



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم

UNIVERSITE ABD ELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE & DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

THESE DE DOCTORAT 3ème Cycle (Doctorat LMD)

Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Nutrition et pathologie

THEME

Impact de *Rhamnus alaternus* sur les perturbations métaboliques et oxydatives induite par le diabète type 2 chez le Rat Wistar

Présentée par : M^{me} REFFAS Anissa Imène

Soutenue le 06/07/2026, devant le jury:

Président : Pr. CHAALEL Abdelmalek

Université Abdelhamid Ibn Badis
Mostaganem

Rapporteur de thèse : Pr. BOUFADI Mokhtaria Yasmina

Université USTHB d'Alger

Examinatrice : Dr. DERAMCHIA Nawel

Université Abdelhamid Ibn Badis
de Mostaganem

Examinatrice : Dr. ZERROUKI Kheira

Université Abdelhamid Ibn Badis
de Mostaganem

Examinatrice: Pr. MEZIANI Samira

Université Djillali Liabés
Sidi Bel Abbés

Année universitaire : 2025-2026

Remerciements

*Au seuil de ce manuscrit, je rends grâce à **Dieu le Tout-Puissant et Miséricordieux**, dont la volonté et la bienveillance m'ont accordé la santé et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce projet de recherche.*

*Ma gratitude s'adresse tout d'abord à ma directrice de thèse, **Madame la Professeure Mokhtaria Yasmina BOUFADI**. Je lui exprime ma profonde reconnaissance pour avoir dirigé ce travail avec une rigueur exemplaire. Son mentorat, sa patience inépuisable et sa disponibilité de chaque instant ont été les piliers de cette aventure intellectuelle. Son expertise scientifique a été une source constante d'inspiration.*

*Je témoigne ma haute considération à **Monsieur le Professeur Abdelmalek CHAALEL**, qui me fait l'insigne honneur de présider ce jury de soutenance.*

*À **Madame la Docteure Nawel DERAMCHIA**, Professeure à l'Université de Mostaganem, pour avoir bien voulu examiner cette thèse et m'honorer de sa présence au sein de ce jury.*

*À **Madame la Docteure Kheira ZERROUKI**, de l'Université de Mostaganem, pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de ce jury de thèse.*

*Je remercie vivement **Madame la Professeure Samira MEZIANI**, de l'Université de Sidi Bel Abbès, pour avoir accepté d'évaluer cet ouvrage et d'y apporter ses précieuses critiques.*

*Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à **Madame la Professeure Soumia KEDDARI**, en sa qualité de **Directrice de mon laboratoire d'affiliation**. Je la remercie pour m'avoir accueillie au sein de sa structure, pour son soutien institutionnel et pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à l'aboutissement de mes recherches.*

*Toute ma reconnaissance va à **Monsieur le Professeur Abdenacer TOU**, Professeur d'Anatomie Pathologique au CHU de Sidi Bel Abbès, pour sa collaboration scientifique majeure lors des analyses histologiques.*

*Mes remerciements s'étendent à **Madame la Professeure Abbassia DEMMOUCHE** pour son soutien et son aide précieuse.*

Enfin, je remercie chaleureusement toutes les personnes qui, par leur aide technique, leurs encouragements ou leur présence, ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse.

Dédicaces

À ma chère famille, mon pilier et mon premier refuge, je dédie ce travail avec une profonde gratitude et une immense reconnaissance pour tout ce qu'elle m'a apporté tout au long de mon parcours.

*À mon père, **REFFAS Mohamed**, je dédie ce travail en témoignage de mon profond respect. Tu as été un modèle de courage, de rigueur et de persévérance. Tes sacrifices, ta patience et ta confiance en moi ont été une source inépuisable de motivation, et un exemple qui m'a toujours guidée.*

*À ma mère, **MAHI Malika**, à qui je dois bien plus que des mots ne peuvent exprimer. Ton amour inconditionnel, tes prières silencieuses et ton soutien constant ont été mon refuge dans les moments difficiles et ma force dans les instants de doute.*

*À ma sœur, **Soulef**, ma confidente et mon soutien précieux. Ta présence a toujours été une force discrète mais essentielle. Ton affection sincère, ton écoute et ton encouragement m'ont permis d'avancer avec plus de sérénité et de confiance. À mon frère, **Houssem**, mon compagnon de vie et mon soutien inestimable. Tu as été bien plus qu'un frère : une source de motivation, de protection et d'encouragement. Ta présence m'a appris la valeur de la solidarité et de la force familiale dans les moments d'épreuve.*

J'adresse également ce travail à la mémoire de mes chers défunts, en particulier mes grands-pères maternel et paternel, ainsi que ma défunte grand-mère maternelle, dont les valeurs et l'amour demeurent à jamais gravés dans mon cœur. Je dédie également ce travail à ma grand-mère paternel, mes oncles et tantes.

*J'adresse également ce travail à la mémoire de mon oncle **MAHI Hocine**, ainsi que son épouse **Aïcha TAÏFFOURI**, et à la regrettée **NOUARI Fatima Zohra**, dont la l'aide précieuse et le soutien sincère ont marqué ce parcours et contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

*Enfin, j'exprime ma profonde reconnaissance et ma gratitude la plus sincère à **Monsieur BENHAMMOU Lakhdar**, ancien directeur de la Direction des Forêts, pour son aide précieuse dans la sélection des sites de récolte.*

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont cru en moi et m'ont encouragée à persévérer, je dédie humblement ce travail.

I.A. REFFAS

Résumé

Le diabète sucré est un trouble métabolique complexe associé au stress oxydatif, à l'inflammation et à une atteinte progressive des organes. L'objectif de ce travail est de déterminer la composition chimique par HPLC/UV et d'évaluer le potentiel antioxydant, antidiabétique, antihyperlipidémique et anti-inflammatoire d'un extrait méthanolique de feuilles de *Rhamnus alaternus* (EMR). Cette étude repose sur une approche pluridisciplinaire combinant des méthodes *in vitro*, *in vivo* (chez les rat Wistar) et *in silico* (docking moléculaire).

L'analyse phytochimique par HPLC/UV a permis d'identifier seize composés phénoliques, principalement des flavonoïdes tels que la quercétine (2.56 mg/g), la rutine (2.13 mg/g) et le kaempférol (1.95 mg/g). L'extrait a révélé des teneurs élevées en composés phénoliques totaux (223.25 mg GAE/g) et en flavonoïdes (92.37 mg QE/g). L'EMR a présenté des propriétés antioxydantes remarquables, marquées par un piégeage efficace du radical DPPH ($CE_{50} = 184.80 \mu\text{g/mL}$) et une forte inhibition de la peroxydation lipidique ($CE_{50} = 29.03 \mu\text{g/mL}$).

In vivo, deux modèles expérimentaux ont été conduits. Dans le premier, l'induction du diabète par injection intrapéritonéale d'alloxane à 200 mg/kg du poids a provoqué une hyperglycémie sévère (4.22 g/L) et un stress oxydatif chez les rats rendus diabétiques. Une thérapie de 90 jours à 200 mg/kg d'EMR a réduit la glycémie de 58 % et normalisé les bio marqueurs hépatiques (ALAT, ASAT, PAL, gamma-GT) et rénaux. Dans le second modèle, consacré à l'activité antihyperlipidémique, l'administration d'un régime hypergras (HFD) a induit une dyslipidémie marquée (Triglycérides : 3.3 g/L ; Cholestérol : 4.34 g/L). Le traitement par l'EMR (200 mg/kg) a permis une amélioration significative de tous les paramètres biochimiques, du stress oxydatif et du statut inflammatoire. Une efficacité très hautement significative ($P < 0.001$) a été constatée chez les rats du groupe G3 (administration simultanée de l'EMR et du régime HFD pendant 30 jours), avec un retour des taux de triglycérides (0.49 g/L) et de cholestérol (1.54 g/L) à des valeurs quasi-identiques au groupe témoin G1.

Sur le plan tissulaire, l'EMR a réduit les taux de malondialdéhyde (MDA) et les médiateurs pro-inflammatoires (TNF-alpha et PGE2), tout en restaurant l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx). Ces effets protecteurs ont été confirmés par les examens histopathologiques des tissus hépatiques, rénaux et pancréatiques pour le premier modelé

expérimentale et les tissus hépatique, rénaux et cardiaque pour le deuxième modèle. Enfin, l'ancrage moléculaire a suggéré de fortes interactions entre les flavonoïdes de l'extrait (rutine et chrysine) et des cibles clés comme l'alpha-glucosidase, la DPP-4 et le PPAR-gamma.

L'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* possède des vertus thérapeutiques majeures, notamment antioxydantes, antidiabétiques, anti hyperlipidémiques et anti-inflammatoires.

Mots clés : *Rhamnus alaternus* ; HPLC/UV ; diabète ; dyslipidémie ; stress oxydatif ; docking moléculaire.

Abstract

Diabetes mellitus is a complex metabolic disorder associated with oxidative stress, inflammation, and progressive organ damage. The objective of this study is to determine the chemical composition using HPLC/UV and to evaluate the antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, and anti-inflammatory potential of a methanolic extract of *Rhamnus alaternus* leaves (EMR). This study is based on a multidisciplinary approach combining *in vitro*, *in vivo* (in Wistar rats), and *in silico* (molecular docking) methods.

Phytochemical analysis by HPLC/UV identified sixteen phenolic compounds, primarily flavonoids such as quercetin (2.56 mg/g), rutin (2.13 mg/g), and kaempferol (1.95 mg/g). The extract was found to contain high levels of total phenolic compounds (223.25 mg GAE/g) and flavonoids (92.37 mg QE/g). The EMR exhibited remarkable antioxidant properties, characterized by effective DPPH radical scavenging ($IC_{50} = 184.80 \mu\text{g/mL}$) and strong inhibition of lipid peroxidation ($IC_{50} = 29.03 \mu\text{g/mL}$).

In vivo, two experimental models were conducted. In the first, diabetes induction via intraperitoneal injection of alloxan at 200 mg/kg body weight caused severe hyperglycemia (4.22 g/L) and oxidative stress in the diabetic rats. A 90-day treatment regimen with 200 mg/kg of EMR reduced blood glucose levels by 58% and normalized liver (ALAT, ASAT, PAL, gamma-GT) and kidney biomarkers.

In the second model, which focused on antihyperlipidemic activity, the administration of a high-fat diet (HFD) induced marked dyslipidemia (triglycerides: 3.3 g/L; cholesterol: 4.34 g/L). Treatment with EMR (200 mg/kg) resulted in a significant improvement in all biochemical parameters, oxidative stress, and inflammatory status. Highly significant efficacy ($P < 0.001$) was observed in rats in-group G3 (simultaneous administration of EMR and the HFD diet for 30 days), with triglyceride (0.49 g/L) and cholesterol (1.54 g/L) levels returning to values nearly identical to those of the G1 control group.

At the tissue level, EMR reduced levels of malondialdehyde (MDA) and pro-inflammatory mediators (TNF-alpha and PGE2), while restoring the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, and GPx). These protective effects were confirmed by histopathological examinations of liver, kidney, and pancreatic tissues in the first experimental model and of liver, kidney, and heart tissues in the second model.

Finally, molecular docking suggested strong interactions between the extract's flavonoids (rutin and chrysin) and key targets such as alpha-glucosidase, DPP-4, and PPAR-gamma. The methanolic extract of *Rhamnus alaternus* leaves possesses significant therapeutic properties, including antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, and anti-inflammatory effects.

Keywords: *Rhamnus alaternus*; HPLC/UV; diabetes; dyslipidemia; oxidative stress; molecular docking.

ملخص

مرض السكري هو اضطراب استقلابي معقد يرتبط بالإجهاد التأكسدي والالتهاب والتلف التدريجي للأعضاء. ويهدف هذا البحث إلى تحديد التركيب الكيميائي باستخدام تقنية HPLC/UV وتقييم الخصائص المضادة للأوكسدة، والمضادة لمرض السكري، والمضادة لفرط شحيمات الدم، والمضادة للالتهاب لمستخلص ميثانولي من أوراق نبات *Rhamnus alaternus* (EMR). تستند هذه الدراسة إلى نهج متعدد التخصصات يجمع بين طرق الاختبار المختبري، والتجارب الحيوية (على فئران ويستار)، والحسابات الحاسوبية (الارتباط الجزيئي).

حدد التحليل الكيميائي النباتي باستخدام تقنية HPLC/UV ستة عشر مركبًا فينوليًا، معظمها من الفلافونويدات مثل الكيرسيتين (2.56 مجم/جم)، والروتين (2.13 مجم/جم)، والكامفيرول (1.95 مجم/جم). وقد تبين أن المستخلص يحتوي على مستويات عالية من المركبات الفينولية الإجمالية (223.25 ملغ/غ GAE و 92.37 ملغ/غ QE). أظهر المستخلص خصائص مضادة للأوكسدة ملحوظة، تتميز بفعالية في إزالة جذور DPPH ($EC_{50} = 184.80$) ميكروغرام/مل و تثبيط قوي لأوكسدة الدهون ($EC_{50} = 29.03$) ميكروغرام/مل.

في التجارب الحيوية، أُجري نموذجان تجريبيان. في النموذج الأول، تسبب تحفيز مرض السكري عن طريق الحقن داخل الصفاق بجرعة 200 ملغ/كجم من وزن الجسم في ارتفاع شديد في نسبة السكر في الدم (4.22 غ/لتر) وإجهاد تأكسدي لدى الفئران المصابة بالسكري. أدى نظام علاجي مدته 90 يومًا بجرعة 200 ملغ/كجم من مستخلص نبات EMR إلى خفض مستويات الجلوكوز في الدم بنسبة 58٪ وإعادة مؤشرات الكبد (ALAT، ASAT، PAL، غاما-GT) والكلية إلى مستوياتها الطبيعية.

في النموذج الثاني، الذي ركز على النشاط المضاد لفرط شحيمات الدم، أدى إعطاء نظام غذائي عالي الدهون (HFD) إلى حدوث خلل ملحوظ في شحيمات الدم (الدهون الثلاثية: 3.3 غ/لتر؛ الكوليسترول: 4.34 غ/لتر). وأسفر العلاج بـ EMR (200 مجم/كجم) عن تحسن ملحوظ في جميع المؤشرات الكيميائية الحيوية، والإجهاد التأكسدي، والحالة الالتهابية. ولوحظت فعالية ذات دلالة إحصائية عالية ($P < 0.001$) في الفئران ضمن المجموعة G3 الإعطاء المتزامن لـ EMR والنظام الغذائي HFD لمدة 30 يومًا، حيث عادت مستويات الدهون الثلاثية (0.49 غ/لتر) والكوليسترول (1.54 غ/لتر) إلى قيم تكاد تكون مطابقة لتلك المسجلة في المجموعة الضابطة G1.

على مستوى الأنسجة، خفضت EMR مستويات المالونديالديهيد (MDA) والوسطاء المؤيدين للالتهاب (TNF- α) و (PGE2)، مع استعادة نشاط الإنزيمات المضادة للأوكسدة (SOD)، CAT، و GPx. تم تأكيد هذه الآثار الوقائية من خلال الفحوصات النسيجية المرضية لأنسجة الكبد والكلية والبنكرياس في النموذج التجريبي الأول، ولأنسجة الكبد والكلية والقلب في النموذج الثاني.

وأخيرًا، أشارت عملية الإرساء الجزيئي إلى وجود تفاعلات قوية بين مركبات الفلافونويد الموجودة في المستخلص (الروتين والكريسيتين) والأهداف الرئيسية مثل ألفا-جلوكوزيداز، و DPP-4، و PPAR- γ ويتمتع المستخلص الميثانولي لأوراق نبات *Rhamnus alaternus* بخصائص علاجية مهمة، بما في ذلك التأثيرات المضادة للأوكسدة، والمضادة لمرض السكري، والمضادة لفرط شحيمات الدم، والمضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: السكري؛ اضطراب شحوم الدم؛ الإجهاد التأكسدي؛ الارتباط الجزيئي؛ *Rhamnus alaternus*؛

HPLC/UV

Liste de publication et communications

Publication internationale :

1. **Imene Anissa REFFAS**, Mokhtaria Yasmina BOUFADI, Faiza MOULAI-HACENE, Soumia KEDDARI, Souheyla MEKRAF, Abdenacer TOU, Abbassia DEMMOUCHE, Hamza MOUSSA, Nouredine NASRALLAH, Walid ELFALLEH, Hamdi BENDIF, Mohamed A.M. ALI, Shakilur RAHMAN, Jie ZHANG, Abdeltif AMRANE, Hichem TAHRAOUI. Exploring the antidiabetic potential of *Rhamnus alaternus*: A combined in vitro, in vivo and in silico approach. **Food Bioscience**. 2026; 14(1): 109010.

Communications scientifiques :

1. **Anissa Imene Reffas**, Mokhtaria Yasmina Boufadi (2023). "Antioxidant potential of methanolic extract of *Rhamnus alaternus* leaves". The 4th national seminar of biology and health. Djilalli Liabes University. 21st October 2023, Sidi Bel Abbes, Algeria.
2. **Anissa Imene Reffas**, Mokhtaria Yasmina Boufadi, Kheira Rebbah (2024). "Exploration de l'effet du *Rhamnus alaternus* sur le diabète type 2 chez les rats Wistar". the 9th International Seminar MGIBR of « BIODIVERSITY : Food Security & Health ». Abou Bekr Belkaid University. 20-21-22 April 2024, Tlemcen , Algeria.

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

Abs C : Absorbance de Contrôle

Abs E : Absorbance d'Echantillon

ACE : Aspect « ciel étoilé »

AII : Absence d'infiltrat inflammatoire

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

ALP : Phosphatase alcaline

ALAT : Alanine aminotransférase

ASAT: Aspartate aminotransférase

CE₅₀ : Concentration Effective Médiane.

Cong V: Congestion vasculaire

DM : Diabetes mellitus

DPPH : Piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EQ : Equivalent Quercétine.

FT : Flavonoïdes Totaux.

GSH-PX : Glutathion peroxydase

HPLC/UV : Chromatographie liquide haute performance avec détection par ultraviolets

II : Infiltrat inflammatoire

L : Litre

MDA : Malondialdehyde

MeOH : Méthanol.

Mg : Milligramme.

mL : Millilitre.

mM : Milimolaire.

mmol : Milimole.

Nec a : Nécrose atrophique

NLT : Tissu hépatique normal

NNT : Tissu rénal normal

NPT : Tissu pancréatique normal

Pan N : Pancréas normal

PGE2 : Prostaglandine E2

pg/mL : Pigogramme par millilitre.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

EMR : Extrait méthanolique de feuilles de *Rhamnus alaternus*

RN : Rein normal

ROS : Radical espèce oxygénée

rpm : Rotation par minute.

RSA : Radical Scavenging Activity.

Rt : Temps de Rétention.

SCL : Stéatose centrolobulaire

SMN : Stéatose micronodulaire

SOD : Superoxyde dismutase

TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

γ -GT : Gamma-glutamyltransférase

μ g : Microgramme.

μ M : Micro-Molaire.

μ UI : Micro-Unité Internationale.

μ m : Micro-mètre.

Liste des figures

Figure 1	Voies métaboliques impliquées dans la production de ROS induite par l'hyperglycémie.	23
Figure 2	Débalancement des antioxydants et des pro-oxydants	26
Figure 3	Origines du stress oxydatif	27
Figure 4	<i>Rhamnus alaternus</i> : (A) : site de collecte ; (B) : feuilles sèches du <i>Rhamnus alaternus</i> ; (C) : Broyage et tamisage	31
Figure 5	Chromatogramme par HPLC/UV d'extrait EMR de <i>Rhamnus alaternus</i> à 290 nm	56
Figure 6	Évaluation du pouvoir anti-radicalaire (RSA%) de l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> vis-à-vis du radical DPPH à différentes concentrations	60
Figure 7	Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique d'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> .	61
Figure 8	Évolution du poids corporel du rat (g) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane..	64
Figure 9	Évolution du taux de la glycémie (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	66
Figure 10	Glycémie (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	67
Figure 11	Teneurs sérique en triglycéride (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane	68
Figure 12	teneur sérique en cholestérol (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	69
Figure 13	Concentration sérique de l'urée (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane	71
Figure 14	Concentration sérique de la créatinine (mg/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	73
Figure 15	Teneur sérique en acide urique (mg/dL) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	74
Figure 16	Teneurs sérique en alanine aminotransférase (ALAT) (UI/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane..	75
Figure 17	Teneurs sérique en aspartate aminotransférase (ASAT) (µl/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane ..	77
Figure 18	Teneurs sérique en phosphatase alcalines (UI/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	78
Figure 19	Teneurs sérique en Gamma-glutamyl transférase (UI/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	80

Figure 20	Albumine (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane..	81
Figure 21	Teneurs sérique en Protéine T (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	82
Figure 22	Teneurs hépatique en Malondialdéhyde (nmol/mL) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane..	83
Figure 23	Teneurs néphrétique en Malondialdéhyde (nmol/mg) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	84
Figure 24	Teneurs hépatique en superoxyde dismutase (U/ cg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	85
Figure 25	Teneurs hépatique en catalase (U/mg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	86
Figure 26	Teneurs hépatique en Glutathion peroxydase (U/g Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	86
Figure 27	Teneurs néphrétique en superoxyde dismutase (U/cg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	87
Figure 28	Teneurs néphrétique en catalase (U/mg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	88
Figure 29	Teneurs néphrétique en Glutathion peroxydase (U/ g Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	88
Figure 30	Teneurs en Prostaglandine E2 (pg/mL) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane).	89
Figure 31	Teneurs hépatique en TNF-Alpha (pg/g) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i> et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane.	90
Figure 32	Coupes histologiques (Gx100) du foie des rats du groupe : (a) : G1 Groupe Témoin ; (b) : G2 200 mg/kg d'alloxane ; (c) : G3 200 mg/kg/jour d'EMR pendant 90 jours ; (d) : G4 200 mg/kg d'alloxane + 200 mg/kg/j d'EMR pendant 30 jours.	92
Figure 33	Coupes histologiques du pancréas (Gx100) des rats du groupe : (a) : G1 Groupe Témoin ; (b) : G2 200 mg/kg d'alloxane ; (c) : G3 200 mg/kg/jour d'EMR pendant 90 jours ; (d) : G4 200 mg/kg d'alloxane + 200 mg/kg/j d'EMR pendant 30 jours.	94
Figure 34	Coupes histologiques des reins (Gx100) des rats du groupe : (a) : G1 Groupe Témoin ; (b) : G2 200 mg/kg d'alloxane ; (c) : G3 200 mg/kg/jour d'EMR pendant 90 jours ; (d) : G4 200 mg/kg d'alloxane + 200 mg/kg/j d'EMR pendant 30 jours.	96
Figure 35	Taux de glycémie (g/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	98

Figure 36	Taux de triglycéride (g/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	100
Figure 37	Concentration de cholestérol (g/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	102
Figure 38	Taux sérique d'urée (g/L) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	103
Figure 39	Concentration de créatinine (mg/L) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	105
Figure 40	Concentration sérique en acide urique (mg/dL) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	106
Figure 41	Taux d'alanine aminotransférase (UI/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	108
Figure 42	Taux d'aspartate aminotransférase (UI/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	109
Figure 43	Concentration sérique en phosphatase alcalines (UI/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	111
Figure 44	Taux de Gamma-glutamyl transférase (UI/L) mesurée chez chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	112
Figure 45	Concentration de protéine T (g/L) mesurée chez chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	113
Figure 46	Taux de malondialdéhyde hépatique (mmol/mg) mesurée chez chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	115
Figure 47	Taux de superoxyde dismutase hépatique (U/cg Hb) mesurée chez chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	116
Figure 48	Taux de catalase hépatique (U/ mg Hb) mesurée chez chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	117
Figure 49	Taux de glutathion peroxydase hépatique (U/ g Hb) mesurée chez chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	117
Figure 50	Taux de Prostaglandine E2 (pg/ mL) mesurée chez chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	119
Figure 51	Taux de TNF- α (pg/g) hépatique mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> ..	120
Figure 52	Coupes histologiques de foie (Gx100) des rats du groupe : a : G1 Groupe Témoin ; b : G2 un régime HFD pendant 30 jours ; c : G3 un régime HFD +	122

200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Figure 53	Coupes histologiques des reins (Gx100) des rats du groupe : a : G1 Groupe Témoin ; b : G2 un régime HFD pendant 30 jours ; c : G3 un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.	124
Figure 54	Coupes histologiques du cœur (Gx100) des rats du groupe : a : G1 Groupe Témoin ; b : G2 un régime HFD pendant 30 jours ; c : G3 un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.	126
Figure 55	Analyse par grappes hiérarchiques des composés phénoliques en fonction de leur affinité de liaison avec l' α -glucosidase, la glucokinase, la DPP-IV et le PPAR γ	129
Figure 56	Interactions de liaison de la rutine avec l' α -glucosidase (a, b) et la DPP-IV (c, d).	130
Figure 57	Interactions de liaison entre la chrysine et la glucokinase (a, b) et interactions de liaison entre la rutine et le PPAR γ (c, d).	131
Figure 58	Interactions de liaison de la quercétine avec l' α -glucosidase (a, b) et la DPP-IV (c,d).	132
Figure 59	Interactions de liaison de la quercétine avec la glucokinase (a, b) et le PPAR γ (c,d).	133

Liste des tableaux

Tableau 1	Composition chimique du <i>Rhamnus alaternus</i>	7
Tableau 2	Composition de l'EMR par <i>HPLC/UV</i> (mg/g).	56
Tableau 3	Teneur en composés phénoliques et CE ₅₀	59
Tableau 4	Symptômes cliniques des rats expérimentaux.	63

Table des matières

« Impact de *Rhamnus alaternus* sur les perturbations métaboliques et oxydatives induite par le diabète type 2 chez le Rat Wistar »

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

الملخص

Liste de publication et communications

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matière

	<u>Introduction</u>	1
	<u>Chapitre I : La phytothérapie et les maladies métaboliques</u>	4
I.	<i>Rhamnus alaternus</i>	4
I.1.	Généralité	4
1.2.	Nomenclature du <i>Rhamnus alaternus</i>	4
I.3.	Description botanique du <i>Rhamnus alaternus</i>	4
I.4.	Classification du <i>Rhamnus alaternus</i> dans le règne végétal	5
I.5.	Répartition géographique	6
I.5.1.	Dans le monde	6
I.5.2.	En Algérie	6
I.6.	Composition chimique	7
I.7.	Utilisation populaire du <i>Rhamnus alaternus</i> en médecine traditionnelle	8
I.8.	Bénéfices thérapeutique du <i>Rhamnus alaternus</i>	9
I.8.1.	Activité antioxydante	9
I.8.2.	Activité antimutagène et antigénotoxique	10
I.8.3.	Activité anti-hyperlipidique	11
I.8.4.	Activité antimicrobienne	11
I.8.5.	Activité hépatoprotective du <i>Rhamnus alaternus</i>	12
I.8.6.	Activité antiprolifératif	13
I.9.	Toxicité de <i>Rhamnus alaternus</i>	14

II.	Diabète, hyperlipidémie et stress oxydatif	15
II .1.	Diabète type 2	15
II.1.1.	Définition	15
II.1.2.	Epidémiologie	16
II.1.3.	Facteurs de risque	17
II.1.4.	Physiopathologie	20
II.1.5.	Prise en charge médicamenteuse du DT2	21
II.1.5.1.	Les agents insulinosécréteurs	21
II.1.5.2.	Les agents sensibilisants à l'insuline	21
II.1.5.3.	Les agents inhibiteurs de l' α -glucosidase	22
II.1.5.4.	Le traitement par insuline	22
II.1.5.5.	Les stratégies thérapeutiques fondées sur l'effet incrétines	22
II.1.5.6	Les agents modulant le système endocannabinoïde	22
II.1.6.	Stress oxydatif dans l'étiologie du diabète de type 2 (DT2)	22
II.1.6.1.	Voie des polyols	24
II.1.6.2.	Formation des produits de glycation avancée (AGEs)	24
II.1.6.3	Activation de la voie de la protéine kinase C (PKC)	25
II.1.6.4	Activation de la voie des hexosamines	25
II .2.	Le stress oxydatif	26
II.2.1.	Définition	26
II.2.2.	Espèces radicalaires libres	26
II.2.3.	Sources du stress oxydatif	27
II.2.4.	Conséquences du stress oxydatif	28
II.2.4.1.	Modifications oxydatives de l'ADN	28
II.2.4.2.	Modifications oxydatives des lipides	28
II.2.4.3.	Modifications oxydatives des protéines	28
II.2.5.	Maladies liées au stress oxydatif	28
II.2.6.	Mécanismes de protection antioxydante	29
II.2.7.	Antioxydants et composés polyphénoliques	29
II.2.8.	Stress Oxydant et Hyperlipidémie	29
II.3.	L'hyperlipidémie	30
II.3.1.	Définition de l'hyperlipidémie	30
II.3.2.	Physiopathologie de l'hyperlipidémie	31
	Chapitre II : Matériel et méthodes	32
	Partie I : Récolte, extraction et identification chimique de <i>Rhamnus alaternus</i> ainsi le choix du matériel animal	32
I.1.	Matière végétale	32
I.2.	Extraction des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> (EMR) et détermination du rendement de <i>Rhamnus alaternus</i>	33
I.3.	Identification chimique de l'extrait méthanolique du <i>R. alaternus</i> par HPLC/UV	33
I.4.	Dosage des composés phénoliques	34
I.4.1.	Dosage des polyphénols totaux (PT)	34
I.4.2.	Dosage des flavonoïdes totaux (FT)	35
I.4.3.	Détermination du potentiel anti-radicalaire par le test au DPPH	35

I.4.4.	Évaluation du potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique	36
I.5.	Analyse statistique	36
I.6.	Animaux et conditions de l'expérience	37
	Partie II : Activité antidiabétique de l'extrait de <i>Rhamnus alaternus</i> chez les rats Wistar	38
II.1.	Protocole de traitement des animaux	38
II.2.	Évaluation du poids corporelle	38
II.3.	Évolution de la glycémie	38
II.4.	Euthanasie, prélèvements sanguins et organiques	39
II.5.	Dosage des marqueurs biochimiques	39
II.5.1.	Marqueurs glycémiques	39
II.5.2.	Marqueurs lipidiques	40
II.5.3.	Dosage des marqueurs rénaux	41
II.5.4.	Dosage des marqueurs hépatiques	42
II.6.	Détermination du statut antioxydant	44
II.7.	Dosage des bio-marqueurs inflammatoires	48
II.8.	L'étude histopathologique	49
II.8.1.	La fixation	49
II.8.2.	La mise en cassette	49
II.8.3.	La déshydratation	50
II.8.4.	La clarification	50
II.8.5.	L'inclusion	50
II.8.6.	La microtomie	50
II.8.7.	Étalement des coupes sur les lames	50
II.8.8.	La coloration	51
II.8.9.	Le montage	51
II.9.	Analyse statistique	51
	Partie III : L'activité anti-hyperlipidémique du <i>Rhamnus alaternus</i> chez les rats Wistar	52
III.1.	Protocole de traitement des animaux	52
III.2.	Évaluations biochimiques, statut antioxydant, marqueurs inflammatoires et études histologiques	53
III.3.	Analyse statistique	53
	Partie IV: Docking moléculaire du <i>Rhamnus alaternus</i> in-silico	54
	Chapitre III : Résultats et discussion	56
	Partie I : La composition chimique de l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> et l'activité antioxydante in vitro	56
I.1.	Détermination du rendement d'extraction	56
I.2.	La composition chimique de l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> par HPLC/UV	56
I.3.	Dosage des polyphénols totaux (PT)	59
I.4.	Dosage des flavonoïdes totaux (FT)	59
I.5.	Détermination du potentiel anti-radicalaire par le test au DPPH	61
I.6.	L'inhibition de la lipoperoxydation	61
	Partie II : Effet antidiabétique du <i>Rhamnus alaternus</i> chez les rats Wistar	64
II.1.	Observations des symptômes cliniques	64

II.2.	Évolution du poids corporel et la glycémie	64
II.3.	Le dosage des marqueurs biochimiques	68
II.4.	La détermination du statut antioxydant	84
II.5.	Détermination du statut inflammatoire	90
II.6.	L'étude histologique	92
	Partie III : L'effet antihyperlipidémique du <i>Rhamnus alaternus</i> chez les rats Wistar	99
III.1.	Dosage des marqueurs biochimiques	99
III.2.	La détermination du statut antioxydant	115
III.3	La détermination des marqueurs inflammatoires	119
III.4.	Etude histologique	122
	Partie IV : le docking moléculaire de l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus in-silico</i>	129
	Conclusion et perspectives	135
	Références bibliographiques	137
	Publication	

Introduction

Le diabète est un problème de santé grave à caractère chronique qui a un impact majeur sur la vie et le bien-être des individus (IDF, 2017), dont la prévalence ne cesse à augmenter dans le monde entier et a atteint des niveaux alarmants (Cho et al., 2018). Selon la Fédération Internationale du Diabète (IDF, 2019), le taux estimé de personnes vivant avec le diabète a augmenté de 10.5 % en 2021 (Sun et al., 2022).

Les raisons de cette augmentation sont complexes : l'incidence croissante du diabète chez les enfants et les jeunes (DuGray et al., 2023), l'augmentation de la prise du poids qui semble plus courante chez les adultes en raison du mode de vie sédentaire (Kerr et al., 2020 ; Lin et al., 2021), les apports alimentaires riches en énergie, les effets intergénérationnels de l'hyperglycémie pendant la grossesse et le vieillissement général de la population mondiale ainsi que les facteurs liés à la génétique (Saeedi et al., 2019)

Le diabète sucré est défini comme un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une perturbation du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides (Khadayat et al., 2020), résultant de défauts dans la sécrétion ou l'action de l'insuline ou les 2 ensemble (ADA, 2014).

Tout comme le diabète sucré, l'hyperlipidémie est une maladie métabolique caractérisée par une augmentation anormale des concentrations plasmatiques de lipides, notamment le cholestérol et les triglycérides. Une hyperlipidémie chronique, notamment induite par un régime riche en lipides, favorise le dépôt lipidique tissulaire et contribue à des altérations cardiovasculaires, hépatiques et rénales (Brandts & Ray, 2023 ; Mitrofanova et al., 2023).

Le diabète comporte plusieurs types, notamment type 1 et type 2. Le type 1 résulte d'une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques entraînant une diminution de l'insuline (Yaribeygi et al., 2019). Le type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline et une réduction de sa réponse biologique (Yaribeygi et al., 2020). Le diabète gestationnel constitue également une autre forme (Saeedi et al., 2019).

Ces troubles entraînent des complications macro et micro vasculaires telles que les événements cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux et une amputation d'une jambe (Bilal et al., 2022). Ils affectent également plusieurs organes, provoquant rétinopathie, néphropathie, neuropathie périphérique et ulcères du pied diabétique (Matoori, 2022), et représentent une cause majeure de mortalité (Akhtar et al., 2016).

Le stress oxydatif joue un rôle central dans l'évolution du diabète (Matough et al., 2012 ; Kanwugu et al., 2022). Il résulte d'un déséquilibre entre systèmes antioxydants et production de radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Mohora et al., 2007). L'augmentation des ERO contribue fortement à la progression du diabète (Kajimoto et al., 2004 ; Bilal et al., 2022).

L'hyperlipidémie chronique est également associée à une augmentation des ERO, entraînant peroxydation lipidique, inflammation et dégradation cellulaire. Le diabète et l'hyperlipidémie partagent ainsi des mécanismes communs impliquant le stress oxydatif et l'inflammation, responsables de lésions tissulaires multiples (Tsimikas & Witztum, 2024 ; Kishi et al., 2024).

Le déficit en insuline réduit l'absorption du glucose (Li et al., 2018) et favorise également la vulnérabilité à l'hyperlipidémie (Attanayake et al., 2018).

Les traitements actuels du diabète reposent sur une approche multi-thérapeutique (Tiwari, 2015), mais restent insuffisants (Hamza et al., 2019). De nombreux antidiabétiques existent avec différents mécanismes d'action (Verma et al., 2018 ; Kaur et al., 2021), mais ils présentent plusieurs effets secondaires (Okur et al., 2018).

Ainsi, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant simultanément le stress oxydatif, l'inflammation et les troubles métaboliques représente une approche prometteuse. Les produits naturels riches en polyphénols et flavonoïdes présentent un intérêt particulier pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et métaboliques.

Les plantes médicinales constituent une alternative thérapeutique importante (Bilal et al., 2022 ; Willcox et al., 2021). Elles agissent notamment par stimulation de la sécrétion d'insuline (Eltayeb Taha et al., 2014), inhibition de l'absorption du glucose (Bashary et al., 2020), modulation des enzymes digestives et réduction de la néoglucogenèse (Dirir et al., 2021).

Les extraits végétaux sont riches en antioxydants naturels et représentent une source potentielle d'agents antidiabétiques (Attanayake et al., 2018). Plusieurs composés tels que flavonoïdes, polyphénols, terpénoïdes, alcaloïdes, glycosides et coumarines participent à la régulation du métabolisme glucidique (Assadi et al., 2021).

Rhamnus alaternus L. (Rhamnacées), communément appelé nerprun, possède de nombreuses propriétés biologiques (Nekkaa et al., 2021). Ses feuilles et branches sont traditionnellement utilisées contre l'hypertension, l'hépatite et divers troubles digestifs (Zeouk et Bakheti, 2020).

En Afrique du Nord, il est également utilisé pour traiter le diabète et les affections dermatologiques (Nekkaa et al., 2021). Il possède des activités hépato protectrices (Benchihha et al., 2017), anti-hyperlipidémiques (Tacherfiout et al., 2018), antioxydantes et antiprolifératives (Kherbachi et al., 2022).

Ses extraits contiennent des anthraquinones et polyphénols responsables de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Kosalec et al., 2013). Les feuilles sont riches en flavonoïdes, tanins et anthocyanes, expliquant leurs effets biologiques (Gadouche et al., 2022).

La présente étude vise à identifier la composition chimique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, à évaluer ses activités antioxydantes in vitro ainsi que ses effets antidiabétiques et anti-hyperlipidémiques in vivo chez des rats Wistar, dans des modèles expérimentaux induits par alloxane et régime hypergras (HFD). Elle inclut également une analyse in silico des interactions moléculaires.

Chapitre I : La phytothérapie et les maladies métaboliques

I. *Rhamnus alaternus*

I.1. Généralité

Rhamnus alaternus est un arbuste ou un arbre méditerranéen indigène qui appartient à la famille des *Rhamnaceae* (Tsahar et al., 2002; Benzaid et al., 2021), l'une des anciennes familles cosmopolites (A. L. de Jessieu 1789) de plante utilisées en médecine traditionnelle, en préparation culinaire (Quézel et Santa, 1963 ; Saha et Ahmad, 2024) hiérarchiser en 11 tribus repartis en trois sous-familles: les *Ziziphoides* les *Rhamnoides* et les *Ampelozizyphoides* et en un environ 900 espèces classé en 55 genres (Spichiger, 2004)

Les *Rhamnaceae* sont des herbacées généralement épineuses, soutenues par des branches axillaires parfois à nodules symbiotiques abritant des bactéries fixatrices d'azotes, avec une fonction chlorophyllienne transférée aux tiges et des feuilles alternes ou rarement palmées, à réseau tertiaire souvent grillagé et en relief (Quézel et Santa, 1963 ; Judd et al., 2002).

I.2. Nomenclature du *Rhamnus alaternus*

Le mot *Rhamnus* signifie « une sorte de plante épineuse » en grec et « le nerf de la guerre ou l'épine du Christ » en latin (Quattrocchi, 2012).

Nom vernaculaire arabe : Aoued elkheir, Am'lile'ce ,M'lila, Soitfaïr, Safir ou bien Qaced

Nom targui ou berbère : Amliles (Debeaux, 1984 ; Bhourri et al., 2012) , Ajroudj, Khalis n'imidekh (Beloued, 2005). N'chem dans la région de l'Edough .

En anglais : Buckthorn. En Français : Nerprun (Gubb et Alfred, 1913)

I.3. Description botanique du *Rhamnus alaternus*

Le *Rhamnus alaternus* (Le Nerprun) est un arbuste méditerranée autochtone, coriaces, à reproduction dioïque pouvant atteindre une hauteur de 2 à 6 mètres (Tsahar et al., 2002) , à rameaux alternes, non épineux, glabres (Battandier et al., 1988) , doté de feuilles épaisses avec une nervure médiane marquée, et des nervures trinervées à la base. Ses stipules sont linéaires et caduques. Il possède des grappes axillaires, plus longues que le pétiole, et ses fleurs sont nombreux. Son feuillage est constitué de feuilles ovales ou lancéolées, pétiolées

(3-6 cm sur 2-3 cm), aux bords cartilagineux et dentelés, disposées de façon alternée, (Tutin, 2001 ; Longo et al., 2005 ; Benamar et al., 2018).

Sa floraison a lieu entre janvier et la fin d'avril, avec un sommet aux alentours du 15 février (Aou-ouad et al., 2015). Les fleurs sont inséminées grâce aux insectes et du vent (Herrera, 2010 ; Bas et al., 2002 ; Nekkaa et al., 2021) ensuite les fruits charnus apparaissent entre avril et août et mûrissent entre la fin du printemps et le début de l'été. Les fruits non mûrs sont verts, puis deviennent rouges à noirs lorsqu'ils sont mûrs, chacune de ces dernières contiennent entre 2 et 5 graines rouges d'une largeur moyenne de 2,5 mm, d'une longueur de 4,6 mm avec un poids maximal de 9,1 mg (Bas et al., 2002 ; Bas et al., 2005) . Les graines sont entourées d'un Tégument qui s'ouvre une fois séché (Bas et al., 2002 ; Nekkaa et al., 2021) , ils représentent une source nutritionnelle importante pour les petits mammifères (Gulias et al., 2004 ; Nekkaa et al., 2021) , germe généralement en 3 à 4 semaines entre 7,5 et 24 °C et restent viables pendant plusieurs années au stockage (Bas et al., 2005)

Le *Rhamnus alaternus* est utilisé dans les programmes de reboisement en Méditerranée, d'une part en raison de sa capacité à survivre dans des environnements xériques (Gulias et al., 2004) et d'autre part en raison de sa capacité à accumuler beaucoup plus de biomasse par rapport à une espèce du même genre le *Rhamnus ludovici-salvatoris* (El Aou-ouad et al., 2015), cet avantage est dû à son bilan carboné élevé résultant des taux de photosynthèse supérieurs par unité de masse, associés à des taux de respiration similaires, ces deux processus sont généralement liés (Atkin et al. 2005).

I.4. Classification du *Rhamnus alaternus* dans le règne végétal

La classification systématique botanique du *Rhamnus alaternus* est la suivante (Quézel et Santa, 1963) :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheophytes

Branche : Spermatophytes

Sous-branche : Angiospermes

Classe : Dicotyledones

Ordre : Rhamnales

Famille : Rhamnaceae

Genre : Rhamnus

Espèce : *Rhamnus alaternus*

I.5. Répartition géographique

I.5.1. Dans le monde

Rhamnus alaternus est une espèce largement répandue à travers le bassin méditerranéen, avec une présence significative dans des pays tels que la Tunisie, l'Algérie, le Maroc, l'Espagne, la France, l'Italie, la Croatie (Nekkaa et al., 2021), ainsi que sur la péninsule Ibérique (Menendez-Baceta et al., 2014). Son aire de répartition s'étend également à certaines zones du Moyen-Orient, notamment en Palestine (Dafni et al., 1984), où elle prospère dans des environnements au climat méditerranéen caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers doux.

Il s'est naturalisé en Nouvelle-Zélande et en Australie (Kheireddine, 2012).

I.5.2. En Algérie

La distribution géographique du *Rhamnus alaternus* en Algérie est facilitée par la répartition établie en 1963 par Quezel et Santa qui a divisé l'Algérie en 20 territoires phytogéographiques, dont 15 étaient en Algérie du nord il s'agit du Sahels littoraux oranais, Plaines littorales oranaises, l'Atlas tellien oranais (Monts de Tlemcen), littoral Algérois, l'Atlas tellien algérois, la grande Kabylie, la petite Kabylie, la Numidie, Tell Constantinois, Haut plateaux Algérois et Oranais ; Haut-plateaux Constantinois, Hodna, l'Atlas saharien Oranais, l'Atlas saharien Algérois, l'Atlas saharien Constantinois et 5 en Algérie du sud il s'agit du Sahara Septentrional occidental, Sahara Septentrional oriental, Sahara occidental, Sahara central, Sahara méridional.

Le *Rhamnus alaternus* est jugée d'espèce hémicryptophyte (type biologique) usuelle du territoire Algérien (abondance globale) et elle est présente au niveau des secteurs phytogéographiques du Nord algérien, tandis qu'elle est quasiment absente au Sud de l'Algérie (Leutrech-Belarouci et al., 2009).

I.6. Composition chimique

La composition chimique du *Rhamnus alaternus* varie notablement en fonction de l'âge, de la région, de la partie analysée et des facteurs génétiques, en générale 22 composés chimiques appartenant à 4 familles de composées ont été décrit il s'agit de :

Tableau 1: Composition chimique du *Rhamnus alaternus* (Nigussie et al., 2021)

Familles de composés	Composés chimiques	Partie de la plante	Références
Anthraquinones	1,2,6,8 tetrahydroxy-3 méthyl Anthraquinone8-O-β D-glucopyranoside	Écorce, racine et feuilles	(Ben Ammar et al., 2018)
	1,4,6,8 tetrahydroxy-3 methyl anthraquinones 1-O-β-Dglucopyranosyl-4,6-di-O-α-Lrhamnopyranoside		
	Aloe-emodin	Racine	(Ben Ghezala et al., 2015)
	Chrysophanol	Tige, écorce	(Kosalec et al., 2013)
	Emodin	feuilles	(Zeouk et al., 2020)
	Emodin-6-O-arabinopyranoside-2',3',4'-triacetate	Fruit	(Cuoco et al., 2011)
	Emodin-6-O-arabinopyranoside-3',4'-diacetate		
Flavonoïdes	Physcion	Racine	(Ben Ghezala et al., 2015)
	Rhein		
	Kaempférol	Feuille, fruit	(Zeouk et al., 2020 . Cuoco et al., 2014)
	Kaempferol-3-O-β-rhamninoside	Feuilles	(Ammar et al., 2009 ; Bhourri et al., 2011)
	Lutéoline	Feuilles	(Moussi et al., 2015)
	Quercétine	Fruit	(Cuoco et al., 2014)
	Rhamnétine 3-O-isorhamninoside	Feuilles	(Ammar et al., 2009 ;

	Rhamnocitrin 3-O- β -isorhamninoside		Bhouri et al., 2011)
	Rhamnocitrin	Fruit	(Cuoco et al., 2014)
	Rutine	Feuilles	(Moussi et al., 2015)
Stéroïdes	β -sitostérol	Écorce, racine et feuilles	(Ben Ammar et al., 2018)
	β -sitostérol-3-O-glycoside		
Acide organique	Acide p-coumarique		
	Acide férulique	Feuilles	(Moussi et al., 2015)
	Acide gallique		

I.7. Utilisation populaire du *Rhamnus alaternus* en médecine traditionnelle

Le *Rhamnus alaternus* est l'une des plantes piliers de la médecine ancestrale. Chaque partie de cette plante possède des usages spécifiques qui changent en fonction des régions et des combinaisons utilisés. Ils sont ordonnés selon leurs fréquences d'utilisation comme suite :

Les *feuilles* sont utilisées en Algérie comme agent digestif, diurétique, laxatif, et pour prendre en charge les troubles hépatiques (Bhouri et al., 2012 ; Boudjelal et al., 2013), y compris l'hépatite et l'ictère hépatique (Benarba, 2016 ; Elyebdri et al., 2017 ; Mira et al., 2019) et pour remédier les troubles gastro-intestinales (Djidel et al., 2010), il sont aussi combinés avec le fruit pour le traitement des amygdalites (Chermat et Gharzouli, 2015). au Maroc elles sont fréquemment appliquées en cataplasme pour soigner les infections cutanées (Zeouk et al., 2019).

Les parties aériennes sont utilisées par la population du Navarre en Espagne et en Péninsule Ibérique pour leurs propriétés antihypertenseurs, hypocholestérolémiantes, et comme agent dépuratif (Akerreta et al., 2007 ; Calvo et Caverio, 2014 ; Menendez-Baceta et al., 2014).

Les branches, sont consommées pour soulager les troubles musculo-squelettiques (Caverio et Calvo, 2015) et en combinaison avec les feuilles, pour la régulation de la tension artérielle (Akerreta et al., 2007 ; Menendez-Baceta et al., 2014).

L'écorce est traditionnellement utilisée en Italie (Fluminimaggiore) pour le traitement des plaies, comme agent laxatif et en Palestine du nord contre la jaunisse et l'ictère (Dafni et al., 1984 ; Ballero et al., 2001 ; Ieto et al., 2013).

Enfin, les racines sont consommées sous forme de décoction, particulièrement en Algérie, pour leurs effets dépuratifs et pour soulager et remédie divers troubles gastro-intestinales (Akerreta et al., 2007).

I.8. Bénéfices thérapeutique du *Rhamnus alaternus*

I.8.1. Activité antioxydante

Les antioxydants naturels sont des principes bioactives issues de plantes qui limitent les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), tant dans les aliments que dans le corps humain.

La propriété antioxydante est un terme générique qui comprend plusieurs mécanismes dont le pouvoir de neutralisation des radicaux, qui peut être évaluée par le test DPPH (2,2 -diphényl-1- picrylhydrazyle) ou ABTS (2,2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline-6-acide sulfonique)), et d'autres tests antioxydants réalisés in vitro (Marc et al., 2004 ; Carlos et al., 2013), impliquant notamment l'inhibition de la peroxydation des lipides ou de la chélation des métaux.

L'évaluation de l'activité antioxydante du *Rhamnus alaternus* a été effectuée par divers méthodes, y compris les tests de DPPH et de piégeage de l'anion superoxyde, certifiant son efficacité à inhiber la peroxydation des lipides et à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (Boussahel et al., 2013).

Les feuilles du *Rhamnus alaternus* présente une activité antioxydante très importante grâce à son abondance en flavonoïdes et en anthraquinones (Ammar et al. 2009), réputés pour leur capacité à réduire le stress oxydatif et à piéger les radicaux libres (Montoro et al., 2005 ; Zeouk et Bekhti, 2020) attribuant à l'extrait méthanolique des feuilles du *Rhamnus alaternus* une capacité antioxydante plus élevée que d'autres extraits dû à sa plus forte concentration en composés polyphénoliques (Boussahel et al., 2013 ; Boussahel et al., 2015) . Ainsi des flavonoïdes isolés de *Rhamnus alaternus*, tels que les 7-hydroxyflavonoïdes , les kaempférol 3-O-beta isorhamninoside (K3O-ir) et les rhamnocitrin 3-O-beta isorhamninoside ont révélé une puissante inhibition de la xanthine oxydase (XOD), une enzyme cytosolique importante dans la réduction de la production d'anions superoxydes, et la protection contre les lésions cellulaires (Ammar et al., 2009 ; Bhourri et al., 2011).

Une autre étude portée sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques d'écorces de *R. alaternus*, obtenus soit par macération, soit par décoction (en

couplant différents tests biochimiques : les tests de piégeage des radicaux, tels que les tests DPPH et ABTS (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazine-6-sulfonic acid), le test de capacité de réduction ferrique qui utilise le réactif FRAP (ferric reducing antioxidant power) et la détermination de la capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC) assay a montré que les flavonoïdes de l'écorce de *Rhamnus alaternus* étaient plus facilement dissous dans le méthanol que dans l'eau. Ainsi, l'extrait méthanolique s'est révélé plus bioactif quels que soient les tests chimiques utilisés, notamment pour le test de quantification des flavonoïdes. De même, le même extrait a montré la capacité antioxydante la plus élevée en équivalents Trolox (Boussahel et al., 2015)

I.8.2. Activité antimutagène et antigénotoxique

L'évaluation de l'activité antimutagène a été opérée par divers essais impliquant des souches bactériennes où les extraits de *Rhamnus alaternus* ont exprimés un potentiel significatif dans la diminution de la mutagénicité induite par plusieurs agents, en particulier l'azide de sodium et l'aflatoxine B1, indiquant leurs effets protecteurs contre les dommages génétiques (Ben Ammar et al., 2008 ; Nekkaa et al., 2021).

L'efficacité de ces extraits varie selon la fraction et la partie de la plante en question ; Ainsi l'extrait d'acétate d'éthyle, présente des propriétés antimutagènes particulièrement fortes, ce qui suggère que des composants spécifiques de la plante peuvent être responsables de ses effets protecteurs (Ben Ammar et al., 2005; Ben Ammar et al., 2008), dans le même contexte les extraits de racines et de feuilles ont montré des réductions significatives de la mutagénicité, en particulier l'extrait de feuilles, qui était plus efficace contre la mutagénicité induite par l'azoture de sodium (Nekkaa et al., 2021).

L'extrait du *Rhamnus alaternus* présente aussi une efficacité sélective fraction dépendante par exemple la fraction d'oligomères flavonoïdes totaux (TOF) du *Rhamnus alaternus* a exprimé l'activité antimutagène la plus élevée contre l'aflatoxine B1, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle était plus efficace contre le nifuroxazide (R. Ben Ammar et al., 2005). Cette efficacité sélective suggère que différents extraits peuvent cibler efficacement divers agents mutagènes.

Au-delà de leurs propriétés antimutagènes, les extraits de *Rhamnus alaternus* ont exprimé une forte capacité à réduire la génotoxicité induite par différents composés en particulier l'aflatoxine B1 et le nifuroxazide, ce qui confirme leur rôle dans la protection de l'intégrité cellulaire.

Les extraits ont été évalués à l'aide du SOS chromotest, qui a révélé leur efficacité à minimiser les dommages causés à l'ADN, soulignant leur capacité à renforcer la stabilité génomique et les mécanismes de défense cellulaire en tant qu'agents naturels (Nekkaa et al., 2021), dans la même perspective des molécules clés ont été identifiées et testées pour leur efficacité significative contre les agents génotoxiques il s'agit du kaempférol 3-O-b-isorhamninoside et la rhamnocitrine 3-O-b-isorhamninoside. Les effets antigénotoxiques de R3O-ir ont été plus importants que ceux de K3O-ir, réduisant de manière significative le facteur d'induction (FI) de l'aflatoxine B1 (AFB1) et de la nitrofurantoïne (NF) à différentes concentrations (Bhourri et al., 2011 ; Bhourri et al., 2012) .

Ces activités biologiques suggèrent que les extraits peuvent moduler les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et les systèmes de défense contre l'oxydation dans les cellules humaines.

I.8.3. Activité anti-hyperlipidique

L'hyperlipidémie est reconnue comme une hausse de la concentration du cholestérol total à jeun susceptible ou pas d'être accompagnée d'une augmentation de la concentration en triglycérides (Nelson , 2013).

L'extrait méthanolique dérivé des feuilles de *Rhamnus alaternus* a révélé une efficacité à améliorer les profils lipidiques à la fois dans des modèles animaux et dans des lignées cellulaires hépatiques humaines en particulier d'hyperlipidémie induits par le Triton . Cette efficacité est suggérée qu'il peut influencer les voies métaboliques des lipides, en améliorant potentiellement l'oxydation des acides gras dans les cellules HepG2, de même, les flavonoïdes dérivés des feuilles de *R. alaternus* ont montré un impact positif similaire sur le modèle cellulaire murin pré-adipocyte 3T3-L1.. Les utilisations traditionnelles du *Rhamnus alaternus* comme agents hypo-cholestérimiant en phytothérapie renforcent son importance et son potentiel thérapeutique (Nigussie et al., 2021 ; Tacherfiout et al., 2018 ; Zeouk & Bekhti, 2019)

I.8.4. Activité antimicrobienne

Les extraits du *Rhamnus alaternus* présente une activité antimicrobienne de large spectre contre diverses bactéries pathogènes, y compris les souches Gram-positives et Gram-négatives (Chouitah et al., 2012 ; Nekkaa et al., 2021) du à leurs richesses en flavonoïdes , en composés phénoliques associées à une inhibition efficace (Zeouk & Bekhti, 2019).

L'étude de l'activité antimicrobienne de *Rhamnus alaternus* contre diverses souches de staphylocoques a montré un potentiel anti-staphylococcique significatif notamment contre les souches de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, et son isolat clinique ([Zeouk, 2019](#))

L'étude de l'effet antimicrobien de 9 fractions et extraits des feuilles du *Rhamnus alaternus* on révélé une efficacité d'inhibition contre 5 bactéries pathogènes Gram positif et négatif il s'agit du *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and *Salmonella typhimurium* NRRLB .Parmi les fraction et les extraits testés les oligomères totaux ,l'extrait enrichi en flavonoïdes, l'extrait d'acétate d'éthyle et la fraction d'acétate d'éthyle, produits de polarité intermédiaire et très riches en flavonoïdes et en composés phénoliques, ont été les plus actifs ([Ben Ammar et al., 2007a, b](#))

L'évaluation du potentiel antimicrobien de l'extrait méthanolique de l'écorce de *R. alaternus* contre des bactéries, des dermatophytes et des souches de levure a présenté une efficace contre le dermatophytes *Microsporum gypseum* et la levure *Candida albicans* .Ce potentiels peut être expliquer par la richesse de l'extrait d'écorce de *R. alaternus* en anthraquinones notamment du chrysophanol ,du physcion et de la rhéine comme cela a été démontré dans la même étude ([Kolsalec et al., 2013](#))

I.8.5. Activité hépatoprotective du *Rhamnus alaternus*

Rhamnus alaternus est traditionnellement reconnue pour ses effets hépato-protecteurs, en particulier dans le sud-ouest de l'Algérie, où ses feuilles sont utilisées en décoction à cette fin. ([Boudjelal et al., 2013](#)).

Cette plante contient plusieurs composants bioactifs, notamment des flavonoïdes et des anthraquinones, qui contribue à ses effets protecteurs sur le foie en réduisant le stress oxydatif ([Ammar, 2009](#)) , en modulant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans les cellules HepG2 et en améliorant potentiellement l'oxydation des acides gras tout en maintenant une lipogenèse stable. ([Bhourri et al., 2018](#) ; [Tehrifiout et al., 2018](#) ; [Nekkaa et al., 2021](#)).

Des études expérimentales ont montré que l'extraits aqueux lyophilisés (décoctés et macérés) de *Rhamnus alaternus* (RAAE) présente une activité hépatoprotectrice significative contre les

dommages oxydatifs du foie induits par le chlorure d'aluminium (AlCl_3) chez les rats. Cet effet protecteur est attribué à son potentiel antioxydant, qui renforce l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). La supplémentation en RAAE réduit de manière significative les niveaux de malonaldéhyde (MDA) et de protéines carbonylées, ce qui indique une diminution de la peroxydation lipidique (Benchihha et al., 2015). Les évaluations histologiques montrent que le traitement par les RAAE rétablit l'architecture normale du foie, atténuant les graves altérations tissulaires causées par AlCl_3 . La présence de composés phénoliques dans les RAAE contribue à leur efficacité dans la prévention des lésions hépatiques (Benzaid et al., 2021).

Une évaluation de l'activité hépatoprotectrice d'extraits macérés *Rhamnus alaternus* chez des rats Wistar soumis à la toxicité du tétrachlorure de carbone (CCl_4) a signalé une baisse significative des niveaux élevés de phosphatase alcaline (ALP), de transaminase glutamique oxaloacétique (GOT), de transaminase glutamique pyruvique (GPT) et de bilirubine totale. De plus, les extraits ont atténué les changements histopathologiques délétères dans le foie, ce qui dévoile son effet protecteur contre les lésions hépatiques (Berroukche et al., 2015).

En outre, une étude portant sur l'activité hépatoprotectrice de l'extrait méthanolique de feuilles de *R. alaternus* a démontré une diminution du taux de lipides intracellulaires dans les cellules HepG2, ce qui atteste une réduction de l'accumulation de lipides, bénéfique pour la santé du foie. En outre, la capacité de l'extrait à réduire les niveaux de lipides sanguins peut contribuer à réduire le risque cardiovasculaire et à prévenir la stéatose hépatique non alcoolique. Dans l'ensemble, *R. alaternus* est un agent naturel prometteur pour la protection du foie et la gestion des lipides. (Tacherfiout et al., 2018)

I.8.6. Activité antiprolifératif

L'activité antiproliférative des extraits de *Rhamnus alaternus* a été évaluée à l'aide de différentes méthodes telles que le test de mesure de la viabilité cellulaire Moteur Minimum (MTT) qui a révélé des propriétés antiprolifératives significatives contre les cellules de leucémie myélogène chronique humaine et de leucémie murine. Parmi les différents extraits, l'extrait aqueux présente un effet antiprolifératif plus important que l'extrait méthanolique, ce qui indique que la méthode d'extraction influence la bio activité.

L'inhibition de la prolifération cellulaire est aussi dose dépendante, ce qui signifie que des

concentrations plus élevées d'extraits entraînent des réductions plus importantes de la viabilité cellulaire.

Les effets antiprolifératifs de *Rhamnus alaternus* sont probablement liés à ses propriétés antioxydantes et antimutagènes, ce qui indique un mécanisme d'action complexe qui contribue à son potentiel en tant qu'agent thérapeutique contre le cancer (Rebai Ben Ammar et al., 2008)

I.9.Toxicité de *Rhamnus alaternus*

La cytotoxicité est la capacité d'un agent chimique ou biologique d'être toxique pour la cellule (Li et al., 2012). Malgré tous les propriétés pharmacologiques potentielles du *Rhamnus alaternus*, la plante a été classé comme toxique dans certaines conditions, en particulier lors de la consommation quotidienne en l'infusion, qui peut présenter une toxicité en cas de consommation abusive ou d'utilisation inappropriée (Elyebdri et al., 2017) . Il est donc essentiel de respecter les doses recommandées et de consulter un professionnel de la santé avant toute utilisation (Calvo et Caverio, 2014)

En présence d'extraits de feuilles et de racines de *R. alaternus*, des variations significatifs été constatés dans l'absorption mesurée du formazan bleu produit par la réduction du MTT par la déshydrogénase mitochondriale lors d'une étude portant sur La cytotoxicité de différents extraits et fractions de la plante sur les cellules myélogènes chroniques humaines K562 et les cellules de leucémie lymphocytaire murine L1210, à l'aide du test colorimétrique au bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényl-tétrazolium (MTT) . Ainsi, une faible cytotoxicité de l'extrait de feuilles par rapport à celle de l'extrait de racines sur les lignées cellulaires K562 et L1210 a été observée (Ben Ammar et al., 2008)

Une toxicité aigüe des extraits d'écorce de *Rhamnus alaternus* par rapport à l'extrait aqueux d'écorce obtenu par macération et à l'extrait d'écorce d'infusion sur les cellules leucémiques humaines U937 et les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), en utilisant le test du bleu trypan et une absence de toxicité pour la lignée de cellules PBMC normales a été encore constaté par d'autre chercheurs (Boussahel et al., 2015) , ce qui suggère que les niveaux de toxicité peuvent varier en fonction de facteurs tels que la méthode d'extraction, le solvant utilisé et les parties spécifiques de la plante utilisées et donc la composition phytochimiques de l'extrait. Ainsi, La toxicité de *Rhamnus alaternus* est attribué aux glycosides d'anthraquinone présents dans la plante, qui peuvent entraîner des troubles

métaboliques et des déséquilibres électrolytiques (Calvo et Caverro, 2014).

Une absence de toxicité sur les cellules HepG2, évaluée par le test de libération de LDH, même à des concentrations allant jusqu'à 500 mg/mL a été remarqué (Tacherfiout et al., 2018).

II. Diabète, hyperlipidémie et stress oxydatif

II .1. Diabète type 2

II.1.1. Définition

Le diabète de type 2 (DT2) constitue une pathologie métabolique chronique, complexe et multifactorielle, définie par une hyperglycémie prolongée due à une dysfonction de la sécrétion d'insuline, à une réduction de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline (résistance à l'insuline), ou à la coexistence de ces deux dysrégulations (Serbis et al., 2021 ; Bosun-Arije et al., 2020).

Il représente la forme la plus répandue du diabète et se distingue par une altération progressive de l'homéostasie glucidique, accompagnée de modifications métabolique (glucidique, lipidique et protéique) (Ahmad et al., 2022) et cellulaires, comprenant notamment le stress oxydatif et l'inflammation, qui favorisent sa progression ainsi que le développement de ses complications, (Cuschieri, 2019 ; Lima et al., 2022).

Le diabète de type 2 résulte d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux et Lorsqu'il n'est pas adéquatement pris en charge, le diabète de type 2 (DT2) engendre de multiples complications micro vasculaires et macro vasculaires, incluant la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie diabétique, ainsi que les maladies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux, qui détériorent significativement la qualité de vie des patients et accroissent le risque de mortalité (Chatterjee et al., 2017 ; Makoni et al., 2024).

Historiquement, le DT2 était perçu principalement comme une maladie affectant les adultes ; cependant, sa prévalence chez les enfants et les adolescents a augmenté de manière significative, parallèlement à l'augmentation de l'obésité infantile (Lee et al., 2024).

II.1.1. Épidémiologie

Depuis les années 1950, le diabète de type 2 est devenu une pandémie mondiale, initialement considéré comme une pathologie relativement rare, en raison principalement de la transition des modes de vie vers une sédentarité accrue et une alimentation déséquilibrée, entraînant une obésité généralisée, laquelle est souvent associée à des prédispositions génétiques. Le diabète de type 2 affecte actuellement un adulte sur sept aux États-Unis, avec une prévalence accrue parmi les personnes âgées (un sur quatre) ([ADA, 2024](#) ; [CDC, 2024](#)) ainsi que chez les minorités raciales ou ethniques (un sur trois) ([Golden et al., 2019](#)), constituant ainsi une problématique majeure de santé publique.

D'un point de vue épidémiologique à l'échelle mondiale, la prévalence du diabète de type 2 (DT2) augmente de manière soutenue et accélérée. La prévalence du diabète chez les adultes a été multipliée par plus de trois entre 1980 et 2021 ([IDF, 2025](#)). En 2022, le nombre d'adultes affectés dans le monde était estimé à 828 millions, ce qui représente une augmentation de 630 millions par rapport à 1990, avec une prévalence standardisée en fonction de l'âge de 13,9 % chez les femmes et de 14,3 % chez les hommes ([Zhou et al., 2024](#)). Cette évolution atteste d'une transition épidémiologique significative du diabète vers une maladie non transmissible prédominante à l'échelle mondiale.

L'analyse géographique révèle une répartition hétérogène de la maladie, les augmentations les plus marquées étant constatées dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, en particulier en Asie du Sud-Est, en Asie du Sud, au Moyen-Orient, en Afrique du Nord, ainsi qu'en Amérique latine, dans les Caraïbes et dans les petits États insulaires en développement²⁹. Cette dynamique s'inscrit étroitement dans le cadre de l'urbanisation accélérée, de la transition nutritionnelle ainsi que de la réduction de l'activité physique, facteurs qui contribuent à l'augmentation de l'obésité et du diabète de type 2 ([Phelps et al., 2024](#) ; [Jaacks et al., 2019](#)).

En Afrique subsaharienne, malgré une prévalence actuelle estimée à 5 %, les projections prévoient une augmentation de 142 %, portant le nombre de cas à 60 millions d'ici 2050 ([IDF, 2025](#)), ce qui illustre une expansion particulièrement rapide dans cette région.

De surcroît, le diabète de type 2 ne concerne plus exclusivement les populations âgées. Son incidence croît aussi chez les adolescents et les jeunes adultes (18–40 ans) ([Luk et al., \(2025\)](#)), témoignant d'un rajeunissement préoccupant de cette pathologie. Aux États-Unis, cette forme

précoce affecte de manière disproportionnée les populations minoritaires (Noirs, Hispaniques et Autochtones), traduisant ainsi des inégalités épidémiologiques majeures associées à des déterminants sociaux de la santé ainsi qu'à des facteurs génétiques potentiels (Perng et al., 2023 ; Butler et Eddington , 2025).

Enfin, malgré la portée mondiale de cette épidémie, la prise en charge demeure inadéquate : en 2022, environ 59 % des 445 millions d'adultes diabétiques âgés de 30 ans ou plus n'ont pas bénéficié d'un traitement (Zhou et al., 2024), ce qui aggrave davantage le fardeau épidémiologique global.

Ces données doivent néanmoins être analysées avec rigueur en raison de la variabilité des systèmes de surveillance et des critères diagnostiques, ce qui restreint les comparaisons internationales et met en évidence l'exigence d'une standardisation des données épidémiologiques (Beyh et al., 2024 ; Narayan et al., 2025) .

II.1.3. Facteurs de risque

- **Surpoids et obésité**

La prévalence du diabète de type 2 (DT2) augmente en concomitance avec l'épidémie mondiale d'obésité, tant dans les nations développées que dans celles en développement, telles que la Chine (Xu et al., 2013 ; CDC 2016). Une diminution de l'incidence du diabète a été constatée à Cuba suite à une réduction généralisée du poids corporel en raison d'une crise économique (Franco et al., 2013). À l'échelle mondiale, la prévalence de l'obésité ($IMC \geq 30$ kg/m²) a augmenté de 3,2 % à 10,8 % chez les hommes et de 6,4 % à 14,9 % chez les femmes entre 1975 et 2014, et pourrait atteindre 18 % chez les hommes et dépasser 21 % chez les femmes d'ici 2025 (NCD, 2016).

L'excès d'adiposité, mesuré par un IMC élevé, représente le principal facteur de risque du diabète de type 2 et contribue à l'émergence d'anomalies métaboliques entraînant une insulino-résistance (Hu, 2001 ; Hu, 2008). Dans l'étude Nurses' Health, 61 % des cas de diabète de type 2 étaient imputables au surpoids ($IMC \geq 25$ kg/m²). L'obésité abdominale, évaluée par le tour de taille ou le rapport taille/hanche, ainsi que la prise de poids à l'âge adulte et l'accumulation de graisse viscérale, constituent également des facteurs de risque indépendants du DT2 (Carey et al., 1997).

Des variations ethniques sont constatées dans la vulnérabilité au diabète de type 2. Les populations asiatiques manifestent un diabète de type 2 à des indices de masse corporelle inférieurs à ceux des populations blanches, en raison d'une proportion accrue de masse grasse, d'une adiposité viscérale plus prononcée et d'une fonction des cellules β généralement moins efficace (Lee et al., 2011 ; Kong et al., 2013 ; Narayan et al., 2016).

La réduction de poids, en particulier par le biais de la chirurgie bariatrique, peut prévenir ou induire la rémission du diabète de type 2 chez les individus obèses (Carlsson et al., 2012). Cependant, cette méthode demeure onéreuse, ce qui met en évidence la nécessité de stratégies préventives à l'échelle de la population.

- **Facteurs associés à l'alimentation et au mode de vie**

Les changements de mode de vie représentent une stratégie essentielle pour la prévention du diabète de type 2. Les essais cliniques ont démontré que des interventions intensives combinant une alimentation saine et une activité physique diminuent l'incidence du diabète de type 2 d'environ 58 %, surpassant l'efficacité de certaines interventions pharmacologiques (Lee et al., 2011 ; Kong et al., 2013 ; Carlsson et al., 2012). Lorsque ces interventions sont impraticables, la metformine peut être administrée aux individus à haut risque, entraînant une diminution de l'incidence du diabète de type 2 d'environ 31 % après 2,8 ans de suivi (Knowler et al., 2002 ; Tong et al., 2017).

- **Alimentation**

Une alimentation de qualité supérieure, riche en acides gras insaturés, en glucides à faible indice glycémique, en céréales complètes, fruits, légumes, noix et légumineuses, et pauvre en céréales raffinées, viandes rouges ou transformées et boissons sucrées, est corrélée à une diminution du risque de DT2 (Ley et al., 2014).

Inversement, la transition nutritionnelle observée dans plusieurs pays asiatiques, marquée par une élévation de la consommation de sucres, de produits d'origine animale et de céréales raffinées, a favorisé l'augmentation du DT2 (Ley et al., 2014). De surcroît, la malnutrition durant la vie fœtale ou l'enfance peut accroître le risque de diabète de type 2 à l'âge adulte (Li et al., 2010).

- **Activité physique**

L'accroissement de l'activité physique constitue un facteur fondamental dans la prévention du diabète de type 2. Les exercices aérobiques et de musculation augmentent la sensibilité à l'insuline et diminuent de manière indépendante le risque de diabète de type 2 ([Grøntved et al., 2012](#)). Inversement, une sédentarité prolongée est corrélée à une élévation du risque de diabète de type 2, indépendamment de l'intensité de l'activité physique 66, bien que la pratique d'activités physiques modérées à intenses puisse en atténuer l'impact ([Ekelund et al., 2009](#)).

- **Consommation de tabac**

Le tabagisme est corrélé à une élévation du risque de diabète de type 2 proportionnelle à la dose. Les personnes fumeuses manifestent un risque accru d'environ 45 % de développer un diabète de type 2 par rapport aux individus non-fumeurs ([Willi et al., 2007](#)). L'exposition involontaire à la fumée accroît également ce risque ([Hayashino et al., 2008](#))

Ces phénomènes pourraient être attribués à une accumulation de tissu adipeux abdominal, à une résistance à l'insuline ainsi qu'à des modifications de la sécrétion insulinaire ([Reaven et Tsao, 2003](#)). La réduction du tabagisme constitue donc une stratégie majeure de santé publique, en particulier dans des pays fortement touchés comme la Chine et l'Inde ([GBD ; 2017](#)).

- **Génomique et relations entre les gènes et l'environnement**

Les recherches menées sur les familles et les jumeaux indiquent que le diabète de type 2 présente une composante génétique prépondérante ([Almgren et al., 2011](#)). Les analyses d'association pangénomique ont permis de recenser plus de cent variantes génétiques corrélées au diabète de type 2, corroborant ainsi la nature polygénique complexe de cette pathologie ([Fuchsberger et al., 2016](#)).

La plupart de ces variantes affectent la sécrétion d'insuline, alors qu'une minorité modifie la sensibilité à l'insuline ([McCarthy, 2010](#)). Néanmoins, ces variantes ne justifient qu'environ 20 % de l'hérédité du diabète de type 2 (DT2) constatée ([Fuchsberger et al., 2016](#)).

Les facteurs génétiques interagissent avec l'environnement et le mode de vie, ce qui pourrait justifier les variations individuelles du risque de diabète de type 2 ainsi que les réponses différentielles aux interventions. ([Böhm et al., 2016 ; Franks et al., 2013](#)). Néanmoins, les données disponibles sur ces interactions demeurent restreintes et parfois contradictoires en

raison de l'intensité modérée des effets observés ainsi que des contraintes méthodologiques des recherches menées. (Langenberg *et al.*, 2014 ; Franks *et al.*, 2016).

II.1.4. Physiopathologie

L'insuline constitue l'hormone prédominante responsable du maintien de l'homéostasie des glucides. Le diabète de type 2 (DT2) découle essentiellement de trois altérations métaboliques majeures : une réduction progressive de la sécrétion d'insuline (insulinopénie relative), une résistance des tissus périphériques à l'action insulinique et une élévation de la production hépatique de glucose. La part respective de ces anomalies diffère d'un individu à l'autre, ce qui justifie l'importante hétérogénéité physiopathologique du diabète de type 2 (Broussolle *et al.*, 1990 ; Bastard et Hainque, 1995).

La défaillance progressive des cellules β pancréatiques représente un facteur majeur dans la progression de la maladie. Dans un premier temps, l'organisme peut pallier l'insulinorésistance en majorant la sécrétion d'insuline, ce qui permet de préserver une glycémie normale. Toutefois, lorsque les capacités sécrétoires des cellules β se révèlent inadéquates, une hyperglycémie chronique s'installe, favorisant la transition de l'intolérance au glucose vers le diabète de type 2 (UKPDS, 1995 ; Marchetti *et al.*, 2006 ; Prentki et Nolan, 2006 ; Chang-Chen *et al.*, 2008).

L'insulinorésistance cible principalement le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie, provoquant une réduction de l'absorption périphérique du glucose ainsi qu'une augmentation de la production hépatique de glucose via la néoglucogenèse et la glycogénolyse (Broussolle *et al.*, 1990 ; Bastard *et al.*, 2001 ; Wellen et Hotamisligil, 2005).

Dans le cadre de l'obésité, un excès d'acides gras libres ainsi qu'une hyperglycémie prolongée provoquent respectivement une lipotoxicité et une glucotoxicité, identifiées comme les principaux agents à l'origine de la détérioration des cellules β pancréatiques. Ces mécanismes induisent une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi qu'un état de stress oxydatif, par l'activation de diverses voies métaboliques, en particulier la phosphorylation oxydative, la voie des hexosamines et la stimulation de la protéine kinase C. L'accumulation lipidique et le stress oxydatif participent de manière significative à la réduction de l'expression du gène codant pour l'insuline ainsi qu'à la destruction des cellules

β pancréatiques (Poitout et Robertson, 2002 ; Lupi et *al.*, 2002 ; Andreozzi et *al.*, 2004 ; Prentki et Nolan, 2006).

II.1.5. Prise en charge médicamenteuse du DT2

La gestion pharmacologique du diabète de type 2 s'appuie sur diverses classes thérapeutiques visant plusieurs mécanismes physiopathologiques afin d'optimiser la régulation glycémique.

II.1.5.1. Les agents insulinosécréteurs

- **Les sulfonylurées, agents hypoglycémiants de la classe des sulfamides**

Les sulfamides hypoglycémiants induisent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques en provoquant la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP (KATP) par fixation au récepteur SUR1. Cette opération provoque une dépolarisation de la membrane, un influx de Ca^{2+} ainsi que l'exocytose d'insuline (Henquin, 2005 ; Thissen & Buysschaert, 2005).

- **Les glinides (méglinides)**

Les glinides (répaglinide, natéglinide) exercent leur effet par un mécanisme analogue à celui des sulfonylurées, mais présentent une cinétique plus rapide ainsi qu'une durée d'action plus brève, ce qui favorise une régulation améliorée de l'hyperglycémie postprandiale tout en diminuant le risque d'hypoglycémie (Saloranta et *al.*, 2002 ; Blicklé, 2004).

II.1.5.2. Les agents sensibilisants à l'insuline

- **Les biguanides, en particulier la metformine**

La metformine diminue la production hépatique de glucose en inhibant la néoglucogenèse, favorise la captation périphérique du glucose par la translocation de GLUT-4 et optimise le métabolisme lipidique (Kirpichnikov et *al.*, 2002).

- **Les thiazolidinediones, également désignées sous le nom de glitazones**

Les glitazones agissent comme des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR- γ , augmentant la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux, musculaire et hépatique, ce qui conduit à une utilisation périphérique accrue du glucose ainsi qu'à une diminution de sa production hépatique (Girard, 2001 ; Hermans & Buysschaert, 2005).

II.1.5.3. Les agents inhibiteurs de l' α -glucosidase

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase (acarbose, miglitol, voglibose) ralentissent la dégradation des glucides complexes en bloquant les enzymes intestinales impliquées dans leur hydrolyse, ce qui diminue les pics glycémiques postprandiaux (Rosak *et al.*, 2002 ; Brogard *et al.*, 1989).

II.1.5.4. Le traitement par insuline

L'instauration d'une insulinothérapie est recommandée en cas d'inefficacité des traitements oraux ou de contre-indications, dans le but de maintenir le capital insulino sécrétoire résiduel. Elle peut être employée conjointement avec d'autres agents antidiabétiques afin d'optimiser le contrôle glycémique (Bosquet & Hartemann-Heurtier, 2004 ; Halimi, 2005).

II.1.5.5. Les stratégies thérapeutiques fondées sur l'effet incrétines

Les incrétines, notamment le GLP-1 et le GIP, constituent des hormones intestinales qui favorisent la sécrétion insulinaire en fonction des taux glycémiques. Deux stratégies thérapeutiques sont mises en œuvre : les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), tels que la sitagliptine, ainsi que les agonistes des récepteurs du peptide-1 glucagon-like (GLP-1), à l'instar de l'exénatide (Vilsbøll & Holst, 2004 ; Stonehouse *et al.*, 2006 ; Amori *et al.*, 2007).

II.1.5.6. Les agents modulant le système endocannabinoïde

L'inhibition du récepteur CB1 accroît la sensibilité à l'insuline, diminue la glycémie et peut atténuer l'évolution des complications métaboliques liées au diabète de type 2 (De Miguel-Yanes *et al.*, 2011).

II.1.6. Stress oxydatif dans l'étiologie du diabète de type 2 (DT2)

Le stress oxydatif joue un rôle fondamental dans la physiopathologie du diabète de type 2 (DT2). Dans des conditions physiologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) sont principalement produites au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale comme sous-produits du métabolisme aérobie (Pcal *et al.*, 2011 ; Schieber *et Chandel*, 2014). Elles comprennent des espèces radicalaires, telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$), ainsi que des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Schieber *et Chandel*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016). À faible concentration, les ROS participent à la régulation de nombreux processus

cellulaires, notamment la signalisation intracellulaire, l'activité enzymatique, la régulation des transporteurs et l'homéostasie du glucose (Rochette et al., 2014 ; Hurre et Hsu, 2017).

En conditions normales, l'équilibre redox est maintenu par les systèmes antioxydants enzymatiques, incluant la superoxyde dismutase (SOD), qui transforme l'anion superoxyde en H_2O_2 , puis la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), responsables de sa neutralisation (Luc et al., (2019) ; Sies et Jones, 2020). Toutefois, une production excessive de ROS peut dépasser les capacités antioxydantes, entraînant un état de stress oxydatif caractérisé par l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN, conduisant ainsi à des altérations fonctionnelles et à des dommages cellulaires (Włodarczyk et Nowicka, 2019 ; Ye et al., 2016). Le facteur de transcription Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) constitue un régulateur majeur de l'expression des gènes impliqués dans la réponse antioxydante (He et al., 2020).

Une surproduction chronique de ROS est étroitement associée à la résistance à l'insuline, à l'altération de la sécrétion insulinaire par les cellules β pancréatiques et à une diminution de l'utilisation périphérique du glucose, contribuant ainsi à l'installation et à la progression du DT2 (Rehman et Akash, 2017). L'hyperglycémie chronique induit une glucotoxicité, caractérisée par une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial, une production excessive de ROS et l'activation de voies inflammatoires, notamment NF- κ B, pouvant aboutir à l'apoptose des cellules β pancréatiques (Stumvoll et al., 2005; Oguntibeju, 2019). Par ailleurs, l'association de la glucotoxicité avec la lipotoxicité induite par l'excès d'acides gras libres observé dans l'obésité exerce des effets synergiques favorisant la dysfonction et la mort des cellules β (Lytrivi et al. 2020 ; Cerf, 2020).

Comme illustré dans la figure 1, l'hyperglycémie favorise l'augmentation du stress oxydatif par l'activation de quatre principales voies métaboliques : la voie des polyols, la formation des produits de glycation avancée (AGEs), l'activation de la protéine kinase C (PKC) et la voie des hexosamines (Domingueti et al., 2016 ; Oguntibeju, 2019).

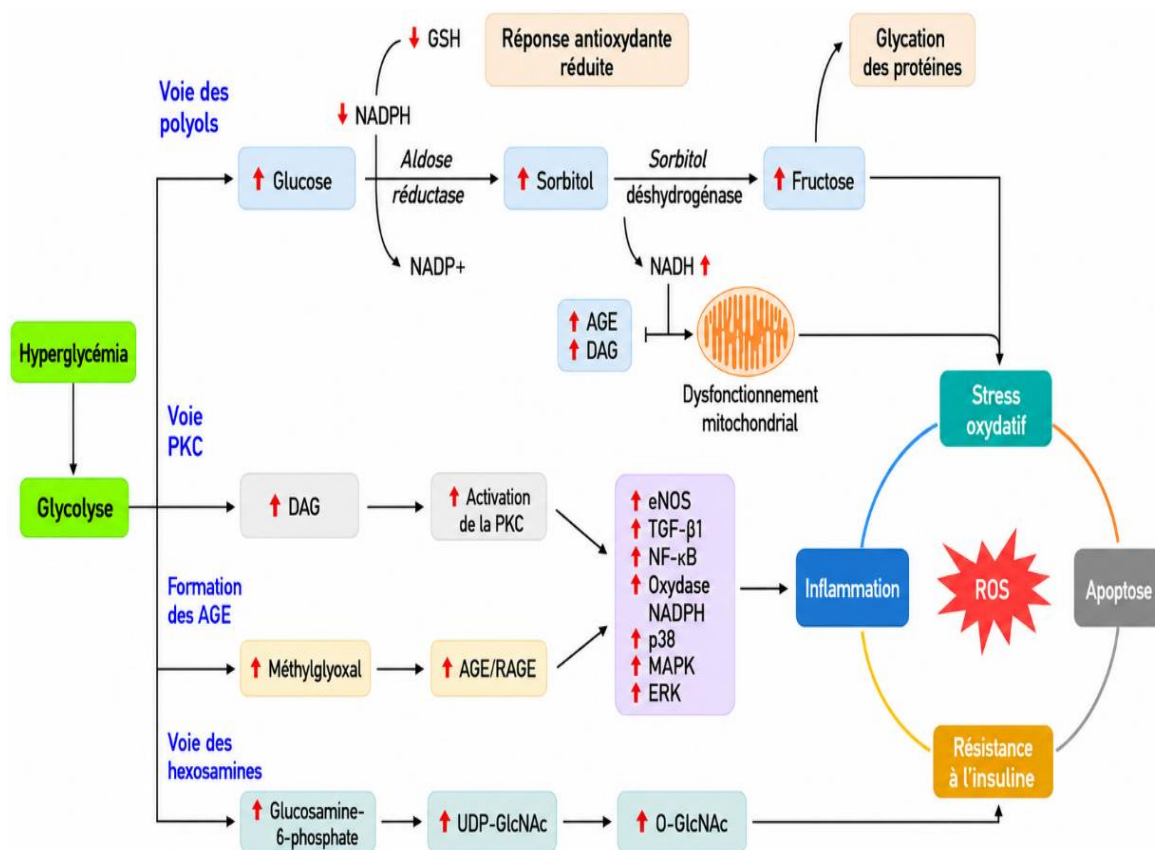


Figure 1 : Voies métaboliques impliquées dans la production de ROS induite par l'hyperglycémie. (Lima et al., 2022)

II.1.6.1. Voie des polyols

En situation d'hyperglycémie, l'excès de glucose est détourné vers la voie des polyols où l'aldose réductase réduit le glucose en sorbitol en utilisant le NADPH. Cette réaction entraîne une diminution des réserves en NADPH, réduisant ainsi la régénération du glutathion réduit (GSH), un antioxydant majeur. Le sorbitol est ensuite converti en fructose par la sorbitol déshydrogénase, provoquant une accumulation de NADH qui surcharge la chaîne respiratoire mitochondriale et favorise la génération de ROS (Zephy et Ahmad, 2015 ; Román-Pintos et al., 2016).

II.1.6.2. Formation des produits de glycation avancée (AGEs)

L'hyperglycémie stimule la formation de méthylglyoxal et d'AGEs, composés capables d'augmenter directement la production de ROS (Nowotny et al., 2015). L'interaction des AGEs avec leur récepteur spécifique RAGE active plusieurs voies de signalisation intracellulaire, notamment MAPK, ERK1/2, p38 et NF-κB, conduisant à une amplification de

l'inflammation, du stress oxydatif et au développement des complications cardiovasculaires associées au diabète (Ighodaro, 2018). De plus, les AGEs favorisent la production de ROS mitochondriaux, diminuent la synthèse d'ATP et altèrent la sécrétion d'insuline (Vlassara et Uribarri, 2014).

II.1.6.3. Activation de la voie de la protéine kinase C (PKC)

L'excès de glucose intracellulaire augmente la production de diacylglycérol (DAG), entraînant l'activation de différentes isoformes de la PKC (Brownlee, 2001). L'activation de cette enzyme stimule l'expression de facteurs pro-inflammatoires et pro-oxydants, notamment TGF- β 1, NF- κ B et les NADPH oxydases, ce qui accroît davantage la production de ROS, l'inflammation et la dysfonction vasculaire (Geraldes et King, 2010 ; Kizub *et al.*, 2014)

II.1.6.4. Activation de la voie des hexosamines

L'accumulation de NADH et l'inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) favorisent l'orientation du glucose vers la voie des hexosamines. Cette voie entraîne la production de glucosamine-6-phosphate et d'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), responsables de la modification O-GlcNAcylation des protéines. Ces modifications sont impliquées dans l'apparition de la résistance à l'insuline. De plus, le glucosamine-6-phosphate inhibe la thioredoxine et stimule la production mitochondriale de ROS, aggravant ainsi le stress oxydatif (Vosseller *et al.*, 2002 ; Kang et Yang, 2020).

Dans l'ensemble, l'activation de ces différentes voies métaboliques conduit à une production excessive de ROS et à un stress oxydatif chronique. Les patients atteints de DT2 présentent généralement une augmentation des marqueurs du stress oxydatif, notamment les produits de peroxydation lipidique et les AGEs, accompagnée d'une diminution de l'expression du facteur NRF2 ainsi que d'une réduction des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, CAT, GPx) et non enzymatiques, telles que les vitamines C et E (Jiménez-Osorio *et al.*, 2014 ; Grindel *et al.*, 2016).

Ainsi, le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie, associé à une altération des systèmes de défense antioxydants, établit un cercle vicieux entre la production de ROS, l'inflammation chronique, la résistance à l'insuline et la dysfonction des cellules β pancréatiques. Ce processus entretient l'hyperglycémie et favorise la progression du DT2 ainsi que l'apparition

de ses complications microvasculaires et macrovasculaires (Jiménez-Osorio *et al.*, 2014 ; Rehman et Akash, 2017).

II .2. Le stress oxydatif

II.2.1. Définition

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres) et les mécanismes antioxydants de protection de l'organisme. Il intervient dans de nombreuses pathologies, soit en tant que facteur initiateur, soit comme élément exacerbant leur progression (Favier, 2003). Les radicaux libres, générés naturellement lors des processus métaboliques, sont essentiels à certaines fonctions biologiques, toutefois leur production excessive s'avère nocive et peut engendrer des lésions cellulaires (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Ce déséquilibre redox provient soit d'une production excessive de radicaux libres, soit d'une déficience des systèmes antioxydants. Il induit des dommages oxydatifs affectant les lipides, les protéines et les acides nucléiques, susceptibles de provoquer l'apoptose ou la nécrose cellulaire (Belaïch *et al.*, 2015 ; Belaïch et Boujraf, 2016) (Fig. 2).



Figure 2: Débalancement des antioxydants et des pro-oxydants (Belaïch et Boujraf, 2016)

II.2.2. Espèces radicalaires libres

Les radicaux libres correspondent à des espèces chimiques caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés, conférant ainsi une instabilité et une réactivité élevées

(Durand *et al.*, 2013). Ils englobent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que celles de l'azote (ERN) (Sosa *et al.*, 2013).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) englobent des formes radicalaires telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), ainsi que des dérivés non radicalaires, notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui présente également une toxicité. Les espèces réactives de l'azote (ERN) proviennent essentiellement de l'oxyde nitrique (NO) (Pisoschi *et Pop*, 2015 ; Weidinger *et Kozlov*, 2015).

À des concentrations faibles, ces molécules interviennent dans des processus physiologiques tels que la signalisation cellulaire et la plasticité synaptique. Néanmoins, lorsqu'elles excèdent les capacités antioxydantes, elles engendrent des modifications irréversibles des membranes, des protéines et de l'ADN (Belaïch *et Boujraf*, 2016 ; Jauniaux *et Burton*, 2016).

II.2.3. Sources du stress oxydatif

Le stress oxydatif peut résulter de facteurs exogènes ainsi que de mécanismes endogènes. Les facteurs exogènes comprennent l'exposition aux rayons ultraviolets, la pollution atmosphérique, le tabagisme, la consommation d'alcool, ainsi que certains médicaments et agents cancérigènes. Les facteurs endogènes englobent essentiellement la chaîne respiratoire mitochondriale, les processus inflammatoires aigus ou chroniques ainsi que les déséquilibres nutritionnels (Thanan *et al.*, 2014) (Fig. 3).

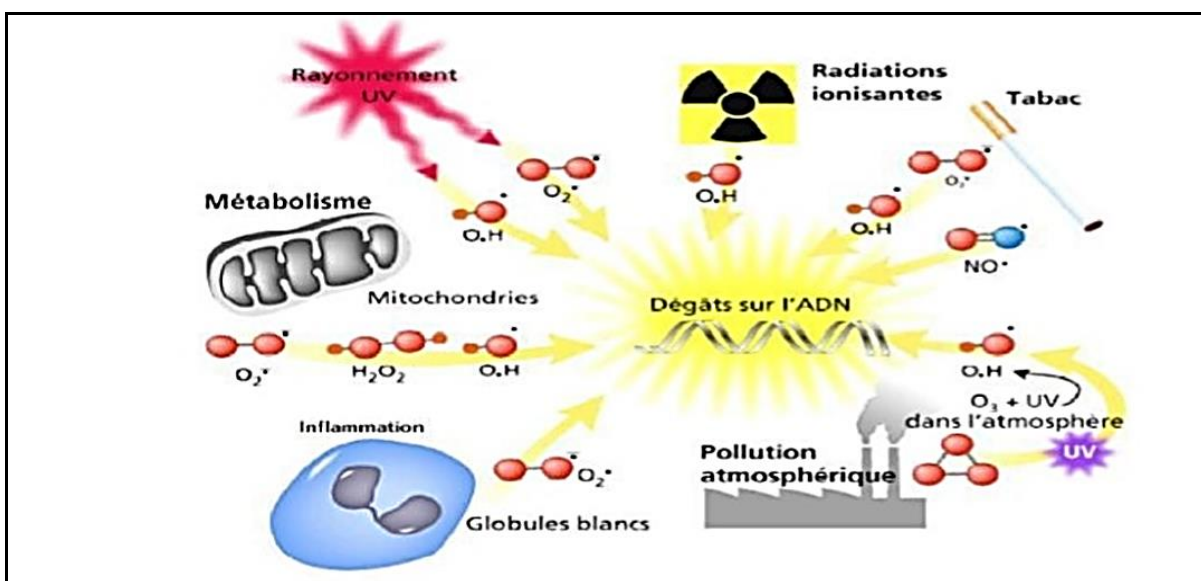


Figure 3 : Origines du stress oxydatif (Defraigne *et Pincemail*, 2008)

II.2.4. Conséquences du stress oxydatif

II.2.4.1. Modifications oxydatives de l'ADN

L'ADN présente une vulnérabilité notable face aux attaques des radicaux libres, ce qui engendre des altérations des bases, des ruptures des brins ainsi que des mutations ponctuelles susceptibles d'affecter la synthèse protéique et la stabilité génomique (Valko *et al.*, 2007 ; Thanan *et al.*, 2014).

II.2.4.2. Modifications oxydatives des lipides

L'oxydation des acides gras polyinsaturés provoque une diminution de la fluidité membranaire ainsi que la mort cellulaire (Cillard *et Cillard*, 2006). Elle stimule en outre la production de LDL oxydées, absorbées par les macrophages et converties en cellules spumeuses, contribuant ainsi à la progression de l'athérosclérose (Atkin *et al.*, 2005 ; Nakajima *et al.*, 2006).

II.2.4.3. Modifications oxydatives des protéines

Les acides aminés comme la cystéine, la tyrosine ou le tryptophane présentent une susceptibilité marquée à l'oxydation. Les lésions comportent la création de groupements carbonylés, la scission des chaînes peptidiques ainsi que la formation de ponts bi-tyrosine, induisant des modifications fonctionnelles fréquemment irréversibles (Jacobson, 2006 ; Schmidt-Ott *et al.*, 2007 ; Sanz *et al.*, 2008). Des protéines oxydées spécifiques se regroupent sous forme d'agrégats intracellulaires (Haleng *et al.*, 2007).

II.2.5. Maladies liées au stress oxydatif

Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans le processus de vieillissement ainsi que dans le développement de diverses maladies chroniques. La réduction des mécanismes antioxydants liée au vieillissement, associée à l'accroissement de la génération mitochondriale de radicaux libres, contribue à son émergence (Sánchez, 2017 ; Ighodaro *et Akinloye*, 2018). Il est corrélé à des pathologies telles que le cancer, le diabète, les affections cardiovasculaires, les cataractes, les maladies neurodégénératives ainsi que certaines insuffisances respiratoires (Forrester *et al.*, 2018 ; Fonseka *et al.*, 2019).

II.2.6. Mécanismes de protection antioxydante

L'homéostasie redox est assurée par les systèmes de défense antioxydants, lesquels se caractérisent comme toute substance pouvant, à faible concentration, ralentir ou inhiber l'oxydation d'un substrat ([Thérond et Bonnefont-Rousselot, 2005](#) ; [Rodrigo, 2009](#)). Les antioxydants se répartissent en : Antioxydants enzymatiques endogènes, notamment la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase.

Antioxydants exogènes non enzymatiques, comprenant les vitamines, les oligoéléments et les composés alimentaires ([Durand et al., 2013](#) ; [Ighodaro et Akinloye, 2018](#)).

II.2.7. Antioxydants et composés polyphénoliques

Les antioxydants neutralisent les espèces réactives de l'oxygène en les convertissant en molécules stables, ce qui restreint les lésions cellulaires. Ils englobent le glutathion, l'acide urique ainsi que plusieurs enzymes à fonction protectrice ([Favier, 2003](#) ; [Kozarski et al., 2015](#)). Les micronutriments, notamment les vitamines A, C et E ainsi que les oligoéléments, contribuent également à la protection contre le stress oxydatif ([Haleng et al., 2007](#) ; [Fofana, 2011](#)).

Les polyphénols représentent une catégorie importante d'antioxydants naturels contenus dans les végétaux. Ils englobent les flavonoïdes (flavonols, flavanols, isoflavones, anthocyanines) ainsi que les composés non flavonoïdes (acides phénoliques, stilbènes). Ces composés, abondamment retrouvés dans les fruits et légumes, présentent des propriétés biologiques antioxydantes significatives et font l'objet d'études approfondies ([Handique et Baruah, 2002](#) ; [Tahidul et al., 2019](#)).

II.2.8. Stress Oxydant et Hyperlipidémie

L'hyperlipidémie est aujourd'hui reconnue comme un facteur majeur contribuant au stress oxydatif et à ses complications métaboliques et cardiovasculaires. L'augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides, ainsi que l'accumulation des LDL circulantes, en particulier les LDL petites et denses (small dense LDL, sdLDL), constitue un élément central de cette interaction pathologique. Ces particules sont plus susceptibles de pénétrer la paroi endothéliale et présentent une forte susceptibilité à l'oxydation en raison de leur faible teneur en antioxydants et de leur structure riche en acides gras polyinsaturés ([Parthasarathy et al., 2022](#) ; [FERENCE et al., 2023](#)).

L'oxydation des LDL conduit à la formation des LDL oxydées (ox-LDL), considérées comme des médiateurs clés de l'athérogenèse. Ces ox-LDL induisent une activation endothéliale, favorisent l'expression de molécules d'adhésion et stimulent le recrutement des monocytes. Une fois différenciés en macrophages, ces derniers internalisent massivement les ox-LDL via les récepteurs scavengers, conduisant à la formation de cellules spumeuses, étape précoce de la plaque d'athérome (Stocker & Kearney, 2021 ; Kattoor et al., 2024).

Parallèlement, l'excès de lipides circulants agit comme un puissant inducteur de stress oxydatif cellulaire. Il stimule plusieurs sources enzymatiques de production de ROS, notamment les mitochondries, les NADPH oxydases (NOX) et les xanthines oxydases. Cette production excessive de ROS dépasse les capacités des systèmes antioxydants endogènes (SOD, catalase, glutathion peroxydase), entraînant un déséquilibre redox et l'installation d'un stress oxydatif chronique (Liguori et al., 2022 ; Di Meo et al., 2023).

Ce déséquilibre favorise également une boucle d'amplification où le stress oxydatif aggrave la dyslipidémie en altérant le métabolisme lipidique hépatique et en augmentant la peroxydation lipidique systémique. Cette interaction bidirectionnelle établit un cercle vicieux entre hyperlipidémie, inflammation de bas grade et stress oxydatif, contribuant à la progression des maladies métaboliques et cardiovasculaires (Heinecke, 2022 ; Kotronen et al., 2023).

Ainsi, l'hyperlipidémie ne doit pas être considérée uniquement comme un désordre lipidique, mais comme un état pro-oxydant et pro-inflammatoire complexe impliqué dans la pathogenèse de l'athérosclérose et des complications métaboliques associées.

II.3. L'hyperlipidémie

II.3.1. Définition de l'hyperlipidémie

L'hyperlipidémie est une dysrégulation du métabolisme lipidique caractérisée par une élévation persistante des lipides plasmatiques, notamment des LDL-cholestérol et/ou des triglycérides, associée ou non à une diminution du HDL-cholestérol. Elle résulte d'un déséquilibre entre la synthèse, l'absorption, le transport et la clairance des lipoprotéines, entraînant l'accumulation de particules athérogènes dans la circulation sanguine. Cette condition, d'origine primaire ou secondaire, constitue un facteur de risque majeur, causal et modifiable des maladies cardiovasculaires athéroscléreuses, en particulier par son rôle dans l'inflammation vasculaire et le stress oxydatif. (FERENCE et al., 2021 ; Mach et al., 2023)

II.3.2. Physiopathologie de l'hyperlipidémie

L'hyperlipidémie est une conséquence d'un déséquilibre du métabolisme des lipoprotéines ApoB, caractérisé par une augmentation du nombre de LDL, VLDL et remnants circulants. Ce déséquilibre résulte principalement d'une augmentation de leur production hépatique et/ou d'une diminution de leur clairance via le récepteur LDL.

Les particules ApoB circulantes pénètrent dans la paroi artérielle où elles sont retenues dans l'intima. Cette rétention constitue l'événement initial de l'athérogenèse. Les LDL subissent ensuite des modifications oxydatives et déclenchent une réponse inflammatoire impliquant les macrophages et la formation de cellules spumeuses. L'accumulation progressive de lipides et de cellules inflammatoires conduit à la formation de la plaque d'athérome, base des complications cardiovasculaires de l'hyperlipidémie.([FERENCE et al., 2021](#) ; [BORÉN et al., 2024](#))

Chapitre II : Matériel et méthodes

Partie I : Récolte, extraction et identification chimique de *Rhamnus alaternus* ainsi le choix du matériel animal

I.1. Matière végétale

En juin 2023, des échantillons foliaires de *Rhamnus alaternus* ont été recueillis dans la commune de Taffisour, localité présentant un climat semi-aride, sec et froid, située à 88.3 km au sud-est de la wilaya de Sidi Bel Abbès (Algérie) [Latitude 34° 46' 23,453" N (34,7731815°) ; Longitude 0° 13' 24,322" E (-0,2234228°)]. Les feuilles de la plante ont été d'abord purifiées, séchées à température ambiante à l'abri de la lumière, puis broyées en poudre avant d'être conservées dans des contenants en verre hermétiques afin de maintenir leur intégrité en vue de l'extraction (fig. 4).

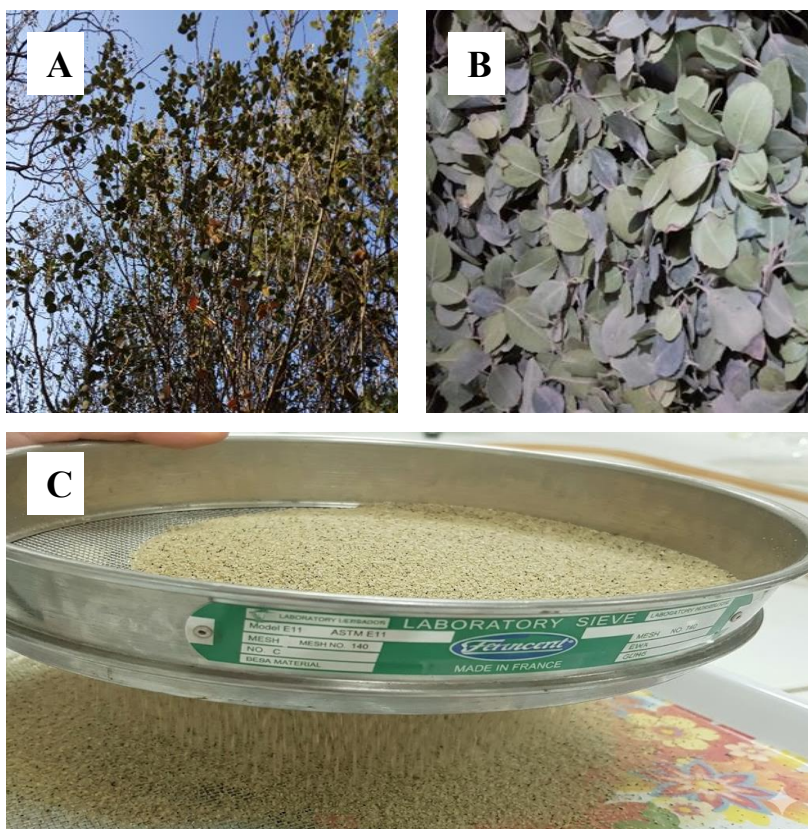


Figure 4 : *Rhamnus alaternus* : (A) : site de collecte ; (B) : feuilles sèches du *Rhamnus alaternus* ; (C) : Broyage et tamisage

I.2. Extraction des feuilles de *Rhamnus alaternus* (EMR) et détermination du rendement de *Rhamnus alaternus*

L'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a été obtenu par macération selon le protocole établie par [Rocchetti et al. \(2019\)](#), avec certaines modifications. Cinquante grammes de poudre de feuilles sont mélangés avec un litre de méthanol à 90°, puis le mélange est soumis à une macération à température ambiante pendant soixante-douze heures, à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique (72h). Le macérât est ensuite filtré avec le papier de filtration Whatman n° 1, puis le filtrat est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (Boeco RVO 400, type SD, Allemagne) à 40 °C afin d'éliminer le méthanol par évaporation. L'extrait des feuilles de *Rhamnus alaternus* est prélevé, pesé, puis conservé à une température de 4 °C dans des contenants opaques en vue d'une utilisation ultérieure.

Le rendement d'extraction des feuilles de *Rhamnus alaternus* est déterminé conformément à l'équation formulée par [Houngnimassoun et al. \(2017\)](#) :

$$R(\%)=(M\times100)/M0$$

R (%) : rendement d'extraction.

M : masse de l'extrait exprimée en g.

M0 : masse de la poudre des feuilles du *Rhamnus alaternus* utilisée pour l'extraction exprimée en g.

I.3. Identification chimique de l'extrait méthanolique du *R. alaternus* par HPLC/UV

La caractérisation qualitative et quantitative des composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV (HPLC/UV), conformément à la méthode analytique décrite par [Valencia et al. \(2012\)](#), en utilisant un système HPLC Agilent 1100 muni d'une colonne Poroshell 120 EC-C18 (100 mm × 2.1 mm, 2.7 µm), sélectionnée pour sa capacité à séparer les acides phénoliques et les flavonoïdes. La phase mobile binaire est constituée d'une solution aqueuse d'acide formique à 5 % (A) et de méthanol (B).

L'élution s'est réalisée à un débit constant de 1 mL/min et à une température de colonne de 55 °C, dans le but d'établir des conditions chromatographiques optimales. Dix microlitres de solution échantillon ont été injectés lors de chaque analyse. Le programme d'élution en

gradient consistait en une composition de 30 % de B de 0 à 15 minutes, suivie d'une augmentation progressive à 40 % de B de 15 à 20 minutes, puis 45 % de B de 20 à 30 minutes, 60 % de B de 30 à 50 minutes, 80 % de B de 50 à 65 minutes, pour atteindre enfin 100 % de B de 65 à 70 minutes. La longueur d'onde de 290 nm a été sélectionnée en raison de sa corrélation directe avec la détection des composés phénoliques.

L'identification des composés a été effectuée par la comparaison des temps de rétention ainsi que des spectres d'absorption UV des pics détectés dans l'extrait avec ceux des composés étalons de référence. Les composés de référence monomères comprenaient des acides phénoliques, notamment l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide m-coumarique et l'acide rosmarinique, des flavonoïdes tels que la catéchine, la galangine, la pinocembrine, l'acacétine, la rutine, la chrysine, l'apigénine, le kaempférol, la lutéoline et la quercétine, ainsi que l'acide ascorbique. Par la suite, un rapport de dilution de 1:100 (v/v) de l'échantillon de référence dans du méthanol a été appliqué afin d'atteindre la concentration nécessaire pour les injections chromatographiques préalables à l'analyse. Des solutions mères de méthanol à une concentration de 1 mg/mL ont été élaborées pour les étalons de chaque composé de référence. La quantification a été effectuée à l'aide de courbes d'étalonnage externes élaborées à partir de ces étalons, et les concentrations de chaque composé ont été rapportées en milligrammes par gramme d'extrait méthanolique brut de *Rhamnus alaternus*, conformément aux protocoles antérieurement établis.

I.4. Dosage des composés phénoliques

I.4.1. Dosage des polyphénols totaux (PT)

La teneur totale en polyphénols de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a été quantifiée selon la méthode de Folin–Ciocalteu, telle que définie par [Singleton et al. \(1999\)](#), reposant sur la mesure de la concentration globale des groupements hydroxyles contenus dans l'extrait.

Procédure : Sous obscurité, 0.5 mL d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) sont mélangés à 5 mL d'eau distillée ainsi qu'à 0.5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après un délai de trois minutes, on ajoute 0.5 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à une concentration de dix pour cent (p/v). Après une incubation d'une heure à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 760 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant comme blanc une solution dépourvue d'extrait, constituée d'eau

distillée dans un volume réactionnel équivalent. Pour permettre le calcul de la concentration en polyphénols totaux exprimée en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de *Rhamnus* (EAG/g), une courbe d'étalonnage linéaire fondée sur l'acide gallique a été établie.

I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

Le dosage des flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a été réalisée en utilisant la méthode colorimétrique à l'aluminium trichlorure (AlCl_3) telle que décrite par [Woisky et Salatino \(1998\)](#).

Procédure : Un millilitre de l'extrait a été mélangé à un millilitre de chlorure d'aluminium dosé à 2 %. Après une incubation de dix minutes à température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel est déterminée à une longueur d'onde de 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en la comparant à celle d'un blanc ne contenant pas d'extrait, constitué d'eau distillée dans le même volume réactionnel. Pour quantifier la concentration en flavonoïdes totaux dans le *Rhamnus*, une courbe d'étalonnage linéaire basée sur la quercétine a été établie. Cette concentration est quantifiée en milligrammes d'équivalent quercétine par gramme de *Rhamnus* (EQ/g).

I.4.3. Détermination du potentiel anti-radicalaire par le test au DPPH

Le DPPH est un radical libre stable qui se distingue par sa couleur violette foncée et son pic d'absorption optimal situé autour de 517 nm. En présence de composés antioxydants, ce radical se transforme en un produit moléculaire plus stable en cédant un électron ou un atome d'hydrogène, ce qui entraîne un changement de couleur vers le jaune, facilitant ainsi la mesure spectrophotométrique de l'activité antioxydante.

La mesure de l'activité antioxydante des extraits de *Rhamnus alaternus* a été effectuée en utilisant la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), conformément au protocole recommandé par [Arnous et al. \(2002\)](#).

Procédure : Un volume de 25 μL d'extrait d'EMR, préparé à des concentrations distinctes de 5, 10, 20 et 50 $\mu\text{g/mL}$, a été mélangé avec 975 μL de DPPH à une concentration de 60 μM . Le mélange réactionnel est incubé pendant une période de trente minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Par la suite, l'absorbance est déterminée à une longueur d'onde de 517 nm en le comparant à un blanc dépourvu d'extrait, constitué d'eau distillée dans un volume de réaction identique. L'acide ascorbique sert de témoin positif ; par conséquent, son absorbance

est déterminée dans des conditions expérimentales équivalentes, chaque essai étant effectué en triplicata.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de pourcentage d'activité anti-radicalaire (% RSA, pour Radical Scavenging Activity), calculé selon la formule suivante :

$$\left[RSA\% = \frac{(Abs_C - Abs_E)}{Abs_{contrôle} \times 100} \right]$$

Abs C : absorbance de contrôle.

Abs E : absorbance d'échantillon.

La concentration effective médiane (CE₅₀) a été dérivée du graphique DPPH [%RSA = f (concentrations)] par le biais de la méthode de régression linéaire (Molyneux, 2004). Elle a été exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique/gramme d'extrait sec (mg EAA/g ES) (Prakash et al., 2007).

I.4.4. Évaluation du potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique

La mesure de l'inhibition de la peroxydation lipidique a été effectuée en suivant le protocole de Yagi et al. (1976). Cette méthode repose sur la formation d'un pigment rose dans un milieu réactionnel impliquant l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA).

Procédure : Cent microlitres de tampon tris-HCl (10 mM, pH 7.4) sont mélangés avec cent microlitres d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) à des concentrations comprises entre 5 et 100 µg/mL. Après une phase d'incubation d'une heure à 37 °C, 100 µL d'acide thiobarbiturique sont ajoutés au mélange réactionnel, lequel est par la suite ré-incubé pendant une heure à 100 °C. Enfin, l'absorbance du mélange réactionnel est déterminée à une longueur d'onde de 532 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-Visible. Le malondialdéhyde a été choisi comme référence pour quantifier les résultats exprimés en nmol de MDA par milligramme de protéine.

I.5. Analyse statistique

Les données obtenues ont été exprimées sous forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée afin de comparer les différents groupes expérimentaux. Dans un premier temps, une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur a

été utilisée pour évaluer les différences globales entre les groupes. Lorsque des différences significatives étaient observées, un test post-hoc de Tukey (Tukey Honestly Significant Difference, HSD) a été appliqué afin d'identifier les comparaisons multiples significatives entre les groupes. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un logiciel statistique approprié SPSS.

I.6. Animaux et conditions de l'expérience

Quarante-deux rats mâles Wistar albinos avec un poids moyen de 120 ± 15 g ont été utilisés dans les deux présentes expériences. Ces animaux ont été fournis par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie). Le protocole se conforme aux directives édictées par le National Institute of Health (NIH-USA).

Dès leur réception, les rats ont été répartis de manière aléatoire dans des cages en sept groupes expérimentaux (4 groupes pour la première étude et 3 pour la deuxième), chaque groupe est composé de 6 rats. Ces animaux sont soumis à une période d'acclimatation de deux semaines, à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité. Les rats ont un accès libre à la nourriture (croquettes provenant de la société de production des aliments pour animaux, Bouzaréa, Alger) et à l'eau.

Partie II : Activité antidiabétique de l'extrait de *Rhamnus alaternus* chez les rats Wistar

II.1. Protocole de traitement des animaux

L'induction du diabète chez les rats (G1 et G3) a été réalisée par injection intraperitoniale (*i.p*) d'une dose unique de 200 mg/kg de l'alloxane monohydraté selon le protocole d'[Ashok Kumar et al. \(2012\)](#), ainsi suivie d'une administration de 5% d'une solution glucosée pendant 48 h afin d'éviter une hypoglycémie réactionnelle potentiellement mortelle, conformément au protocole standard décrit par [Rohilla et Ali \(2012\)](#). Après la période d'adaptation, les quatre groupes expérimentaux ont été désigné comme suite:

G1 : groupe témoin (contrôle négatif) ;

G2 : Les rats ont reçu une dose unique de 200 mg/kg d'alloxane monohydraté (*i.p*) et une solution glucosée (5%) pendant 48 ;

G3 : Les rats ont reçu l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* en raison de 200 mg/kg de poids par gavage pendant 90 jours ;

G4 : Les rats ont reçu une dose unique de 200 mg/kg d'alloxane monohydraté (*i.p*) et une solution glucosée (5%) pendant 48 ; puis l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* en raison de 200 mg/kg de poids par gavage à partir des 7^{ème} jours d'induction durant 90 jours.

II.2. Evaluation du poids corporelle

Chaque semaine, les poids des rats ont été enregistrés à l'aide d'une balance de précision (Sartorius, Göttingen, Allemagne).

II.3. Évolution de la glycémie

Suite à un jeûne de 12 heures, l'effet hypoglycémiant a été évalué sur une période de 90 jours, en procédant à des mesures hebdomadaires du taux de glucose sanguin à l'aide d'un glycomètre à bandelettes (Vital Check MM 1200, Corée). Une incision délicate a été réalisée latéralement, au-dessus de la veine de la queue de rat. Le sang a été instantanément absorbé par l'extrémité de la bandelette dès qu'il a été en contact avec celle-ci. La queue de l'animal a été soigneusement désinfectée au préalable à l'aide d'un coton imbibé d'alcool chirurgical.

II.4. Euthanasie, prélèvements sanguins et organiques

Après 90 jours d'expérimentation, les rats ont été euthanasiés après une mise à jeun pendant 12 h et après leurs maintiens sous une légère anesthésie de chloroforme en vue de la collection du sang et des organes.

Les échantillons sanguins ont été collectés par ponction cardiaque dans des tubes sec et héparine et les érythrocytes restants ont été lavées avec la solution du sérum physiologique trois fois et de l'eau distillée glacée est ajoutée en vue de les lysés, une centrifugation à 5000 t/min pendant 5 min a été ensuite exécutée pour éliminer les débris cellulaires et récupéré le lysat pour le dosage des enzymes antioxydantes érythrocytaires.

Le liquide péritonéal a été conservé dans une solution saline stérile tamponnée au phosphate (PBS). Le foie, le pancréas et les reins des rats ont été prélevés avec soin, puis examinés et rapidement rincés avec une solution glacée de NaCl à 0.9%. Suite à l'exérèse, les échantillons d'organes sont placés dans une solution de formol à 10 % et conservés à température ambiante en vue d'une étude histologique.

II.5. Dosage des marqueurs biochimiques

Les paramètres biochimiques ont été analysés par un automate (Mindray BS 330, Allemagne) à l'aide des kits de dosages standards commercialisés. Les dosages de chaque paramètre ont été déterminés selon les méthodes décrites par les fabricants.

II.5.1. Marqueurs glycémiq

- **Glucose sanguin**

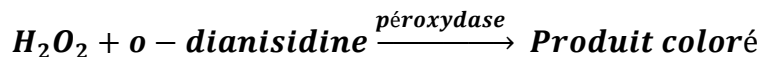
La mesure du taux de glycémie sanguin a été élaboré à l'aide du Kit de réactif de glucose (Biomérieux, France) tout en suivant la méthode enzymatique (Hexokinase /G-6-PDH).

Principe

La méthode enzymatique (Hexokinase /G-6-PDH) est fondée sur une double réaction enzymatique dont la glucose-oxydase (GOD) catalyse la réaction d'oxydation suivante :



Au cours de cette phase, le glucose est oxydé en acide gluconique, générant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui participe ensuite à la réaction enzymatique colorimétrique subséquente :



Au cours de cette phase, le H_2O_2 catalyse la réaction d'oxydation de l'o-dianisidine par le H_2O_2 en présence de la peroxydase (POD). Ce phénomène engendre une modification chromatique dont l'intensité est directement corrélée à la concentration en glucose. L'absorbance du composé coloré est évaluée à une longueur d'onde fixée à 505 nm.

II.5.2. Marqueurs lipidiques

- **Triglycérides (TG)**

L'évaluation de la concentration des triglycérides plasmatiques et lipoprotéiques a été réalisée en suivant la technique colorimétrique à l'aide du Kit Biocon, Germany

Principe

La méthode colorimétrique repose sur la détermination de l'absorbance à une longueur d'onde de 505 nm du quinoneimine, composé coloré formé par la réaction du peroxyde d'hydrogène (dérivé de l'hydrolyse enzymatique des triglycérides en glycérol et acides gras libres catalysée par les lipases), de la 4-aminoantipyrine et du 4-chlorophénol, sous l'effet catalytique de la peroxydase.

- **Cholestérol total (TC)**

La quantification de la concentration totale de cholestérol a été réalisée à l'aide d'une méthode enzymatique colorimétrique (Kit Biocon, Germany)

Principe

Cette méthode s'appuie sur la mesure spectrophotométrique, à une longueur d'onde de $\lambda = 512$ nm, d'un complexe rouge coloré issu d'une double réaction. Au cours de ces réactions, la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase catalysent la dégradation des esters de cholestérol et du cholestérol libre en cholesténone, tout en générant du peroxyde d'hydrogène. Cette réaction provoque une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de cholestérol, lors de son interaction avec le phénol (ou la 4-aminoantipyrine)

en présence de peroxydase.

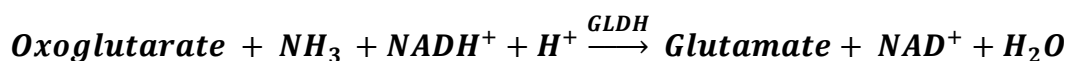
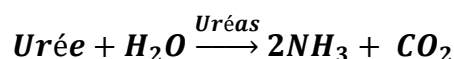
II.5.3. Dosage des marqueurs rénaux

- **Urée**

L'urémie a été quantifiée par la méthode calorimétrique enzymatique conformément aux instructions techniques du kit Chronolab, System (Berthelot, 1998).

Principe

La méthode colorimétrique de dosage repose sur la quantification de l'absorbance à une longueur d'onde de 340 nm du cofacteur NADH formé, en relation avec l'ammoniac (NH_3) et l'oxoglutarate, pour générer du glutamate, du NAD^+ et de l'eau (H_2O) en présence de la glutamate déshydrogénase (GLDH), selon le schéma réactionnel suivant :



- **Créatinine**

La quantification de la créatinine est réalisée en utilisant la méthode cinétique et colorimétrique décrite par [Whelton et al. 1994](#) à l'aide du kit Biocon, Germany

Principe

La créatinine établit un complexe coloré lors de sa réaction avec le picrate en milieu alcalin. Le principe fondamental de cette méthode consiste à mesurer l'absorbance liée à la vitesse de formation du complexe par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 500 nm, durant des intervalles initiaux brefs afin de prévenir toute interférence avec d'autres composés.

- **Acide urique**

La concentration de l'acide urique est mesurée en utilisant la méthode enzymatique colorimétrique du Kit Biolabo (France) par une méthode enzymatique colorimétrique.

Principe

Lorsque l'acide urique subit une oxydation catalysée par l'uricase, il est converti en allantoïne et en peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$). Ce dernier réagit ensuite avec la 4-aminophénazone (4-

AP) et le 2-4 dichlorophénol-sulfonate (DCPS) pour engendrer, en présence du peroxyde, un composé rouge de quinonéimine. La quantité de quinonéimine formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon, conformément aux observations rapportées par [Schultz \(1984\)](#).

II.5.4. Dosage des marqueurs hépatiques

- **Alanine aminotransférase (ALAT)**

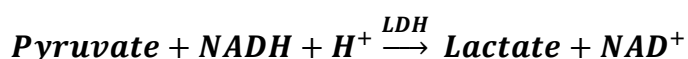
Le dosage de l'aspartate amino transférase est effectué en suivant la méthode cinétique décrite sur la fiche technique du kit biomérieux (France)

Principe

La méthode cinétique de dosage de l'ALAT repose sur l'évaluation de la diminution de l'absorbance liée à l'oxydation du NADH en NAD⁺ au cours des deux réactions suivantes :

L-alanine et α -cétoglutarate réagissent en présence de l'alanine aminotransférase (ALAT).
Glutamate et pyruvate

Au cours de cette réaction, l'alanine aminotransférase (ALAT) catalyse une transamination entre l'acide aminé L-alanine et l' α -cétoglutarate, conduisant à la formation de glutamate et de pyruvate, ce dernier étant ensuite réduit en lactate par l'action de la lactate-déshydrogénase (LDH) en présence du cofacteur NADH, lequel est oxydé en NAD⁺ selon la réaction suivante :



La mesure de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 340nm. Ainsi, Plus l'ALAT est active, plus elle produit de pyruvate, qui sera rapidement converti en lactate, consommant du NADH et faisant baisser l'absorbance. ([Bergmeyer, 1980](#))

- **Aspartate aminotransférase (ASAT)**

La mesure de l'aspartate amino transférase est réalisée en suivant la méthode cinétique décrite sur la fiche technique du kit biomérieux (France).

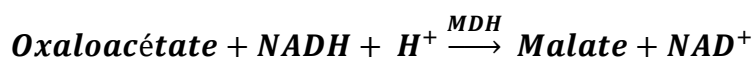
Principe

La technique cinétique de dosage d'ASAT est basée sur la mesure de la diminution

d'absorbance de l'oxydation de la NADH en NAD⁺ issue d'une double réaction enzymatique :



Dans cette étape l'ASAT catalyse la réaction entre le L-aspartate) et le 2-oxoglutarate (ou α -cétooglutarate) en produisant le Glutamate et l'Oxaloacétate qui est ensuite réduit en malate grâce à une autre enzyme : la malate déshydrogénase (MDH) en utilisant le NADH (nicotinamide adénine di nucléotide réduit) comme cofacteur, qui est oxydé en NAD⁺ sous la réaction suivant :



Le NADH absorbe la lumière à 340 nm, tandis que le NAD⁺ ne l'absorbe pas. Ainsi, en mesurant la diminution progressive de l'absorbance à 340 nm, on peut déduire l'activité de l'ASAT dans l'échantillon.

- **Phosphatase alcaline (PAL)**

L'analyse de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) est réalisée à l'aide du kit BioVision , USA et en suivant une méthode enzymatique colorimétrique.

Principe

L'absorbance du p-nitrophénol, produit de l'hydrolyse du phosphate p-nitrophényl catalysée par la phosphatase alcaline en présence d'ions magnésium, est déterminée à une longueur d'onde de 405 nm. L'intensité de la coloration produite est directement corrélée à l'activité de la phosphatase alcaline présente dans l'échantillon (Thomas, 1998).

- **Gamma-glutamyl-transférase (γ -GT)**

Le dosage du gamma glutamyl transférase (γ -GT) est effectué à l'aide du Kit BIOLABO

Principe

La technique colorimétrique de dosage est basée sur la mesure de l'absorbance du p-nitroaniline un produit de la réaction entre L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide et glycylglycine catalysée par la γ -GT à une longueur de 405nm.

- **Albumine**

La quantification du taux d'albumine est réalisée selon la méthode colorimétrique en utilisant le kit Biolabo, France. Cette méthode repose sur la quantification du complexe coloré résultant de la réaction de l'albumine avec le vert de bromocrésol en milieu acide, réalisée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 630 nm.

II.6. Détermination du statut antioxydant

- **Dosage de la peroxydation lipidique (malondialdéhyde MDA)**

La quantification du malondialdéhyde dans le surnageant mitochondrial est réalisée en suivant le protocole décrit par [Yagi et al. \(1976\)](#). Basée sur la mesure de l'absorbance, la phase butanolique est un complexe fluorescent formé par la réaction de fusion MDA-TBA, mesurée par l'absorbance à 553 nm.

Mode opératoire

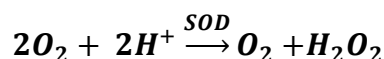
- Mélanger et agiter 20 µl de l'échantillon (hépatique ou rénale) avec 0.8 mL de H₂SO₄ qui favorise la précipitation des protéines et autres composants indésirables.
- Ajouter 100 µl de solution d'acide phospho-tungstique (10%: P/V) au mélange pour permettre la précipitation des lipides oxydés
- Incuber pendant 5 min à l'obscurité
- Centrifuger à 1600 tours/min pendant 10 min
- Resuspendre le culot dans 0.4 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄)
- Additionner de 60 µl d'acide phosphotungstique
- Centrifuger de nouveau 10 min à 1600 tours/min et éliminer le surnageant.
- Dissoudre le culot résultant dans 2 mL d'eau distillée et 0.5 mL de réactif TBA (335 mg d'acide thiobarbiturique dans 50 mL d'eau + 50 mL d'acide acétique 99%).
- Chauffer le mélange dans un bain-marie à 95 °C pendant 60 min

- Refroidir dans un bac à glace
- Extraire 2.5 mL de butanol pour permettre la lecture de l'absorbance.

Une droite d'étalonnage est dessinée en utilisant le tétraméthoxypropane (TMP), un standard qui libère du MDA lors de l'hydrolyse et les résultats sont exprimés en équivalents MDA

- **Dosage du superoxyde dismutase (SOD)**

Le superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui prévient l'accumulation de l'anion superoxyde (O_2^-), un radical libre toxique produit durant la respiration cellulaire, en catalysant sa conversion en H_2O_2 et O_2 , ce qui diminue le stress oxydatif selon le mécanisme réactionnel suivant :



Mode opératoire

- Ajouter 250 μ l de l'échantillon à 400 μ l du mélange éthanol/chloroforme (62.5/37.5 : V/V) qui sert d'extracteur du SOD en éliminant les lipides et les protéines interférentes.
- Centrifuger à 4000 tr/min pendant 5 min en vue de la séparation des phases.
- Mélanger 5 μ l de surnageant récupéré avec 10 μ l de tampon phosphate et 100 μ l de réactif 1
- Ajouter 10 μ l de NADPH (cofacteur de la chaîne de réduction) au mélange
- Incuber pendant 15 min à une température ambiante.
- Ajouter 100 μ l de réactif 2
- Incuber pendant 20 min,
- Mesurer l'absorbance par spectrophotométrie à 540 nm ([Elstner et al., 1983](#)).

Composition et rôle des constituants du réactif 1

5 mL de tampon phosphate (0.2M/L, pH 7.4) qui sert à maintenir un environnement stable

1 mL d'hydroxylamine chloride (0.69 mg/mL) qui sert à capter l'anion superoxyde (O_2^-) et forme du nitrite (NO_2^-)

1 mL d'antraquinone (0.1332 mg/mL) qui sert de générateur d'anions superoxydes en présence de NADPH

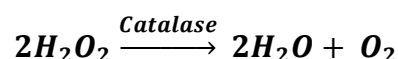
1 mL de diaphorase (1 mg/mL d'une solution de 15 U/mL), une enzyme qui participe à la réduction de l'antraquinone pour produire de l' O_2^- .

Composition et rôle des constituants du réactif 2

6 mL de sulfanilamide à 10 mg/mL d'HCl à 25% et 6mL de naphylethylène diamine à 0.2 mg/mL qui sert à la formation d'un composé coloré mesurable à 540 nm en réagissant avec le nitrite (NO_2^-).

- **Dosage du catalase (CAT)**

Le dosage de la catalase (CAT) est exécuté selon le protocole de [Lück \(1963\)](#), une enzyme clé du système antioxydant qui sert à protéger les cellules en décomposant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (un sous-produit du métabolisme cellulaire), en eau (H_2O) et oxygène moléculaire (O_2) selon la réaction suivante



Mode opératoire

-Mélanger 1 mL de l'échantillon avec 1 mL de H_2O_2 et 1 mL de tampon phosphate (50 mM/L, pH 7.4) pour maintenir des conditions optimales et 2 mL de catalase (3 U/ μ L) qui sert d'initiateur de la réaction.

-Incuber pendant 5 min.

-Ajouter 1 mL du réactif sulfate d'oxyde de titanium ($TiOSO_4$) (1.7 g dans 500 mL d' H_2SO_4 2N) pour arrêter la réaction et former un complexe coloré avec le H_2O_2 restant.

-Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 240 nm tout en sachant que cette dernière est disproportionnelle avec la concentration de la catalase

Les concentrations résiduelles de H_2O_2 sont mesurées en utilisant une série d'étalons de H_2O_2 en présence de tampon phosphate et de réactif $TiOSO_4$, afin d'obtenir des concentrations allant de 0.5 à 2 mM/L dans le milieu réactionnel.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique est :

$$A = \log A1 - \log A2.$$

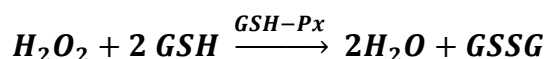
A1 : la concentration de H₂O₂ de départ.

A2 : la concentration de H₂O₂ après incubation (au bout de 5 min).

L'activité spécifique est exprimée en U/mg.

- **Dosage du glutathion peroxydase (GSH-Px)**

La mesure d'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px) repose sur le principe de [Paglia and Valentine \(1967\)](#). Une enzyme qui neutralise les peroxydes toxiques comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les hydroperoxydes lipidiques en catalysant la réaction suivante :



-GSH (glutathion réduit) = un puissant antioxydant intracellulaire.

-GSSG (glutathion oxydé) = forme oxydée du glutathion après neutralisation du H₂O₂

Le dosage spectrophotométrique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) s'appuie sur une réaction couplée impliquant la glutathion réductase (GR), au cours de laquelle la GSH-Px catalyse la conversion du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et la quantité résiduelle de GSH est déterminée à l'aide du réactif d'Ellman (DTNB), générant un composé jaune mesurable par spectrophotométrie à 405 nm.

Mode opératoire

-Mélanger 0.1 mL d'azide de sodium (un composé permettant l'inhibition la catalase, pour éviter l'interférence) avec 0.2 mL de l'échantillon, 0.2 mL de tampon tris-Hcl (permettant la stabilisation du PH dans le milieu réactionnel), 0.2 mL de glutathion et 0.1 mL de peroxyde d'hydrogène

-Incuber pendant 10 min à 37 °C.

-Ajouter 0.4 mL de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% (un substrat permettant l'arrêt de la réaction enzymatique en précipitant les protéines).

Centrifuger et récupérer le surnageant

-Ajouter le réactif d'Ellman (19.8 mg d'acide 5, 5'-dithiobisnitro benzoïque (DTNB) dans 100 mL de solution de nitrate de sodium à 0.1%).

La mesure a ensuite été réalisée par spectrophotométrie à 405 nm. Les résultats sont exprimés en U/mg.

II.7.Dosage des bio-marqueurs inflammatoires

- **Dosage de la prostaglandine E2**

La prostaglandine E2, ou PGE2, est une molécule bioactive participant aux mécanismes de l'inflammation, de la douleur, de la fièvre ainsi qu'à divers autres processus physiologiques.

Le dosage de la PGE2 dans le liquide péritonéal repose sur la méthode décrite dans le kit ELISA, une technique immuno-enzymatique fondée sur une inhibition compétitive entre la PGE2 présente dans l'échantillon à concentration variable et la PGE2 marquée à la peroxydase de raifort (HRP) à concentration précise, permettant leur fixation sur des sites spécifiques à la PGE2 d'un anticorps monoclonal pré-endu sur une microplaque, suivie du lavage du mélange réactionnel afin d'éliminer le conjugué non fixé, puis de l'ajout d'un substrat chromogène qui interagit avec l'enzyme HRP pour générer une coloration vert jaunâtre détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm.

L'absorbance varie en fonction inverse de la concentration de PGE2 dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage du PGE2, établie à partir de concentrations définies, est employée afin de déterminer avec précision la quantité de PGE2 présente dans l'échantillon.

- **Dosage du facteur de nécrose tumorale (TNF- α)**

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) constitue une cytokine pro-inflammatoire essentielle participant aux mécanismes de la réponse immunitaire et inflammatoire. La quantification est réalisée sur l'homogénat tissulaire hépatique selon la méthode immuno-enzymatique spécifiée dans le Kit ELISA.

Un anticorps spécifique du TNF- α est fixé sur les parois des puits microscopiques des plaques de microtitration, ce qui autorise la fixation du TNF- α contenu dans l'échantillon ou dans l'étalon. Par la suite, un anticorps monoclonal dirigé contre le TNF- α , conjugué à la biotine,

est introduit afin de se lier au TNF- α . Après incubation et élimination par lavage de l'anticorps biotinylé non lié, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) est ajoutée dans les puits, lesquels font l'objet d'un second lavage. Par la suite, de l'acide phosphorique est introduit dans les puits, induisant le développement d'une coloration proportionnelle à la quantité de TNF- α liée. L'évaluation de l'intensité chromatique est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

II.8. L'étude histopathologique

Cette analyse microscopique a pour objectif d'évaluer l'intégrité de l'architecture tissulaire ainsi que de caractériser les éventuelles modifications structurales résultant des divers traitements.

L'intégralité des analyses histopathologiques ont été réalisées et examinées au laboratoire d'anatomie pathologique du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Sidi Bel Abbès, conformément aux protocoles standards de coloration énoncés par [Drury et Wellington \(1980\)](#).

II.8.1. La fixation

L'objectif consiste à prévenir la dégradation des tissus par les microorganismes ou par autolyse, tout en conservant les constituants cellulaires et tissulaires dans un état proche de celui du vivant, en les immergeant dans un liquide approprié au volume des échantillons, variant de quelques heures pour un petit fragment biopsique à plusieurs semaines pour un cerveau humain entier.

Les fixateurs liquides les plus fréquemment employés sont le formol ainsi que le liquide de Bouin, ce dernier constituant un mélange de formol et d'acide picrique.

Dans notre contexte, les organes sont immergés dans une solution de formol à 10 %, reconnue comme l'un des fixateurs les plus efficaces pour les protéines, garantissant ainsi la conservation de nos échantillons sur une période de plusieurs semaines.

II.8.2. La mise en cassette

Chaque échantillon est inséré dans une cassette qui est plongée pendant au minimum une heure dans un récipient fermé de formol à 10%, d'un volume de 10 fois le volume des prélèvements.

II.8.3. La déshydratation

Cette phase a pour objectif de retirer le fixateur ainsi que l'eau des échantillons afin de faciliter leur incorporation dans la paraffine, un composé hydrophobe. À cette fin, les échantillons sont plongés dans de l'alcool selon une durée progressive, conformément à un gradient défini : alcool à 70° (acétone I) durant quarante-cinq minutes, alcool à 90° pendant quarante-cinq minutes, puis alcool absolu à 100° pendant quarante-cinq minutes. Cette immersion s'effectue dans des récipients hermétiquement clos, dans un milieu correctement ventilé ou sous une hotte aspirante, à température ambiante.

II.8.4. La clarification

Cette phase vise à éliminer l'alcool de l'échantillon en le soumettant à trois bains consécutifs de toluène ou de xylène à une température de 40°C pendant une durée de 2 heures.

II.8.5. L'inclusion

L'objectif de l'inclusion consiste à assurer une cohérence rigoureuse des échantillons, ce qui permet la réalisation de coupes fines et régulières ainsi que l'amélioration de la transmission lumineuse pour optimiser l'observation des sections. L'échantillon est déposé dans un moule d'inclusion contenant de la paraffine fondue pure maintenue à une température comprise entre 56 et 58 °C ; après refroidissement, un bloc solide se forme à l'intérieur du moule, prêt à être sectionné. La procédure d'inclusion requiert un délai total compris entre vingt-quatre et quarante-huit heures.

II.8.6. La microtomie

Des sections d'une épaisseur variant de 2 à 5 µm sont obtenues en effectuant un mouvement régulier et successif du bloc (contenant l'échantillon) devant la lame du microtome. Toutes les tranches vont constituer une série de coupes tissulaires prélevées formant un ruban.

II.8.7.Étalement des coupes sur les lames

L'identification du bloc est inscrite sur la lame à l'aide d'un crayon diamanté avant sa collecte pour la coupe. Par la suite, elles sont disposées sur une plaque chauffante à une température de 37 degrés pour favoriser leur étalement.

II.8.8. La coloration

Cette phase a pour objectif d'optimiser la différenciation entre les différents éléments cellulaires et tissulaires par le renforcement du contraste. Puisque les colorants sont en solution aqueuse et que la paraffine présente une nature hydrophobe, il convient de procéder initialement à la déparaffinisation des lames à l'aide de chaleur et de bains de toluène, suivie d'une réhydratation par immersion successive dans des bains d'alcool de concentration dégressive, puis dans de l'eau distillée. Les lames sont immergées successivement dans des solutions d'hématoxyline puis de carbonate de lithium, avec des lavages intermédiaires à l'eau, afin d'effectuer une coloration trichromique à l'hématoxyline.

II.8.9. Le montage

Après avoir éliminé les gouttelettes d'eau susceptibles d'entraver l'observation microscopique par un processus de déshydratation, effectué par immersion successive dans deux bains d'alcool de xylène et d'éthanol pendant quinze minutes. Une faible quantité de colle EUKITT ou de baume du Canada de montage, dont l'indice de réfraction est similaire à celui du verre, est déposée sur les coupes, puis une lamelle est positionnée de sorte que la colle se répartisse uniformément sur toute la surface de la coupe sans entraîner la formation de bulles d'air. Les lames préparées sont laissées à sécher avant d'être analysées au microscope.

II.9. Analyse statistique

Les données obtenues ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée afin de comparer les différents groupes expérimentaux. Dans un premier temps, une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur a été utilisée pour évaluer les différences globales entre les groupes. Lorsque des différences significatives étaient observées, un test post-hoc de Tukey (Tukey Honestly Significant Difference, HSD) a été appliqué afin d'identifier les comparaisons multiples significatives entre les groupes. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un logiciel statistique approprié SPSS.

Partie III : L'activité anti-hyperlipidémique du *Rhamnus alaternus* chez les rats Wistar

III.1. Protocole de traitement des animaux

Le régime hyperlipidique (HFD) était composé de 700 g d'aliment standard en poudre (provenant de la société de production des aliments pour animaux, Bouzaréa, Alger), 200 g de graisse d'agneau et 100 g d'huile de tournesol, représentant respectivement 70 %, 20 % et 10 % de la composition du régime. Les préparations étaient renouvelées tous les trois jours et conservées à 4 °C ([Bendahmane et al., 2022](#)).

Après la période d'adaptation, les quatre autres groupes expérimentaux ont été désignés comme suit :

G1 : groupe témoin (contrôle négatif)

G2 : Les rats ont reçu le régime HFD pendant 30 jours ;

G3 : Les rats ont reçu le régime HFD et 200 mg/kg d'EMR pendant 30 jours (au même temps).

Après 30 jours d'expérimentation, les rats ont été euthanasiés après une mise à jeun pendant 12 h et après leurs maintiens sous une légère anesthésie de chloroforme en vue de la collection du sang et des organes.

Les échantillons sanguins ont été collectés par ponction cardiaque dans des tubes sec et héparine et les érythrocytes restants ont été lavées avec la solution du sérum physiologique trois fois et de l'eau distillée glacée est ajoutée en vue de les lysés, une centrifugation à 5000 t/min pendant 5 min a été ensuite exécutée pour éliminer les débris cellulaires et récupéré le lysat pour le dosage des enzymes antioxydantes érythrocytaires.

Le liquide péritonéal a été conservé dans une solution saline stérile tamponnée au phosphate (PBS). Le foie, le cœur et les reins des rats ont été prélevés avec soin, puis examinés et rapidement rincés avec une solution glacée de NaCl à 0.9%. Suite à l'exérèse, les échantillons d'organes sont placés dans une solution de formol à 10 % et conservés à température ambiante en vue d'une étude histologique.

III.2. Évaluations biochimiques, statut antioxydant, marqueurs inflammatoires et études histologiques

L'ensemble des analyses biochimiques sériques, tissulaires et péritonéales a été exécuté en suivant rigoureusement les mêmes principes, modes opératoires et kits commerciaux que ceux détaillés lors du premier essai.

Cette uniformité méthodologique s'applique strictement aux paramètres suivants :

- Glucose sanguin.
- Triglycérides (TG) et Cholestérol total (CT).
- Urée, Créatinine et Acide urique.
- Alanine aminotransférase (ALAT), Aspartate aminotransférase (ASAT), Phosphatase alcaline (PAL), Gamma-glutamyl-transférase (gamma-GT) et Albumine.
- Malondialdéhyde (MDA), Superoxyde dismutase (SOD), Catalase (CAT) et Glutathion peroxydase (GSH-Px).
- Prostaglandine E2 (PGE2) et Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-alpha).
- Histopathologie.

III.3. Analyse statistique

Les données obtenues ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée afin de comparer les différents groupes expérimentaux. Dans un premier temps, une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur a été utilisée pour évaluer les différences globales entre les groupes. Lorsque des différences significatives étaient observées, un test post-hoc de Tukey (Tukey Honestly Significant Difference, HSD) a été appliqué afin d'identifier les comparaisons multiples significatives entre les groupes. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un logiciel statistique approprié SPSS.

Partie IV : Docking moléculaire du *Rhamnus alaternus* in-silico

• Le choix et Mise en Condition des Structures Tridimensionnelles des Récepteurs

Dans le but d'investiguer les mécanismes moléculaires à l'origine des effets antidiabétiques et métaboliques de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, une analyse de docking moléculaire a été conduite sur quatre cibles enzymatiques et réceptrices majeures. Les coordonnées tridimensionnelles des structures cristallographiques ont été obtenues à partir de la base de données normalisée Protein Data Bank (RCSB PDB) le 20 janvier 2026 :

-Alpha-glucosidase (identifiant PDB : 3A4A)

-Glucokinase (identifiant PDB : 4RCH)

-Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV ; identifiant PDB : 2P8S)

- Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR-gamma ; identifiant PDB : 3G9E)

La préparation des macromolécules avant simulation a été réalisée à l'aide du logiciel BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020. Cette procédure de purification a consisté à éliminer les hétéroatomes perturbateurs, notamment les molécules d'eau de cristallisation, les ions non fonctionnels ainsi que les ligands co-cristallisés d'origine. Les structures protéiques ainsi épurées et optimisées ont été enregistrées au format PDB en prévision des phases de paramétrage de l'ancrage.

• L'acquisition et Modélisation Structurale des Ligands

Les structures chimiques des métabolites secondaires et des composés bioactifs déjà identifiés dans l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* ont été extraites le même jour depuis la base de données PubChem au format SDF (Structure Data File).

Chaque molécule a été répertoriée conformément à son identifiant unique PubChem (CID). Au moyen de l'outil de modélisation BIOVIA Discovery Studio Visualizer, les coordonnées bidimensionnelles de ces ligands ont été transformées en structures tridimensionnelles (3D), soumises à une hydrogénation, puis exportées au format PDB. Les rotations autour des liaisons covalentes ont été maintenues afin de garantir une flexibilité conformationnelle optimale au cours des simulations d'ancrage.

- **Simulations d'amarrage moléculaire réalisées par docking aveugle (Blind Docking)**

Les simulations de docking moléculaire ont été réalisées au moyen de l'algorithme d'optimisation empirique AutoDock Vina (version 1.1.2). Dans le but d'éliminer tout biais relatif à la localisation des sites actifs et de cartographier exhaustivement l'ensemble des cavités topographiques des protéines, une stratégie de docking aveugle intensif (blind docking) a été adoptée.

Le paramétrage de la grille de recherche (grid box) a été réalisé de manière à couvrir intégralement la surface tridimensionnelle de chaque macromolécule. Afin d'optimiser la validité statistique de l'échantillonnage conformationnel et d'assurer la convergence vers des minima énergétiques globaux, le paramètre d'exhaustivité a été établi à 8.

La méthode stochastique globale de Monte Carlo, associée à la souplesse algorithmique des ligands, a été intégrée à travers la plateforme en ligne validée par [Moussa et al. \(2025\)](#). Cette interface a permis la conversion automatisée des fichiers vers le format standardisé PDBQT, en incorporant les charges partielles de Gasteiger ainsi que les potentiels atomiques d'AutoDock.

Analyses post-docking et caractérisation des interactions complexes.

À l'issue du criblage virtuel, les complexes protéine-ligand ont été ordonnés selon leur affinité thermodynamique, représentée par l'énergie libre de liaison (ΔG , en kcal/mol). Les configurations d'ancrage les plus stables, caractérisées par les scores énergétiques les plus faibles, ont été sélectionnées pour une analyse géométrique détaillée.

La représentation tridimensionnelle (3D) des complexes optimisés, accompagnée de la cartographie bidimensionnelle (2D) des interactions intermoléculaires sous-jacentes, a été effectuée à l'aide de BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020. Cette analyse post-docking a autorisé une caractérisation précise de la nature des interactions de contact, notamment : les liaisons hydrogène (classiques et carbonées), les interactions électrostatiques ainsi que celles de Van der Waals, et les interactions hydrophobes impliquant les systèmes π (empilements π - π , interactions π -alcyle, etc.).

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie I : La composition chimique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* et l'activité antioxydante *in vitro*

I.1. Détermination du rendement d'extraction

L'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* (EMR) a présenté un rendement estimé à 17%, une valeur pouvant être considérée comme relativement élevée et attestant de la richesse des feuilles en composés polaires extractibles. Ce rendement pourrait s'expliquer par la polarité élevée du méthanol, qui est réputé pour sa capacité à solubiliser efficacement une vaste gamme de métabolites secondaires bioactifs, notamment les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins ainsi que certains glycosides [Boussahel et al. \(2013\)](#).

Des études antérieures portées par [Tacherfiout et al. \(2018\)](#) et [Boussahel et al. \(2013\)](#) ont mis en évidence des rendements d'extraction méthanolique de 18.3 % et 14.48 % respectivement. Les disparités observées peuvent être attribuées à la variabilité génétique, aux conditions particulières de croissance (type de sol et méthodes culturales), aux conditions de dessiccation, ainsi qu'au procédé d'extraction. ([Benmeddour et al., 2013](#) ; [Oreopoulou et al., 2019](#)).

I.2. La composition chimique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* par HPLC/UV

Le profil phénolique de l'extrait d'EMR a été établi par HPLC avec détection UV à 290 nm, ce qui a permis une séparation et une quantification précises des acides phénoliques et des flavonoïdes ([fig. 5](#)).

L'identification des composés a été réalisée par comparaison systématique avec des étalons de référence, ce qui a permis de mettre en évidence seize constituants phénoliques distincts, comme indiqué dans le [tableau 2](#).

Le profil chromatographique a révélé que les flavonoïdes représentaient la classe chimique majoritaire au sein de l'extrait. Parmi ces composés, la quercétine a été reconnue comme étant la molécule la plus présente, avec une concentration maximale de 2.56 mg par gramme d'extrait, et un temps de rétention de 13.62 minutes. La rutine et le kaempférol étaient

également détectés à des concentrations relativement élevées, atteignant respectivement 2.13 mg/g et 1.95 mg/g, avec des temps de rétention de 17.87 minutes et 17.00 minutes.

La prédominance notable de ces flavonols indique qu'ils jouent un rôle crucial dans le potentiel bioactif de l'extrait. Les acides phénoliques ont été identifiés en quantités moindres par rapport aux flavonoïdes. L'acide caféique s'est imposé comme le principal composé de ce groupe, avec une concentration déterminée de 0.41 mg/g d'extrait et un temps de rétention de 12.75 minutes, tandis que d'autres acides, notamment les acides gallique, férulique, rosmarinique et m-coumarique, n'ont été détectés qu'en quantités marginales.

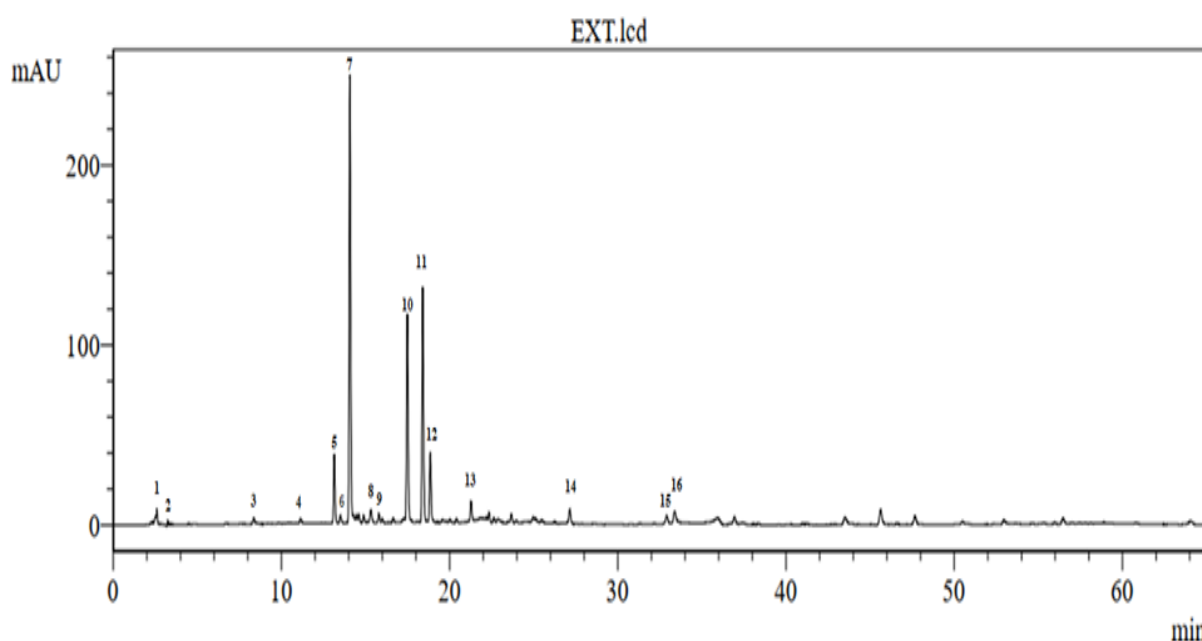


Figure 5 : Chromatogramme par HPLC/UV d'extrait EMR de *Rhamnus alaternus* à 290 nm

Tableau 2 : Composition de l'EMR par HPLC/UV (mg/g).

N° du pic	Constituant	Rt (min)	Teneur (mg/g EMR)
1	Acide gallique	2.5	0.03
2	Acide ascorbique	3.125	0.01
3	Acide férulique	8	0.02
4	Acide rosmarinique	10.75	0.01
5	Acide caféique	12.75	0.41
6	Acide m-coumarique	13.125	0.02
7	Quercétine	13.625	2.56

8	Chrysine	14.75	0.03
9	Apigénine	15.25	0.02
10	Kaempférol	17	1.95
11	Rutine	17.875	2.13
12	Galangine	18.25	0.42
13	Pinocembrine	20.625	0.04
14	Catéchine	26.25	0.03
15	Acacétine	31.75	0.03
16	Lutéoline	32.25	0.04

La coexistence de multiples sous-catégories de composés phénoliques met en évidence la complexité chimique de l'extrait méthanolique et atteste d'une diversité phytochimique importante. De manière générale, ces résultats confirment que l'EMR présente un profil phénolique riche en flavonoïdes, associé à une diversité étendue d'acides phénoliques. Une telle hétérogénéité compositionnelle pourrait induire des interactions synergiques entre les composants, ce qui accroîtrait potentiellement les activités antioxydantes et biologiques démontrées lors des analyses expérimentales subséquentes. Les résultats obtenus sont confrontés à ceux de [Tacherfiout et al. \(2018\)](#), qui ont utilisé un solvant et un matériel végétal similaires ; néanmoins, certains de ces composés n'ont pas été identifiés par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par spray (HPLC/ESI-MS2) à partir d'extraits méthanoliques de feuilles. Cette variabilité pourrait être attribuée à des divergences dans les conditions de récolte, à une sensibilité thermique ainsi qu'à des altérations des protocoles d'extraction ou d'analyse.

De plus, [Boufadi et al. \(2017\)](#) ont établi que les composés phénoliques isolés, notamment l'acide caféique, le kaempférol et la quercétine, administrés séparément, possèdent une biodisponibilité relativement réduite, ce qui indique que les extraits bruts sont susceptibles d'engendrer des effets supérieurs lors des tests biologiques en raison d'une absorption améliorée et de synergies pharmacodynamiques. Une étude récente, réalisée via des analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), a validé cette hypothèse en révélant que les extraits méthanoliques des racines de *Rhamnus alaternus* contiennent des teneurs élevées en dérivés de la quercétine et du kaempférol ([Boussahel et al., 2015](#)).

Les différences liées aux techniques d'extraction, aux méthodes analytiques et aux compartiments végétaux justifient probablement la concentration plus élevée en flavonols observée dans l'extrait analysé.

I.3. Dosage des polyphénols totaux (PT)

Les résultats du dosage des polyphénols totaux d'EMR tels que présentés dans le [tableau 3](#), indiquent une concentration élevée de ces composés, s'élevant à 222.25 mg EAG/g.

Les analyses quantitatives de la littérature révèlent une importante variabilité dans la concentration en composés phénoliques de *Rhamnus alaternus*. Par comparaison, [Boussahel et al. \(2013\)](#) ont observé des concentrations approximatives de 33.65 mg EAG/g pour l'extrait méthanolique et de 8.54 mg EAG/g pour l'extrait aqueux, à partir d'échantillons collectés à Bordj Bou Arreridj. De manière analogue, [Kosalec et al. \(2013\)](#) rapportent une concentration de 38.4 mg d'équivalents acide gallique (EAG) par gramme dans l'extrait méthanolique, alors que [Bouhazama et al. \(2024\)](#) indiquent une teneur correspondante de 50.35 mg EAG/g (50.35 µg/mg).

[Tacherfiout et al. \(2018\)](#) ont rapporté des valeurs supérieures pour l'extrait méthanolique brut des feuilles recueillies à Sidi-Ayad (Béjaïa), atteignant 155.98 mg EAG/g.

Enfin, [Gadouche et al. \(2022\)](#) ont observé une concentration supérieure, atteignant un pic maximal de 326 mg EAG/g.

Au vu de ces résultats, notre extrait se positionne parmi les plus élevés de la littérature, avec une teneur remarquable de 222.25 mg EAG/g, attestant ainsi d'une concentration exceptionnellement importante en composés phénoliques. Cette divergence manifeste entre les études s'explique par les variations climatiques et pédologiques des régions d'origine, la période de récolte ([Piao et al., 2019](#)) ainsi que par les protocoles et solvants d'extraction employés.

I.4. Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

Le dosage des composées flavonoïques d'EMR a abouti aux résultats présentés dans le [tableau 3](#), lesquels indiquent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* renferme des quantités significatives de flavonoïdes, s'élevant à 92.37 mg EQ/g.

Cette concentration est comparativement supérieure à celle publiée par [Boussahel et al. \(2013\)](#) qui ont attestés une teneur en flavonoïdes d'ordre respective de 61.12 et 1.95 mg EQ/g d'extrait méthanolique et aqueux de feuilles de *Rhamnus alaternus* récoltés dans la commune de Bordj Bou Arriridj.

De plus, une étude menée par [Gadouche et al. \(2022\)](#) attestant une concentration de 27.58 mg EQ/g de l'extrait méthanolique de feuilles de *Rhamnus alaternus* L. provenant des montagnes de Bissa en Algérie. Une concentration est significativement inférieure à celle observée dans la présente étude.

Inversement, une teneur bien plus prononcée que la nôtre a été attestée par [Bouhazama et al. \(2024\)](#) où ils ont révélé une concentration de flavonoids de 235.51 et de 200.84 mg EQ/g respectivement, pour un macérât méthanolique et un extrait méthanolique de feuilles *Rhamnus alaternus*. Selon [Yahyaoui et al. \(2018\)](#) et [Yahyaoui et al. \(2017\)](#), cette variabilité pourrait être attribuée à l'influence de multiples facteurs, notamment les déterminants génétiques, les conditions expérimentales et climatiques, la période de récolte, la localisation géographique, la composition pédologique, la nature chimique des composés végétaux, la méthode d'extraction employée ainsi que la partie de la plante analysée (feuilles, racines, etc.).

L'évaluation des concentrations en polyphénols et en flavonoïdes des plantes réalisée pendant les phases de floraison et de croissance végétative a mis en évidence une variation significative des teneurs totales en polyphénols et en flavonoïdes parmi les différents organes prélevés au cours de ces deux périodes ([Wang et al., 2017](#)). Il semble que ces variations soient essentiellement associées à la saisonnalité et aux conditions environnementales, en particulier au site de récolte ainsi qu'aux paramètres climatiques régionaux.

Tableau 3 : Teneur en composés phénoliques et CE₅₀

Extrait méthanolique du <i>Rhamnus alaternus</i>	Composés phénoliques		Activité antioxydante	
	Polyphenols EAG/g <i>Rhamnus alaternus</i>)	(mg du (mg EQ/g du <i>Rhamnus alaternus</i>)	CE ₅₀ DPPH (µg/mL)	CE ₅₀ Lipoperoxydation (µg/mL)
	223.25±8.31	92.37±2.68	184.80±4.67	29.03±0.23

Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ± écart type (n = 3).

I.5. Détermination du potentiel anti-radicalaire par le test au DPPH

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (fig. 6) possède une activité anti radicalaire significative, caractérisée par une CE_{50} de 184.80 $\mu\text{g/mL}$, comparativement à une CE_{50} de 46.95 $\mu\text{g/mL}$ pour l'acide ascorbique.

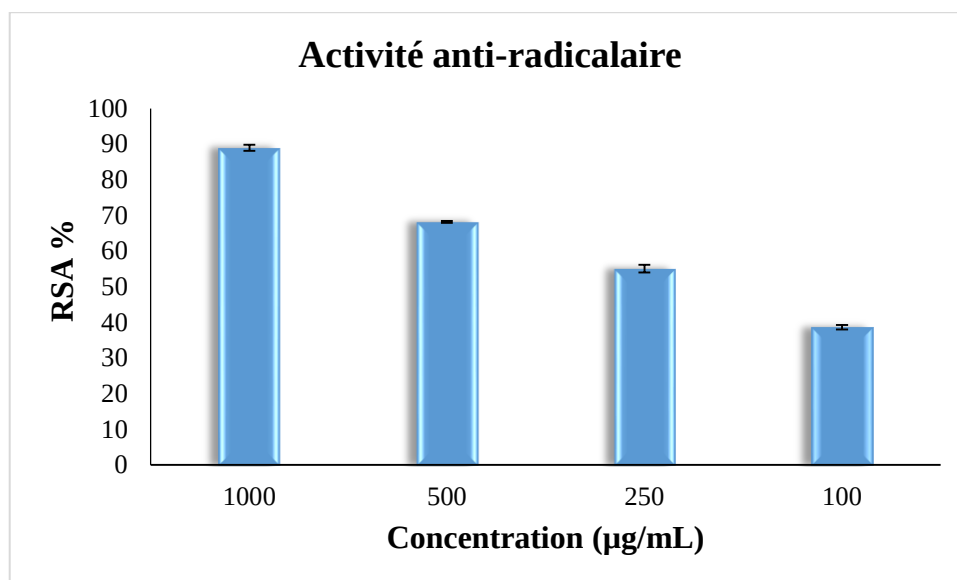


Figure 6 : Évaluation du pouvoir anti-radicalaire (RSA%) de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* vis-à-vis du radical DPPH à différentes concentrations. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations $\pm$ écart type (n = 3).

Les résultats obtenus ont été confrontés avec ceux de l'étude menée par Gadouche et al. (2022). Ces derniers ont indiqué que l'extrait méthanolique de feuilles de *Rhamnus alaternus*, prélevé dans la forêt de Bissa située au nord de la province de Chlef en Algérie, présentait une concentration efficace à 50 % (CE_{50}) de 740 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats obtenus à partir de notre extrait révèlent une activité antioxydante nettement plus élevée, ce qui pourrait être attribué à plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, on peut citer la provenance géographique des matières premières utilisées, la méthode spécifique d'extraction employée pour obtenir l'extrait, ainsi que les concentrations différentes en polyphénols.

I.6. L'inhibition de la lipoperoxydation

Le pouvoir inhibiteur de la peroxydation lipidique de l'extrait méthanolique EMR est présenté dans la figure 7

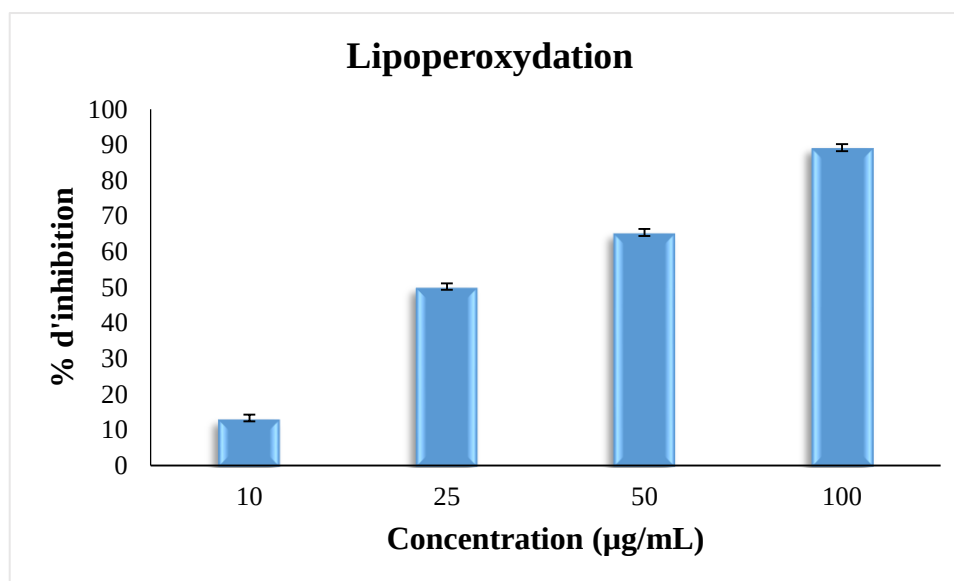


Figure 7 : Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique d'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations $\pm$ écart type (n = 3).

La peroxydation lipidique correspond à un mécanisme d'oxydation des lipides membranaires provoqué par l'activité des radicaux libres, conduisant à la production de composés toxiques tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (4-HNE). Ces composés d'oxydation interagissent avec les protéines ainsi qu'avec l'acide désoxyribonucléique (ADN), entraînant une altération de leurs fonctions, une perturbation des voies de signalisation et une modification de l'expression génétique. En conséquence, ce mécanisme contribue à la genèse de multiples pathologies liées au stress oxydatif, notamment l'athérosclérose, le diabète ainsi que les maladies inflammatoires (Nam ; 2011).

Les propriétés antioxydantes des plantes médicinales sont attribuées à leur teneur élevée en flavonoïdes et en composés phénoliques, lesquels constituent des antioxydants impliqués dans les mécanismes de défense de l'organisme contre divers radicaux libres (Zafar et al., 2023).

Les données exposées dans la figure 7 révèlent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* présente des pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique oscillant entre 13.33 % et 89.19 %. Ces résultats indiquent que l'activité inhibitrice significative de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est clairement corrélée à la dose administrée.

La concentration efficace médiane (CE₅₀) pour l'inhibition de la peroxydation lipidique a été déterminée à 29.03 ± 0.23 µg/mL.

En comparaison, une recherche menée par [Ben Ammar et al. \(2011\)](#) a révélé une activité plus faible des fractions éthylacétate et flavonoïdique de *Rhamnus alaternus*, avec des concentrations efficaces médianes (CE₅₀) respectives de 273 µg/mL et 196 µg/mL dans un modèle in vitro analogue de peroxydation lipidique.

De plus, une investigation sur la lipoperoxydation, menée par [Ben Ammar et al. \(2009\)](#) suivant la même méthodologie, a été effectuée sur trois flavonoïdes isolés par fractionnement des extraits méthanoliques ainsi que des extraits enrichis en oligomères totaux de flavonoïdes issus des feuilles de *Rhamnus alaternus*. Il a été indiqué que le rhamnétine-3-O-isorhamninoside, le kaempférol 3-O-isorhamninoside ainsi que le rhamnocitrine-3-O-isorhamninoside manifestaient des valeurs de CE₅₀ respectives de 106, 180 et 320 µg/mL. Par conséquent, il ressort que notre extrait affiche la performance la plus élevée, ce qui s'explique par l'effet synergique des molécules polaires, généralement conservées dans les extraits bruts, en comparaison avec les fractions.

Partie II : Effet antidiabétique du *Rhamnus alaternus* chez les rats Wistar

II.1. Observations des symptômes cliniques

Les symptômes cliniques des rats des groupes expérimentaux ont été surveillés après l'injection intra-péritonéale de 200 mg/kg d'alloxane suivie de l'administration d'une solution glucosée à 5 %, afin de déterminer ses conséquences et les effets protecteurs de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* sur le comportement de l'animal (tableau 4). Il convient de souligner qu'aucun cas de mortalité n'a été enregistré au cours de cette phase expérimentale.

Les rats diabétiques du G2 (200 mg/kg d'alloxane) et du G4 (200 mg/Kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR) ont présenté des perturbations comportementales physiques. En revanche, le groupe témoin (G1) et le groupe 3 (200mg/kg d'EMR) n'ont présenté aucune anomalie.

Tableau 4: Symptômes cliniques des rats expérimentaux. Les résultats correspondent à la moyenne (m) des six essais $\pm$ SEM.

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane; G3 : 200 mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

Groupes	Symptômes cliniques
G1	Aucun symptôme
G2	Polyurie, polydipsie, polyphagie, somnolence, hypoactivité, isolement, tachycardie, difficulté respiratoire, et perte de poids
G3	Aucun symptôme
G4	Polyurie, polydipsie, polyphagie.

II.2.Évolution du poids corporel et la glycémie

La figure 8 illustre la variation du poids corporel des rats diabétiques et non diabétiques soumis à un régime alimentaire standard, accompagnée d'un traitement par extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* (EMR) sur une période expérimentale de quatre-vingt-dix jours.

Au départ, le poids corporel de l'ensemble des groupes présentait une similitude quasi totale.

Cependant, l'induction du diabète a engendré une diminution progressive du poids corporel chez le groupe de rats diabétiques (G2). Cette diminution s'est avérée hautement significative ($P < 0.01$), atteignant 55.10 % par rapport au groupe témoin G1 et 54.63 % et 56.09 % par rapport au groupe G3 (ayant reçu 200 mg/kg d'EMR) et le groupe G4 (ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/kg d'EMR) respectivement. Ce qui désigne que la thérapie fondée sur l'EMR pourrait conférer une protection aux rats diabétiques contre une diminution significative de leur poids corporel. Une progression pondérale caractéristique observée chez les rats du groupe 1 au fil du temps.

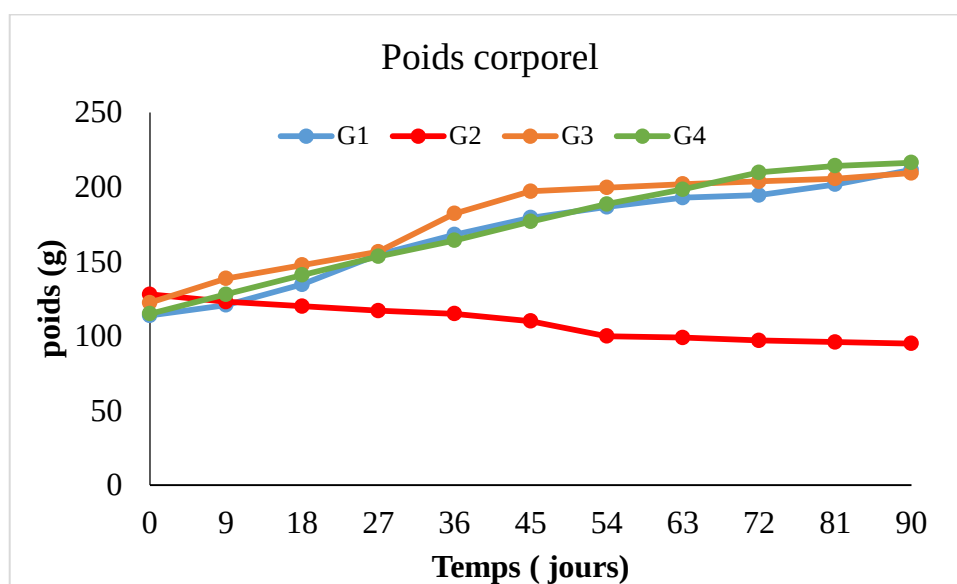


Figure 8 : Évolution du poids corporel du rat (g) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

L'hyperglycémie constatée chez les rats présentant un diabète de type 2 induits expérimentalement résulte d'une dysfonction de la sécrétion et/ou de l'efficacité de l'insuline, conduisant à une perturbation du métabolisme des glucides. Cette perturbation métabolique induit une intensification du catabolisme lipidique et protéique pour pallier le déficit énergétique au niveau cellulaire, ce qui justifie la perte de poids constatée chez les rats diabétiques non traités.

Des observations comparables ont été documentées par Ibrahim A et al. (2023), qui ont

démontré une réduction significative du poids corporel associée à une hyperglycémie prolongée chez des rats diabétiques. De façon analogue, [Ibrahim R et al. \(2023\)](#) ont démontré que le diabète expérimental provoquait des perturbations métaboliques significatives ainsi qu'une dégradation de l'état physiologique global des animaux.

De surcroît, l'augmentation graduelle du poids corporel constatée au sein des groupes traités G4 pourrait être attribuée à une sensibilité accrue à l'insuline ainsi qu'à une amélioration de l'utilisation périphérique du glucose induite par les extraits végétaux. Cette progression favoriserait la diminution du catabolisme des stocks lipidiques et protéiques ainsi que la restauration progressive de l'état nutritionnel chez les animaux diabétiques.

Des observations similaires ont été documentées par [Mistry et al. \(2023\)](#), qui ont établi qu'une administration d'extrait de pelure de mangue, riche en mangiférine, augmentait significativement le poids corporel et améliorait les paramètres glycémiques chez des rats diabétiques. Par ailleurs, [Bagheri et al. \(2023\)](#) ont démontré que les extraits végétaux à haute teneur en composés phénoliques et antioxydants pouvaient atténuer les troubles métaboliques liés au diabète en raison de leurs propriétés protectrices contre le stress oxydatif.

Ces données indiquent que les extraits végétaux dotés de propriétés anti-hyperglycémiantes et antioxydantes pourraient favoriser l'amélioration des conditions physiologiques et métaboliques chez les animaux présentant un diabète de type 2.

L'injection intrapéritonéale d'alloxane (200 mg/kg) ainsi que l'administration quotidienne de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR, 200 mg/kg) ont induit une modification significative du profil glycémique chez les rats ([fig. 9](#)). Au commencement de l'expérimentation (J0), tous les rats présentaient une glycémie basale normale et homogène. L'administration exclusive d'alloxane a provoqué une élévation hyperglycémique considérable, hautement significative ($P < 0.001$), chez les rats du groupe pathologique G2, avec une glycémie enregistrée à 4.06 g/L comparativement à 1.50 g/L dans le groupe témoin sain G1, ce qui confirme une induction efficace du diabète chimique.

Inversement, les rats diabétiques du groupe G4, soumis à un traitement concomitant par l'alloxane et l'EMR (200 mg/kg), présentent une normalisation remarquable de leur glycémie, qui se stabilise à 1.66 g/L, ce qui atteste de l'efficacité antidiabétique et protectrice prononcée de cet extrait.

Par ailleurs, l'administration exclusive d'EMR aux rats sains du groupe G3 a induit une diminution du profil glycémique à 0.97 g/L, maintenant ainsi les animaux dans une plage

physiologique optimale, ce qui atteste de la sécurité de la plante vis-à-vis de l'homéostasie glucidique.

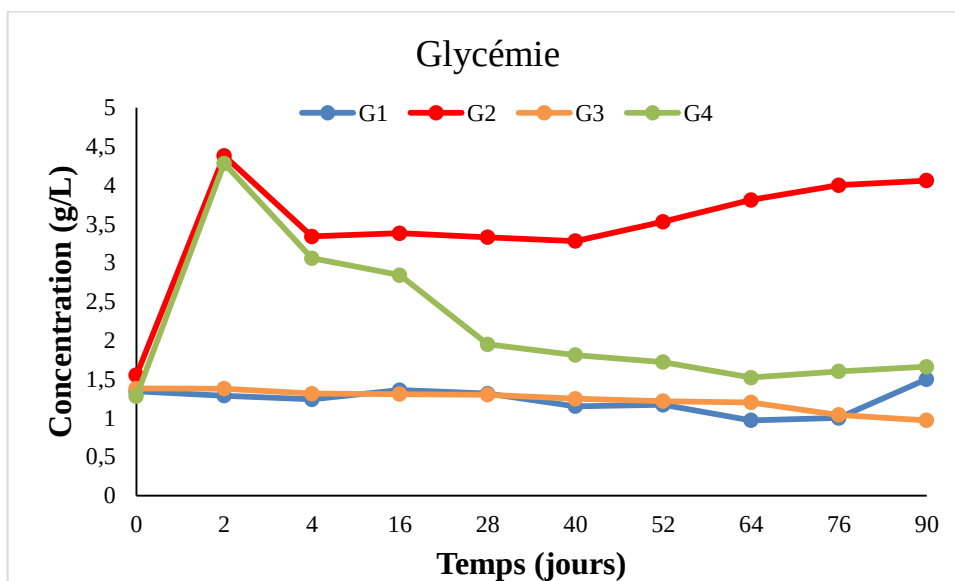


Figure 9 : Évolution du taux de la glycémie (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

La composition phytochimique du *Rhamnus alaternus* pourrait justifier l'activité antihyperglycémiant observée au cours de notre recherche. Cette espèce méditerranéenne se distingue par une concentration importante en polyphénols et flavonoïdes, en particulier la quercétine, la rutine et le kaempférol, des composés capables d'inactiver les radicaux libres, d'atténuer le stress oxydatif provoqué par l'hyperglycémie et de maintenir l'intégrité fonctionnelle des cellules β pancréatiques. Par ailleurs, ces composés présentent la capacité d'accroître la sensibilité périphérique à l'insuline et de réguler l'absorption intestinale du glucose, tout en participant à la réduction de la glycémie (Nekkaa et al., 2021).

Il convient également de noter que l'administration de l'EMR aux rats non diabétiques (G3) a entraîné une normalisation de la glycémie en une plage physiologiquement compatible avec la normo-glycémie. Cette observation indique que l'extrait exerce une influence régulatrice sur le métabolisme des glucides et pourrait faciliter l'utilisation périphérique du glucose ou moduler de manière modérée la sécrétion d'insuline, sans induire d'hypoglycémie sévère. Par conséquent, l'ensemble de ces données indique que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* exerce une activité anti-hyperglycémiant significative face au diabète induit par

l'alloxane. Cet effet pourrait résulter d'une action synergique de ses composés phénoliques et flavonoïdiques, impliquant une diminution du stress oxydatif, une protection des cellules β pancréatiques ainsi qu'une amélioration de l'homéostasie glucidique, ce qui corrobore l'emploi traditionnel de cette plante dans la gestion du diabète (Nekkaa et al., 2021).

II.3. Le dosage des marqueurs biochimiques

- **Glycémie**

Une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) des concentrations de glucose sanguin a été détectée chez les rats du groupe diabétique (G2) par rapport au groupe témoin (G1), confirmant l'apparition d'un état diabétique. En adition, l'administration d'EMR a induit une diminution négligeable du taux sérique de glycémie chez les rats du groupe G3 ayant reçu 200 mg/kg d'EMR (0.86 g/L) comparativement au groupe témoin G1 (1.02 g/L). Inversement, une réduction spectaculaire, jugée très hautement significative ($P < 0.001$), de l'ordre de 1.78 g/L est observée chez les rats du groupe G4, ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane par voie intrapéritonéale (*i.p*) et 200 mg/kg d'EMR, comparativement au groupe diabétique G2 (4.22 g/L) (fig. 10).

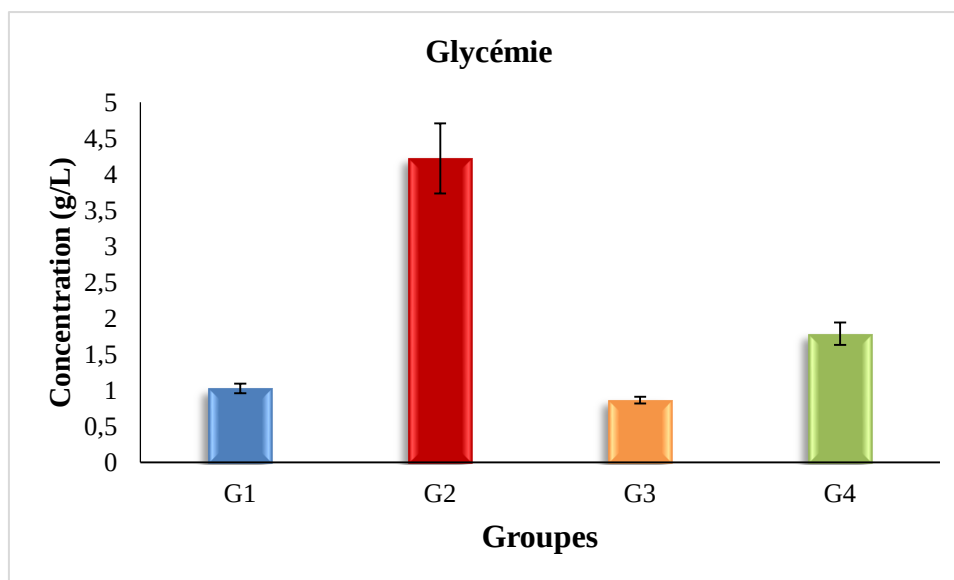


Figure 10 : Glycémie (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en *i.p* ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

Il a été reporté par [Amtaghri et al. \(2022\)](#), qu'une baisse significative de la glycémie a été constatée chez des rats rendus diabétiques par Streptozotocine après quatre heures d'administration orale unique de 20 mg/kg de l'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus* et s'est avérée plus marquée à partir de la sixième heure suivant le traitement. En revanche, aucune modification du profil glycémique sanguin n'a été relevée chez les rats en bonne santé. Par ailleurs, des changements significatifs ont été observés chez les rats diabétiques après des administrations répétées de 20 mg/kg de l'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus* pendant 2-4 et 7 jours. Cependant, aucune modification n'a été constatée chez les rats non diabétiques, ce qui confirme les conclusions de notre étude.

• Triglycérides (TG)

En se basant sur les résultats du dosage sérique de la triglycéride présentés sur la [figure 11](#), on remarque une diminution très hautement significative ($P < 0.001$), chez les rats du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en i.p et 200 mg/kg d'EMR (0.81 g/L) par rapport à ceux du groupe diabétique 2 (1.23g/L) et un léger décroissement du même paramètre chez les rats du groupe G3 ayant reçu 200mg/kg d'EMR (0.46g/L) par rapport au groupe témoin G1 (0.74g/L).

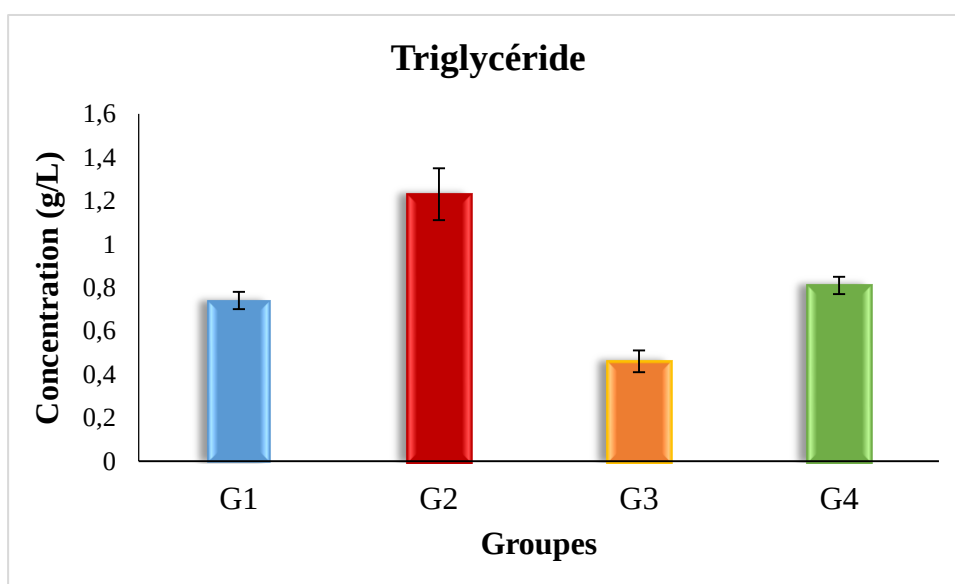


Figure 11 : Teneurs sérique en triglycéride (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

L'efficacité observée après l'administration d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* rejoint les données publiées par Ouchatti et al. (2019) avec des convergences quant aux pourcentages de réduction constatés, soit 64.64 % dans l'étude de Ouchatti et al. (2019) contre 34.48 % dans la présente étude. En contraste, d'après une étude de courte durée d'Amtaghri et al. (2022) aucun changement significatif des taux de triglycérides sanguin n'a été attesté. Ces convergences sont attribuées à la provenance géographique, aux polymorphismes sexuelle et à la durée de l'essai.

- **Cholestérol total (CT)**

Les résultats représentés sur la figure 12 témoignent des taux presque similaires de cholestérol total chez les rats du groupe témoin G1 (1.6) par rapport à ceux du Groupe 3 ayant reçu 200 mg/kg d'EMR (1.5g/L).

En addition, une diminution non significative du même paramètre a été constatée chez les rats du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en *i.p* et 200 mg/kg d'EMR par rapport au groupe diabétique G2.

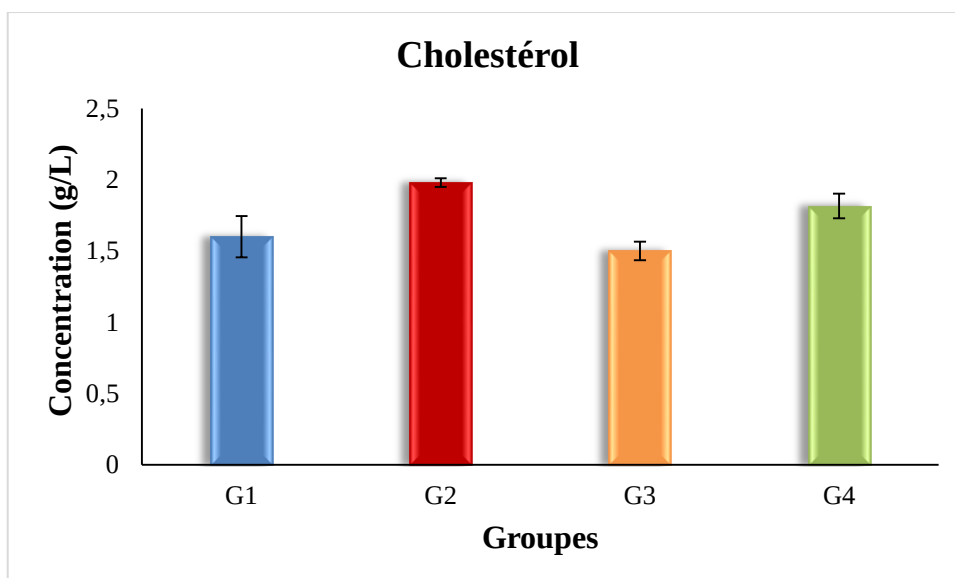


Figure 12 : teneur sérique en cholestérol (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en *i.p* ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

L'induction expérimentale du diabète par l'alloxane entraîne une altération du métabolisme lipidique, illustrée dans notre étude par une élévation de la cholestérolémie chez les rats du

groupe G2. Cette hypercholestérolémie résulte principalement du déficit en insuline, lequel provoque une suppression de l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux, conduisant ainsi à une augmentation de la libération des acides gras libres dans la circulation sanguine. L'accroissement du transport des acides gras vers le foie favorise la synthèse ainsi que la libération des lipoprotéines à haute teneur lipidique, participant ainsi à l'apparition de la dyslipidémie constatée dans le cadre du diabète expérimental (Julius, 2003 ; Feingold, 2023).

L'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a entraîné une baisse du taux de cholestérol sérique chez les rats diabétiques. Cette efficacité est cohérente avec les observations d'Ouchtati et al. (2019), qui ont démontré, dans une étude subaiguë menée chez des rates diabétiques, une réduction du taux de cholestérol suite à l'administration de l'extrait des feuilles de *Rhamnus alaternus*. Des concordances sont ainsi constatées entre l'étude d'Ouchtati et la présente recherche, avec une diminution des concentrations de cholestérol de 19.34 % et 8.29 %, respectivement. Ces résultats confirment également les recherches menées par Amtaghri et al. (2022), qui ont observé une amélioration du profil lipidique suite à l'administration d'extraits de *Rhamnus alaternus*, renforçant par conséquent l'hypothèse d'un potentiel hypolipidémiant associé à cette espèce végétale.

Bien que les observations rapportées dans l'étude de Ouchatti et al. (2019) et d'Amtaghri et al. (2022) étayent les conclusions émanant de notre propre investigation les convergences observée peuvent être liés à la provenance géographique mais cet écart est directement attribuable aux polymorphismes sexuelle et à la durée de l'essai (Martín-Carro et al., 2023).

- **Urée**

Le dosage plasmatique de la concentration d'urée dont les résultats sont représentés sur la figure 13, illustre une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) chez les rats diabétique du groupe G2 (0.93 g/L) par rapport aux rats témoins sains du groupe G1 (0.33 g/L), indiquant une capacité de clairance rénale nettement réduite. De surcroit, une augmentation jugée très hautement significative ($P < 0.001$) a été enregistrée chez les rats diabétique du groupe 2 (0.93 g/L) par rapport à ceux du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en i.p et 200 mg/kg d'EMR (0.44 g/L) témoignant une amélioration de l'état fonctionnel rénal. En adition, des taux presque similaires du même paramètre ont été constatés chez les rats du groupe G3 ayant reçu 200mg/kg d'EMR (0.326 g/L) et les rats du groupe Témoin G1 (0.33g/L).

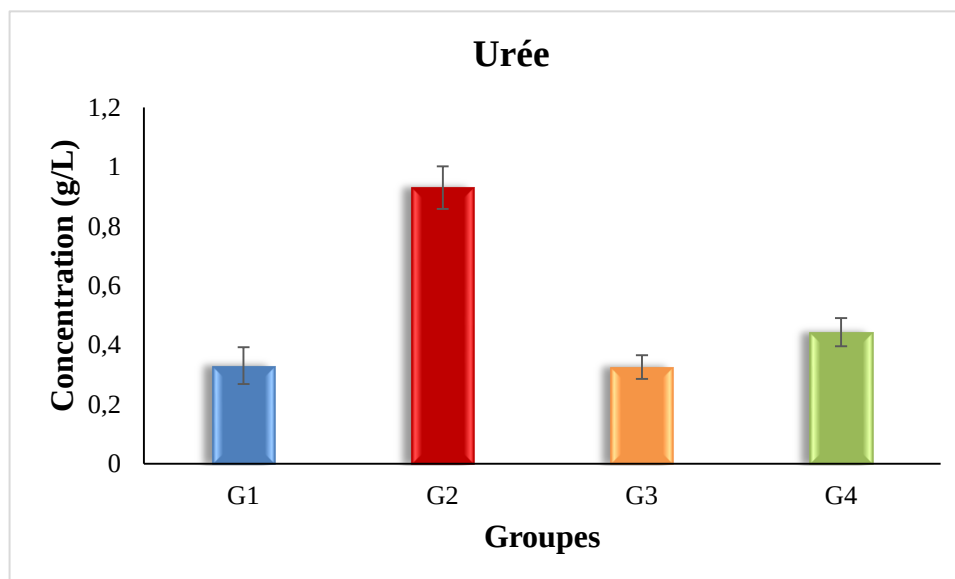


Figure 13 : Concentration sérique de l'urée (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

Les résultats obtenus mettent en évidence une réduction de la concentration sanguine en urée chez les rats soumis au traitement par EMR, suggérant une amélioration de la fonction rénale ainsi qu'une atténuation des altérations fonctionnelles induites par le diabète expérimental. L'urée constitue un marqueur indirect de la fonction rénale : son augmentation est associée à une réduction de la filtration glomérulaire, impliquant ainsi une altération fonctionnelle rénale (Levey et al., 2015 ; Thomas et al., 2019).

Cette amélioration pourrait résulter d'une réduction du stress oxydatif, mécanisme fondamental impliqué dans les dommages rénaux induits par le diabète. En effet, l'hyperglycémie chronique provoque une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui entraîne des dommages cellulaires, une inflammation ainsi qu'une dégradation progressive de la fonction rénale (Forbes & Cooper, 2013 ; Yaribeygi et al., 2018).

Dans ce contexte, les polyphénols et flavonoïdes contenus dans *Rhamnus alaternus* confèrent un effet protecteur, principalement en raison de leurs propriétés antioxydantes, notamment la réduction de la peroxydation lipidique (Pisoschi & Pop, 2015 ; Cory et al., 2018).

L'accord observé entre ces résultats et ceux d'Ouchatti et al. (2019), qui ont démontré une diminution de 35.42 % de l'urée sanguine, corrobore l'hypothèse d'un effet néphroprotecteur de *Rhamnus alaternus*. Par ailleurs, des recherches récentes concernant cette espèce ont mis en évidence ses propriétés antidiabétiques et antioxydantes, ainsi que son aptitude à optimiser les paramètres métaboliques et à préserver les tissus cibles dans des modèles expérimentaux de diabète (Amtaghri et al., 2022 ; Nekkaa et al., 2021).

La variabilité des amplitudes observées entre les études peut être attribuée à la diversité des durées de traitement, à l'hétérogénéité phytochimique des extraits végétaux employés, aux modèles expérimentaux distincts ainsi qu'aux variations des doses administrées (Heinrich et al., 2020).

- **Créatinine**

L'analyse des résultats du dosage de la créatinine, présenté dans la figure 14, a révélé une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) des taux de créatinine chez les rats diabétiques du groupe 2 comparativement à ceux du groupe G1 révélant l'induction d'une pathologie rénale diabétique typiquement associée à un dérèglement métabolique lié à la maladie et à un stress cellulaire des tissus extra-pancréatiques en état d'hyperglycémie .

De même, une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) des taux de créatinine a été constaté chez les rats diabétiques du groupe 2 (12.71 mg/L) par rapport à celle du groupe G4, ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en intra-péritonéal et 200 mg/kg d'EMR (7.08 mg/L). Par ailleurs, des taux presque similaire du même paramètre ont été observés chez les rats du groupe témoin G1 (5.04 mg/L) par rapport au groupe G3, ayant reçu 200 mg/kg d'EMR (5.01 mg/L).

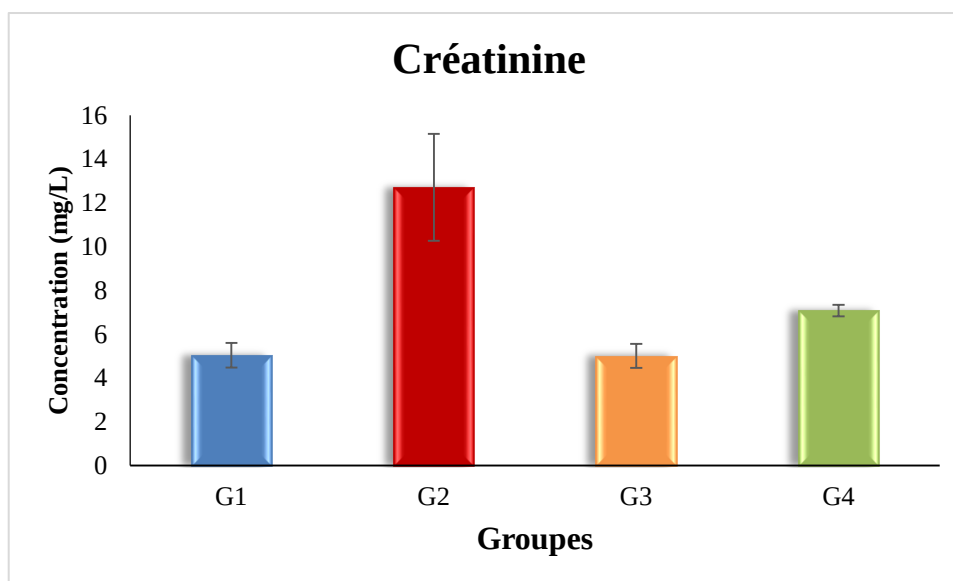


Figure 14 : Concentration sérique de la créatinine (mg/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

La hausse extrêmement significative de la créatinine sérique chez les animaux diabétiques non soignés (G2) témoigne un compromis de la fonction rénale. Cette augmentation est révélatrice d'une réduction du débit de filtration glomérulaire, conséquence immédiate des lésions engendrées par l'hyperglycémie chronique, discutant de stress oxydatif, inflammation et dysfonction endothéliale rénale (Faselis et al., 2020 ; Thomas et al., 2021).

Par ailleurs, La diminution substantielle (44.29 %) des taux de créatinine sanguine chez les rats du groupe 4, comparativement à ceux du groupe 2, concordait avec les observations d'Ouchatti et al. (2019), qui ont noté une réduction significative (40.33 %) de la créatinine sérique suite à l'administration d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Ces constats suggèrent une amélioration de la fonction rénale et une meilleure filtration glomérulaire par rapport au groupe diabétique non traité témoignant aussi un effet néphroprotecteur de l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus*. La créatinine est un bio marqueur largement utilisé pour évaluer l'atteinte rénale et la progression des néphropathies métaboliques (Alicic et al., 2017 ; Tuttle et al., 2022).

- **Acide urique**

Les résultats de dosage des concentrations d'acide urique représentent sur la [figure 15](#), témoigne une modification négligeable du taux de l'acide urique de 7.79 mg/dL chez les rats du groupe témoin G1 à un taux de 7.61 mg/dL par rapport aux rats du Groupe 3 et une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) du même paramètre chez les rats du groupe diabétique G2 (13 mg/dL) par rapport au groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en *i.p* et 200 mg/kg d'EMR (9.03 mg/dL) .

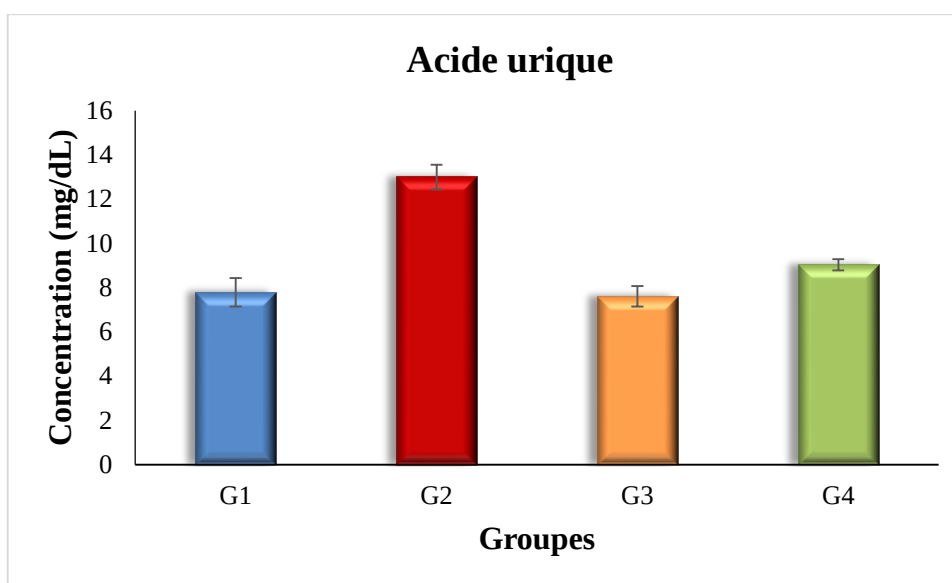


Figure 15 : Teneur sérique en acide urique (mg/dL) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en *i.p* ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

A notre connaissance, aucune étude antérieure n'a évalué l'effet du *Rhamnus alaternus* sur les l'acide urique. Cependant, l'hyper uricémie est couramment corrélée au diabète expérimental et traduit une dysfonction rénale ainsi qu'un stress oxydatif amplifié, conduisant à une réduction de l'excrétion rénale de l'acide urique et à une perturbation du métabolisme des purines ([Johnson et al., 2018](#) ; [Jia et al., 2021](#)).

Dans le groupe de rats soumis à un traitement concomitant par l'alloxane et l'extrait (G4), une réduction significative du taux d'acide urique (9.03 mg/dL) a été constatée par rapport au groupe diabétique, témoignant d'une amélioration partielle de l'homéostasie rénale. Cette

progression pourrait être attribuée aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des polyphénols et flavonoïdes contenus dans *Rhamnus alaternus*.

Par conséquent, ces résultats indiquent un effet protecteur de l'extrait sur le métabolisme de l'acide urique ainsi que sur la fonction rénale dans un cadre de diabète expérimental.

- **Alanine aminotransférase (ALAT)**

L'analyse des résultats présentés dans la [figure 16](#) révèle une modification légère du taux sérique d'alanine aminotransférase (ALAT), passant de 44 UI/L chez les rats du groupe témoin G1 à 42.66 UI/L chez les rats du groupe 3 ayant reçu 200 mg/kg d'EMR, ce qui indique l'absence d'effets hépatiques négatifs en l'absence du diabète.

De surcroît, une baisse très hautement significative ($P < 0.001$) de ce même paramètre a été enregistré chez les rats du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en administration intrapéritonéale (*i.p*) et 200 mg/kg d'EMR (69.33 UI/L) comparativement au groupe diabétique G2 (143 UI/L) indiquant une restauration des dommages considérables hépatocellulaires.

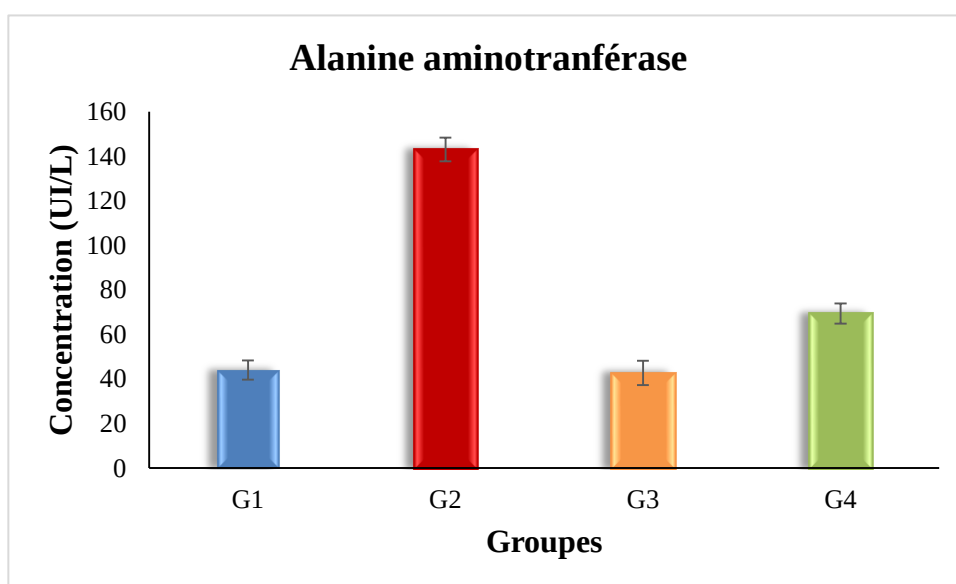


Figure 16 : Teneurs sérique en alanine aminotransférase (ALAT) (UI/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en *i.p* ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

À notre connaissance, cette étude serait la première à examiner l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* en évaluant les concentrations de l'alanine aminotransférase (ALAT). Toutefois et pour contextualiser les résultats obtenus, il apparaît pertinent de comparer les données issues de la présente étude avec celles rapportées par [Benzaid et al. \(2021\)](#) qui ont mis en évidence une atténuation des altérations biochimiques hépatiques chez les rats ayant reçu une co-administration de 250 mg/kg d'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus*, comparativement à ceux ayant reçu uniquement 50 mg/kg d'AlCl₃, ainsi qu'une diminution d'environ 10.52 % des taux d'alanine aminotransférase dans le groupe ayant reçu une co-administration de 250 mg/kg d'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus* par rapport au groupe ayant reçu exclusivement 50 mg/kg d'AlCl₃, un pourcentage explicitement inférieur au pourcentage de diminution observé entre le groupe de traitement et le groupe diabétique (52%).

Toutefois, il est crucial de noter que cette étude diffère significativement par la nature du solvant utilisé et le mécanisme de lésion étudié et la durée de l'expérimentation.

Néanmoins, la comparaison du pourcentage de diminution de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) entre les deux modèles permet d'évaluer l'efficacité des extraits à restaurer l'intégrité des hépatocytes.

- **Aspartate aminotransférase (ASAT)**

A la lumière des résultats représentés sur la [figure 17](#), on remarque une hausse très hautement significative ($P < 0.01$) des taux des paramètres hépatique d'Aspartate aminotransférase chez les rats diabétique du groupe 2 (158 UI/L) par rapport à ceux du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en *i.p* et 200 mg/kg d'EMR (75 UI/L) et un léger décroissement des taux d'Aspartate aminotransférase sérique de 50 UI/L chez les rats du Groupe 3 ayant reçu 200mg/kg d'EMR à un taux de 51.1 UI/L chez les rats du groupe témoin G1

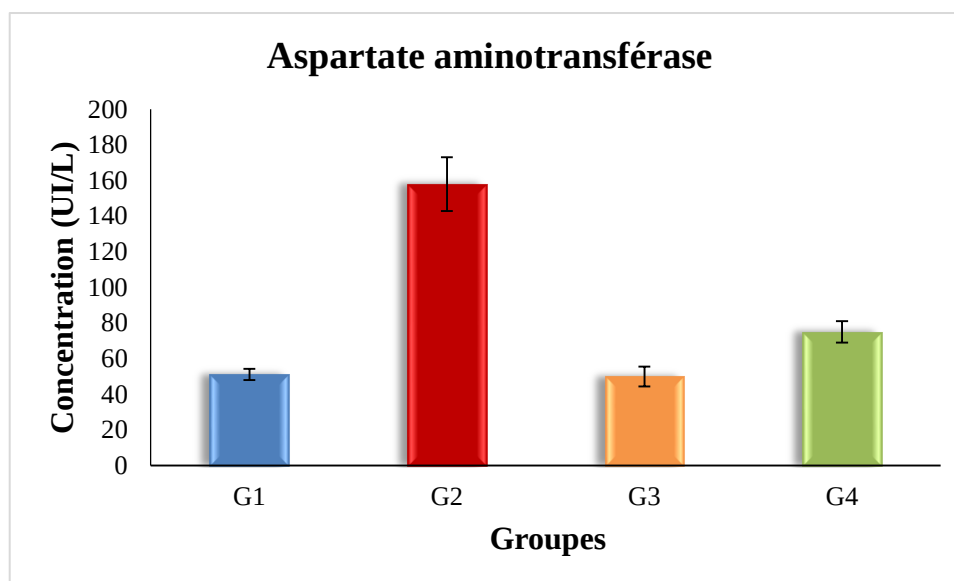


Figure 17 : Teneurs sérique en aspartate aminotransférase (ASAT) ($\mu\text{L/L}$) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM ($n = 6$).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

D'après nos informations, la présente étude constitue la première investigation de l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus*, incluant une évaluation du taux d'aspartate aminotransférase (ASAT).

Afin d'élucider l'amplitude de la protection hépatique conférée par notre extrait, il est essentiel de la mettre en regard des résultats obtenus par [Chatti et al.\(2025\)](#) qui ont indiqué qu'une provocation des lésions hépatiques aiguë confirmée par une augmentation significative des taux sériques d'ASAT (Aspartate Transaminase) a été constaté après l'administration d'éthanol aux rats par rapport au groupe témoin sain. Toutefois, Le traitement des rats par l'extrait enrichi en flavonoïdes oligomères totaux de *Rhamnus alaternus* en même temps que l'éthanol a révélé un puissant effet curatif appuyé par une diminution significative des niveaux sériques d'ASAT par rapport au groupe intoxiqué par l'éthanol seul.

Par extension, une étude de [Benzaid et al. \(2021\)](#) a témoigné une diminution de 15.77 % des taux d'aspartate aminotransférase dans le groupe ayant bénéficié d'une co-administration de 250 mg/kg d'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus*, en comparaison avec le groupe ayant reçu exclusivement 50 mg/kg d' AlCl_3 . Un pourcentage sensiblement inférieur à celui observé dans notre étude (53%), qui malgré des variations expérimentales, confirme néanmoins nos propres conclusions.

Cependant, Il est crucial de noter que ces études divergent sur des points fondamentaux : du solvant utilisé au type de dommage induit en passant par la temporalité de l'expérimentation. Cela étant dit, l'appréciation du potentiel régénérateur des extraits sur les hépatocytes se fonde sur une analyse comparative de la baisse du taux d'aspartate aminotransférase (ASAT) observée dans les différents modèles.

- **Phosphatase alcaline (PAL)**

En se basant sur les résultats du dosage sérique de la phosphatase alcaline illustrés sur la [figure 18](#), on remarque une élévation très hautement significative ($P < 0.001$) de 164.03% et 45.96% chez les rats diabétique du groupe 2 par rapport à ceux du groupe témoin G1 et du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en i.p et 200 mg/kg d'EMR, ce qui confirment à la fois des modifications importantes de la fonction biliaire et de l'intégrité de la membrane des hépatocytes et un potentiel hépato protecteur de l'extrait .

En addition, un léger décroissement du même paramètre chez les rats du groupe témoin G1 (79.66 UI/L) par rapport au groupe G3 ayant reçu 200mg/kg d'EMR (80 UI/L).

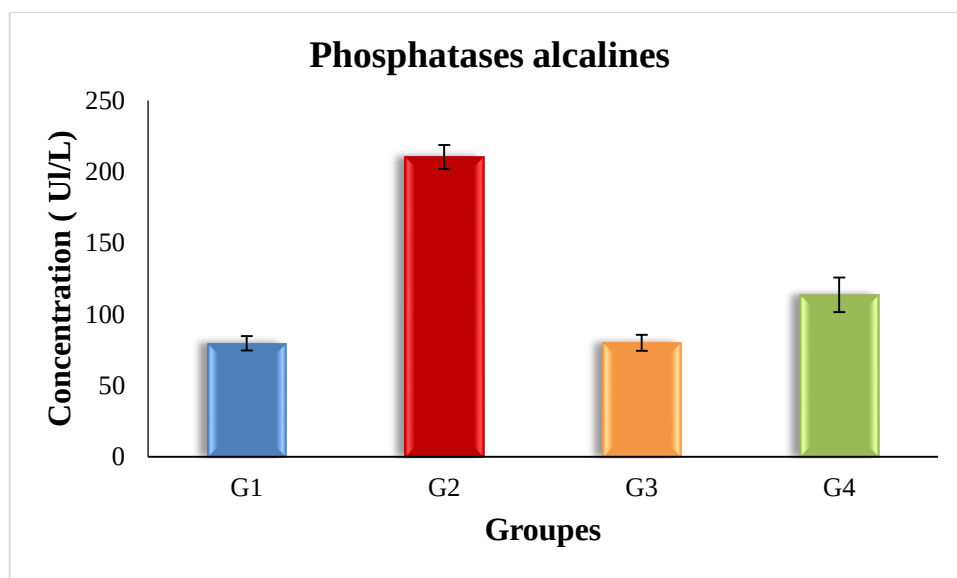


Figure 18 : Teneurs sérique en phosphatase alcalines (UI/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

Il ressort, à l'heure actuelle, que cette étude représente l'investigation initiale concernant l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus*, à travers l'évaluation de son impact sur le niveau de phosphatase alcaline.

Néanmoins, [Benzaid et al. \(2021\)](#) ont observé une restauration de l'activité enzymatique ainsi qu'une diminution d'environ 19.31 % des concentrations de phosphatases alcalines entre le groupe ayant reçu uniquement 50 mg/kg d' AlCl_3 et le groupe ayant reçu une co-administration de 250 mg/kg d'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus*.

Par ailleurs, une étude élaborée par [Benchihha et al. \(2015\)](#) a révélé une diminution de 33.89 % et de 32.24 % du taux de phosphatases alcalines chez les rats des groupes test ayant reçu du tétrachlorure de carbone (CCl_4) et auxquels ont été administrés 250 mg/mL d'extraits aqueux lyophilisés macérés et décoctés, respectivement, une fois par jour pendant toute la durée de l'expérience. La réduction de l'activité sérique de la phosphatase alcaline (PAL) observée chez les rats diabétiques traités avec notre extrait corrobore les données de la littérature, ce qui vient confirmer la nature polyvalente de l'activité hépato protectrice de *Rhamnus alaternus*.

Cette convergence observée entre les différents modèles, qu'il s'agisse de lésions chimiques aiguës ($\text{CCl}_4/\text{AlCl}_3$) ou métaboliques chroniques (diabète), laisse supposer que l'extrait exerce un mécanisme de protection commun, indépendamment de la nature de l'agression.

- **Gamma-glutamyl transférase**

L'analyse des résultats présentés dans la [figure 19](#) révèle une modification négligeable du taux sérique du Gamma-glutamyl transférase (Gamma GT), passant de 32.33 UI/L chez les rats du groupe témoin G1 à 33UI/L chez les rats du groupe 3 ayant reçu 200 mg/kg d'EMR.

De plus, une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) de l'ordre de 322 % et 43% du même paramètre a été constaté après l'induction du diabète par alloxane chez les rats du groupe diabétique G2 comparativement au groupe G1 et G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en administration intrapéritonéale (*i.p*) et 200 mg/kg d'EMR, respectivement, indiquant à la fois une installation d'une modification hépatique importante sur le point biochimique et un effet protecteurs des hépatocytes de l'EMR.

Cette étude pionnière est la première à explorer l'impact de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* sur la gamma-glutamyl transférase jetant une nouvelle lumière sur son rôle potentiel

dans la protection hépatique contre les perturbation métaboliques et oxydative induite par le diabète de type 2.

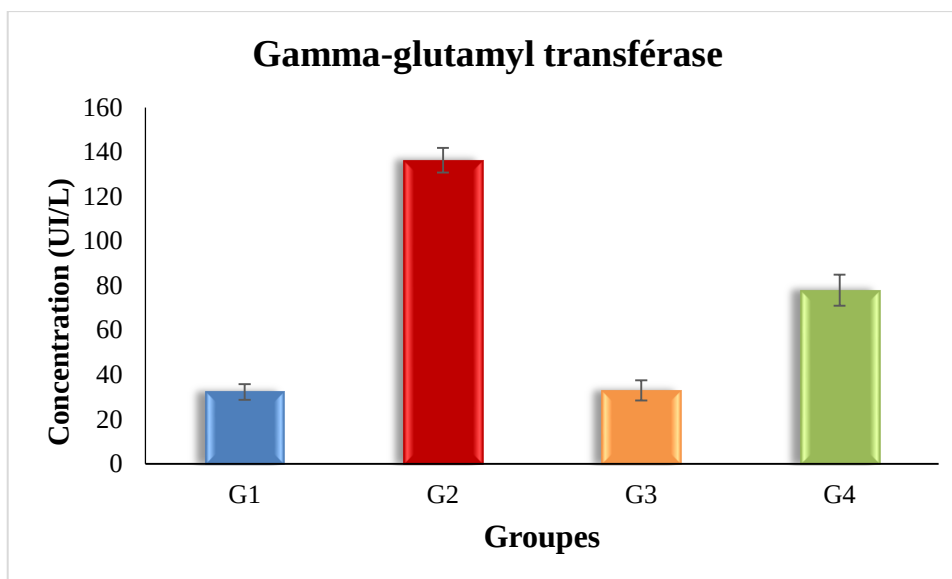


Figure 19 : Teneurs sérique en Gamma-glutamyl transférase (UI/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

Cependant, il convient de noter que l'efficacité constatée suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* corrobore les informations déjà disponibles dans la littérature scientifique. Une recherche menée par [Benzaid et al. \(2021\)](#) a montré qu'une amélioration de l'activité enzymatique a été observée, entraînant une diminution d'environ 16.67 % du taux de Gamma GT chez les rats ayant reçu une co-administration de 250 mg/kg d'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus* par rapport à ceux ayant reçu uniquement 50 mg/kg d' AlCl_3 .

- **Albumine**

Les résultats présentés dans la [figure 20](#) mettent en évidence une diminution minime de l'albuminémie, passant de 34.66 g/L chez les rats du groupe témoin G1 à 33.33 g/L chez les rats du Groupe 3 ayant reçu 200 mg/kg d'EMR. L'induction du diabète par alloxane a résulté en une diminution hautement significative ($P < 0.01$) des taux d'albumine chez les rats du groupe diabétique G2 par rapport au groupe témoin. De surcroît, une diminution de 20.69%

de ce même paramètre chez les rats du groupe diabétique G2 (23 g/L) comparativement au groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en i.p. et 200 mg/kg d'EMR (29 g/L).

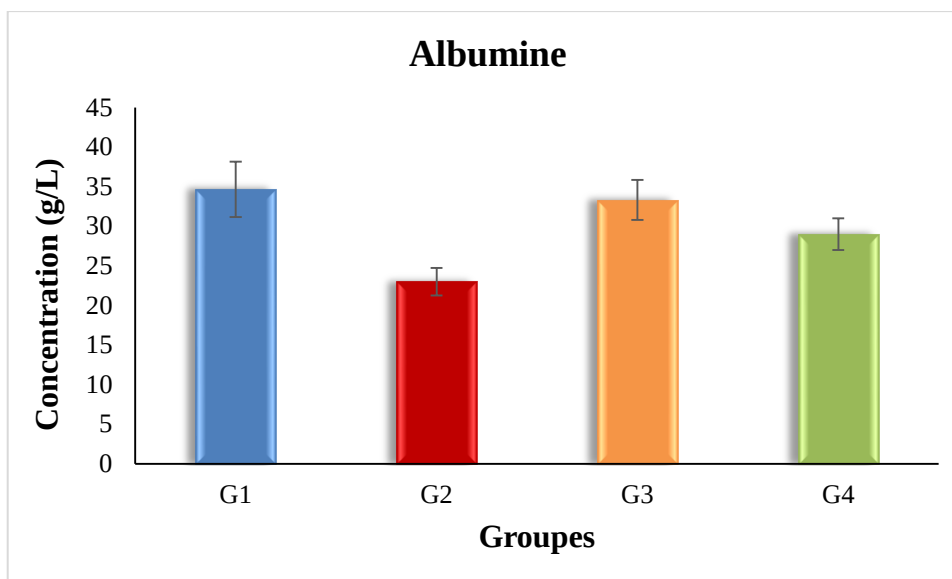


Figure 20 : Albumine (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude portant sur l'activité antidiabétique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* évaluant les taux sérique d'albumine.

Toutefois, une étude élaborée par [Benzaid et al. \(2021\)](#) a signalée un allègement des altérations biochimiques hépatiques observées chez les rats recevant une co-administration de 250 mg/kg d'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus* par rapport à ceux recevant uniquement 50 mg/kg de l' $AlCl_3$. En outre, le groupe de co-traitement a montré une amélioration de 24.75% dans les niveaux plasmatiques d'albumine. Ce qui se rapproche de nos résultats indiquant une amélioration de 20.69% d'albumine. Les différences constatées peuvent avoir un lien avec la méthodologie expérimental.

• Protéine Totales

Le dosage plasmatique des protéines totales (PT) est représenté sur la [figure 21](#). L'étude des protéines totales sériques a révélé que l'état diabétique provoque une hypo-protéinémie importante (G2 :44.33 g/L) traduit par une diminution très hautement significative de (41%)

des taux de PT chez les rats du groupe diabétique (G2) par rapport aux rats du groupe témoin (G1), un fait souvent rapporté et qui est dû essentiellement à l'altération de la capacité de synthèse hépatique et à la protéinurie de la néphropathie diabétique (chokri et al., 2024). L'élévation significative ($P < 0.05$) du taux de PT après l'administration de l'EMR témoigne d'un effet anabolisant et cyto-protecteur où l'extrait rétablit l'intégrité hépatique et la machinerie de synthèse protéique, un avantage conforme aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes de la plante. Ce constat est différent des cas où une normalisation ou une légère diminution des PT est rapportée par Ouchatti et al. (2019). Cette différence est due à la physiopathologie de départ : si les rats étaient hyper-protéïniques à cause de la déshydratation, l'EMR améliorerait l'équilibre hydrique et donc la concentration des protéines reviendrait à la normale (Liao et al., 2024). L'EMR vient donc rétablir l'équilibre initial, qu'il s'agisse d'un manque de synthèse ou d'une concentration trop importante.

En outre, une étude élaborée par Benzaid et al. (2021) a signalé améliorations de 14.39% dans les niveaux plasmatiques des protéines totales chez les rats recevant une co-administration de 250mg/kg d'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus* par rapport à ceux recevant uniquement 50mg/kg de l' $AlCl_3$. Ce qui se corroborent nos résultats indiquant une amélioration de 19.4% des protéines totales.

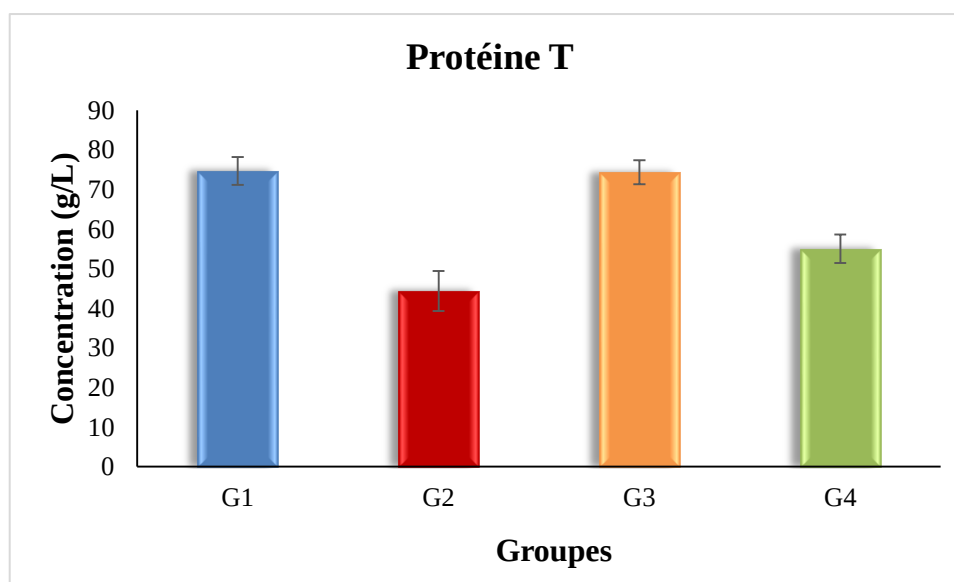


Figure 21 : Teneurs sérique en Protéine T (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

II.4. La détermination du statut antioxydant

• Taux du malondialdéhyde (MDA) hépatique

Le dosage du taux de malondialdéhyde hépatique présenté sur la [figure 22](#) a mis en évidence une variation modérée entre les rats du groupe G3 ayant reçu 200mg/kg d'EMR (2.29 nmol/mL) et ceux du groupe témoin G1 (2.36 nmol/mL) ainsi qu'une diminution très hautement significative ($P < 0.001$) de ce même paramètre chez les rats du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en administration intrapéritonéale (i.p.) et 200 mg/kg d'EMR (4.81 nmol/mL) comparativement à ceux du groupe diabétique G2 (10.76 nmol/mL)

Une étude conduite par [Chatti et al. \(2025\)](#) a révélé une augmentation significative des taux de malondialdéhyde hépatique chez les rats ayant reçu uniquement de l'éthanol. En revanche, l'administration concomitante de l'extrait enrichi en flavonoïdes oligomères totaux et d'éthanol a induit une réduction significative du niveau de malondialdéhyde hépatique.

De manière analogue, une étude menée par [Benzaid et al. \(2021\)](#) a également mis en évidence que l'administration combinée de l'extrait et d' $AlCl_3$ a permis de restaurer les activités enzymatiques antioxydantes du malondialdéhyde.

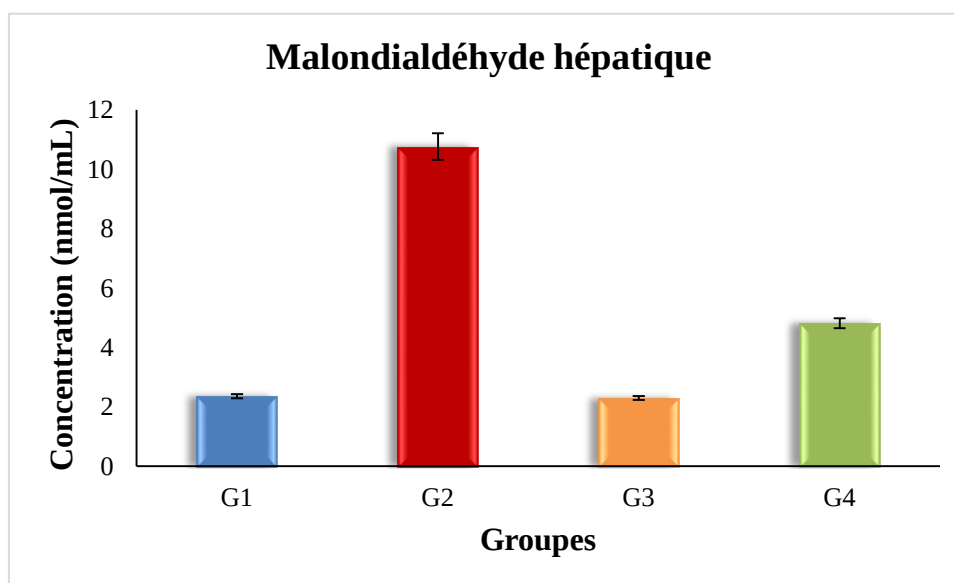


Figure 22 : Teneurs hépatique en Malondialdéhyde (nmol/mL) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

- **Taux du malondialdéhyde (MDA) néphrétique**

Le dosage du taux de malondialdéhyde néphrétique représenté sur la [figure 23](#) a révélé une modification négligeable entre les rats du groupe G3 ayant reçu 200mg/kg d'EMR (0.38 nmol/mg) et ceux du groupe témoin G1 (0.4 nmol/mg) ainsi qu'une diminution très hautement significative ($P < 0.001$) de ce même paramètre chez les rats du groupe G4 ayant reçu 200 mg/kg d'alloxane en administration intrapéritonéale (i.p.) et 200 mg/kg d'EMR (2.23 nmol/mg) comparativement à ceux du groupe diabétique G2 (5.18 nmol/mg).

Suite à un examen approfondi de la documentation scientifique, aucune étude n'a été identifiée portant sur l'évaluation de l'acide malonique dialdéhyde (MDA) rénal consécutive à l'administration d'extraits méthanoliques de *Rhamnus alaternus*. Notre étude constitue donc la première à fournir des données expérimentales relatives à ce paramètre.

Cependant, une étude menée par [Tichati et al. \(2022\)](#) a démontré qu'une supplémentation avec l'extrait aqueux de *Rhamnus alaternus* (RAAE) a significativement inversé l'augmentation significative du niveau de MDA au niveau rénal causée par l'administration seule de chlorure d'aluminium

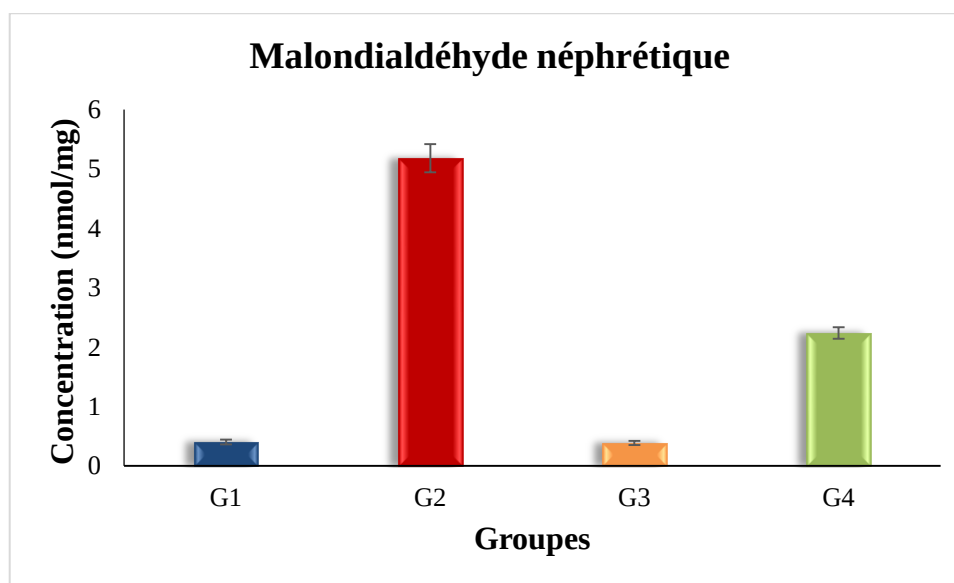


Figure 23 : Teneurs néphrétique en Malondialdéhyde (nmol/mg) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

• **Taux du superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), de catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) et de glutathion peroxydase (GSH-Px) hépatique**

L'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a provoqué une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) des taux de superoxyde dismutase (fig. 24), hautement significative ($P < 0.01$) des taux de catalase (fig. 25) et non significative des taux de glutathion peroxydase (fig. 26) chez les rats du groupe G3 recevant 200 mg/kg d'EMR, comparativement au groupe témoin G1.

Par ailleurs, une hausse très hautement significative ($P < 0.001$) des taux d'enzyme antioxydant hépatique (SOD ; CAT ; GSH-PX), a été enregistrée chez les rats diabétiques du groupe G2 par rapport au groupe G4, lequel a été soumis à une injection intrapéritonéale d'alloxane (200 mg/kg) suivie d'un traitement par EMR (200 mg/kg).

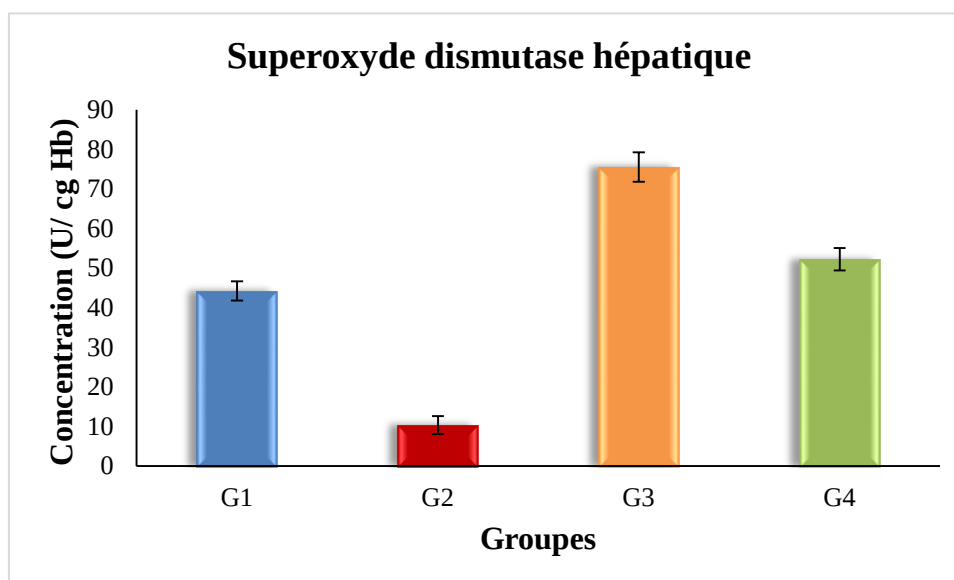


Figure 24: Teneurs hépatique en superoxyde dismutase (U/ cg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

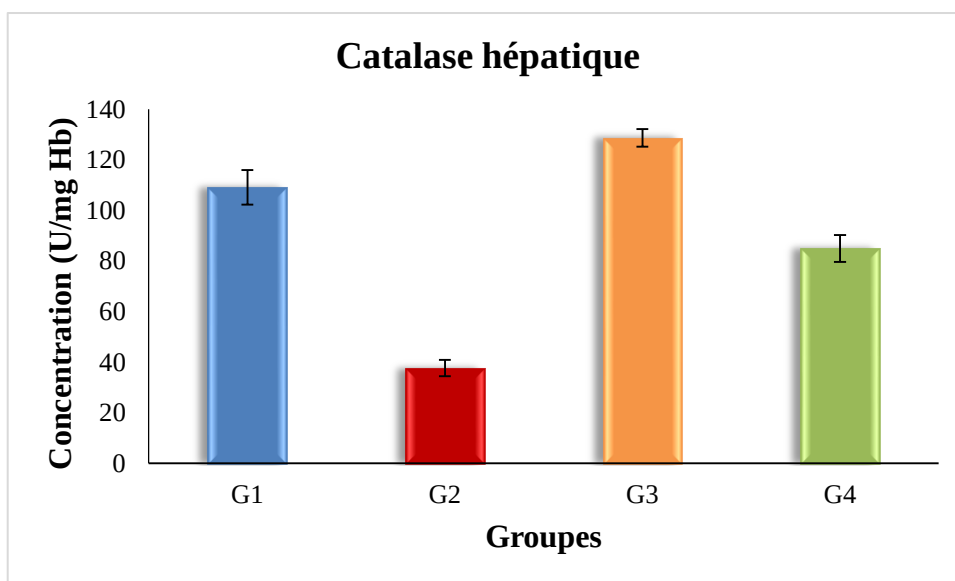


Figure 25 : Teneurs hépatique en catalase (U/mg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

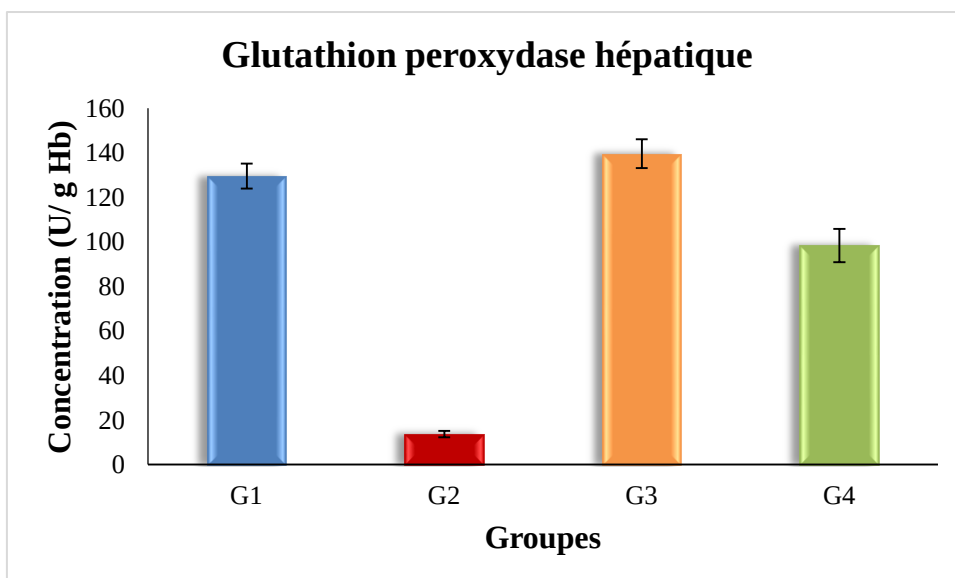


Figure 26 : Teneurs hépatique en Glutathion peroxydase (U/g Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR.

Nos résultats représentent la première démonstration du rôle potentiel de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* dans la correction des déséquilibres enzymatiques antioxydants induits par le diabète de type 2.

Néanmoins, les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont mis en parallèle avec ceux rapportés par [Benzaid et al. \(2021\)](#), qui ont constaté une augmentation très significative du superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase hépatique lors d'une administration concomitante de l'extrait et d'AlCl₃ par rapport au groupe ayant reçu uniquement de l'AlCl₃. C'est propriétés antioxydantes bénéfiques des extraits de *Rhamnus alaternus* peuvent être attribuées aux composés phénoliques présents, comme cela a déjà été rapporté pour divers extraits végétaux ([Moussi et al., 2015](#)).

- **Taux du superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), de catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) et de glutathion peroxydase (GSH-Px) néphrique**

L'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a provoqué une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) des taux de catalase et non significative des taux de superoxyde dismutase et de glutathion peroxydase chez les rats du groupe G3 recevant 200 mg/kg d'EMR, comparativement au groupe témoin G1.

Par ailleurs, une hausse très hautement significative ($P < 0.001$) des taux de catalase et de glutathion peroxydase et une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) du taux de superoxyde dismutase ont été enregistrée chez les rats diabétiques du groupe G2 par rapport au groupe G4, lequel a été soumis à une injection intrapéritonéale d'alloxane (200 mg/kg) suivie d'un traitement par EMR (200 mg/kg)

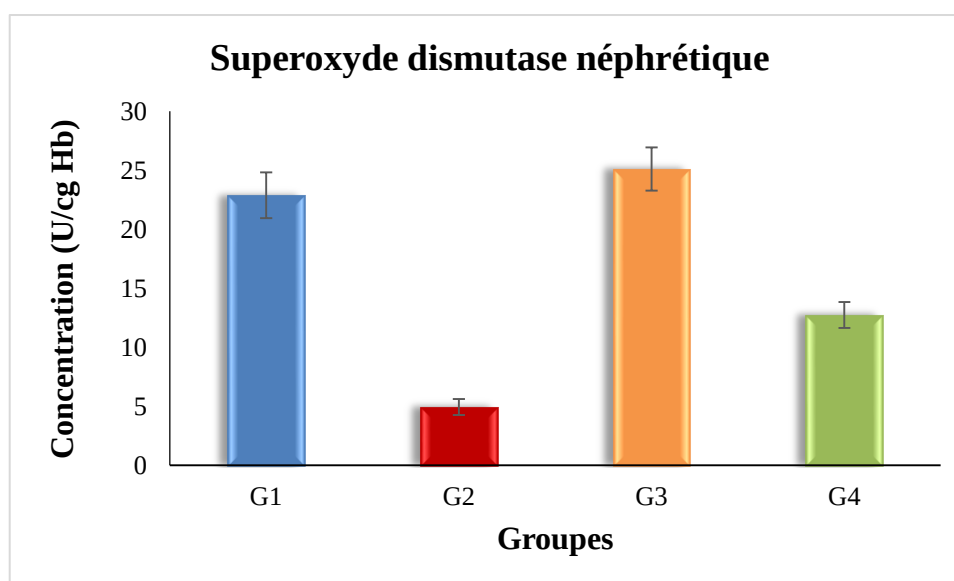


Figure 27 : Teneurs néphrétique en superoxyde dismutase (U/cg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

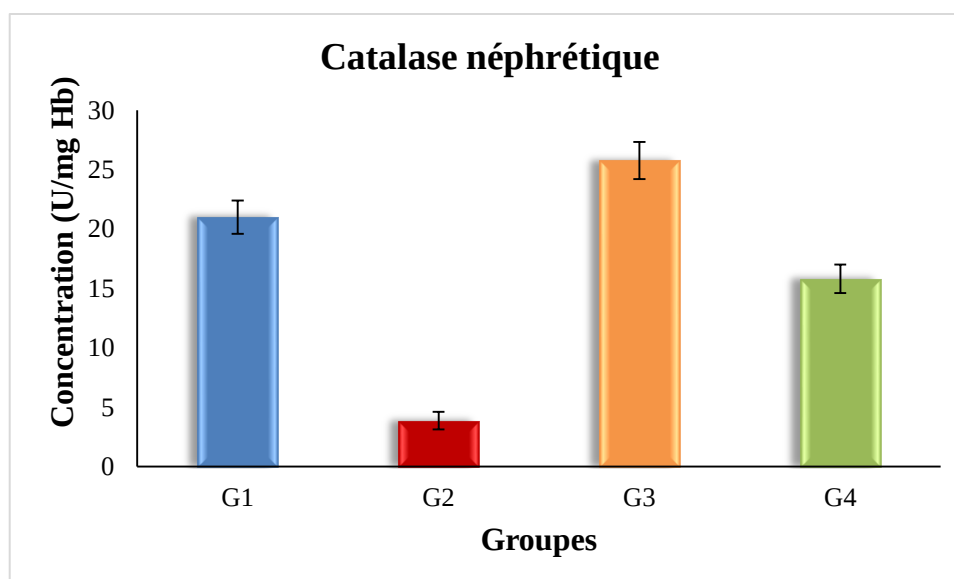


Figure 28 : Teneurs néphrétique en catalase (U/mg Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR.

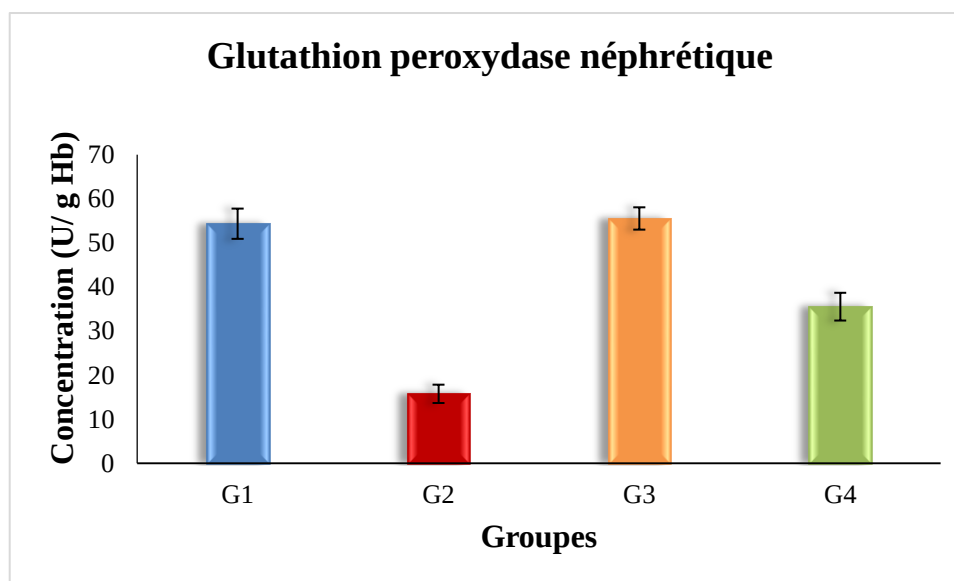


Figure 29 : Teneurs néphrétique en Glutathion peroxydase (U/ g Hb) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

Une étude portée par [Tichati et al. \(2022\)](#) a souligné l'effet positif de l'extrait aqueux du *Rhamnus alaternus* dans la réparation des dommages causés par la toxicité des métaux dans le tissu rénal par l'augmentation significative des activités de la superoxyde dismutase, de la catalase et de glutathion peroxydase.

II.5. Détermination du statut inflammatoire

• La prostaglandine E2

L'analyse des concentrations sériques de prostaglandine E2 (PGE2) chez les quatre groupes expérimentaux représentée sur la [figure 30](#) révèle une baisse modérée chez les rats du groupe G3 recevant 200 mg/kg d'EMR (687.33 pg/mL), comparativement au groupe témoin G1 (690 pg/mL). Par ailleurs, une hausse très hautement significative ($P < 0.001$), a été enregistrée chez les rats diabétiques du groupe G2 par rapport au groupe G4, lequel a été soumis à une injection intrapéritonéale d'alloxane (200 mg/kg) suivie d'un traitement par EMR (200 mg/kg), avec des concentrations respectives de 1313 et 881 pg/mL.

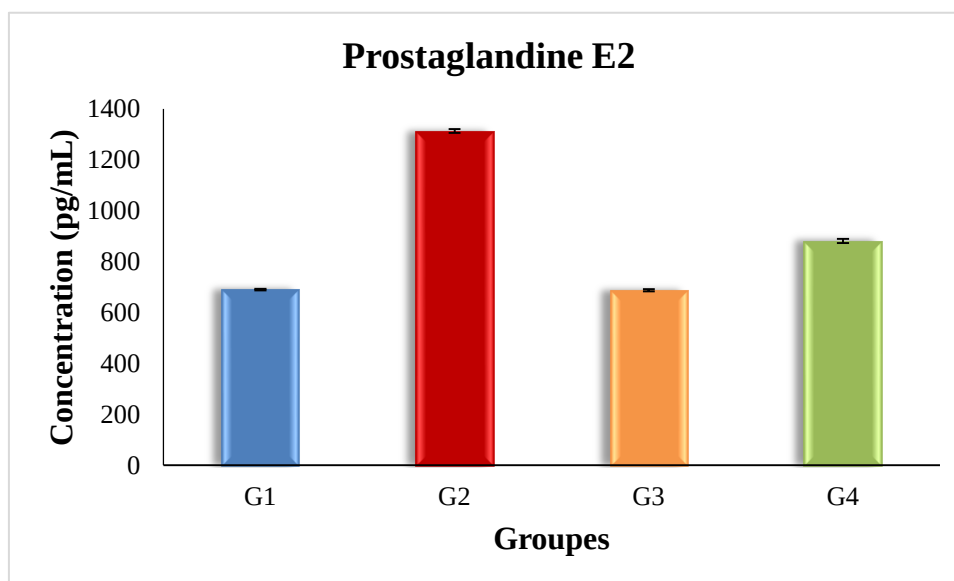


Figure 30 : Teneurs en Prostaglandine E2 (pg/mL) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR

Actuellement, aucune étude n'a évalué directement l'effet des extraits de *Rhamnus alaternus* sur la PGE₂ dans n'importe qu'elle contexte pathologique, rendant la comparaison directe limitée. Toutefois, une étude du potentiel anti-inflammatoire et cicatrisant de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Rhamnus alaternus* menée par [Ait atmane et al. \(2025\)](#) sur des souris a témoigné une réduction significative de l'œdème dose dépendante considérée comme indicative d'effets anti-inflammatoires.

• TNF-alpha Hépatique

L'évaluation des concentrations sériques de TNF- α chez les quatre groupes montre des variations significatives liées au statut physiopathologique et au traitement. Une augmentation modérée a été constaté chez les rats du groupe G3 recevant 200 mg/kg d'EMR (57.82 pg/g), comparativement au groupe témoin G1 (51.52 pg/g).

Par ailleurs, une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$), a été enregistrée chez les rats diabétiques du groupe G2 par rapport au groupe G4, avec des concentrations respectives de 202 et 104.8 pg/g ([fig. 31](#))

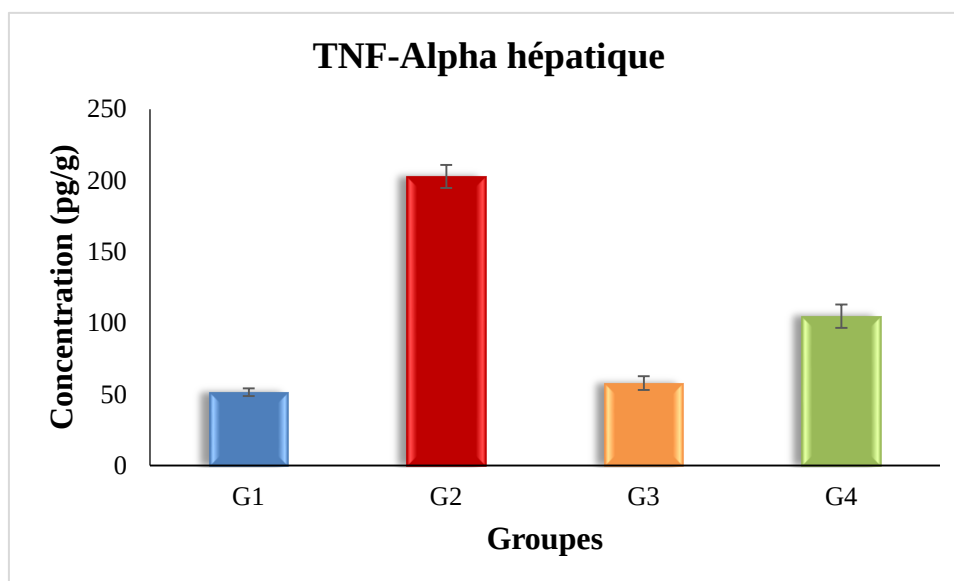


Figure 31 : Teneurs hépatique en TNF-Alpha (pg/g) chez les rats traités ou/non par l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et dont le diabète est induit ou pas par l'alloxane. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : Témoin ; G2 : 200 mg/kg d'alloxane en i.p ; G3 : 200mg/kg d'EMR ; G4 : 200 mg/kg d'alloxane et 200 mg/Kg d'EMR.

L'absence de données antérieures sur l'effet de *Rhamnus alaternus* sur le TNF- α hépatique dans ce contexte pathologique précis souligne le caractère exploratoire de la présente étude. En outre, une comparaison relative avec une étude portée par [Chatti et al. \(2025\)](#) a attesté une similitude de l'effet de baisse des marqueurs tumoraux (TNF- α)

II.6. L'étude histologique

• Histopathologie du foie

Les rats du groupe Témoin (G1) présente une structure histologique normale du tissu hépatique, avec une architecture lobulaire bien organisée, caractérisée par une veine centrale entourée de travées régulières d'hépatocytes à noyau central, des sinusoides hépatiques normalement disposés et des espaces portes bien individualisés ([fig. 32-a](#)).

L'administration intrapéritonéale d'alloxane aux rats appartenant au groupe diabétique (G2) a induit d'importantes altérations histopathologiques. L'examen histopathologique du foie a révélé une stéatose micronodulaire et centro-lobulaire, associée à un aspect en « ciel étoilé » ainsi qu'à une congestion vasculaire ([fig. 32-b](#)).

En outre, la coupe histologique du G3 (rats administrés uniquement de l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* à raison de 200 mg/kg/j) révèle l'apparition d'une congestion vasculaire.

Enfin, l'administration de 200 mg/kg/jour d'extrait de EMR après induction du diabète chez les rats du groupe de traitement (G4) a montré une régression de la congestion vasculaire et de la stéatose micronodulaire dans certaines zones du tissu hépatique, notamment celles présentant une congestion vasculaire, ainsi qu'une élimination de la stéatose centro-lobulaire et de l'aspect « ciel étoilé » (fig. 32-d).

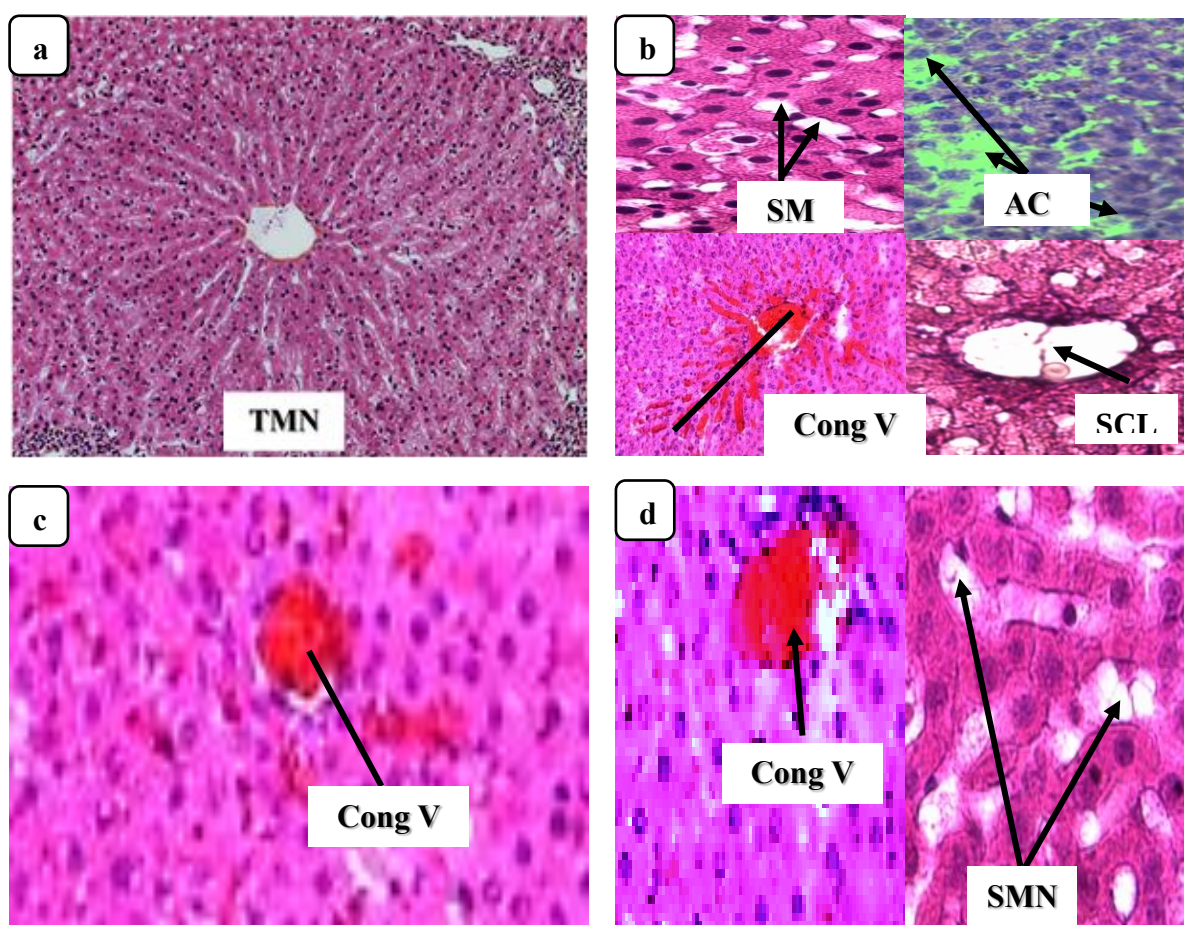


Figure 32 : Coupes histologiques (Gx100) du foie des rats du groupe : (a) : G1 Groupe Témoin ; (b) : G2 200 mg/kg d'alloxane ; (c) : G3 200 mg/kg/jour d'EMR pendant 90 jours ; (d) : G4 200 mg/kg d'alloxane + 200 mg/kg/j d'EMR pendant 30 jours.

TMN : Tissu hépatique normal, **SMN :** Stéatose micronodulaire, **ACE :** Aspect étoilé, **Cong V :** Congestion vasculaire, **SCL :** Stéatose Centro lobulaire.

L'administration d'alloxane provoque des lésions hépatiques majeures, manifestées par une stéatose bimodale (micronodulaire et Centro lobulaire) associée à une congestion vasculaire. Ces altérations structurelles, de même que l'accumulation lipidique, s'inscrivent dans le profil caractéristique des complications hépatiques liées à l'hyperglycémie chronique (Lenzen, 2008 ; Szkudelski, 2001). Sur le plan mécanistique, ce profil pathologique découle directement du stress oxydatif induit par une hyperglycémie prolongée, phénomène démontré par Robertson et al. (2004) ainsi que par Ceriello et Motz (2004). La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) provoque une peroxydation lipidique marquée, conduisant à une désorganisation du parenchyme lobulaire et expliquant ainsi la manifestation de la stéatose ainsi que l'aspect typique qualifié de « en ciel étoilé ».

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Benzaid et al. (2021), lesquels indiquent une restauration quasi intégrale de l'architecture hépatique après un traitement par des extraits aqueux de *Rhmanus alaternus* dans un modèle d'hépatotoxicité induite par le chlorure d'aluminium (AlCl₃).

• Histopathologie du pancréas

L'examen histopathologique des tissus pancréatiques des rats témoins du groupe (G1) a montré une organisation histologique pancréatique préservé constitué d'acini exocrine denses et d'îlots de Langerhans (portion endocrine) nettement délimités. Ces îlots se manifestent sous forme d'amas cellulaires sphériques et translucides, caractérisés par une cellularité préservée, une vascularisation homogène et une absence complète d'inflammation ou de fibrose (fig. 33-a).

L'administration intrapéritonéale unique de 200mg/kg d'alloxane aux rats appartenant au groupe diabétique (G2) a induit d'importantes altérations histopathologiques. L'examen du pancréas a révélé des lésions sévères, incluant une nécrose atrophique, d'importants infiltrats inflammatoires ainsi que des ganglions lymphatiques kystiques (fig. 33-b).

En outre, Les rats du Groupe (G3) traités avec 200 mg/kg d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* ont révélé une structure normale semblable au groupe témoin (G1) (fig. 33-c)

Enfin, l'administration de 200 mg/kg/jour d'extrait de RME après induction du diabète chez les rats du groupe de traitement (G4) à montrer un rétablissement totale des complications observés lors de l'induction du diabète par injection intrapéritonéale d'alloxane chez les rats du groupe diabétique (G2) (fig. 33-d)

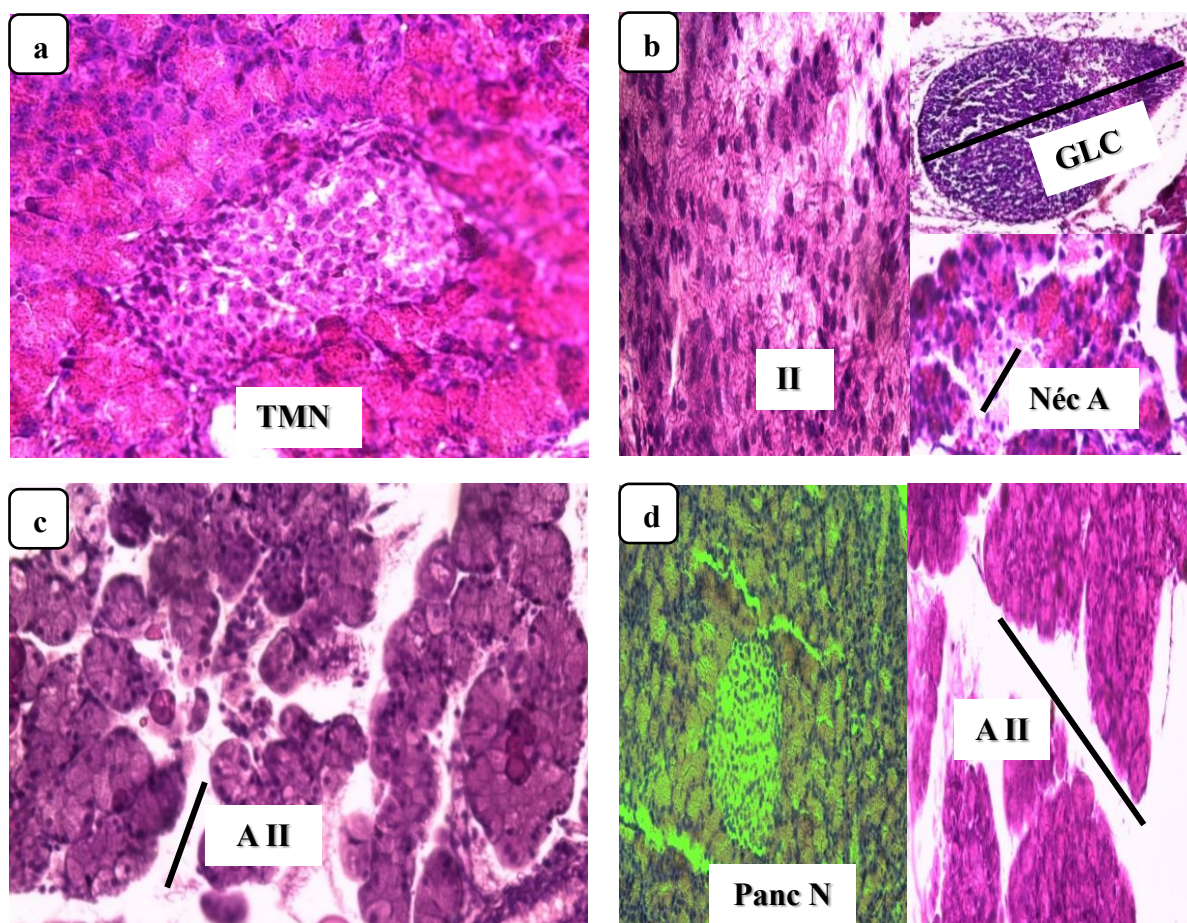


Figure 33 : Coupes histologiques du pancréas (Gx100) des rats du groupe : (a) : G1 Groupe Témoin ; (b) : G2 200 mg/kg d'alloxane ; (c) : G3 200 mg/kg/jour d'EMR pendant 90 jours ; (d) : G4 200 mg/kg d'alloxane + 200 mg/kg/j d'EMR pendant 30 jours.

TMN : Tissu pancréatique normal, **II** : Infiltrat inflammatoire, **GLC** : Ganglion lymphatique kystique, **Néc A** : Nécrose atrophique, **A II** : Absence d'infiltrat inflammatoire, **Panc N** : Pancréas normal.

L'analyse histopathologique du pancréas des rats témoins (G1) révèle une organisation tissulaire normale et intacte (Bonner-Weir, 2001). En revanche, l'administration d'alloxane (G2) provoque des lésions sévères caractérisées par une nécrose partielle des cellules β , une atrophie des îlots de Langerhans ainsi que de larges infiltrations inflammatoires. D'un point de vue mécanistique, cette cytotoxicité sélective provient d'une génération accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), induisant un stress oxydatif létal pour les cellules endocrines (Lenzen, 2008 ; Szkudelski, 2001), tandis que la réponse immuno-inflammatoire locale contribue de manière supplémentaire au remodelage délétère de l'îlot (Wang et al., 2013).

L'administration exclusive de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (G3) corrobore l'absence de toxicité tissulaire directe, la structure conservant une similarité avec celle du témoin. Dans un contexte thérapeutique (G4), l'extrait favorise une restauration presque intégrale de l'architecture pancréatique, marquée par une réorganisation des îlots ainsi qu'une régression significative des foyers nécrotiques et inflammatoires. Cette pancréato-protection résulte des propriétés cytoprotectrices des composés phénoliques présents dans les végétaux (Pandey et Rizvi, 2009). De manière plus précise, les flavonoïdes, notamment la quercétine et le kaempférol, interviennent dans la régulation du stress oxydatif et modulent les voies de survie des cellules β (Cai et al., 2018 ; Li et al., 2020), tandis que les fractions polyphénoliques contribuent à la restauration de la fonction endocrine (Zhang et al., 2021 ; Abdelmegeed et al., 2022).

En résumé, *Rhamnus alaternus* neutralise efficacement la toxicité de l'alloxane en préservant l'intégrité structurelle des îlots de Langerhans par le biais de mécanismes conjoints antioxydants et anti-inflammatoires.

- **Histopathologie des reins**

L'examen du tissu rénal après induction du diabète par injection intrapéritonéale unique de 200mg/kg d'alloxane aux rats appartenant au groupe diabétique (G2) a induit une congestion vasculaire sévère (fig. 34-b) qui a été régressé partiellement après l'administration de 200 mg/kg/jour d'extrait de RME après induction du diabète chez les rats du groupe de traitement (G4) (fig. 34-c).

Cependant, suite à l'administration d'EMR après l'induction du diabète, une réduction significative de cette congestion a été remarquée chez les rats du groupe traité (G4) (fig. 34-d). En revanche, aucune modification n'a été observée chez les rats du groupe témoin (G1) (fig. 34-a).

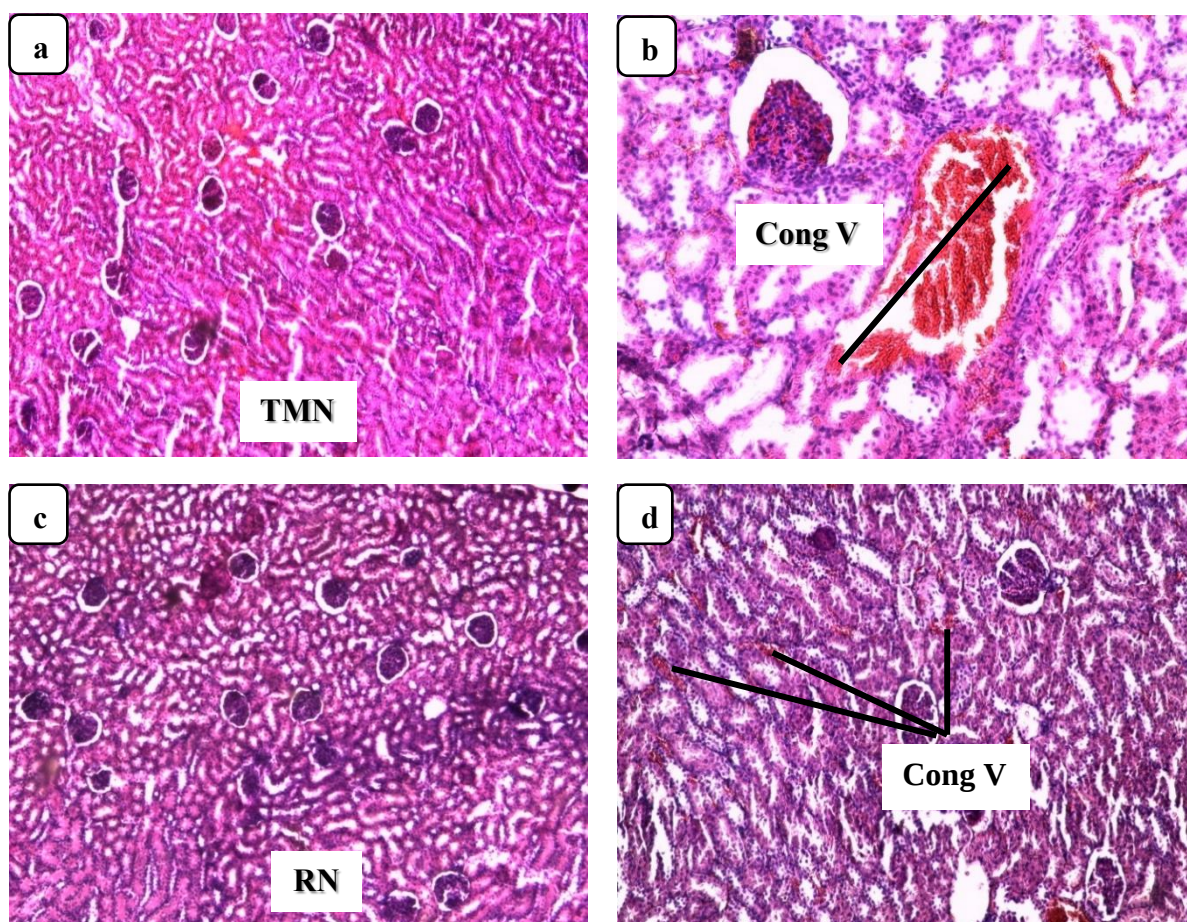


Figure 34 : Coupes histologiques des reins (Gx100) des rats du groupe : (a) : G1 Groupe Témoin ; (b) : G2 200 mg/kg d'alloxane ; (c) : G3 200 mg/kg/jour d'EMR pendant 90 jours ; (d) : G4 200 mg/kg d'alloxane + 200 mg/kg/j d'EMR pendant 30 jours.

TMN : Tissu rénale témoin ; **Cong V :** Congestion vasculaire ; **RN :** Rein normale.

Le dysfonctionnement rénal observé chez les rats diabétiques induits par l'alloxane est en corrélation avec la vulnérabilité bien documentée du tissu rénal aux lésions oxydatives associées à l'hyperglycémie. Une hyperglycémie chronique entraîne une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dépassant les capacités des systèmes antioxydants endogènes et induisant un stress oxydatif majeur au niveau rénal (Brownlee, 2005 ; Forbes et Cooper, 2013 ; Thomas et al., 2015). Ce déséquilibre redox constitue un mécanisme central dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique.

Les glomérules sont particulièrement sensibles à ces agressions en raison de leur forte vascularisation et de leur activité métabolique élevée. Les lésions des cellules induites par le stress oxydatif entraînent une altération de la barrière de filtration glomérulaire, une

augmentation de la perméabilité membranaire et une diminution progressive de la fonction rénale (Tervaert et al., 2010 ; Reidy et al., 2014). Ces modifications structurelles contribuent à l'élévation des marqueurs azotés tels que la créatinine et l'urée, reflétant une altération de la filtration glomérulaire.

Par ailleurs, la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines induites par le stress oxydatif entraînent une désorganisation de la membrane basale glomérulaire et une atteinte mitochondriale des cellules rénales, aggravant ainsi le dysfonctionnement rénal (Sharma, 2016 ; Forbes et Thorburn, 2018 ; Singh et al., 2018). Ces altérations participent à la progression des lésions glomérulaires et tubulaires caractéristiques de la néphropathie diabétique.

Le traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a permis une amélioration significative des paramètres rénaux, suggérant une réduction des lésions oxydatives induites par l'hyperglycémie. Cet effet néphroprotecteur pourrait être attribué à la richesse de l'extrait en flavonoïdes et acides phénoliques, dont les propriétés antioxydantes sont largement documentées (Pandey et Rizvi, 2009 ; Ben Ammar et al., 2015 ; Tlili et al., 2019). Ces composés agissent en neutralisant les radicaux libres et en inhibant les réactions de peroxydation lipidique, tout en renforçant les systèmes enzymatiques antioxydants endogènes.

De plus, les flavonoïdes tels que la quercétine, la rutine et le kaempférol ont été rapportés comme modulant les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et l'apoptose des cellules rénales exposées au stress oxydatif (Li et al., 2020 ; Zhang et al., 2022 ; Liu et al., 2021). Ces mécanismes contribuent à limiter les lésions glomérulaires et tubulaires et à préserver l'intégrité fonctionnelle du rein.

Enfin, l'amélioration des paramètres de la fonction rénale chez les animaux traités concorde avec les données rapportées par Navarro-González et Mora-Fernández (2011) et Wada et Makino (2016), qui soulignent que la réduction du stress oxydatif et de l'inflammation constitue une stratégie clé dans la prévention de la progression de la néphropathie diabétique.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'extrait de *Rhamnus alaternus* exerce un effet néphroprotecteur significatif, reposant principalement sur une action antioxydante et cytoprotectrice, permettant de limiter les lésions rénales induites par l'hyperglycémie et de préserver l'homéostasie rénale.

Partie III : L'effet antihyperlipidémique du *Rhamnus alaternus* chez les rats Wistar

III.1. Dosage des marqueurs biochimiques

- **Glycémie**

Le dosage du taux de glycémie sanguin illustré sur la [figure 35](#) a révélé des variations significatives entre les groupes. Le groupe témoin (G1) maintient une glycémie normale de 0.88 g/L, indiquant un métabolisme glucidique équilibré. En revanche, les rats du groupe HFD (G2) présentent une augmentation très hautement significative de la glycémie ($p < 0.001$), confirmant l'impact délétère du régime hyper lipidique sur l'homéostasie glucidique.

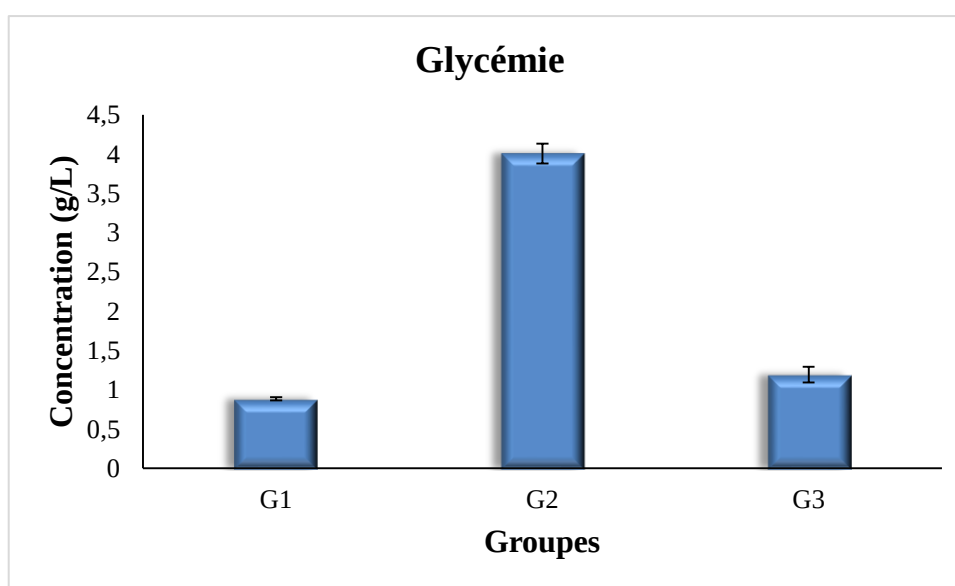


Figure 35 : Taux de glycémie (g/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats du groupe G2, l'instauration d'un régime hyperlipidique (HFD) a provoqué une hyperglycémie marquée, caractérisée par une glycémie moyenne de 4.06 g/L à la fin de l'expérimentation. Inversement, une réduction très hautement significative ($P < 0.001$) du profil glycémique a été constatée chez les rats soumis au traitement par l'EMR. L'administration concomitante et prolongée de l'EMR au régime HFD (groupe G3) a empêché la défaillance de l'homéostasie glucidique en maintenant la concentration en glucose

à 1.19 g/L, ce qui correspond à une diminution de 70.69 % par rapport au groupe pathologique non traité. Ces données mettent en évidence l'effet antihyperglycémique significatif ainsi que le potentiel thérapeutique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus*. Dans cette étude, l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a induit une réduction extrêmement significative du taux de glycémie chez les rats présentant une hyperlipidémie. Cet effet anti hyperglycémiant pourrait être attribué à la concentration élevée en composés phénoliques et flavonoïdes présents dans l'extrait, en particulier la quercétine, la rutine et le kaempférol, qui augmentent la sensibilité à l'insuline, tout en réduisant le stress oxydatif et régulant le métabolisme glucidique (Reffas et al., 2026).

Les données recueillies corroborent celles publiées par Amtaghri et al. (2022), qui a démontré qu'un extrait aqueux de *Rhamnus alaternus*, administré à des rats diabétiques induits par la streptozotocine, entraînait une diminution significative de la glycémie dès les sept premiers jours de traitement. Les chercheurs ont en outre constaté une amélioration de la tolérance au glucose ainsi qu'une concentration élevée en polyphénols et en flavonoïdes au sein de l'extrait, composés susceptibles de contribuer à son effet antidiabétique.

Ces résultats corroborent également les données présentées par Reffas et al. (2026), qui ont démontré qu'un extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus*, administré à une dose de 200 mg/kg, entraînait une diminution de 58 % de la glycémie chez des rats diabétiques induits par l'alloxane après un traitement prolongé ; cet effet a été attribué à la présence de flavonoïdes bioactifs susceptibles d'inhiber plusieurs cibles moléculaires impliquées dans l'homéostasie glucidique (α -glucosidase, DPP-4, glucokinase, PPAR- γ).

III.2. Le dosage des paramètres biochimiques

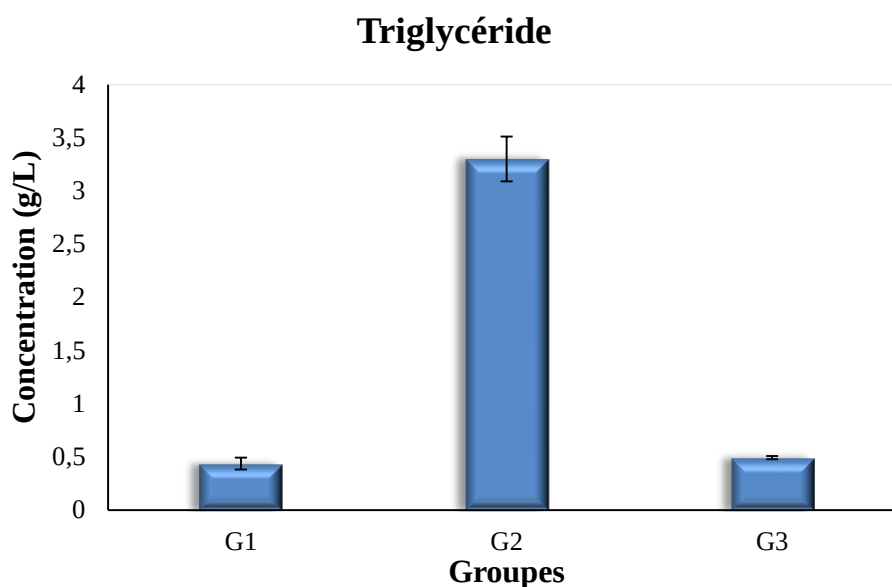
- **Triglycérides (TG)**

Les rats du groupe G2 nourris uniquement avec un régime hypergras ont manifesté une augmentation prononcée et très hautement significative du taux sérique de triglycéride ($P < 0.001$), de 3.3 g/L par rapport au groupe témoin G1 attestant une concentration de 0.43 g/L (fig. 36). Ce qui traduit l'installation d'un état d'hypertriglycéridémie sévère, témoignant d'une perturbation importante du métabolisme lipidique induite par le régime riche en graisses.

En outre une chute jugée très hautement significative ($P < 0.001$) de 0.49g/L du même paramètre est constatée le groupe 3 par rapport au groupe G2 (3.3g/L). Cette diminution

suggère que le traitement administré exerce un effet hypo-triglycéridémiant marqué, capable de restaurer l'homéostasie lipidique altérée par le régime hypergras.

La valeur obtenue chez le groupe G3 (0.49 g/L), très proche de celle du groupe témoin G1 (0.43 g/L), indique une correction presque complète de l'hypertriglycéridémie induite par le régime hypergras. Ces résultats mettent en évidence l'efficacité du traitement administré dans la prévention ou la correction des désordres lipidiques associés à l'excès alimentaire en



lipides.

Figure 36: Taux de triglycéride (g/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures (n = 6).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats soumis à un régime hyperlipidique (HFD), l'élévation de la concentration en triglycérides résulte d'une augmentation de la synthèse hépatique des acides gras, ainsi que d'une sécrétion anormale de lipoprotéines de très basse densité (VLDL). En effet, un apport lipidique excessif entraîne une accumulation d'acides gras au niveau du foie, lesquels sont ensuite estérifiés en triglycérides et intégrés aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL) avant d'être libérés dans la circulation sanguine. Une des caractéristiques principales de l'hypertriglycéridémie induite par un régime alimentaire riche en lipides (HFD) réside dans cette altération du métabolisme lipidique (Fabbrini *et al.*, 2021 ; Choi & Ginsberg, 2022).

La diminution extrêmement significative des triglycérides constatée à la suite de l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* suggère une amélioration du métabolisme lipidique hépatique. Cette action pourrait être attribuée à la concentration élevée en polyphénols et flavonoïdes présente dans l'extrait, lesquels sont susceptibles de réguler l'expression des enzymes associées à la lipogenèse et d'activer la β -oxydation des acides gras. Ces processus contribuent à réduire l'accumulation des triglycérides tout en optimisant le profil lipidique global (Li et al., 2022 ; Zhang et al., 2023). Cette hypothèse est également corroborée par les recherches de Tacherfiout et al. (2018), lesquelles ont mis en évidence une diminution significative des triglycérides chez des rats hyperlipidémiques soumis à un traitement par extrait de *Rhamnus alaternus*.

- **Cholestérol total (TC)**

Le dosage du taux lipidique du cholestérol a montré une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) chez les rats qui ont reçu uniquement le régime hyper gras (G2) de 4.34 g/L par rapport au groupe témoin G1 (1.52 g/L). Cela traduit l'apparition d'une hypercholestérolémie sévère, témoignant d'une perturbation du métabolisme lipidique causée par un apport alimentaire excessif en lipides.

En outre, une réduction très hautement significative de cette concentration sérique d'ordre de 1.54 g/L a été constatée chez les rats du groupe G3 comparativement au groupe G2. Cette amélioration suggère que le traitement administré exerce un effet hypocholestérolémiant important.

Il convient de souligner que la concentration de cholestérol mesurée dans le groupe G3 (1.54 g/L) est quasi identique à celle du groupe témoin G1 (1.52 g/L), ce qui suggère une restauration quasi totale de l'hypercholestérolémie provoquée par le régime riche en graisses. Ce résultat souligne l'efficacité du traitement appliqué dans la correction des dyslipidémies provoquées par une alimentation hyperlipidique.

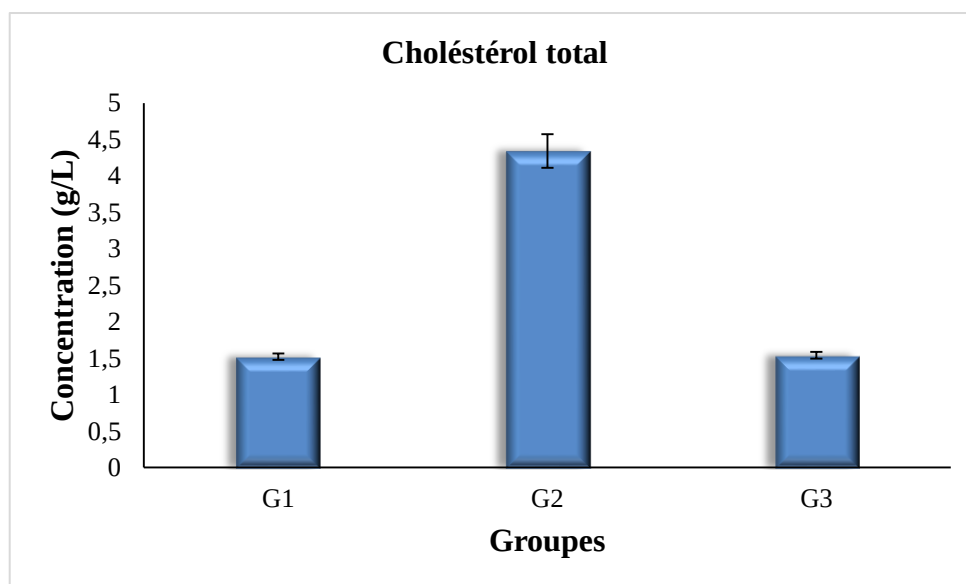


Figure 37 : Concentration de cholestérol (g/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Une perturbation significative de l'homéostasie du cholestérol est mise en évidence par l'augmentation du taux de cholestérol total chez les rats soumis à un régime hyperlipidique. Un surplus de substrats lipidiques encourage l'accumulation lipidique hépatique et active les voies de biosynthèse du cholestérol, notamment par la modulation de l'activité de la HMG-CoA réductase, entraînant ainsi une élévation des concentrations plasmatiques du cholestérol total et une majoration du risque athérogène (Ipsen et al., 2018).

La diminution extrêmement significative du cholestérol total constatée suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique une potentialité hypocholestérolémiante. Cette constatation est confirmée par les résultats de Tacherfiout et al. (2018), qui ont démontré une réduction significative du cholestérol total chez des rats hyperlipidémiques soumis à un traitement par un extrait foliaire de *R. alaternus*. L'effet constaté pourrait s'expliquer par la concentration élevée en composés phénoliques et flavonoïdes présents dans l'extrait, lesquels sont reconnus pour moduler le métabolisme du cholestérol en inhibant son absorption intestinale, en diminuant sa biosynthèse hépatique et en favorisant son excrétion sous forme d'acides biliaires (Cory et al., 2018 ; Zhang et al., 2022).

- Urée

La Figure 38 illustre la concentration plasmatique d'urée chez des rats Wistar, qu'ils aient ou non subi l'administration d'un régime hypergras (HFD). Une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) de la concentration plasmatique d'urée a été observée chez les rats du groupe G2 nourris uniquement avec un régime hypergras (1.22 g/L) par rapport au groupe témoin G1 (0.37 g/L) ce qui témoigne d'une altération de la fonction rénale induite par le régime riche en graisses.

À l'inverse, Une diminution spectaculaire et très hautement significative ($P < 0.001$) de l'urée plasmatique a été observée chez les rats du groupe G3 (0.39 g/L) ayant reçu simultanément de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* et un régime HFD pendant toute la durée de l'étude avec des valeurs presque similaires à celles du groupe témoin G1 (0.37 g/L), comparativement aux animaux du groupe G2, nourris avec un régime riche en graisses (HFD) pendant toute la période expérimentale, présentant un taux de 1.22 g/L ce qui indique un effet néphroprotecteur potentiel de l'extrait, capable d'atténuer les perturbations rénales induites par le régime hypergras.

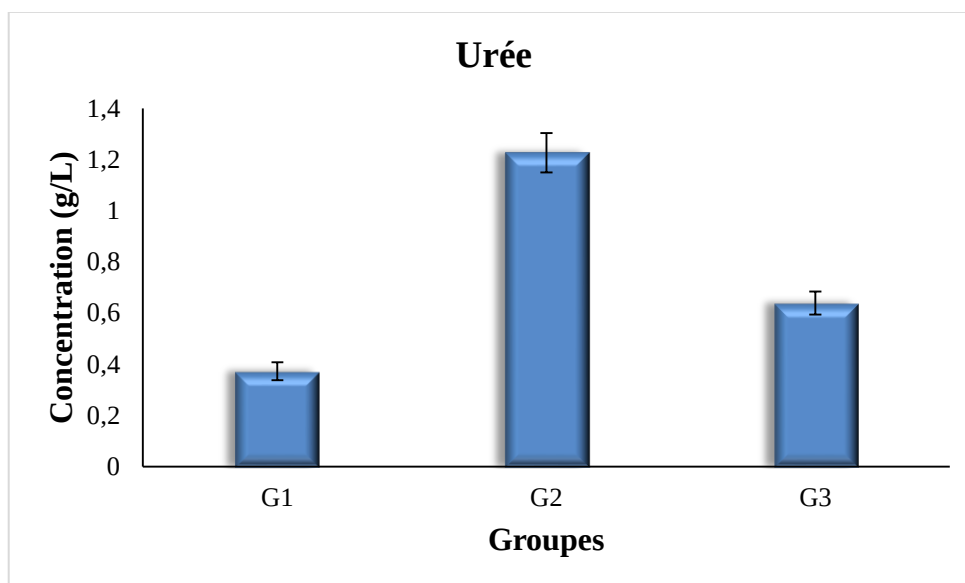


Figure 38 : Taux sérique d'urée (g/L) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats exposés à un régime riche en lipides (HFD), l'élévation du taux d'urée constitue un indicateur de dysfonction rénale associée aux perturbations métaboliques provoquées par

l'hyperlipidémie. Un surplus de lipides peut provoquer leur accumulation au sein des tissus rénaux, ce qui contribue à l'augmentation du stress oxydatif ainsi qu'aux dommages rénaux. Ces modifications sont susceptibles d'affecter la fonction de filtration rénale, entraînant une élévation des concentrations sériques d'urée et de créatinine (Sun et al., 2020).

La réduction significative du taux d'urée constatée suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique un effet susceptible de protéger la fonction rénale. Cette amélioration pourrait être attribuée à la concentration élevée en composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait, connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. En atténuant le stress oxydatif ainsi que les lésions cellulaires provoquées par l'hyperlipidémie (Yang et al., 2023).

- **Créatinine**

Dans la présente étude, on remarque des différences très hautement significatives ($P < 0.001$) entre les groupes (fig. 39). En comparaison avec le groupe témoin qui a montré une créatinémie allant jusqu'à 3.35 mg/L, le groupe G2 (qui a reçu seulement le régime hyper gras HFD) a montré une augmentation importante de la créatinémie à 20.01mg/L. Cette élévation massive témoigne d'une altération sévère de la fonction de filtration glomérulaire induite par la lipotoxicité et le stress métabolique du régime HFD.

Inversement, L'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a eu un effet néphroprotecteur marqué. Une baisse spectaculaire du taux sanguin de créatinine a été observée chez les rats du groupe G3, en le maintenant à une concentration de 5.68 mg/L (soit une diminution de 71.61 % par rapport à G2).

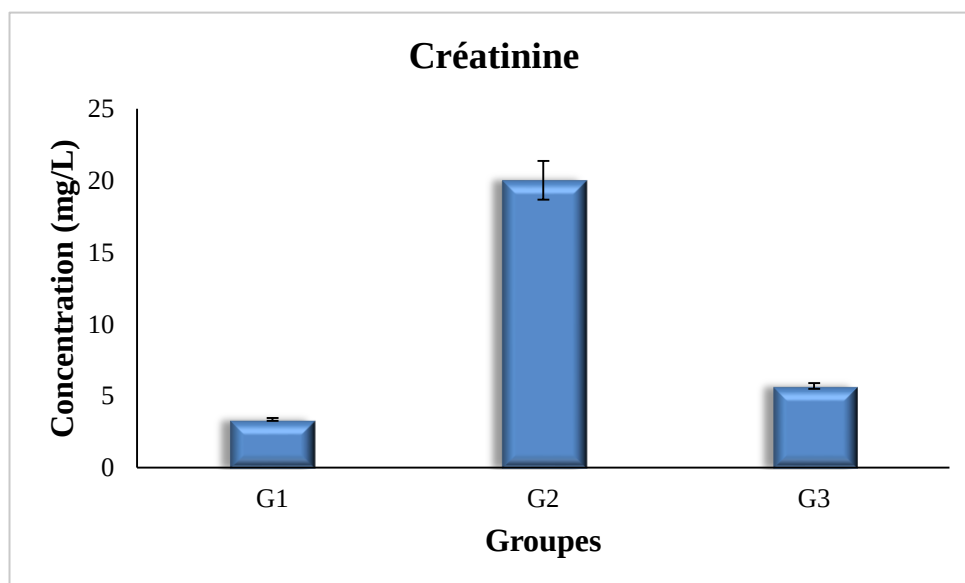


Figure 39 : Concentration de créatinine (mg/L) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures (n = 6).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats soumis à un régime hyperlipidique (HFD), l'élévation de la créatinine constatée résulte essentiellement d'une réduction du débit de filtration glomérulaire (DFG), témoignant d'une détérioration de la fonction rénale. La créatinine constitue un indicateur fiable de la capacité de filtration rénale. Une augmentation de sa concentration indique une défaillance rénale dans l'élimination efficace des déchets circulants. Il a été établi que les régimes alimentaires à forte teneur en lipides et en glucides provoquent une dysfonction rénale initiale, caractérisée par des modifications hémodynamiques et morphologiques du glomérule, aboutissant à une diminution progressive du débit de filtration glomérulaire (DFG) (Declèves et Sharma, 2015 ; Tsuboi et al., 2020).

La réduction de la créatinine constatée après l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique un effet néphroprotecteur probable, vraisemblablement associé à la préservation de la fonction glomérulaire. Les composés phénoliques et flavonoïdes contenus dans l'extrait possèdent la capacité de réduire le stress oxydatif, de bloquer les médiateurs inflammatoires et d'optimiser la microcirculation rénale, contribuant ainsi à la restauration d'une filtration glomérulaire normale (Li et al., 2023).

• Acide urique

Les résultats illustrés dans la figure 40 manifeste une augmentation notable très hautement significative ($P < 0.001$) du taux sérique d'acide urique allant de 8.43mg/dL chez le groupe témoin G1 jusqu'à 35.83 mg/dL chez le groupe G2 administré d'un régime hyper gras pendant toute la période expérimentale ce qui résulte du régime riche en lipides qui perturbe le métabolisme hépatique en favorisant la synthèse d'acide urique, tout en compromettant sa filtration et son excrétion rénale, phénomène associé à une lipotoxicité rénale.

Contrairement, une baisse très hautement significative ($P < 0.001$) de concentration d'acide urique de 9.12 mg/dL a été constatée chez les rats du groupe G3 administré d'EMR et nourris avec un régime HFD simultanément pendant toute la période expérimentale, en comparaison avec celle du groupe G2.

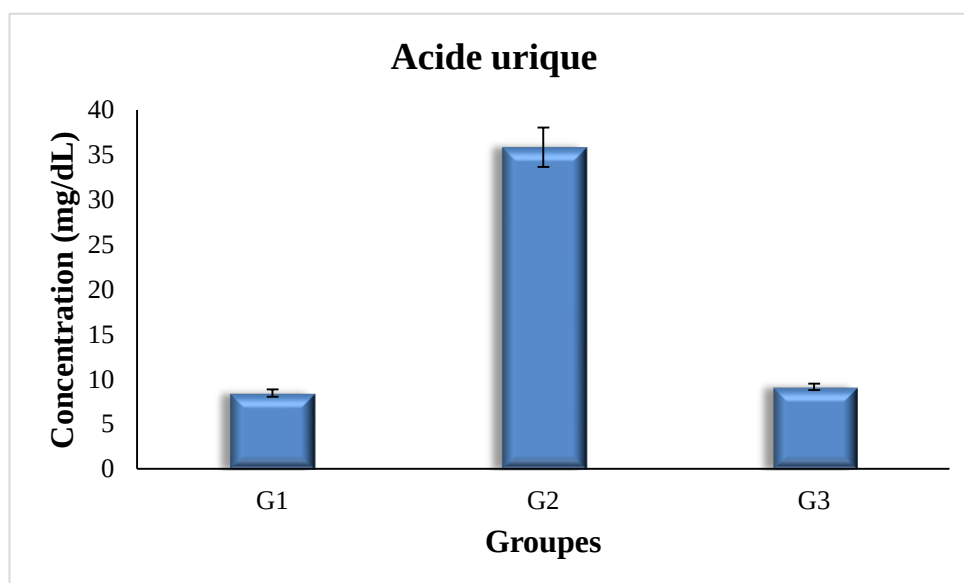


Figure 40 : Concentration sérique en acide urique (mg/dL) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats nourris avec un régime riche en lipides (HFD), l'augmentation de l'acide urique peut être expliquée par les perturbations métaboliques liées à l'hyperlipidémie et à l'obésité. De nombreuses études ont démontré que l'alimentation riche en graisses favorise une augmentation de la production d'acide urique et une réduction de son élimination rénale, ce

qui aboutit à une hyperuricémie. Cette élévation est fréquemment liée à un stress oxydatif accru et à une inflammation chronique de bas grade, typiques des troubles métaboliques induits par le HFD (Johnson et al., 2018 ; Sanchez-Lozada et al., 2020).

La réduction très hautement significative de l'acide urique observée après le traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* suggère une amélioration du statut métabolique et de la fonction rénale. Cette action pourrait être due à l'effet de réduction du stress oxydatif et de modulation des voies impliquées dans la production d'acide urique exercé par l'extrait, ainsi que la facilitation de son élimination, ce qui contribue à la normalisation de ce paramètre biochimique (Pérez-Ruiz et al., 2019 ; Li et al., 2022).

- **Alanine aminotransférase (ALAT)**

La mesure de l'alanine aminotransférase (fig. 41) met en évidence une diminution très hautement significative ($P < 0.001$) chez les rats ayant reçu l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR), comparativement au groupe pathologique G2 (110.5 UI/L). Effectivement, l'administration concomitante de l'EMR au sein du groupe G3 a permis de maintenir le taux d'ALAT à 43.73 UI/L, valeur quasiment équivalente à celle observée dans le groupe témoin G1 (44 UI/L).

L'élévation marquée des ALAT observée dans le groupe (G2) par rapport aux rats du groupe témoin (G1) résulte de la lipotoxicité induite par un régime riche en lipides.

La normalisation complète constatée dans le groupe G3 témoigne de l'effet hépato protecteur marqué de l'EMR.

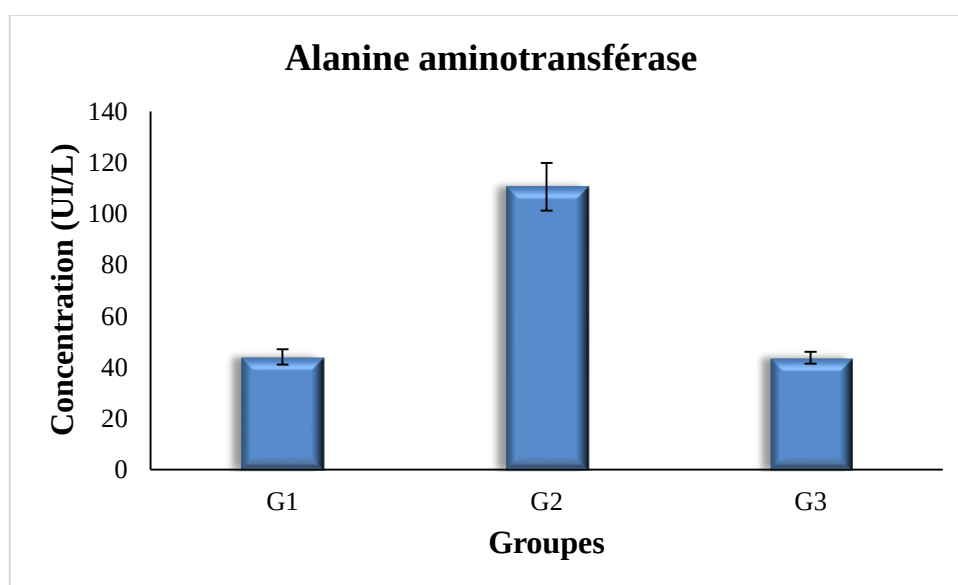


Figure 41 : Taux d'alanine aminotransférase (UI/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures (n = 6).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

La diminution extrêmement significative du niveau d'ALAT suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique un effet protecteur possible sur le tissu hépatique. Cette amélioration pourrait s'expliquer par l'effet antioxydant des composés poly phénoliques et flavonoïdiques renfermer dans l'extrait qui limitent les dommages cellulaires et maintien l'intégrité des hépatocytes face aux effets délétères d'un régime hyperlipidique (Zhang et al., 2024).

Chez les rats soumis à un régime alimentaire riche en lipides (HFD), l'élévation du taux d'alanine aminotransférase (ALAT) témoigne d'une altération de la fonction hépatique consécutive à une accumulation excessive de lipides dans le foie. Étant donné que l'alanine aminotransférase (ALAT) se localise essentiellement dans le cytoplasme des hépatocytes, elle constitue un indicateur sensible des atteintes hépatiques. Un excès de lipides induit une stéatose hépatique, caractérisée par une intensification du stress oxydatif et de la réaction inflammatoire, compromettant ainsi l'intégrité des hépatocytes et favorisant la libération accrue de cette enzyme dans la circulation sanguine (Loomba et al., 2023 ; Powell et al., 2023).

- **Aspartate aminotransférase (ASAT)**

La figure 42 met en évidence une réduction extrêmement significative ($P < 0.001$) de 53.2 UI/L de l'enzyme ASAT chez les rats du groupe (G3) ayant reçu un traitement par EMR toute au long de la période expérimentale en association avec le régime HFD par rapport aux rats du groupe (G2), cette diminution étant très proche de celle observée chez les animaux témoins qui ont exprimé une concentration de 52.83 UI/L.

L'administration du régime hypergras (HFD) a induit une élévation très hautement significative ($P < 0.001$) du taux sérique d'ASAT atténuant 124.41 UI/L chez les rats du groupe (G2), soumis uniquement à ce régime, comparativement aux rats du groupe témoin G1 présentant un taux de 52.83 UI/L.

L'ASAT est une enzyme présente dans le cytoplasme et les mitochondries des hépatocytes. Son augmentation massive dans le sang chez le groupe G2 confirme une altération cellulaire profonde et une perte d'intégrité de la membrane hépatique. La baisse spectaculaire de l'ASAT dans les groupes traités démontre l'effet cytoprotecteur et antioxydant de l'EMR.

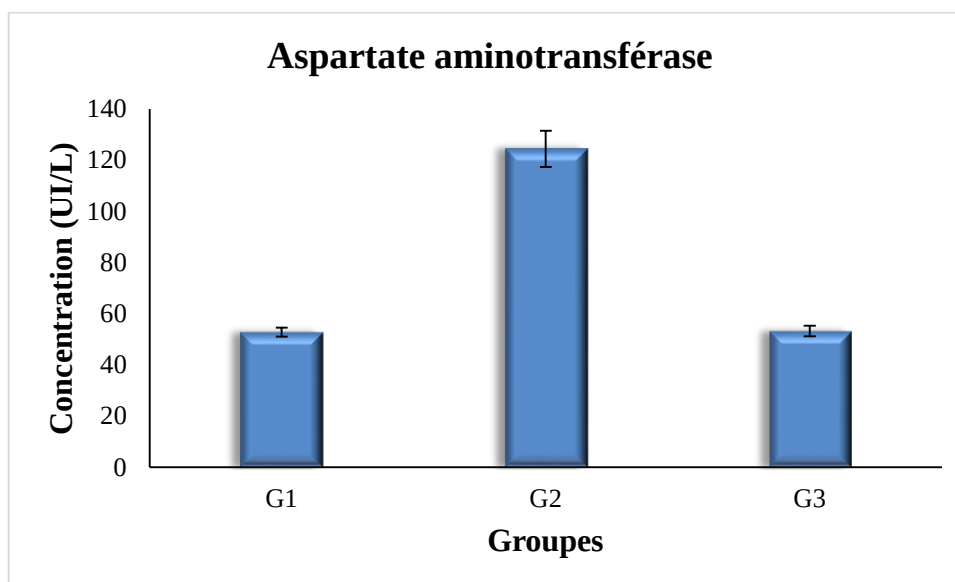


Figure 42 : Taux d'aspartate aminotransférase (UI/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats nourris par un régime riche en lipides (HFD), l'augmentation du taux sérique d'aspartate aminotransférase (ASAT) reflète une atteinte tissulaire notable, étroitement associée aux troubles métaboliques engendrés par l'excès lipidique. L'alanine aminotransférase (ALAT) reste le marqueur principal de la cytolysé hépatique en raison de sa spécificité, tandis que l'aspartate aminotransférase (ASAT) possède une distribution tissulaire plus large, incluant le myocarde, les muscles squelettiques et le parenchyme rénal. En conséquence, son élévation au sein du groupe pathologique reflète non seulement une lésion hépatique, mais traduit également des altérations métaboliques et cellulaires plus généralisées à l'échelle systémique. Le régime hyperlipidique (HFD) intensifie cette fuite enzymatique par le biais de la lipotoxicité, de l'accumulation ectopique de triglycérides et de l'exacerbation subséquente du stress oxydatif (Friedman et al., 2024).

En revanche, l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a provoqué une réduction significative des taux d'ASAT, témoignant ainsi d'une conservation de l'intégrité membranaire et d'une atténuation des dommages cellulaires engendrés par l'hyperlipidémie chronique. Cette modification enzymatique révèle une corrélation significative avec la teneur en composés phénoliques bioactifs présents dans l'extrait. Ces métabolites secondaires, grâce à leurs propriétés antioxydantes élevées et à leur aptitude à capturer les radicaux libres, neutralisent les espèces réactives de l'oxygène (ERO), diminuant par conséquent la peroxydation lipidique des membranes cellulaires et protégeant les organes cibles contre la nécrose tissulaire (Wang et al., 2025).

- **Phosphatase alcaline (PAL)**

D'après les résultats obtenus illustrés dans la figure 43 une augmentation très hautement significative des taux de phosphatase alcaline a été constatée chez les rats du Groupe G2 (138.66 UI/L) par rapport à ceux du groupe témoin G1 (84.33UI/L). Témoinnant une souffrance hépatobiliaire ou d'une cholestase modérée induite par l'accumulation ectopique de lipides (stéatose) due au régime hypergras

Cependant une chute très hautement significative a été détectée chez les rats du groupe G3 (88UI/L) administré de l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* et nourris avec un régime HFD simultanément pendant toute la période expérimentale par rapport à ceux du groupe G2, ce qui démontre que l'EMR exerce un effet protecteur ciblé sur le système hépatobiliaire.

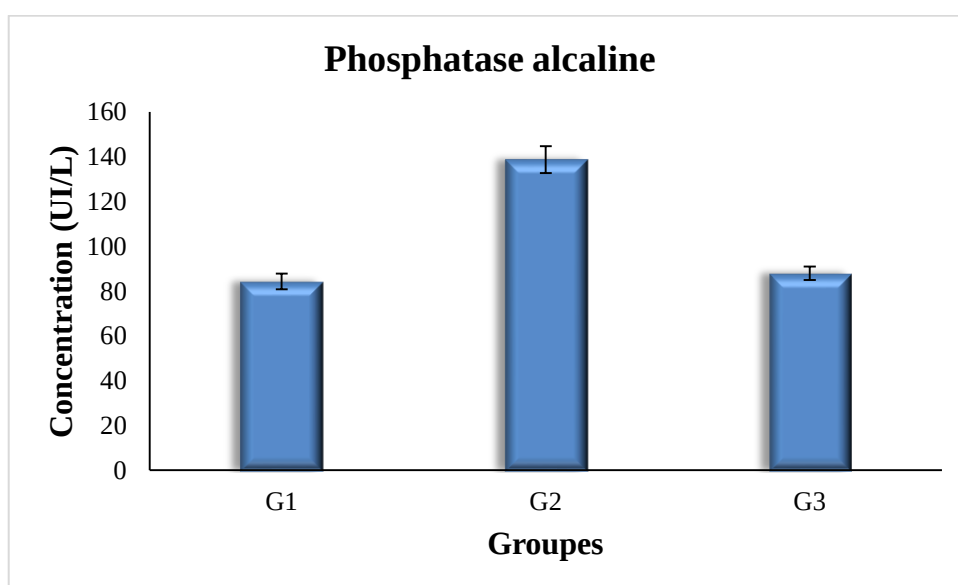


Figure 43 : Concentration sérique en phosphatase alcalines (UI/L) chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures (n = 6).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats soumis à un régime hyperlipidique (HFD), l'élévation de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) peut refléter une altération de la fonction hépatique liée à une accumulation excessive de lipides au niveau hépatique. En effet, l'apparition d'une stéatose hépatique ainsi que les mécanismes inflammatoires associés sont susceptibles d'affecter la fonctionnalité normale des hépatocytes et des voies biliaires, entraînant une élévation de l'activité sérique de cette enzyme (Powell et al., 2023 ; Younossi et al., 2024).

La diminution significative de l'activité de la PAL suite au traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique un potentiel effet hépatoprotecteur de cet extrait. Cette amélioration peut être attribuée à sa concentration élevée en composés phénoliques et flavonoïdes, reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces composés atténuent le stress oxydatif provoqué par un régime hyperlipidique tout en préservant l'intégrité fonctionnelle hépatique (Benzaid et al., 2021).

- **Gamma-glutamyl transférase**

A la lumière des résultats du dosage de la Gamma-glutamyl transférase représenté sur la figure 44, des différences très hautement significatives ($P < 0.001$) sont dévoilés, il s'agit d'une augmentation spectaculaire des concentrations de la Gamma-glutamyl transférase chez les rats du groupe G2 (84.53 UI/L) nourris d'un régime hypergras HFD par rapport au groupe témoin G1 (33 UI/L), ce qui confirme la présence d'une cholestase ou d'une souffrance hépatobiliaire induite par la lipotoxicité du régime hypergras.

Parallèlement, une diminution de 34.4 UI/L est constatée chez les rats du groupe G3 par rapport au animaux du groupe G2, avec une valeur très proche de celle constaté chez les rats témoins du groupe G1 (33 UI/L) ce qui démontre l'effet protecteur de l'EMR sur le système biliaire et corroborant parfaitement les résultats obtenus pour la phosphatase alcaline (PAL).

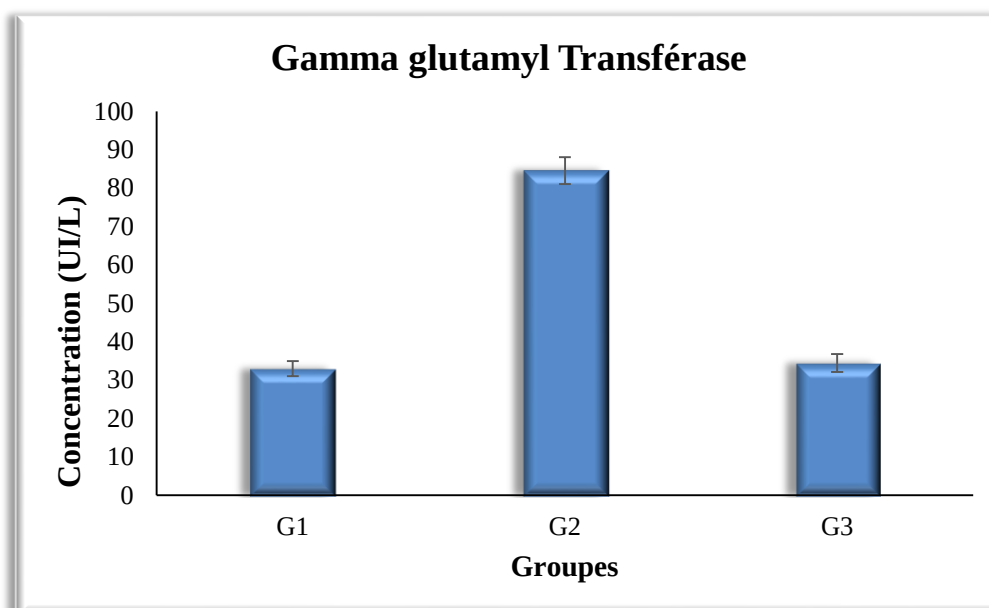


Figure 44 : Taux de Gamma-glutamyl transférase (UI/L) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats soumis à un régime hyperlipidique (HFD), l'élévation de la gamma-glutamyl transférase reflète principalement une altération du système glutathion, constituant le principal mécanisme de défense antioxydante de l'organisme. Cette enzyme est généralement hyperactive lorsque les cellules doivent renforcer le recyclage du glutathion afin de répondre à un stress oxydatif excessif provoqué par une surcharge lipidique (Younossi et al., 2024).

La diminution de l'activité de la gamma-glutamyl transférase (GGT) constatée à la suite du traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique une amélioration du statut antioxydant global. Cette activité pourrait être attribuée aux polyphénols contenus dans la plante, lesquels sont susceptibles de renforcer les mécanismes de défense antioxydante et de réduire la demande en recyclage du glutathion (Benzaid et al., 2021).

• Protéine Totales

Les données issues du dosage des protéines totales (fig. 45) montrent une augmentation extrêmement significative ($P < 0.001$) dans le groupe pathologique G2 (95 g/L) comparativement au groupe témoin G1 (77.33 g/L), cette élévation étant attribuable à

l'induction par un régime hyperlipidique d'une inflammation chronique associée à un stress métabolique systémique.

Inversement, une réduction extrêmement significative ($P < 0.001$) de ce paramètre est constatée dans le groupe soumis au traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR). La concentration en protéines totales a atteint 79 g/L dans le groupe G3 (traitement simultané/préventif), présentant ainsi une valeur très proche de celle observée dans le groupe témoin (G1), ce qui illustre l'effet protecteur et anti-inflammatoire systémique de l'EMR.

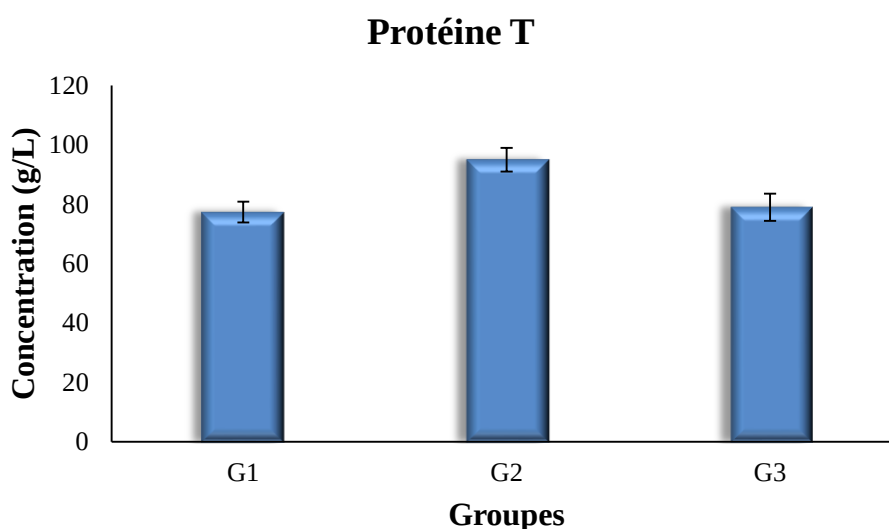


Figure 45 : Concentration de protéine T (g/L) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

La diminution des protéines totales constatée chez les rats soumis à un régime riche en lipides (HFD) pourrait refléter un dysfonctionnement hépatique ainsi qu'une altération du métabolisme protéique. Le foie joue un rôle essentiel dans la synthèse des protéines plasmatiques, telles que l'albumine et plusieurs protéines de transport. Dans un contexte de surcharge lipidique, la stéatose hépatique ainsi que le stress oxydatif sont susceptibles de compromettre la capacité synthétique hépatique, conduisant à une réduction des protéines circulantes (Friedman et al., 2023 ; Loomba et al., 2023).

L'accroissement significatif des protéines totales consécutif à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique une potentialité de rétablissement de la fonction synthétique du foie. Cet effet pourrait s'expliquer par l'activité protectrice des composés renfermer dans l'extrait, lesquels réduisent les lésions oxydatives et renforcent l'intégrité des hépatocytes, contribuant ainsi à une synthèse plus efficiente des protéines plasmatiques (Zhang et al., 2024 ; Wang et al., 2025).

III.3. La détermination du statut antioxydant

- **Taux du malondialdéhyde (MDA) hépatique**

Les résultats de la quantification du taux de malondialdéhyde (MDA) hépatique sont illustrés dans la figure 46. Les résultats obtenus mettent en évidence des écarts statistiquement très hautement significatifs ($P < 0.001$) entre les divers lots expérimentaux. Les rats du groupe pathologique G2 (régime HFD seul) ont exhibé une élévation marquée et significative du taux de MDA, atteignant 19.05 nmol/mL, comparativement à 3.41 nmol/mL chez les rats du groupe témoin G1.

Inversement, le groupe ayant été traité avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) a montré une réduction très hautement significative ($P < 0.001$) de ce bio marqueur en comparaison avec le groupe G2. En effet, la concentration de MDA au niveau tissulaire a diminué à 4.67 nmol/mL dans le groupe G3 (traitement simultané/préventif) ce qui correspond à une réduction de 75.49 %, avec une valeur physiologiquement proche de celle observée dans le groupe témoin.

L'élévation accrue des taux de MDA dans le groupe G2 reflète un stress oxydatif marqué, notamment une peroxydation lipidique au sein du parenchyme hépatique, provoquée par la surcharge lipidique associée au régime hypergras (HFD).

La réduction significative du taux de MDA hépatique observée dans le groupe traité (G3) atteste une activité antioxydante remarquable in vivo ainsi que de l'effet cytoprotecteur de l'EMR.

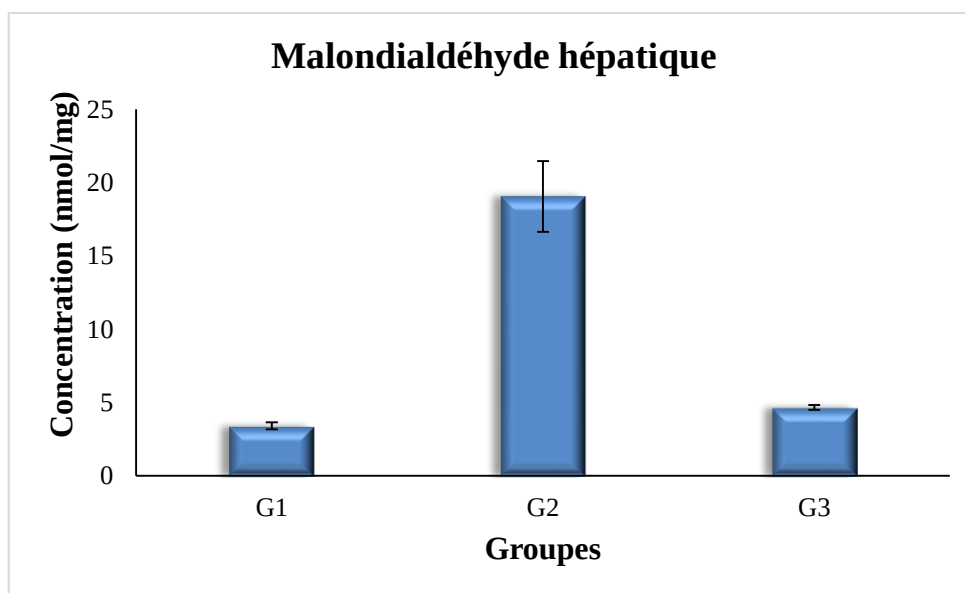


Figure 46 : Taux de malondialdéhyde hépatique (mmol/mg) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats alimentés avec un régime riche en lipides, l'augmentation du malondialdéhyde (MDA) traduit une intensification de la peroxydation lipidique, révélatrice d'un stress oxydatif marqué. Le malondialdéhyde (MDA), issu de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires, constitue un bio marqueur couramment utilisé pour quantifier les lésions oxydatives dans les modèles expérimentaux des pathologies métaboliques (Ayala et al., 2014 ; Del Rio et al., 2022).

Sous un régime alimentaire riche en lipides (HFD), l'excès de lipides présents dans la circulation sanguine et les tissus provoque une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant à l'oxydation des lipides membranaires ainsi qu'à l'accumulation de malondialdéhyde (MDA) dans les tissus et la circulation sanguine. Cette augmentation traduit donc une altération de l'intégrité cellulaire ainsi qu'un déséquilibre entre les processus pro-oxydants et antioxydants (Liguori et al., 2023 ; Niki, 2021).

La réduction extrêmement significative du malondialdéhyde (MDA) consécutive au traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* révèle un potentiel antioxydant notable (Zhang et al., 2024 ; Wang et al., 2025).

- Taux du superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), de catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) et de glutathion peroxydase (GSH-Px)

Les figures 47, 48 et 49 présentent les activités des enzymes antioxydantes hépatiques, à savoir la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px).

Les résultats montrent une baisse très hautement significative ($P < 0.001$) de ce bouclier enzymatique chez les rats du groupe G2 (HFD seul), avec des taux respectifs de 21.63 U/cg Hb (SOD), 51.9 U/mg Hb (CAT) et 41.63 U/g Hb (GSH-Px).

Au contraire, l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR) entraîne une restauration importante de ces défenses endogènes. L'activité de la CAT et de la GSH-Px est très hautement significativement ($P < 0.001$) chez le groupe (G3) d'ordre respective de 155.33 U/mg Hb (pour la catalase) et 127.06 U/g Hb pour la GSH-PX comparativement au groupe (G2). En ce qui concerne la SOD, on observe une augmentation très hautement significative chez les rats du groupe G3 ($P < 0.001$) par rapport au lot G2.

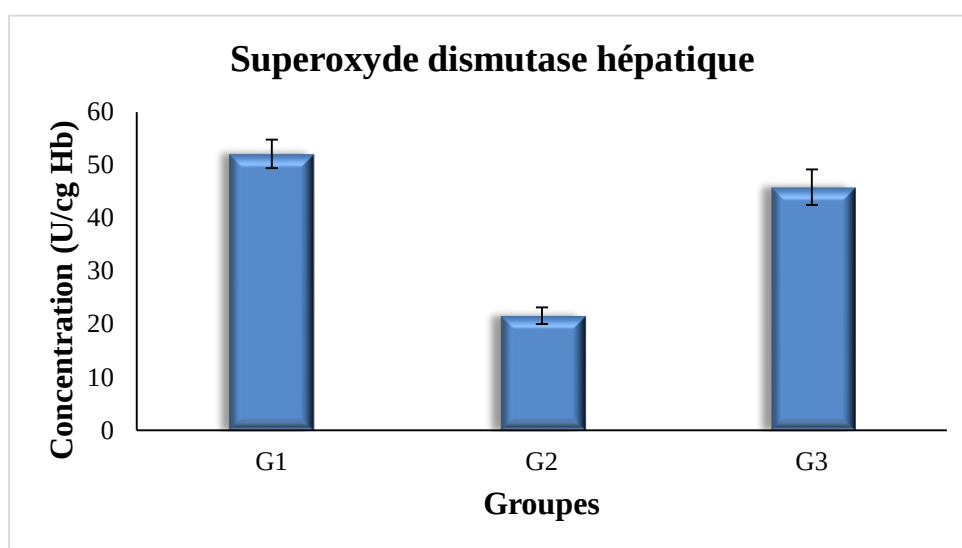


Figure 47 : Taux de superoxyde dismutase hépatique (U/cg Hb) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

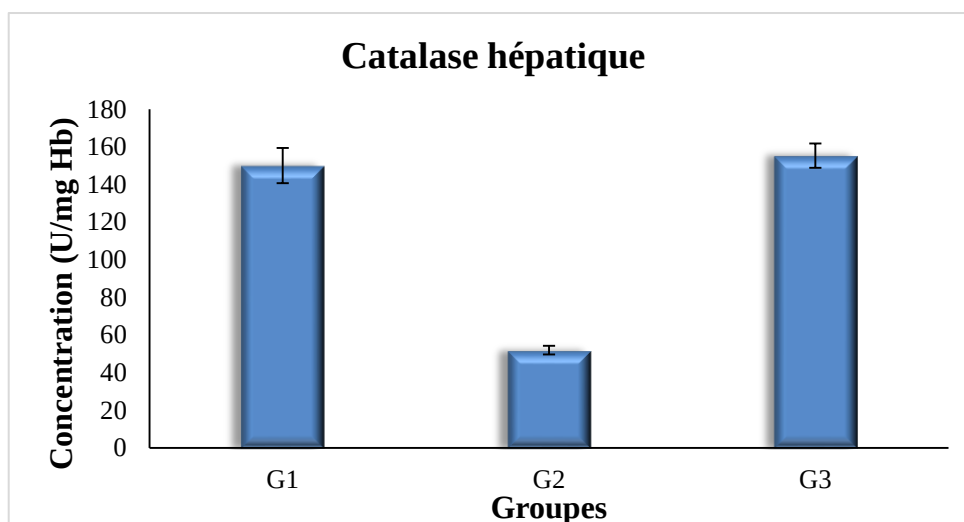


Figure 48 : Taux de catalase hépatique (U/ mg Hb) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures (n = 6).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

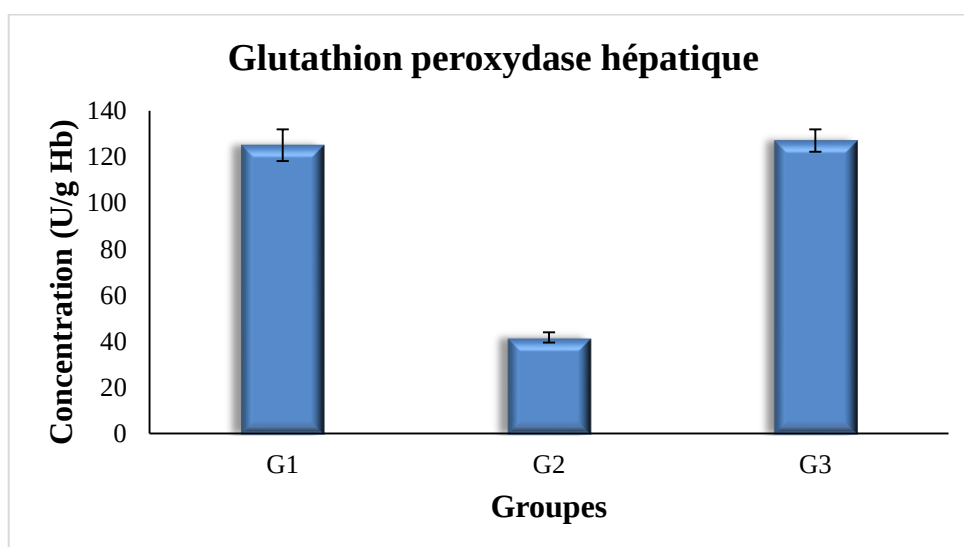


Figure 49 : Taux de glutathion peroxydase hépatique (U/ g Hb) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures (n = 6).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats soumis à un régime alimentaire riche en lipides (HFD), une réduction des activités du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GSH-Px) est constatée, témoignant d'une perturbation des systèmes enzymatiques de défense antioxydante. Un excès de lipides induit une élévation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dépassant la capacité de neutralisation des enzymes antioxydantes, ce qui favorise le développement du stress oxydatif systémique (Liguori et al., 2018 ; Sies & Jones, 2020).

La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) participent de manière synergique à la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : la SOD catalyse la transformation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, qui est par la suite dégradé par la CAT et la GSH-Px. Par conséquent, une réduction concomitante de ces enzymes indique un déséquilibre redox généralisé ainsi qu'un dysfonctionnement du système antioxydant endogène dans le cadre du stress métabolique engendré par un régime hyperlipidique (HFD) (Ighodaro & Akinloye, 2018 ; Sies et al., 2022).

L'accroissement des activités du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GSH-Px) suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* reflète une restauration du système de défense antioxydante. Cette activité pourrait être attribuée à sa composition, qui lui confère la capacité de neutraliser les radicaux libres. Cette élévation, associée à la réduction du MDA, corrobore l'efficacité protectrice de l'extrait face au stress oxydatif induit par un régime obésogène riche en lipides (Benzaid et al., 2021 ; Pandey & Rizvi, 2022).

III.4. La détermination des marqueurs inflammatoires

- **La prostaglandine E2**

D'après nos résultats rapportés dans la figure 50. Les résultats indiquent que l'obésité induite par un régime hyperlipidique entraîne une augmentation hautement significative ($P < 0.001$) du taux de PGE2 chez les rats du groupe G2, atteignant environ 1810.33 pg/mL, comparativement à 767.66 pg/mL chez les rats du groupe témoin G1, ce qui suggère la présence d'un état inflammatoire chronique, caractéristique de l'obésité liée à un régime hyperlipidique.

En revanche, par rapport au groupe G2, une réduction extrêmement significative ($P < 0.001$) de ce marqueur est observée suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR). Une réduction de 52.11 % est observée dans le groupe G3 mettant en évidence les propriétés anti-inflammatoires in vivo remarquables de l'EMR.

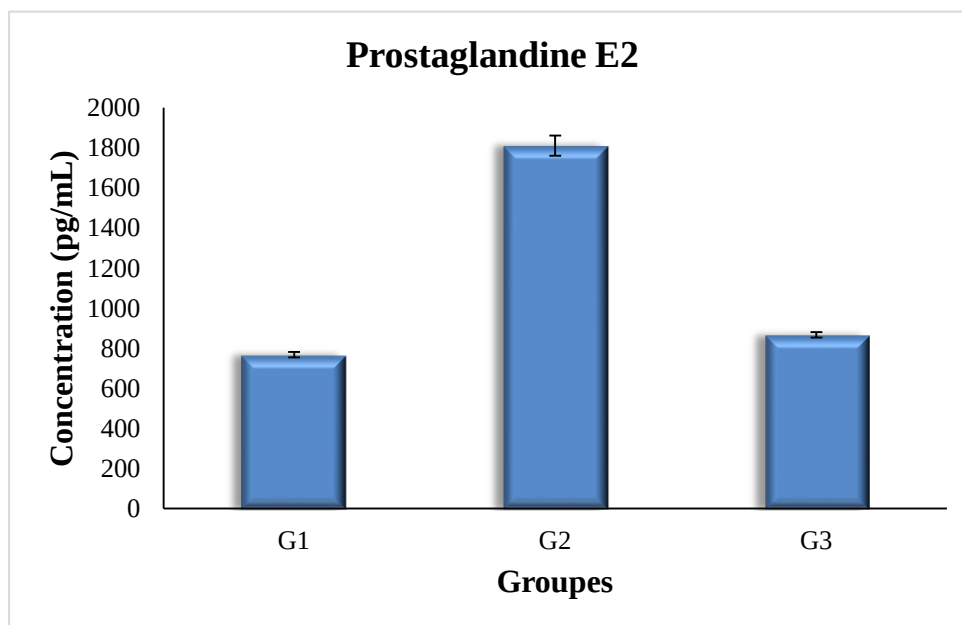


Figure 50 : Taux de Prostaglandine E2 (pg/ mL) mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

L'augmentation des niveaux de PGE2 chez les rats soumis à un régime hyperlipidique (HFD) reflète une activation des voies inflammatoires, notamment par l'induction de la COX-2, contribuant ainsi à l'inflammation de faible intensité associée aux troubles métaboliques (Ricciotti & FitzGerald, 2011 ; Wang & DuBois, 2016). La diminution de la PGE2 observée après l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* suggère un effet anti-inflammatoire, probablement lié à l'inhibition des voies des cyclooxygénases (COX) ainsi qu'aux caractéristiques antioxydantes des polyphénols (Calder, 2020).

- **TNF- α**

Les résultats du dosage de la TNF- α sont représentés sur la [figure 51](#), On observe une corrélation positive très hautement significative ($P < 0.001$) entre l'administration du régime hypergras et la concentration de cette cytokine. Ainsi, une augmentation spectaculaire de 88.56 % est observée chez les rats du groupe G2 par rapport aux animaux du groupe G1, ce qui est expliquée par la lipotoxicité du régime hypergras.

En revanche, par rapport au groupe G2, une diminution très hautement significative ($P < 0,001$) du taux de TNF- α de l'ordre de 81.42 % a été observée chez les rats du groupe G3 traités par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR). Cette réduction atteste de la puissance de l'effet anti-inflammatoire et immuno-modulateur de l'EMR.

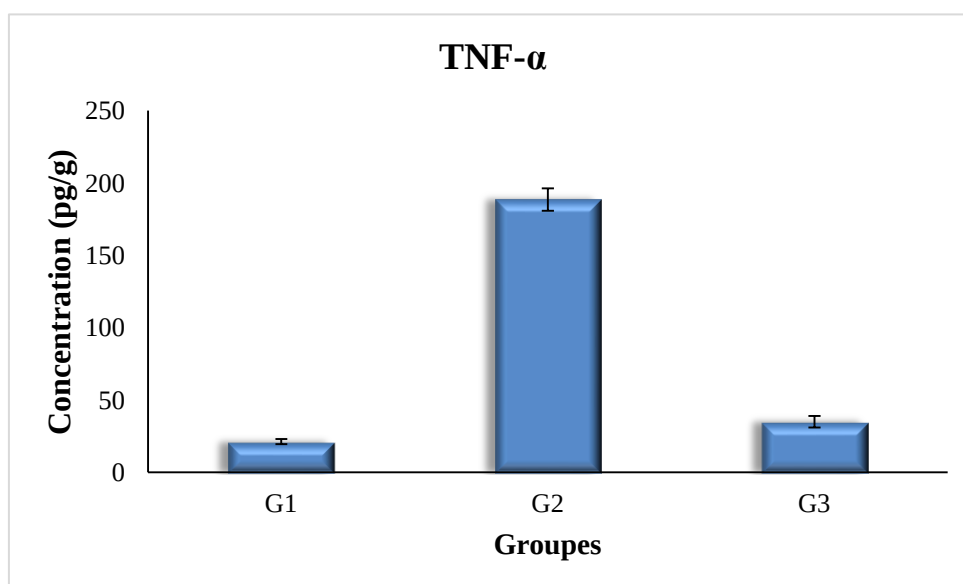


Figure 51 : Taux de TNF- α (pg/g) hépatique mesurée chez les rats nourris avec un régime alimentaire standard et/ou un régime HFD et administrés avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 6 mesures ($n = 6$).

G1 : Groupe Témoin ; G2 : un régime HFD pendant 30 jours ; G3 : un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

Chez les rats soumis à un régime hyperlipidique (HFD), l'élévation du TNF- α indique un état d'inflammation chronique de faible intensité. Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), est une cytokine pro-inflammatoire prépondérante, principalement synthétisé par les macrophages ainsi que par le tissu adipeux. Son accroissement est étroitement associé à

l'hyperlipidémie ainsi qu'aux perturbations métaboliques induites par un régime alimentaire riche en lipides (Hotamisligil, 2017 ; Furman et al., 2019).

La diminution du TNF- α constatée suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* suggère une propriété anti-inflammatoire. Cette action pourrait résulter de l'inhibition de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires ainsi que de l'activité antioxydante des composés phénoliques et flavonoïdes, contribuant de ce fait à l'atténuation de l'inflammation systémique provoquée par un régime hyperlipidique (Calder, 2020).

III.5. Etude histologique

- **Histopathologie du foie**

L'analyse histologique du tissu hépatique des rats du groupe témoin (G1) a révélé une architecture normale, caractérisée par des cordons hépatocytaires strictement structurés autour de la veine Centro lobulaire (fig. 52-a).

Inversement, l'induction du régime hyperlipidique (HFD) chez les rats du groupe G2 a provoqué des altérations structurelles sévères, combinant une fibrose prononcée, des zones nécrotiques, une stéatose micronodulaire importante ainsi que des foyers d'apoptose cellulaire (fig. 52-b).

Dans les groupes soumis au traitement, l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a conduit à une amélioration significative de l'histologie hépatique. Dans le groupe G3, la structure histologique du tissu hépatique demeure analogue à celle observée dans le groupe témoin, indiquant une conservation quasi complète de l'intégrité hépatique ainsi qu'une absence de lésions pathologiques significatives (fig. 52-c)

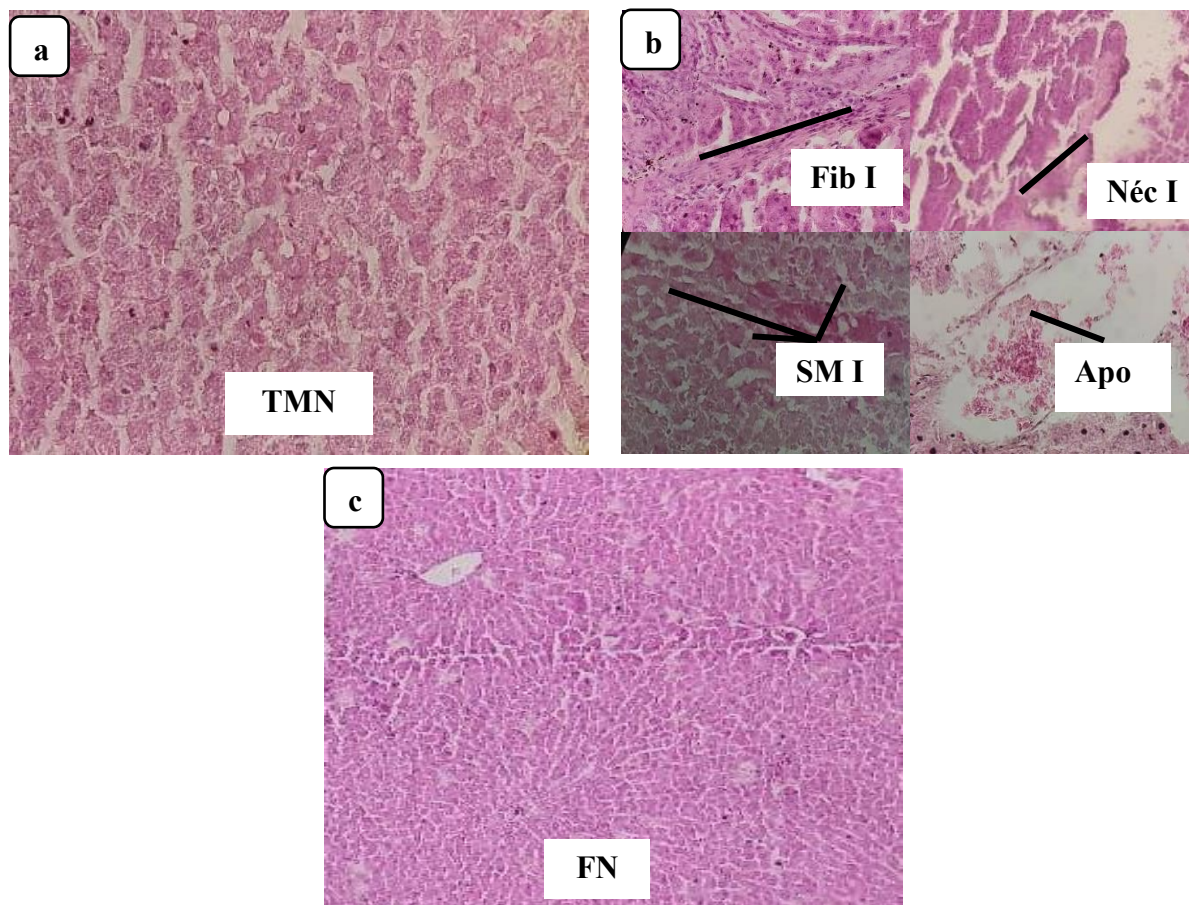


Figure 52 : Coupes histologiques de foie (Gx100) des rats du groupe : a : G1 Groupe Témoin ; b : G2 un régime HFD pendant 30 jours ; c : G3 un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

TMN : Tissus témoin, **Fib I :** Fibrose intense, **Néc :** Nécrose, **SM I :** Stéatose micronodulaire intense, **Apo :** Apoptose, **FN :** Foie normale.

Les altérations histopathologiques observées chez les rats soumis à un régime hyperlipidique confirment l'effet délétère de l'excès de lipides sur la structure hépatique. En effet, l'accumulation lipidique excessive conduit l'hépatocyte à développer une stéatose, induisant un stress oxydatif, déclenchant la réponse inflammatoire ainsi que l'activation des cellules étoilées hépatiques, éléments caractéristiques de la progression fibrogénique (Machado et Diehl, 2016 ; Buzzetti et al., 2016 ; Friedman et al., 2018 ; Kisseleva et Brenner, 2021).

L'étude histologique hépatique après administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a montré une amélioration, laquelle pourrait être attribuée à sa richesse en flavonoïdes et en composés phénoliques reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-

inflammatoires, agissant par la protection cellulaire et la réduction du stress oxydatif, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie hépatique (Scalbert et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2015 ; Fraga et al., 2019).

L'architecture hépatique des animaux ayant bénéficié d'une administration concomitante du régime riche en lipides (HFD) et de l'extrait apparaît par ailleurs quasi normale, ce qui illustre un effet prophylactique significatif de *Rhamnus alaternus* sur les lésions hépatiques induites par un régime hyperlipidique.

En somme, ces résultats mettent en évidence le potentiel hépato protecteur de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, attribuable principalement à ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie hépatique.

• Histopathologie des Reins

L'examen histologique du tissu rénal des rats appartenant au groupe témoin (G1) a révélé une architecture corticale normale, caractérisée par des glomérules intacts et des tubules rénaux présentant une morphologie préservée, définissant ainsi un tissu témoin normal (TMN) (fig. 53-a).

Inversement, l'administration d'un régime hyperlipidique (HFD) aux rats du groupe pathologique (G2) a engendré des modifications structurelles majeures. Une dégénérescence et une vacuolisation tubulaires diffuses (D & V T), une congestion vasculaire marquée (Con V), ainsi que l'émergence d'un espace adipeux périvasculaire ou interstitiel anormal (EA) sont observées (fig. 53-b).

Dans groupe G3, en dépit de la co-administration de l'extrait, la poursuite du régime HFD a induit le maintien de modifications structurales modérées, notamment des tubules dilatés (TD) et des glomérules pathologiques hyper cellulaires (GH) (fig. 53-c).

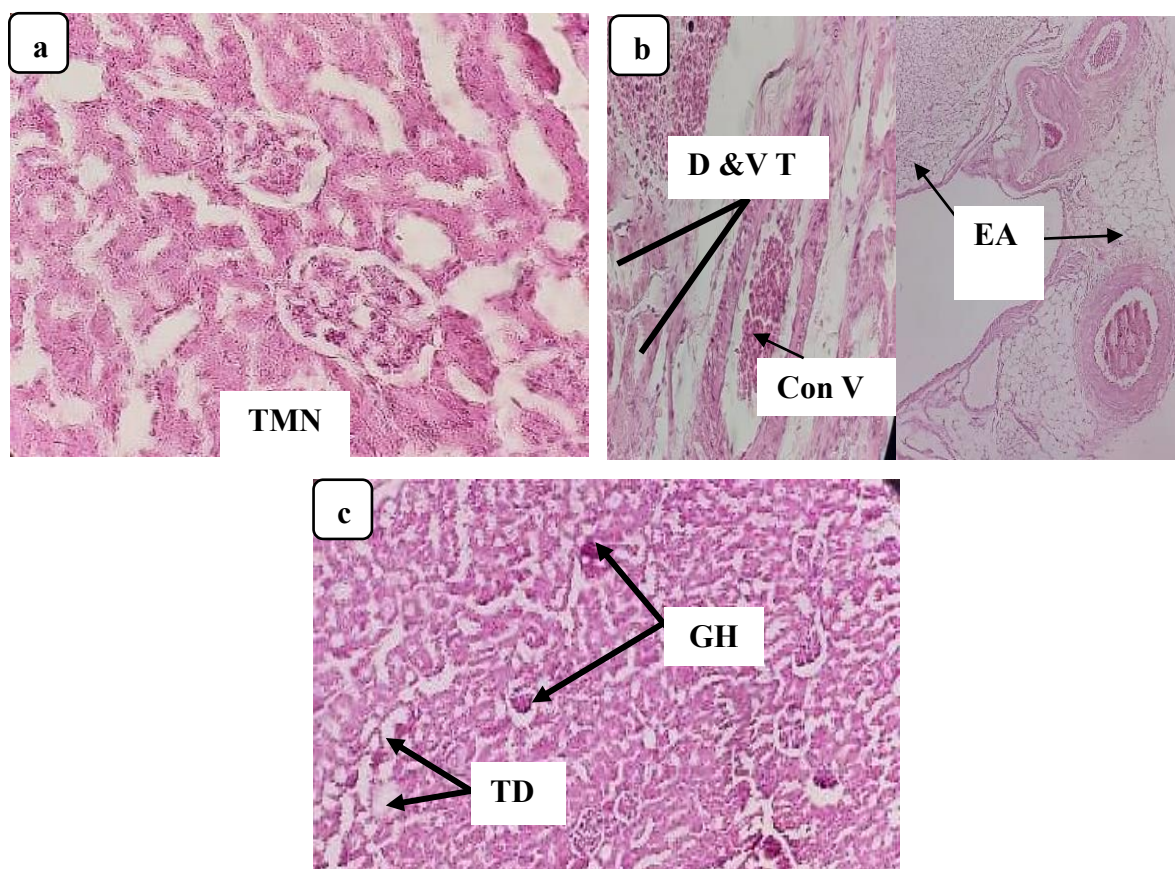


Figure 53 : Coupes histologiques des reins (Gx100) des rats du groupe : a : G1 Groupe Témoin ; b : G2 un régime HFD pendant 30 jours ; c : G3 un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

TMN : Tissus témoin, **D&V T:** dégénérescence et vacuolisation tubulaire , **EA:** Espace adipeux, **Cong V:** Congestion vasculaire , **TD:** Tubules dilatés , **GH:** Glomérule pathologique hypercellulaire.

Les modifications histopathologiques constatées chez les rats soumis à un régime hyperlipidique (HFD) témoignent des conséquences délétères de la surcharge lipidique sur l'intégrité des tissus rénaux.

En effet, la présence de vacuolisation et de dégénérescence tubulaire, associée à la congestion vasculaire ainsi qu'à l'accumulation de tissu adipeux interstitiel, témoigne d'une lésion rénale susceptible d'être liée à une lipotoxicité résultant d'une accumulation excessive d'acides gras

libres. Ces dysfonctionnements entraînent une altération mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui génère un stress oxydatif, une inflammation et des lésions cellulaires au niveau rénal (Declèves et Sharma, 2014 ; Herman-Edelstein et al., 2014).

L'observation d'une amélioration de la structure rénale chez les rats soumis au traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* indique un potentiel effet néphroprotecteur de cette plante. Cette activité pourrait s'expliquer par la présence de composés phénoliques et flavonoïdes, dotés d'une propriété antioxydante permettant de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS), de diminuer la peroxydation lipidique et de maintenir l'intégrité des cellules rénales (Ben Ammar et al., 2015 ; Scalbert et al., 2005 ; Fraga et al., 2019).

Cependant, la détection de quelques anomalies histologiques au sein du groupe G3, en particulier la dilatation tubulaire et l'hypercellularité glomérulaire, indique que l'exposition prolongée au régime hyperlipidique pourrait partiellement compromettre l'effet protecteur de l'extrait.

En définitive, ces données mettent en évidence le potentiel protecteur rénal de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* contre les lésions rénales induites par un régime hyperlipidique, attribuable essentiellement à ses effets antioxydants et anti-inflammatoires.

- **Histopathologie du cœur**

L'examen histologique du tissu cardiaque des rats du groupe témoin (G1) a révélé une architecture myocardique parfaitement normale, caractérisée par des faisceaux de cardiomyocytes réguliers, compacts et un parallélisme fasciculaire maintenu, correspondant à un tissu témoin (TMN) (fig. 54-a).

À l'inverse, l'induction d'un régime hyperlipidique (HFD) chez les rats du groupe pathologique (G2) a provoqué des altérations structurelles majeures du myocarde. Une désorganisation des fibres musculaires est observée, accompagnée d'une stéatose micronodulaire (SM), d'une accumulation anormale de tissu adipeux (TA) interstitiel ainsi que d'une congestion vasculaire (Con V) marquée au sein des espaces inter-fasciculaires (fig. 54-b).

Dans le groupe soumis au traitement par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, une restauration ainsi qu'une protection significativement prononcées de la structure cardiaque ont été constatées. Le groupe G3 (fig. 54-c) présentent une morphologie cardiaque normale (CN). Les fibres myocardiques retrouvent leur compacité, leur homogénéité ainsi que leur orientation physiologique, attestant ainsi de l'absence de foyers de stéatose ou d'infiltration lipidique délétère et corroborant les propriétés cardio-protectrices majeures de l'extrait.

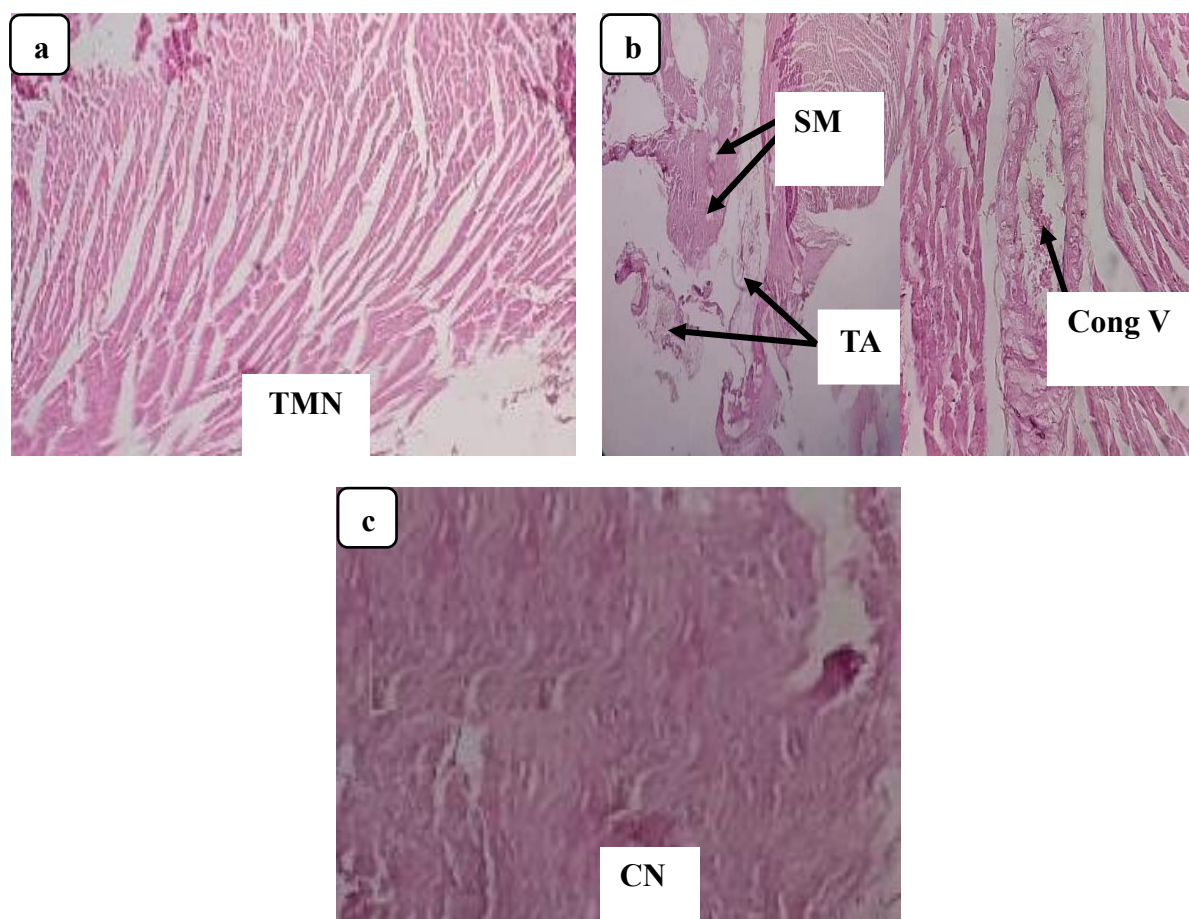


Figure 54 : Coupes histologiques du cœur (Gx100) des rats du groupe : a : G1 Groupe Témoin ; b : G2 un régime HFD pendant 30 jours ; c : G3 un régime HFD + 200 mg/kg EMR pendant 30 jours.

TMN : Tissu témoin, **SM :** Stéatose micronodulaire, **TA:** Tissu adipeux, **Cong V:** Congestion vasculaire, **CN:** Cœur normal.

L'analyse histopathologique du tissu cardiaque du groupe G2 a démontré que le régime riche en graisses entraîne des modifications significatives de l'architecture myocardique. Ces résultats corroborent les recherches de Zhou et al. (2016), lesquelles ont démontré qu'une

surcharge lipidique systémique induit une accumulation ectopique de lipides dans le tissu cardiaque, engendrant une lipotoxicité myocardique progressive. [Chiu et al. \(2011\)](#) ont démontré que l'excès d'acides gras circulants engendre une accumulation intracellulaire de métabolites lipidiques délétères au sein des cardiomyocytes, perturbant ainsi l'organisation des fibres contractiles. Cette lipotoxicité pourrait constituer l'explication de la désorganisation des fibres, de la congestion vasculaire constatée dans le groupe HFD, ainsi que des altérations microvasculaires. Par ailleurs, l'infiltration adipeuse interstitielle observée constitue une manifestation du remodelage tissulaire cardiaque, phénomène que [Iacobellis et Sharma \(2012\)](#) ont défini comme un indicateur de dysfonction métabolique dans les contextes de surcharge lipidique.

En revanche, l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a conduit à une restauration quasi intégrale de l'architecture myocardique au sein des groupes traités, caractérisée par une organisation régulière des fibres et une diminution de l'accumulation lipidique. Cet effet cardio protecteur est cohérent avec les observations de [Ben Ammar et al. \(2015\)](#), qui ont mis en évidence les propriétés protectrices de cette espèce contre les perturbations oxydatives et métaboliques. Cette activité pourrait être attribuée aux composés phénoliques présents dans l'extrait, lesquels sont susceptibles de réduire l'accumulation lipidique ectopique et de maintenir l'intégrité structurelle des cardiomyocytes. D'après [Stanely et al. \(2013\)](#), les polyphénols d'origine végétale exercent une influence favorable sur le métabolisme lipidique cardiaque et contribuent à prévenir le remodelage myocardique provoqué par les régimes hyperlipidiques.

En fin, le maintien de l'architecture myocardique constaté indique une prévention efficace des mécanismes de lipotoxicité et de désorganisation cellulaire initiale. Des résultats analogues ont été présentés par [Mozaffarian et al. \(2016\)](#), soulignant l'importance des stratégies modulant le métabolisme lipidique dans la prévention cardiovasculaire. Globalement, ces résultats indiquent que *Rhamnus alaternus* exerce un effet cardio protecteur notable, principalement en réduisant l'accumulation lipidique ectopique et en maintenant l'intégrité de l'architecture myocardique contre les impacts néfastes d'un régime hyperlipidique.

Partie IV : le docking moléculaire de l'extrait méthanolique du *Rhamnus alaternus* in-silico

Comme le montre la [figure 55](#) la carte thermique issue du regroupement hiérarchique des résultats de l'ancrage moléculaire fait apparaître une distinction nette entre les acides phénoliques et les composés flavonoïdiques en fonction de leurs affinités de liaison vis-à-vis des quatre cibles antidiabétiques étudiées (α -glucosidase, glucokinase, DPP-IV et PPAR γ). Les acides phénoliques ont été regroupés, présentant des énergies de liaison globalement plus faibles vis-à-vis de toutes les cibles, tandis que les flavonoïdes ont formé un groupe distinct associé à des profils de liaison plus forts et plus stables ([fig. 55](#)). Parmi tous les ligands testés, la rutine a présenté des énergies de liaison positives et reproductibles, s'élevant à $-10.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l' α -glucosidase (3A4A), $-9.20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour la DPP-IV (2P8S) et de $-9.10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ par rapport au PPAR γ (3G9E), comme le montre partiellement le [tableau 1](#). À l'inverse, la chrysine a présenté le score d'énergie de liaison le plus élevé ($-8.70 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) et une interaction avec la glucokinase (4RCH), tandis que la rutine a présenté un score d'énergie de liaison similaire mais plus faible ($-8.50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) vis-à-vis de cette cible ([fig. 55](#)). Enfin, des valeurs d'énergie de liaison plus faibles (plus négatives) prédisaient une affinité de liaison plus élevée, et donc des complexes ligand-protéine plus stables, ce qui explique la position des flavonoïdes en tant que principaux représentants du groupe à haute affinité. La structure polyhydroxylée et le long système aromatique de la rutine pourraient également favoriser un comportement de liaison multi-target fort en permettant la formation de nombreuses liaisons hydrogène et interactions hydrophobes au sein des sites actifs des enzymes.

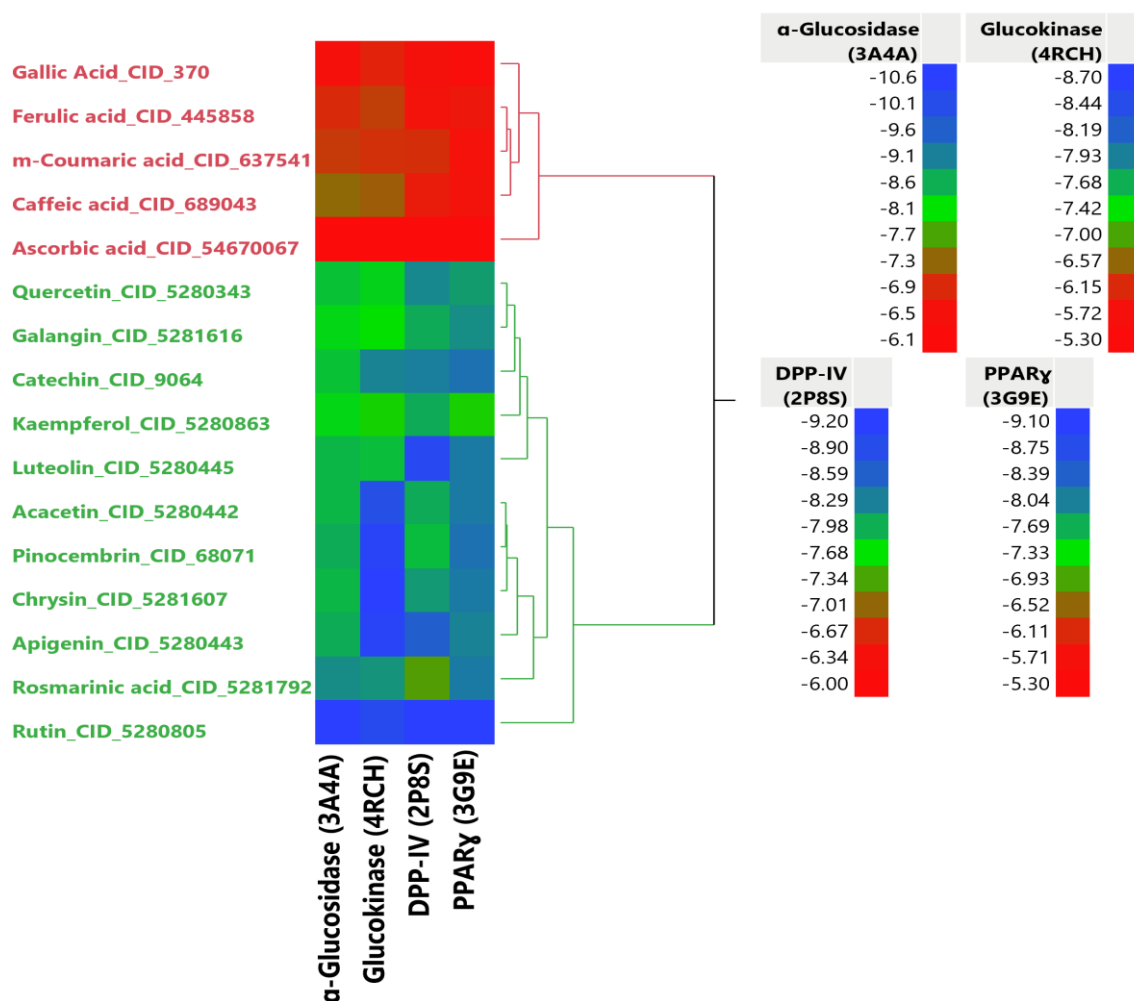


Figure 55 : Analyse par grappes hiérarchiques des composés phénoliques en fonction de leur affinité de liaison avec l' α -glucosidase, la glucokinase, la DPP-IV et le PPAR γ

Les résultats de l'ancrage moléculaire montrent que la rutine se lie de manière stable au sein des sites actifs de l' α -glucosidase et de la DPP-IV grâce à de multiples interactions non covalentes (fig. 55). Dans le complexe de l' α -glucosidase, la rutine forme plusieurs liaisons hydrogène classiques avec des résidus catalytiques clés, soutenues par des empilements π - π et des interactions π -anion, qui contribuent collectivement à une meilleure stabilité de la liaison et expliquent son score d'ancrage élevé. De même, au sein du site actif de la DPP-IV, la rutine établit de multiples liaisons hydrogène et entre en interaction π avec des résidus aromatiques, favorisant une orientation favorable du ligand et sa stabilisation au sein de la poche de liaison (fig. 56). La forte densité de groupes hydroxyles dans la rutine facilite la formation de

nombreuses liaisons hydrogène, tandis que sa structure aromatique permet des interactions

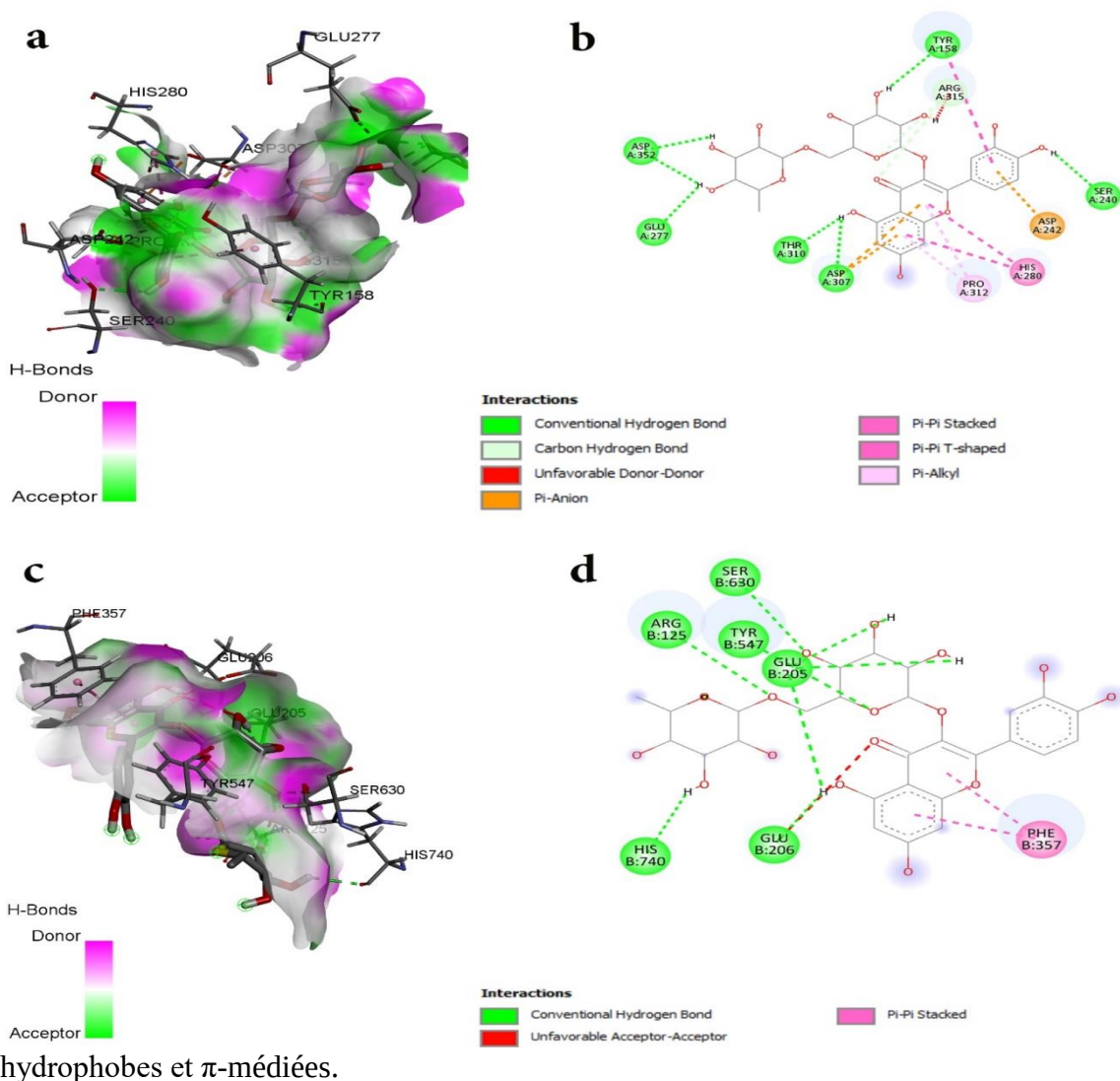
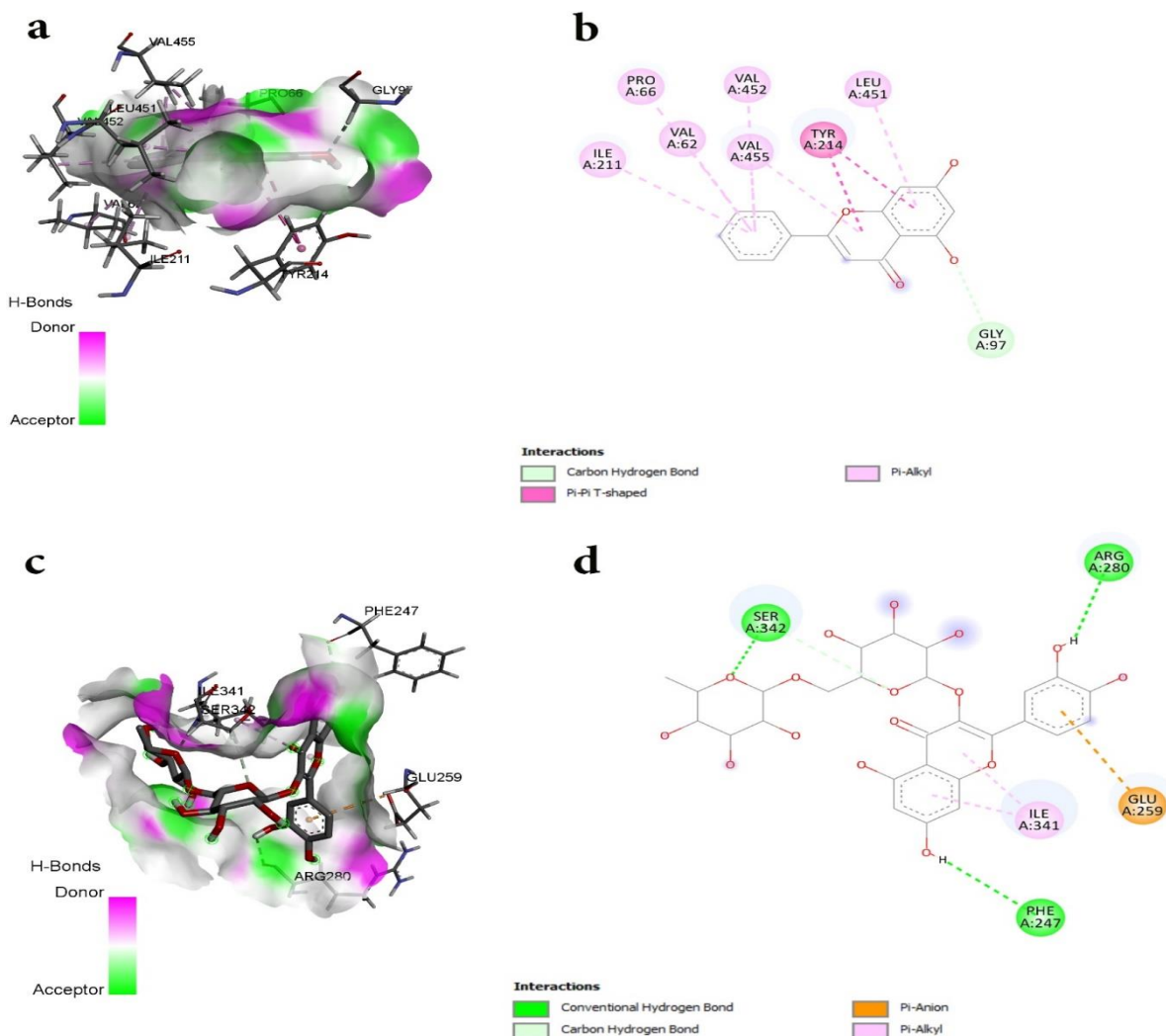


Figure 56 : Interactions de liaison de la rutine avec l' α -glucosidase (a, b) et la DPP-IV (c, d).

La [figure 57](#) illustre les profils d'interaction de docking de la chrysine et de la rutine, révélant des modes de liaison distincts liés à leurs caractéristiques structurales et à la complémentarité de leurs cibles. Comme le montrent les [figure s 57-a et 57-b](#), la chrysine se lie au site actif de la glucokinase principalement par le biais d'interactions hydrophobes, notamment des contacts π -alkyle et π - π en forme de T, ainsi qu'une liaison carbone-hydrogène stabilisatrice impliquant Gly97. En revanche, les [figures s 57-c et 57-d](#) montrent que la rutine interagit avec le domaine de liaison au ligand du PPAR γ par le biais d'un vaste réseau d'interactions polaires. En raison de sa structure glycosylée, la rutine forme de multiples liaisons hydrogène

conventionnelles et une interaction π -anion spécifique avec Glu259. Ce schéma d'interaction met en évidence le rôle du squelette polyhydroxylé de la rutine dans l'amélioration de la stabilité de la liaison en permettant à la fois des fonctions de donneur et d'accepteur de liaison hydrogène, ce qui se traduit par un complexe protéine-ligand plus stable et chimiquement plus



diversifié.

Figure 57 : Interactions de liaison entre la chrysine et la glucokinase (a, b) et interactions de liaison entre la rutine et le PPAR γ (c, d).

De plus, la figure 58 illustre la liaison de la quercétine au sein des sites actifs de l' α -glucosidase (a, b) et de la DPP-IV (c, d). Pour l' α -glucosidase, la quercétine présente une affinité de liaison de -8.4 kcal/mol, formant de multiples liaisons hydrogène avec Thr290, Ala292, Ser291 et Leu297, ainsi qu'une interaction π -alkyle avec Arg263, ce qui indique une

liaison stable. Dans le complexe DPP-IV, la quercétine présente une affinité de liaison de -8.2 kcal/mol, avec des liaisons hydrogène impliquant Glu206, Arg125 et Ser630, ainsi que des interactions π -anion et π - π avec Glu205 et Tyr666. Malgré des contacts mineurs défavorables avec Arg669, le ligand reste bien stabilisé. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la quercétine présente une liaison forte et comparable avec les deux enzymes.

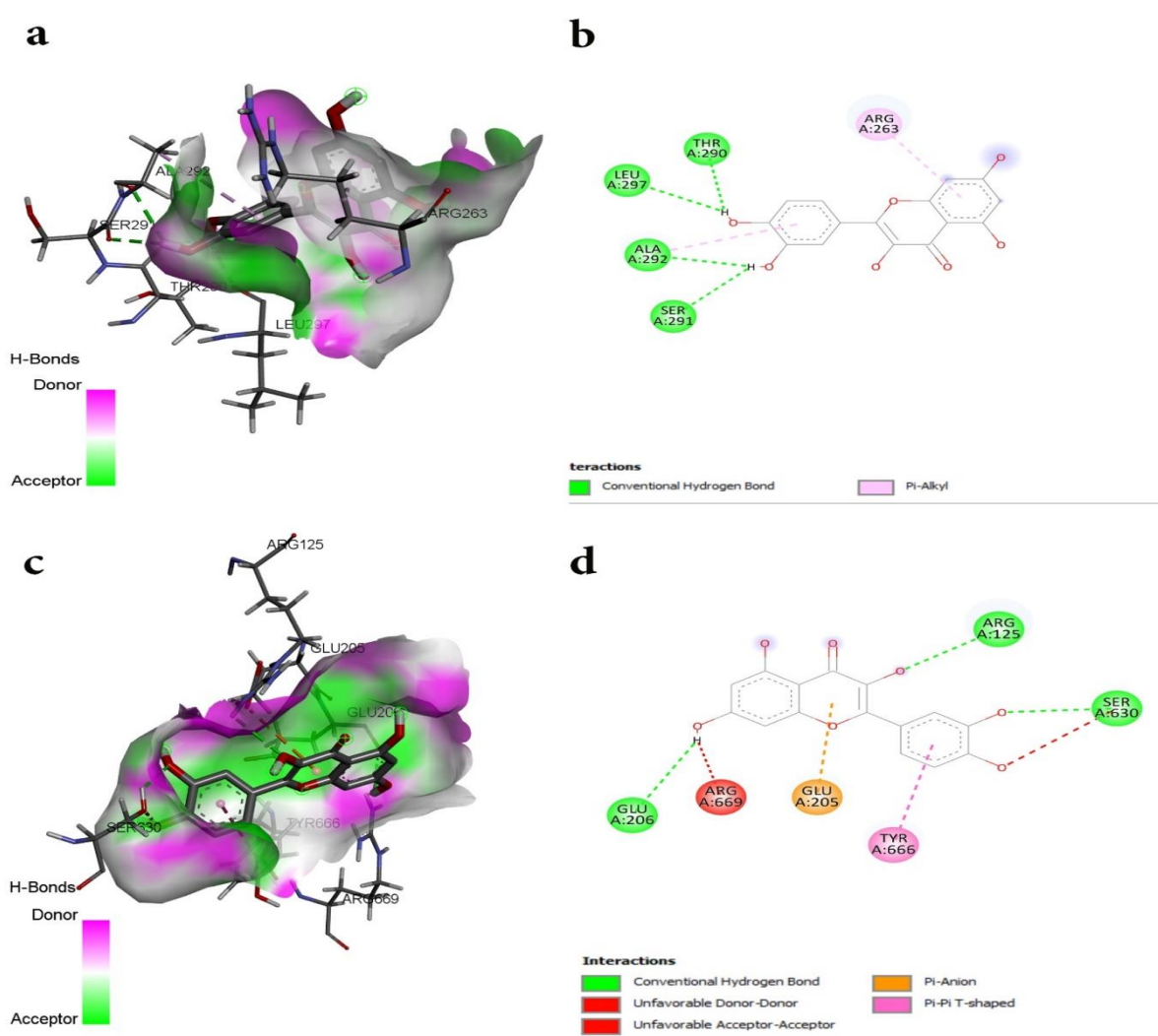


Figure 58 : Interactions de liaison de la quercétine avec l' α -glucosidase (a, b) et la DPP-IV (c, d).

D'autre part, la [figure 59](#) présente les interactions de liaison de la quercétine avec la glucokinase (a, b) et le PPAR γ (c, d) à travers des représentations en 3D et en 2D. Dans le complexe glucokinase, la quercétine présente une affinité de liaison de -7.5 kcal/mol, formant des liaisons hydrogène classiques avec des résidus clés tels que Arg63 et Glu96, ainsi qu'une interaction empilée π - π avec Tyr214, contribuant à la stabilisation du ligand au sein de la

poche de liaison. Dans le complexe PPAR γ , la quercétine présente une affinité de liaison légèrement plus forte de -7.8 kcal/mol, soutenue par des liaisons hydrogène avec Lys367 et Phe363, ainsi que par des interactions supplémentaires, notamment des contacts π -soufre avec Cys285 et des contacts π -alkyle avec Leu330 et Arg288. Une interaction donneur-donneur défavorable avec Ser342 est également observée, mais elle ne compromet pas de manière significative la stabilité globale. Ces résultats indiquent que la quercétine peut interagir efficacement avec les deux cibles grâce à une combinaison de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes, avec une affinité légèrement supérieure pour le PPAR γ

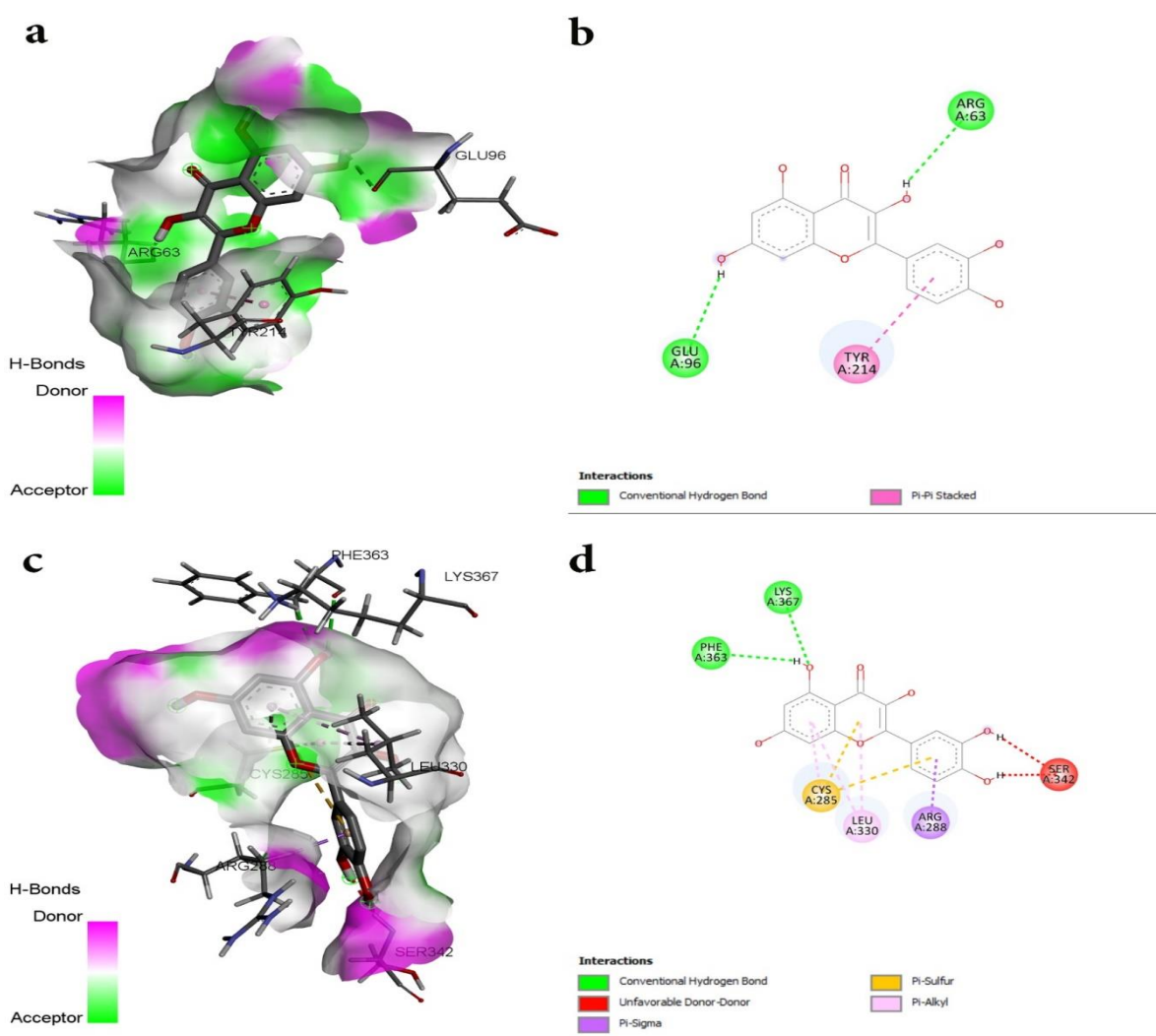


Figure 59 : Interactions de liaison de la quercétine avec la glucokinase (a, b) et le PPAR γ (c, d).

Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude démontrent que, malgré l'essor considérable de la médecine moderne, la phytothérapie demeure une pratique prépondérante à l'échelle mondiale pour prophylaxie et le traitement d'une vaste gamme de pathologies.

Notre étude s'articule autour d'une approche intégrative visant à explorer les vertus thérapeutiques de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (EMR). L'extrait de *Rhamnus alaternus* comprend une diversité d'acides polyphénoliques (l'acide gallique, l'acide ascorbique et l'acide férulique, etc.) et de flavonoïdes (la quercétine, le kaempférol, la rutine, etc.) identifiés par HPLC/UV.

En effet, l'extrait EMR se caractérise par sa richesse phénolique et sa teneur en flavonoïdes, ce qui lui procure des effets biologiques *in vitro* très accentués, notamment une forte capacité de piégeage du radical DPPH et une inhibition de la peroxydation lipidique. En conséquence, il a été sélectionné en tant que base d'étude afin d'évaluer les impacts biologiques *in vivo*.

Après une administration par voie intra-péritonéale d'alloxane, les rats Wistar ont manifesté des désordres métaboliques sévères caractérisés par une hyperglycémie franche et une dyslipidémie. Ces perturbations ont été accompagnées de dommages pancréatiques, hépatiques et néphrotiques, ainsi que d'un stress oxydatif et de réponses inflammatoires (hausse du TNF-alpha et PGE2), attestés par une analyse histologique des organes (foie, pancréas et reins).

Dans ce contexte, nos résultats démontrent que l'administration orale de l'extrait EMR (200 mg/kg) peut atténuer de façon remarquable les conséquences nocives de l'alloxane, en régulant les taux des indices biochimiques, dévoilant ainsi une amélioration métabolique globale. Le traitement a permis une réduction de la glycémie, une normalisation des marqueurs hépatiques (AST, ALT, ALP, gamma-GT) et rénaux (urée, créatinine), ainsi qu'une restauration des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx).

Sur le plan histologique, cet extrait a assuré une protection tissulaire des organes affectés par la toxicité de l'alloxane. La dose d'extrait d'EMR (200 mg/kg) a prouvé une prévention optimale des effets toxiques précités, affirmant que cette action résulte de la synergie spécifique des polyphénols identifiés par HPLC, tels que la quercétine (2.56 mg/g), la rutine (2.13 mg/g) et le kaempférol (1.95 mg/g). Ces résultats sont corroborés par l'étude *in silico*,

où le docking moléculaire suggère de fortes interactions de la rutine et de la chrysine avec les cibles clés comme l'alpha-glucosidase et le PPAR-gamma.

Par ailleurs, les résultats obtenus dans le deuxième modèle expérimental induite par un régime hypergras (HFD) ont également attribué un potentiel antihyperlipidémique considérable à l'EMR. L'administration prolongée du régime HFD a déclenché une perturbation spectaculaire du métabolisme lipidique, caractérisée par une hausse accrue des taux sériques en triglycérides et en cholestérol total, associée à un stress oxydatif, d'une exacerbation de la réponse inflammatoire et d'altérations histopathologiques affectant le foie, les reins et le cœur. L'administration concomitante et quotidienne de 200mg/kg d'EMR avec le régime hypergras (HFD) a permis une amélioration significative du profil lipidique avec une diminution importante des taux de triglycérides et de cholestérol, où les concentrations lipidiques ont retrouvé des valeurs proches de celles du groupe témoin. Cette activité antihyperlipidémique a été associée à une réduction de la peroxydation lipidique, témoigné par la diminution du taux de MDA, ainsi qu'à une restauration des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, CAT et GPx). En outre, l'EMR a exercé un effet anti-inflammatoire important, par une diminution des médiateurs pro-inflammatoires TNF- α et PGE₂.

Les observations histologiques ont confirmé ces effets protecteurs en révélant une amélioration marquée de l'architecture hépatique, rénale et cardiaque, avec une réduction des phénomènes de stéatose, de dégénérescence cellulaire, de congestion vasculaire et de l'accumulation lipidique tissulaire.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* possède un potentiel thérapeutique multifactoriel associant des activités antidiabétiques, antihyperlipidémique, antioxydantes et anti-inflammatoires.

En outre, vu les processus d'action et les propriétés pharmacocinétiques encore peu étudiés chez l'humain, il est nécessaire de soulever le point du manque de recherches cliniques sur les effets de cette plante chez l'homme. Vu le déficit de consensus sur la normalisation des produits thérapeutiques dérivés de *Rhamnus alaternus*, des recherches ultérieures sont indispensables pour résoudre cette lacune scientifique.

Références bibliographiques

-A-

1. Abdel Azeem, H. H., Mansour, H. E. A., Mahfouz, M. M., et al. (2025). Antioxidant and antiapoptotic impacts of the land snail *Helix aspersa* extracts on aged male rats, *Rattus norvegicus*. *Journal of Biological Analysis*, 86. Article 31.
2. ADA (2014). American Diabetes Association (). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014;37(Suppl. 1):S81–S90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
3. Aebi, H. (1974). Catalase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (pp. 673–680). Verlag Chemie/Academic Press.
4. Ait Atmane, S., Tacherfiout, M., Tighilet, K., et al. (2025). Pharmacological potentials of *Rhamnus alaternus* L. stem bark extract *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 351, Article 120076.
5. Akhtar, M. T.; Bin Mohd Sarib, M. S.; Ismail, I. S.; Abas, F.; Ismail, A.; Lajis, N. H.; Shaari, K. Anti-Diabetic Activity and Metabolic Changes Induced by *Andrographis paniculata* Plant Extract in Obese Diabetic Rats. *Molecules*. 2016, 21, 1026.
6. Amtaghri, S., Farid, O., Lahrach, N., et al. (2022). Antihyperglycemic effect of *Rhamnus alaternus* L. aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular & Haematological Disorders - Drug Targets*, 22(4), 245–255.
7. Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 655–665.
8. Ashok Kumar, B. S., Lakshman, K., Jayaveea, K. N., et al. (2012). Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(1–2), 75–79.
9. Assadi, S.; Shafiee, S. M.; Erfani, M.; Akmal, M. Antioxidative and antidiabetic effects of *Capparis spinosa* fruit extract on high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 138, No. 111391.
10. Attanayake, A. P.; Jayatilaka, K. A. P. W.; Mudduwa, L. K. B.; Pathirana, C. Biochemical and histological evaluation of three selected medicinal plant extracts of Sri Lankan origin on dyslipidemia and oxidative stress in alloxan induced diabetic rats. *J. Bot.* 2018, 2018, 1–8.

-B-

11. Bashary, R., Vyas, M., Nayak, S. K., Suttee, A., Verma, S., Narang, R., & Khatik, G. L. (2020). An insight of alpha-amylase inhibitors as a valuable tool in the management of type 2 diabetes mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 16(2), 117–136. <https://doi.org/10.2174/1573399815666190618093315>
12. Belew, A. A., Hanan, G. G. M. W., Meshesha, D. S., et al. (2025). Evaluation of total phenolic, flavonoid contents, antioxidant and antibacterial activity of leaf extracts from *Rhus vulgaris*. *Discover Plants*, 2. Article 141.
13. Ben Ammar, R., Neffati, A., Skandrani, I., et al. (2011). Anti-lipid peroxidation and induction of apoptosis in the erythroleukaemic cell line K562 by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Natural Product Research*, 25(11), 1047–1058.
14. Benchiha, W., Mahroug, S., Aoued, L., Bouterfas, K., 2017. Activité antihépatotoxique des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae). *Phytothérapie*, 15(1), 10-15.
15. Bendahmane, M., Belkrorissat, A., Bouremana, Y., Djebbar, A. A., Ali Abbou, K., & Benalia, A. (2022). Assessment of turmeric-based treatment efficacy against high fat diet-induced dyslipidaemia and testicular damages in Wistar rats. *Journal of*

- Experimental Research*, 10(2), 89–96. https://www.er-journal.com/papers/Bendahmane_2022_June_10_2_89-96.pdf
16. Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Le Meurlay, D., & Louaileche, H. (2013). Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: A comparative study. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.005>
 17. Benzaid, C., Tichati, L., Trea, F., et al. (2021). *Rhamnus alaternus* aqueous extract enhances the capacity of system redox defence and protects hepatocytes against aluminum chloride toxicity. *Clinical Phytoscience*, 7. Article 67.
 18. Bergmeyer, H.U. (1980) IFCC Methods for Measurement of Catalytic Concentrations of Enzymes. *Clinica Chimica Acta*, 105, 147-154. [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(80\)90105-9](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(80)90105-9)
 19. Bhouri, W., Sghaier, M. B., Kilani, S., et al. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1167–1173.
 20. Bilal HM, Sharif A, Malik MNH, Zubair HM. Aqueous Ethanolic Extract of *Adiantum incisum* Forssk. Protects against Type 2 Diabetes Mellitus via Attenuation of α -Amylase and Oxidative Stress. *ACS Omega*. 2022 Oct 12;7(42):37724-37735. doi: 10.1021/acsomega.2c04673. PMID: 36312418; PMCID: PMC9607679.
 21. Boufadi, M. Y., Keddari, S., Moulai-Hacene, F., & Chaa, S. (2021). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Salvia officinalis* extract from Algeria. *Pharmacognosy Journal*, 13(2), 506–515.
 22. Boufadi, Y. M., Van Antwerpen, P., Chikh Alard, I., et al. (2017). Antioxidant effects and bioavailability evaluation of propolis extract and its content of pure polyphenols. *Journal of Food Biochemistry*, Article e12434.
 23. Bouhazama, H., Lamchouri, F., & Toufik, H. (2024). Phytochemical investigation and quantification of bioactive compounds of *Rhamnus alaternus* L. *Tropical Journal of Drug Research*, 1(1), 19–29.
 24. Boussahel, S., Speciale, A., Dahamna, S., et al. (2015). Flavonoid profile, antioxidant and cytotoxic activity of different extracts from Algerian *Rhamnus alaternus* L. bark. *Pharmacognosy Magazine*, 11(Suppl. 1), S102–S109.
 25. Brandts, J., & Ray, K. K. (2023). Novel and future lipid-modulating therapies for the prevention of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 20(9), 600–616. <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00860-8>
- C-
26. Chatti, I. B., Krichen, Y., Horchani, M., et al. (2024). Anthraquinones from *Rhamnus alaternus* L.: A phytocosmetic ingredient with photoprotective properties. *Chemistry and Biodiversity*, 21(1), Article e202300876.
 27. Chen, X., Chen, C., & Fu, X. (2022). Hypoglycemic effect of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus* on type 2 diabetic mice based on the "gut microbiota-mucosal barrier". *Food & Function*, 13(19), 10121–10133. <https://doi.org/10.1039/d2fo02300h>
 28. Chen, X., Chen, C., Tian, X., He, L., Zuo, E., Liu, P., Xue, Y., Yang, J., Chen, C., & Lv, X. (2024). DBAN: An improved dual branch attention network combined with serum Raman spectroscopy for diagnosis of diabetic kidney disease. *Talanta*, 266(Pt 2), Article 125052. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125052>
 29. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 138: 271–81.

30. Chokri, S., Ben Younes, S., Ellafi, A., et al. (2024). Exploring *Rhamnus alaternus* polysaccharides: Extraction, characterization, and analysis of antioxidant properties. *Polymers*, 16(22), Article 3180.

-D-

31. Dirir, A. M., Daou, M., Yousef, A. F., & Yousef, L. F. (2022). A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 21(4), 1049–1079. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09773-1>
32. Drury, R. A., & Wallington, E. A. (1980). *Carleton's histological technique* (5th ed.). Oxford University Press.
33. DuGray K, Duff E (2023). Type 2 Diabetes in Indigenous Youth Living in Remote Communities. *The Journal of Nurse Practitioners*. Volume 19, Issue 3, 104469. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2022.09.022>.

-E-

34. Elstner, E. F., Youngman, R. J., & Obwald, W. (1983). Superoxide dismutase. In *Methods of enzymatic analysis* (3rd ed., pp. 293–302). Verlag Chemie.
35. Eltayeb Taha L, Bakhit S.M.A., Al-Sa'aidi J.A.A., Uro A.O (2014). The anti-hyperglycemic effect of *Solenostemma argel* compared with Glibenclamide. *AL-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci.* Vol. 13 No. 2 2014.

-G-

36. Gómez-Jiménez, V., Burggraaf-Sánchez de las Matas, R., & Ortega, A. L. (2025). Modulation of oxidative stress in diabetic retinopathy. *Antioxidants*, 14(7). Article 875.
37. Gadouche L, Zerrouki K, Zidane A, Ababou A, Bachir Elazaar I, Merabet D, Henniche W, Ikhlef S (2022). Genoprotective, antimutagenic, and antioxidant effect of methanolic leaf extract of *Rhamnus alaternus* L. from the Bissa mountains in Algeria. *Foods and Raw Materials*. 2022;10(2). <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-2-530>.
38. Ge, C., Shi, Z., He, J., Feng, X., Shang, K., Liao, X., Liu, Y., Jiang, Y., & Liu, S. (2026). Cyanoglycosides isolated from *Moringa oleifera* seeds inhibited PFKFB3/TGF- β 1/ smads pathway to alleviate diabetic nephropathy through driving metabolic reprogramming. *Pharmaceutical Biology*, 64(1), 130–142. <https://doi.org/10.1080/13880209.2025.2607563>
39. Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751–766.

-H-

40. Hamza N, Berkea B, Umara A, Chezea C, Gind H, Moorea N (2019). A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 238 (2019) 111841. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111841>.
41. Hou, J., Gong, H., Gong, Z., Tan, X., Qin, X., Nie, J., Zhu, H., & Zhong, S. (2024). Structural characterization and anti-inflammatory activities of a purified polysaccharide from fruits remnants of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt. et Smith. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267(Pt 2), Article 131534. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131534>
42. Hounnimassou, H. M. A., Attindehou, S., Koumodji, K. D., & Salifou, S. (2017). Effets strongyloides in vitro de l'extrait aqueux de feuilles de *Ficus exasperata* Vahl 1805 (Moraceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(3), 1012–1020. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v11i3.6>

43. Hu, E., Li, Z., Li, T., Yang, X., Ding, R., Jiang, H., ... Wang, Y. (2023). A novel microbial and hepatic biotransformation-integrated network pharmacology strategy explores the therapeutic mechanisms of bioactive herbal products in neurological diseases: The effects of Astragaloside IV on intracerebral hemorrhage as an example. *Chinese Medicine*, 18(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13020-023-00745-5>

-I-

44. IDF (2017). International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*, 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2017.
45. IDF (2019). International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*, 9th edn. Brussels: International Diabetes Federation, 2019.
46. Ighodaro, O. M., Adeosun, A. M., & Akinloye, O. A. (2017). Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds. *Medicina*, 53. Article 365.
47. Iqbal, R., Iqbal, A., Iqbal, M. N., et al. (2023). Chemical characterization, antioxidant and antidiabetic activities of a novel polyherbal formulation. *Heliyon*, 9, Article e19292.

-K-

48. Kajimoto, Y.; Kaneto, H. Role of Oxidative Stress in Pancreatic β -Cell Dysfunction. In *Mitochondrial Pathogenesis*, Springer, 2004; pp 168–176.
49. Kanwugu, O. N., Glukhareva, T. V., Danilova, I. G., & Kovaleva, E. G. (2022). Natural antioxidants in diabetes treatment and management: Prospects of astaxanthin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(18), 5005–5028. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1881434>.
50. Kaur, N.; Kumar, V.; Nayak, S. K.; Wadhwa, P.; Kaur, P.; Sahu, S. K. Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review. *Chem. Biol. Drug. Des.* 2021, 98, 539–560.
51. Kebieche, M. (2009). Biochemical activity of flavonoid extracts of *Ranunculus repens* L. (Doctoral thesis). Mentouri Constantine University.
52. Kerr D, Glantz N. Diabetes, like COVID-19, is a wicked problem. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8(11):873–4.
53. Khadayat, K.; Marasini, B. P.; Gautam, H.; Ghaju, S.; Parajuli, N. Evaluation of the alpha-amylase inhibitory activity of Nepalese medicinal plants used in the treatment of diabetes mellitus. *Clin. Phytosci.* 2020, 6, 34.
54. Kherbachi S, Kheniche M, Tacherfiout M (2022). Antihemolytic activity of hydroalcoholic leaves and bark extracts from *Rhamnus alaternus* against AAHP induced hemolysis on human erythrocytes. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals.* (2022) 2(2), 210-219.
55. Kishi, S., Hernandez, A., & Cohen, R. A. (2024). Oxidative stress, lipid metabolism, and vascular inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Cardiology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41569-024-00987-x>
56. Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M., & Zovko Končić, M. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry*, 136(2), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.026>

-L-

57. Li, K.; Yao, F.; Xue, Q.; Fan, H.; Yang, L.; Li, X.; Sun, L.; Liu, Y. Inhibitory effects against alpha-glucosidase and alpha-amylase of the flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots and interpretation of structure-activity relationship of its eight flavonoids by a refined assign-score method. *Chem. Cent. J.* 2018, 12, 82.

58. Liao, W., Li, Y., Liu, J., et al. (2024). Homotherapy for heteropathy: Therapeutic effect of butein in NLRP3 driven diseases. *Cell Communication and Signaling*, 22, Article 315.
59. Lin AL, Vittinghoff E, Olgin JE, Pletcher MJ, Marcus GM. Body Weight Changes During Pandemic-Related Shelter-in-Place in a Longitudinal Cohort Study. *JAMA Netw Open* 2021;4(3):e212536.
60. Lück, H. (1965). Catalase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (pp. 885–894). Academic Press.

-M-

61. Majidinia, M., Bishayee, A., & Yousefi, B. (2019). Polyphenols: Major regulators of key components of DNA damage response in cancer. *DNA Repair*, 82, Article 102679.
62. Martín-Carro, B., Donate-Correa, J., Fernández-Villabril, S., et al. (2023). Experimental models to study diabetes mellitus and its complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), Article 10309.
63. Matoori S (2022). Diabetes and its complications. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 5, 8, 513–515. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.2c00122>.
64. Matough, F. A.; Budin, S. B.; Hamid, Z. A.; Alwahaibi, N.; Mohamed, J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2012, 12, 5–18.
65. Mitrofanova, A., Merscher, S., & Fornoni, A. (2023). Kidney lipid dysmetabolism and lipid droplet accumulation in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 19(10), 629–645. <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00741-w>
66. Mohora, M.; Greabu, M.; Muscurel, C.; Duta, C.; Totan, A. The sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications. *Romanian J. Biophys.* 2007, 17, 63–84.
67. Molyneux, P. (2004) The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 26, 211-219.
68. Moussa, H., Dahmoune, F., Tahraoui, H., Mr'oz, M., Hamid, S., Lekmine, S., Benslama, O., Touzout, N., Kusznierevicz, B., Kadri, N., Remini, H., Elfalleh, W., Bendif, H., Boufahja, F., Ibrahim, N. A., & Amrane, A. (2025). UHPLC-HRMS profiling and in silico analysis of *Carthamus caeruleus* L. phenolics for wound healing. *Food Bioscience*, 63, Article 107219. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107219>

-N-

69. Nekkaa A, Benaissa A, Mutelet F, Canabady-Rochelle L. *Rhamnus alaternus* plant: Extraction of bioactive fractions and evaluation of their pharmacological and phytochemical properties. *Antioxidants*. 2021;10(2). <https://doi.org/10.3390/antiox10020300>

-O-

70. Okur, M. E.; Özbek, H.; Polat, D. Ç.; Yılmaz, S.; Arslan, R. Hypoglycemic activity of *Capparis ovata* Desf. var. *palaestina* Zoh. methanol extract. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2018, 54, DOI: 10.1590/s2175-97902018000318031.
71. Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: An overview of the methods and the effect of extraction parameters. In C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation* (2nd ed., pp. 243–259). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6>

72. Ouchtati, S., Seridi, R., & El-Shora, H. M. (2019). Influence of Rhamnus alaternus L. leaf extract on normal and alloxane-induced diabetic rats. *Bioscience Research*, 16(2), 2009–2016.

-P-

73. Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–169.
74. Perron, N. R., Hodges, J. N., Jenkins, M., & Brumaghim, J. L. (2008). Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorganic Chemistry*, 47(14), 6153–6161.
75. Piao, S., Liu, Q., Chen, A., et al. (2019). Plant phenology and global climate change: Current progresses and challenges. *Global Change Biology*, 25(6), 1922–1940.
76. Prakash, A., Piening, B., Whiteaker, J., Zhang, H., Shaffer, S. A., Martin, D., Hohmann, L., Cooke, K., Olson, J. M., Hansen, S., Flory, M. R., Lee, H., Watts, J., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Paulovich, A., & Schwikowski, B. (2007). *Assessing bias in experiment design for large scale mass spectrometry-based quantitative proteomics. Molecular & Cellular Proteomics*, 6(10), 1741–1748. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600470-MCP200>

-R-

77. Rocchetti, G., Blasi, F., Montesano, D., et al. (2019). Impact of extraction methods on the untargeted phenolic profile of Moringa oleifera leaves. *Food Research International*, 115, 319–327.
78. Rohilla, A., & Ali, S. (2012). Alloxan induced diabetes: Mechanisms and effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(2), 819–823.

-S-

79. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Nov;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31518657.
80. Schultz, A. (1984). Uric acid. In A. J. Pesce & L. A. Kaplan (Eds.), *Methods in Clinical Chemistry* (pp. 1226–1233). C.V. Mosby Co.
81. Silva, J. P., Gomes, C., & Coutinho, O. P. (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601(1–3), 50–60.
82. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
83. Su, M., Tang, T., Tang, W., Long, Y., Wang, L., & Liu, M. (2023). Astragalus improves intestinal barrier function and immunity by acting on intestinal microbiota to treat T2DM: A research review. *Frontiers in Immunology*, 14, Article 1243834. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1243834>
84. Sun, H.; Saeedi, P.; Karuranga, S.; Pinkepank, M.; Ogurtsova, K.; Duncan, B. B.; Stein, C.; Basit, A.; Chan, J. C. N.; Mbanya, J. C.; Pavkov, M. E.; Ramachandaran, A.; Wild, S. H.; James, S.; Herman, W. H.; Zhang, P.; Bommer, C.; Kuo, S.; Boyko, E. J.; Magliano, D. J. IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level

Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2022, 183, 109119.

85. Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50, 537–546.

-T-

86. Tacherfiout, M., Petrov, P.D., Mattonai, M., Ribechini, E., Ribot, J., Bonet, M.L., Khettal, B., 2018. Antihyperlipidemic effect of a *Rhamnus alaternus* leaf extract in Triton-induced hyperlipidemic rats and human HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 501-509.
87. Tang, L., Wang, Y., Gong, X., Xiang, J., Zhang, Y., Xiang, Q., & Li, J. (2023). Integrated transcriptome and metabolome analysis to investigate the mechanism of intranasal insulin treatment in a rat model of vascular dementia. *Frontiers in Pharmacology*, 14, Article 1182803. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1182803>
88. Tiwari, P. (2015). Recent trends in therapeutic approaches for diabetes management: A comprehensive update. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 340838. <https://doi.org/10.1155/2015/340838>.
89. Tsimikas, S., & Witztum, J. L. (2024). Oxidized phospholipids and lipoprotein(a): Key drivers of inflammation and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine*, 75, 1–20. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042822-123456>

-V-

90. Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., et al. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645–651.
91. Verma, S.; Gupta, M.; Popli, H.; Aggarwal, G. Diabetes mellitus treatment using herbal drugs. *Int. J. Phytomed.* 2018, 10, 01.
92. Wang, J., Liu, K., Li, X., et al. (2017). Variation of active constituents and antioxidant activity in *Scabiosa tschiliensis*. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2288–2295.

-W-

93. Wang, X., Chen, X., Tang, Y., Wu, J., Qin, D., Yu, L., ... Wu, A. (2022). The therapeutic potential of plant polysaccharides in metabolic diseases. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1329. <https://doi.org/10.3390/ph15111329>
94. Wang, X., Kang, J., Liu, Q., et al. (2020). Fighting diabetes mellitus: Pharmacological and non-pharmacological approaches. *Current Pharmaceutical Design*, 26, 4992–5001.
95. Whelton, A. (1994). Nitrogen metabolites and renal function. In C. A. Burtis & E. R. Ashwood (Eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 1513–1575). W.B. Saunders Company.
96. Willcox, M. L., Elugbaju, C., Al-Anbaki, M., Lown, M., & Graz, B. (2021). Effectiveness of medicinal plants for Glycaemic control in type 2 diabetes: An overview of meta-analyses of clinical trials [systematic review]. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 777561. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.777561>.
97. Woisky, R.G. and Salatino, A. (1998) Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *Journal of Apicultural Research*, 37, 99-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>
98. Wu, J., Yue, X., Wang, T., Zhang, Y., Jin, Y., ... Li, G. (2025). A cost-effective and sensitive voltammetric sensor for determination of baicalein in herbal medicine based

on shuttle-shape α -Fe₂O₃ nanoparticle decorated multi-walled carbon nanotubes. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 717, Article 136850. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.136850>

-Y-

99. Yagi, K. (1976a). Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochemical Medicine, 15(2), 212–216.
100. Yagi, K. (1976b). Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma (réf'ERENCE doubl'EE dans la liste source). Biochemical Medicine, 15, 212–216.
101. Yahyaoui, M., Bouajila, J., Cazaux, S., & Abderrabba, M. (2018). The impact of regional locality on chemical composition of *Thymelaea hirsuta* L. Phytomedicine, 41, 13–23.
102. Yahyaoui, M., Ghazouani, N., Sifaoui, I., & Abderrabba, M. (2017). Comparison of extraction methods on phytochemical composition of *Thymelaea hirsuta* L. Biosciences, Biotechnology Research Asia, 14(3), 997–1007.
103. Yan, Z., Yu, B., Lan, X., Cui, X., Zhao, D., Qiu, L., ... Li, K. (2024). Synthesis, bioactivity evaluation and theoretical study of nicotinamide derivatives containing diphenyl ether fragments as potential succinate dehydrogenase inhibitors. Journal of Molecular Structure, 1308, Article 138331. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138331>
104. Yaribeygi, H.; Farrokhi, F. R.; Butler, A. E.; Sahebkar, A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. J. Cell. Physiol. 2019, 234, 8152–8161.
105. Yaribeygi, H.; Sathyapalan, T.; Atkin, S. L.; Sahebkar, A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. Oxid. Med. Cell. Longevity 2020, 2020, No. 8609213.

-Z-

106. Zeouk I, Bekhti K. A critical overview of the traditional, phytochemical and pharmacological aspects of *Rhamnus alaternus*: a Mediterranean shrub. Advances in Traditional Medicine. 2020; 20:1–11. <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00388-8>



Exploring the antidiabetic potential of *Rhamnus alaternus*: A combined *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approach

Anissa Imene Reffas^a, Mokhtaria Yasmina Boufadi^{a,b}, Faïza Moulai-Hacene^a, Soumia Keddari^a, Souheyla Mekraf^a, Abdenacer Tou^c, Abbassia Demmouche^d, Hamza Moussa^e, Nouredine Nasrallah^f, Walid Elfalleh^{g,*}, Hamdi Bendif^g, Mohamed A.M. Ali^g, Shakilur Rahman^{g,**}, Jie Zhang^h, Abdeltif Amraneⁱ, Hichem Tahraoui^j

^a Laboratory of Bioeconomics, Food Safety and Health. Faculty of Natural Sciences and Life. Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria

^b Faculty of Biology, University of Houari Boumediene USTHB, Algiers, 16000, Algeria

^c Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes, Algeria

^d Biotoxicology Laboratory, Faculty of Natural Sciences and Life. Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes, Algeria

^e Laboratoire de Biotechnologies et Protection des Ecosystèmes Agricoles et Naturels, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Bouira, Bouira, 10000, Algeria

^f Laboratory of Reaction Engineering, Department of Mechanical and Process Engineering, University of Science and Technology Houari Boumediene (USTHB), Algiers-Bab Ezzouar, 16111, Algeria

^g Department of Biology, College of Science, Imam Mohammad Ibn Saud Islamic University (IMSIU), Riyadh, 11623, Saudi Arabia

^h School of Engineering, Merz Court, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, NE1 7RU, UK

ⁱ University Rennes, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS, ISCR-UMR6226, Rennes, F-35000, France

^j Laboratory of Biomaterials and Transport Phenomena (LBMT), University Yahia Fares, Medea, 26000, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Diabetes

Oxidative stress

Rhamnus alaternus

Docking

HPLC/UV

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a complex metabolic disorder associated with oxidative stress, inflammation, and progressive organ damage. This study investigated the phytochemical composition, antioxidant potential, antidiabetic activity, and possible molecular mechanisms of a methanolic extract of *Rhamnus alaternus* leaves (RME) using *in vitro*, *in vivo*, histopathological, and *in silico* approaches. Phytochemical analysis revealed high levels of total phenolics (223.25 mg GAE/g extract) and flavonoids (92.37 mg QE/g), along with strong antioxidant activity measured by DPPH radical scavenging ($IC_{50} = 184.80 \mu\text{g/mL}$) and lipid peroxidation inhibition ($IC_{50} = 29.03 \mu\text{g/mL}$). HPLC/UV profiling identified sixteen phenolic compounds, mainly flavonoids, including quercetin (2.56 mg/g), rutin (2.13 mg/g), and kaempferol (1.95 mg/g). *In vivo* experiments showed that alloxan-induced diabetic rats developed severe hyperglycemia (4.22 g/L), dyslipidemia, hepatic and renal dysfunction, oxidative stress, and inflammatory responses. Oral administration of RME (200 mg/kg for 90 days) significantly reduced blood glucose levels by approximately 58%, improved lipid parameters, restored protein and albumin levels, and normalized hepatic (AST, ALT, ALP, γ -GT) and renal (urea, creatinine, uric acid) biomarkers. RME also reduced malondialdehyde levels and restored antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx) in liver and kidney tissues, while significantly decreasing tumor necrosis factor- α and prostaglandin E2 levels. Histopathological analysis confirmed protective effects on liver, pancreas, and kidney tissues. Molecular docking suggested strong multi-target interactions of flavonoids, particularly rutin and chrysin, with α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, Glucokinase, and PPAR- γ . Overall, RME exhibited significant antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, and organ-protective effects, highlighting its potential as a natural therapeutic candidate for diabetes management.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: wbelfallah@imamu.edu.sa (W. Elfalleh), srahman@imamu.edu.sa (S. Rahman).

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2026.109010>

Received 24 March 2026; Received in revised form 23 April 2026; Accepted 29 April 2026

Available online 30 April 2026

2212-4292/© 2026 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is one of the most common chronic metabolic disorders, which affects global public health dramatically and reduces the life span and life quality (IDF, 2017). The incidence of this disease has been increasing over the past decades and has reached epidemic proportions globally (Cho et al., 2018). In terms of diabetes etiology, it is multifactorial, and genetic predisposition, environmental factors, infectious diseases, and undesirable drug interactions can all lead to emerge (Wang et al., 2020). Evidence points to both environmental and genetic determinants as having influential roles in pathology of the disease, but inherited genetic factors are thought to play a major role in the increasing prevalence of diabetes syndrome (Iqbal et al., 2023).

Diabetes leads to a broad range of large and small vessel complications from chronic metabolic derangements. Additional metabolic complications present as cardiovascular events (myocardial infarction and stroke) and distal limb amputations (Bilal et al., 2022). Moreover, the presence of hyperglycemia over time causes functional and structural damage in different organs, giving rise to features characteristic of diabetic retinopathy, nephropathy, peripheral neuropathy, and chronic foot lesions (Matoori, 2022).

Increasing evidence indicates that oxidative stress contributes to the development and progression of DM (Kanwugu et al., 2022; Matough et al., 2012). At physiological levels, redox homeostasis is maintained by endogenous antioxidant systems that limit oxidative injury to tissues. But dysfunction of these systems results in excessive generation of reactive oxygen species (ROS) subsequently causing oxidative stress (Mohora et al., 2007). Chronic increases in ROS leads to pancreatic β -cell death, induces insulin resistance, and raises diabetic complications, thereby accelerating the progression of the disease (Bilal et al., 2022; Kajimoto & Kaneto, 2004). Furthermore, insulin resistance has been shown to play an important role in the pathogenesis of vascular dementia, promoting the metabolism of β -amyloid (A β) and tau proteins, and inducing metabolic disorders and, ultimately, cognitive dysfunction (Tang et al., 2023).

Although various pharmacological strategies targeting different metabolic pathways are developed, the existing therapeutic protocols are still insufficient for diabetes long-term management and for the complications (Hamza et al., 2019; Tiwari, 2015). Common hypoglycemic drugs act via different mechanisms of action (Kaur et al., 2021; Verma et al., 2018), but their long-term use is often linked to major adverse effects such as weight gain, hypoglycemia, gastrointestinal intolerance and allergic reactions. In extreme cases, these side effects can develop into dysfunction of the liver or heart (Okur et al., 2018). Thus, more and more attention is needed in alternative and complementary therapy approaches, especially those related to the use of the medicinal plants (Bilal et al., 2022). These strategies have shown promising impacts on glucose homeostasis via safe and pleiotropic mechanisms (Willcox et al., 2021).

These mechanisms involve attenuation of postprandial hyperglycemia, through decreasing intestinal absorption of glucose (Bashary et al., 2020), and the carb inhibition, when inhibition of both α -amylase and α -glucosidase are modulating the digestion of such carbohydrates.

Currently, with the improvement in quality of life, a growing number of people are turning to natural medicines, particularly herbal dietary supplements, for the prevention and treatment of diseases (Wang et al., 2022). Therefore, bioactive compounds derived from plants can be a source of potential antidiabetic agents with low toxicity and side effects. Their anti-diabetic activity is primarily due to inhibition of α -glucosidase activity and suppression of gluconeogenesis in the liver (Dirir et al., 2023).

Extracts of medicinal plants are also rich in natural antioxidants; therefore, these extracts can play a significant role in the making of novel antidiabetic drugs through the regulation of essential metabolic pathways. For instance, Cyanoglycosides derived from *Moringa oleifera* seeds suppressed the PFKFB3/TGF- β 1/Smads signalling

pathway, promoting metabolic reprogramming and mitigating diabetic nephropathy (Ge et al., 2026). A variety of phytochemical classes such as flavonoids, phenolic acids, terpenoids, alkaloids, glycosides and coumarins have been demonstrated to benefit carbohydrate digestion and glycaemic control (Assadi et al., 2021).

Rhamnus alaternus L. (family Rhamnaceae) is a shrub indigenous to the Mediterranean basin that has been traditionally used in folk medicine (Nekkaa et al., 2021). The leaves and branches of this species have been used in folk medicine for centuries to treat hypertension, as well as hepatic, jaundice, musculoskeletal, and gastrointestinal disorders (Zeouk & Bekhti, 2020). Recent phytochemical and pharmacological investigations on *Rhamnus alaternus* revealed an extensive array of biological activities, such as hepatoprotective (Benchiha et al., 2017), antihyperlipidemic (Tacherfiout et al., 2018), and antioxidant, anti-radical, antiproliferative and cytotoxicity (Kherbachi et al., 2022). The high multifunctional antioxidant and antimicrobial potential of bark extracts could be attributed to the presence of anthraquinones and a variety of phenolic compounds (Belew et al., 2025); another study concluded that total phenolic and flavonoid contents were positively correlated to antioxidant activity, suggesting the great therapeutic potential of this species (Kosalec et al., 2013). In addition to this, leaf extracts are rich in flavonoids, tannins and anthocyanins, and the antigenotoxic and antimutagenic properties of these phytochemicals are considered to play a crucial role in these effects (Gadouche et al., 2022).

In this study, we prepared and characterized phytochemically the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* leaves (RME). The antioxidant activity was assessed by *in vitro* assays, antidiabetic and protective potential were evaluated *in vivo* in the alloxan-induced diabetic rat model. The following analyses were conducted: biochemical, oxidative stress, inflammation studies, and histopathology of liver, pancreas and kidneys. In addition, a molecular docking study was performed to examine the binding interactions of the active compounds both of the purified and of the extracts with respect to the diabetic-relevant enzymatic targets.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All chemical reagents used in this study including methanol (MeOH), Folin–Ciocalteu reagent, sodium carbonate (Na₂CO₃), gallic acid, AlCl₃, DPPH, Tris-HCl buffer, alloxan, and formaldehyde—were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Commercial assay kits for the determination of prostaglandin E₂ were procured from Abcam (UK), while TNF- α kits were obtained from Thermo Fisher Scientific (USA).

2.2. Extraction of *Rhamnus alaternus*

Methanolic extraction of *Rhamnus alaternus* leaves was performed according to the method described by Rocchetti et al. (2019), with some adjustments. Ten g of ground leaves were transferred to a glass container with 100 mL of absolute methanol. The suspension was stirred at room temperature for 60 min to promote the diffusion of solvent-soluble compounds. The mixture was kept in static maceration for 72 h at room temperature and protected from light to minimize oxidative or photochemical degradation. The extract was then clarified by filtration through Whatman No. 1 filter paper to separate the liquid phase from the plant debris. Solvent removal was then carried out using a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C, resulting in a concentrated methanolic extract. The final extract was stored at 4 °C until further biological analyses and evaluations.

2.3. Determination of total polyphenols

The overall phenolic concentration of the methanolic extract derived from *Rhamnus alaternus* leaves was evaluated using the Folin–Ciocalteu

colorimetric method, in accordance with Singleton et al. (1999), with slight procedural adjustments. In brief, 0.5 mL of the extract solution (1 mg/mL) was diluted with 5 mL of distilled water, followed by the addition of 0.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent. The reaction was conducted under dark conditions to avoid light-related interference. After an initial equilibration period of 3 min, the reaction medium was alkalized by introducing 0.5 mL of a 10% (w/v) sodium carbonate solution, allowing the chromogenic reaction to proceed. The mixture was then left to incubate for 60 min at room temperature to ensure full color development. Absorbance readings were subsequently recorded at 760 nm using a UV–Vis spectrophotometer.

Quantitative determination was achieved by comparing sample absorbance values to a calibration curve established with gallic acid standards ranging from 0 to 200 µg/mL, prepared under identical conditions. Results were finally expressed as milligrams of gallic acid equivalents (mg GAE) per gram of extract.

2.4. Determination of flavonoid content

One mL of the *Rhamnus alaternus* extract was mixed with 1 mL of aluminum trichloride (AlCl₃, 2%). The absorbance is measured at 430 nm after 30 min of incubation at room temperature. Quercetin was used to plot the calibration curve.

2.5. In vitro antioxidant activity

2.5.1. Free radical scavenging activity and DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

The free radical scavenging potential of the RME was determined using the DPPH assay, according to the procedure reported by Arnous et al. (2002), with slight procedural adaptations. This method evaluates the capacity of antioxidant compounds to neutralize the stable DPPH radical, leading to a reduction in absorbance.

For the assay, 25 µL of the RME extract at different concentrations (5, 10, 20, and 50 µg/mL) was added to 975 µL of a freshly prepared DPPH solution (60 µM). The reaction mixtures were gently mixed and maintained in darkness at room temperature for 30 min to allow complete interaction between the extract constituents and the radical species. Absorbance values were subsequently recorded at 517 nm using a UV–visible spectrophotometer.

The antioxidant effectiveness of the extract was expressed as the percentage of DPPH radical inhibition, calculated using the following equation:

$$I(\%) = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Where: A₀ corresponds to the absorbance of the control solution containing DPPH alone, and A₁ represents the absorbance measured in the presence of the extract.

2.5.2. Lipid peroxidation

The degree of lipid peroxidation was assessed by using the method of TBARS, described by Yagi (1976). This method determines MDA, an oxidative degradation of lipids, through the reaction with thiobarbituric acid in a chromogenic complex.

Briefly, 100 µL of Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) was mixed with 100 µL of the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* from 5 to 100 µg/mL. The composition was kept at 37 °C for 1 h to permit contact or interaction with the extract to the lipid peroxidation system. Then, 100 µL of thiobarbituric acid solution was added, and the mixture was incubated at 100 °C for 60 min to promote adduction of MDA with TBA.

After cooling the absorbance was measured at 532 nm with a UV–visible spectrophotometer. Values for lipid peroxidation were determined from a standard curve established with continuous MDA concentrations and expressed as nanomoles of MDA per milligram of

protein.

2.5.3. Identification of the chemical composition of the methanol extract of *Rhamnus alaternus* by HPLC/UV

Identification and quantification of phenolic compounds in the methanolic extract from *Rhamnus alaternus* were performed by HPLC/UV according to the analytical method described by Valencia et al. (2012). Chromatographic analyses were conducted with an Agilent 1100 HPLC system equipped with a Poroshell 120 EC-C18 column (100 mm × 2.1 mm 2.7 µm) which was selected for its appropriate application in the separation of phenolic acids and flavonoids.

The elution was conducted in a binary mobile phase composed of solvent A (5% aqueous formic acid) and solvent B (methanol). The elution was performed with a constant flow rate of 1 mL/min using a column temperature of 55 °C to achieve optimal chromatographic conditions. 10 µL of sample solution was injected on each run. The gradient elution program was as follows: 30% B 0–15min, ramped to 40% B from 15 to 20min, 45% B 20–30min, 60% B 30–50min, 80% B 50–65min, 100% B 65–70min. 290 nm was chosen, which relates directly to detection of phenolic compounds.

The identification of compounds was carried out by comparing with retention time and UV absorption spectrum of the peaks present in the extract and those of authentic standard compounds. The reference compound monomeric included phenolic acids (i.e., gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, m-coumaric acid, rosmarinic acid), flavonoids (i.e., catechin, galangin, pinocembrin, acacetin, rutin, chrysin, apigenin, kaempferol, luteolin, quercetin), and ascorbic acid. Then, 1: 100 (v/v) diluted ratio of the RME with methanol to meet the required concentration for chromatographic injections was used prior to the analysis. Methanol stock solutions of 1 mg/mL were prepared for standard solutions of each reference compound. The quantification was performed using external calibration curves prepared from these standards, and the amounts of single compounds were expressed as milligrams per gram of crude methanolic extract from *Rhamnus alaternus* according to previous protocols (Boufadi et al., 2021).

2.6. Antidiabetic activity in Wistar rats

2.6.1. Animals and accommodation conditions

The experimental study was conducted using twenty-four male Wistar albino rats with an average body weight of 120 ± 15 g. The animals were supplied by the Pasteur Institute located in Algiers, Algeria. This weight range is consistent with the recommended criteria for establishing experimental models of type 2 diabetes, which typically involve rats weighing between 90 and 150 g and aged 4 to 5 weeks, as recommended by Yeasen Biotechnology.

Following their arrival, the animals were randomly assigned to four experimental groups, each comprising six rats. Before the onset of any experimental interventions, the rats were allowed a two-week adaptation period to acclimate to laboratory conditions. During this phase, they were housed under standardized environmental settings, including an ambient temperature maintained at 22 ± 3 °C, relative humidity ranging from 45 to 50%, and a controlled 12 h light/12 h dark cycle. Animals were provided with standard laboratory feed and water *ad libitum* throughout the study.

All procedures involving animals were performed in compliance with the ethical principles and guidelines outlined by the National Institutes of Health (NIH, USA) for the care and use of laboratory animals. Approval for the experimental protocol was granted by the local ethics committee for animal welfare at Abdelhamid Ibn Badis University of Mostaganem (approval code: rat/mouse 20% maintenance, RN-01-20K12; Carfil Quality).

2.6.2. Animal treatment protocol

Diabetes was experimentally induced in overnight-fasted rats (12 h) by a single intraperitoneal injection of alloxan monohydrate (200 mg/

kg), freshly dissolved in 0.9% saline. To prevent early hypoglycemic shock, a 5% glucose solution was provided for the first 48 h in accordance with the procedure reported by [Ashok Kumar et al. \(2012\)](#). Following the acclimatization phase, the animals were randomly divided into four groups of six rats each. The first group (G1) served as the untreated control. Rats in the second group (G2) received a single intraperitoneal dose of alloxan (200 mg/kg body weight) to induce diabetes followed by an administration of a 5% glucose solution during the first 48 h to prevent lethal reactive hypoglycemia, in accordance with the standard procedure outlined by [Rohilla and Ali \(2012\)](#). The third group (G3) consisted of non-diabetic rats administered the RME orally at a dose of 200 mg/kg body weight for a duration of three months. In the fourth group (G4), diabetes was first induced by alloxan injection (200 mg/kg, i.p.), followed by an administration of a 5% glucose solution during the first 48 h and an oral treatment with RME at the same dose (200 mg/kg) for three months.

At the conclusion of the 90-day treatment period, animals were fasted for 12 h prior to biological sampling. Rats were then subjected to light anesthesia with chloroform before being sacrificed. Blood samples were collected by cardiac puncture and transferred into both plain and heparinized tubes for subsequent analyses.

Erythrocytes were isolated by centrifugation and rinsed three times with physiological saline to remove remaining plasma components. Cell lysis was achieved by adding ice-cold distilled water, followed by centrifugation at 5000 rpm for 5 min to eliminate cellular fragments. The supernatant obtained was used for the assessment of erythrocyte antioxidant enzyme activities. Peritoneal fluid samples were collected and stored in sterile phosphate-buffered saline (PBS).

After blood withdrawal, the liver, pancreas, and kidneys were carefully exercised, macroscopically examined, and immediately washed with chilled 0.9% sodium chloride solution. The organs were subsequently fixed in 10% formalin at room temperature and preserved for histopathological analysis.

2.6.3. Biochemical parameter testing

Plasma glucose levels were quantified using an enzymatic assay based on the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase (Hexokinase/G-6-PDH) system, following the instructions provided with a commercial reagent kit (Biomérieux, France). This procedure allows accurate determination of glucose concentration through coupled enzymatic reactions.

Serum total protein concentration was assessed according to the protocol established by [Gornall et al. \(1949\)](#), which involves the formation of a chromogenic complex under alkaline conditions. Albumin levels were determined using a dedicated colorimetric assay with a commercial kit supplied by Biolabo (France).

Serum lipid parameters, including total cholesterol and triglycerides, were evaluated using enzymatic colorimetric methods with commercially available diagnostic kits (Biocon, Germany). These assays are based on enzymatic conversion of lipids into colored products, the absorbance of which is proportional to their concentrations. All measurements were carried out in accordance with the manufacturers' recommendations.

2.6.4. Blood liver function parameters

The activities of the hepatic enzymes AST (EC 2.6.1.1) and ALT (EC 2.6.1.2) were measured using standardized diagnostic kits obtained from bioMérieux SA (France). These assays quantify enzyme activity based on the rate of aminotransfer reactions, providing an index of hepatocellular function.

ALP (EC 3.1.3.1) activity was evaluated using colorimetric kits supplied by BioVision (USA), which rely on the enzymatic cleavage of phosphate esters under alkaline conditions to generate a measurable signal.

γ -GT (EC 2.3.2.2) levels were determined with commercial assay kits from GenWay Biotech (USA). This method is based on γ -GT group

transfer reactions that produce a chromogenic product proportional to enzyme activity. All analyses were conducted in strict accordance with the instructions provided by the manufacturers.

2.6.5. Measurement of renal function parameters

Renal function was evaluated through the determination of key biochemical markers, including urea, uric acid, and creatinine. Serum urea concentration was measured using a commercial Chronolab System diagnostic kit, which is based on an enzymatic colorimetric reaction allowing accurate quantification of urea levels.

Serum uric acid and creatinine concentrations were determined using standardized enzymatic assays provided by bioMérieux SA (France). These methods rely on specific enzymatic reactions that generate chromogenic products, the intensity of which is directly proportional to the concentration of the respective analytes. All measurements were performed according to the manufacturers' instructions to ensure reliability and reproducibility of the results.

2.6.6. Prostaglandin E₂ and TNF- α dosage

Prostaglandin E₂ (PGE₂) concentrations in peritoneal fluid were determined using a commercial ELISA assay kit obtained from Abcam Discover More (UK). This analysis was performed according to a competitive immune enzymatic format, in which endogenous PGE₂ in the samples competes with an enzyme-labeled antigen for binding to specific antibodies, allowing quantitative determination of PGE₂ levels following the manufacturer's instructions.

The quantification of TNF- α in peritoneal fluid was carried out using an independent ELISA kit provided by Thermo Fisher Scientific (USA). This immunoassay is based on antibody-antigen specificity and enables sensitive measurement of TNF- α concentrations. All experimental steps, including incubation, washing, and signal detection, were conducted in strict accordance with the supplier's recommended protocol.

2.6.7. Determination of antioxidant status

Plasma lipid peroxidation was assessed through the quantification of MDA levels using the procedure described by [Yagi \(1976\)](#). This method measures MDA as a marker of oxidative degradation of lipids via its reaction with thiobarbituric acid, producing a colored complex that can be detected spectrophotometrically.

The activity of superoxide dismutase (SOD) was evaluated following the protocol established by [Elstner et al. \(1983\)](#), which determines the enzyme's capacity to neutralize superoxide anion radicals by catalyzing their conversion into hydrogen peroxide and oxygen.

Erythrocyte catalase (CAT) activity was determined according to the methods reported by [Lück \(1965\)](#) and [Aebi \(1974\)](#). This assay is based on monitoring the rate of hydrogen peroxide decomposition, allowing estimation of catalase efficiency in protecting cells against oxidative injury.

Glutathione peroxidase (GPx) activity in erythrocytes was measured using the method described by [Paglia and Valentine \(1967\)](#). This technique assesses the enzyme's ability to reduce peroxides through glutathione oxidation, coupled with NADPH consumption, which is followed spectrophotometrically to calculate enzymatic activity.

2.6.8. Histopathological study

Histopathological examinations of the liver, pancreas, and kidney were performed as described by [Drury and Wallington \(1980\)](#). After the collection, tissue samples were floated in a 10% formaldehyde solution to guarantee an appropriate morphological fixation. These fixed tissues underwent standard histological processing procedures of graded ethanol dehydration, xylene clearing, and paraffin wax embedding.

Using a rotary microtome (Leica, Germany), the paraffin blocks were cut into a series of slices with a thickness of about 5 μ m. The resulting sections were fixed on glass slides and deparaffinized by immersion in two successive baths of xylene, 10 min each. Sections were then rehydrated in a 100, 95, 80, 70% ethanol series.

Following this staining, sections were re-hydrated and stained with hematoxylin and eosin for general cellular and tissue morphology visualization. The nuclei were selectively stained with hematoxylin, and cytoplasmic and extracellular components were contrasted with eosin. Slides were then dehydrated, cleared, and mounted for analysis after staining.

Histological organization and possible pathological modifications for liver, pancreas and kidneys were assessed by microscopic (light microscope) evaluation among experimental groups.

2.7. Molecular docking

2.7.1. Docking molecular studies

The three-dimensional coordinates of α -glucosidase (PDB ID: 3A4A), Glucokinase (PDB ID: 4RCH), dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV; PDB ID: 2P8S), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ ; PDB ID: 3G9E) were retrieved from the Protein Data Bank (RCSB PDB) on January 20, 2026, for the molecular docking analysis. Before taking docked, BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020 was used to prepare all protein structures by removing the co-crystallized ligands and water molecules. The processed protein models were then saved as PDB files for further analysis.

The bioactive compounds identified from *Rhamnus alaternus* extract were downloaded from PubChem database (in SDF file format, same date). Using BIOVIA Discovery Studio Visualizer, we converted these ligand structures to PDB format and labeled them with their PubChem compound identification (CID) numbers.

Molecular docking simulations were performed applying AutoDock Vina version 1.1.2. Potential binding sites were probed throughout the surface of the protein using an aggressive blind docking approach. An exhaustiveness setting of eight was used to ensure sampling of suitable ligand conformations among the output solutions. The Monte Carlo search of flexible ligand docking was carried commands using line interface (Moussa et al., 2025), which generated input and output files in PDBQT format to facilitate meticulous scrutiny of predicted binding poses. Screening was followed by docking and post-docking analyses for the most favorable protein–ligand complexes. Visualization and interpretation of the binding interactions and docking conformations of the top ranked ligands were performed using BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020.

2.8. Statistical analysis

SigmaStat software (SPSS, version 3.0, SPSS, Inc., Chicago, IL) was utilized for statistical analysis. The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation and analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Rank-based ANOVA accompanied by Dunn's post hoc test was employed if necessary.

3. Results

3.1. Total phenolic content, flavonoids, and in vitro antioxidant activity

Comprehensive phytochemical analysis revealed that the RME is notably rich in bioactive phenolic constituents. The total phenolic content reached 223.25 mg gallic acid equivalents per gram of extract, indicating a strong affinity of methanol for the extraction of polar secondary metabolites and reflecting a high density of redox-active compounds. In parallel, flavonoids represented a substantial fraction of this phenolic pool, with a quantified content of 92.37 mg quercetin equivalents per gram of extract (Table 1). The marked abundance of these compounds is of particular importance, given their well-documented antioxidant, anti-inflammatory, and antidiabetic properties, and suggests a key contribution to the biological potential of the extract.

The antioxidant performance of the methanolic extract was further confirmed through *in vitro* assays evaluating both free radical

Table 1

Content of total phenolic and flavonoid compounds in methanolic extract of *Rhamnus alaternus*.

Methanolic extract of <i>Rhamnus alaternus</i>		
Polyphenols	(mg GAE/g)	223.25 $\pm$ 8.31
Flavonoids	(mg QE/g)	92.37 $\pm$ 2.68
IC ₅₀ DPPH	(μ g/mL)	184.80 $\pm$ 4.67
Lipoperoxidation	(μ g/mL)	29.03 $\pm$ 0.23

¹ The values represent the mean (m) of 5 determinations $\pm$ standard deviation (n = 5).

scavenging and lipid peroxidation inhibition. Using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH) assay, the extract exhibited a strong and concentration-dependent scavenging capacity, achieving nearly 88% inhibition at 1000 μ g/mL, with an IC₅₀ value of 184.80 μ g/mL (Table 1).

This pronounced activity reflects the presence of efficient hydrogen- or electron-donating molecules capable of neutralizing free radicals. Moreover, assessment of lipid peroxidation by the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) method demonstrated a potent protective effect against oxidative membrane damage, as evidenced by a low IC₅₀ value of 29.03 μ g/mL. Together, these findings indicate that the RME exerts a broad-spectrum antioxidant effect, combining radical scavenging activity with effective suppression of oxidative chain reactions, which may underline its protective effects, observed in subsequent biological evaluations.

3.2. Chemical identification of the methanol extract of *Rhamnus alaternus* by HPLC

The phenolic fingerprint of the RME was established using HPLC/UV detection at 290 nm, allowing accurate separation and quantification of phenolic acids and flavonoids (Fig. 1). Compound identification was achieved through systematic comparison with authentic standards, leading to the detection of sixteen individual phenolic constituents, as reported in Table 2.

Chromatographic profiling showed that flavonoids constituted the predominant chemical class within the extract. Among these, quercetin was identified as the most abundant compound, reaching a concentration of 2.56 mg per gram of extract and eluting at 13.62 min. Rutin and kaempferol were also present at relatively high levels, with contents of 2.13 mg/g and 1.95 mg/g and retention times of 17.87 and 17.00 min, respectively. The marked prevalence of these flavonols suggests that they represent key contributors to the extract's bioactive potential.

Phenolic acids were detected in lower proportions compared with flavonoids. Caffeic acid emerged as the dominant representative of this group, with a measured content of 0.41 mg/g of extract at a retention time of 12.75 min, while other acids such as gallic, ferulic, rosmarinic, and m-coumaric acids were present only in minor amounts. The coexistence of multiple phenolic subclasses highlights the chemical complexity of the methanolic extract and indicates a diversified phytochemical composition.

Taken together, these results confirm that the RME exhibits a flavonoid-rich phenolic profile supported by a range of phenolic acids. Such compositional diversity may promote synergistic interactions among constituents, potentially enhancing the antioxidant and biological activities observed in subsequent experimental assessments.

3.3. Biochemical parameters

The differences in metabolic parameters observed in the experimental groups after administration of the alloxan and extract treatment were statistically significant (Table 3). Importantly, no mortality was recorded throughout the experimental period, which can be attributed to the administration of the glucose solution. Glycemic values from the

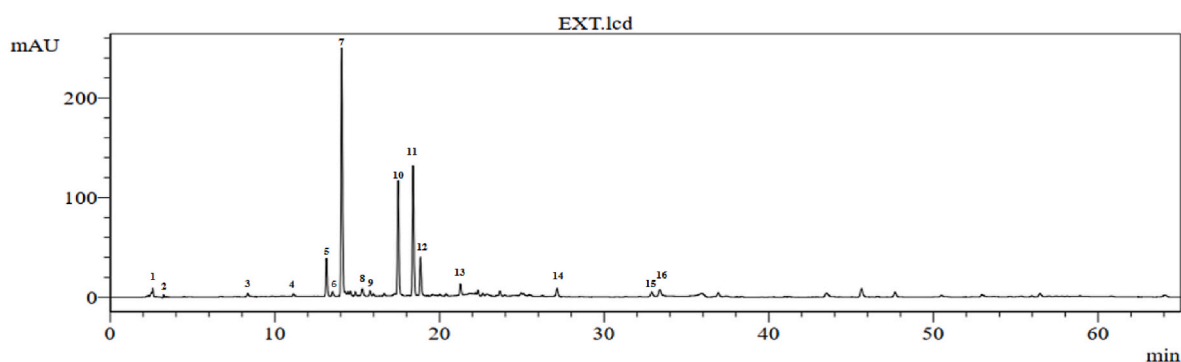


Fig. 1. HPLC/UV analysis chromatograms of methanolic extract of *Rhamnus alaternus* at a wavelength of 290 nm.

Table 2

Composition of *Rhamnus alaternus* methanolic extracts by HPLC/UV (mg/g).

Peak number	Compound	Retention time (min)	Amount (mg/g)
1	Gallic acid	2.5	0.03
2	Ascorbic acid	3.125	0.01
3	Ferulic acid	8	0.02
4	Rosmarinic acid	10.75	0.01
5	Caffeic acid	12.75	0.41
6	m-Coumaric acid	13.125	0.02
7	Quercetin	13.625	2.56
8	Chrysin	14.75	0.03
9	Apigenin	15.25	0.02
10	Kaempferol	17	1.95
11	Rutin	17.875	2.13
12	Galangin	18.25	0.42
13	Pinocembrin	20.625	0.04
14	Catechin	26.25	0.03
15	Acacetin	31.75	0.03
16	Luteolin	32.25	0.04

Table 3

Biological parameters of the experimental groups of rats.

Parameter	Experimental groups			
	G1	G2	G3	G4
Glucose g/L	1.03 ± 0.06	4.22 ± 0.49	0.86 ± 0.05	1.79 ± 0.15
Total protein g/L	74.67 ± 3.51	44.33 ± 5.03	74.33 ± 3.05	55 ± 3.60
Albumin g/L	34.67 ± 3.51	23 ± 1.73	33.33 ± 2.52	29 ± 2
Cholesterol g/L	1.6 ± 0.14	1.98 ± 0.03	1.5 ± 0.06	1.82 ± 0.08
Triglycerides g/L	0.74 ± 0.04	1.23 ± 0.12	0.46 ± 0.05	0.81 ± 0.04

G1: Control; G2: 200 mg/kg of alloxan; G3: 200 mg/kg of RME (3 months); G4: 200 mg/kg of alloxan and 200 mg/kg of RME (3 months). The values are expressed as ± mean SD (n = 5).

control animals (G1) remained steady with blood glucose averaging 1.03 g/L while a severe increase in blood glucose concentrations, to 4.22 g/L, was observed following alloxan administration in the diabetic group (G2), confirming the establishment of a diabetic condition. The RME applied subsequently to the diabetic rats (G4) significantly reduced blood glucose levels from the untreated diabetic animals within 58%. Glucose values were even lower (0.86 g/L), though not significantly different from controls, as rats being tested with the extract alone (G3) do not seem to markedly alter normal glucose homeostasis.

Giving less emphasis on glycemic control, alloxan-induced diabetes had a great impact on biochemical indices pertaining to protein. We found a significant and evident decrease in circulating total protein and albumin in G2 (41% and 34%, respectively) when compared with the control (Fig. 2). Such disturbances were not noticed in the extracts treated rats (G3). Importantly, the extract has a partial role on protein

metabolism of diabetic animals (G4), total protein and albumin concentrations were increased by 1.24- and 1.26-fold compared to the diabetic group, respectively.

Alloxan also induced changes in lipid metabolism. The serum cholesterol and triglyceride levels in diabetic rats were significantly higher than those in the normoglycemic controls, indicating the development of dyslipidemia. On the contrary, rats that even received with methanolic extract had lower amounts of lipids. Crucially, administration of the extract to the diabetic rats resulted in a near-normalization of lipid parameters: Cholesterol and triglyceride levels fell roughly 80% and 34%, respectively, compared to untreated diabetic animals.

3.3.1. Liver function

Table 4 depicts the results of hepatic biomarker analysis in alloxan-induced diabetic rats, which have been rendered diabetic50. Serum -transaminase activities were significantly higher ($P < 0.05$) in diabetic rats (G2) as compared with normoglycemic control animals (G1). Plasma concentrations of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) approximately were 3.09- and 3.25-fold higher respectively, confirming a significant hepatocellular impairment caused by the diabetic state.

Oral supplementation of *Rhamnus alaternus* methanolic extract in diabetic rats (G4) for three months dramatically compensated these above-mentioned enzyme changes. Compared to values in diabetic, untreated animals, AST and ALT activities were reduced by 53% ($p < 0.0003$) and 52% ($p < 0.0001$), respectively, indicating striking restoration of hepatic integrity. Conversely, rats only receiving extract (G3) were shown to have aminotransferase levels at control levels, which indicates a lack of negative hepatic effects in non-diabetic conditions.

Alloxan-Induced Diabetes Affects Markers of Cholestasis and Membrane Integrity in a Similar Manner. The activity of alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl transferase (γ -GT) was significantly elevated in diabetic rats, being 2.64 and 4.22 times higher than control animals, an increase of 164% and 322%, respectively. These results indicate major changes in biliary function and hepatocyte membrane integrity.

Specifically, bearings on methanolic extract treatment demonstrated significant remission of the above-mentioned parameters. In further support of the hepatoprotective potential of the extract, the data showed that diabetic rats receiving the extract (G4) showed 46% and 43% reduction in ALP activity and γ -GT activity, respectively, over untreated diabetic rats.

3.3.2. Kidney function

Serum biochemical parameters for kidney function have been clearly known from before. Abnormality of all these biochemical indices strongly suggested kidney dysfunction after alloxan induction of DM (Table 5). In diabetic group (G2) urea, uric acid, and creatinine plasma content were significantly higher compared with those from healthy control rats (G1), indicating a markedly reduced capacity of renal

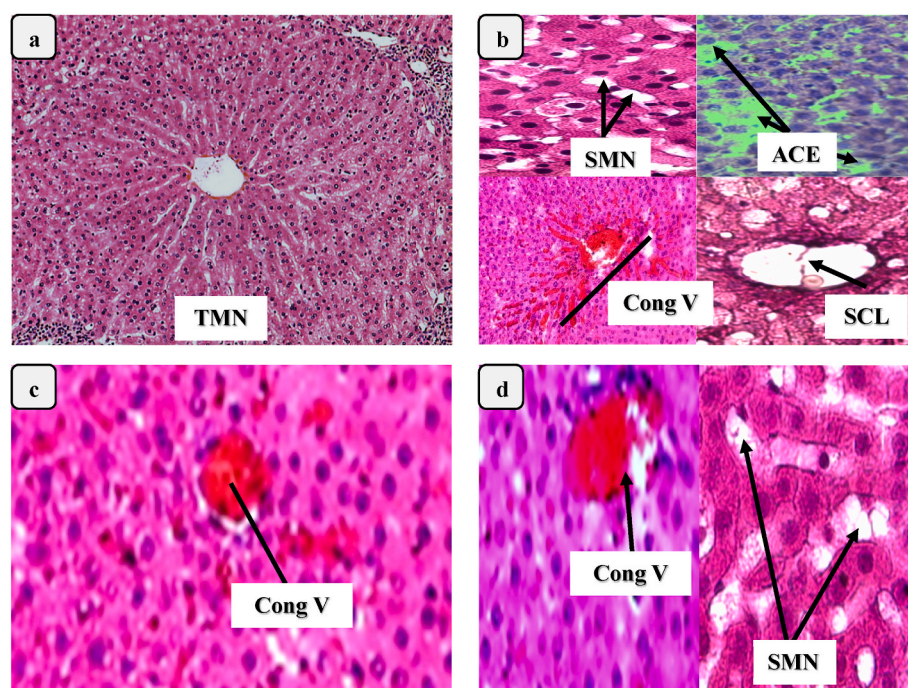


Fig. 2. Histological sections of liver from group: a (G1): control; b (G2): 200 mg/kg alloxane (90 d); c (G3): 200 mg/kg/d EMR (90 d); d (G4): 200 mg/kg alloxane i.p and 200 mg/kg/d EMR (90 d). TMN: normal liver tissue, SMN: micronodular steatosis, ACE: Starry-sky appearance, Cong V: Vascular congestion, SCL: Centrilobular steatosis.

Table 4

Effect of the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* on the values of liver function parameters of diabetic Wistar rats injected with alloxan.

Parameter	Experimental groups			
	G1	G2	G3	G4
AST UI/L	51.1 ± 3.15	158 ± 15.10	50 ± 5.57	75 ± 6
ALT UI/L	44 ± 4.36	143 ± 5.29	42.67 ± 5.51	69.33 ± 4.51
PAL UI/L	79.67 ± 5.03	210.33 ± 8.50	80 ± 5.57	113.67 ± 12.05
γ GT UI/L	32.33 ± 3.51	136.33 ± 5.51	33 ± 4.58	78 ± 7

G1: Control; G2: 200 mg/kg of alloxan; G3: 200 mg/kg of RME (3 months); G4: 200 mg/kg of alloxan and 200 mg/kg of RME (3 months). The values are expressed as ± mean SD (n = 5).

Table 5

Effect of the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* on the values of liver function parameters of diabetic Wistar rats injected with alloxan.

Parameter	Experimental groups			
	G1	G2	G3	G4
Urea g/L	0.33 ± 0.06	0.93 ± 0.07	0.33 ± 0.04	0.44 ± 0.05
Uric acid mg/dL	7.79 ± 0.64	13 ± 0.56	7.61 ± 0.46	9.03 ± 0.25
Creatinine mg/L	5.04 ± 0.56	12.71 ± 2.43	5.01 ± 0.54	7.08 ± 0.26

G1: Control; G2: 200 mg/kg of alloxan; G3: 200 mg/kg of RME (3 months); G4: 200 mg/kg of alloxan and 200 mg/kg of RME (3 months). The values are expressed as ± mean SD (n = 5).

clearance. These marked rises affirm the inducing of diabetic renal pathology which is typically associated with disease-related metabolic dysregulation and cellular stress to extra-pancreatic tissues in states of hyperglycaemia.

Conversely, treatment with the RME strongly diminished these renal alterations. However, it is clear in the extract-treated diabetic rats (G4) that the serum status of urea, uric acid and creatinine is lower than untreated diabetic animals, which shows an improvement of the renal functional status. Despite these variables being consistently higher than

the values observed in the control group, the general trend clearly shows the protective effect of the extract in preventing both the nephrotoxicity and hyperglycaemia induced by alloxan.

More significantly, administration of the extract to normo-glycemic (G3) rats did not produce significant changes in renal biomarkers as compared to control animals, indicating that the methanolic extract does not have nephrotoxic effects in normal physiological conditions. Altogether, these results emphasize the ability of the RME to protect renal function, as well as to prevent biochemical changes associated with diabetes in the kidney, in a fractionated manner.

3.4. Status of oxidative stress

Results of redox-related biomarker analyses suggested that exposure to alloxan elicited significant redox disturbances in both liver and kidney tissues (Table 6). Diabetic rats showed the most dramatic change with high-saturated production of lipid peroxidation products. Relative to control animals (G1), malondialdehyde (MDA) (the product of lipid peroxidation) levels were significantly elevated in group G2, increased by approximately 4- to 4.56 folds in the liver and close to 13-fold in the kidneys, reflecting extensive cellular membrane oxidative damage from chronic hyperglycemia (Abdel Azeem et al., 2025).

Treatment with the RME for three months diminished lipid peroxidation in organs of diabetic rats (G4). The concentrations of MDA was considerably lower than what was found in untreated diabetic rats, suggesting an ability of the extract to prevent oxidative injury to membranes. Though values did not reach control values, the drop was clearly indicative of an improvement in tissue redox status.

At the same time, the antioxidant defenses were severely affected by alloxan-induced diabetes. Dramatic inhibition of the activity of the main enzymatic antioxidants, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px), was found in liver and kidney tissues of diabetic rats, clearly indicating an imbalance between the production of ROS and the antioxidant capacity. This enzymatic depletion predisposes tissues to injury mediated by oxidative stress.

On the other hand, the diabetic rats that received treatment with the

Table 6Effect of the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* on the values of liver function parameters of diabetic Wistar rats injected with alloxan.

Parameter	Experimental groups			
	G1	G2	G3	G4
Liver oxidative stress status				
MDA liver (mmol/mg)	2.36 ± 0.07	10.76 ± 0.45	2.29 ± 0.06	4.81 ± 0.17
SOD liver (U/cg)	44.2 ± 2.43	10.34 ± 2.26	75.54 ± 3.71	52.24 ± 2.82
CAT liver (U/mg)	109.06 ± 6.83	37.65 ± 3.26	128.66 ± 3.45	84.96 ± 5.33
GSH-Px liver (U/g)	129.5 ± 5.60	13.70 ± 1.42	139.56 ± 6.49	98.32 ± 7.47
TNF-α liver (ng/g)	51.52 ± 2.69	202.82 ± 8.04	57.82 ± 4.80	104.8 ± 8.23
Renal oxidative stress status				
MDA kidneys (mmol/mg)	0.40 ± 0.04	5.18 ± 0.23	0.39 ± 0.04	2.24 ± 0.10
SOD kidneys (U/cg)	22.88 ± 1.94	4.94 ± 0.67	25.1 ± 1.83	12.73 ± 1.10
CAT kidneys (U/mg)	21 ± 1.4	3.87 ± 0.75	25.77 ± 1.57	15.81 ± 1.21
GSH-Px kidenys (U/g)	54.4 ± 3.45	15.8 ± 2.09	55.57 ± 2.53	35.58 ± 3.16
PGE2 kidenys (pg/mL)	690 ± 19.97	1313 ± 25.36	687.33 ± 19.65	881 ± 32.60

G1: Control; G2: 200 mg/kg of alloxan; G3: 200 mg/kg of RME (3 months); G4: 200 mg/kg of alloxan and 200 mg/kg of RME (3 months). The values are expressed as ± mean SD (n = 5).

methanolic extract exhibited a marked recovery of antioxidant enzyme activity in both tissues. As compared to diabetic rats without treatment, SOD CAT and GSH-Px activities were significantly increased in G4, showing rebuilding of endogenous antioxidant defenses. Most noteworthy, the extract alone (G3) caused no significant change in either lipid peroxidation level or antioxidant enzyme activities, as compared to control animals, proving from a redox point of view the safety of the extract within the physiological conditions.

Alloxan treatment also modulated inflammatory markers in addition to oxidative stress. In diabetic rats, ROS and oxidation markers, such as MDA, rise due to diabetes, this leads to overexpression of pro-inflammatory cytokines, such as hepatic tumor necrosis factor-α (TNF-α) and renal prostaglandin E2 (PGE2), which exacerbates inflammation (Gómez-Jiménez et al., 2025). In addition to its antioxidant effects, the present study indicates that the protective effect of the methanolic extract also involves modulation of inflammation, which was supported by the significant reduction of these inflammatory mediators following methanolic extract treatment.

Collectively, the results as exhibited above indicate that alloxan-induced diabetes leads to dramatic oxidative and inflammatory changes in liver and kidney tissues. *Rhamnus alaternus* methanol extract also attenuates these metabolic and tissue dysfunctions by inhibiting lipid peroxidation in different tissues, correcting the depleted antioxidant enzymatic profile, and reducing inflammatory processes, thereby pointing to its protective role against oxidative damage induced by the diabetic condition.

3.5. Inflammation markers

Inflammatory status assessment indicated that alloxan-induced pro-inflammatory responses were strongly aggravated in hepatic and renal tissues (Table 6). TNF-α was significantly higher in the liver of diabetic rats subjected to alloxan (G2), reaching concentrations of 202.82 ng/g, compared to control animals (G1) with much lower levels (51.52 ng/g). Such a marked elevation stipulates an activation of pro-inflammatory signaling pathways coupled with oxidative stress and liver parenchymal cell injury in a diabetic milieu.

This inflammatory response was significantly reduced following treatment with the RME, in diabetic rats (G4) group. The extract was also able to suppress overproduction of TNF-α cytokine, as hepatic TNF-α levels declined by nearly 48% compared to untreated diabetic animals, indicating modulation of inflammation-induced liver injury via the hepatic TNF-α overproduction pathway.

PGE2 concentrations in urine were also indicative of inflammatory changes at the renal level. Rats treated with alloxan alone (G2) experienced a significant increase in PGE2, from 690 pg/mL to 1313 pg/mL. This rise implies heightened stimulation of mediators of inflammation

mediating renal stress and renal tissue dysfunction.

Diabetic rats given the methanolic extract exhibited a marked reduction in this response. The comparative decrease in PGE2 production of group G4 against untreated diabetic animals (in mg average per gram of kidney tissue) was about 33%, demonstrating the down-regulation effect of the extract on inflammatory processes in the kidney tissues.

Collectively, these results demonstrate the ability of alloxan-induced diabetes to induce a pro-inflammatory state in both liver and kidneys, as indicated by increased levels of TNF-α and PGE2. These changes were reversed by the RME, which shows that the extract acts as an anti-inflammatory agent and can protect the tissues from the deleterious effects of the inflammatory process associated with diabetes.

3.6. Histopathological study

Histological studies were performed to compare liver, pancreas and kidneys tissue architecture between the different experimental groups, to reveal the structural lesions induced by alloxan diabetes and potential protective effects offered by RME.

All parameters showed that the physiological and biochemical status of control group (G1) animals remained in the normal range throughout the duration of the study. None of the examined organs showed any gross lesions, and at the microscopic level, all tissues appeared intact and appropriately organized. Liver sections revealed normal-oriented hepatic cords of polygonal hepatocytes with centrally located nuclei and well-defined sinusoids (Fig. 2-a). The pancreatic tissue showed preserved islets of Langerhans, with a β-cell distribution similar to normal, and no evidence of inflammatory infiltration or degeneration. (Fig. 3-a). Similarly, kidneys sections showed normal renal morphology, with intact glomeruli and distinct tubular architecture (Fig. 4-a). These results are consistent with intact normal tissue in the untreated animals.

On the contrary, rats exposed to alloxan (G2) showed severe histological damage. Histological features of liver sections: Large-scale pathological changes were multiple portal areas suffering from micro-nodular and centrilobular steatosis, marked vascular congestion with the starry this pattern indicates extreme hepatocellular injury (Fig. 2-b). Extensive destruction of endocrine tissue with atrophic necrosis, dense inflammatory cell infiltration, and cystic lymphoid structure was also seen in pancreatic sections (Fig. 3-b). Marked vascular congestion was observed in the renal tissue from diabetic rats, indicating impaired renal microcirculation, and early nephropathy changes (Fig. 4-b).

Rats received only methanolic extract only (G3) did not show any significant gross structural defects in pancreatic or renal tissues, still similar to those in the control animals (Fig. 3-c and 4-c). Nonetheless, the liver sections of this group revealed the mild vascular congestion (Fig. 2-c), indicating an abatement of hepatic vascular sign due to

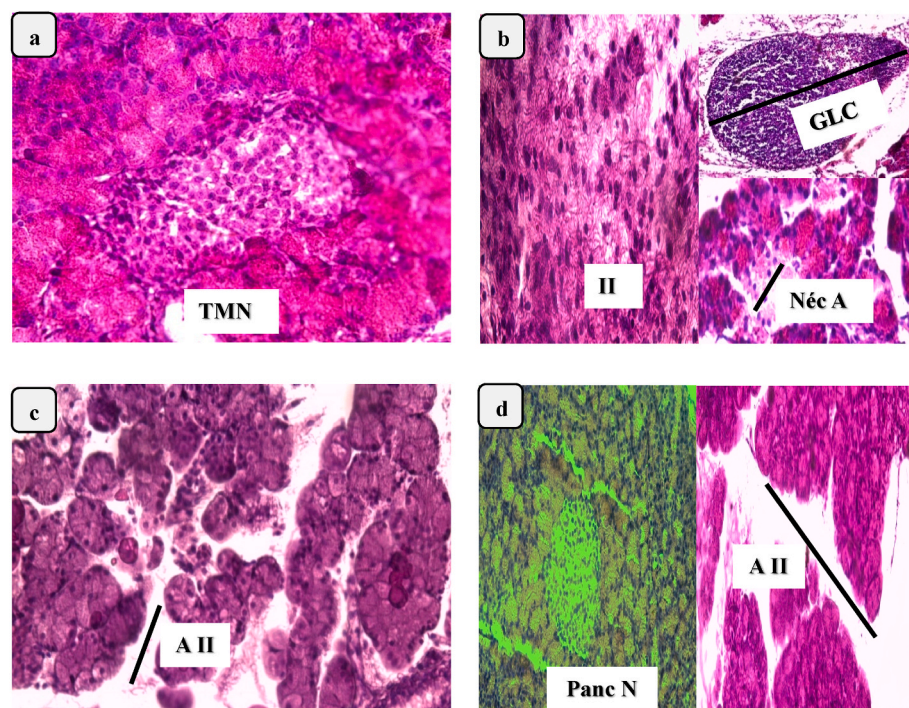


Fig. 3. Histological sections of pancreas group: a (G1): control; b (G2): 200 mg/kg alloxane (90 d); c (G3): 200 mg/kg/d EMR (90 d); d (G4): 200 mg/kg alloxane i.p and 200 mg/kg/d EMR (90 d). TMN: normal pancreatic tissue, II: inflammatory infiltrate, GLC: cystic lymph node, Nec A: atrophic necrosis, AII: absence of inflammatory infiltrate, Pan N: normal pancreas.

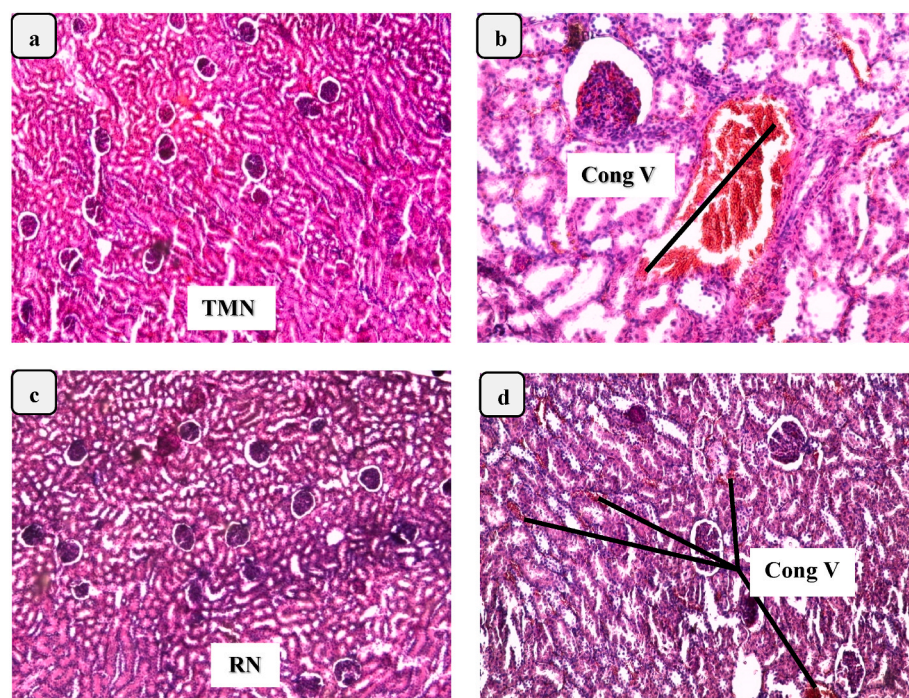


Fig. 4. Histological sections of kidney group: a (G1): control; b (G2): 200 mg/kg alloxane (90 d); c (G3): 200 mg/kg/d EMR (90 d); d (G4): 200 mg/kg alloxane i.p and 200 mg/kg/d EMR (90 d). TMN: normal nephric tissue, Cong V: vascular congestion, RN: normal kidney.

continuous extract exposure except diabetic stress.

Interestingly, treating diabetic rats (G4) with a methanolic extract induced a striking histological repair in all tissues, which were analyzed. Pancreatic tissue shows almost complete restoration of normal architecture, with reformed islet structure and devoid of inflammatory infiltrates and necrotic lesions (Fig. 3-d). The liver showed

obvious improvement with less vascular congestion and micronodular steatosis, with disappearance of centrilobular steatosis and starry-sky in affected areas (Fig. 2-d). This group of renal sections showed more fibrotic repair within areas that were once congested, as well as a significant reduction in vascular congestion, suggesting improved structured architecture and recovery of tissue (Fig. 4-d).

When considered collectively, these histopathological findings show that alloxan-induced diabetes can generate significant structural alteration in liver, pancreas, and kidney tissues. Administration of the RME significantly improves these changes and accelerates tissue regeneration, confirming its potential hepatoprotective, pancreatoprotective and nephroprotective effects. Overall, these morphological enhancements corroborate the biochemical and oxidative stress data to ascertain the therapeutic potentials of the extract for diabetes-induced organ injury.

3.7. Molecular docking

As shown in Fig. 5, a clear separation between phenolic acids and flavonoid compounds according to their binding affinities towards the four investigated antidiabetic targets (α -glucosidase, glucokinase, DPP-IV, and PPAR γ) appears in the hierarchical clustering heatmap of the molecular docking results. Phenolic acids were grouped, with overall weaker binding energies against all targets, and flavonoids formed a separate cluster that was associated with stronger and more stable binding profiles (Fig. 5). Within all the ligands tested, rutin presented positive and reproducible binding energies and were -10.6 kcal/mol over α -glucosidase (3A4A), -9.20 kcal/mol over DPP-IV (2P8S), and shear -9.10 kcal/mol over PPAR γ (3G9E) semi-displayed in Table 1. Conversely, chrysin had the most potent binding energy score (-8.70 kcal/mol) and interaction with glucokinase (4RCH), and rutin had a similar yet weaker binding energy score (-8.50 kcal/mol) toward this target (Fig. 5). Finally, lower (more negative) magnitude are values of binding energy predicted higher binding affinity, and thus more stable ligand–protein complexes, which explains the positions of the flavonoids

as the chief representatives of the high-affinity cluster. The polyhydroxylated structure and long aromatic system of rutin could also provide strong multitarget binding behavior by allowing many hydrogen bonds and hydrophobic interactions to occur within the active sites of the enzymes.

The molecular docking results demonstrate that rutin binds stably within the active sites of both α -glucosidase and DPP-IV through multiple non-covalent interactions (Fig. 6). In the α -glucosidase complex, rutin forms several conventional hydrogen bonds with key catalytic residues, supported by π - π stacking and π -anion interactions, which collectively contribute to enhanced binding stability and explain its high docking score. Similarly, within the DPP-IV active site, rutin establishes multiple hydrogen bonds and engages in π -based interactions with aromatic residues, promoting favorable ligand orientation and stabilization within the binding pocket (Fig. 6). The high density of hydroxyl groups in rutin facilitates extensive hydrogen bonding, while its aromatic framework enables hydrophobic and π -mediated interactions.

Fig. 7 illustrates the docking interaction profiles of chrysin and rutin, revealing distinct binding modes associated with their structural features and target complementarity. As shown in Fig. 7a–and b, chrysin binds to the glucokinase active site predominantly through hydrophobic interactions, including π -alkyl and π - π T-shaped contacts, along with a stabilizing carbon–hydrogen bond involving Gly97. In contrast, Fig. 7c and d shows that rutin interacts with the PPAR γ ligand-binding domain through an extensive network of polar interactions. Owing to its glycosylated structure, rutin forms multiple conventional hydrogen bonds and a specific π -anion interaction with Glu259. This interaction pattern highlights the role of rutin's polyhydroxylated scaffold in enhancing binding stability by enabling both hydrogen bond donor and acceptor

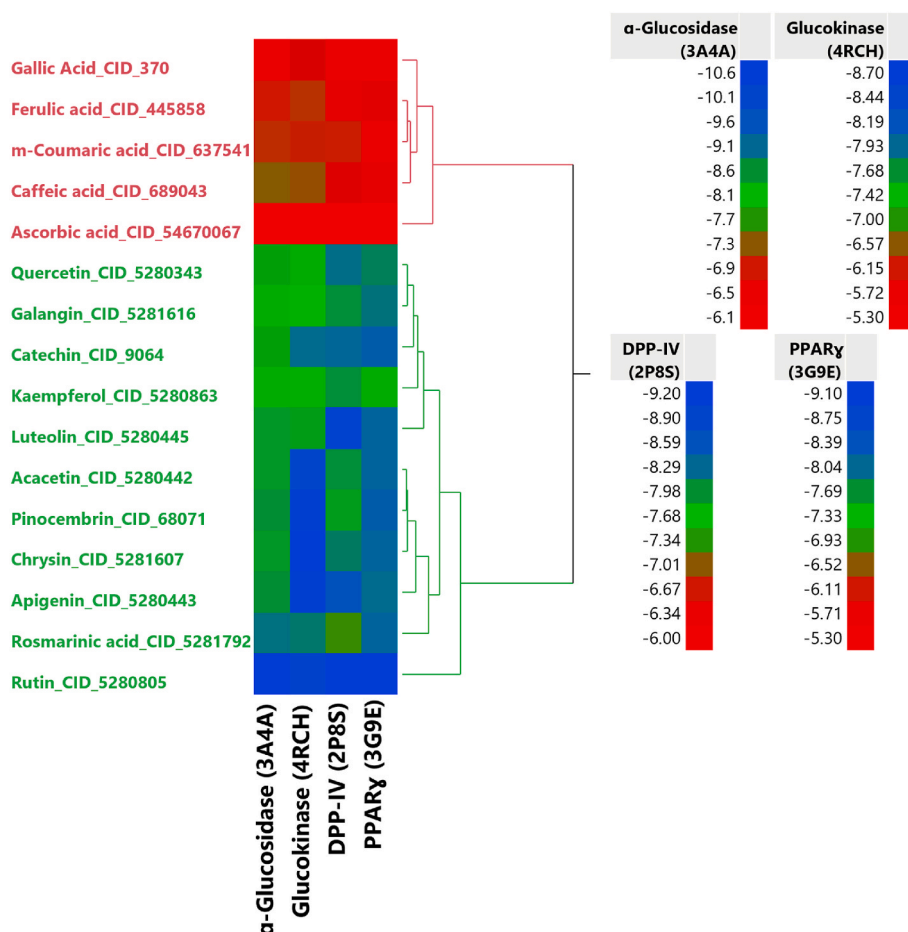


Fig. 5. Hierarchical cluster analysis of phenolic compounds based on docking Affinity to α -Glucosidase, Glucokinase, DPP-IV, and PPAR γ .

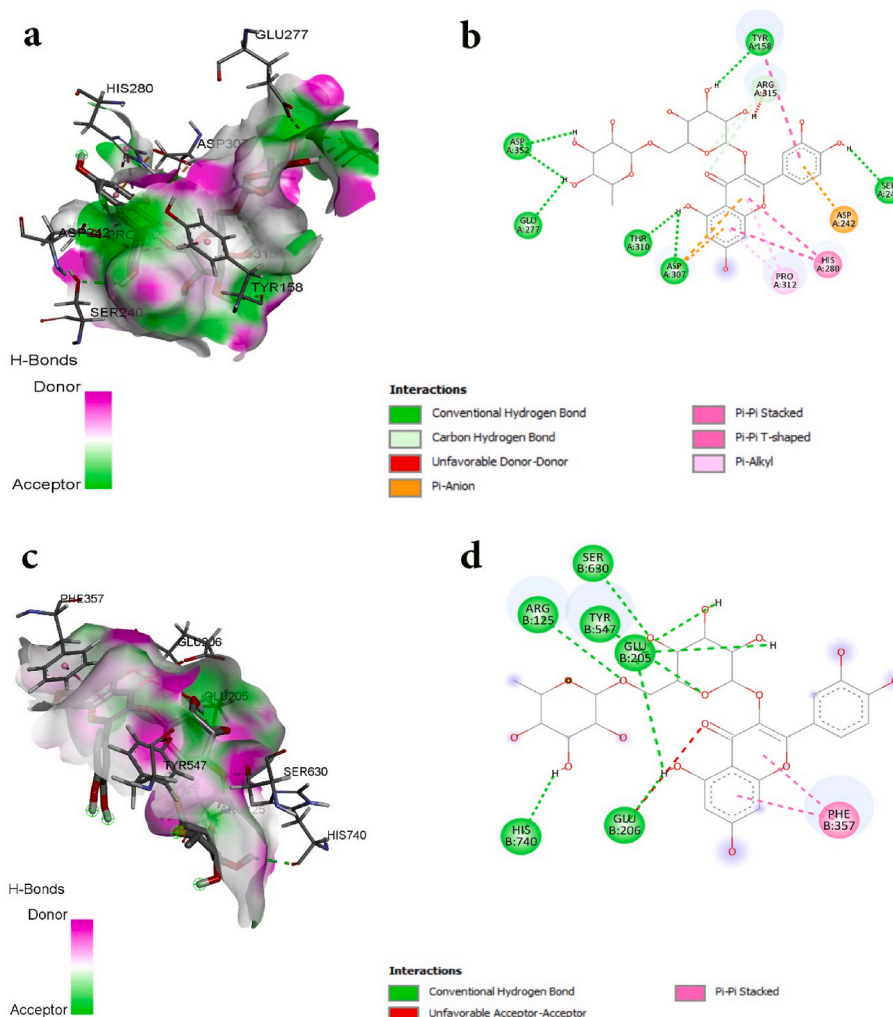


Fig. 6. Binding interactions of Rutin with α -Glucosidase (a, b) and DPP-IV (c, d).

functions, resulting in a more stable and chemically diverse protein–ligand complex.

Furthermore, Fig. 8 illustrates the binding of quercetin within the active sites of α -glucosidase (a, b) and DPP-IV (c, d). For α -glucosidase, quercetin shows a binding affinity of -8.4 kcal/mol, forming multiple hydrogen bonds with Thr290, Ala292, Ser291, and Leu297, along with a π -alkyl interaction with Arg263, indicating stable binding. In the DPP-IV complex, quercetin exhibits a binding affinity of -8.2 kcal/mol, with hydrogen bonds involving Glu206, Arg125, and Ser630, as well as π -anion and π - π interactions with Glu205 and Tyr666. Despite minor unfavorable contacts with Arg669, the ligand remains well-stabilized. Overall, these results suggest that quercetin has strong and comparable binding toward both enzymes.

On the other hand, Fig. 9 presents the binding interactions of quercetin with glucokinase (a, b) and PPAR γ (c, d) through both 3D and 2D representations. In the glucokinase complex, quercetin exhibits a binding affinity of -7.5 kcal/mol, forming conventional hydrogen bonds with key residues such as Arg63 and Glu96, along with a π - π stacked interaction with Tyr214, contributing to ligand stabilization within the binding pocket. In the PPAR γ complex, quercetin shows a slightly stronger binding affinity of -7.8 kcal/mol, supported by hydrogen bonds with Lys367 and Phe363, as well as additional interactions including π -sulfur with Cys285 and π -alkyl contacts with Leu330 and Arg288. An unfavorable donor–donor interaction with Ser342 is also observed but does not significantly compromise the overall stability. These results indicate that quercetin can effectively interact with both

targets through a combination of hydrogen bonding and hydrophobic interactions, with a slightly higher affinity toward PPAR γ .

4. Discussion

Chronic inflammation can lead to a dysregulation of the immune system, causing significant damage to the body, including hyperglycemia, chronic inflammatory bowel disease, kidney disease, and cancer (Hou et al., 2024). Plant extracts with high levels of phenolic and flavonoid contents are highly reputed for their powerful antioxidant and protective properties (Belew et al., 2025). The chemical actions of phenolic compounds that drive these biological effects are mainly related to their capacity for redox regulation, and thereby the ability to minimize oxidative stress, inflammatory processes, and subsequent tissue damage (Silva et al., 2008). In agreement with these findings, the high phenolic and flavonoid content of the RME tested here explains well its strong biological activity.

Extraction solvent polarity has been previously reported as an important factor affecting phytochemical recovery, and a decisive feature for previous investigations. According to Boussahel et al. (2015) presented that methanolic extracts of *Rhamnus alaternus* bark have more flavonoid levels than aqueous extracts, methanol is especially an efficient solvent for the extraction of flavonoid. AlCl $_3$ -based spectrophotometric assays corroborated these results, showing substantial differences in flavonol concentrations between methanol and aqueous extracts and classic preparations. Similarly, Kosalec et al.

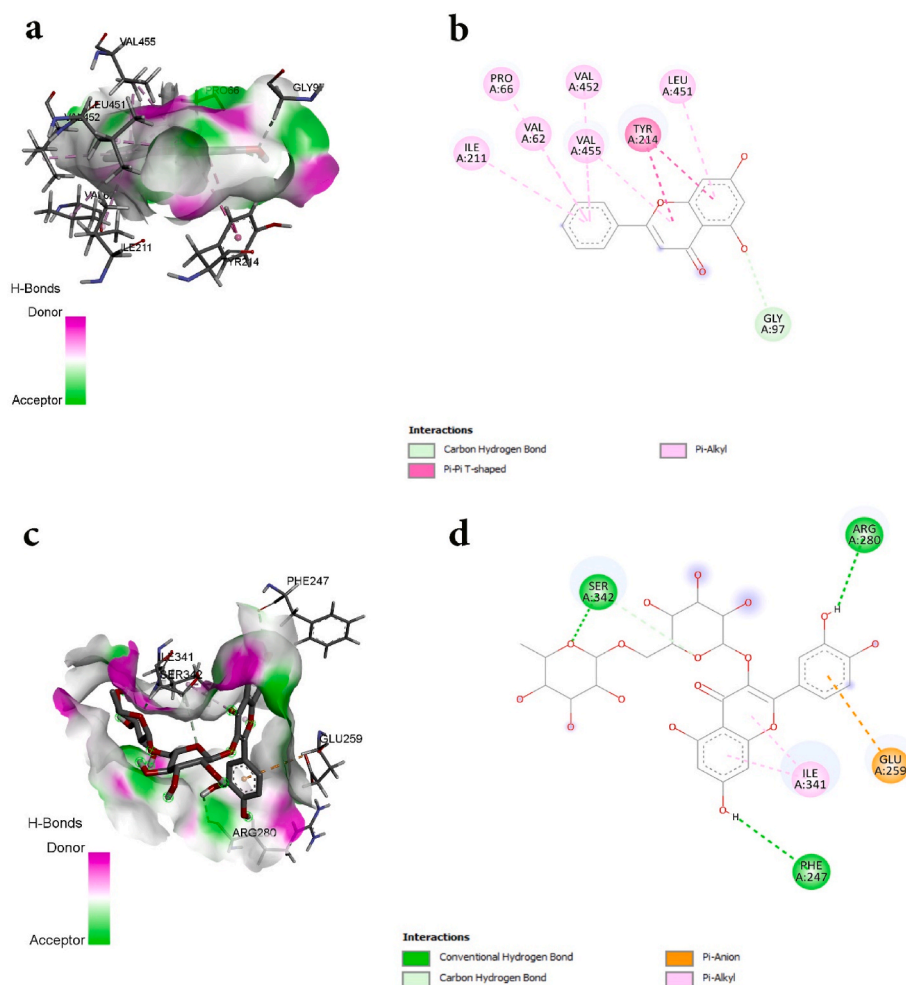


Fig. 7. Binding interactions of Chrysin with Glucokinase (a, b) and Binding interactions of Rutin with PPAR γ (c, d).

(2013) analyzed methanol extracts from *Rhamnus alaternus*, specifically its leaves, to study their polyphenol and flavonoid content. Variability in the phytochemical content among studies may also be due to numerous incoming and outgoing factors such as the genetic variability, environment and climatic conditions, harvesting time, geographical origin, soil, plant organ, and methods applied (Yahyaoui et al., 2017, 2018). The most significant seasonal effects because biosynthesis of phenolic varies between vegetative and flowering (Wang et al., 2017). Environmental parameters such as temperature, rainfall, and geographic location also modulate such differences (Piao et al., 2019). Along these lines, Bouhazama et al. (2024) found that levels of phenolics and flavonoids in methanolic extracts of *Rhamnus alaternus* were significantly higher than in aqueous extracts.

Mechanistically, the antioxidative action of polyphenols relates to their ability to donate electrons or hydrogen atoms, producing relatively stable radical intermediates that terminate harmful chain reactions of oxidation by reacting with oxygen free radicals (Majidinia et al., 2019). Their molecular structure contains several hydroxyl groups, which are associated with high radical-scavenging activity and protection against oxidative damage to lipids, proteins, and nucleic acids (Perron et al., 2008). In support of this mechanism, in a study conducted by Gadouche et al. (2022), methanolic extracts of *Rhamnus alaternus* leaves showed high DPPH scavenging activity as well as inhibition of lipid peroxidation, results which were attributed to their high contents of polyphenols and flavonoids.

The antioxidant activity exhibited in this study is consistent with previously reported results, especially when results for aqueous

extracts are compared. Chokri et al. (2024) Aqueous extracts revealed about 8-fold higher IC₅₀ values (Chokri et al., 2024), whereas this methanolic extract exhibited higher radical-scavenging and anti-lipoperoxidative activity. Perhaps these differences can be attributed to the solvent polarity, diversity of phytochemicals and total phenolic content (Yahyaoui et al., 2017). Moreover, Ben Ammar et al. (2011) Ethyl acetate and flavonoid fractions showed lower inhibition of lipid peroxidation than isolated methanolic fractions, indicating that methanolic extracts may be benefited from mixture effects of compounds (Ben Ammar et al., 2011).

Differences in methodology can also explain variability across studies in phytochemical detection. Tacherfiout et al. (2018) While adopting a similar solvent and plant material, some of these compounds were not detected in High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometry (HPLC/ESI-MS²) from methanolic leaf extracts. This variability may be due to divergence in harvesting conditions, temperature dependence, and changes in extraction or analytical protocols. In addition, Boufadi et al. (2017) Isolated phenolics like caffeic acid, kaempferol, or quercetin given separately have rather low bioavailability so that crude extracts may perform better in biological tests thanks to better absorption and pharmacodynamic synergisms.

A recent study performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) based analyses has backed this idea as methanolic root extracts of *Rhamnus alaternus* were shown to contain higher amount of quercetin and kaempferol derivatives (Boussahel et al., 2015). The differences in extraction techniques, analytical methods and plant

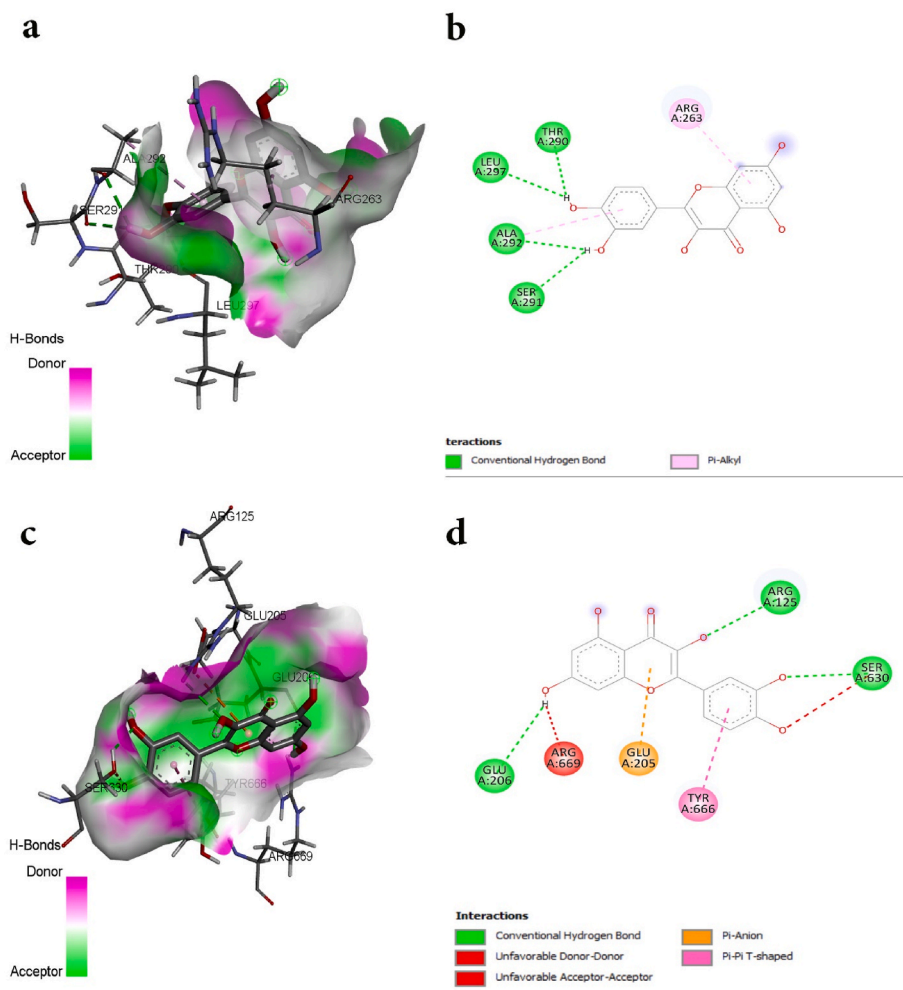


Fig. 8. Binding interactions of Quercetin with α -Glucosidase (a, b) and DPP-IV (c, d).

compartments are likely the reason for the higher content of flavonols as observed in extract from the present study. It is also crucial to note that synergistic interactions between their constituent polyphenols have been shown to enhance biological responses far beyond those expected from individual antioxidants (Amtaghri et al., 2022).

Flavonoids have received considerable attention due to their unique effects as antioxidants, anti-allergic, anti-inflammatory, anxiolytic, antidiabetic, and anticancer agents (Wu et al., 2025). Flavonoids from *Rhamnus alaternus* not only have antioxidant properties but also showed effective cytotoxicity and antiproliferative activity. The flavonoids kaempferol and rhamnocitrin glycosides have been associated with inducing apoptosis in human lympho blastoid cells (Bhouri et al., 2011), and in another study, quercetin decreased cell viability in leukemia cells (Okur et al., 2018). Nevertheless, in spite of these effects, the toxicity evaluation shows that the crude methanolic extracts of *Rhamnus alaternus* leaves seem to be relatively safe since neither cytotoxicity was observed in HepG2 cells at concentrations up to 500 μ g/mL (Tacherfiout et al., 2018) nor an oral LD₅₀ value of 680.79 mg/kg was determined for rats (Ouchtati et al., 2019).

Alloxan diabetes model used in this study is developed method for studying antidiabetic agents. Alloxan is preferentially toxic to pancreatic β -cells and causes lysis of those cells via an overload of intracellular ROS and disturbed calcium homeostasis, resulting in the insulopenia and hyperglycemia characteristic of diabetes (Szkudelski, 2001). This has been shown to result in a type 1 diabetic phenotype with polyuria, polydipsia, polyphagia and weight loss (Kebieche, 2009). Sensitivity to alloxan can vary depending on different experimental parameters and

doses of alloxan up to 200 mg/kg are used to produce a stable diabetes state in Wistar rats (Ighodaro et al., 2017).

This also confirms our results with the previous studies supporting the antidiabetic effect of *Rhamnus alaternus*. as previously indicated by Amtaghri et al. (2022), the authors reported a decrease in blood glucose concentrations after treatment with aqueous extracts, and no alteration of lipid parameters. On the other hand, the methanolic extract used in the current study resulted in significant enhancements in glycemic control and lipid profile, which can probably be explained by its higher phenolic constituents and antioxidant capacity. This efficacy is consistent with that described by Ouchtati et al. (2019). in a subacute study of *Rhamnus alaternus* leaf extract in female diabetic rats. However, notable similarities in the reduction of cholesterol and triglyceride levels were observed between Ouchtati's study and the current study, namely 19.34% and 8.29% for cholesterol and 64.64% and 34.48% for triglycerides, respectively. The differences observed may be related to geographical origin, but they are directly attributable to sexual polymorphisms and the duration of the trial (Martín-Carro et al., 2023).

In addition, the administration of RME showed a 20.69% increase in albumin. To our knowledge, this is the first study on the antidiabetic activity of RME evaluating serum albumin levels. However, a study by Benzaid et al. (2021), showed that the aqueous extract of *Rhamnus alaternus* could strengthen the redox defense system and protect rat hepatocytes from AICl₃ toxicity. In addition, the co-treatment group showed a 24.75% increase in plasma albumin profile. This is similar to our results. The differences observed may be related to the experimental methodology.

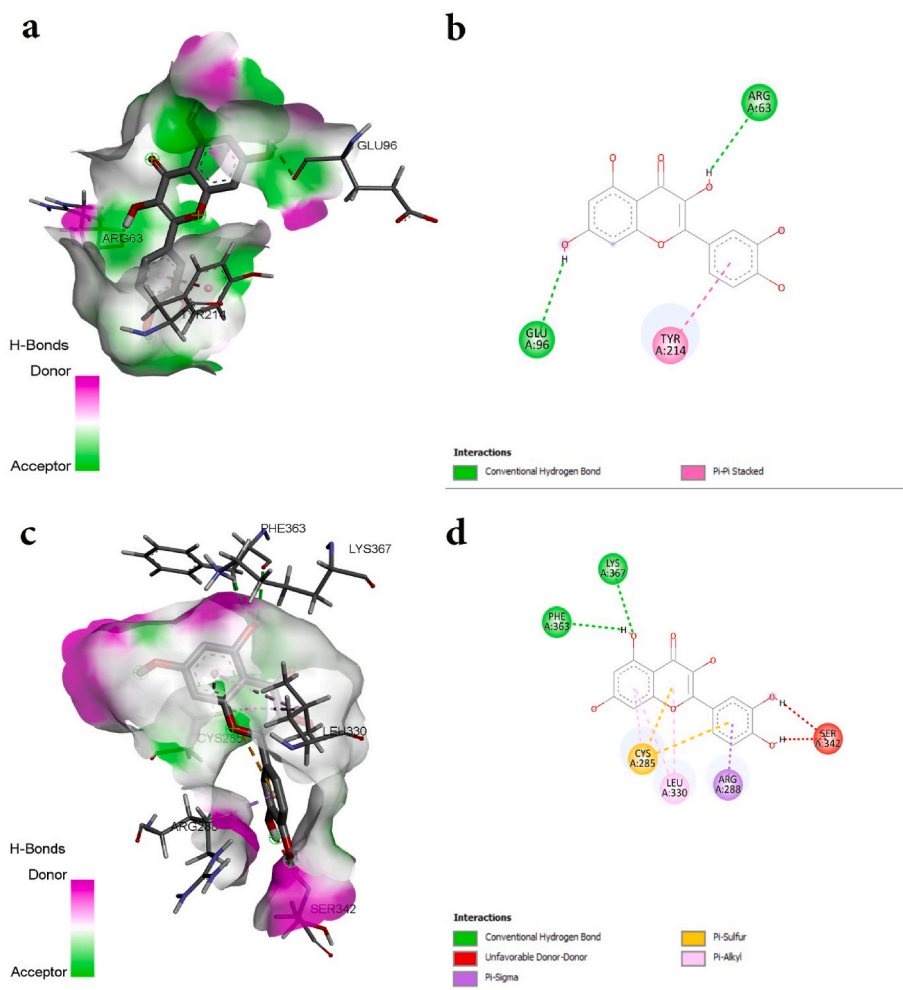


Fig. 9. Binding interactions of Quercetin with Glucokinase (a, b) and PPARγ (c, d).

Furthermore, experimental induction of diabetes led to significant hypoproteinaemia, mainly due to impaired hepatic synthesis and proteinuria in diabetic nephropathy (Chokri et al., 2024). The significant increase in PT after administration of RME shows an anabolic and cytoprotective effect, whereby the extract restores hepatic integrity and protein synthesis, in line with the antioxidant properties of the plant's flavonoids. This finding differs from the cases of normalization or slight decrease in PT reported by Ouchtati et al. (2019). The difference is caused by the initial pathophysiology: if the rats were dehydrated and hyperproteinemic, RME would restore water balance and normalize protein concentration (Liao et al., 2024). RME restores the initial balance in cases of insufficient synthesis or excessive concentration.

Moreover, evaluation of liver function parameters (AST, ALT, γ GT and PAL) revealed a significant decrease ($P < 0.05$) after treatment of diabetes-induced rats with RME. Currently, this study constitutes preliminary research into the antidiabetic activity of the RME, through the evaluation of its influence on AST, ALT, γ GT and PAL levels. However, Benzaid et al. (2021) observed a restoration of enzyme activity, as well as a respective decrease of 15.77%, 10.52%, 16.67% and 19.31% in AST, ALT, γ GT and PAL concentrations, in a study on the ability of *Rhamnus alaternus* aqueous extract to strengthen the redox defence system and protect hepatocytes against aluminum chloride ($AlCl_3$), toxicity. This study was conducted between rats in the group that received only 50 mg/kg of $AlCl_3$ and those that received a co-administration of 250 mg/kg of aqueous extract of *Rhamnus alaternus*.

The measurements of renal function parameters revealed decreases of 52.68%, 44.29% and 30.51% in urea, creatinine and uric acid,

respectively. The evaluation of the effect of RME on uric acid is a pioneering study. However, a study by Ouchtati et al. (2019) on the influence of RME on normal and alloxan-induced diabetic rats reported decreases of 35.42% and 40.33% in urea and creatinine levels after administration of RME to rats that had been made diabetic.

This recovery of antioxidant enzyme activities observed in the present work is in line with the findings reported by Benzaid et al. (2021). As previously shown by Benzaid et al. (2021), hydroalcoholic extracts of *Rhamnus alaternus* were able to counteract the enhancement of the redox imbalance observed and to confer hepatoprotection in an $AlCl_3$, toxicity model. Similarly, Chatti et al. (2024) Flavonoid-rich extracts lead to a lower production of $TNF-\alpha$ and MDA. Furthermore, *in vivo* and *in vitro* studies by Hu et al. (2023) confirmed that metabolites derived from astragaloside IV suppressed the expression of the CDC42 gene and the colony-stimulating factor receptor (CSF1R) and inhibited the proliferation, migration of microglial/macrophage cells, and secretion of perihematomal $TNF-\alpha$ by microglia after intracerebral hemorrhage. Finally, this study is the first to check the impact of *Rhamnus alaternus* extract on PGE_2 in diabetic situation. However, a study of the anti-inflammatory and healing activity of the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* bark conducted by Ait atmane et al. (2025) on mice showed a significant dose-dependent reduction in oedema, considered indicative of anti-inflammatory effect.

The data is also supported by histopathological evidence, which revealed that hepatic, renal, and pancreatic tissues are greatly protected from alloxan-induced oxidative injury. To our knowledge, this is the first study to show hepatoprotective and nephroprotective effects of

methanolic *Rhamnus alaternus* leaf extract at the histopathological level in an alloxan-induced diabetic model. The observations tend to agree with that reported by Benzaid et al. (2021) of near total reversal of the hepatic architecture after treatment with aqueous extracts of *corchorus olitorius* in an $AlCl_3$ induced hepatotoxicity.

The renal dysfunction seen in alloxan induced diabetic rats correlates with the well-documented vulnerability of renal tissues to hyperglycemia-associated oxidative damage. Chronic high-level blood glucose induces more production of ROS, leading to surpass endogenous antioxidant defense, thereby initiating oxidative injury to renal macromolecules. Glomeruli, in particular, are especially sensitive to oxidative injury because of their densely packed capillary network coupled with an extremely high metabolic activity.

Damage to glomerular endothelial cells and mesangial cells mediated by oxidative stress causes an increase in membrane permeability and impairment of glomerular filtration, resulting in the recycling of nitrogenous waste products such as urea, uric acid, and creatinine in the circulation. Moreover, oxidative stress-induced lipid peroxidation and protein oxidation lead to structural disorganization of the glomerular basement membrane, which in turn aggravates the ongoing renal dysfunction during diabetes.

Rhamnus alaternus methanolic extract treatment significantly ameliorated biochemical renal markers, through-presumably-reducing kidney oxidative damage. The nephroprotective effect might be mainly linked to the high concentrations of flavonoids and phenolic acids that are present in the extract, that are well demonstrated by their high free radical scavenging and metal-chelating capacity. Through inhibitory effects on ROS accumulation, these bioactive compounds presumably contribute to preserving glomerular integrity and maintaining normal filtration processes.

In addition, flavonoids including quercetin, rutin, and kaempferol have also been shown to modulate inflammatory signaling pathways as well as the apoptosis of renal epithelial cells induced by oxidative stress. Their presence in the extract could thus contribute to the reduction of renal biomarkers via limiting both oxidative and inflammatory insults to the glomeruli and renal tubules.

All together, these ameliorations of renal function parameters in treated diabetic rats are consistent with the idea of a protective effect of RME on kidney tissues either towards a direct antioxidant effect and/or a cytoprotective effect. The dual action may be important to inhibit the progression of nephropathy associated with diabetes while protecting the renal homeostasis during hyperglycemia.

The RME extract's elevated phenolic and flavonoid levels, along with its DPPH radical scavenging ability, suggest significant antioxidant activity that may mitigate oxidative stress-related damage. This impact is additionally corroborated by the decrease in malondialdehyde (MDA) levels and the enhancement of antioxidant enzyme activity in treated diabetic animals. Prior studies elaborated by Yan et al. (2024) have demonstrated that the generation of reactive oxygen species can be diminished by modulating mitochondrial enzymes, including succinate dehydrogenase. The antioxidant capacity of *Rhamnus alaternus* may be linked to the modulation of mitochondrial oxidative pathways, potentially enhancing its protective and antidiabetic properties.

The molecular docking analysis offers an additional mechanistic explanation for the biological activities observed. The most abundant flavonoids in the methanolic extract, including rutin, quercetin, kaempferol, and chrysin, bound strongly to key molecular targets related to glucose regulation and diabetes progression, e.g. α -glucosidase, DPP-IV, glucokinase, and PPAR γ . Of these compounds, rutin showed the best multitarget interaction profile by making strong hydrogen bonds and hydrophobic interactions in the active sites of the enzymes.

Such *in silico* results indicate that the antidiabetic effectiveness of *Rhamnus alaternus* extract is manifested not only through its antioxidant and anti-inflammatory activities, but also through the direct modification of carbohydrate digesting, insulin signaling, and glucose

homeostasis enzymes. Analogous to astragalus polysaccharides, which exhibit antidiabetic properties via various mechanisms such as antioxidant activity, enzyme modulation or modulation of gut microbiota and intestinal barrier integrity (Chen et al., 2022; Su et al., 2023) and cyanoglycosides from *Moringa oleifera*, which modulate metabolic and fibrotic pathways to protect renal function in diabetic models (Ge et al., 2026), the flavonoids found in *Rhamnus alaternus* show significant multitarget binding in molecular docking analyses, underscoring their prospective function in glycemic regulation, the improvement of antioxidant status, biochemical parameters and organ preservation in diabetic rats. The integration of molecular docking with *in vivo*, biochemical, and histopathological data provides strong support for a dual mechanism of action involving redox regulation and metabolic enzyme inhibition.

Collectively, the current study shows that the RME has several synergistic effects that potentiate its strong antioxidant, anti-inflammatory and antidiabetic properties. The combined results obtained from the phytochemical, molecular docking, biochemical and histological studies suggest a firm scientific basis for the possible antidiabetic and antidiabetic complications effect of this species in the management of DM and its complications. Future research may evaluate long-term efficacy and safety, utilizing modern diagnostic instruments, such as Dual Branch Attention Network (DBAN) model (Chen et al., 2024) in conjunction with serum Raman spectroscopy, to assess renal protection and establish a mechanistic connection between bioactive component content and treatment results.

5. Conclusions

This work provides promising quantitative data demonstrating the antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory and organ-protective potential of the RME. Phytochemical characterization revealed a considerable enrichment of bioactive compounds particularly with phenolic compounds and flavonoids, reflected by considerable *in vitro* antioxidant activity.

In vivo, alloxan administration resulted in considerable metabolic and organ impairment, characterized by hyperglycemia, lipid irregularities, and hepatic and renal failure. The administration of RME mitigated these anomalies, enhancing metabolic balance, hepatic and renal function, along with natural antioxidant defenses. Moreover, inflammatory markers were markedly diminished, and histological analyses validated the maintenance and regeneration of hepatic, pancreatic, and renal tissues.

Molecular docking investigations indicated that the principal flavonoids in the extract may interact with multiple critical antidiabetic targets, suggesting a multi-target mechanism of action.

These results indicate that the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* is a promising natural medicine for the prevention and control of diabetes mellitus and its consequences, owing to its synergistic antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme-regulating properties.

CRedit authorship contribution statement

Anissa Imene Reffas: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Mokhtaria Yasmına Boufadi:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. **Faiza Moulai-Hacene:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Formal analysis. **Soumia Keddari:** Writing – original draft, Visualization, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Souheyla Mekraf:** Writing – original draft, Visualization, Validation, Resources, Investigation, Formal analysis. **Abdenacer Tou:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Abbassia Demmouche:** Writing – review & editing, Software, Resources, Formal analysis. **Hamza Moussa:** Writing – review &

editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Software. **Noureddine Nasrallah:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Walid Elfalleh:** Writing – review & editing, Supervision, Software, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Hamdi Bendif:** Writing – review & editing, Software, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Mohamed A.M. Ali:** Writing – review & editing, Software, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Shakilur Rahman:** Writing – review & editing, Software, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Jie Zhang:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Funding acquisition. **Abdeltif Amrane:** Writing – review & editing, Supervision, Software, Resources, Project administration. **Hichem Tahraoui:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Software.

Data availability statement

The original contributions presented in this study are included in the

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript.

DOAJ	Directory of open access journals
TLA	Three letter acronym
LD	Linear dichroism
RME	Methanolic extract of <i>Rhamnus alaternus</i> leaves
HPLC/UV	High-performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection
DM	Diabetes mellitus
ROS	Reactive oxygen species
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase
ALP	Alkaline phosphatase
γ-GT	Gamma-glutamyl transferase
MDA	Malondialdehyde
SOD	Superoxide dismutase
CAT	Catalase
GSH-PX	Glutathione peroxidase
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
PGE2	Prostaglandin E2
NLT	Normal liver tissue
SMN	Micronodular steatosis
ACE	Starry-sky appearance
Cong V	Vascular congestion
SCL	Centrilobular steatosis
NPT	Normal pancreatic tissue
II	Inflammatory infiltrate
GLC	Cystic lymph node
Nec a	Atrophic necrosis
AII	Absence of inflammatory infiltrate
Pan N	Normal pancreas.
NNT	Normal nephric tissue
RN	Normal kidney
AlCl3	Aluminum chloride

article. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Finding statement

This work was supported and funded by the Deanship of Scientific Research at Imam Mohammad Ibn Saud Islamic University (IMSIU) (grant number IMSIU-DDRSP2601).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The author is an Editorial Board Member/Editor-in-Chief/Associate Editor/Guest Editor for this journal and was not involved in the editorial review or the decision to publish this article.

Data availability

Data will be made available on request.

References

Abdel Azeem, H. H., Mansour, H. E. A., Mahfouz, M. M., et al. (2025). Antioxidant and antiapoptotic impacts of the land snail *Helix aspersa* extracts on aged male rats, *Rattus norvegicus*. *Journal of Biological Analysis*, 86. Article 31.

Aebi, H. (1974). Catalase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (pp. 673–680). Verlag Chemie/Academic Press.

Ait Atmane, S., Tacherfiout, M., Tighilet, K., et al. (2025). Pharmacological potentials of *Rhamnus alaternus* L. stem bark extract in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 351, Article 120076.

Amtaghri, S., Farid, O., Lahrach, N., et al. (2022). Antihyperglycemic effect of *Rhamnus alaternus* L. aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular & Haematological Disorders - Drug Targets*, 22(4), 245–255.

Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 655–665.

- Ashok Kumar, B. S., Lakshman, K., Jayavee, K. N., et al. (2012). Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(1–2), 75–79.
- Assadi, S., Shafiee, M., Erfani, M., & Akmal, M. (2021). Antioxidative and antidiabetic effects of *Capparis spinosa* fruit extract on type 2 diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, Article 111391.
- Bashary, A., Vyas, M., Nayak, S. K., et al. (2020). An insight of alpha-amylase inhibitors as a valuable tool in the management of type 2 diabetes mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 16, 117–136.
- Belew, A. A., Hanan, G. G. M. W., Meshesha, D. S., et al. (2025). Evaluation of total phenolic, flavonoid contents, antioxidant and antibacterial activity of leaf extracts from *Rhus vulgaris*. *Discover Plants*, 2, Article 141.
- Ben Ammar, R., Neffati, A., Skandrani, I., et al. (2011). Anti-lipid peroxidation and induction of apoptosis in the erythroleukaemic cell line K562 by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Natural Product Research*, 25(11), 1047–1058.
- Benchiha, W., Mahroug, S., Aoued, L., & Bouterfas, K. (2017). Activité antihépatotoxique des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). *Phytothérapie*, 15, 10–15.
- Benzaid, C., Tichati, L., Trea, F., et al. (2021). *Rhamnus alaternus* aqueous extract enhances the capacity of system redox defence and protects hepatocytes against aluminum chloride toxicity. *Clinical Phytoscience*, 7, Article 67.
- Bhouiri, W., Sghaier, M. B., Kilani, S., et al. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1167–1173.
- Bilal, H. M., Sharif, A., Malik, M. N. H., & Zubair, H. M. (2022). Aqueous ethanolic extract of *Adiantum incisum* Forssk. protects against type 2 DM. *ACS Omega*, 7, 37724–37735.
- Boufadi, M. Y., Keddari, S., Moulai-Hacene, F., & Chaa, S. (2021). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Salvia officinalis* extract from Algeria. *Pharmacognosy Journal*, 13(2), 506–515.
- Boufadi, Y. M., Van Antwerpen, P., Chikh Alard, I., et al. (2017). Antioxidant effects and bioavailability evaluation of propolis extract and its content of pure polyphenols. *Journal of Food Biochemistry*, Article e12434.
- Bouhazama, H., Lamchouri, F., & Toufik, H. (2024). Phytochemical investigation and quantification of bioactive compounds of *Rhamnus alaternus* L. *Tropical Journal of Drug Research*, 1(1), 19–29.
- Boussahel, S., Speciale, A., Dahamna, S., et al. (2015). Flavonoid profile, antioxidant and cytotoxic activity of different extracts from Algerian *Rhamnus alaternus* L. bark. *Pharmacognosy Magazine*, 11(Suppl. 1), S102–S109.
- Chatti, I. B., Krichen, Y., Horchani, M., et al. (2024). Anthraquinones from *Rhamnus alaternus* L.: A phytocosmetic ingredient with photoprotective properties. *Chemistry and Biodiversity*, 21(1), Article e202300876.
- Chen, X., Chen, C., & Fu, X. (2022). Hypoglycemic effect of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus* on type 2 diabetic mice based on the "gut microbiota-mucosal barrier". *Food & Function*, 13(19), 10121–10133. <https://doi.org/10.1039/d2fo02300h>
- Chen, X., Chen, C., Tian, X., He, L., Zuo, E., Liu, P., Xue, Y., Yang, J., Chen, C., & Lv, X. (2024). DBAN: An improved dual branch attention network combined with serum Raman spectroscopy for diagnosis of diabetic kidney disease. *Talanta*, 266(Pt 2), Article 125052. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125052>
- Cho, N. H., Shaw, J. E., & Karuranga, S. (2018). IDF diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138, 271–281.
- Chokri, S., Ben Yunes, S., Ellafi, A., et al. (2024). Exploring *Rhamnus alaternus* polysaccharides: Extraction, characterization, and analysis of antioxidant properties. *Polymers*, 16(22), Article 3180.
- Dirir, A. M., Daou, M., Yousef, A. F., & Yousef, L. F. (2023). A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*, 21, 1049–1079.
- Drury, R. A., & Wallington, E. A. (1980). *Carleton's histological technique* (5th ed.). Oxford University Press.
- Elstner, E. F., Youngman, R. J., & Öbwald, W. (1983). Superoxide dismutase. In *Methods of enzymatic analysis* (3rd ed., pp. 293–302). Verlag Chemie.
- Gadouch, L., Zerrouki, K., Zidane, A., et al. (2022). Genoprotective, antimutagenic, and antioxidant effects of methanolic leaf extract of *Rhamnus alaternus* L. *Foods and Raw Materials*, 10(2), 196–205.
- Ge, C., Shi, Z., He, J., Feng, X., Shang, K., Liao, X., Liu, Y., Jiang, Y., & Liu, S. (2026). Cyanoglycosides isolated from *Moringa oleifera* seeds inhibited PFKFB3/TGF- β 1/smads pathway to alleviate diabetic nephropathy through driving metabolic reprogramming. *Pharmaceutical Biology*, 64(1), 130–142. <https://doi.org/10.1080/13880209.2025.2607563>
- Gómez-Jiménez, V., Burggraaf-Sánchez de las Matas, R., & Ortega, Á. L. (2025). Modulation of oxidative stress in diabetic retinopathy. *Antioxidants*, 14(7), Article 875.
- Gomall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751–766.
- Hamza, N., Berke, B., Umar, A., et al. (2019). A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 238, Article 111841.
- Hou, J., Gong, H., Gong, Z., Tan, X., Qin, X., Nie, J., Zhu, H., & Zhong, S. (2024). Structural characterization and anti-inflammatory activities of a purified polysaccharide from fruits remnants of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt. et Smith. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267(Pt 2), Article 131534. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131534>
- Hu, E., Li, Z., Li, T., Yang, X., Ding, R., Jiang, H., ... Wang, Y. (2023). A novel microbial and hepatic biotransformation-integrated network pharmacology strategy explores the therapeutic mechanisms of bioactive herbal products in neurological diseases: The effects of Astragaloside IV on intracerebral hemorrhage as an example. *Chinese Medicine*, 18(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13020-023-00745-5>
- IDF. (2017). *International diabetes Federation. Diabetes Atlas* (8th ed.). International Diabetes Federation.
- Ighodaro, O. M., Adeosun, A. M., & Akinloye, O. A. (2017). Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds. *Medicina*, 53, Article 365.
- Iqbal, R., Iqbal, A., Iqbal, M. N., et al. (2023). Chemical characterization, antioxidant and antidiabetic activities of a novel polyherbal formulation. *Heliyon*, 9, Article e19292.
- Kajimoto, Y., & Kaneto, H. (2004). Role of oxidative stress in pancreatic β -cell dysfunction. In *Mitochondrial pathogenesis* (pp. 168–176). Springer.
- Kanwugu, O. N., Glukhareva, T. V., Danilova, I. G., et al. (2022). Natural antioxidants in diabetes treatment and management: Prospects of astaxanthin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62, 5005–5028.
- Kaur, N., Kumar, V., Nayak, S. K., et al. (2021). Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus. *Chemical Biology & Drug Design*, 98, 539–560.
- Kebiche, M. (2009). *Biochemical activity of flavonoid extracts of Ranunculus repens L. (Doctoral thesis)*. Mentouri Constantine University.
- Kherbachi, S., Kheniche, M., & Tacherfiout, M. (2022). Antihemolytic activity of hydroalcoholic leaves and bark extracts from *Rhamnus alaternus*. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 2(2), 210–219.
- Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., et al. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*. *Food Chemistry*, 136(2), 335–341.
- Liao, W., Li, Y., Liu, J., et al. (2024). Homotherapy for heteropathy: Therapeutic effect of butein in NLRP3 driven diseases. *Cell Communication and Signaling*, 22, Article 315.
- Lück, H. (1965). Catalase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (pp. 885–894). Academic Press.
- Majidinia, M., Bishayee, A., & Yousefi, B. (2019). Polyphenols: Major regulators of key components of DNA damage response in cancer. *DNA Repair*, 82, Article 102679.
- Martin-Carro, B., Donate-Correa, J., Fernández-Villabrille, S., et al. (2023). Experimental models to study diabetes mellitus and its complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), Article 10309.
- Matoori, S. (2022). Diabetes and its complications. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 5, 513–515.
- Matough, F. A., Budin, S. B., Hamid, Z. A., et al. (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Medical Journal*, 12, 5–18.
- Mohora, M., Greabu, M., Muscule, C., et al. (2007). The sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications. *Romanian Journal of Biophysics*, 17, 63–84.
- Moussa, H., Dahmoune, F., Tahraoui, H., Mróz, M., Hamid, S., Lekmine, S., Benslama, O., Touzout, N., Kuszneriewicz, B., Kadri, N., Remini, H., Elfalleh, W., Bendif, H., Boufahja, F., Ibrahim, N. A., & Amrane, A. (2025). UHPLC-HRMS profiling and in silico analysis of *Carthamus caeruleus* L. phenolics for wound healing. *Food Bioscience*, 63, Article 107219. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107219>
- Nekkaa, A., Benaisa, F., Mutelet, B., & Canabady-Rochelle, L. (2021). *Rhamnus alaternus* plant: Extraction of bioactive fractions and evaluation of properties. *Antioxidants*, 10, Article 300.
- Okur, M. E., Özbek, H., Polat, D. Ç., et al. (2018). Hypoglycemic activity of *Capparis ovata* Desf. methanol extract. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, Article e18031.
- Ouchtati, S., Seridi, R., & El-Shora, H. M. (2019). Influence of *Rhamnus alaternus* L. leaf extract on normal and alloxan-induced diabetic rats. *Bioscience Research*, 16(2), 2009–2016.
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–169.
- Perron, N. R., Hodges, J. N., Jenkins, M., & Brumaghim, J. L. (2008). Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorganic Chemistry*, 47(14), 6153–6161.
- Piao, S., Liu, Q., Chen, A., et al. (2019). Plant phenology and global climate change: Current progresses and challenges. *Global Change Biology*, 25(6), 1922–1940.
- Rocchetti, G., Blasi, F., Montesano, D., et al. (2019). Impact of extraction methods on the untreated phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. *Food Research International*, 115, 319–327.
- Rohilla, A., & Ali, S. (2012). Alloxan induced diabetes: Mechanisms and effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(2), 819–823.
- Silva, J. P., Gomes, C., & Coutinho, O. P. (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601(1–3), 50–60.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Su, M., Tang, T., Tang, W., Long, Y., Wang, L., & Liu, M. (2023). Astragalus improves intestinal barrier function and immunity by acting on intestinal microbiota to treat T2DM: A research review. *Frontiers in Immunology*, 14, Article 1243834. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1243834>
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50, 537–546.
- Tacherfiout, M., Petrov, P. D., Mattonai, M., et al. (2018). Antihyperlipidemic effect of a *Rhamnus alaternus* leaf extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 501–509.
- Tang, L., Wang, Y., Gong, X., Xiang, J., Zhang, Y., Xiang, Q., & Li, J. (2023). Integrated transcriptome and metabolome analysis to investigate the mechanism of intranasal insulin treatment in a rat model of vascular dementia. *Frontiers in Pharmacology*, 14, Article 1182803. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1182803>

- Tiwari, P. (2015). Recent trends in therapeutic approaches for diabetes management. *Journal of Diabetes Research*, Article 340838.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., et al. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645–651.
- Verma, S., Gupta, M., Popli, H., & Aggarwal, G. (2018). Diabetes mellitus treatment using herbal drugs. *International Journal of Phytomedicine*, 10. Article 1.
- Wang, X., Chen, X., Tang, Y., Wu, J., Qin, D., Yu, L., ... Wu, A. (2022). The therapeutic potential of plant polysaccharides in metabolic diseases. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1329. <https://doi.org/10.3390/ph15111329>
- Wang, X., Kang, J., Liu, Q., et al. (2020). Fighting diabetes mellitus: Pharmacological and non-pharmacological approaches. *Current Pharmaceutical Design*, 26, 4992–5001.
- Wang, J., Liu, K., Li, X., et al. (2017). Variation of active constituents and antioxidant activity in *Scabiosa tschiliensis*. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2288–2295.
- Willcox, M. L., Elugbaju, C., Al-Anbaki, M., et al. (2021). Effectiveness of medicinal plants for glycaemic control in type 2 diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 12, Article 777561.
- Wu, J., Yue, X., Wang, T., Zhang, Y., Jin, Y., ... Li, G. (2025). A cost-effective and sensitive voltammetric sensor for determination of baicalein in herbal medicine based on shuttle-shape α -Fe₂O₃ nanoparticle decorated multi-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 717, Article 136850. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.136850>
- Yagi, K. (1976a). Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15(2), 212–216.
- Yagi, K. (1976b). Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma (référence doublée dans la liste source). *Biochemical Medicine*, 15, 212–216.
- Yahyaoui, M., Bouajila, J., Cazaux, S., & Abderrabba, M. (2018). The impact of regional locality on chemical composition of *Thymelaea hirsuta* L. *Phytomedicine*, 41, 13–23.
- Yahyaoui, M., Ghazouani, N., Sifaoui, I., & Abderrabba, M. (2017). Comparison of extraction methods on phytochemical composition of *Thymelaea hirsuta* L. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 14(3), 997–1007.
- Yan, Z., Yu, B., Lan, X., Cui, X., Zhao, D., Qiu, L., ... Li, K. (2024). Synthesis, bioactivity evaluation and theoretical study of nicotinamide derivatives containing diphenyl ether fragments as potential succinate dehydrogenase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1308, Article 138331. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138331>
- Zeouk, I., & Bekhti, K. (2020). A critical overview of the traditional, phytochemical and pharmacological aspects of *Rhamnus alaternus*. *Advances in Traditional Medicine*, 20, 1–11.