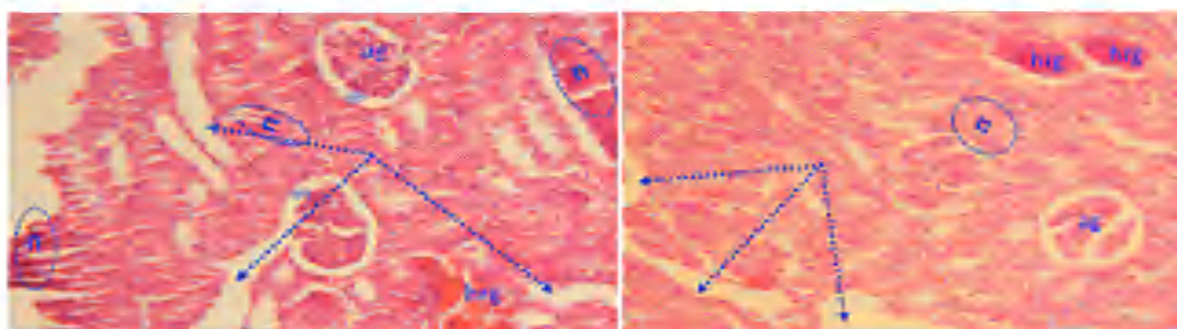
(C) (STZ + Metf): L'altération de architecture est moins sévère et montre des cordes hépatocytaires régulières accompagnée d'une stéatose modérée (MIS).

(D). (STZ + BETA): L'architecture hépatique a été préservé et montre des cordons d'hépatocyte réguliers, la veine centrale est moins congestionnée.

Les reins des rats témoins montrent une structure normale, les tubules contournés proximaux et distaux, le glomérule et la capsule glomérulaire avaient une architecture normale (**Fig 5.15 A**). Cependant, dans le groupe des rats diabétiques non traités, des défauts structurels ont été observés. L'examen microscopique des reins des rats diabétiques traités avec l'extrait BETA n'a pas montré de nécrose tubulaire ou des changements nécrotiques dans l'épithélium glomérulaire (**Fig 5.15 D**).



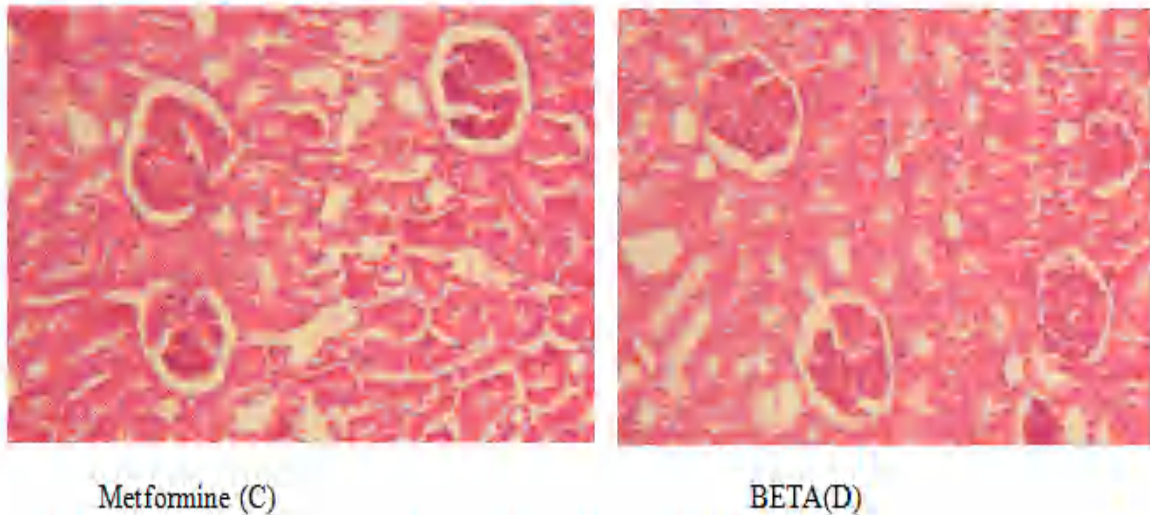
Contrôle (A)



STZ (B1)

STZ (B1)





**Figure 5.15:** Photomicrographie de l'histopathologie du cortex rénale (H&E X400).

-(A) (contrôle): glomérule normale (g), tubules rénaux RT, (proximal; p, distale ; d)

-(B1) et (B2) (rats-STZ) : Altération du parenchyme rénale montrant une perte structurale des arrangements des tubules (flèches), une dégénération sévère et une atrophie glomérulaire (ag), dilation de l'espace Bowman (Head Arrow), nécrose tubulaire proximale (n).

(C) (metformine-groupe) : préservation de l'architecture glomérulaire avec une régularisation des cellules épithéliales de quelques tubules, une nécrose tubulaire modérée,

(D) (BETA-groupe): une légère dégénération au niveau des tubules proximaux avec un degré de modération des altérations histopathologiques avec des tubules sains.



**CHAPITRE 06**

**DISCUSSION**



## 6. Discussion

Le diabète sucré est le résultat d'un déséquilibre dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, suivi d'une sécrétion d'insuline ou d'une action de l'insuline défectueuses ou de ces deux anomalies associées (Zheng *et al.*, 2018). Actuellement, les plantes sont utilisées comme remède traditionnel et sont considérées comme des sources de nouveaux médicaments pour lutter contre de nombreuses maladies y compris le diabète (Doan *et al.*, 2018). De nombreux travaux récents effectués dans le but de répertorier les plantes médicinales antidiabétiques dans la flore algérienne soulignent l'importance qu'occupe ce patrimoine végétal dans la pharmacopée traditionnelle et surtout dans le traitement du diabète sucré (Kooti *et al.*., 2016 ; Sharma *et al.*, 2020).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet antidiabétique ainsi que l'effet antioxydant de l'extrait n-butanolique de la plante *Thymus algeriensis* (BETA) réalisée en deux étapes: *in vitro* et *in vivo*.

Les phénols sont des composés qui ont la capacité de détruire les radicaux car ils contiennent des groupes hydroxyles. Ces composants végétaux cèdent les atomes d'hydrogène de leurs groupes hydroxyles aux radicaux et forment des radicaux phénoxyliques stables; par conséquent, ils jouent un rôle important dans l'activité antioxydante (Sengul *et al.*, 2009). Les flavonoïdes sont considérés comme des composés polyphénoliques à faible masse moléculaire, ayant une gamme de bioactivités, y compris des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Di Carlo *et al.*, 1999). Il est très important d'examiner la relation entre la teneur en polyphénols totaux et le potentiel antioxydant total car certains auteurs ont rapporté qu'il n'y a pas de relation entre la teneur en ces principaux composés antioxydants et la capacité de piégeage des radicaux libres (Yu *et al.*, 2002). Les résultats obtenus dans notre étude ne supportent pas ces dernières affirmations; le dosage des polyphénols totaux en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a indiqué une valeur polyphénolique extrêmement élevée au niveau de la BETA. Des études antérieures ont également montré qu'il existe une relation réellement positive entre les polyphénols, les flavonoïdes et les activités antioxydantes (Dibacto *et al.*, 2021; Kiani *et al.*, 2021). D'après les résultats obtenus, il est possible que la teneur de l'extrait en polyphénols et flavonoïdes puisse contribuer à son activité antioxydante.

Les études de l'activité antioxydante de l'extrait du *T.algeriensis* ont été effectuées par quatre tests complémentaires, à savoir : le DPPH°, l'ABTS°, et l'évaluation de l'activité antioxydante totale par le phosphomolybdène. La quantité d'extrait végétal nécessaire pour diminuer la concentration initiale de DPPH de 50 % (EC<sub>50</sub>) est un paramètre largement utilisé pour mesurer l'activité antioxydante, dont cette dernière s'accroît avec l'augmentation de la concentration. En présence d'un agent antioxydant, le DPPH° forme un radical libre de couleur violette stable en obtenant un autre atome d'électron ou d'hydrogène de l'antioxydant et le transforme en  $\alpha$ - $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picryl hydrazine incolore (**Brand-Williams et al., 1995**). L'extrait de *T.algeriensis* a été caractérisé par une capacité de piégeage des radicaux libres semblable à celle des antioxydants synthétiques comme la quercétine, le BHA, et le trolox qui ont été utilisés comme étalons de référence. Cette activité antiradicalaire pourrait être liée à la présence de flavonoïdes ou autres composés phénoliques. Collectivement, les données obtenues à partir de l'évaluation de l'activité antioxydante de BETA par le test DPPH° sont comparables aux résultats rapportés sur d'autres espèces de *Thymus* tels que *Thymus serrulatus* (**Haile et al., 2021**), et *Thymus ciliatus* (**Souadia, 2022**).

Le test de décoloration des cations radicaux ABTS° a montré des résultats assez similaires à ceux obtenus dans le test du DPPH°. Il existe également des corrélations significatives entre le dosage ABTS° et la teneur phénolique totale déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ces résultats indiquent une relation entre la concentration en composés phénoliques dans l'extrait végétal de *T.algeriensis* et sa capacité de piégeage des radicaux libres. Ceci est en accord avec une autre étude travaillant sur une espèce du même genre : *Thymus atlanticus* (**Khouya et al., 2021**).

Pour étudier la variation de l'activité antioxydante de l'extrait BETA, le dosage du pouvoir réducteur a été réalisé en utilisant la quercétine, le BHA, et le trolox comme agents réducteurs de référence (**Moein et al., 2008**). La présence d'agents réducteurs dans l'extrait de *T.algeriensis* a induit une réduction des ions ferriques (Fe<sup>+3</sup>) en ions ferreux (Fe<sup>+2</sup>). Cette réduction est mesurée par l'intensité de la couleur bleu verte qui en résulte. Donc notre extrait a exercé un pouvoir réducteur, ce dernier pourrait être due à la réduction de l'anion superoxyde, ou à l'inactivation des radicaux libres, grâce à la présence d'antioxydants naturels tels que les composés phénoliques dans la *T.algeriensis* (**Boutaoui et al., 2018**). Des résultats assez similaires ont également été obtenus pour d'autres plantes du genre

*Thymus* tel que *Thymus capitatus* (Jabri-Karoui *et al.*, 2012), et *Thymus vulgaris* (Kindl *et al.*, 2015).

La méthode au phosphomolybdène est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par les composés antioxydants à pH acide et la formation d'un complexe vert : phosphate /Mo (V) avec l'absorption maximale à 695 nm (Prieto *et al.*, 1999). Les résultats obtenus dans le dosage du phosphomolybdène impliquent que l'extrait de *T.algeriensis* montre une forte capacité à agir comme antioxydant. L'explication possible de cette activité biologique c'est qu'un effet synergique des composants phénoliques peut exercer une activité antioxydante élevée (Ceylan *et al.*, 2015). Zengin *et al.*, (2019) ont également rapportés des résultats similaires pour la plante *Thymus argaeus*.

Afin d'identifier les composés responsables de l'activité antioxydante associée à la plante *T.algeriensis*, une caractérisation chimique de l'extrait a été réalisée par LC-MS. Le composé dominant dans l'espèce examinée était l'acide férulique, dont la valeur tourne autour de 59826,860 mg/kg. Ce composé a été considéré comme un antioxydant dans le sens où il est réactif vers les radicaux libres tels que les espèces réactives d'oxygène (Shahidi *et al.*, 1992). Mis à part l'acide férulique, l'acide rosmarinique représentait 54228,711 mg/kg du total des composés phénoliques quantifiés dans notre BETA. La teneur élevée en acide rosmarinique de l'extrait végétal vue dans notre étude est en bon accord avec ses niveaux dans d'autres espèces du genre *Thymus* (Afonso *et al.*, 2017). Ainsi, les propriétés antioxydantes observées de la plante *T.algeriensis* peuvent dépendre fortement de l'acide rosmarinique (Özgen *et al.*, 2006), qui possède un très fort potentiel de piégeage du radical DPPH° (Chen et Ho, 1997). L'acide caféique et l'acide chlorogénique représentent d'environ 3404, 063 mg/kg et 916,121 mg/kg de l'extrait. Conformément à la littérature, l'acide caféique était présent à des concentrations plus faibles que l'acide rosmarinique lorsqu'il a été identifié (Janicsak *et al.*, 1999). De plus, plusieurs composés phénoliques tels que la quercétine, l'acide gallique, l'acide gentisique, l'acide hydroxybenzoïque et l'acide coumarique ont été détectés. Nos résultats concordent avec ceux obtenus dans l'étude de Mokhtari *et al.*, (2021), qui ont presque caractérisé les mêmes composés phénoliques dans la même espèce *T.algeriensis*. Ces composés ont été signalés comme étant des antioxydants efficaces, en particulier pour inhiber l'oxydation des lipides (Shahidi et Naczki, 2003).

L'oxydation de l'acide linoléique produit des hydroperoxydes dérivés de radicaux libres qui attaquent le chromophore du  $\beta$ -carotène entraînant un blanchiment de l'émulsion

réactionnelle (**Miraliakbaria et Shahidi, 2008**). Les résultats obtenus ont montré qu'il y avait une diminution de la valeur d'absorbance due à l'oxydation du  $\beta$ -carotène, donc l'extrait BETA présente une activité antioxydante comparativement aux substances standards BHA, quercétine et trolox. La présence d'une quantité variable de composés antioxydants dans cet extrait peut entraver l'étendue du blanchiment du  $\beta$ -carotène en neutralisant les radicaux libres de linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système (**Koleva et al., 2002**).

Dans le test de l'inhibition de la peroxydation du thiocyanate ferrique d'acide linoilique, l'ion ferreux est oxydé par des radicaux de linoléate tels que des hydroperoxydes pour former l'ion ferrique qui est surveillé comme un complexe de thiocyanate à 500 nm. Les composés antioxydants contenus dans l'extrait de *T.algeriensis* empêchent l'oxydation des ions ferreux en inhibant les radicaux linoléate dans le système (**Osawa et Namiki, 1981**). L'oxydation de l'acide linoléique a été efficacement inhibée par notre extrait BETA, ce dernier a montré une activité antioxydante élevée en inhibant la formation d'ions ferriques.

Selon notre conclusion, l'effet bénéfique de l'extrait BETA peut être attribué à la présence de quantités élevées de polyphénols. Nos études phytochimiques sur le même extrait ont révélé sa richesse en polyphénols tels que l'acide férulique, l'acide rosmarinique, l'acide café, l'acide chlorogénique et la quercétine, connus comme des agents antioxydants (**Lu et Foo, 2001**). Nos résultats sont en bon accord avec plusieurs études dans la littérature, qui montrent que les espèces de *Thymus* sont considérées comme agents antioxydants potentiels, leur richesse en acide rosmarinique et ses dérivés ont déjà été signalés pour leurs propriétés antioxydantes (**Del Baño et al., 2003**). Cette potentialité pourrait être attribuée à sa double liaison insaturée et à la présence de dihydroxyphénol ou de catéchol qui facilite la délocalisation des quinones résultantes (**Chen et al., 2016**). La présence de la structure du catéchol en position C11 et C12 est également un élément important dans l'activité antioxydante de l'acide rosmarinique. La présence d'un groupe carboxylique dans un dimère d'acide phénolique comme l'acide rosmarinique renforce l'activité antioxydante de ce composé (**Del Baño et al., 2003**).

La peroxydation lipidique est considérée comme un facteur important dans la physiopathologie d'un certain nombre de maladies (**Halliwell, 1994**). Elle est probablement le processus induit par les radicaux libres le plus étudié (**Ngre-Salvayre et al., 2008**). Cette

étude a montré que l'extrait BETA réduisait le format des ions TBARS en fonction de la concentration en réduisant le MDA générée par Fe<sup>3+</sup>/ascorbate de la même façon des standards de référence trolox, BHA et la quercétine. L'extrait de BETA est doté de cette propriété antioxydante grâce toujours à sa richesse en métabolites déjà prescrits au-dessus.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait BETA confirme sa grande richesse en métabolites secondaires, autre raison qui nous a poussé d'évaluer son activité hypoglycémiant. La tolérance orale au glucose et la capacité de l'extrait BETA à inhiber l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase ont été testées. D'après les données obtenues avec le test de tolérance au glucose par voie orale, il est clair que les niveaux de glucose plasmatique ont atteint un pic et sont revenus à des valeurs proches de la normale après 180 min chez les rats normaux et traités au *T.algeriensis* (200 et 500 mg/kg). L'administration de cet extrait a efficacement empêché l'augmentation du glucose plasmatique sans causer un état hypoglycémique. Cet effet peut être dû à la réduction de l'utilisation des tissus de glucose et à une augmentation de la production hépatique de glucose, en raison de la diminution de la sécrétion d'insuline (Gupta *et al.*, 2005). De même, Alamgeer *et al.*, (2012) ont montré que *Thymus serpyllum* Linn, qui est riche en composés phénoliques, présentait également un effet anti-hyperglycémique.

A propos de l'activité inhibitrice des deux enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase, notre extrait BETA qui est fortement riche en polyphénols, a montré des effets inhibiteurs élevés contre l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase, révélant qu'il pourrait mettre en œuvre une fonction antidiabétique potentielle en inhibant les deux enzymes. En outre, il a été rapporté que les polyphénols alimentaires, en plus de leur effet antioxydant, ils exercent également un effet anti-hyperglycémiant en se liant aux transporteurs de glucose (Tundis *et al.*, 2010) et en inhibant de manière compétitive les enzymes digestives (Bischoff, 1994). De plus, de nombreuses herbes riches en composés phénoliques présentent une forte interaction avec les protéines et peuvent inhiber leurs activités enzymatiques en formant des complexes et en changeant la conformation (Liu *et al.*, 2013). Donc l'activité inhibitrice de l'extrait de *T. algeriensis* pourrait être due à la présence de plusieurs composés phytochimiques tels que l'acide rosmarinique (Kwon *et al.*, 2007 ; Umeno *et al.*, 2016 ; Mccue *et al.*, 2010).

La formation d'AGE qui conduit à la réaction de glycation des protéines est une caractéristique de l'hyperglycémie (Singh *et al.*, 2001), et joue un rôle clé dans le développement des complications du diabète (Peppia et Vlassara, 2005). L'utilisation de la



metformine et l'aminoguanidine, connu aussi comme des inhibiteurs de glycation; qui inhibent la réticulation de l'AGE-BSA dans le glucose-BSA ou le piègeur de méthylglyoxal libre respectivement, a été limitée, en raison de leur cytotoxicité, ou parce qu'ils ne sont pas assez efficaces pour inhiber le processus de glycation au cours de l'hyperglycémie chronique (**Lucis, 1983**). Il y a donc une demande urgente de nouveaux agents non toxiques.

Dans la présente étude, l'activité inhibitrice de l'extrait BETA sur l'AGE a été évaluée en utilisant la protéine de glycation glucose-BSA, le MGO-BSA, et le modèle d'Hb glycation. Nos résultats ont montré que *T.algeriensis* prouvait une activité antiglycation dépendante de la dose lorsqu'il était utilisé avec le modèle de glycation glucose-BSA. Le 3-méthylglyoxal (MGO) est considéré comme l'un des précurseurs les plus réactifs des AGEs et est le réactif capable de causer un stress dicarbonylique, influençant les fonctions physiologiques normales (**Lapolla et al., 2003**). Dans notre étude, l'extrait BETA a également eu un effet inhibiteur sur la formation des AGEs lorsqu'il a été testé sur la glycation du MGO-BSA. L'autoxydation et la perturbation de la glycation des protéines de la chaîne de transport des électrons constituent une base moléculaire clé des complications diabétiques résultant d'une hyperglycémie chronique (**Lapolla et al., 2003**). On croit que la formation d'AGE sur une période prolongée *in vivo* affecte particulièrement les protéines à longue durée de vie comme l'hémoglobine, l'hémoglobine A1c, un produit de glycation non enzymatique bien connu. L'hémoglobine A1c est un indice clinique du diabète sucré, où le groupe amino N-terminal de la valine est glyqué (**Liu et al., 2011**). Nos résultats indiquent que l'extrait de *T.algeriensis* a réussi à limiter la glycation de l'hémoglobine lors d'une exposition à 2 % de glucose sur une période de 72 heures, toujours en le compare avec les deux médicaments standards la metformine et à l'aminoguanidine. Il a été rapporté que le stade précoce de la réaction de Maillard s'accompagne de la production d'une grande quantité de radicaux libres (**Matsuura et al., 2002 ; Yeh et al., 2017**). Par conséquent, nous avons considéré que la peroxydation anti-lipidique et le piégeage des radicaux libres qui ont été démontrés par l'extrait BETA peuvent avoir un effet efficace sur la réduction des AGEs au stade précoce de la glycation. De manière intéressante, l'effet anti-AGE du *T.algeriensis* pourrait être dû à sa richesse en polyphénols identifiée par l'analyse de LC/MS. Les agents les plus abondants et les plus puissants signalés étaient l'acide férulique et l'acide rosmanique, suivis par l'acide caféique et l'acide chlorogénique.

Les interactions synergiques possibles de ces composés phénoliques ont montré des propriétés antioxydantes, qui peuvent être bénéfiques pour l'effet anti-AGE (**Rabiei et al.,**



2019). Plusieurs études ont montré que l'acide férulique et l'acide chlorogénique ont inhibé de façon significative la modification protéique induite par le glucose (Lo *et al.*, 2011). Les acides caféique et chlorogénique ont été signalés comme étant les principaux inhibiteurs de la génération d'AGE par le méthylglyoxal dans les protéines modèles (Gugliucci *et al.*, 2009), et pourraient inhiber la production d'AGEs et la réticulation ultérieure de l'activité des protéines (Chao *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). La quercétine s'est révélée efficace au stade avancé de la glycation des protéines dans le modèle BSA-glucose et a réduit considérablement la production d'hémoglobine. HbA<sub>1c</sub>, au début de la phase de glycation (Chen *et al.*, 2016), l'aminoguanidine, un inhibiteur des AGE, s'est avérée capable d'inhiber la production d'AGE en piégeant la MG et le glyoxal (Li *et al.*, 2014).

La structure de base de l'acide phénolique comporte de nombreux groupes hydroxyle ; par conséquent, il peut avoir d'excellentes fonctions antiglycatives et de piégeage de MG lorsqu'un cycle benzénique a un à deux groupes OH. On pense que le composé d'acide 2,4,6-trihydroxybenzoïque a une bonne structure de piégeage de MG (Lo *et al.*, 2011). L'analyse LC/MS a révélé que l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* possède plusieurs antioxydants tels que les phénols et les flavonoïdes, qui ont été suggérés pour inhiber la formation des AGE, ces propriétés ont été attribuées à la structure de ces composés.

Puisque nos travaux ont mis en exergue l'extrait BETA pour sa forte capacité antioxydante et antidiabétique, nous avons poursuivi nos travaux en nous concentrant sur l'étude *in vivo* de son effet hypolycémiant sur des rats rendus diabétiques en utilisant la streptozotocine.

La streptozotocine (STZ) a été initialement identifiée à la fin des années 1950 comme un antibiotique et a été découverte dans une souche du microbe du sol *Streptomyces achromogenes* (Hosseini et Abdollahi, 2013). Elle contient une molécule de glucose liée à un groupement méthyl-nitrosourea hautement réactif dont on pense qu'elle exerce les effets cytotoxiques de la STZ tandis que le groupement de glucose dirige le produit chimique aux cellules  $\beta$  pancréatiques (Baczako et Dolderer, 1997). La STZ a une demi-vie courte, due au métabolisme rapide dans le foie et à l'élimination par excrétion rénale (Eleazu *et al.*, 2013). Une fois la STZ est éliminée de l'organisme, une déficience fonctionnelle supplémentaire du foie ou du rein peut être attribuée aux effets de l'hyperglycémie diabétique. C'est la base de l'étude des mécanismes de complications diabétiques dans ces organes (Tesch et Allen, 2007).

Le diabète induit par la STZ chez les rongeurs demeure l'un des modèles animaux les plus acceptables pour étudier la pathogenèse du diabète de type 1 et la découverte de nouveaux médicaments, car il induit des complications et des manifestations cliniques semblables à celles observées chez l'homme (**Tesch et Allen 2007; Wang-Fischer et Garyantes, 2018**). L'administration intrapéritonéale de STZ (60 mg/kg) endommage partiellement les cellules  $\beta$  pancréatiques sécrétant de l'insuline en brisant le brin d'ADN, ce qui entraîne une augmentation de la glycémie et une diminution de la libération d'insuline endogène (**Pushparaj et al., 2000**). Dans notre étude, l'induction du diabète se traduit par une hyperglycémie, une polyphagie, une polydipsie et une perte de poids corporel par rapport aux rats normaux. L'administration orale de BETA (200 mg/kg) a entraîné une réduction de la glycémie à jeun au cours des différents jours de traitement, cette diminution étant comparable à celle induite par la metformine. La metformine, un biguanide, est un médicament oral connu pour son effet hypoglycémiant (**Ustinova et al., 2020**), est utilisée comme témoin positif dans les études expérimentales sur le diabète. Ce standard n'induit pas la sécrétion d'insuline par les cellules des îlots  $\beta$  du pancréas, mais il augmente l'utilisation du glucose dans les tissus extra-hépatiques et réduit la gluconéogenèse hépatique (**LaMoia et Gerald, 2021**).

La réduction du glucose plasmatique pourrait être due à l'amélioration de l'utilisation périphérique du glucose, à l'amélioration aussi de la glycolyse hépatique altérée et à la limitation de sa formation gluconéogénique semblable à l'insuline (**Ismail et Yaheya, 2009**). Nos résultats indiquent que chez les rats rendus diabétiques par la STZ, l'injection orale journalière de la *T.algeriensis* à une dose de 200mg/kg pendant 28 jours provoquait une diminution significative de la glycémie, ceci suggère que notre plante possède probablement un effet hypoglycémiant. Cette découverte est similaire à l'activité antihyperglycémiant observée de l'extrait d'une plante de la famille des Lamiacées ; *Becium grandiflorum* (**Gebremeskel et al., 2020**). Cependant, les résultats obtenus par **Azimi et al., (2021)** ont constaté que l'extrait alcoolique de *Thymus Vulgaris* ne normalise pas l'hyperglycémie.

En plus de l'hyperglycémie, nous avons observé une diminution significative du poids corporel, de la nourriture et de l'apport en eau chez les rats diabétiques par rapport aux rats normaux. La diminution du poids corporel pourrait être due à un mauvais contrôle glycémique et à un catabolisme excessif des protéines structurelles pour fournir des acides aminés pour la gluconéogenèse pendant la carence en insuline (**Kasetti et al., 2010**). Le co-

traitement des rats diabétiques par l'extrait de *T.algeriensis* a montré une amélioration du poids corporel par rapport au groupe des rats témoins et au groupe des rats traités par le médicament standard la metformine. En outre, la capacité de l'extrait BETA à protéger la perte du poids corporel pourrait être le résultat de sa capacité à réduire l'hyperglycémie. Les résultats obtenus dans cette exploration sont similaires à ceux rapportés par **El Kabbaoui et al., (2016)** qui ont remarqué un gain de poids corporel lors de l'amélioration de l'état diabétique.

L'hyperosmolarité sanguine peut entraîner une augmentation de l'excrétion de glucose dans les urines (généralement plus de 300 à 500 mg / 100 ml) qui la fait agir comme un soluté osmotique dans l'urine produisant une diurèse osmotique (polyurie). La déshydratation qui en résulte active les mécanismes de régulation de la consommation d'eau, conduisant à la polydipsie (**Guyton et Hall, 2006**), et puisque tous ces paramètres représentaient des conséquences directes de l'hyperglycémie, nous pouvons suggérer que l'effet régulateur de la glycémie par *T. algeriensis* peut améliorer la polyphagie, la polydipsie et la perte de poids des rats diabétiques.

Les concentrations d'HbA1c sont un outil utile pour l'évaluation du contrôle glycémique chez les diabétiques, comme le suggère la Fédération internationale du diabète. L'administration de BETA entraîne une diminution de la glycémie à jeun, ce qui entraîne une réduction des taux d'HbA1C chez les rats diabétiques, ce qui peut être due à la sécrétion d'insuline pancréatique à partir de cellules bêta existantes (**Irudayaraj et al., 2012**). Plusieurs plantes médicinales comme *Anacardium occidentale Linn* (**Jaiswal et al., 2016**) et *Chloroxylon swietenia* (**Jayaprasad et al., 2016**) ont la capacité de réduire les taux d'HbA1C chez les rats diabétiques ce qui concorde parfaitement avec les résultats de notre étude.

Pour évaluer la capacité de la protection de l'extrait BETA des tissus hépatorénaux des dommages tissulaires qui peuvent être causés par la production excessive ERO lors du diabète induit chez des rats par la streptozotocine, une évaluation de la fonction hépatorénal et du stress oxydative a été effectuée.

Dans divers pays développés, la néphropathie diabétique (ND) est la principale cause d'insuffisance rénale terminale et une cause principale de blessure et de mortalité chez les personnes atteintes de morbidité rénale (**El-Hameed et Abeer, 2020**). Par conséquent, la prévention et le traitement de la néphropathie diabétique sont d'une grande importance.

Divers agents thérapeutiques sont disponibles pour prévenir la néphropathie diabétique, mais les plantes médicinales traditionnelles ont montré une meilleure activité thérapeutique en termes de prise en charge et de sécurité (**Kundu et al., 2020**). Certaines espèces du genre *Thymus* sont connues pour avoir un effet bénéfique sur les rats diabétiques; cependant, la question de savoir si *T. algeriensis* est bénéfique pour le diabète et la néphropathie diabétique ou non n'a pas été étudiée.

Un déséquilibre de l'azote associé à une synthèse protéique réduite déclenche la génération de composés azotés non protéiques, notamment la créatinine et l'azote uréique (**Navale et Paranjape, 2017**). Ce phénomène est associé à ces deux paramètres, qui sont des indices substantiels de la dysfonction rénale au cours de l'hyperglycémie diabétique (**Mkhwanazi et al., 2014**). La créatinine est un acide aminé dérivé de la créatine, traditionnellement utilisé pour évaluer la fonction rénale (**Assif et al., 2020**). Le rein fonctionne en maintenant un taux de créatinine sanguin normal, en filtrant la créatinine du sang par filtration glomérulaire rénale et en l'excrétant via l'urine (**Ferguson et Waikar, 2012**). Cependant, en cas d'atteinte rénale, les concentrations de ce métabolite augmentent dans le sang et les urines (**Huang et al., 2003**). L'urée, communément appelée azote uréique du sang lorsqu'elle est mesurée dans le sang, est un produit du métabolisme des protéines. La dépendance de l'organisme vis-à-vis du système rénal pour excréter l'urée en fait un analyte utile pour évaluer la fonction rénale (**Price et Finney, 2000**).

Selon le résultat actuel, une augmentation significative des concentrations sériques d'urée et de créatinine chez les rats diabétiques par rapport aux rats témoins a été observée, indiquant une atteinte rénale progressive. Cela peut être dû à une perturbation métabolique lors de l'hyperglycémie provoquée au cours du diabète, reflétée par des activités élevées de xanthine-oxydase, une peroxydation lipidique et une augmentation des taux de triglycéride et de cholestérol (**Mahboob et al., 2005**). Après quatre semaines d'administration de l'extrait BETA, les taux sériques de créatinine et d'urée sont significativement diminués dans le groupe des rats traités par l'extrait de la plante, par rapport au groupe des rats diabétique. La quercétine est l'un des composés de la plante *T.algeriensis* (**Boutaoui et al., 2018; Mokhtari et al., 2021**), qui fait partie de la famille des flavonoïdes, et qui possède des propriétés antioxydantes en raison de ses groupements hydroxyle aromatiques. Les concentrations de la créatinine et de l'urée dans le sérum des rats diabétiques ont été significativement améliorées après le traitement avec la quercétine (**Iskender et al., 2017**),

ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans ce travail, indiquant ainsi que la plante *T. algeriensis* possède un effet néphroprotecteur puissant.

Le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique et sa progression vers l'insuffisance rénale terminale (**García-García et al., 2014**).

Dans notre étude, on a observé une augmentation significative de la peroxydation lipidique dans les reins des rats diabétiques. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont rapporté une augmentation du niveau de l'MDA dans les reins de rats atteints de diabète expérimental (**Yazdi et al., 2020; Albasher et al., 2020; Niazmand et al., 2021**). Donc ces résultats suggèrent que l'exposition à des niveaux élevés de glucose peut augmenter la génération des ERO, qui pourraient interagir avec les acides gras polyinsaturés et déclencher la génération de la peroxydation lipidique (LPO) dans le tissu rénal et, par conséquent, déclencher la toxicité ou endommager le tissu rénal (**Calabrese et al., 2007**).

Les radicaux libres comme le superoxyde et l'hydroxyle provoquent l'initiation de la LPO tissulaire. LPO, un processus complexe résultant de réactions radicalaires dans les membranes biologiques, forme des hydroperoxydes lipidiques qui décomposent les doubles liaisons des acides gras insaturés et détruisent les lipides membranaires (**Halliwell et Gutteridge, 2015**). Le malondialdéhyde (MDA) est un produit de décomposition final de la peroxydation des lipides; ainsi, la détermination de la teneur en MDA rénal peut refléter le degré d'endommagement des cellules rénales (**Afshari et al., 2007**).

Il existe essentiellement deux types d'antioxydants, enzymatique et non enzymatique. Le premier et peut-être le plus important des antioxydants enzymatiques est la SOD, qui aide à protéger les organes des dommages oxydatifs causés par les radicaux libres. Il est responsable de la réduction de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (**Zelko et al., 2002**), la CAT est une autre enzyme antioxydante qui catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau (**Ha et al., 1999**), le GSH fait partie du système antioxydant endogène non enzymatique qui détoxifie le radical de peroxyde d'hydrogène à l'aide de la glutathion peroxydase et prévient la LPO (**Forman, 2016**), et la glutathion peroxydase (GPx) qui joue un rôle important dans le métabolisme des peroxydes d'hydrogène et de lipides en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène entraînant la formation de glutathion oxydé (GSSG) (**Meister et Anderson, 1983**).

Dans notre étude, on a observé une diminution de l'activité des enzymes antioxydants SOD, CAT et GPx dans les reins des rats diabétiques, ce qui suggère une altération de l'homéostasie redox rénale, l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et la formation de peroxydation lipidique chez les rats diabétiques. Cette réduction peut être également due à l'inactivation causée par l'excès de radicaux libres et/ou par la glycation non enzymatique due à l'hyperglycémie persistante (**Maritim *et al.*, 2003; Rains et Sushil, 2011**).

Le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie chronique peut activer plusieurs voies métaboliques qui perturbent les mécanismes de régulation de l'homéostasie (**Mahmoud, 2017**), parmi ces voies la chaîne respiratoire mitochondriale, l'auto-oxydation du glucose, la production de produits de glycation avancés (AGE), et l'activation de la NADPH oxydase et de nombreuses voies comme la protéine kinase C (PKC), l'hexosamine et les voies polyoliques (**Ighodaro, 2018**).

Au cours de la néphropathie diabétique, la concentration des espèces réactives de l'oxygène est augmentée et de nombreuses molécules sont affectées dans leurs structures conformationnelles, produisant des troubles dans les fonctions cellulaires (**Miranda-Díaz *et al.*, 2016**). En outre, dans la ND, le déséquilibre redox se produit principalement en raison de l'augmentation des enzymes productrices de ERO, de la diminution des enzymes antioxydantes et de l'induction transitoire de la voie du facteur 2 lié à NFE2 (NRF2) en tant que mécanisme de défense antioxydant (**Lindblom *et al.*, 2015**).

Les reins ont de multiples rôles dans le métabolisme systémique du glucose, tels que la réabsorption du glucose, la gluconéogenèse et la dégradation de l'insuline. Par conséquent, une hyperfonction rénale putative pourrait contribuer au développement du diabète (**Domon *et al.*, 2021**). Dans ce travail, des examens histologiques des tissus rénaux des rats diabétiques renforcent les résultats de la fonction rénale. De graves lésions rénales aux niveaux de tous les types de cellules rénales, tels que les cellules mésangiales, les cellules tubulo-interstitielles, une hypertrophie glomérulaire et tubulaire était également perceptible en plus d'une dilatation tubulaire. Il a été rapporté qu'au cours du diabète, des néphropathies, des modifications atrophiques des tubules, de l'interstitium et des glomérules ont été enregistré (**Chakkarwar, 2011; Cohen *et al.*, 1996**). L'augmentation des ERO peut endommager directement les podocytes, les cellules mésangiales et les cellules



endothéliales, entraînant une protéinurie et une fibrose tubulo-interstitielle (**Khazim et al., 2013 ; Duni et al., 2019**).

Dans notre étude il est intéressant de noter, qu'après quatre semaines de traitement par l'extrait BETA, le niveau de MDA a été normalisé et les activités de SOD, CAT et GPX ont été rétablies. Ceci suggère que le stress antioxydant est un mécanisme employé par la plante *T. algeriensis* contre la néphropathie diabétique. Cette propriété antioxydante de l'extrait BETA pourrait être due à la présence de l'acide rosmarinique et de kaempférol-O-glucuronide, qui se caractérisent par un très fort potentiel antioxydant (**Ziani et al., 2019; Sobeh et al., 2020**). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Haile et al., (2021)** qui ont trouvé que la plante *Thymus Serrulatus* a un potentiel antioxydant très élevé.

En plus des reins, le foie est aussi l'un des organes endommagés par le diabète, en raison de son rôle prépondérant dans le contrôle du métabolisme des glucides, car il utilise le glucose comme énergie; il a le potentiel d'accumuler du glucose sous forme de glycogène et également de sécréter du glucose à partir de sources non glucidiques (**Marchesini et al., 2001**). Le diabète est donc fortement lié à l'inflammation du foie, à la cirrhose, à l'apoptose et au dysfonctionnement des cellules  $\beta$ , et il provoque finalement un dysfonctionnement du foie (**Moorthi et Chelliah, 2015**). Dans la présente étude, l'administration intrapéritonéale de la STZ à une dose de 60mg/kg cause une perturbation du niveau des enzymes hépatiques dans le groupe des rats diabétiques par rapport au groupe des rats traité à la metformine et aux rats témoins. L'élévation des niveaux de l'AST et de l'ALT peut être due aux dommages cellulaires dans le foie causés par l'effet toxique direct de la STZ ou l'hyperglycémie induite par celle-ci (**Guven et al., 2006 ; Vural et al., 2001**). La streptozotocine, la substance déjà prescrite ci-dessus, cause principalement des dommages aux cellules  $\alpha$  et  $\beta$  et aux reins, le foie est également sensible à la toxicité de la STZ (**Weiss, 1982**). Les enzymes hépatiques, les transaminases, sont abondantes dans le foie et tout dommage aux cellules hépatiques augmente leur taux dans le sang (**El-Newary et al., 2017; Giannini et al., 2005**). L'ALT, est le biomarqueur hépatique clinique le plus largement utilisé (**Ozer et al., 2008**), la fuite de l'ALT de l'hépatocyte dans le sang se produit après une lésion hépatocellulaire est pourrait élevée dans le sérum dans des conditions de nécrose cellulaire importante et est utilisée comme mesure de la fonction hépatique (**Evans, 2009**). L'augmentation des taux de l'ALT et l'AST peut donc être due à une altération de l'utilisation du glucose, entraînant une réduction de la sécrétion d'insuline, ce qui entraîne une augmentation du catabolisme des acides aminés résultant d'une dégradation accrue des protéines (**Ramesh et al., 2012**). De

plus, l'augmentation de l'activité sérique de ces enzymes indique une altération de l'intégrité de la membrane hépatocytaire, ce qui entraîne une fuite de ces enzymes (**Chen et al., 2016**).

Dans une autre partie, ce travail vise à déterminer l'effet protecteur de l'extrait BETA contre le diabète sucré induit par la STZ, qui, dans son rôle, induit des lésions hépatiques.

Une augmentation significative des enzymes hépatiques a été observée après un traitement de 28 jours avec l'extrait BETA. Cette augmentation suggère l'effet hépatoprotecteur de la plante *T.algeriensis*. De plus, les propriétés hépatoprotectrices pourraient être dues à la présence de composés bioactifs, notamment des flavonoïdes en tant que puissants antioxydants (**Mcilwain et al., 2015**). Les résultats de la présente étude sont en accord avec **Sureka et al., (2021)** et **Noshahr et al., (2020)**, qui ont rapporté une observation similaire sur *Sesbania grandiflora* et le fenouil respectivement contre le diabète induit par la STZ.

Il a été rapporté que les biomarqueurs du stress oxydatif augmentaient dans le foie au stade précoce du diabète induit par la STZ en raison de son rôle principal dans les processus de détoxification et d'oxydation (**Schmatz et al., 2012**). Cependant, des taux élevés de glucose peuvent augmenter la glycosylation non enzymatique et auto-oxydative, les voies des polyols et des hexosamines, la formation et la glycation du méthylglyoxal et la phosphorylation oxydative, qui sont toutes impliquées dans la génération des ERO dans le foie (**Goswami et Chatterjee, 2014**).

Par conséquent, les dommages oxydatifs des tissus hépatiques pourraient être induits soit par l'effet toxique de la STZ ou de l'hyperglycémie ou une combinaison des deux, soit élucidés indirectement par d'autres conséquences de l'hyperglycémie telles que l'inflammation des tissus (**Cordero-Herrera et al., 2015**).

Conformément aux conclusions précédentes (**Al-Amarat et al., 2021; Vanani et al., 2021**), nos résultats ont montré que l'injection de la STZ induisait d'une manière marquée un stress oxydatif au niveau des tissus hépatiques, car nous avons montré une augmentation significative des niveaux de MDA et une diminution significative de l'activité des enzymes antioxydantes telles que SOD, CAT et GPx dans le foie des rats diabétiques par rapport au rats témoins. Cependant, le traitement par l'extrait de *T.algeriensis* (200 mg/kg) et la metformine a permis de réduire significativement la peroxydation lipidique et de restaurer l'activité des enzymes antioxydantes à des niveaux normaux. Ces résultats suggèrent que la



capacité de piéger ou d'inactiver les radicaux libres est affaiblie chez les rats diabétiques. Cet effet antioxydant de l'extrait BETA pourrait être attribué à la présence des antioxydants, tels que les vitamines et les composés phénoliques (Bouatoui *et al.*, 2018 ; Mokhtari *et al.*, 2020). Al-Amarat *et al.*, (2021) ont également constaté que l'activité de ces enzymes antioxydantes a été normalisée après le traitement à la galangine flavonoïde (Gal) dans le foie des rats rendus diabétiques par la STZ.

Dans notre étude, l'évaluation histologique a montré une dilatation et une congestion de la veine centrale et de la veine porte et une dégénérescence des hépatocytes chez les rats rendus diabétiques par la STZ. Il a été rapporté que l'injection de STZ entraînait une fibrose périsinusoïdale et une augmentation de la matière collagénique. Ainsi, des anomalies structurelles du foie peuvent être l'une des conséquences des effets hépatotoxiques de la STZ (Adeyemi *et al.*, 2014). Un traitement de quatre semaines avec l'extrait de *T. algeriensis* a réduit la dégénérescence hépatocytaire et améliorer les anomalies structurelles au niveau hépatique. L'effet hépatoprotecteur de la plante *T.algeriensis*, en plus de l'effet hypoglycémiant, sont peut-être également liés à sa richesse en métabolites secondaires potentiels (Bouatoui *et al.*, 2018 ; Mokhtari *et al.*, 2020), donc d'autres études sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Au cours du diabète, le désordre du métabolisme glucidique est associé à des troubles importants du métabolisme lipidique résultant à une dyslipidémie avec augmentation des triglycérides, des acides gras libres, des lipoprotéines LDL et une baisse du HDL-cholestérol (Vergès, 2001).

Au cours de notre expérimentation, un profil lipidique sérique altéré a été observé chez les rats rendus diabétique par la STZ par rapport au rats normaux (augmentation du cholestérol total, des triglycérides, de LDL et diminution des niveaux de HDL). Des changements dans le métabolisme des lipides ont été largement rapportés dans le cas de la résistance et ou/carence en insuline, qui est souvent caractérisée par une augmentation aberrante des triglycérides, du cholestérol total, du taux de LDL et une réduction du taux de HDL (Huang *et al.*, 2013; Athyros *et al.*, 2018). Dans les conditions habituelles, l'enzyme lipoprotéine lipase, qui joue un rôle très important dans le métabolisme des lipides, est activée par l'insuline, et qui hydrolyse les triglycérides. Cependant, au cours du diabète, une carence en insuline provoque une inactivation de la lipoprotéine lipase, entraînant une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie (Girija *et al.*, 2011). De plus, les

triglycérides jouent un rôle primordial dans la formation de lipides à faible densité et d'un taux de cholestérol HDL réduit toujours dans le cas d'une hyperglycémie (**Boren et al., 2020**). D'autre part, l'hyperlipidémie a été identifiée comme un facteur de risque de la néphropathie diabétique via l'exacerbation des lésions glomérulaires par l'activation de multiples voies de signalisation (**Sacks et al., 2014**).

L'élévation des triglycérides est le résultat d'une production accrue et diminution de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides. Cependant, l'augmentation de la production de lipoprotéines de très basse densité (VLDL), principal transporteur du jeûne triglycérides, est une caractéristique importante de la résistance à l'insuline (**Lorenzo et al., 2013**). L'insuline intervient dans tous les stades de la production et de la sécrétion des VLDL. Au niveau des tissus adipeux, l'insuline supprime la lipolyse en inhibant l'activité de l'hormone sensible, la lipase, qui catalyse la mobilisation des acides gras libres à partir des triglycérides stockés. Ainsi, l'insuline régule la quantité des acides gras libres circulants, qui agissent comme des substrats et des facteurs de régulation de la sécrétion des VLDL (**Avramoglu et al., 2006**).

Au cours de notre expérimentation, l'analyse microscopique révèle que le foie des rats traités par la STZ présente des altérations sévères dans l'histoarchitecture, une infiltration des cellules inflammatoires mixtes, et une présence d'une nécrose centrolobulaire accompagné de la présence de gouttelettes lipidiques reflétant une stéatopathie.

La stéatose hépatique est définie par une teneur accrue en lipides hépatocellulaires au niveau du parenchyme hépatique, et est fréquemment observée dans les états insulino-résistants dont le diabète sucré de type 2 (**Roden, 2006**). Sur le plan anatomo-pathologique, elle se traduit par une accumulation lipidique macrovacuolaire avec de larges vacuoles intracytoplasmiques. La stéatose hépatique peut résulter d'une augmentation du flux d'acides gras vers le foie, d'un excès de synthèse hépatique (synthèse de novo d'acides gras), d'un défaut d'oxydation ou d'un défaut de sécrétion des lipoprotéines (VLDL). En phase postprandiale, les triglycérides provenant de l'alimentation sont transportés par les chylomicrons (**Vinod, 2012**).

Il existe une relation entre l'hépatostéatose et la résistance à l'insuline. D'une part, cette dernière s'accompagne d'une lipolyse accentuée au niveau du tissu adipeux (liée à une inhibition insuffisante de la lipase hormono-sensible), ce qui favorise l'afflux d'acides gras vers le foie. Il s'ensuit une augmentation des concentrations d'acylCoA et d'acetylCoA et

enfin de malonylCoA, ce qui fournit ainsi le substrat pour la synthèse hépatique de triglycérides (lipogenèse intrahépatique), via l'action du facteur de transcription SREBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1-1c) et en raison de la présence de concentrations élevées d'insuline, provoquant finalement une stéatose hépatique (**Fromenty, 2019**).

Il est intéressant de mentionner que le traitement par l'extrait de *T.algeriensis* a pu corriger la dyslipidémie observée à un degré semblable à celui de la metformine. En plus, le traitement avec BETA pendant 28 jours a montré une diminution des taux de triglycérides et de cholestérol total et une amélioration du taux de HDL. Ainsi que BETA montre une légère dégénérescence du parenchyme hépatique accompagnée d'une stéatose modérée comparativement au metformine.

Les polyphénols sont des composés qui ont la capacité d'abaisser les taux de lipides sanguins (**Byun et al., 2015**), cependant, l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* se caractérise par la teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes. L'un des acides polyphénoliques les plus importants de cet extrait est l'acide gallique (**Mokhtari et al., 2021**), ce métabolite secondaire est connu par sa capacité à diminuer la résistance à l'insuline par l'activation d'un récepteur activé à cause de la prolifération de peroxysomes (**Adefegha et al., 2015**). L'acide gallique a également la capacité de réduire le cholestérol, les triglycérides et les lipoprotéines de basse densité et a amélioré la libération de l'insuline par la régénération des cellules  $\beta$  (**Latha et Daisy, 2011**).

Par conséquent, l'extrait BETA pourrait être bénéfique dans l'amélioration du métabolisme lipidique, en raison de la présence de l'acide gallique, qui peut conduire à prévenir les complications du diabète. Ces résultats obtenus sont en accord avec ceux publiés par **Ekoh et al., (2014)** sur *Thymus vulgaris*, **El kabbaoui et al., (2016)** sur *Thymus satureioides*, et **Khouya et al., (2021)** sur *Thymus atlanticus*.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## **Conclusion et perspectives**

L'objectif principal de ce travail était la vérification des effets de l'extrait n-BuOH de la plante *Thymus algeriensis* (BETA) sur l'hyperglycémie, la dyslipidémie, et le stress oxydant induit par injection de la streptozotocine.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés surtout à l'étude de l'effet antioxydant de l'extrait BETA ainsi que son mécanisme d'action, parce qu'elle a montré une activité antioxydante très intéressante, les résultats obtenus mettent en évidence la grande teneur de cet extrait végétal en polyphénols et flavonoïdes (divers composés chimiques identifiés) qui peuvent être responsables des effets biologiques trouvés de cette plante.

Les résultats concernant l'effet antidiabétique de l'extrait BETA montrent un abaissement de la glycémie, ainsi qu'une réduction significative du taux de l'hémoglobine glyquée (HbA1c), qui est un indicateur fiable de l'évolution du diabète. De plus un effet inhibiteur prometteur sur l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase a été démontré par l'extrait étudié. Une activité antiglycation (Anti AGE) a été également prouvée par l'extrait BETA.

L'injection intrapéritonéale de la streptozotocine à la dose de 60 mg/kg de poids corporel chez les rats mâles adultes a induit des perturbations métaboliques : glucidique, lipidique et dans le fonctionnement de certains organes. En revanche le traitement des rats diabétiques par l'extrait n-BuOH de *T.algeriensis* corrige ces perturbations et améliore la résistance contre le diabète chez les rats diabétiques.

Chez le rat diabétique traité avec *T.algeriensis* comparé au non traité, une amélioration du poids corporel, de la polyphagie, et de la polydipsie a été démontrée. En outre, cet extrait a pu diminuer les concentrations plasmatiques en urée et en créatinine, ce qui témoigne une amélioration de la fonction rénale. Cet extrait a été également capable d'ajuster les niveaux des paramètres hépatiques tels que l'ASAT et l'ALAT. Les résultats du profil lipidique ont indiqué que le traitement avec l'extrait a pu améliorer la perturbation de celui-ci montrant que l'effet hypoglycémiant obtenu avec *T.algeriensis* a permis de corriger la dyslipidémie observée.


Ainsi la quantification de l'effet antioxydant de l'extrait BETA *in vivo* a été aussi évaluée par le dosage du MDA et des enzymes antioxydantes où cet extrait a montré une réduction de la peroxydation lipidique et une restauration des taux des enzymes antioxydantes

hépatiques et rénales, et par conséquent protège ces deux tissus des effets délétères des ERO. Il a également provoqué une restauration de l'architecture histologique du foie et des reins.


En conclusion nous pouvons dire que l'extrait n-BuOH de la plante *T.algeriensis* (BETA) peut renforcer le système de défense enzymatique antioxydant, peut jouer un rôle préventif dans le développement du diabète sucré par l'amélioration des métabolismes glucidique, lipidique et il peut être utilisé comme un antioxydant.

Pour nos perspectives, on envisage de poursuivre nos investigations à l'échelle moléculaire afin d'identifier la ou les molécules responsables de l'effet hypoglycémiant et de comprendre le ou les mécanismes d'action de toutes les voies antidiabétiques impliquées.

Il serait intéressant de faire des formulations à partir des plantes médicinales déjà évaluées sur l'activité antidiabétiques au sein de notre laboratoire de biologie et environnement, afin d'étudier et de chercher un effet de synergie ou bien de potentialisation qui va être utile pour la fabrication d'un complément alimentaire ou d'un phytomédicament.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



### Références bibliographiques

Abderrahmani, Amar, et al. "Increased hepatic PDGF-AA signaling mediates liver insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes." *Diabetes* 67.7 (2018): 1310-1321.

Adamski, Zbigniew, et al. "Biological activities of alkaloids: from toxicology to pharmacology." *Toxins* 12.4 (2020): 210.

Adefegha, Stephen Adeniyi, et al. "Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: a structure–function perspective." *Comparative clinical pathology* 24.6 (2015): 1579-1585.

Adeli, Khosrow, et al. "Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance." *Trends in cardiovascular medicine* 11.5 (2001): 170-176.

Adeyemi, David O., et al. "Anti-hepatotoxic activities of *Hibiscus sabdariffa* L. in animal model of streptozotocin diabetes-induced liver damage." *BMC complementary and alternative medicine* 14.1 (2014): 1-11.

Aebi, Hugo. "[13] Catalase in vitro." *Methods in enzymology*. Vol. 105. Academic press, 1984. 121-126.

Afonso, Andrea F., et al. "Health-promoting effects of *Thymus herba-barona*, *Thymus pseudolanuginosus*, and *Thymus caespititius* decoctions." *International journal of molecular sciences* 18.9 (2017): 1879.

Afonso, Andrea F., et al. "Metabolites and biological activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* grown under organic cultivation." *Molecules* 23.7 (2018): 1514.

Afshari, Ali Taghizadeh, et al. "The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats." *Food chemistry* 101.1 (2007): 148-153.

AG, H. BISCHOFF Bayer. "Pharmacology of  $\alpha$ -glucosidase inhibition." *European Journal of Clinical Investigation* 24.S3 (1994): 3-10.

Al-Amarat, Wesam, et al. "Galangin attenuates liver injury, oxidative stress and inflammation, and upregulates Nrf2/HO-1 signaling in streptozotocin-induced diabetic rats." *Processes* 9.9 (2021): 1562.



- Alamgir, A. N. M. "Pharmacognostical Botany: Classification of medicinal and aromatic plants (MAPs), botanical taxonomy, morphology, and anatomy of drug plants." *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1*. Springer, Cham, 2017. 177-293.
- Albasher, Gadah, et al. "Protective effects of *Artemisia judaica* extract compared to metformin against hepatorenal injury in high-fat diet/streptozotocine-induced diabetic rats." *Environmental science and pollution research* 27.32 (2020): 40525-40536.
- Al-Bayati, Firas A. "Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts." *Journal of ethnopharmacology* 116.3 (2008): 403-406.
- Aleixandre, Andrea, et al. "Understanding phenolic acids inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase and influence of reaction conditions." *Food Chemistry* 372 (2022): 131231.
- Amar, Laurence, et al. *Endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques: Réussir les ECNi*. Elsevier Health Sciences, 2019.
- Amarti, F., et al. "Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc." *Phytothérapie* 6.6 (2008): 342-347.
- Amarti, F., et al. "Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc." *Phytothérapie* 9.3 (2011): 149-157.
- American Diabetes Association. "2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021." *Diabetes care* 44.Supplement 1 (2021): S15-S33.
- Anderson, Gregory J., and Edouard Bardou-Jacquet. "Revisiting hemochromatosis: genetic vs. phenotypic manifestations." *Annals of translational medicine* 9.8 (2021).
- Anwar, Shehwaz, et al. "A review on mechanism of inhibition of advanced glycation end products formation by plant derived polyphenolic compounds." *Molecular Biology Reports* 48.1 (2021): 787-805.
- Aouam, I., et al. "Antioxidant capacities and total phenolic contents of *Thymus riararum*." *Materials Today: Proceedings* 13 (2019): 579-586.

Apak, Reşat, et al. "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method." *Journal of agricultural and food chemistry* 52.26 (2004): 7970-7981.

Aronson, Doron. "Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications." *Cardiovascular diabetology: Clinical, metabolic and inflammatory facets* 45 (2008): 1-16.

Asif, Abuzar A., Habiba Hussain, and Tulika Chatterjee. "Extraordinary creatinine level: a case report." *Cureus* 12.7 (2020).

Athyros, Vasilios G., et al. "Diabetes and lipid metabolism." *Hormones* 17.1 (2018): 61-67.

Avramoglu, Rita Kohen, Heather Basciano, and Khosrow Adeli. "Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states." *Clinica chimica acta* 368.1-2 (2006): 1-19.

Ayer, Anita, et al. "The role of mitochondrial reactive oxygen species in insulin resistance." *Free Radical Biology and Medicine* 179 (2022): 339-362.

Azimi, Mohammadreza, et al. "The Effect of Alcoholic Extract of *Thymus Vulgaris* on Hepatic Enzymes Activity and Apoptosis-Related Gene Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." (2021).

Baczako, K., and M. Dolderer. "Polyarteritis nodosa-like inflammatory vascular changes in the pancreas and mesentery of rats treated with streptozotocin and nicotinamide." *Journal of comparative pathology* 116.2 (1997): 171-180.

Bakker, Stephan JL, et al. "Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and  $\beta$ -cell failure?." *Atherosclerosis* 148.1 (2000): 17-21.

Balbaa, Mahmoud, Shaymaa A. Abdulmalek, and Sofia Khalil. "Oxidative stress and expression of insulin signaling proteins in the brain of diabetic rats: Role of *Nigella sativa* oil and antidiabetic drugs." *PLoS One* 12.5 (2017): e0172429.

Barbosa-Filho, José M., et al. "Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16.1 (2006): 109-139.

Barthel, Andreas, and Dieter Schmoll. "Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis." *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 285.4 (2003): E685-E692.

Bazytko, A. G. N. I. E. S. Z. K. A., and H. A. L. I. N. A. Strzelecka. "A HPTLC densitometric determination of luteolin in *Thymus vulgaris* and its extracts." *Fitoterapia* 78.6 (2007): 391-395.

Benayache, Feryal. "Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret." (2013).

Beretta, Giangiacomo, et al. "Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics." *Analytica Chimica Acta* 533.2 (2005): 185-191.

Bischoff, Hilmar. "The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes." *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale* 18.4 (1995): 303-311.

Blicklé, Jean-Frédéric. "Place des thiazolidinediones dans le traitement du diabète de type 2." *La Presse Médicale* 33.15 (2004): 1034-1040.

Boizot, Nathalie, and Jean-Paul Charpentier. "Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier." *Cahier des Techniques de l'INRA* (2006): 79-82.

Bonnefont-Rousselot, Dominique. "The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications." *Treatments in endocrinology* 3.1 (2004): 41-52.

Bonnet, F. "Diabète et complications hépatiques." *Diabetologie*. Elsevier, 2019. 345-351.

Borén, Jan, Chris J. Packard, and Marja-Riitta Taskinen. "The roles of ApoC-III on the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in humans." *Frontiers in Endocrinology* 11 (2020): 474.

Boren, Jan, et al. "Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel." *European heart journal* 41.24 (2020): 2313-2330.

Boukhari, N., et al. "L'huile des co-produits de poisson corrige la dyslipidémie, améliore le transport inverse du cholestérol et stimule l'activité de la paraoxonase-1 chez le rat obèse." *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. Vol. 62. No. 3. Elsevier Masson, 2013.

Boutaoui, Nassima, et al. "Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts." *Molecules* 23.2 (2018): 463.

Boyer, Florence. *Stress oxydant et pathologie diabétique: impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses*. Diss. Université de la Réunion, 2016.

Brand-Williams, Wendy, Marie-Elisabeth Cuvelier, and C. L. W. T. Berset. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT-Food science and Technology* 28.1 (1995): 25-30.

Brighente, I. M. C., et al. "Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species." *Pharmaceutical biology* 45.2 (2007): 156-161.

Brownlee, Michael. "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." *diabetes* 54.6 (2005): 1615-1625.

Buyschaert, Martin, et al. "One-year metabolic outcomes in patients with type 2 diabetes treated with exenatide in routine practice." *Diabetes & metabolism* 36.5 (2010): 381-388.

Buyschaert, Martin. "Pourquoi les diabétiques ont-ils un risque plus important de développer un cancer?." *Médecine des Maladies Métaboliques* 8.4 (2014): 392-395.

Byun, A. Ri, et al. "Effects of a dietary supplement with barley sprout extract on blood cholesterol metabolism." *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015 (2015).

Calabrese, Vittorio, et al. "Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy." *Cell stress & chaperones* 12.4 (2007): 299.

Cao, Yu, et al. "An overview of the posttranslational modifications and related molecular mechanisms in diabetic nephropathy." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (2021).

Capeau, J. "Insulin resistance and steatosis in humans." *Diabetes & metabolism* 34.6 (2008): 649-657.

Ceylan, Yusuf, et al. "Evaluation of antioxidant activity, phytochemicals and ESR analysis of *Lavandula stoechas*." *Acta Phys Pol A* 128.2 (2015): 483-487.

Chao, Che-yi, et al. "Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice." *Molecular nutrition & food research* 54.3 (2010): 388-395.

Chemat, Smain, et al. "Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) essential oil." *Journal of Essential Oil Research* 24.1 (2012): 5-11.

Chen, Hengye, Muhammad Safiullah Virk, and Fusheng Chen. "Phenolic acids inhibit the formation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on their reducing powers and structures." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 67.4 (2016): 400-411.

Chen, Jiang Hong, and Chi-Tang Ho. "Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds." *Journal of agricultural and food chemistry* 45.7 (1997): 2374-2378.

Chen, Jie, et al. "Synergistic anti-inflammatory effects of silibinin and thymol combination on LPS-induced RAW264. 7 cells by inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK activation." *Phytomedicine* 78 (2020): 153309.

Cho, Nam Han. "Q&A: Five questions on the 2015 IDF Diabetes Atlas." *Diabetes research and clinical practice* 115 (2016): 157-159.

Cho, NH1, et al. "IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045." *Diabetes research and clinical practice* 138 (2018): 271-281.

Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2011; 63:363-370.

Coballase-Urrutia, Elvia, et al. "Acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides*, and quercetin, decrease CCl<sub>4</sub>-oxidative stress in several rat tissues." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013 (2013).

Cohen, Margo P., and Fuad N. Ziyadeh. "Role of Amadori-modified nonenzymatically glycosylated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology* 7.2 (1996): 183-190.

Cordero-Herrera, Isabel, et al. "Cocoa intake ameliorates hepatic oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats." *Food research international* 69 (2015): 194-201.

Dagar, Neha, et al. "Diabetic nephropathy: A twisted thread to unravel." *Life Sciences* 278 (2021): 119635.

Dakuyo, Zéphirin. "Traditional medicine in Burkina Faso." *Protecting AND Promoting Traditional Knowledge: Systems, National Experiences AND International Dimensions* (2004): 15.

DeFronzo, Ralph A., et al. "Type 2 diabetes mellitus." *Nature reviews Disease primers* 1.1 (2015): 1-22.

del Baño, María José, et al. "Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway." *Journal of agricultural and food chemistry* 52.16 (2004): 4987-4992.

Dewanto, Veronica, et al. "Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity." *Journal of agricultural and food chemistry* 50.10 (2002): 3010-3014.

Di Carlo, Giulia, et al. "Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs." *Life sciences* 65.4 (1999): 337-353.

Dibacto, Ruth Edwige Kemadjou, et al. "Total polyphenol and flavonoid content and antioxidant capacity of some varieties of *Persea americana* peels consumed in Cameroon." *The Scientific World Journal* 2021 (2021).

Dimo, T., et al. "Glucose lowering efficacy of the aqueous stem bark extract of *Trema orientalis* (Linn) Blume in normal and streptozotocin diabetic rats." *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 61.3 (2006): 233-236.

Dinda, Biswanath, et al. "Dietary plant flavonoids in prevention of obesity and diabetes." *Advances in protein chemistry and structural biology* 120 (2020): 159-235.

Doan, Hau Van, et al. "Antidiabetic activity, glucose uptake stimulation and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of *Chrysophyllum cainito* L. stem bark extract." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18.1 (2018): 1-10.

Domínguez Avila, J. Abraham, et al. "The antidiabetic mechanisms of polyphenols related to increased glucagon-like peptide-1 (GLP1) and insulin signaling." *Molecules* 22.6 (2017): 903.

Domon, Ayaka, et al. "Characterization of Enlarged Kidneys and Their Potential for Inducing Diabetes in DEK Rats." *Biology* 10.7 (2021): 633.

Dongiovanni, Paola, et al. "The role of insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis and liver disease development—a potential therapeutic target?." *Expert review of gastroenterology & hepatology* 10.2 (2016): 229-242.

El Ajjouri, Mustapha, et al. "Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre." *Base* (2008).

El omari, Nasreddine. "Étude phytochimique et toxicologique et évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique et antibactérienne des racines d'*Aristolochia longa* L." (2021).

El Ouahdani, Khadija, et al. "Thymus Algeriensis and Artemisia Herba-Alba Essential Oils: Chemical Analysis, Antioxidant Potential and In Vivo Anti-Inflammatory, Analgesic Activities, and Acute Toxicity." *Molecules* 26.22 (2021): 6780.

Eleazu, Chinedum Ogbonnaya, et al. "Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans." *Journal of diabetes & metabolic disorders* 12.1 (2013): 1-7.

El-Guendouz, Soukaïna, et al. "Antioxidant activity of thyme waste extract in O/W emulsions." *Antioxidants* 8.8 (2019): 243.

El-Hameed, Abd, and M. Abeer. "Polydatin-loaded chitosan nanoparticles ameliorates early diabetic nephropathy by attenuating oxidative stress and inflammatory responses in streptozotocin-induced diabetic rat." *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 19.2 (2020): 1599-1607.

Ellman, George L. "Tissue sulfhydryl groups." *Archives of biochemistry and biophysics* 82.1 (1959): 70-77.

Elmarakby, Ahmed A., and Jennifer C. Sullivan. "Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy." *Cardiovascular therapeutics* 30.1 (2012): 49-59.

Elmastas, Mahfuz, et al. "Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea—*Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites." *International journal of food properties* 21.1 (2018): 374-384.

El-Newary, Samah A., Nermeen M. Shaffie, and E. A. Omer. "The protection of *Thymus vulgaris* leaves alcoholic extract against hepatotoxicity of alcohol in rats." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10.4 (2017): 361-371.

Erejuwa, Omotayo Owomofoyon, et al. "Comparison of antioxidant effects of honey, glibenclamide, metformin, and their combinations in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats." *International journal of molecular sciences* 12.1 (2011): 829-843.

Evans, G. Owen. *Animal clinical chemistry: a practical handbook for toxicologists and biomedical researchers*. CRC Press, 2009.

Fazakerley, Daniel J., et al. "Mitochondrial oxidative stress causes insulin resistance without disrupting oxidative phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 293.19 (2018): 7315-7328.

Ferguson, Michael A., and Sushrut S. Waikar. "Established and emerging markers of kidney function." *Clinical chemistry* 58.4 (2012): 680-689.

Ferri, Jordi, et al. "8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a marker of DNA oxidative stress in individuals with combined familiar hyperlipidemia." *Medicina Clinica* 131.1 (2008): 1-4.

Figueiredo, A. Cristina, José G. Barroso, and Luis G. Pedro'. "Volatiles from *Thymbra* and *Thymus* species of the western Mediterranean basin, Portugal and Macaronesia." *Natural Product Communications* 5.9 (2010): 1934578X1000500924.

Fischer, Karen Leal, et al. "Cellules  $\alpha$  et  $\beta$  du pancréas-Meilleures ennemies ou partenaires pour la vie?." *médecine/sciences* 37.8-9 (2021): 752-758.



Fisher, Simon J., and C. Ronald Kahn. "Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production." *The Journal of clinical investigation* 111.4 (2003): 463-468.

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol.* 1984; 105:114-121.

Flohe, L. "[10] Superoxide dismutase assays." *Methods in enzymology*. Vol. 105. Academic press, 1984. 93-104.

Foretz, Marc, et al. "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.22 (1999): 12737-12742.

Forman, Henry Jay. "Glutathione—From antioxidant to post-translational modifier." *Archives of biochemistry and biophysics* 595 (2016): 64-67.

Fromenty, Bernard. "Inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation in drug-induced hepatic steatosis." *Liver Research* 3.3-4 (2019): 157-169.

Galovičová, Lucia, et al. "Thymus serpyllum Essential Oil and Its Biological Activity as a Modern Food Preserver." *Plants* 10.7 (2021): 1416.

Ganesan, Kavitha, Muhammad Burhan Majeed Rana, and Senan Sultan. "Oral hypoglycemic medications." (2018).

García-García, Patricia M., et al. "Inflammation in diabetic kidney disease." *World journal of diabetes* 5.4 (2014): 431.

Gebremeskel, Leake, Kald Beshir Tuem, and Tewolde Teklu. "Evaluation of antidiabetic effect of ethanolic leaves extract of *Becium grandiflorum* Lam.(Lamiaceae) in streptozotocin-induced diabetic mice." *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 13 (2020): 1481.

Gerber, Philipp A., and Guy A. Rutter. "The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus." *Antioxidants & redox signaling* 26.10 (2017): 501-518.

Ghasemi Pirbalouti, Abdollah, Zohreh Emami Bistghani, and Fatemeh Malekpoor. "An overview on genus *Thymus*." *Journal of Medicinal Herbs*, 6.2 (2015): 93-100.

Ghorbani, Ahmad, Roghayeh Rashidi, and Reza Shafiee-Nick. "Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 111 (2019): 947-957.

Giannini, Edoardo G., Roberto Testa, and Vincenzo Savarino. "Liver enzyme alteration: a guide for clinicians." *Cmaj* 172.3 (2005): 367-379.

Gilbert, Matthew P., and Richard E. Pratley. "GLP-1 analogs and DPP-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy: review of head-to-head clinical trials." *Frontiers in endocrinology* 11 (2020): 178.

Giordani, Roger, Youcef Hadeff, and Jacques Kaloustian. "Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants." *Fitoterapia* 79.3 (2008): 199-203.

Girija, K., et al. "Anti-diabetic and anti-cholesterolemic activity of methanol extracts of three species of *Amaranthus*." *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 1.2 (2011): 133-138.

Gohi, Serge Irie Bi, et al. "Diabète gestationnel révélé par une acidocétose diabétique inaugural: à propos de un cas." *The Pan African Medical Journal* 27 (2017).

Goswami, Nandini, and Sreemoyee Chatterjee. "Assessment of free radical scavenging potential and oxidative DNA damage preventive activity of *Trachyspermum ammi* L.(carom) and *Foeniculum vulgare* Mill.(fennel) seed extracts." *BioMed research international* 2014 (2014).

Goudjil, Mohamed Bilal, et al. "Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae)." *South African Journal of Botany* 128 (2020): 274-282.

Governa, Paolo, et al. "Phytotherapy in the management of diabetes: a review." *Molecules* 23.1 (2018): 105.

Graff, Sarah M., et al. "A *KCNK16* mutation causing *TALK-1* gain of function is associated with maturity-onset diabetes of the young." *JCI insight* 6.13 (2021).

Gras, V., et al. "Effect of metformin on survival rate in experimental sepsis." *Diabetes & metabolism* 32.2 (2006): 147-150.

Guesmi, Fatma, Houda Bellamine, and Ahmed Landoulsi. "Hydrogen peroxide-induced oxidative stress, acetylcholinesterase inhibition, and mediated brain injury attenuated by *Thymus algeriensis*." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 43.12 (2018): 1275-1281.

Gugliucci, A., et al. "Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins." *Fitoterapia* 80.6 (2009): 339-344.

Guillausseau, P. J., and M. Laloi-Michelin. "Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *La revue de médecine interne* 24.11 (2003): 730-737.

Gupta, Rajesh Kumar, et al. "Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals." *Journal of ethnopharmacology* 99.1 (2005): 75-81.

Gupta, Saket, et al. "Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-10.

Güven, Aysel, et al. "Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats." *Acta histochemica* 108.2 (2006): 85-93.

Guyton, Arthur C., and John Edward Hall. *Textbook of medical physiology*. Vol. 548. Philadelphia: Saunders, 2006.

Ha, Hunjoo, Mi-Ra Yu, and Kyung Hwan Kim. "Melatonin and taurine reduce early glomerulopathy in diabetic rats." *Free Radical Biology and Medicine* 26.7-8 (1999): 944-950.

Haile, Tesfay, et al. "Chemical Composition, Antioxidant Potential, and Blood Glucose Lowering Effect of Aqueous Extract and Essential Oil of *Thymus Serrulatus* Hochst. Ex Benth." *Frontiers in Pharmacology* 12 (2021): 858.

Hajjalizadeh, Zahra, et al. "Inhibitory effect of *Thymus caramanicus* Jalas on hyperglycemia-induced apoptosis in in vitro and in vivo models of diabetic neuropathic pain." *Journal of ethnopharmacology* 153.3 (2014): 596-603.

Haleng, Jeanine, et al. "Le stress oxydant." *Revue médicale de Liège* 62.10 (2007): 628-38.

Halliwell, Barry, and John MC Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA, 2015.

Halliwell, Barry. "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?." *The lancet* 344.8924 (1994): 721-724.

Hamdani, Imad, et al. "Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco." *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4.4 (2014): 281-286.

Han, Hye-Sook, et al. "Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective." *Experimental & molecular medicine* 48.3 (2016): e218-e218.

Han, Kyoung-Sik, Tae-Hwan Jung, and Kyung-Ok Shin. "Studies on the general analysis and antioxidant component analysis of *Chenopodium album* var. *centrorubrum* and biochemical analysis of blood of mice administered *C. album*." *Korean Journal of Food Science and Technology* 51.5 (2019): 492-498.

Harju, Anni M., and Martti Venäläinen. "Measuring the decay resistance of Scots pine heartwood indirectly by the Folin-Ciocalteu assay." *Canadian journal of forest research* 36.7 (2006): 1797-1804.

Hayden, Melvin R., and Suresh C. Tyagi. "Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus." *Jop* 3.4 (2002): 86-108.

Henry, Scott P., et al. "Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a four-week study in cynomolgus monkeys." *Toxicology* 120.2 (1997): 145-155.

Herman, Richard Ansah, et al. "Essential oils and their applications-a mini review." *Adv. Nutr. Food Sci* 4.4 (2019).

Heywood, Vernon Hilton, et al. *Flowering plant families of the world*. Vol. 88. Ontario: Firefly Books, 2007.

Hirano, Tsutomu. "Pathophysiology of diabetic dyslipidemia." *Journal of atherosclerosis and thrombosis* (2018): RV17023.

Ho, Edwin, et al. "Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice." *Redox biology* 1.1 (2013): 483-491.

Hosseini, Asieh, and Mohammad Abdollahi. "Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013 (2013).

Huang, Y. H., et al. "Combination therapy with losartan and fosinopril for early diabetic nephropathy." *Di 1 jun yi da xue xue bao= Academic Journal of the First Medical College of PLA* 23.9 (2003): 963-965.

Huang, Yifan, et al. "Lipoprotein lipase links vitamin D, insulin resistance, and type 2 diabetes: a cross-sectional epidemiological study." *Cardiovascular diabetology* 12.1 (2013): 1-8.

Hur, Kyu Yeon, et al. "2021 Clinical Practice Guidelines for Diabetes Mellitus in Korea." *Diabetes & Metabolism Journal* 45.4 (2021): 461-481.

Ighodaro, Osasenaga Macdonald. "Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108 (2018): 656-662.

Indyk, Diana, et al. "Advanced glycation end products and their receptors in serum of patients with type 2 diabetes." *Scientific Reports* 11.1 (2021): 1-14.

Irudayaraj, Santiago Stephen, et al. "Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats." *Journal of Ethnopharmacology* 143.2 (2012): 515-523.

Iskender, Hatice, et al. "The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF- $\kappa$ B and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 90 (2017): 500-508.

Ismail, Mohammad Yaheya Mohammad, and M. Yaheya. "Clinical evaluation of antidiabetic activity of *Trigonella* seeds and *Aegle marmelos* leaves." *World Applied Sciences Journal* 7.10 (2009): 1231-1234.

- Jabri-Karoui, Iness, et al. "Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*." *Journal of Functional Foods* 4.3 (2012): 661-669.
- Jaiswal, Yogini, Zhitao Liang, and Zhongzhen Zhao. "Botanical drugs in Ayurveda and traditional Chinese medicine." *Journal of ethnopharmacology* 194 (2016): 245-259.
- Janardhan, Sridhara, and G. Narahari Sastry. "Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: a new paradigm in type 2 diabetes treatment." *Current drug targets* 15.6 (2014): 600-621.
- Janicsák, Gábor, et al. "Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species." *Biochemical systematics and ecology* 27.7 (1999): 733-738.
- Jarald, Edwin, Siddaheswar Balakrishnan Joshi, and D. Jain. "Diabetes and herbal medicines." (2008): 97-106.
- Jayaprasad, B., P. S. Sharavanan, and R. Sivaraj. "Antidiabetic effect of *Chloroxylon swietenia* bark extracts on streptozotocin induced diabetic rats." *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 5.1 (2016): 61-69.
- Jeanrenaud, Claude, and G. Dreyer. "Les coûts directs médicaux du diabète." Une estimation pour le canton de Vaud. Institut de recherches économiques. University of Montréal (2012).
- Jialal, Ishwarlal, and Gurdeep Singh. "Management of diabetic dyslipidemia: An update." *World journal of diabetes* 10.5 (2019): 280.
- Jiménez-Arellanes, Adelina, et al. "*Thymus vulgaris* as a potencial source of antituberculous compounds." *Pharmacologyonline* 3 (2006): 569-574.
- Johnson, Jillian, et al. "Oxidative stress in neutrophils: Implications for diabetic cardiovascular complications." *Antioxidants & redox signaling* 36.10 (2022): 652-666.
- Kabbaoui, M., et al. "Antidiabetic effect of *Thymus satureioides* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats." *Int J Pharm Pharm Sci* 8.9 (2016): 140-145.
- Kambouche, N., et al. "Étude de l'effet antidiabétique des saponines extraites d'*Anabasis articulata* (Forssk) Moq, plante utilisée traditionnellement en Algérie." *Phytothérapie* 7.4 (2009): 197-201.
- Kanwar, Yashpal S., et al. "Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression." *Experimental biology and medicine* 233.1 (2008): 4-11.

Karakelides, Helen, et al. "Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects." *Diabetes* 56.11 (2007): 2683-2689.

Karaman, S., et al. "Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey." *Journal of Ethnopharmacology* 76.2 (2001): 183-186.

Kasetti, Ramesh Babu, et al. "Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of methanol: water (4: 1) fraction isolated from aqueous extract of *Syzygium alternifolium* seeds in streptozotocin induced diabetic rats." *Food and Chemical Toxicology* 48.4 (2010): 1078-1084.

Kaur, Navneet, and Tawseef Ahmed. "Bioactive secondary metabolites of medicinal and aromatic plants and their disease-fighting properties." *Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Cham, 2021. 113-142.

Kessler, André, and Aino Kalske. "Plant secondary metabolite diversity and species interactions." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49 (2018): 115-138.

Khadraoui, Abdelkader, et al. "Thymus algeriensis extract as a new eco-friendly corrosion inhibitor for 2024 aluminium alloy in 1 M HCl medium." *Journal of Molecular Liquids* 214 (2016): 293-297.

Khafaji, S. S. O. "Subject review: pharmacological application of thyme." *Adv. Anim. Vet. Sci* 6.9 (2018): 366-371.

Khan, Majid, et al. "Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review." *Food Research International* 130 (2020): 108933.

Khouya, Tarik, et al. "Phytochemical analysis and bioactivity evaluation of Moroccan *Thymus atlanticus* (Ball) fractions." *Scientific African* 11 (2021): e00716.

Khumalo, Gugulethu P., et al. "A review of the traditional use of Southern African medicinal plants for the treatment of inflammation and inflammatory pain." *Journal of Ethnopharmacology* 283 (2022): 114436.

Kiani, Razieh, Ahmad Arzani, and S. A. M. Mirmohammady Maibody. "Polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity involved in salt tolerance in wheat, *Aegilops cylindrica* and their amphidiploids." *Frontiers in Plant Science* 12 (2021): 493.

Kim, Yoon-Ha, et al. "Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review." *Frontiers in Plant Science* 8 (2017): 510.

Kindl, Marija, et al. "Antioxidant and anticholinesterase potential of six thymus species." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015 (2015).

Koleva, Irina I., et al. "Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods." *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* 13.1 (2002): 8-17.

Koochi-Hosseiniabadi, Omid, et al. "Effects of dietary *Thymus vulgaris* extract alone or with atorvastatin on the liver, kidney, heart, and brain histopathological features in diabetic and hyperlipidemic male rats." *Comparative Clinical Pathology* 24.6 (2015): 1311-1315.

Kooti, Wesam, et al. "The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review." *Electronic physician* 8.1 (2016): 1832.

Krishan, Pawan, and Vishal Arvind Chakkarwar. "Diabetic nephropathy: Aggressive involvement of oxidative stress." *Journal of Pharmaceutical Education & Research* 2.1 (2011).

Kumaran, A., and R. Joel Karunakaran. "In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India." *LWT-Food Science and Technology* 40.2 (2007): 344-352.

Kundu, Amit, et al. "Protective effects of *Croton hookeri* on streptozotocin-induced diabetic nephropathy." *Food and Chemical Toxicology* 135 (2020): 110873.

Kuzan, Aleksandra. "Toxicity of advanced glycation end products." *Biomedical Reports* 14.5 (2021): 1-8.

Kwon, Oran, et al. "Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids." *The FASEB Journal* 21.2 (2007): 366-377.



- Labiad, M. H., et al. "Phytochemical screening and antioxidant activity of Moroccan *Thymus satureioides* extracts." *Journal of Materials and Environmental Sciences* 8.6 (2017): 2132-2139.
- LaMoia, Traci E., and Gerald I. Shulman. "Cellular and molecular mechanisms of metformin action." *Endocrine Reviews* 42.1 (2021): 77-96.
- Lapolla, Annunziata, et al. "Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method." (2003): 1166-1173.
- Larsen, Simon Asbjørn, Moustapha Kassem, and Suresh IS Rattan. "Glucose metabolite glyoxal induces senescence in telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells." *Chemistry Central Journal* 6.1 (2012): 1-13.
- Latha, R. Cecily Rosemary, and P. Daisy. "Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats." *Chemico-biological interactions* 189.1-2 (2011): 112-118.
- Lebovitz, Harold E. "Alpha-glucosidase inhibitors." *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 26.3 (1997): 539-551.
- Lebovitz, Harold E. "Thiazolidinediones: the forgotten diabetes medications." *Current diabetes reports* 19.12 (2019): 1-13.
- Leduc, Charles, et al. "Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: a novel approach in quantitative ethnobotany." *Journal of Ethnopharmacology* 105.1-2 (2006): 55-63.
- Li, Xiao, et al. "Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Thymus*." *Chemistry & Biodiversity* 16.9 (2019): e1900254.
- Li, Zongshu, et al. "Effects of the combination of methylprednisolone with aminoguanidine on functional recovery in rats following spinal cord injury." *Experimental and Therapeutic Medicine* 7.6 (2014): 1605-1610.
- Libby, Gillian, et al. "New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes." *Diabetes care* 32.9 (2009): 1620-1625.

- Lindblom, Runa, et al. "Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy." *The review of diabetic studies: RDS 12.1-2* (2015): 134.
- Liu, Haiyan, et al. "Cranberry phytochemicals inhibit glycation of human hemoglobin and serum albumin by scavenging reactive carbonyls." *Food & Function* 2.8 (2011): 475-482.
- Liu, Song, et al. "Inhibition of pancreatic lipase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves." *Journal of ethnopharmacology* 149.1 (2013): 263-269.
- Liu, Xiangyuan, and Li Song. "Quercetin protects human liver cells from o, p'-DDT-induced toxicity by suppressing Nrf2 and NADPH oxidase-regulated ROS production." *Food and Chemical Toxicology* 161 (2022): 112849.
- Lo, Chih-Yu, Wen-Tuan Hsiao, and Xiu-Yu Chen. "Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acids." *Journal of food science* 76.3 (2011): H90-H96.
- Lorenzo, C., et al. "The association of alanine aminotransferase within the normal and mildly elevated range with lipoproteins and apolipoproteins: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." *Diabetologia* 56.4 (2013): 746-757.
- Lorenzo, O., et al. "Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy." *Mediators of inflammation* 2013 (2013).
- Lu, Yinrong, and L. Yeap Foo. "Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*)." *Food chemistry* 75.2 (2001): 197-202.
- Lucis, O. J. "The status of metformin in Canada." *Canadian Medical Association Journal* 128.1 (1983): 24.
- Maataoui B S., Hmyene A., Hilali S., 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. (1):3-8.
- Magnan, C., and A. Ktorza. "Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique." *EMC-Endocrinologie* 2.4 (2005): 241-264.

Mahboob, M., M. F. Rahman, and P. Grover. "Serum lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in male and female diabetic patients." *Singapore medical journal* 46.7 (2005): 322.

Mahdavi, S., and G. Karimzadeh. "Karyological and nuclear DNA content variation in some Iranian endemic *Thymus* species (Lamiaceae)." (2010): 447-458.

Mahmoud, Ayman M. "Exercise ameliorates metabolic disturbances and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy: possible underlying mechanisms." *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment*. Springer, Singapore, 2017. 207-230.

Mahmoudi, Souhila, Mustapha Khali, and Nacéra Mahmoudi. "Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.)." *Nature & Technology* 9 (2013): 35.

Marchesini, Giulio, et al. "Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome." *Diabetes* 50.8 (2001): 1844-1850.

Maritim, A. C., aRA Sanders, and J. B. Watkins Iii. "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review." *Journal of biochemical and molecular toxicology* 17.1 (2003): 24-38.

Matsuura, Nobuyasu, et al. "Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts." *Journal of health science* 48.6 (2002): 520-526.

McCue, Patrick, and Kalidas Shetty. "Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review." *Critical reviews in food science and nutrition* 44.5 (2004): 361-367.

McIlwain, David R., Thorsten Berger, and Tak W. Mak. "Caspase functions in cell death and disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7.4 (2015).

Meex, Ruth CR, and Matthew J. Watt. "Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance." *Nature Reviews Endocrinology* 13.9 (2017): 509-520.

Meister, Alton, and Mary E. Anderson. "Glutathione." *Annual review of biochemistry* 52.1 (1983): 711-760.

Meng, Ying, et al. "Genome-Wide Identification, Characterization and Expression Analysis of Lipoyxygenase Gene Family in *Artemisia annua* L." *Plants* 11.5 (2022): 655.

Miguel, Maria Graça. "Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review." *Molecules* 15.12 (2010): 9252-9287.

Miki, Takashi, et al. "Distinct effects of glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility." *Diabetes* 54.4 (2005): 1056-1063.

Miraliakbari, H., and F. Shahidi. "Antioxidant activity of minor components of tree nut oils." *Food Chemistry* 111.2 (2008): 421-427.

Miranda-Díaz, Alejandra Guillermina, et al. "Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease." *Journal of diabetes research* 2016 (2016).

Mkhwanazi, Blessing N., et al. "Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function." *Renal Failure* 36.3 (2014): 419-431.

Moein, Mahmood Reza, Soheila Moein, and Saeid Ahmadizadeh. "Radical scavenging and reducing power of *Salvia mirzayanii* subfractions." *Molecules* 13.11 (2008): 2804-2813.

Mohamed, Suhaila. "Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease." *Trends in Food Science & Technology* 35.2 (2014): 114-128.

Mohora, Maria, et al. "The sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications." *Romanian J Biophys* 17.2 (2007): 63-84.

Mokhtari, Mouna, et al. "Phytochemicals, Antihemolytic, Anti-inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Activities from *Thymus Algeriensis*." *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 27.3 (2021): 253-266.

Molyneux, Philip. "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." *Songklanakarin J. sci. technol* 26.2 (2004): 211-219.

Monnier, Louis, and Claude Colette. "Targeting prandial hyperglycemia: how important is it and how best to do this?." *Current Diabetes Reports* 8.5 (2008): 368-374.

Moorthi, Puthamohan Vinayaga, and Chelliah Balasubramanian. "Antimicrobial properties of marine seaweed, *Sargassum muticum* against human pathogens." *J. Coast. Life Med* 3 (2015): 122-125.

Mushtaq, Muhammad Naveed, et al. "Hypoglycemic and hematological effects of aqueous extract of *Thymus serpyllum* Linn. in alloxan-induced diabetic rabbits." *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6.40 (2012): 2845-2850.

Najafian, Behzad, Charles E. Alpers, and Agnes B. Fogo. "Pathology of human diabetic nephropathy." *Diabetes and the Kidney* 170 (2011): 36-47.

Nassir, Fatiha, et al. "Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis." *Gastroenterology & hepatology* 11.3 (2015): 167.

Navale, Archana M., and Archana Paranjape. "Antidiabetic and renoprotective effect of *Anogeissus acuminata* leaf extract on experimentally induced diabetic nephropathy." *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 29.4 (2018): 359-364.

Negre-Salvayre, Anne, et al. "Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors." *British journal of pharmacology* 153.1 (2008): 6-20.

Newman, David J., Gordon M. Cragg, and Kenneth M. Snader. "The influence of natural products upon drug discovery." *Natural product reports* 17.3 (2000): 215-234.

Newsholme, Philip, et al. "Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes." *Biochemical Journal* 473.24 (2016): 4527-4550.

Niazmand, Saeed, et al. "The effect of *Cinnamomum cassia* extract on oxidative stress in the liver and kidney of STZ-induced diabetic rats." *Journal of Complementary and Integrative Medicine* (2021).

Nickavar, Bahman, and Naser Esbati. "Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species." *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 5.3 (2012): 119-125.

Niimi, Naoko, et al. "Aldose reductase and the polyol pathway in schwann cells: old and new problems." *International Journal of Molecular Sciences* 22.3 (2021): 1031.

- Nikolić, Miloš, et al. "Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils." *Industrial Crops and Products* 52 (2014): 183-190.
- Noshahr, Zahra Samadi, et al. "Animal models of diabetes-associated renal injury." *Journal of Diabetes Research* 2020 (2020).
- Oakhill, Jonathan S., et al. "AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase." *Science* 332.6036 (2011): 1433-1435.
- Ohiagu, Franklyn O., Paul C. Chikezie, and Chinwendu M. Chikezie. "Pathophysiology of diabetes mellitus complications: Metabolic events and control." *Biomedical Research and Therapy* 8.3 (2021): 4243-4257.
- Ohkawa, Hiroshi, Nobuko Ohishi, and Kunio Yagi. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." *Analytical biochemistry* 95.2 (1979): 351-358.
- Ohnishi, Motoyo, et al. "Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis." *phytochemistry* 36.3 (1994): 579-583.
- Olaoye, Ige Francis, Babatunde Joseph Oso, and Adepeju Aberuagba. "Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activities of the Extracts of *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris*." *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 13.4 (2021): 207.
- Olorunnisola, Olubukola Sinbad, et al. "The role of poly-herbal extract in sodium chloride-induced oxidative stress and hyperlipidemia in male wistar rats." *Medicines* 8.6 (2021): 25.
- Osawa, Toshihiko, and Mitsuo Namiki. "A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves." *Agricultural and biological chemistry* 45.3 (1981): 735-739.
- Oyaizu, Makoto. "Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine." *The Japanese journal of nutrition and dietetics* 44.6 (1986): 307-315.
- Ozer, Josef, et al. "The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity." *Toxicology* 245.3 (2008): 194-205.
- Özgen, U. F. U. K., et al. "Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae (Labiatae) species." *Pharmaceutical biology* 44.2 (2006): 107-112.

- Paithankar, Jagdish Gopal, et al. "Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction." *Chemosphere* 262 (2021): 128350.
- Parwani, Kirti, and Palash Mandal. "Role of advanced glycation end products and insulin resistance in diabetic nephropathy." *Archives of physiology and biochemistry* (2020): 1-13.
- Patel, Mayurkumar B., and Shrihari Mishra. "Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia*." *Phytomedicine* 18.12 (2011): 1045-1052.
- Patel, Mayurkumar B., and Shrihari Mishra. "Isoquinoline alkaloids from *Tinospora cordifolia* inhibit rat lens aldose reductase." *Phytotherapy Research* 26.9 (2012): 1342-1347.
- Peng, Xiaofang, et al. "Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts." *Journal of agricultural and food chemistry* 56.6 (2008): 1907-1911.
- Peppas, Melpomeni, and Helen Vlassara. "Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview." *Hormones* 4.1 (2005): 28-37.
- Pérez-Tortosa, Víctor, et al. "Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots." *Food chemistry* 130.2 (2012): 362-369.
- Petrov, Maxim S. "Post-pancreatitis diabetes mellitus: investigational drugs in preclinical and clinical development and therapeutic implications." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 30.7 (2021): 737-747.
- Piasecka, Anna, Nicolas Jedrzejczak-Rey, and Paweł Bednarek. "Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals." *New Phytologist* 206.3 (2015): 948-964.
- Pilkis, S. J., and C. R. Park. "Mechanism of action of insulin." *Annual Review of Pharmacology* 14.1 (1974): 365-388.
- Plows, Jasmine F., et al. "The pathophysiology of gestational diabetes mellitus." *International journal of molecular sciences* 19.11 (2018): 3342.
- Pop-Busui, Rodica, Aaron P. Kellogg, and Hsinlin T. Cheng. "Cyclooxygenase-2 pathway as a potential therapeutic target in diabetic peripheral neuropathy." *Current drug targets* 9.1 (2008): 68-76.

Popovici Cristina; Ilonka Saykova ; Bartek Tylkowski, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel 2009, 4, 25-39. 2009.

Price, Christopher P., and Hazel Finney. "Developments in the assessment of glomerular filtration rate." *Clinica chimica acta* 297.1-2 (2000): 55-66.

Prieto, Pilar, Manuel Pineda, and Miguel Aguilar. "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E." *Analytical biochemistry* 269.2 (1999): 337-341.

Pushparaj, P., C. H. Tan, and B. K. H. Tan. "Effects of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats." *Journal of ethnopharmacology* 72.1-2 (2000): 69-76.

Rabiei, Sana, et al. "The protective effect of Liza klunzingeri protein hydrolysate on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and toxicity in male rats." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 22.10 (2019): 1203.

Rader, Daniel J. "Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus." *The American journal of medicine* 120.3 (2007): S12-S18.

Radünz, Marjana, et al. "Chemical composition and in vitro antioxidant and antihyperglycemic activities of clove, thyme, oregano, and sweet orange essential oils." *LWT* 138 (2021): 110632.

Rahman, Md Saidur, et al. "Role of insulin in health and disease: an update." *International Journal of Molecular Sciences* 22.12 (2021): 6403.

Rains, Justin L., and Sushil K. Jain. "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes." *Free Radical Biology and Medicine* 50.5 (2011): 567-575.

Ramesh, B., et al. "Effect of Commiphora mukul gum resin on hepatic marker enzymes, lipid peroxidation and antioxidants status in pancreas and heart of streptozotocin induced diabetic rats." *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2.11 (2012): 895-900.



Ramos, Daniel R., et al. "Effect of ionizing radiation on human myeloperoxidase: Reaction with hydrated electrons." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 226 (2022): 112369.

Re, Roberta, et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free radical biology and medicine* 26.9-10 (1999): 1231-1237.

Reaven, Gerald M. "Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistant individuals." *Endocrinology and Metabolism Clinics* 34.1 (2005): 49-62.

Rehman, Kanwal, and Muhammad Sajid Hamid Akash. "Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?." *Journal of cellular biochemistry* 118.11 (2017): 3577-3585.

Ribéreau-Gayon J, Peynaud m, Ribéreau-Gayon P and Sudraud P. *Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins*. Ed. Dunod, Paris, 1972, p. 671.

Roden, Michael. "Mechanisms of disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes—pathogenesis and clinical relevance." *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* 2.6 (2006): 335-348.

Rop, Otakar, et al. "Selected cultivars of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) as a new food source for human nutrition." *African Journal of Biotechnology* 9.8 (2010).

Rotruck, J. T<sup>†</sup>, et al. "Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase." *Science* 179.4073 (1973): 588-590.

Ruegenberg, Sabine, et al. "Protein kinase A controls the hexosamine pathway by tuning the feedback inhibition of GFAT-1." *Nature communications* 12.1 (2021): 1-14.

Sabahi, Zahra, et al. "Essential oil composition and in vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Thymus daenensis* Celak from Iran." *Global J Pharmacol* 7 (2013): 153-8.

Sacks, Frank M., et al. "Association between plasma triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol and microvascular kidney disease and retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a global case–control study in 13 countries." *Circulation* 129.9 (2014): 999-1008.

Saravanan, Settu, and Leelevenoathan Pari. "Protective effect of thymol on high fat diet induced diabetic nephropathy in C57BL/6J mice." *Chemico-biological interactions* 245 (2016): 1-11.

Scheen, A. J. "Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion?." *Diabetes & metabolism* 31 (2005): 5S27-5S34.

Scheen, André, and Jean-Marie Krzesinski. "Combinaison fixe perindopril-amlodipine (Coveram®) dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance coronaire." *Revue Médicale de Liège* 64.4 (2009): 223-227.

Schlienger, Jean-Louis. "Diabète et phytothérapie: les faits." *Médecine des maladies Métaboliques* 8.1 (2014): 101-106.

Schmatz, Roberta, et al. "Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats." *Biochimie* 94.2 (2012): 374-383.

Schwabe, Robert F., and David A. Brenner. "Mechanisms of liver injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 290.4 (2006): G583-G589.

Sekizuka, Hiromitsu. "Uric acid, xanthine oxidase, and vascular damage: potential of xanthine oxidoreductase inhibitors to prevent cardiovascular diseases." *Hypertension Research* 45.5 (2022): 772-774.

Selby, Nicholas M., and Maarten W. Taal. "An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 22 (2020): 3-15.

Selmi, S. A. L. A. H., and S. A. L. O. U. A. Sadok. "The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* Linnaeus) on flesh quality of tuna (*Thunnus thynnus* (Linnaeus)) during chilled storage." *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 3.1 (2008): 36-45.

Sengul, Memnune, et al. "Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants." *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22.1 (2009).

Sergi, Domenico, et al. "The role of dietary advanced glycation end products in metabolic dysfunction." *Molecular Nutrition & Food Research* 65.1 (2021): 1900934.

Seyyedi, M. A., et al. "Study on glutathione S-transferase (GST) inhibition assay by triclabendazole. I: Protoscolec (hydatid cyst; *Echinococcus granulosus*) and sheep liver tissue." *Iranian Journal of Public Health* 34.1 (2005): 38-46.

Shahidi, Fereidoon, and Marian Naczk. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press, 2003.

Shahidi, Fereidoon, P. K. J. P. D. Wanasundara, and C. Hong. "Antioxidant activity of phenolic compounds in meat model systems." 1992. 214-222.

Sharma, Ayush, and Ajay Kumar. "Role of antioxidant therapy for pain relief in chronic pancreatitis: Finding the signal in the noise." *JGH Open: An Open Access Journal of Gastroenterology and Hepatology* 5.3 (2021): 327.

Sharma, Uttam, et al. "A Comparative Antidiabetic Activity of the Three Plants Found in Terai and Duars Region of West Bengal, India." *Biomedical and Pharmacology Journal* 13.2 (2020): 907-913.

Sidali, Lamia, et al. "Chemical composition, acute toxicity, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Thymus fontanesii* essential oil from Algeria." *PhytoChem and BioSub Journal* 11.1 (2017): 11.

Singh, R. B. A. M., et al. "Advanced glycation end-products: a review." *Diabetologia* 44.2 (2001): 129-146.

Singh, Savita, et al. "A preliminary report on the role of yoga asanas on oxidative stress in non-insulin dependent diabetes mellitus." *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 16.2 (2001): 216-220.

Sobeh, Mansour, et al. "*Thymus algeriensis* and *Thymus fontanesii*: chemical composition, in vivo antiinflammatory, pain killing and antipyretic activities: a comprehensive comparison." *Biomolecules* 10.4 (2020): 599.

Souadia, Ahmed. "Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Essential Oils of Algeria." *Natural Product Communications* 17.2 (2022): 1934578X221080337.

Stachowicz, Katarzyna. "Deciphering the mechanisms of regulation of an excitatory synapse via cyclooxygenase-2. A review." *Biochemical Pharmacology* 192 (2021): 114729.

Stahl-Biskup, Elisabeth, and R. P. Venskutonis. "Thyme." Handbook of herbs and spices. Woodhead Publishing. (2012): 499-525.

Steinmetz, Josiane, and Edwige Panek. "Adaptation sur GSA II Greiner du dosage des triglycérides par voie entièrement enzymatique. Application à l'étude de leur conservation et de certaines interférences analytiques." (1978): 613-620.

Sugden, Mary, and Mark Holness. "Pathophysiology of diabetic dyslipidemia: implications for atherogenesis and treatment." *Clinical Lipidology* 6.4 (2011): 401-411.

Sun, Bao, Zhiying Luo, and Jiecan Zhou. "Comprehensive elaboration of glycemie variability in diabetic macrovascular and microvascular complications." *Cardiovascular Diabetology* 20.1 (2021): 1-13.

Sun, Yan, et al. "miR-451 suppresses the NF-kappaB-mediated proinflammatory molecules expression through inhibiting LMP7 in diabetic nephropathy." *Molecular and cellular endocrinology* 433 (2016): 75-86.

Sun, Zheng, and Mitchell A. Lazar. "Dissociating fatty liver and diabetes." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 24.1 (2013): 4-12.

Sureka, Chandrabose, et al. "Ameliorative property of *Sesbania grandiflora* on carbohydrate metabolic enzymes in the liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats." *Saudi Journal of Biological Sciences* 28.7 (2021): 3669-3677.

Taghouti, Meriem, et al. "Chemical characterization and bioactivity of extracts from *Thymus mastichina*: A *Thymus* with a distinct salvianolic acid composition." *Antioxidants* 9.1 (2019): 34.

Tardugno, Roberta, et al. "*Thymus vulgaris* L. essential oils from Emilia Romagna Apennines (Italy): phytochemical composition and antimicrobial activity on food-borne pathogens." *Natural Product Research* 36.3 (2022): 837-842.

Tepe, Bektas, et al. "Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*." *Journal of Food Engineering* 66.4 (2005): 447-454.

Tesch, Greg H., and Terri J. Allen. "Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research)." *Nephrology* 12.3 (2007): 261-266.

Thomas, Merlin C., et al. "Diabetic kidney disease." *Nature reviews Disease primers* 1.1 (2015): 1-20.

Tiffany, T. O., et al. "Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer." *Clinical Chemistry* 18.8 (1972): 829-840.

Tlili, Imen, et al. "Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars." *Journal of Food Composition and Analysis* 24.7 (2011): 923-928.

Tohidi, Behnaz, et al. "Thymol, carvacrol, and antioxidant accumulation in *Thymus* species in response to different light spectra emitted by light-emitting diodes." *Food chemistry* 307 (2020): 125521.

Touhami, Aisha, et al. "Phytochemical characterization of the essential oils obtained from mediterranean *Thymus* spp. (Lamiacea) harvested at different stages of growth." *J. Pharm. Pharmacol* 5 (2017): 37-45.

Tsai, C. Stan, and Q. Chen. "Purification and kinetic characterization of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*." *Biochemistry and Cell Biology* 76.1 (1998): 107-113.

Tundis, R., M. R. Loizzo, and F. Menichini. "Natural products as  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update." *Mini reviews in medicinal chemistry* 10.4 (2010): 315-331.

Umeno, Aya, et al. "Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones." *Molecules* 21.6 (2016): 708.

Unuofin, Jeremiah Oshiomame, and Sogolo Lucky Lebelo. "Antioxidant effects and mechanisms of medicinal plants and their bioactive compounds for the prevention and treatment of type 2 diabetes: an updated review." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2020 (2020).

Ustinova, Monta, et al. "Whole-blood transcriptome profiling reveals signatures of metformin and its therapeutic response." *PLoS One* 15.8 (2020): e0237400.

Van De Laar, Floris A., et al. " $\alpha$ -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis." *Diabetes care* 28.1 (2005): 154-163.

Vanani, Atefeh Raesi, et al. "Dimethyl fumarate reduces oxidative stress, inflammation and fat deposition by modulation of Nrf2, SREBP-1c and NF- $\kappa$ B signaling in HFD fed mice." *Life Sciences* 283 (2021): 119852.

Vergès, B. "Glitazones et effets indésirables cardiovasculaires." *La Lettre du cardiologue* 419 (2008): 10-13.

Vergès, B. "Insulin sensitivity and lipids." *Diabetes & metabolism* 27.2 Pt 2 (2001): 223-227.

Vergès, Bruno. "Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2." *Nutrition clinique et métabolisme* 21.1 (2007): 9-16.

Verma, Sushma, Honey Chandra, and Monisha Banerjee. "Cyclooxygenase 1 (COX1) expression in Type 2 diabetes mellitus: A preliminary study from north India." *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 17.1 (2016): 41-45.

Vinod, Kombath Ravindran, et al. "Critical issues related to transfersomes-novel vesicular system." *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 11.1 (2012): 67-82.

Vinod, P. B. "Pathophysiology of diabetic nephropathy." *Clinical Queries: Nephrology* 1.2 (2012): 121-126.

Vural, Hüseyin, et al. "Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats." *Journal of pineal research* 31.3 (2001): 193-198.

Wada, Jun, and Atsuko Nakatsuka. "Mitochondrial dynamics and mitochondrial dysfunction in diabetes." *Acta Medica Okayama* 70.3 (2016): 151-158.

Wang, Jingjing, and Hongjun Wang. "Oxidative stress in pancreatic beta cell regeneration." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017 (2017).

Wang-Fischer, Yanlin, and Tina Garyantes. "Improving the reliability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model." *Journal of diabetes research* 2018 (2018).

Weiss, Raymond B. "Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity." *Cancer Treat Rep* 66.3 (1982): 427-38.

White, Michael G., James AM Shaw, and Roy Taylor. "Type 2 diabetes: the pathologic basis of reversible  $\beta$ -cell dysfunction." *Diabetes care* 39.11 (2016): 2080-2088.

Williamson, Gary, and Katherine Sheedy. "Effects of polyphenols on insulin resistance." *Nutrients* 12.10 (2020): 3135.

Wolf, G. "New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology." *European journal of clinical investigation* 34.12 (2004): 785-796.

Wolf, Megan E., et al. "Cytochromes P450 in the biocatalytic valorization of lignin." *Current Opinion in Biotechnology* 73 (2022): 43-50.

Wu, Chi-Hao, et al. "The proglycation effect of caffeic acid leads to the elevation of oxidative stress and inflammation in monocytes, macrophages and vascular endothelial cells." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22.6 (2011): 585-594.

Wu, Liya, and Klaus G. Parhofer. "Diabetic dyslipidemia." *Metabolism* 63.12 (2014): 1469-1479.

Yahia, Imen Ben Haj, et al. "Variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Mentha x rotundifolia* (L.) Huds.(Lamiaceae) collected from different bioclimatic areas of Tunisia." *Biochemical Systematics and Ecology* 84 (2019): 8-16.

Yalcin, Sakine, et al. "Effects of dried thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves on performance, some egg quality traits and immunity in laying hens." *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 67.3 (2020): 303-311.

Yan, Liang-jun. "Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway." *Animal models and experimental medicine* 1.1 (2018): 7-13.

Yaribeygi, Habib, et al. "Effects of antidiabetic drugs on NLRP3 inflammasome activity, with a focus on diabetic kidneys." *Drug discovery today* 24.1 (2019): 256-262.

Yaribeygi, Habib, et al. "Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2020 (2020).

Yazdi, Hassan Bagheri, et al. "The role of *Artemisia turanica* extract on renal oxidative and biochemical markers in STZ-induced diabetes in rat." *Avicenna Journal of Phytomedicine* 10.5 (2020): 504.

- Yeh, Wan-Ju, et al. "Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings." *Journal of food and drug analysis* 25.1 (2017): 84-92.
- You, Wen-Peng, and Maciej Henneberg. "Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth." *BMJ open diabetes research and care* 4.1 (2016): e000161.
- Young, Donald S. "Effects of drugs on clinical laboratory tests." *Annals of clinical biochemistry* 34.6 (1997): 579-581.
- Yu, Liangli, et al. "Free radical scavenging properties of wheat extracts." *Journal of agricultural and food chemistry* 50.6 (2002): 1619-1624.
- Zeghib, A., et al. "Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Constantine (Algeria)." *Der Pharmacia Lettre* 5.3 (2013): 206-210.
- Zelko, Igor N., Thomas J. Mariani, and Rodney J. Folz. "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." *Free Radical Biology and Medicine* 33.3 (2002): 337-349.
- Zengin, Gokhan, et al. "Phenolic profiling and in vitro biological properties of two Lamiaceae species (*Salvia modesta* and *Thymus argaeus*): A comprehensive evaluation." *Industrial Crops and Products* 128 (2019): 308-314.
- Zheng, Yan, Sylvia H. Ley, and Frank B. Hu. "Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications." *Nature reviews endocrinology* 14.2 (2018): 88-98.
- Zhu, Jianzhong, et al. "The inhibitory effects of flavonoids on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase." *Critical reviews in food science and nutrition* 60.4 (2020): 695-708.
- Ziani, Borhane EC, et al. "Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne." *Food Research International* 116 (2019): 312-319.





## PHYTOCHEMICAL PROFILE, ANTI-LIPID PEROXIDATION AND ANTI-DIABETIC ACTIVITIES OF THYMUS ALGERIENSIS BOISS. & REUT



Zaoui Heyem<sup>a</sup>, Nassim<sup>a</sup> Boutaoui<sup>b</sup>, Menad Ahmed<sup>a</sup>, Ramazan Erenler<sup>c</sup>, 5

Zaiter Lahcene<sup>b</sup>, Benayache Fadila<sup>b</sup>, Ameddah Souad<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté de Sciences de la Nature et de la vie, Université Constantine1, 25000 Constantine, Algérie

<sup>b</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine1, 25000 Constantine, Algérie

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tokat, Turkey

### Abstract

*Thymus algeriensis* Boiss & Reut is an Algerian native plant traditionally used for culinary and medicinal purposes. Biological activities varied with their chemical composition, which depends on the floral and geographical origin. This study was designed to screen the phenolic content of the n-BuOH extract of *Thymus algeriensis* (BETA), anti-lipid peroxidation and anti-diabetic properties on different *in vitro* models. The results showed that BETA reduced TBARS formation in a concentration-dependent manner; protected  $\beta$ -carotene from auto-oxidation and prevented oxidation of ferrous in the linoleic acid/ferric thiocyanate assay. Furthermore, BETA showed effective inhibitions of the key enzymes linked to type 2 diabetes;  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. BETA blocked also the formation of AGE as shown by the results of glucose-BSA (BSA-GLU), BSA-Methylglyoxal system (BSA-MGO) and glycated hemoglobin. The effectiveness of BETA in combating diabetics might be influenced by the synergistic action of its phenolic compounds; mentioned by the phenolic content and LC/MS analysis; particularly their richness on the rosmarinic acid and ferulic acid, caffeic acid as well quercetin. This suggests the potential of BETA to mitigate multiple complications stemming from oxidative stress and protein glycation in diabetes.

Keywords: *Thymus algeriensis*; LC-MS; Anti-glycation; Anti-lipid peroxidation;  $\alpha$ -glucosidase;  $\alpha$ -amylase

### 1. Introduction

Diabetes mellitus, a chronic metabolic disorder, is at present major worldwide health problem [1]. Multiple signaling pathways underlying hyperglycemic cellular damage in type 2 diabetes mellitus [2]. Elevated blood sugar levels have been implicated in the induction of oxidative stress via a number of mechanisms, viz., autooxidation of glucose [3] and advanced glycation products (AEG) formation. Several approaches of therapy were considered, the combat of oxidative stress is one of the therapeutic approaches in treating diabetic patients [4,5]. One promising approach for management of diabetes, particularly type 2 diabetes, is to decrease postprandial hyperglycemia by inhibiting carbohydrate-hydrolyzing enzymes in gastrointestinal tract [6]. The inhibition of AGE formation has been an effective way for retarding the full range of diabetes complications. Since all the existing anti-diabetic agents are having considerable unwanted effects [4,7], there is an urgent

demand for new and non-toxic agent. Traditional plant medicines are used throughout the world for a range of diabetic presentations [8]. Indeed, inhabitants of the world, including Algerians, believed that eating and consuming fresh medicinal plants may treat illnesses and ailments [9,10]; among those plants was *Thymus algeriensis*, which belongs to the Lamiaceae family [11]. In fact, this family is among the largest families of flowering plants with about 400 genera and over 7000 species distributed around the world [12]. *T. algeriensis* is the most widespread North African species. It is endemic in Libya, Tunisia, Algeria and Morocco [13]. *T. algeriensis* is largely used, fresh or dried, mainly as a culinary herb, essentially used in Algeria both as a popular herb and as a spicy herb [14,15]. The plant is largely used as a culinary herb and as a traditional medicine to treat digestive and respiratory infections (e.g., gastrointestinal dysentery) [16]. In addition, it was used to enhance the immune system and help fight colds [17]. These properties

\*Corresponding author e-mail: [amedsouad@yahoo.fr](mailto:amedsouad@yahoo.fr); (Souad Ameddah).

Receive Date: 09 March 2022, Revise Date: 25 March 2022, Accept Date: 21 April 2022

DOI: 10.21608/EJCHEM.2022.126336.5600

©2022 National Information and Documentation Center (NIDOC)

depend greatly on their chemical compositions and are mainly attributed to their richness on phenolic acids [16]. However, it has been reported that a differences among mentioned phenolic compounds levels can be related to environmental conditions, such geographic origin [18], genetic and extraction methods [19], could influence the variability of these chemical composition. *T. algeriensis* has been previously studied with an exclusive attention to ethanolic extract and the methanol extracts [16,20] whereas, few studies carried out on the *n*-BuOH extract. In continuation of our research on the genus *Thymus* and taking into account that there was no information available in the literature about the anti-diabetic studies on *T. algeriensis*, our investigation seeking the *in vitro* antidiabetic activity of the *n*-BuOH extract of *T. algeriensis* (BETA). The present study also is an attempt to identify and enrich the knowledge on the variation of the chemical composition of *T. algeriensis* (MSila region; Algeria) by using LC/MS, analyses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The chemical products and reagents used were:  $\beta$ -carotene, linoleic acid, galantamine, 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $\geq 99\%$ ),  $\alpha$ -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (Type I,  $\geq 10$  units/mg protein), acarbose ( $\geq 95\%$ ), amylase, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (*p*-NPG), 3,5- dinitro-salicylic acid (DNS), serum albumin (BSA), methylglyoxal (MG), 40% aqueous solution, bovine hemoglobin (Hb). All the chemicals used including the solvents, were of analytical grade were purchased from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Phytochemical studies

#### 2.2.1. Plant material

Samples of full bloom plants were collected from wild population in MSila region (Coordinates: 35420 N 4330 E), Algeria, identified by Professor Mohamed Kaabeche (Biology Department, University of Setif 1, Algeria). A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University Frères Mentouri Constantine 1. Aerial parts were manually separated, dried at controlled temperature (40 °C) in the dark until constant weight. Then plant material was powdered to a uniform granulometry and stored in the dark at -20 °C, in vacuum bags, until extractions.

#### 2.2.2. Extraction

The air-dried aerial parts (leaves and flowers, 2.0 kg) of *T. algeriensis* were powdered and macerated at room temperature with EtOH-H<sub>2</sub>O 70:30, (v/v) (15 L) for 24 h, four times with fresh solvent. After filtration, and evaporation. The remaining aqueous solution was extracted successively with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, and *n*-BuOH, giving CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7.42 g), EtOAc (4.19 g) and *n*-

BuOH (BETA) (33.15 g) extracts. In our investigation, we are interested to BETA.

#### 2.2.3. Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic (TPC) was determined with the Folin-Ciocalteu reagent following the method of Singleton et al. [21] with a slight modification using Gallic acid as standard. Results were expressed as micrograms of gallic acid equivalents per milligrams of extract ( $\mu$ g GAE/mg).

#### 2.2.4. Determination of total flavonoid content (TFC)

The concentration of flavonoids was achieved using the method described Ordenez et al. [22] by using the aluminum chloride reagent results were expressed as  $\mu$ g quercetin equivalents (QE)/mg extract.

#### 2.2.5. LC-MS analysis

The qualitative and quantitative analyses of polyphenolic compounds were performed by LC-MS. Thermo Scientific - Dionex Ultimate 3000 -TSQ Quantum with Thermo ODS Hypersil 250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m column were used for quantitative analysis. The injection volume was 20  $\mu$ L. The mobile phase included eluent A, water with 0.1 % formic acid and B, methanol. The flow rate was 0.7 mL/min at 40 °C. The gradient program was fixed as follow: 0-1 min, 100 % A, 5-20 min, 95 % A, 1-22 min, 5 % A, 25 min, 5 % A, 30 min 0 % A. Total process time was 30 min. Extracts were prepared to be 1 mg/1 mL and analyzed. The relationship between peak area and concentration was found to be linear from 0.5 to 10 mg/L (ppb) for each compound. Linearity was assessed using linear regression analysis of six points for each compound. Linear plot consists of three replicates per point. For all analyses, the correlation coefficients ( $R_2$  values) were found to be  $\geq 0.99$ . The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) values of compounds for LC-MS/MS method are given in Table. LOD and LOQ were determined by using measurements of reagent blanks spiked with low concentrations of analyte according to EURACHEM GUIDE. The blank solution was spiked to 0.1 ppm standard. Calculate LOD and LOQ as  $LOD = 3 \times S_0$  and  $LOQ = 10 \times S_0$ , where  $S_0$  is the standard deviation. The standards used for LC-MS/MS analysis were chlorogenic acid, naringenin, *p*-hydroxybenzoic acid, kaempferol, gentisic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, gallic acid, rosmarinic acid, ferulic acid and caffeic acid.

### 2.3. *In vitro* antioxidant effect

#### 2.3.1. Lipid peroxidation (LPO) inhibition induced by $Fe^{2+}$ /ascorbic acid system

The reaction mixture containing rat liver homogenate (0.1 mL, 25 % w/v) in Tris-HCl (30 mM), ferrous ammonium sulfate (0.16 mM), ascorbic acid (0.06 mM) and different concentrations of the extract was incubated for 1hr at 37 °C and the resulting

thiobarbituric reacting substance (TBARS) was measured at 532 nm [23].

#### 2.3.2. $\beta$ -carotene/linoleic acid bleaching assay

The antioxidant activity was evaluated using the  $\beta$ -carotene-linoleic acid model system [24]. BHA and trolox were used as standards. Antioxidant activities (inhibition percentage) of the samples were calculated using the following equation: Inhibition % = (Absorbance of  $\beta$ -carotene at 120 min /Initial absorbance of  $\beta$ -carotene)  $\times$  100.

#### 2.3.3. Peroxidation inhibition of linoilic acid ferric thiocyanate assay

The peroxy radical scavenging activity was determined by thiocyanate method [25]. BHA and trolox were used as standards. Antioxidant activities (inhibition percentage) of the samples were calculated using the following equation: Inhibition % = (Absorbance at 72 hr-initial absorbance/Absorbance at 72 hr)  $\times$  100

### 2.4. Antidiabetic studies

#### 2.4.1. $\alpha$ -amylase inhibitory activity

$\alpha$ -amylase inhibitory activity of extract was carried out according to the method of [26] with minor modification. The absorbance was read at 580 nm and the percentage inhibition was calculated using the equation: inhibition of enzyme activity was calculated as follows: Inhibitory effect (%) = (Absorbance of control – Absorbance of sample) / Absorbance of control  $\times$  100.

#### 2.4.2. $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity

The  $\alpha$ -glucosidase inhibitory assay was performed by applying the literature procedure with minor modifications according to Matsuura et al. [27]. Absorbance of the resulting *p*-nitro phenol (pNP) was determined at 405 nm using spectrophotometer and was considered directly proportional to the activity of the enzyme acarbose was used as a positive control. Inhibitory effect (%) = (Absorbance of control – Absorbance of sample)/Absorbance of control  $\times$  100.

#### 2.4.3. Anti-glycation (anti-AGE) Activity

##### 2.4.3.1. In-vitro BSA-glucose assay

The anti-AGE of BETA, metformin and aminoguanidine were performed by using BSA-glucose assay [27]. After the incubation for 7 days at 37 °C in dark, the samples were measured at fluorescence intensity (excitation wave length of 370 nm and emission wave length of 440 nm) using Omega micro plate reader. The percent inhibition was calculated by using equation: AGE inhibition = [(F<sub>0</sub>-F<sub>t</sub>)/F<sub>0</sub>  $\times$  100], where F<sub>t</sub> and F<sub>0</sub> represent the fluorescence intensity of the sample and the control mixtures, respectively.

##### 2.4.3.2. In-vitro BSA-methylglyoxal (MGO) model

The BSA- MGO reaction mixture was incubated at 37 °C for 7 days, aminoguanidine an inhibitor of glycation of proteins was used as a positive control the fluorescence intensity of the samples was measured at an excitation wavelength of 370 nm and an emission

wavelength of 440 nm, using an Omega microplate reader [28]. The percentage of inhibition was calculated by using the above formula.

##### 2.4.3.3. Anti-hemoglobin glycation

Glycation of hemoglobin was performed according to the methodology described by Gutierrez et al. [29] and Liu et al [30]. The concentrations of glycated hemoglobin were measured after the incubation period of 72 hr at a wavelength of 443 nm. The test the inhibition of glycated hemoglobin was calculated using above equation.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Microsoft Office Excel 2016. All the results were expressed as mean value  $\pm$  SD of three measurements. IC<sub>50</sub>-value ( $\mu$ g/mL) is the effective concentration, which proves 50 % of activity, was calculated for each assay. Significant differences between means were determined by Student's t-test, differences between groups were carried out by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. p values <0.05 were considered as significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Polyphenol and flavonoid contents

**Table 1**

Polyphenol and flavonoid contents of BETA extract

Extract	TPC ( $\mu$ g GAE/mg extract)*	TFC ( $\mu$ g QE/ mg extract)**
BETA	299.48 $\pm$ 1.38	168.17 $\pm$ 0.80

Results are expressed as means  $\pm$  SD deviation of three measures.

\*Total phenolic is expressed as  $\mu$ g Gallic acid equivalents/mg of extract; \*\*Total flavonoids are expressed as  $\mu$ g Quercetin equivalents/ mg of extract.

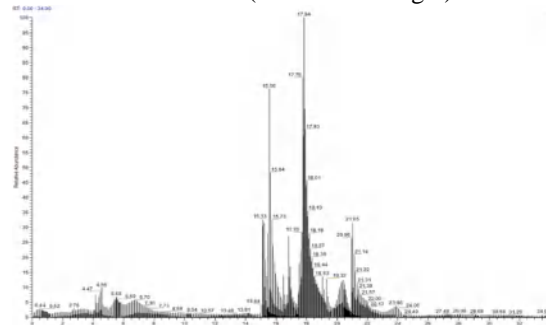
*T. algeriensis* has been reported for its richness in secondary metabolites particularly flavonoids and phenolic acids [18]. In our present results a high phenolic and flavonoid contents were found in the of *n*-BuOH plant extract of *T. algeriensis* with values of 299.48 $\pm$ 1.38  $\mu$ g GAE/mg extract and 168.17 $\pm$ 0.80  $\mu$ g QE /mg extract. That it seems that they belong to the interval of values reported in the literature between 18.73  $\mu$ g GAE/mg and 318.07  $\pm$  0.88  $\mu$ g GAE /mg [31,32]. Our results are in accordance with the findings obtained from other studies carried out on *T. algeriensis*, for the same fraction. Mokhtari et al. [32] revealed a value of 318.07  $\pm$  0.88  $\mu$ g GAE/mg and 198.17 $\pm$ 0.12  $\mu$ g QE/mg for TPC and TFC values respectively, more or less similar to our results. In addition, Righi et al. [33] reported that the crude hydromethanolic extract of *T. algeriensis* exhibited a TPC of approximately 300  $\mu$ g GAE/mg, consisting of flavonoids (16  $\mu$ g QE/mg). However, Hazzit and Baaliouamer. [14] found that *T. algeriensis* from Algeria showed a chemical polymorphism, even for samples from the same location. From the semi-arid area surrounding Bechar, in the south- west of Algeria,

different results (18.73 mg GAE/g extract) were obtained by the authors [31,34], TPC was detected at 81.5 mg GAE/g of *T. algeriensis*. While at the flowering stage of *T. algeriensis* in the Algerian Saharan Atlas zone (Laghouat region), TPC and TFC values were recorded respectively at 125±1 mg/g extract and 118±1 mg/g of ethanolic extract [20]. Numerous studies conducted have established that *Thymus* species are rich and promising sources of phenolic compounds and flavonoids. The amounts of phenolic and flavonoid compounds in crude extracts can also vary due to environmental factors, cultivation practices, growing locations and storage [35]. It should be mentioned that an increase of the phenolic metabolism in these plants may be related to the hard climate conditions (hot temperature, height solar exposure, dryness, short growing season) [36].

### 3.2. LC-MS analysis

It has been reported that *Thymus* species showed a great variability in the contents of the phenolic compounds [37]. Several phytochemical studies were performed on *Thymus algeriensis*, differences among phenolic compounds levels can be related to environmental conditions [20]. Many factors can be responsible for this variability in the chemical

composition of thyme extracts. The most important are the climate, the soil, the harvest period and the method of preservation and extraction [19,38]. The chemical compositions of this species of thyme found in the literature relating to different countries (Libya, Algeria, Tunisia and Morocco) are characterized by different chemotypes and a great variability [39]. In our results, the LC-MS profile of the *n*-BuOH fraction of the *T. algeriensis* (BETA) is illustrated in Fig.1. Several compounds were detected; only eleven phenolic compounds were identified in the BETA by comparing their retention times with those of available commercial standards (Table 2 and Fig.1).



**Figure 1** : LC-MS analysis of the phenolic constituents of BETA

**Table 2** : LC-MS of phenolic compounds from BETA

N°	Name	MS/MS Ions studied				LOD	LOQ	RT	mg phenolic/Kg Extract
		Parent	Product	CE	Polarity				
1	Gallic acid	169.7	80.5 126.2	25 16	- -	0.058	0.091	10.1	<b>102,786</b>
2	Gentisic acid	153.7	109.5	21	-	0.026	0.039	13.87	<b>272,822</b>
3	Chlorogenicacid	353.4	86.5 192.1	43 21	- -	0.051	0.072	14.25	<b>916,221</b>
4	<i>p</i> -Hydroxybenzoicacid	137.9	66.6 94.6	38 17	- -	0.243	0.519	14.64	<b>755,211</b>
5	Cafeicacid	179.7	135.2 136.2	27 18	- -	0.042	0.058	15.26	<b>3404,063</b>
6	<i>p</i> -Cumaricacid	163.9	94.3 120.2	33 17	- -	0.069	0.109	16.97	<b>715,134</b>
7	Rosmarinicacid	359.2	134.3 162.2	44 20	- -	0.029	0.050	17.86	<b>54228,711</b>
8	Ferulicacid	195.4	89.4 177.4	30 7	+ +	0.063	0.118	17.88	<b>59826,860</b>
9	Naringenin	273	147.1 153	20 24	+ +	0.052	0.068	20.46	<b>141,739</b>
10	Quercetin	301	152.1 179.9	23 20	- -	0.141	0.181	20.51	<b>639,517</b>
11	4-OH benzaldehyde	121.9	93.5 121.1	25 20	+ +	0.032	0.059	15.32	<b>29,089</b>

The most abundant molecule was the ferulic acid (59826.860 mg/kg extract), followed by rosmarinic acid (54228.711 mg/kg extract), cafeic acid (3404.063 mg/kg extract), chlorogenic acid (916.221 mg/kg

extract), *p*-hydroxybenzoicacid (755.211 mg/kg extract), *p*-cumaric acid (715.134 mg/kg extract), gentisic acid (272.822 mg/kg extract), gallic acid (102.786 mg/kg extract), 4-OH benzaldehyde (29.089 mg/kg extract) and the flavonoids, naringenin

(141.739 mg/Kg), quercetin (639.517 mg/kg extract). The results obtained by Boutaoui et al. [40] on the same fraction, reported the presence of three 3 common products and other different compounds in which epicatechin had the highest concentration. Rezzoug et al. [20], reported that the ethanolic extract of *T. algeriensis* from the Algerian Saharan Atlas (Laghouat), contains six different compounds, in which epicatechin was also found to be the major compound. The current investigation has shown that the main constituents of *T. algeriensis* are rosmarinic acid and ferulic acid followed by caffeic acid. Our results are in agreement with results obtained from other studies which reported the major constituent of *T. algeriensis* is rosmarinic acid. Mansour et al. [41] revealed that from the methanol extract of the *T. algeriensis* (Ain Dem- AIN Defla" region; Algeria), thirty-five secondary metabolites were characterized phenolic acids, mainly rosmarinic acid and its derivatives, dominated the *T. algeriensis* extract. Righi et al. [33], also revealed the presence of rosmarinic acid in the methnolic extract from flowering *T. algeriensis* (Taglait, Bordj BouArreridj region; Algeria). Mokhtari et al. [32] revealed the presence of ten compounds including rosmarinic acid in the *n*-BuOH extract of *T. algeriensis* (Chelia mountain, Banta; Algeria). The different mentioned results show that the chemical composition of thyme extract can vary depending on the geographic location. In addition, the phenol content of the plant extract depends on various parameters such as genetic and ecological factors, the part of the plant used, the extraction method used and the same age of the plant [18,42]. In agreement with our findings, several studies note that despite the fact that *Thymus* plants are generally known for their richness in rosmarinic acid, the specific phenolic composition of thyme extracts is dependent on several factors [19,38].

### 3.3. LPO inhibitory activity of BETA

**Table 3:** Lipid peroxidation inhibition of BETA extract (IC<sub>50</sub> value: µg/mL).

Extract/ Standard	FeCl <sub>2</sub> / Ascorbate	β-Carotene/ Linoleic acid	Linoleic acid ferric/ thiocyanate
BETA	177.20±2.87	234.71±9.25	201.63±8.97
Trolox <sup>a</sup>	62.06±1.368	64.63±18.42	47.58±8.47
BHA <sup>a</sup>	68.94±12.22	45,77±7.66	38.73±8.7

IC<sub>50</sub> values is defined as the concentration of 50% inhibition percentages and calculated by semi logarithmic regression analysis and expressed as Mean ±SD (n=3).

a: reference compounds, BHA (butylatedhydroxyanisole) and Trolox

#### 3.3.1. LPO inhibition ( Fe<sup>2+</sup>/ascorbic acid system )

Lipid peroxidation is thought to be an important factor in the pathophysiology of a number of diseases [43]. Lipid peroxidation is probably the most extensively investigated free radical-induced process [44]. Table 3 showed that BETA extract reduced

TBARS format ion in a concentration-dependent manner. BETA reduces (63.54±0.90 %) the MDA generated by Fe<sup>3+</sup>/ascorbate at a concentration 400 µg/mL with an IC<sub>50</sub> value: 177.20±2.87 µg/mL. This effect was comparable to the two standard references trolox and BHA which achieved 80.65±1.55 %; and 83.09±0.74 % respectively only at 200 µg/mL, with an IC<sub>50</sub>: 62.06±1.368 µg/mL and 68.94±12.22 µg/mL values respectively.

#### 3.3.2. β-Carotene/linoleic acid bleaching inhibition of BETA

The oxidation of linoleic acid produces hydroperoxides derived free radicals that attack the chromophore of β-carotene resulting in bleaching of the reaction emulsion [24]. Table 3 showed that there was a decrease in absorbance value due to the oxidation of β-carotene at 400 µg/mL, the *n*-BuOH exhibited high antioxidant activity (76.81±1.60 %; IC<sub>50</sub>: 234.71±9.25 µg/mL) as compared to standards substances BHA and trolox (93.36±0.11 %; IC<sub>50</sub>: 45.77±7.66 µg/mL and 84.43±1.19 %; IC<sub>50</sub>: 64.63±18.42 µg/mL) respectively. The presence of varying amount of antioxidant compounds in BETA can hinder the extent of β-carotene bleaching by neutralizing the linoleate free radicals and other free radicals formed in the system [45].

#### 3.3.3. Peroxidation inhibition of linoleic acid ferric thiocyanate assay

In this system, the ferrous ion is oxidized by linoleate radicals such as hydroperoxides to form the ferric ion which is monitored as a thiocyanate complex at 500 nm. The antioxidant compounds in the plant extract prevent oxidation of ferrous ion inhibiting the linoleate radicals in system [25]. The oxidation of linoleic acid was effectively inhibited by BETA. The BETA showed high antioxidant activity with 75.27±0.81 % at 400 µg/mL with IC<sub>50</sub>: 201.63±8.97 µg/mL; by inhibiting the formation of ferric ion. This inhibition was clearly compared to the two standard references trolox and BHA (83.55±0.46 %; IC<sub>50</sub>: 47,58±8,47 µg/mL and 87.44±0,82 %; IC<sub>50</sub>: 38.73±8.7 µg/mL) respectively. According to our finding, the beneficial effect of BETA may be attributed to the presence of high amounts of polyphenols. Our phytochemical studies on BETA revealed its richness in polyphenols such as ferulic acid, rosmarinic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and quercetin mentioned in our work have been revealed antioxidant agents [46]. Our antioxidant findings are in good agreement with several studies in the literature, which show that *Thymus* species are candidate as potential antioxidant agents, their richness in rosmarinic acid and its derivatives have been previously reported for their antioxidant properties [47]. This potentiality could be attributed to its unsaturated double bound and the presence of dihydroxyphenol or catechol structure that



facilitates the delocalization of the resulting quinones [48]. The presence of catechol structure in the C11 and C12 position is also an important element in the antioxidant activity of rosmarinic acid. The presence of a carboxylic group in a phenolic acid dimer like rosmarinic acid enhances the antioxidant activity of this compound [47]. Increased oxidative stress is

widely accepted as a participating in the development and progression of diabetes [3].

### 3.4. Antidiabetic activities of BETA

#### 3.4.1. Anti- $\alpha$ -amylase and anti- $\alpha$ -glucosidase activity

**Table 4:** %  $\alpha$ -amylase inhibitory effect and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of BETA

$\alpha$ -Amylase		$\alpha$ -Glucosidase		
Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	BETA	acarbose <sup>a</sup>	BETA	acarbose <sup>a</sup>
50	33.43 $\pm$ 1.14	48.96 $\pm$ 2.75	26.04 $\pm$ 0.69	43.99 $\pm$ 0.90
100	43.23 $\pm$ 1.83	67.21 $\pm$ 3.08	34.33 $\pm$ 2.04	47.91 $\pm$ 1.38
200	61.03 $\pm$ 1.45	86.37 $\pm$ 4.75	45.65 $\pm$ 0.69	64.35 $\pm$ 1.20
400	66.16 $\pm$ 1.81	92.70 $\pm$ 1.45	60.43 $\pm$ 1.14	88.18 $\pm$ 5.77
600	76.57 $\pm$ 0.45	93.46 $\pm$ 0.94	64.80 $\pm$ 1.20	90.89 $\pm$ 0.69
IC <sub>50</sub>	132.53 $\pm$ 5.24	41.64 $\pm$ 4.94	237.79 $\pm$ 15.20	85.24 $\pm$ 6.69

IC<sub>50</sub> values is defined as the concentration of 50% inhibition percentages, expressed as Mean $\pm$ SD (n=3). a : reference compounds.

The inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities is one of the primary approaches to manage hyperglycemic conditions of T2D patients [49]. According to current opinions, it is believed that inhibitory effects against the two key enzymes, namely  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, may from the present results, BETA effectively inhibits the action of both  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzyme in a concentration dependent manner. The percentage inhibition of the two enzymes varied from 33.43 $\pm$ 1.14 % to 76.57 $\pm$ 0.45 % and from 26.04 $\pm$ 0.69 % to 64.80 $\pm$ 1.20 % respectively at a concentration ranging from 50 to 600  $\mu\text{g/mL}$  compared to acarbose (from 43.99 $\pm$ 0.90 % to 90.89 $\pm$ 0.69 %) in the same range of concentration. The IC<sub>50</sub> values of BETA for  $\alpha$ -amylase and for the enzyme  $\alpha$ -glucosidase inhibition were respectively (132.53 $\pm$ 10.24  $\mu\text{g/mL}$  and 237.79 $\pm$ 15.20  $\mu\text{g/mL}$ ) comparable to that of acarbose (IC<sub>50</sub>: 41.64 $\pm$ 4.94  $\mu\text{g/mL}$  and 85.24 $\pm$ 1.69  $\mu\text{g/mL}$ ) respectively (Table 4). Acarbose is widely used in the treatment of patients with type 2 diabetes via inhibiting the upper gastrointestinal glucosidases that convert complex polysaccharides into monosaccharides [51]. Dietary polyphenols, in addition to their antioxidant, have been reported to exert anti-hyperglycemic by binding to glucose transporters [52] and competitively inhibiting digestive enzymes [53]. In the present study, the polyphenol-rich BETA extract showed high inhibitory effects against both  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase (Table 4), revealing that it could implement a potential anti-diabetes function by inhibiting the two enzymes. In addition, many herbs rich in phenolic compounds have been reported to exhibit strong interaction with proteins and can inhibit their enzymatic activities by forming complexes and

changing conformation [26]. This inhibitory activity of the *T. algeriensis* extract could be due to the presence of several phytochemicals such as rosmarinic acid [54-56]. Many flavonoids, such as rutin, myricetin, kaempferol and quercetin, have been previously reported to inhibit  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase, these flavonoids exhibit both hypoglycemic and antioxidant effects in diabetic [57]. Collectively, our findings based on the refined and their roles could be directly associated with their specific structural characteristics, such as the position and number of hydroxyls and the number of double bonds on aromatic rings A and B as well as the heterocyclic ring C [58].

#### 3.4.2. Anti-glycation activity of BETA

<b>Table 5</b> Anti-aglycation of BETA extract (IC <sub>50</sub> value : $\mu\text{g/mL}$ ).			
Extract/Satandards	BSA-glucose	BSA-MGO	Hb-glycation
BETA	284.9 $\pm$ 19.53	203.65 $\pm$ 5.7	254.35 $\pm$ 12.43
Aminoguanidine <sup>a</sup>	75.72 $\pm$ 7.12	70.16 $\pm$ 2.72	190.15 $\pm$ 9.26
Metformine <sup>a</sup>	111.18 $\pm$ 7.71	76.20 $\pm$ 3.83	154.72 $\pm$ 6.48
IC <sub>50</sub> values is defined as the concentration of 50% inhibition percentages, expressed as Mean $\pm$ SD (n=3). a: reference compounds.			

Formation of AGEs that leads to the glycation reaction of proteins is a hallmark of long-standing hyperglycemia [59]. It has been revealed that AGEs play key role in the development of diabetic complications [60]. Despite glycation inhibitors; metformin and aminoguanidine; which inhibit the crosslinking of AGE-BSA in glucose- BSA or free methylglyoxal scavenger respectively, they have been limited, due to their cytotoxicity, or because they are not effective enough to inhibit the glycation process in chronic hyperglycemia and other side effects [7].

Thus, there is an urgent demand for new and non-toxic agent. In the present study, the inhibitory activity of BETA on the AGE was evaluated using glucose-BSA and MGO-BSA glycation protein and Hb glycation model. Table 5 showed that BETA proved dose dependent antiglycation activity when used glucose-BSA glycation model. At 600  $\mu\text{g/mL}$ , BETA exhibited ( $75.56 \pm 2.04$  %) inhibition of glucose-BSA glycation with an  $\text{IC}_{50}$ :  $284.9 \pm 19.53$   $\mu\text{g/mL}$ . The two standard drugs, metformin and aminoguanidine, revealed ( $80.98 \pm 2.30$  %;  $85.178 \pm 3.56$  %) inhibition of AGEs only at 300  $\mu\text{g/mL}$  with  $\text{IC}_{50}$ :  $111.18 \pm 7.71$   $\mu\text{g/mL}$  and  $75.72 \pm 7.12$   $\mu\text{g/mL}$  respectively. 3-methylglyoxal (MGO) is considered to be one of the most reactive precursors of AGEs and is the reactive capable of causing dicarbonyl stress, influencing normal physiological functions [61]. In our study, BETA also had an inhibitory effect on AGEs' formation when tested on MGO-BSA glycation at 600  $\mu\text{g/mL}$  ( $76.8 \pm 0.48$  %;  $\text{IC}_{50}$ :  $203.65 \pm 0.70$   $\mu\text{g/mL}$ ). Inhibition of MGO-BSA glycation for metformin and aminoguanidine were found to be  $84.71 \pm 2.41$  %;  $\text{IC}_{50}$ :  $76.20 \pm 3.83$  % and  $88.71 \pm 2.41$  %;  $\text{IC}_{50}$ :  $70.16 \pm 2.72$   $\mu\text{g/mL}$  respectively. Autoxidation and disruption of the electron transport chain protein glycation is a key molecular basis of diabetic complications resulting from chronic hyperglycemia [61]. It is believed that the formation of AGEs over a prolonged period *in vivo* especially affects long-lived proteins such as hemoglobin, hemoglobin A1c, a well-known non-enzymatic glycation product. Hemoglobin A1c is a clinical index for diabetes mellitus, where in the N-terminal amino group of valine is glycosylated [30]. BETA succeeded in restricting hemoglobin glycation upon exposure to 2 % glucose over a 72 hours period and was able to reach  $77.82 \pm 2.36$  % at 600  $\mu\text{g/mL}$  with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $254.35 \pm 2.43$   $\mu\text{g/mL}$ , compared to metformin and aminoguanidine ( $90.30 \pm 1.39$  %;  $\text{IC}_{50}$ :  $154.72 \pm 6.48$   $\mu\text{g/mL}$  and  $87.27 \pm 2.91$  %;  $\text{IC}_{50}$ :  $190.15 \pm 3.26$   $\mu\text{g/mL}$ ) respectively (Table 5). It has been reported that the early stage of the Maillard reaction is accompanied by the production of a large amount of free radicals [27,62]. Therefore, we considered the anti-lipid peroxidation and free radical scavenging which has been demonstrated by BETA may have an effective effect on reducing AGEs at the early stage of glycation. Interestingly, the anti-AGE effect of BETA could be due to its richness in polyphenols identified by LC/MS analysis. The most abundant and potent agents reported were ferulic acid and rosmarinic acid, followed by caffeic acid and chlorogenic acid. The possible synergistic interactions of these phenolic compounds have shown antioxidant properties, which may be beneficial for the anti-AGE effect [63]. Ferulic acid and chlorogenic acid have been reported to all significantly inhibit glucose-mediated protein modification [64], and all can significantly inhibit glucose-mediated protein

modification [65]. Caffeic and chlorogenic have been reported to be the major inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins [58] and could inhibit AGE production and the subsequent crosslinking of proteins activity [66,67]. Quercetin was shown to be effective at the late stage of protein glycation in the BSA-glucose model and significantly reduced the production of Amadori hemoglobin. HbA1c, at the start of the glycation phase [48] Aminoguanidine, an AGE inhibitor, has been found to be able to inhibit AGE production by scavenging MG and ethanedial [57]. The basic structure of phenolic acid has many hydroxyl groups; therefore, it may have excellent antiglycative and MG trapping functions when a benzene ring has one to two OH groups. The compound 2,4,6-trihydroxybenzoic acid compound is believed to have good MG scavenging structure [64]. LC/MS analysis revealed that BETA possesses several antioxidants such as phenols and flavonoids, which have been suggested to inhibit the formation of AGEs, these properties, have been attributed to the structure of these compounds.

#### 4. Conclusion

Based on these findings; it can be concluded that BETA exhibited a good inhibition of lipid peroxidation on different *in vitro* models ( $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbic acid system;  $\beta$ -carotene-linoleic acid model system and linoleic acid ferric thiocyanate assay). The effectiveness of BETA in combating diabetics was clarified on several *in vitro* studies ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity, anti-AGE activity (MGO-BSA; MGO-BSA; hemoglobin glycosylated). The antidiabetic activities of BETA could be due to its richness in polyphenols identified by LC/MS analysis, mainly the potent agents, ferulic acid, rosmarinic acid, caffeic acid. Synergistic interactions between all their compounds; can qualify BETA as an effective agent against diabetic complications linked to oxidative stress. In addition, these effects need to be confirmed using *in vivo* models for its effective use as therapeutic agents.

#### 5. Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### 6. Disclosure statement and author contributions

Soud Ameddah designed and supervised the study; Zaoui Heyem performed all experiments, wrote the manuscript; Nassima Boutaoui involved in the phytochemical studies under the supervision of Lahcene Zaiter; Benayache Fadila; and Benayache Samir, Ahmed Menad performed the data analysis, and Erenler Ramazan was involved in LC MS analysis. All co-authors approve the current version of the manuscript.

## 7. Acknowledgments

We thank Algerian government for financial support

## 8. References

- [1] Gahlan AA, Derayea SM, Omar MA, Saleh GA, Haredy AM. Square Wave Anodic Voltammetric Determination of Antidiabetic Drug Linagliptin in The Dosage Form and Biological Fluids by Microparticles Copper Pencil Graphite Electrode. *Egypt.J.Chem.* 2021;64:3121-3130. doi: 10.21608/EJCHEM.2021.48845.2999
- [2] Wild SG, Roglic A, Green R, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimated for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 5:1047–1053
- [3] Kang MH, Lee MS, Choi MK, Min KS, Shibamoto T. Hypoglycemic activity of gymnema sylvestre extracts on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60: 2517-2524. doi: 10.1021/jf205086b
- [4] Dastagir G, Rizvi MA. Review - Glycyrrhiza glabra L. (Liquorice). *Pak J Pharm Sci.* 2016;29: 1727-1733. PMID: 27731836.
- [5] Deore AB, Sapakal VD, Naikwade NS. Role of oxidative stress in pathogenesis of diabetes and its complications. *Pharmacologyonline.* 2011;2 : 603-621. <https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2011/vol3/015.deore.pdf>
- [6] Van de Laar FA. A-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4: 1189-1195. doi.org/10.2147/vhrm.s3119.
- [7] Afify M, Samy N, Hafez NA, Alazzouni AS, Mahdy ES, El Mezayen HAEM, Kelany MM. Evaluation of zinc-oxide nanoparticles effect on treatment of diabetes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Egypt.J.Chem.* 2019;62:1771-1783. doi: 10.21608/ejchem.2019.11350.1735
- [8] Raz I, Eldor R. Rational therapy for diabetes: early recognition of adverse effects and avoidance of disruptive false alarms. *Diabetes/Metab Res.* 2012;28: 321-324. doi.org/10.1002/dmrr.2265.
- [9] Ahn J, Alford AR, Niemeyer ED. Variation in Phenolic Profiles and Antioxidant Properties among Medicinal and Culinary Herbs of the Lamiaceae Family. *J. Food Meas. Charact.* 2020;14: 1720-1732. doi.org/10.1007/s11694-020-00420-5.
- [10] Chelalba I, Benchikha N, Begaa S, Messaoudi M, Debbeche H, Rebiai A, Youssef FS. Phytochemical composition and biological activity of *Neurada procumbens* L. growing in southern Algeria. *J. Food Process Preserv.* 2020;44: e14774. doi.org/10.1111/jfpp.14774.
- [11] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Int. J. Aromather.* 2006;16: 95-100. doi.org/10.1016/j.ijat.2006.04.003
- [12] Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. Volatiles from *Thymbra* and *Thymus* species of the western Mediterranean basin, Portugal and Macaronesia. *Nat Prod Commun.* 2010;5(ç): 1465-1476. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1000500924>
- [13] Quezel P, Santa S. New flora of Algeria and southern desert regions. *CNRS.* 1963;2: 559-565. [https://bibliotheques.mnhn.fr/medias/detailstatisc.aspx?INSTANCE=exploitation&RSC\\_BAS E=HORIZON&RSC\\_DOCID=493163](https://bibliotheques.mnhn.fr/medias/detailstatisc.aspx?INSTANCE=exploitation&RSC_BAS E=HORIZON&RSC_DOCID=493163)
- [14] Hazzit M, Baaliouamer A. Essential oil composition of *Thymus algeriensis* Boiss. ET Reut. and *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Rivista Italiana EPPOS.* 2007;43: 11-18.
- [15] Jayari A, El Abed N, Jouini A, Wahab OMSA, Maaroufi A, Ahmed SBH. Antibacterial activity of *Thymus capitatus* and *Thymus algeriensis* essential oils against four food-borne pathogens inoculated in minced beef meat. *J. Food Saf.* 2018;38: 1-10. doi.org/10.1111/jfs.12409.
- [16] Ziani BE, Heleno SA, Bachari K, Dias MI, Alves MJ, Barros L, Ferreira IC. Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne. *Food Res Int.* 2019;116: 312-319. doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.041.
- [17] Nikolic M, Glamoclija J, Ferreira ICFR, Calhella RC, Fernandes Â, Markovic T, Sokovic M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Ind Crops Prod.* 2014;52. doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.006
- [18] Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, Chaouch A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. from Morocco. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010;14: 141-148.



- [19] Echeverrigaray S, Agostini G, Atti-Serfini L, Paroul N, Pauletti GF, dos Santos AC. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49: 4220-4223. doi.org/10.1021/jf010289j.
- [20] Rezzoug M, Bakchiche B, Gherib A, Roberta A, Kiliñarslan F, Kiliñarslan Ö, Mammadov R, Bardaweel SK. Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oils and Ethanolic Extracts of *Ocimum Basilicum* L. And *Thymus Algeriensis* Boiss. & Reut From the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complement. Altern Med.* 2019;146: 19. doi.org/10.1186/s12906-019-2556-y.
- [21] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 1999;299: 152-178. doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- [22] Ordonez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechiumedule* (Jacq.) Swart extracts. *Food Chem.* 2006;97: 452-458. doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.024.
- [23] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95: 351-358. doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- [24] Miraliakbari H, Shahidi F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem.* 2008;111: 421-427. doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.008.
- [25] Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* Leaves. *Agric Biol Chem.* 1981;45: 735-739. doi.org/10.1080/00021369.1981.10864583.
- [26] Liu S, Li D, Huang B, Chen Y, Lu X, Wang Y. Inhibition of pancreatic lipase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbonucifera* leaves. *J Ethnopharmacol.* 2013;149: 263-269. doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.034.
- [27] Matsuura N, Aradate T, Sasaki C, Kojima H, Ohara M, et al. Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts. *J Health Sci.* 2002;48: 520-526. doi.org/10.1248/jhs.48.520.
- [28] Peng X, Chang KW, Ma J, Chen B, Ho CT, Lo C, Chen F, Wang M. Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation products. *J Agric Food Chem.* 2008;56: 1907-1911. DOI: 10.1021/jf073065
- [29] Gutierrez RMP, Cotera LBF, Gonzalez AMN. Evaluation of the Antioxidant and Antiglication Effects of the Hexane Extract from *Piper auritum* Leaves in Vitro and Beneficial Activity on Oxidative Stress and Advanced Glycation End-Product-Mediated Renal Injury in Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *Molecules.* 2012;17: 11897-11919. doi.org/10.3390/molecules171011897
- [30] Liu H, Wang W, Khoo C, Taylor J, Gu L. Cranberry phytochemicals inhibit glycation of human hemoglobin and serum albumin by scavenging carbonyls. *Food Funct.* 2011;2: 475-482. doi.org/10.1039/C1FO10087D.
- [31] Bakchiche B, Gherib A, Aazza S, Gago C, Miguel M. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind Crops Prod.* 2013;46: 85-96. doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.020.
- [32] Mokhtari M, Chabani S, Mouffouk S, Aberkane MC, Dibi A, Benkhaled M, Haba H. Phytochemicals, Antihemolytic, Anti-inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Activities from *Thymus Algeriensis*. *J. Herbs Spices Med. Plants.* 2021;27: 1-14. doi.org/10.1080/10496475.2021.1891174.
- [33] Righi N, Boumerfeg S, Fernandes PAR, Daghima A, Baali F, Coelho E, Cardoso SM, Coimbra MA, Baghiani A. *Thymus algeriensis* Bioss & Reut: Relationship of phenolic compounds composition with in vitro/in vivo antioxidant and antibacterial activity. *Food Res. Int.* 2020;136: 109500. doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109500
- [34] Abid M, Yaich H, Cheikhrouhou S, Khemakhem I, Bouaziz M, Attia H, Ayadi MA. Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *J. Food Sci. Technol.* 2017;54: 2890-2901. doi.org/10.1007/s13197-017-2727-0
- [35] Akula R, Ravishankar GA. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signal Behav.* 2011;6: 1720-1731. doi.org/10.4161/psb.6.11.17613.
- [36] Guesmi F, Ben Farhat M, Mejri M, Landoulsi A. In vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtus* sp. *algeriensis*. *Lipids Health Dis.* 2014;13: 1-12. doi.org/10.1186/1476-511x-13-114
- [37] Li X, He T, Wang X, Shen M, Yan X, Fan S, She G. Traditional Uses, Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Thymus*. *Chem. Biodivers.* 2019;16: 9. doi.org/10.1002/cbdv.201900254.
- [38] Jaafari A, Mouse H, Rakib E, Ait M'barek L, Tilaoui M, Benbakhta C, Boulli A, Abbad A,

- Zyad A. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2007;17: 477-491. doi.org/10.1590/S0102-695X2007000400002
- [39] Lamiri A, Lhaloui S, Benjilali B, Berrada M. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.* 2001;71: 9-15. doi.org/10.1016/S03784290(01)00139-3.
- [40] Boutaoui N, Zaiter L, Benayache F, Benayache S, Carradori S, Cesa S, Giusti AM, Campestre C, Menghini L, Innosa D, Locatelli M. Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of Different Extracts from *Thymus algeriensis* Aerial Parts. *Molecules.* 2018;463: 1- 11. doi.org/10.3390/molecules23020463.
- [41] Mansour S, Rezq S, Cheurfa M, Abdelfattah MAO, Rasha Rashied MH, El-Shazl AM, Yasri A, Wink M, Mahmoud MF. *Thymus algeriensis* and *Thymus fontanesii*: Chemical Composition, In Vivo Anti inflammatory, Pain Killing and Antipyretic Activities: A Comprehensive Comparison. *Biomolecules.* 2020;10: 599. doi.org/10.3390/biom10040599.
- [42] Gharibi S, Ebrahim B, Tabatabaei S, Saeidi G. Comparison of Essential Oil Composition, Flavonoid Content and Antioxidant Activity in Eight *Achillea* Species. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 2015;18: 1382-1394. doi.org/10.1080/0972060X.2014.981600
- [43] Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994;344: 721-724. doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92211-x
- [44] Al-Okbi S, Al-Siedy ES. Potential anti-dyslipidemia and hepatoprotection of functional food components represented by tetracosanol and mixture of policosanol in Triton X-100 induced dyslipidemic rats. *Egypt.J.Chem.* 2022;65:11. doi: 10.21608/EJCHEM.2022.121634.5452
- [45] Koleva II, Teris AB, Jozef PH, Linssen AG, Lyuba NE. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Analysis.* 2002;13: 8-17. doi.org/10.1002/pca.611.
- [46] Lu Y, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 2001;75: 197-202. doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00198-4
- [47] Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, del Río JA, Ortuño A, Quirin KW, Gerard D. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. *Agric. Food Chem.* 2003;51: 4247-4253. doi.org/10.1021/jf0300745
- [48] Chen H, Virk MS, Chen F. Phenolic acids inhibit the formation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on their reducing powers and structures. *Int J Food Sc Nutr.* 2016;67: 400-411. doi.org/10.3109/09637486.2016.1166187.
- [49] Dwek R, Butters T, Platt F, et al. Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1: 65-75. doi.org/10.1038/nrd708
- [50] Etxeberria U, de la Garza AL, Campión J, Martínez JA, Milagro FI. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16: 269-297. doi.org/10.1517/14728222.2012.664134.
- [51] Ibrahim FM, Fouad R, El-Hallouty S, Hendawy SF, Omer EA, Mohammed RS. Egyptian *Myrtus communis* L. Essential oil Potential role as in vitro Antioxidant, Cytotoxic and  $\alpha$ -amylase Inhibitor. *Egypt.J.Chem.* 2021;64:3005-3017.
- [52] Tundis R, Loizzo MR, Menichini F. Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update. *Mini Rev Med Chem.* 2010;10: 315-312. doi.org/10.2174/138955710791331007.
- [53] Bischoff H. Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur J Clin Invest.* 1994;24(S3): 3-10. doi.org/10.1111/j.1365-2362.1994.tb02249.x
- [54] Kwon O, Eck P, Chen S, et al. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 2007;21: 366-377. doi :10.1096/fj.06-6620com.
- [55] Umeno A, Horie M, Murotomi K, Nakajima Y, Yoshida Y. Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules.* 2016;21: 708. doi.org/10.3390/molecules21060708.
- [56] Mccue P, Shetty K. Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: A Review. *Crit Rev Food.* 2010;44: 361-367. doi.org/10.1080/10408690490509591.
- [57] Li Z, DU J, Sun H, Mang J, HE J, Wang J, Liu H, Xu Z. Effects of the combination of methylprednisolone with aminoguanidine on functional recovery in rats following spinal cord injury. *Exp. Ther. Med.* 2014;7: 1605-1610. doi.org/10.3892/etm.1613.
- [58] Gugliucci A, Bantos D, Schulze J, Souza M. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors

- of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia*. 2009;339: 344-80. doi.org/10.1016/j.fitote.2009.04.007
- [59] El-Mesallamy A, Hussein S, Hussein AAM, Mahmoud SA, El-Azab KM. Reno-protective effect of methanolic extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni and bioactive phenolic compounds in type-1-diabetes. *Egypt.J.Chem.* 2018;61: 609-615. doi: 10.21608/EJCHEM.2018.3550.1297
- [60] Peppas M, Vlassara H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens)*. 2005;4: 28-37. doi: 10.14310/horm.2002.11140
- [61] Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R, Traldi P. Glyoxal and methyl glyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41: 1166-1173. doi.org/10.1515/CCLM.2003.180.
- [62] Yeh W, Hsia S, Lee W, Wu C. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *J Food Drug Anal.* 2017;25: 84-92. doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.017.
- [63] Rabiei S, Rezaei M, Abasian Z, Khezri M, Nikoo M, Rafieian-kopaei M, Anjomshoaa M. The protective effect of *Liza klunzingeri* protein hydrolysate on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and toxicity in male rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22: 1203-1210. doi.org/10.22038/ijbms.2019.33201.7927.
- [64] Lo CY, Hsiao WT, Chen XY. Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acids. *J Food Sci.* 2011;76: 90-96. doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02067.x.
- [65] Silvan J, Assar S, Srey C, Dolores Del Castillo M, Ames J. Control of the Maillard reaction by ferulic acid. *Food Chem.* 2011;128: 208-213. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.047.
- [66] Chao CY, Mong MC, Chan KC, Yin MC. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54: 388-395. doi.org/10.1002/mnfr.200900087.
- [67] Wu CH, Huang HW, Lin JA, Huang SM, Yen GC. The proglycation effect of caffeic acid leads to the elevation of oxidative stress and inflammation in monocytes, macrophages and vascular endothelial cells. *J Nutr Biochem.* 2011;22: 585-594. doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.05.002.

<b>Année universitaire : 2022/2023</b>	<b>Présentée par : Zaoui heyem</b>
<b>Intitulé</b>  Modulation des altérations physiopathologiques hépatiques et rénales par <i>Thymus algeriensis</i> chez le rat rendu diabétique	
<b>Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat</b>	
<p data-bbox="225 398 355 432"><b>RESUME</b></p> <p data-bbox="129 450 1508 815">Le présent travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique, anti-dyslipidémique ainsi que le rôle limitant des complications majeures, telles que les dysfonctionnements hépatorénaux de la plante <i>Thymus algeriensis</i>. Les études <i>in vitro</i> (utilisant les modèles : DPPH°, l'ABTS°, le pouvoir réducteur, phosphomolybdène) ainsi que l'évaluation de l'activité anti-peroxydation lipidique (blanchissement <math>\beta</math>-carotène/acide linoléique, système Fe<sup>2+</sup>/acide ascorbique et thiocyanate ferrique) ont montré que l'extrait n-BuOH de <i>T. algeriensis</i> (BETA) est associé à une activité antioxydante très intéressante.</p> <p data-bbox="129 833 1508 1198">L'activité antidiabétique a été effectuée <i>in vitro</i>, en mesurant l'activité inhibitrice de l'<math>\alpha</math>-glucosidase et l'<math>\alpha</math>-amylase et l'activité antiglycation (anti-AGE), et <i>in vivo</i>, en utilisant le modèle animal rat-streptozotocine (60 mg/kg). Les rats diabétiques traités par le BETA (200 mg/kg pendant 28 jours) ont manifesté une amélioration significative du poids corporel, une diminution significative de la concentration de glucose dans le sang et des taux de l'HbA1C. Le BETA a amélioré d'une façon significative la fonction rénale (diminution des taux de la créatinine et de l'urée) et la fonction hépatique (diminution des taux des AST et ALT).</p> <p data-bbox="129 1216 1508 1473">Le BETA a également diminué d'une façon significative les taux du MDA et a corrigé les paramètres du statut redox hépatique et rénal (SOD, CAT et le système glutathion, GSH, GPX, GST). Les résultats histologiques ont renforcé les résultats biochimiques en indiquant que le co-traitement avec le BETA a pu améliorer les anomalies structurales hépatiques (stéatose) et rénales (altération glomérulaires et tubulaires) induites par la STZ.</p> <p data-bbox="129 1491 1508 1697">Il ressort de ces résultats que l'extrait n-BuOH de la plante <i>Thymus algeriensis</i>, vu sa richesse qualitative et quantitative en polyphénols confirmée par l'analyse chimique (LC-MS), serait doté d'un effet anti-dyslipidémique, antioxydant, antidiabétique et il pourrait jouer un rôle néphroprotecteur et hépato-protecteur.</p>	
<b>Mots clés :</b> Diabète, Streptozotocine, <i>Thymus algeriensis</i> , Hyperglycémie, Dyslipidémie, Stress oxydant.	
<b>Laboratoire de recherche :</b> Biologie et environnement (LBE)	