

BC 03/06

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE JLJEL

Faculté de Science
Département de Biochimie et Microbiologie
Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme des études
universitaires supérieures en biologie

Option : Biochimie

Thème

Etude de l'effet antioxydant des
polyphénols dans le cas d'une toxicité
pancréatique induite par l'alloxane chez les
rats Albinos souche Wistar

Membre de jury :

Président : GHORAB Ismaïel

Examineur : LAHOUEL Mesbah.

Promoteur : KEBIECHE Mohammed.

Réalisé par :

- ❖ KHELALF Lamia.
- ❖ HIMROUCHE Yasmîna
- ❖ DEBIECHE Dalila.

Promotion : 2006

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu dieu de nous avoir donné la force et éclairé le chemin pour la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions vivement notre encadreur monsieur : **KEBIECHE MOHAMMED** qui nous a proposé ce sujet de recherche, et qui nous a encadré par ses conseils judicieux, ses encouragements et sa totale disponibilité.

Nos remerciements vont aux membres du jury pour nous avoir honoré en acceptant de juger notre travail.

Nos remerciements vont aussi aux étudiants de post graduation (phytopharmacologie et chimie) : **WIDADE, HASSIBA, et TARAK.**

Nous voudrions exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude aux personnels des laboratoires de biologie et surtout. **Mme HOURIA, SOUMIA et ZIAD.**

Nous remercions vivement tous les enseignants qui ont participé à notre formation.

Sommaire

Partie A : Etude bibliographique.

Introduction générale:.....	01
-----------------------------	----

Chapitre I : Généralités.

I.1. <i>Ranunculus repens</i> L.....	03
I.1.1. Définition.....	03
I.1.2. Systématique de RRL.....	03
I.1.3. Propriétés.....	03
I.1.4. Répartition.....	03
I.1.5. Biologie.....	03
I.2. Les polyphénols.....	04
I.2.1. Les flavonoides.....	04
I.2.1.1. Définition.....	04
I.2.1.2. Structure.....	04
I.2.1.3. Classification des flavonoides.....	05
I.2.1.4. L'activité pharmacologique des flavonoides.....	05
1. L'activité antioxydante.....	05
2. L'activité antidiabétique.....	05
3. Autres activités.....	05
I.2.2. Les tannins.....	05
I.2.3. Les acides phénoliques.....	06

Chapitre II : La toxicité pancréatique.

II.1. Le pancréas.....	07
II.1.1. Définition.....	07
II.1.2. La physiologie pancréatique.....	07
II.1.3. Les îlots de langerhans et la production de l'insuline.....	07
II.2. La pancratotoxicité à l'Alloxane.....	08
II.2.1. Définition de l'Alloxane.....	08
II.2.2. Action d'Alloxane sur les cellules pancréatiques.....	09
II.3. Le diabète.....	09
II.3.1. Définition.....	09
II.3.2. Diagnostic.....	09
II.3.3. Les symptômes du diabète.....	10
II.3.4. Types de diabète :.....	10
• Diabète DID.....	10

• Diabète NID.....	10.
II.4.L'hyperglycémie.....	10
II.4.1.Définition.....	10
II.4.2.La cause de l'hyperglycémie.....	11
II.4.3.Le rôle délétère de l'hyperglycémie sur la sécrétion endocrine.....	11
Chapitre III : Stress oxydatif et radicaux libres.	
III.1.Stress oxydatif.....	12
III.1.1.Définition.....	12
III.1.2.L'origine de stress oxydatif.....	12
III.2.Les radicaux libres.....	12
III.2.1.Définition d'un radical libre.....	12
III.2.2.Définition d'un dérivé réactif de l'oxygène.....	12
III.2.3. Les sources des radicaux libres.....	12
III.2.3.1. La respiration mitochondriale.....	13
III.2.3.2.L'inflammation.....	13
III.2.3.3. Le mécanisme d'un cycle redox.....	13
III.2.3.4. Les métaux toxiques.....	13
III.2.3.5. Les particules inhalées.....	13
III.2.3.6. Les rayonnements.....	14
III.2.4. Les différents radicaux libres de la biologie.....	14
III.2.5. Le rôle des radicaux libres.....	16
III.2.6. Les antioxydants.....	16
III.2.6.1. Les enzymes de protection.....	16
• Les superoxydes dismutase.....	16
• Les glutathion peroxydase.....	17
• Héme oxygénase.....	17
• Les protéines de stress thermique.....	17
III.2.6.2. Molécules antioxydants de petite taille.....	17
• Les caroténoïdes.....	17
• Le coenzyme Q 10.....	17
• Les oligo-éléments.....	18
• Les protéines transporteuses de fer et de cuivre.....	18

Chapitre IV : Le stress oxydatif et la destruction des biomolécules.

IV.1. L'oxydation des protéines.....	19
IV.2. L'oxydation de l'ADN.....	19
IV.3. La peroxydation lipidique.....	19
IV.3.1. Définition.....	19
IV.3.2. Marqueurs de la peroxydation lipidique.....	20
IV.3.3. MDA.....	20

Partie B : Etude pratique.**Chapitre V : Matériel et méthode.**

V.1. Matériels.....	22
V.1.1. Les animaux.....	22
V.1.2. La plante.....	22
V.2. Méthodes.....	22
V.2.1. L'extraction des polyphénols.....	22
V.2.2. Préparation de la solution administrée.....	25
V.2.2.1. Solution polyphénolique.....	25
V.2.2.2. Solution d'Alxane.....	26
V.3. Voies d'administration des différentes solutions.....	26
V.3.1. Gavage gastrique.....	26
V.3.2. Par voie TP.....	27
V.4. Traitement des animaux.....	28
V.5. Prélèvement des échantillons.....	28
V.5.1. Prélèvement de sang.....	28
V.5.2. Prélèvement de pancréas.....	29
A. Anesthésie.....	29
B. Dissection.....	29
C. Prélèvement du pancréas.....	30
V.6. Etude de la toxicité pancréatique.....	30
V.6.1. Mesure de l'effet scavenger ou piègeur de l'extrait polyphénolique.....	30
V.6.2. Dosage du MDA.....	31
V.6.3. Dosage de l'activité enzymatique de catalase.....	32
V.6.4. Dosage du glutathion.....	33
V.6.5. Dosage de la glycémie.....	34

Chapitre VI : Résultats et interprétation.

VI. Courbes de changement de paramètres... 36
VI.1. Evaluation de l'effet scavenger.....38
VI.2. Evaluation de la glycémie.....38

VI.3. Evaluation de MDA.....39
VI.4. Evaluation de glutathion.....41
VI.5. Evaluation de l'activité enzymatique de catalase.....44

Chapitre VII : Discussion.....46

Chapitre VIII : Conclusion.....49

Références.....50

Liste des figures:

- Fig.01. La plante <i>Ranunculus repens</i> L.....	03
- Fig.02. Structure de base des flavonoides.....	04
- Fig.03. Métabolisme de la cellule β	08
- Fig.04. Structure développée de l'Alloxane	08
- Fig.05. L'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	15
- Fig.06. Peroxydation lipidique: voie de synthèse du Malon dialdéhyde à partir des acides gras.....	21
- Fig.07. Etapes d'extraction des polyphénols.....	24
- Fig.08. Méthode d'administration par gavage gastrique.....	27
- Fig.09. Méthode d'administration en IP.....	27
- Fig.10 Méthode d'administration de prélèvement du sang.....	29
- Fig.11. Dessection de rat.....	29
- Fig.12. Méthode de préparation de l'homogénats	30
- Fig.13. Evaluation de taux de la glycémie chez les différents lots.....	37
- Fig.14. Courbe d'etalonage de MDA.....	38
- Fig.15. Evaluation de taux de MDA chez les différents lots.....	39
- Fig.16. Courbe d'etalonage de GSH.....	40
- Fig.17. Evaluation de taux du GSH chez les différents lots.....	41
- Fig.18. Evaluation de taux du catalase chez les différents lots.....	43

Liste des tableaux:

– Tab.01. Distribution et traitement des rats.....	28
– Tab.02. Etape de la réalisation de dosage du MDA.....	32
– Tab.03. Etape d'évaluation de l'activité enzymatique du catalase.....	33
– Tab.04. Etape d'évaluation du glutathion	34
– Tab.05. Protocole de dosage de la glycémie.....	35
– Tab.06. Les mesure de la DO obtenues dans l'évaluation de l'effet scavanger de l'extraction polyphénolique dans le cas de DPPH.....	36
– Tab.07. Dosage de la glycémie chez les différents lots.....	36
– Tab.08. Evaluation de taux du MDA.....	38
– Tab.09. Evaluation de taux de la glycémie	40
– Tab.10. Resultats d'évaluation de l'activité enzymatique du catalase.....	42

Introduction

INTRODUCTION

Depuis long temps, l'homme exploite les ressources naturelles, que ce soient minérales, animales ou encore végétales. En effet, les végétaux ayant un intérêt grandiose dans la vie de l'humanité, constituent l'apport le plus important en ressourcement tant alimentaire qu'en pharmaceutique dans le quotidien de l'homme.

Un fait, bien connu, est l'utilisation très ancienne des substances naturelles des végétaux dans l'industrie, l'alimentation, la cosmétologie... etc. c'est ainsi, que les premières utilisations des plantes, comme remèdes naturels ou poisons toxiques ont été pratiquées par les médecins grecs (*Hepocrate, Aristote...*). C'est grâce, à leurs recherches, qu'on a réussi à préserver la phytothérapie.

Actuellement, les substances naturelles végétales constituent la source principale, qui représentent près de 60% des médicaments dont nous disposons et les 40% restants pour les médicaments de synthèse, sont souvent nés de modifications chimiques des molécules ou partie de molécules naturelles. Ce qui fait que la phytothérapie a été abandonnée au profit de cette synthèse chimique de ces médicaments. La liste des plantes entrant, précisément dans ce cadre est exhaustive, et comme ces plantes sont utilisées sous forme de tisanes extraites ou de préparations complexes, néanmoins, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action thérapeutique, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés actifs, tels que les Alcaloïdes et dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés poly phénoliques (1).

Parmi les plantes médicinales largement utilisées dans la tradimédecine, on cite le *Chanomilla*, *Thymus vulgari*, *Quercus robur*, *Ranunculus repens L*qui sont très riches en principes actifs, ce qui permet d'ouvrir des nouveaux horizons dans le domaine de la phytothérapie (2).

Actuellement les essais phytopharmaceutiques dépassent largement la tradimédecine en introduisant les méthodes d'études modernes ayant pour objectifs l'extraction, purification et caractérisation des phytosubstances et leur pharmacologie expérimentale sur les animaux de laboratoire. Ces recherches seraient justifiées par au moins deux raisons, à savoir:

- L'incapacité de certains médicaments de synthèses de guérir quelques maladies telles que, Cancers, Diabète, SIDA, la grippe aviaires..... etc.

- Les effets nocifs de certains médicaments sur les organes non cibles ; l'effet toxique par leurs métabolites, inclus le stress oxydatif, issus de différentes biotransformations, causant en conséquence des effets secondaires très néfastes sur l'organisme.

En effet, le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par la glycation des protéines, l'altération de la structure de l'ADN, la génération des produits de la peroxydation des lipides et des modulations de la transcription de nombreux gènes. Il est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs – peut être de la plupart – des voies pathologiques. Il est particulièrement lié aux développements des maladies coronariennes (M.C), des accidents vasculaires cérébraux (A.V.C.), le diabète, des cancers, la maladie d'Alzheimer(3, 4) et la sénescence cellulaire qui conduit à une insuffisance des organes, tels que, le foie, le pancréas, etc.... Ces maladies sont difficiles à traiter par des médicaments de synthèse, qui se trouvent incapables de lutter contre les radicaux libres dans certaines conditions pathologiques.

A présent, plusieurs équipes de recherches dans le monde entier se penchent sur la problématique du stress oxydatif et la recherche des antioxydants d'origine notamment végétale afin de traiter ou prévenir les maladies sus-citées.

De notre part, nous nous sommes intéressés à rechercher une activité antioxydante dans les polyphénols des plantes en l'occurrence la *Ranunculus repens L.*, en utilisant un modèle expérimental de lésion pancréatique par intoxication diabétogénique à l'Alloxane sur des animaux de laboratoire. Cette étude sera conduite comme suit:

- L'extraction des polyphénols de RRL
- L'induction de la pancréatototoxicité à l'Alloxane.
- L'exploration biochimique de l'effet antioxydant et préventif des extraits polyphénoliques.

Chapitre I: Generalités

I. Généralités :**I.1. *Ranunculus repens* L :****I.1.1. Définition :**

Ranunculus repens, connue en français sous les noms de bassinet d'or, bouton d'or, renoncule scélérate ou mort aux vaches (5).

I.1.2. Systématique de *Ranunculus repens* L :

Les données systématiques de la plante sont les suivantes:

La classe : *Dicotylidones*
Sous classe : *Ranunculoides*
Ordre : *Ranale*
Famille : *Ranunculaceae*
Genre : *Ranunculs*
Espèce : *Ranunculus repens* L (6)



Fig. 1-La plante *Ranunculus repens* L (Dhrousafe)

I.1.3. Propriétés:

20-50 cm de hauteur, fleurs jaunes de 2 à 2,5cm de diamètre, isolées à l'aisselle des feuilles, se reconnaissent facilement par leurs tiges stolonifères qui s'enracinent au nœud (5).

I.1.4. Répartition :

Dans toute la France, mais plus rare dans la méditerranée et la Corse, lieux plus humides, jardins, parcs, prairies, champs, chemins forestiers (7).

I.1.5. Biologie :

Plante envahissante, qui se propage très rapidement grâce à ses stolons notamment dans les jardins et sur les pelouses, le nom scientifique de genre (de latin, grenouille, *Ranunculus*, petite grenouille) évoque son habitat humide, commun avec d'autres espèces (7).

1.2. Les polyphénols:

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature, et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou non d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle,...) (1).

Parmi les polyphénols les plus abondants, on peut citer notamment : Les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques...

1.2.1. Les flavonoïdes:

1.2.1.1. Définition :

Sont les pigments quasiment universels des végétaux presque toujours hydro-solubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et par fois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, flavonols jaunes, des anthocyanosides rouges, bleus ou violets). Tous les flavonoïdes (environ 3000) ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (8).

1.2.1.2. Structure :

Les flavonoïdes comprennent deux noyaux aromatique (A) et (B) et un hétérocycle oxygéné (C) (8).

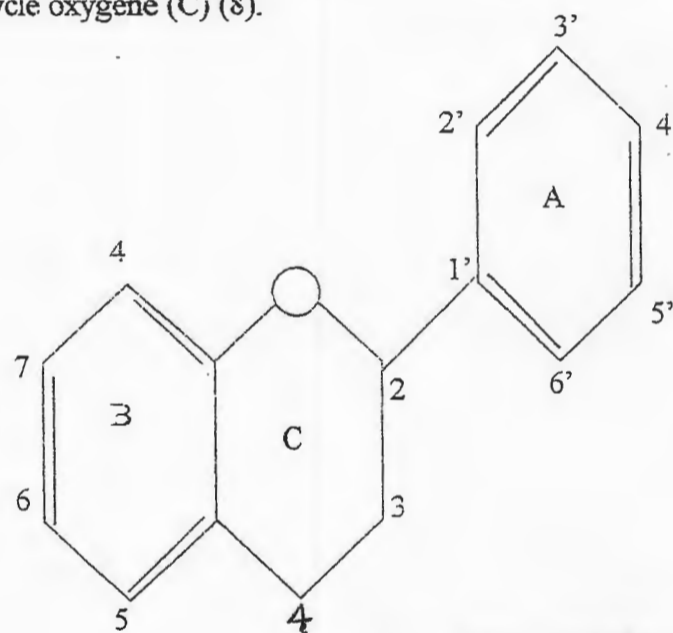


Fig.2. Structure de base des flavonoïdes (8).

1.2.1.3. Classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances très répandues à l'état naturel. Structurellement ils se répartissent en 15 familles de composés, dont les plus importants sont les suivants : -Anthocyanes.-Flavones.-Flavanones.-Flavanes.-Aurones-Chalcones (8).

I.2.1.4. L'activité pharmacologique des flavonoïdes ;

Plusieurs recherches sont effectuées dans le domaine médical concernant leurs activités :

1- L'activité antioxydante :

Les flavonoïdes ont la capacité de capturer les radicaux libres par des dérivés hémi synthétiques, monoalkylés ou polyalkylés de la rutine et de la quercétine, ont permis de déterminer l'élément structural essentiel à la désactivation des radicaux libres (9).

2- L'activité antidiabétique ;

Les flavonoïdes peuvent améliorer la sécrétion de l'insuline et protègent les cellules pancréatiques qui peuvent être endommagées par les radicaux libres (9).

3- Autres activités :

- Activité antitumorale.
- Activités au niveau vasculaire.
- Lutte contre l'altération des fibres collagéniques.
- Activités anti-inflammatoires (9).

I.2.2. Les tannins :

Les tannins sont des molécules polyphénoliques hydro solubles de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da, ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les grains des plantes (10). La plupart des propriétés biologiques des tannins sont liées à leur pouvoir de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines, les liaisons covalentes, hydrogènes et hydrophiles participent à la formation du complexe tannins-protéines (11).

I.2.3. Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont largement distribués dans les fruits (12), les tiges et les feuilles des légumes (13). De plus, le thé et le vin rouge sont riches en ces composés (14), ils sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires, les acides phénoliques sont divisés en 3 classes :

- Les acides phénoliques simples.
- Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.
- Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.

II .La toxicité pancréatique induite à l'Alloxane :

II.1.Le pancréas :

II.1.1. Définition :

Pancréas, glande digestive volumineuse, situé derrière l'estomac, sa longueur varie entre 15 et 20cm, sa largeur est d'environ 3,888cm, et son épaisseur entre 1,3 et 2,5cm, son poids est d'environ 85g (15).

II.1.2 La physiologie pancréatique :

La glande pancréatique est constituée de deux types de tissus responsables de deux fonctions distinctes :

- La sécrétion endocrine (insuline, glucagon) : est assurée par les cellules endocrines, regroupées îlots (îlots de *Langerhans*) parmi au sein des cellules acineuses, elle est importante dans le métabolisme du sucre.

- La sécrétion exocrine : le suc pancréatique, est assurée par les cellules acineuses (petites cavités tapissées de cellules excrétrices dont le contenu se déverse dans un canalicule), elle est acheminée vers l'intestin grêle par le canal excréteur principal (canal de *Wirsung*). Leur composition en enzymes est importante pour faciliter la digestion (16).

II.1.3. Les îlots de Langerhans et production de l'insuline :

L'insuline est produite dans le pancréas par un petit groupe de cellules glandulaires « îlots de Langerhans » ou cellules Bêta (15) dont le mécanisme est illustré dans la figure 3. L'incapacité de ces cellules à produire suffisamment l'insuline, entraîne un diabète. Cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction de la cellule bêta, sous l'effet d'agents diabétogènes, comme l'Alloxane (17,18).

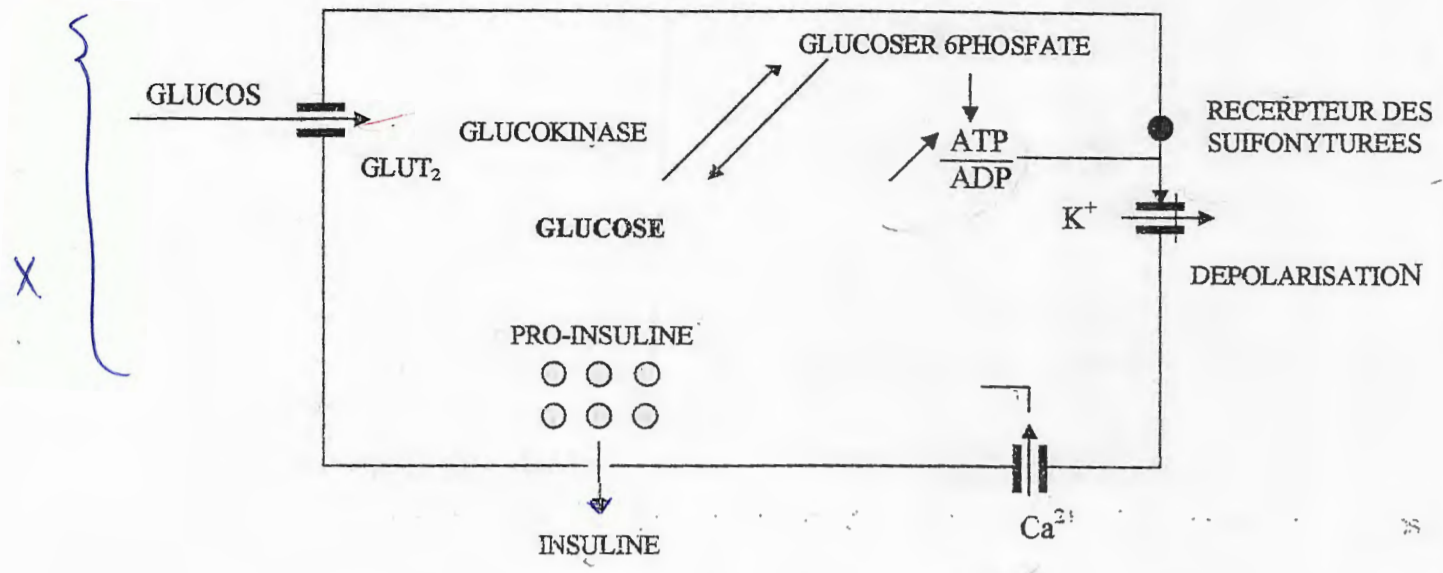


Fig.3. Métabolisme de la cellule β (19).

II.2. La pancréatotoxicité à l'Alloxane :

II.2.1. Définition de l'Alloxane :

L' Alloxane ou la mésoxalylurée est un composé organique basé sur un squelette de l'hétérocyclique de la pyrimidine. Ce composé a une haute affinité pour l'eau et par conséquent existe comme le monohydrate (20).

Les données caractérisant l'Alloxane dans les conditions standard sont comme suit:

Nom chimique : 2, 4, 5,6(1H, 3H)-pyrimidine tetrone monohydrate.

Formule chimique : C₄H₂N₂O₄, avec la structure développée figure 4.

Masse moléculaire : 160,09 g/mol

Point fondant : 253°C (20).

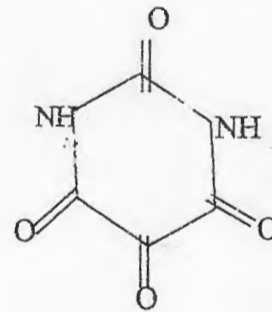


Fig.4. Structure développée de l'Alloxane (20).

II.2.2. Action d'Alloxane sur les cellules pancréatiques :

Les cellules bêta sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif en raison d'une part de leur pauvreté en cu / zn super oxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase. (21.22), d'autre part de leur faible contenu en glutathion réduit (23), cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction de la cellule bêta sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'Alloxane.

L'Alloxane est un agent oxydant fort excentré une activité sur les cellules bêta comme le produit de sa réduction nommé "acide dialurique". L'Alloxane établit un cycle d'oxydoréduction avec formation des radicaux superoxyde, associé à des fortes doses de calcium cytosotique, il provoque la destruction rapide de la cellule bêta (24).

II.3. Le diabète:

II.3.1. Définition :

Le mot diabète signifie « passer à travers », en référence à la forte polyurie qui caractérise la maladie. Le terme de diabète sucré (DS) regroupe tous les états morbides, ayant en commun une hyperglycémie chronique, consécutive à une insuffisance de sécrétion d'insuline par le pancréas (insulinocarence), ou à des anomalies de l'action de cette insuline au niveau des tissus cibles (insulinorésistance) ou le plus souvent à une interaction des deux anomalies (25).

Le diabète est définie par des anomalies métaboliques, par des complications à long terme: oculaire, rénal, nerveux et vasculaires, et par une lésion des membranes basales visibles en microscopie électronique. Les sujets correspondants à ces critères ne constituent pas un groupe homogène, et des syndromes distincts ont été définis (26).

II.3.2. Diagnostic :

Il repose essentiellement sur l'analyse de la glycémie (taux de sucre dans le sang). L'existence d'un diabète est établie lorsque deux mesures de la glycémie réalisée à jeun règlement un taux de sucre supérieur ou égal à 1,26 gramme par litre (g/l). Si la glycémie à jeun est inférieure à ce chiffre, on recourt à l'hyperglycémie expérimentale provoquée par voie orale.

On suppose le diagnostic de diabète si la glycémie reste supérieure à 2 g/l. 2 heures après l'observation du glucose, lors de deux examens réalisés six mois d'intervalle, on peut également faire le dosage de l'insulinémie (taux d'insuline dans le sang)(16).

II.3.3. Les symptômes du diabète :

Les symptômes classiques du diabète sont :

- La polydipsie : (soif intense) qui correspond à la fuite d'urine.
- La polyurie : une émission d'urine fréquente et importante.
- L'asthénie : une fatigue intense.
- Une perte du poids (27).

II.3.4. Types de diabète :

Le Diabète sucré se présente sous deux grandes formes.

◆ Diabète insulino-dépendant (DID)

Apanage de l'enfant et de l'adulte jeune, dû à la destruction des îlots de Langerhans par un processus immunitaire dont la conséquence est une insulino-carance absolue, son traitement relève d'une insulinothérapie substitutive à vie (25).

◆ Diabète non insulino-dépendant (DNID)

Il survient chez l'adulte aux environs de la cinquantaine, sa pathogénie exacte est encore inconnue, son mode d'installation est en générale insidieux, son traitement fait appel à la diététique et aux antidiabétiques oraux (25).

X II.4. L'hyperglycémie :

II.4.1. Définition :

L'augmentation anormale de la glycémie (taux de glucose dans le sang) au dessus de 6,7 millimoles, soit 1,2 g/l (16). L'hyperglycémie est la première phase de la maladie de diabète consiste en une mauvaise efficacité de l'insuline sur la pénétration intracellulaire de glucose, qui s'accumule alors dans le secteur extracellulaire à partir d'un certain niveau, elle provoque une glycosurie (passage du glucose dans les urine) (24).

II.4.2. La cause :

Deux mécanismes essentiels sont en cause :

- 1- L'absence de pénétration du glucose dans les cellules: elle est en rapport avec le manque d'insuline. Les transporteurs de glucose cellulaire (muscles et cellules adipeuses surtout) sont inactivés et les cellules insulino-dépendantes se trouvent dès lors en état de jeûne absolu.
- 2- L'augmentation de la néoglucogenèse et la glycogénolyse massive: Ces phénomènes sont la conséquence de la carence glucidique cellulaire. Le foie fournit une quantité très importante de glucose qui tend à pallier le cas d'utilisation périphérique (28).

II.4.3. Le rôle délétère de l'hyperglycémie sur la sécrétion endocrine

(glucotoxicité) :

Alors que le glucose est le stimulus naturel de l'insulinosécrétion, on sait qu'au contraire, au cours du DNID, l'hyperglycémie bloque l'insulinosécrétion résiduelle. Plusieurs études ont bien montré la récupération fonctionnelle de la cellule bêta en noramidopyrine et au contraire l'aggravation du diabète uniquement du fait de l'hyperglycémie permanente (28).

Chapitre III:

Stress oxydatif et Radicaux libres

III. Stress oxydatif et radicaux libres :

III.1. Le stress oxydatif :

III.1.1. Définition :

Un stress oxydatif se définira comme étant un déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les pro- oxydants (29).

III.1.2. L'origine du stress oxydatif :

Depuis quelque années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant, c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques (30).

III.2. les radicaux libres :

III.2.1 Définition d'un radical libre :

En chimie un radical libre est un atome ou molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que la molécule dont il (elle) issu(e) (31).

Un électron libre est un électron qui occupe à lui tout seul une orbite atomique ou moléculaire, il peut être considéré comme un fragment de molécule. Les premiers radicaux libres organiques furent identifiés par Gomberg en 1900 (15).

III.2.2. Définition d'un dérivé réactif de l'oxygène :

L'appellation dérivée réactifs de l'oxygène n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène, proprement dit (radical super oxyde (O°_2), radical hydroxyle ($^{\circ}OH$)...), mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , Peroxonitrique ($ONOO^-$),...) (32).

III.2.3. Les sources des radicaux libres :

De nombreux facteurs, tels que des perturbations métaboliques, l'inflammation, des agents physiques, des cytokines, la présence d'oxydants exogène, peut conduire à la formation de radicaux libres (31).

III.2.3.1. La respiration mitochondriale :

La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en deux molécules d'eau. Environ 0,4 à 4% de l'oxygène ne seront pas correctement convertis en eau, suite à des fuites électroniques résultant d'imperfection de la chaîne respiratoire mitochondriale par réduction mono électronique. L'oxygène donne naissance à des espèces oxygénées actives (EOA), parmi lesquelles figurent des radicaux libres comme $O_2^{\cdot-}$ et OH^{\cdot} (30).

III.2.3.2. Inflammation :

Les enzymes jouent un rôle essentiel dans la production des radicaux libres telles que:

- NADPH oxydase : activée par les cellules phagocytaires, cette enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire l'anion super oxyde $O_2^{\cdot-}$.
- Les différentes NO synthétases (NOS) capables de produire le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) (30).

III.2.3.3. Le mécanisme d'un cycle redox :

Produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones, ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, de nombreux médicaments, aussi avec des composés endogènes comme les catécholamines (30).

III. 2.3.4. Les métaux toxiques :

Le fer et le cuivre libre génèrent des radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 (réaction de fenton) (30).

III.2.3.5 Les particules inhalées :(amiante, silice) :

Sont des sources de radicaux libres, d'une part par ce qu'elles exacerbent la phagocytose, et d'autre part par ce que leur surface est tapissée de sels et de fer (30).

III.2.3.6. Les rayonnements :

Ce mécanisme génère les radicaux libres comme NO^\bullet , $^1\text{O}_2^\bullet$:

- Les rayons ionisants X, Y : scindent les molécules d'eau.
- Les rayons ultra violets : activent des molécules

photosensibilisations (30).

III.2.4. Les différents radicaux libres de la biologie :

Parmi toutes les espèces susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires. Qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion super oxyde O_2^\bullet et le radical hydroxyle OH^\bullet , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^\bullet (33). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux. (30) (fig.5).

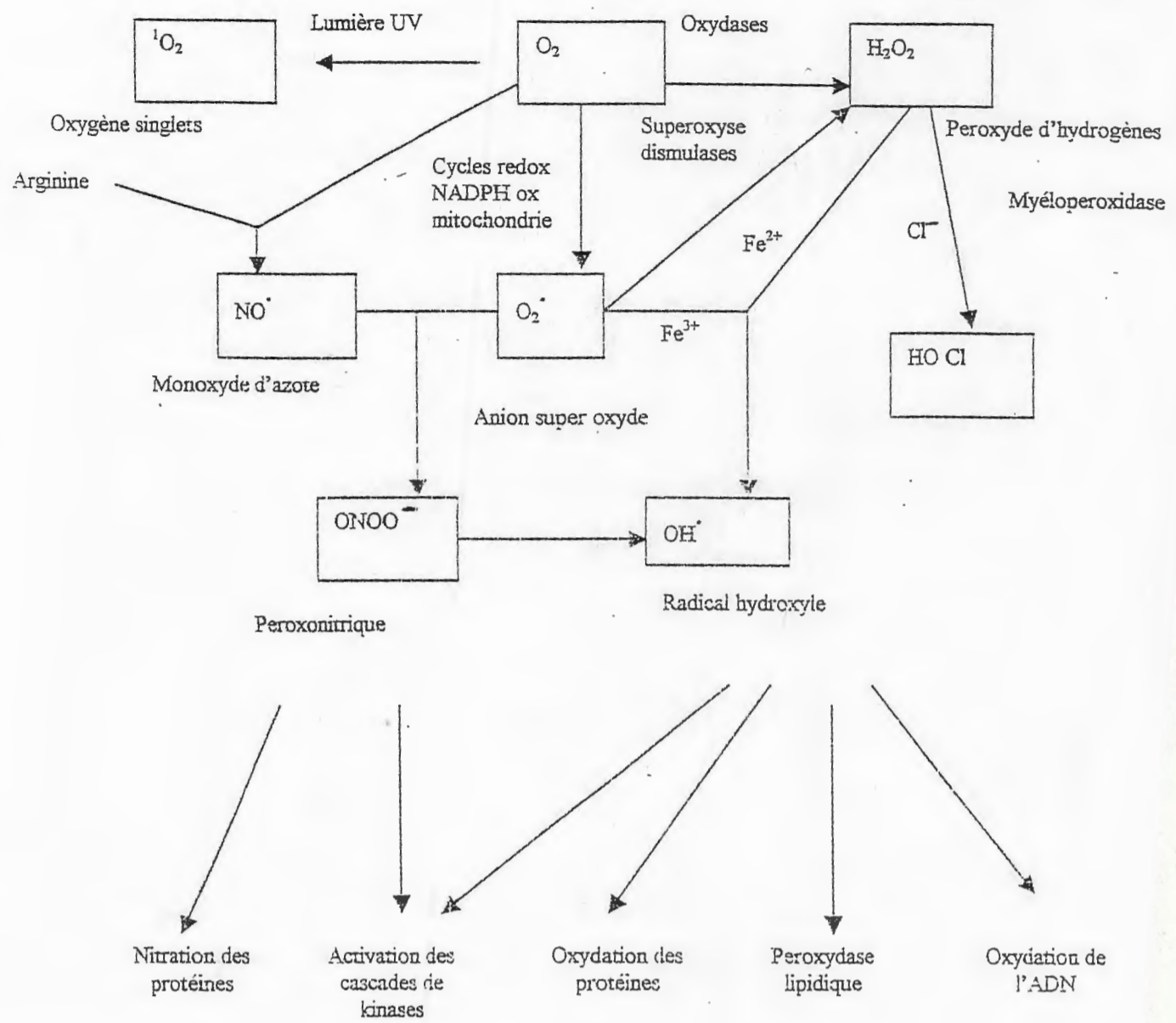


Fig . 5 . Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (30).

III.2.5. Le rôle des radicaux libres :

Le paradoxe des radicaux libres en biologie c'est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles :

- La phagocytose.
- Participent au fonctionnement de certains enzymes.
- La transduction de signaux cellulaires.
- La défense immunitaire contre les agents pathogènes.
- La destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire.
- La régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire

- La fécondation de l'ovule.
- La régulation des gènes (30).
- La régulation de la pression sanguine (comme le NO^o) (31).

III.2.6. Les antioxydants :

La production des EOA strictement régulée par notre organisme qui a développé des défenses antioxydants pouvant nous protéger contre les effets potentiellement destructeurs des EOA, ces systèmes se composent :

III.2.6.1. Les enzymes de protection : On peut citer les enzymes suivantes:

- **Les super oxydes dismutase :**

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion super oxydes, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, elle assure ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant(31). Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera les super oxydes dismutase :

- SOD à manganèse (MnSOD) : protégeant la mitochondrie.
- SOD à cuivre zinc, protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD)
- La face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD).
- Le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (34).

- **Les glutathions peroxydases (GPx) :**

Cette enzyme a besoin du glutathion et du sélénium pour fonctionner correctement. Son rôle principale est d'éliminer les peroxydes lipidiques, résultant de l'effet du stress oxydant des acides gras poly insaturés (31).

- **Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR) :**

Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante, une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et les peroxydes d'hydrogène (31).

- **L'hème oxygénase (HO) :**

Le système oxygénase (HO) permet la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer : L'effet protecteur de la HO contre le stress oxydant est indirect, puisqu'il est relié au fait que :

- La biliverdine se transforme en bilirubine qui possède une activité antioxydante.

- Le fer produit par l'activité de la HO stimule la synthèse de ferritine, qui est aussi impliquée dans la réponse antioxydante (31).

- **Les protéines de stress thermique :**

Ces protéines interviennent dans la réparation des dommages oxydatifs induits au niveau des protéines, par un stress oxydant (31).

III.2.5.2. molécules antioxydantes de petite taille :

- **Les caroténoïdes :**

La plus part des caroténoïdes interagissent avec l'oxygène singulet, et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras poly insaturés (31).

- **Le Coenzyme Q10 :**

L'ubiquinone ou CoQ10 est bien connu pour son rôle vital dans la production d'énergie au niveau de la mitochondrie. Principalement sous sa forme réduite ubiquinol-10 ou CoQ10H₂, possède aussi des propriétés antioxydantes intéressantes puisque, tout comme la vitamine E, il est capable d'inhiber la peroxydation lipidique (35,36).

Il existe d'autres antioxydants comme la vitamine C, E, A, l'acide urique, bilirubine, et les flavonoïdes (31).

- **Les oligo-éléments :**

- **Sélénium :** Cet oligo-élément joue un rôle antioxydant, il participe aussi au processus de défense contre les EOA, comme Cofacteur de la glutathion peroxydase (31).

- **Le zinc et le cuivre :** Ce sont des cofacteurs de SOD, indispensables dans l'activité des enzymes antioxydants, le zinc induit les protéines antioxydants comme les métallothionéines antioxydants et protègent les groupes thiols de l'oxydation (31).

- **Les protéines transporteuses de fer et de cuivre :**

Le fer et le cuivre jouent un rôle dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation des espèces oxygénées activées (31), par exemple le fer libre possède un effet très pro oxydant en catalysant la réaction de fenton et en favorisant la lipidoperoxydation,(34). La ferritine représente le site majeur de stockage de fer intracellulaire et considérée comme une protéine transporteuse (comme le cas de la transferrine et la céruléoplasmine).

Chapitre IV:
Stress oxydatif et
la destruction des biomolécules

IV . Le stress oxydatif et la destruction des biomolécules :

IV .1.L'oxydation des protéines :

En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues particulièrement vulnérables à l'action des protéases. Dans les conditions d'augmentation du stress oxydatif, les cellules peuvent être incapables d'éliminer l'accumulation des protéines oxydées par protéolyse, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés dans le diabète.

Il y a deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines qui sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines (37).

IV .2.L'oxydation de l'ADN :

L'ADN est vulnérable, aussi aux dégâts oxydatifs, mais il existe des mécanismes enzymatiques sophistiqués pour réparer les dégâts sur l'ADN (38). Les dégâts sur l'ADN peuvent résulter en des cassures de brins, des enchaînements croisés protéines-ADN et des modifications des bases (37).

IV .3. La peroxydation lipidique :

IV .3.1. Définition :

Les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires sont la cible principale des espèces oxygénées actives (EOA) (31). Quand les lipides sont attaqués par les espèces réagissant à l'oxygène, un radical carbone est formé, qui ensuite réagit avec un radical peroxyde et génère des peroxydes lipidiques (37).

Les acides gras polyinsaturés sont les constituants principaux des LDL (low density lipoprotéines). L'oxydation des LDL est un processus particulièrement important dans le processus de l'athérosclérose (31) (est un composant majeur de la pathogenèse des maladies coronariennes). Les LDL oxydées ne sont pas reconnues par le LDL récepteur, et sont éliminées par les monocytes. Et alors le cholestérol, est finalement déposé dans la paroi artérielle (37).

IV .3.2. Marqueurs de la peroxydation lipidique :

Les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique (PL) sont les substances réagissant aux Malonaldéhyde (MDA) / acide thiobarbiturique, aux diènes conjugués, aux hydroperoxydes lipidiques et aux isoprostanes (37).

IV .3.3. MDA (Malondialdéhyde) :

La MDA est un sous produit de la peroxydation lipidique. Pendant de nombreuses années, la détermination de la MDA par l'acide thiobarbiturique a été utilisée pour évaluer *in vivo*, la présence d'une peroxydation lipidique, mais il est possible maintenant de mesurer la MDA par des techniques de chromatographie plus précises (HPLC). Il est toute fois bon de rappeler que la MDA ne présente qu'un faible pourcentage (1%) du processus de décomposition des peroxydes lipidiques , et a ce titre,elle est donc loin d'être un marqueur fiable de la présence d'un stress oxydant (31). (fig5)

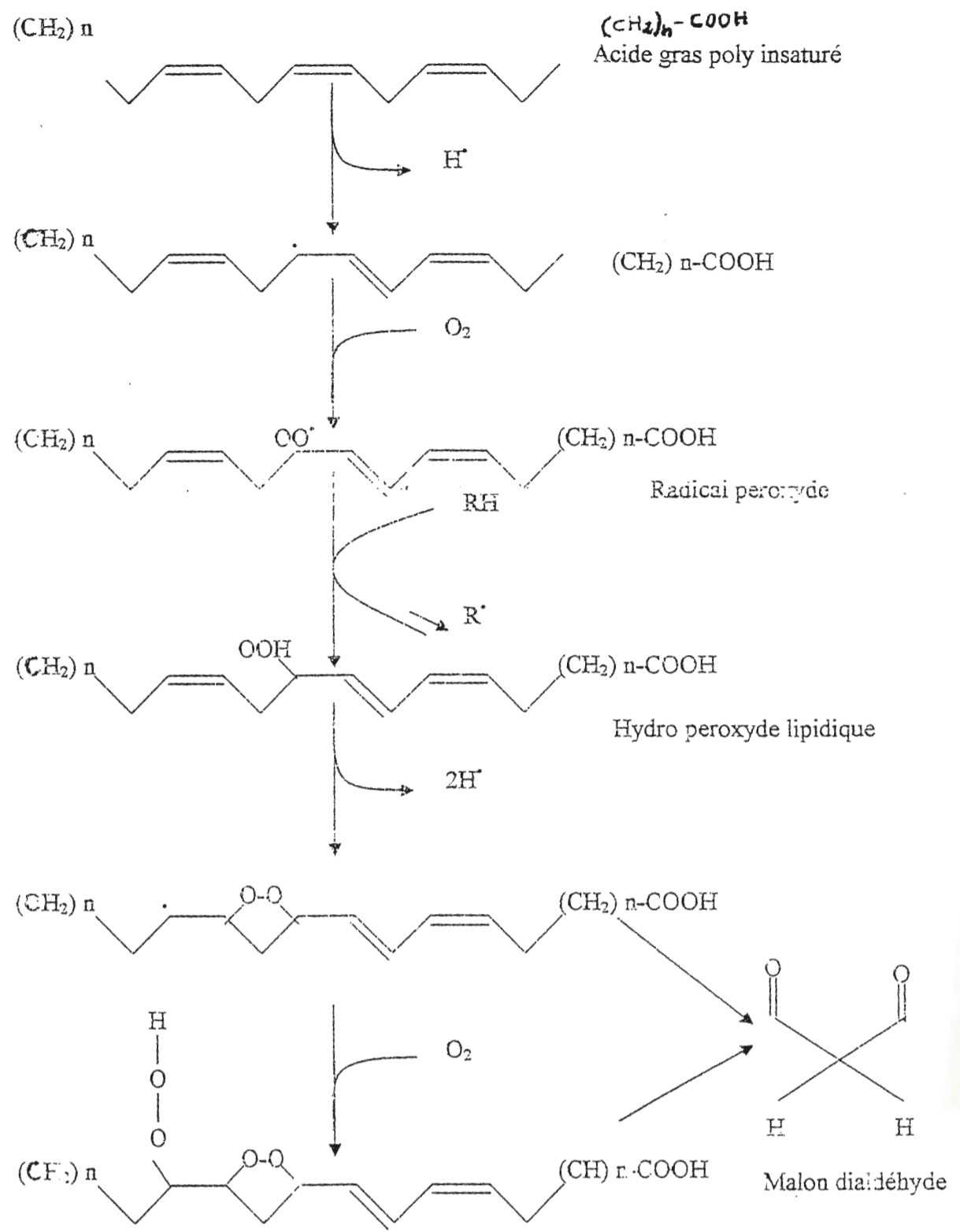


Fig.6. Peroxydation lipidique : voie de synthèse du Malon dialdéhyde à partir des acides gras (39).

Chapitre V:
Matériels et
méthodes

V. Matériels et méthodes :**V.1. Matériel :****V.1.1. Les animaux :**

Nos expériences ont été réalisées sur des rats **Albino** de souches **Wistar** provenant de l'institut pasteur d'Alger pesant entre 98 et 186 g. Ces animaux sont élevés dans des cages en plastique, avec libre accès à la nourriture (croquettes) et à l'eau.

V.1.2. La plante :

La plante R.R.L a été cueillie dans son milieu systématique (Dharouassaf et Chekfa wilaya de Jijel) après sa floraison, en début du mois d'avril 2006

V.2. Méthodes :**V.2.1. Extraction des polyphénols:**

L'extraction a été réalisée au niveau du laboratoire de pharmacologie Université de Jijel, selon les étapes suivantes que nous avons inspirées de Bruneton

(8) (fig.07).

- **Le séchage** : après la cueillette de la plante (jeune pousse), et le lavage par l'eau de robinet puis l'eau distillée, nous l'avons séché à l'air libre pendant 15 jours, puis dans l'étuve à 37°C pendant 3 jours.
- **Le broyage** : Nous avons procédé au broyage manuel de la plante à l'aide d'un moulin artisanal jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.
- **La macération** : Nous avons mis 150 g de la matière végétale dans 625 ml d'une solution hydroethanolique d'un pourcentage consécutif 20% et 80% et laisser macérer pendant 3 jours.
- **La filtration** : Elle est faite sur une gaze, puis sur papier filtre.
- **L'évaporation** : Pour éliminer l'éthanol, nous avons passé le macérât par le rotavapor à température égale 50 °C à 120 tours/mn jusqu'à l'obtention d'une petite quantité de la phase aqueuse.
- **Le dégraissage** : Dans une fiole à décantation nous avons mélangé la phase aqueuse obtenue avec le chloroforme à quantité suffisante afin d'éliminer les lipides suivi d'une décantation dans une fiole pour séparer la phase aqueuse contenant nos extraits.

- **L'affrontement par le n-butanol** : La phase aqueuse récupérée précédemment est mélangée avec le n-butanol (volume suffisant) dans une fiole, suivi par une décantation pendant 24 heures pour séparer la phase n-butanolique contenant les extraits polyphonoliques
- **L'évaporation** : La phase n-butanolique est soumise à une évaporation par le rotavapor à 50 C° pour obtenir en fin des extraits en poudre.
- **La quantification de la poudre** : Une différence de poids du ballon contenant la phase n-butanolique avant et après l'évaporation à sec a été calculée pour déterminer le poids des extraits obtenus.

V.2. 2. Préparation des solutions administrées :

Dans cette étude, nous avons utilisé 2 préparations :

V.2.2.1.Solution polyphénolique :

La posologie de la solution polyphenolique recommandée par des travaux en cours

dans le laboratoire de phytochimie et de pharmacologie ainsi que par d'autres travaux de recherches (40), est de 200 mg/kg sous forme d'une solution physiologique (0,09%).

Les doses thérapeutiques administrées aux rats ont été calculées, après adaptation aux poids des rats en choisissant un volume convenable à la biologie du rat ; à partir d'une solution reconstituée des polyphenols (solution mère).

• **Préparation de la solution mère :**

Cette solution a été préparée en additionnant à 2 g de la poudre polyphenolique à 50 ml d'eau physiologie. Soit donc une solution de 40 mg/ml.

$$2 \text{ g} \longrightarrow 50 \text{ ml} \quad \} X=0,04 \text{ g/ml} = 40 \text{ mg/ml}$$

$$X \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ ml}$$

• **Calcul de la quantité administrée :**

Pour un rat. de 200 g par exemple :

$$200 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \text{ g} \quad \} X=40 \text{ mg}$$

$$X \text{ mg} \longrightarrow 200 \text{ g}$$

• **Calcul de volume correspondant :**

$$1 \text{ ml} \longrightarrow 40 \text{ mg} \quad \} Y=1 \text{ ml}$$

$$Y \text{ ml} \longrightarrow 40 \text{ mg}$$

Donc pour un rat de 200 g, le volume administrée est 1 ml de la solution mère, soit 40 mg de la poudre polyphénolique.

V.2.2.2. La solution d'Alloxane :

Pour induire une toxicité pancréatique par l'Alloxane, la dose administrée est 150 mg/kg (41).

$$150 \text{ mg} \longrightarrow 5 \text{ ml } \} X=30 \text{ mg}$$

$$X \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ ml}$$

Pour un rat de 200 g :

$$150 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \text{ g} \} X=30 \text{ mg}$$

$$X \text{ mg} \longrightarrow 200 \text{ g}$$

Donc pour un rat moyen de 200 g, le volume d'Alloxane administrée est 1 ml de la solution mère, soit 30 mg de la poudre d'Alloxane. La distribution et les traitements des rats sont récapitulés dans le tableau 01.

V.3. Voies d'administration des différentes solutions :

V.3.1. Par gavage gastrique :

La solution polyphénolique est administrée par gavage gastrique selon la méthode suivante (Fig.08) :

La nuque du rat a été fixée par l'index et le pouce de façon à tenir la peau du rat dans la paume de la main, et donc l'administration s'effectue à l'aide d'une seringue menue d'une sonde métallique, cette dernière applique une pression sur la base de la langue pour assurer l'ouverture bucco-pharyngienne et permet sa pénétration dans l'œsophage.



Fig. 08. Méthode d'administration par gavage gastrique.

V.3.2. Par voie Intra péritonéale :

L'Alloxane est administrée en IP selon la méthode suivante (Fig. 09).

La nuque du rat à été fixée par l'index et le pouce de façon à tenir la peau du rat dans la paume de la main donc l'administration s'effectue à l'aide d'un seringue menue d'une aiguille très fine qui sera entrée dans le péritoine du rats sans toucher les viseres internes.

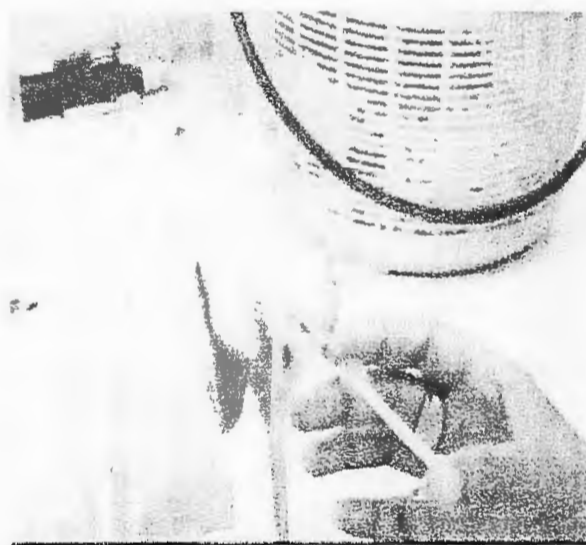


Fig.09. Méthode d'administration en IP.

V.4. Traitement des animaux :

Dans notre étude pratique, nous avons utilisé 14 rats. Ces derniers ont été soumis à une période d'adaptation à l'environnement de l'animalerie pour s'habituer aux nouvelles conditions avant d'être utilisés.

La distribution des rats est faite en 3 lots : (Tab.01)

- 1^{er} lot (L1) : témoin négatif, contient 4 rats, reçoivent l'eau physiologique par gavage gastrique.
- 2^{ème} lot (L2) : témoin positif intoxicant, contient 5 rats, reçoivent l'Alloxane en IP.
- 3^{ème} lot (L3) : lot traité (traitement préventif) : contient 5 rats, reçoivent la solution polyphénolique.

Tab .01. Distribution et traitement des rats.

Lots	Reçoit
Lot1 : Témoin négatif	1 ml d'eau physiologie
Lot 2 : témoin positif	1 ml d'Alloxane
Lot3 : traitement préventif	1 ml des polyphénols à J1 puis 1ml des polyphénols et 1ml d'Alloxane à J2.

V.5. Prélèvement des échantillons :**V.5.1. Prélèvement du sang :**

Le sang est prélevé par ponction à l'aide d'un tube à hématocrite, dont le bout est induit délicatement au niveau rétro-orbitaire. Le sang sera donc récupéré dans des tubes secs contenant un anticoagulant (EDTA) (Fig.10).

La centrifugation du sang est faite extemporanément à 3500 tours/ min pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (BIOBLOCK SCIENTIFIC, CENTRIFUGEUSE 55702), les sérums obtenus sont utilisés pour le dosage des différents enzymes.



Fig.10. Méthode de prélèvement du sang.

V.5.2. Prélèvement du pancréas ✕

A. Anesthésie des rats :

Afin d'anesthésier les rats et faire la dissection nous avons utilisé le chloroforme donc rapidement le rat va mourir par asphyxie après l'inhalation d'une petite quantité de chloroforme.

B. La Dissection :

Après de sacrifier les rats la dissection commence par la fixation des pattes sur le dos à l'aide d'épingles suivie par une dissection au niveau de l'abdomen en utilisant une pince et une paire de ciseaux (Fig. 11).

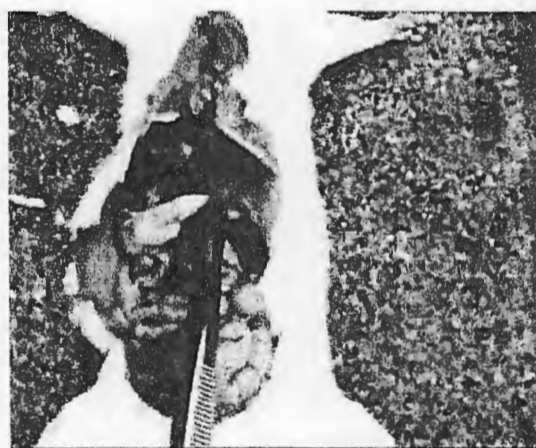


Fig.11. Dissection de rat.

C. Prélèvement du pancréas :

Le pancréas est prélevé à l'aide d'une pince afin de faire premièrement une observation anatomique, soit de pancréas témoin ou de pancréas intoxiqué par l'Alloxane et deuxièmement pour préparer l'homogénat nécessaire au dosage des différents enzymes.

V.6. Etude de la toxicité pancréatique :

Dans le cadre de notre étude biochimique de la toxicité pancréatique, nous avons procédé aux dosages des enzymes : catalase et glutathion plus le MDA, ainsi que le dosage des glycémies dans un intervalle de 10 jours.

Le dosage de glycémie a été réalisé au niveau de laboratoire privé de Dr. Bekioua, alors que le dosage des autres paramètres : catalase, glutathion, MDA est réalisé au niveau de laboratoire de toxicologie de l'institut de biologie de l'Université de Jijel, en utilisant un homogénéisateur de DOUNCE pour préparer les homogénats. (Fig.12)



Fig.12.Méthode de préparation du l'homogénat.

V.6.1. Mesure de l'effet scavenger ou piègeur de l'extrait butanolique de la RRL (polyphénols) : Méthode au DPPH°:

- Le principe :

Le DPPH° (2-2 Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable largement utilisé pour tester la capacité antiradicalaire des composés naturels, c'est à

dire la capacité des composés polyphénoliques d'agir en tant qu'éboueurs des radicaux libres.

- **Méthode de mesure du l'effet scavenger:**

La cuve de mesure contient: 1,5 ml de la solution éthanolique de DPPH° (100 µM) et 0,015 ml de l'extrait à tester aux différentess concentrations (40g/L, 20g/L), donc la mesure de la DO s'effectue chaque 30 seconde pendant 5 min à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. En fin, l'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction en prenant le 100%de contrôle (DPPH°seul), selon la formule suivante (42):

$$\% \text{de réduction} = (Ac - Ae / Ac) \times 100.$$

Ac: Absorbance de contrôle après 5min.

Ae: Absorbance de l'essai après 5 min.

V.6.2. Dosage du MDA :

- **Principe :** Le dosage du MDA est basé sur la méthode de OKAWA, (43) dont le principe est le suivant :

Le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) dans un milieu acide (PH=2 à 3) et à chaud 100C° pour donner un pigment coloré en rose, extractible par les solvants organique comme le n-butanol. La densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm

- **Protocole d'évaluation du MDA :**

Le dosage du MDA est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau 02 (43):

Tab.02. Etapes de la réalisation de dosage du MDA :

Tubes Solution [ml]	Tube Blanc	Tube échantillon
Homogénat tissulaire (1g de pancréas homogénéisé avec 3ml de Kcl)	–	0,5
Kcl (ml)	0,5	–
TCA (20%)	0,5	0,5
TBA (0,67%)	1	1
Incubation dans le bain marie à 100C° pendant 45 minutes, puis le refroidissement ;		
n-butanol	4	4
Centrifugation à 3000 Pm pendant 15 min, puis on mesure les DO à l'aide d'un spectrophotomètre (UV.VIS spectrophotometer)		

Puis on fait la projection des différentes densités optiques obtenues sur la courbe d'étalonnage pour obtenir les concentrations en nanomole du MDA/ml de sérum.

V.6.3. Dosage de l'activité enzymatique de catalase :

- **Principe :**

L'activité enzymatique de catalase a été déterminée en adaptant la méthode de CLARBONE 1985, le principe est basée sur la disparition de l' H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 250 C°, le lecture de la DO est effectué à 560nm chaque minute pendant 2 minutes (44).

- **Protocole d'évaluation de l'activité enzymatique de la catalase :**

Le dosage de l'activité enzymatique de la catalase est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau 03(44).

- **Préparation de cytosol :**

On met une quantité d'homogénat, préparé précédemment pour le dosage du MDA dans des épindoffes. L'homogénat est centrifugé à 800 rpm, pendant 15 minutes, on refait la centrifugation des surnageants obtenues pour la deuxième fois à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4 C° à l'aide d'une centrifugeuse SIGMA 6 k 15. Le surnageant final considéré comme le cytosol nécessaire pour le dosage de l'activité de catalase (44).

Tab.03. Etapes d'évaluation de l'activité enzymatique de catalase :

Solution (ml)	La cuve de mesure
Tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ , 1M, PH=7,2)	1ml
Peroxyde d'hydrogène (0,019)	0,95ml
La source enzymatique	0,025ml
Lecture de la DO à 560nm chaque minute pendant 2 min	

L'activité enzymatique AE est exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante:

$$\text{UI/g de protéine} = (2,3033/T \times \log A1/A2) / \text{g protéine.}$$

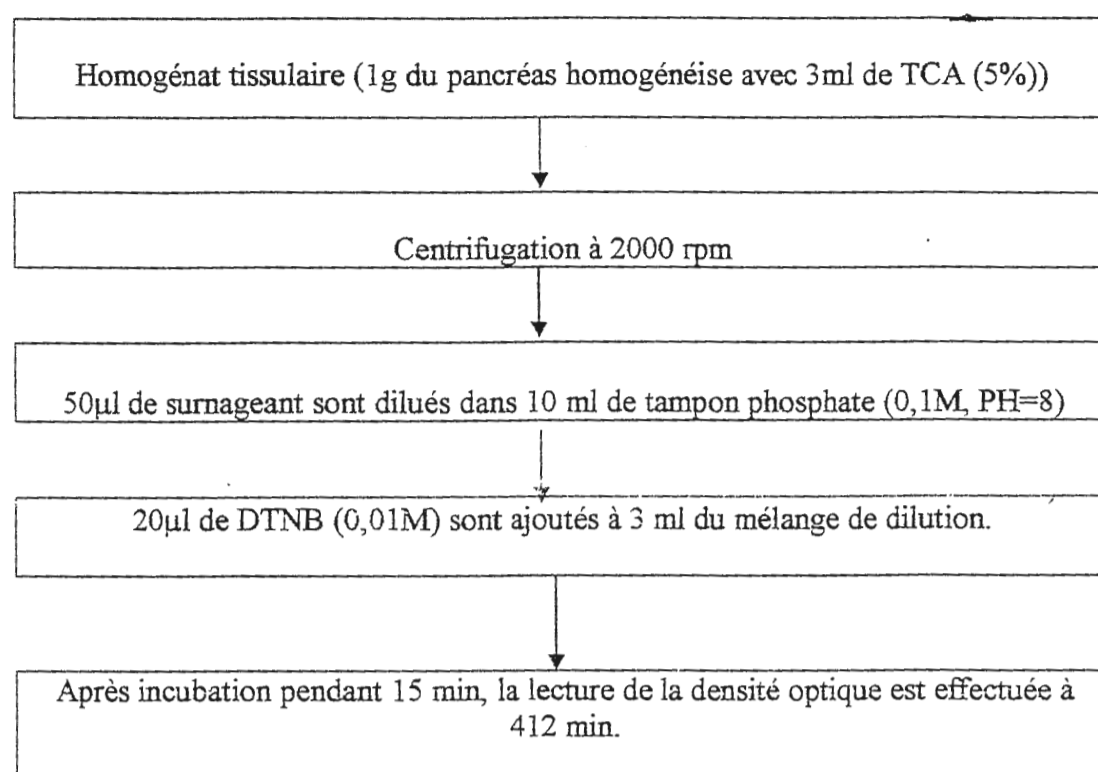
V.6.4. Dosage du glutathion :

- **Principe :**

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman. Le principe de la réaction consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque l'absorbance est mesurée à 412nm (45).

- **Le protocole d'évaluation du glutathion :**

Il est récapitulé dans le tableau suivant: (Tab.04) (45)

Tab.04. Etapes d'évaluation du glutathion.

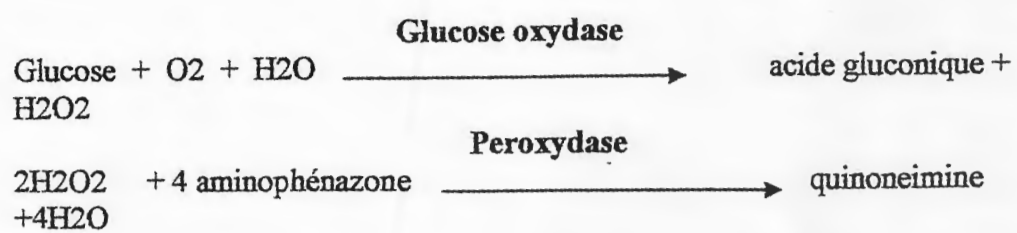
La lecture est faite contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%), puis on fait la projection des différentes densités optiques obtenues sur la courbe d'étalonnage, pour obtenir les concentrations du glutathion en mmol par ml de sérum.

V.6.5. Dosage de la glycémie :

- **Principe :**

Le glucose est déterminé après l'oxydation enzymatique en présence de glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène est l'un des produits qui catalysé en suite par la peroxydase en présence de phénol et le 4-amino phénazone pour former un quinoneimine rouge violet, considérée comme un indicateur (Tab.05) (46).

• Réaction principale :



Tab.05. Protocole de dosage de la glycémie :

	Bianc	Ethalon	Echantillon
Ethalon du glucose	-	10 μ l	-
Sérum	-	-	10 μ l
Réactif	1,0ml	1,0ml	1,0ml

Incubation dans le bain marie à 37c° pendant 10 min puis la mesure de l'absorbance (DO) à 5000nm.

VI:

Chapitre

et



Résultats

de

l'interprétation

des

VI. Résultats et interprétation :

- **Courbes de changement des différents paramètres chez les lots intoxiqués et traités préventivement selon la chronologie de :j₀ , j₃, j₆, j₁₀ .**

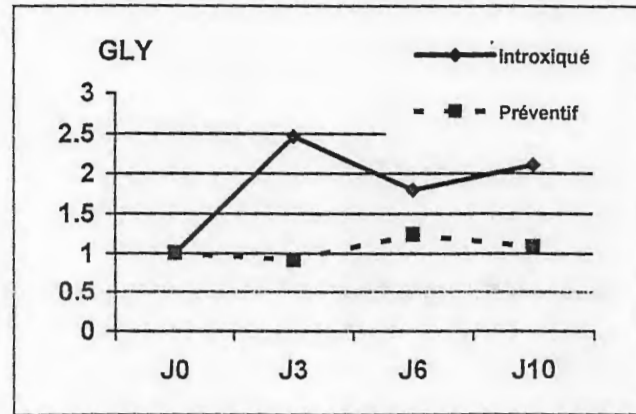
1. Glycémie :

Témoin intoxiqué :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
1,007	2,465	1,80	2,11

Témoin préventif :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
1,007	0,915	1,24	1,09



Courbe de changement de la glycémie chez les lots intoxiqués et traités préventivement selon la chronologie de :j₀ , j₃, j₆, j₁₀ .

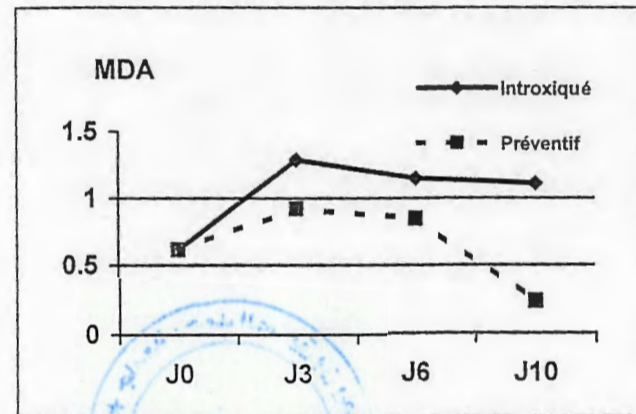
2. MDA :

Témoin intoxiqué :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
0,618	1,286	1,149	1,110

Témoin préventif :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
0,618	0,92	0,85	0,236



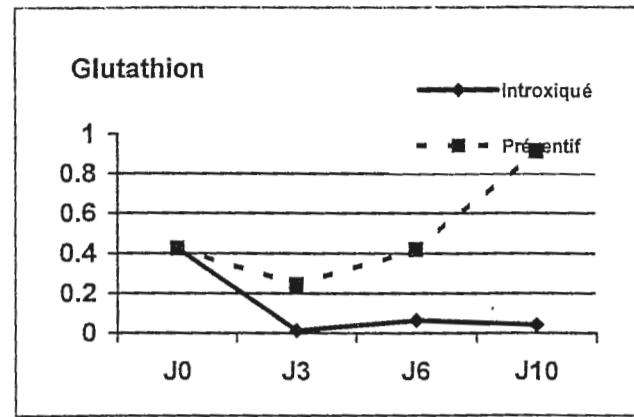
Courbe de changement de MDA chez les lots intoxiqués et traités préventivement selon la chronologie de :j₀ , j₃, j₆, j₁₀ .

3. Glutathion :
Témoin intoxiqué :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
0.425	0.012	0.065	0.042

Témoin préventif :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
0.425	0.243	0.419	0.913



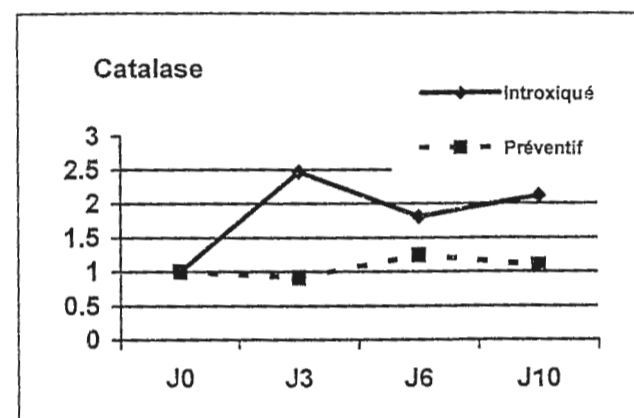
Courbe de changement de Glutathion chez les lots intoxiqués et traités préventivement selon la chronologie de :j₀ , j₃, j₆, j₁₀.

4. Catalase :
Témoin intoxiqué :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
0.162	0.265	0.466	0.509

Témoin préventif :

J ₀	J ₃	J ₆	J ₁₀
0.162	0.918	0.345	0.269



Courbe de changement de Catalase chez les lots intoxiqués et traités préventivement selon la chronologie de :j₀ , j₃, j₆, j₁₀.

VL1. Evaluation de l'effet scavanger:

Les valeurs de la DO des différents tubes sont récapitulées dans le tableau 06.

Tab. 06. les mesures de la DO obtenues dans l'évaluation de l'effet scavanger de l'extrait polyphénolique dans le cas de DPPH°.

Tubes	DO mesuré après 5 min
Contrôle	0,774
Tube à 40g/L	0,218
Tube à 20g/L	0,209

• Pour 40g/L:

Le % de réduction=71,83%

• Pour 20g/L:

Le % de réduction=72,997%

VL2. Evaluation de la glycémie:

Les résultats de dosage de la glycémie sont récapitulés dans le tableau 07

Tab.07. Dosage de la glycémie chez les différents lots.

Lots	Rats	Avant traitement	Glycémie		Moyen + écart type
			Moyen + écart type	Après traitement	
L1	1	0,96	1,007± 0,136	-	-
	2	0,99			
	3	0,88			
	4	1,20			
L2	1	0,97	1,020± 0,127	2,50	2,190 ± 0,283***
	2	0,89		2,43	
	3	1,03		1,80	
	4	1,19		2,08	
	5	1,14		2,14	
L3	1	0,99	1,068± 0,131	1,14	1,137± 0,125
	2	0,88		0,69	
	3	1,20		1,24	
	4	1,11		1,21	
	5	1,16		0,97	

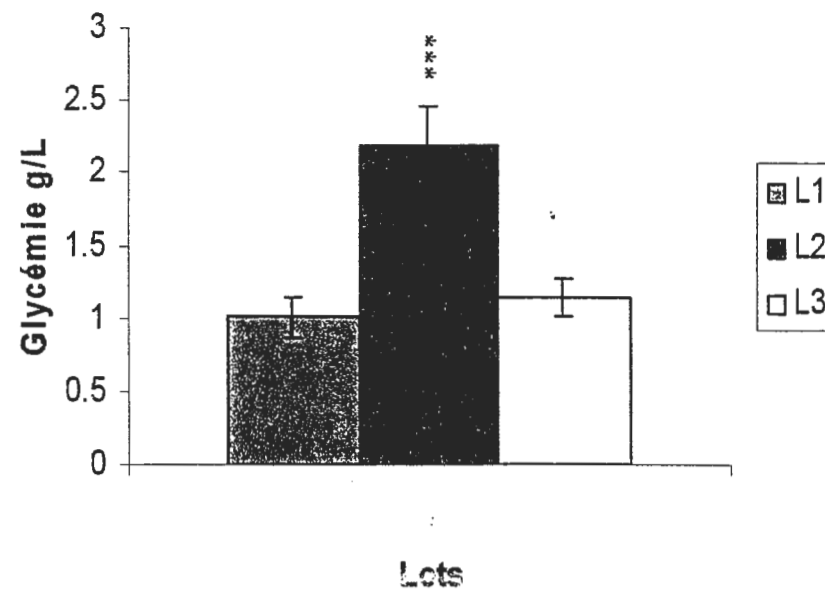


Fig. 13. Evaluation de la glycémie dans les différents cas de traitement. Les valeurs sont données en Moyenne \pm écart type. *** $p < 0.001$ la différence est très hautement significative par rapport au témoin, L1.

Nous avons constaté chez le lot intoxiqué une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) qui atteint la valeur ($2,190 \pm 0,283$) après l'administration de l'Alloxane par rapport à la valeur normale évaluée chez les témoins ($1,007 \pm 0,163$). Chez le lot traité préventivement par les polyphénols, nous constatons une petite augmentation de la glycémie par rapport au lot témoin dont la valeur atteint ($1,137 \pm 0,125$). Par contre nous n'avons pas constaté une hyperglycémie chez les rats intoxiqués et traités préventivement par l'extrait polyphénolique.

VI.3. Evaluation du MDA :

- **Courbe d'étalonnage du MDA :**

Les mesures qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage (Fig.14) sont les suivantes:

[MDA] (nmol/ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
DO (nm)	0,091	0,149	0,269	0,320	0,410	0,493	0,598

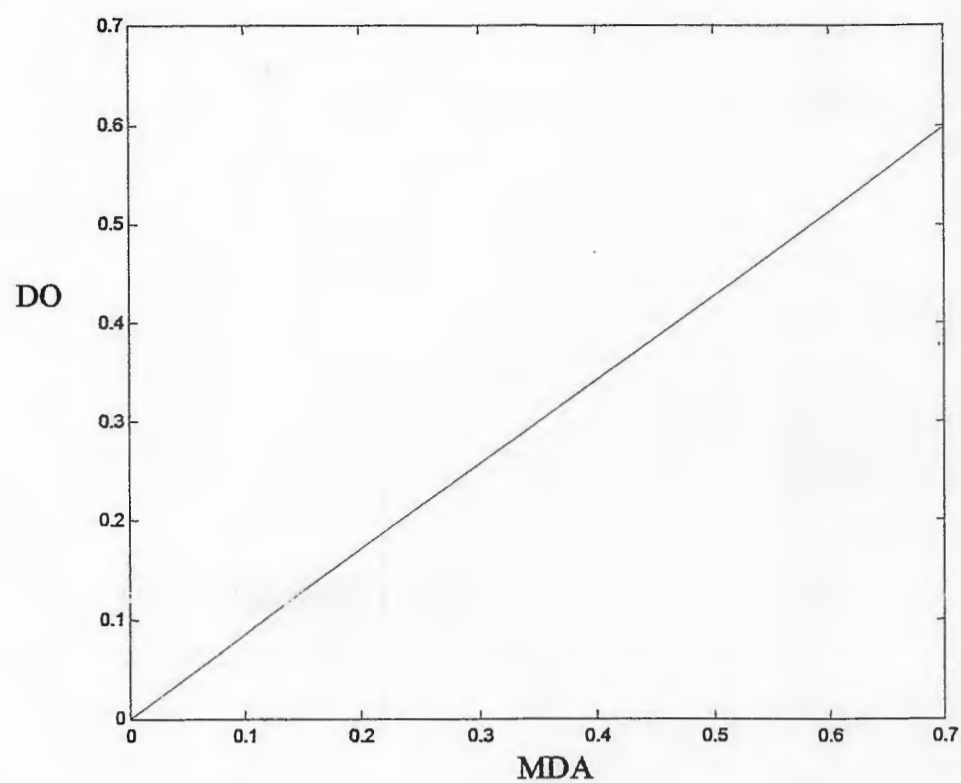


Fig.14.Courbe d'étalonnage du MDA.

Les résultats du dosage du MDA sont rassemblés dans le tableau 08 et représentés en histogrammes dans la figure15.

Tab.08. Evaluation de taux du MDA.

Lots	Rats	DO	Résultats	Moyen + écart type
L1	1	0,451	0,527	0,618± 0,099
	2	0,642	0,758	
	3	0,521	0,609	
	4	0,495	0,579	
L2	1	0,82	0,960	1,1866 ± 0,2534**
	2	1,378	1,613	
	3	0,982	1,149	
	4	0,970	1,180	
	5	0,868	1,040	
L3	1	0,752	0,880	0,636± 0,377
	2	0,824	0,968	
	3	0,734	0,858	
	4	0,088	0,103	
	5	0,321	0,375	

- L1 : lot témoin.
- L2 : lot intoxiqué par l'Alloxane.
- L3 : lot traité préventivement.

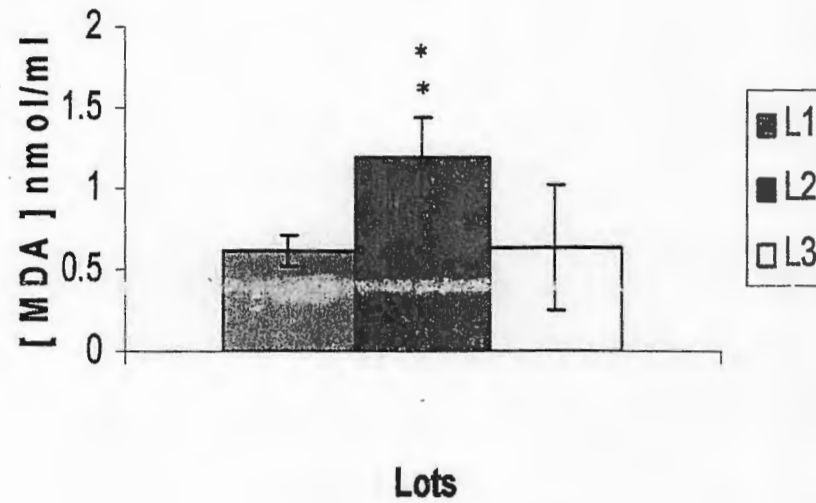


Fig. 15. Evaluation de la concentration du MDA chez les différents lots. Les valeurs sont données en Moyenne ± écart type. ** p < 0.01 la différence est hautement significative par rapport au témoin, L1.

Après l'administration de l'Alloxane, nous observons chez le lot intoxiqué une augmentation de la concentration du MDA (1,186 ± 0,253 nmol/ml) 2 fois plus élevée que celle obtenue chez les témoins (0,618 ± 0,099 nmol/ml). Cette concentration est diminuée chez le lot traité préventivement à (0,636 ± 0,377nmol/ml) qui est plus proche au celle de témoin.

VI.4.Evaluation de glutathion :(GSH)

• **Gamme d'étalonnage :**

Les mesures qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage (Fig.16) sont les suivantes.

GSH(nmol/ml)	0	1,25	2,5	5	7,5
DO	0	0,31	0,40	0,89	0,91

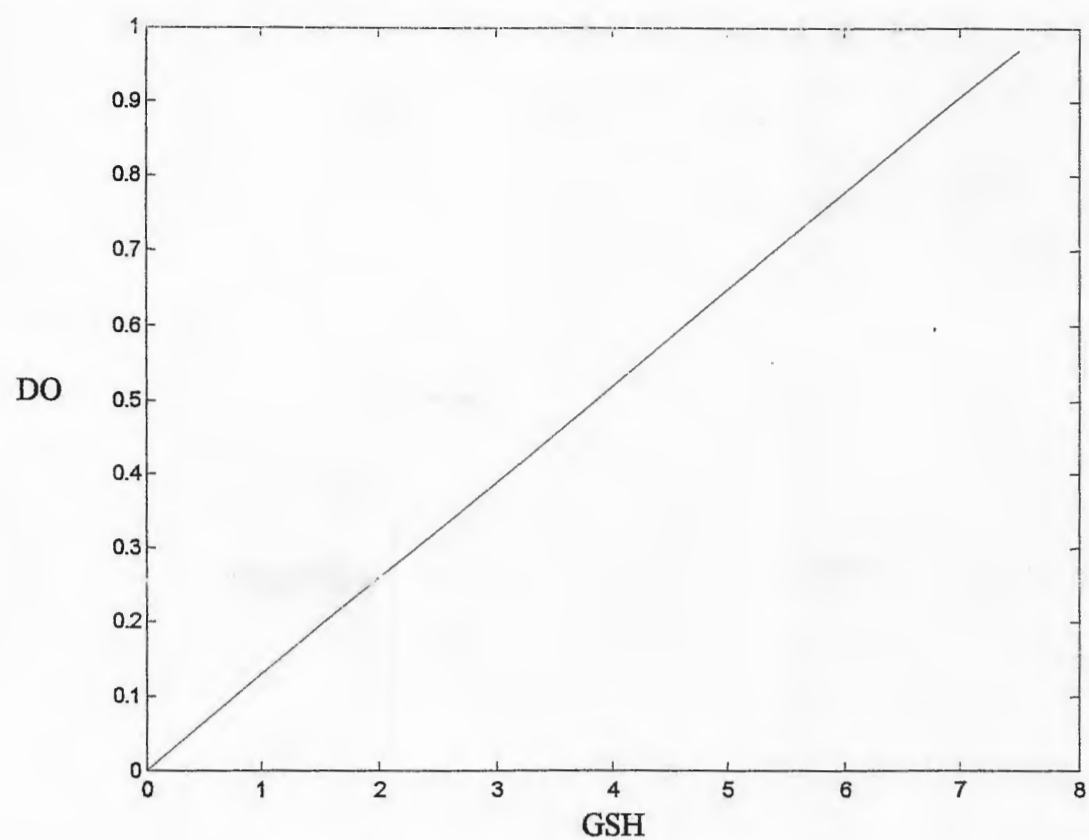


Fig.16. Courbe d'étalonnage du GSH.

Les résultats du dosage de GSH sont rassemblés dans le tableau 09 et représentés en histogrammes dans la figure 17.

Tab.09. Evaluation de taux du glutathion :

Lots	Rats	DO	Résultats (mmol/ml)	Moyen + écart type
L1	1	0,053	0,410	0,425± 0,057
	2	0,066	0,510	
	3	0,052	0,404	
	4	0,049	0,379	
L2	1	0,002	0,017	0,0352 ± 0,023***
	2	0,001	0,0089	
	3	0,009	0,065	
	4	0,008	0,053	
	5	0,004	0,031	
L3	1	0,021	0,163	0,546± 0,348
	2	0,042	0,324	
	3	0,054	0,419	
	4	0,125	0,959	
	5	0,112	0,868	

L1 : lot témoin.

L2 : lot intoxiqué.

L3 : lot traité préventivement.

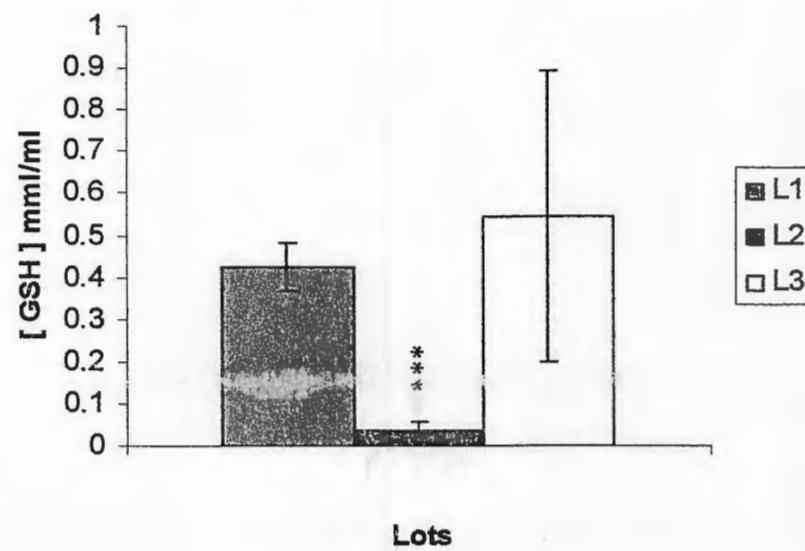


Fig.17. Evaluation de taux du GSH chez les différents lots. Les valeurs sont données en Moyenne \pm écart type. *** < 0.001 la différence est très hautement significative par rapport au témoin, L1.

Nous constatons une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre le lot témoin et le lot intoxiqué avec des valeurs successive de $(0,425 \pm 0,057 \text{ mmol/ml})$ et $(0,0352 \pm 0,023 \text{ m mol/ ml})$. Par contre il y'a une légère augmentation de GSH chez les préventifs $(0,546 \pm 0,348 \text{ mmol/ml})$ en comparaison à celle des témoins.

VI.5. Evaluation de l'activité enzymatique du catalase:

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 10.

Tab.10. Résultats d'évaluation de l'activité enzymatique du catalase.

Lots	Rats	DO après 1 min (A1)	DO après 2min (A2)	L'activité enzymatique (UI/g)	Moyen + écart type
L1	1	0,171	0,17	0,1462	0,16235± 0,06264
	2	0,234	0,233	0,1065	
	3	0,199	0,197	0,2522	
	4	0,173	0,172	0,1445	
L2	1	0,088	0,087	0,2856	0,40336± 0,13428*
	2	0,102	0,101	0,2458	
	3	0,108	0,106	0,4669	
	4	0,112	0,11	0,4502	
	5	0,089	0,087	0,5683	
L3	1	0,122	0,115	1,4741	0,5442± 0,5273
	2	0,137	0,135	0,362	
	3	0,144	0,142	0,3454	
	4	0,132	0,130	0,380	
	5	0,157	0,156	0,159	

Les valeurs sont données en Moyenne ± écart type. * $p < 0.05$ la différence est significative par rapport au témoin, L1.

L1 : Lot témoin.

L2 : Lot intoxiqué par l'Alloxane.

L3 : Lot traité préventivement.

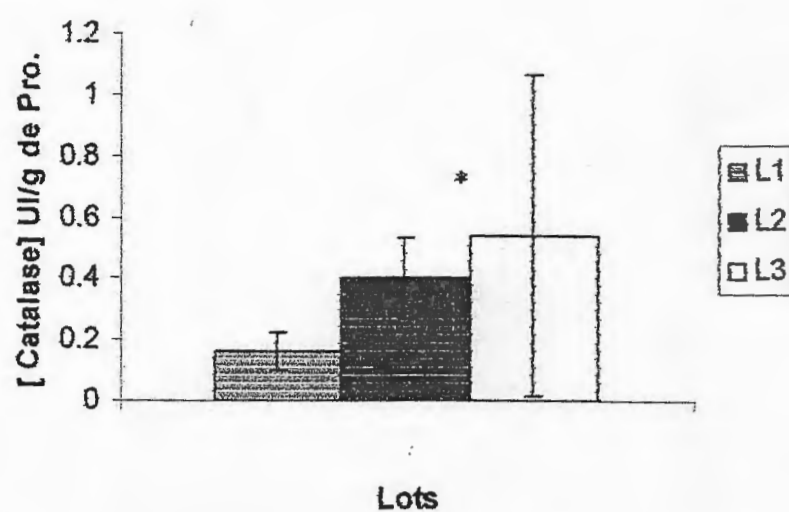


Fig. 18. Les différentes valeurs de l'activité enzymatique de la catalase chez les différents lots traités. Les valeurs sont données en Moyenne \pm écart type. * $p < 0.05$ la différence est significative par rapport au témoin, L1.

Après l'administration de l'Alloxane, nous observons chez le lot intoxiqué une augmentation de l'activité enzymatique du catalase d'une manière significative ($0,40336 \pm 0,13428^*$). Chez le lot traité préventivement par les polyphénols, l'activité enzymatique continue à augmenter non significativement par rapport à sa valeur chez les témoins, pour atteindre la valeur de ($0,5442 \pm 0,5273$ IU/g de protéine).

Chapitre VII:

Discussion

Discussion

Le diabète est l'une des maladies métaboliques les plus redoutables dans la santé publique puisque il touche 100 millions de personnes dans le monde et cause l'une des mortalités les plus élevées. Ces derniers temps beaucoup de chercheurs se penchent sur l'investigation des substances antidiabétiques dans le domaine des plantes médicinales.

Dans notre étude, nous avons essayé les polyphénols extraits de la *Ramunculus repens* L. comme principes actifs antistress oxydatif afin de prévenir l'induction du diabète par des substances toxiques. Pour cela nous avons procédé au model de l'induction de diabète à l'Alloxane chez les animaux de laboratoire à savoir les rats Wister Albinos.

Le pancréas est une glande mixte à des fonctionnements métaboliques différents, ce qu'il l'a rendu susceptible aux effets toxiques des médicaments et notamment les diabétogènes tel que l'Alloxane. Cet effet diabétogène est dû principalement aux métabolites réactifs. En effet, l'Alloxane est utilisé comme une drogue induisant le diabète chez les animaux (20) en provoquant la destruction des cellules β par un mécanisme radicalaire des radicaux libres oxygénés (ROS), 24 heures après l'administration de ce toxique, et donc l'insuffisante de la insulino-sécrétion pancréatique. Il a été documenté que la famille des polyphénols possède une capacité de captation de ces ROS et protégeant ainsi les systèmes biologiques notamment les plus sensibles car ces substances ayant des structure leur permettant de piéger les radicaux libres et les neutraliser (47).

Pour vérifier les effets pancréatoprotectrices des polyphénols sur une pancréatotoxicité induite à l'Alloxane à dose unique de 1ml/kg, nous avons réalisé une étude expérimentale chez les rats normaux et intoxiqués à l'Alloxane et avons procédé en l'évaluation du stress oxydatif dans les différents cas de traitements, à travers certains paramètres indicateurs de ce stress à savoir: Le MDA, qui renseigne sur le taux de peroxydation lipidique; GSH et Catalase qui renseignent sur le degré du stress oxydatif, Le radical DPPH^o, pour évaluer l'effet scavenger de l'extrait polyphénolique.

1. Evaluation du stress oxydant dans le cas des rats alloxanisés.

- En effet, après l'administration de l'Alloxane aux rats, nous avons constaté au terme des premières 24 heures suivant, une élévation d'une manière très hautement significative de la glycémie ($P < 0.001$) qui atteint une valeur moyenne de ($2,190 \pm 0,283$ g/l), ce résultat s'explique par une insuffisante insulinosécrétoire pancréatique due à une

cytolysé des cellules β des îlots de Langerhans des rats qui sont plus ou moins susceptibles à l'effet diabétogène de l'alloxane, de la force de mécanismes de défense vis-à-vis les radicaux libres et donc la diminution de la sécrétion de l'insuline (48). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les travaux de Claudia et al (40).

- Pour ce qui concerne le MDA, nous avons constaté une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) de ce produit de peroxydation lipidique, d'un pourcentage de 191,90%, par rapport au témoin. Cette élévation importante est due à la peroxydation des lipides membranaires sous l'effet des ROS générés par l'alloxane. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs travaux qui confirment que le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal (MDA) (30).

- Pour le glutathion, nous avons observé une diminution très hautement significative ($p < 0,001$), qui atteint un pourcentage de 1214% par rapport au témoin après l'intoxication par l'alloxane. Cette diminution est due d'une part à son rôle protecteur non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou NO° (30), et à son rôle clé dans l'expression de gènes codant pour les différentes protéines pro- et anti-inflammatoires d'autre part. Plusieurs recherches confirment aussi que le GSH est utilisé comme substrat de glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés qui justifie sa diminution dans les conditions de stress oxydatif (31).

- Pour ce qui concerne la catalase, malgré son augmentation significative ($p < 0.05$) d'un pourcentage de 248,17% est due à l'inductibilité des gènes antioxydants par le stress oxydant (49), cette inductibilité explique le phénomène d'adaptation au stress oxydant des cellules et des animaux qui sont exposés régulièrement aux faibles doses pour assurer un équilibre prooxydant-antioxydants et assurer en conséquence une résistance dans certaines conditions à de fortes doses de radicaux oxygénés (30).

2. Evaluation du stress oxydatif chez les rats traités préventivement.

L'administration préventive de l'extrait polyphénolique aux rats alloxanisés à la dose de 200mg/kg avant et pendant 2 jours, nous a permis de constater un niveau sanguin de glucose qui ne varie pas significativement par rapport au lot témoin et pareillement

quant aux GSH et MDA avec des valeurs successives de ($1,137 \pm 0,125$ g/l), de GSH ($0,546 \pm 0,348$ mmol/ml) et de MDA ($0,636 \pm 0,377$ nmol/ml). Ces résultats pourraient se justifier par le fait que les principes actifs constituant l'extrait polyphénolique de la plante RRL possèdent une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et donc ont un effet antioxydant. Ces résultats sont comparables avec d'autres travaux (de Claudia et al) (40).

- Concernant la valeur de l'activité de la catalase, elle continue à augmenter pour atteindre ($0,5442 \pm 0,5273$ UI/g de pro.), ce qui signifie que la faible dose des radicaux libres pouvant induire la synthèse génétique d'une quantité en plus de catalase pour contrebalancer le stress oxydant et acquérir un potentiel antioxydant à des fortes doses (30) ce qui pourrait être produit à cause du rôle anti stress des extraits polyphénoliques administrés en prévention.

Finalement, nous concluons que l'Alloxane est un agent diabétogène, produit des radicaux oxygénés dans le corps en causant la destruction des cellules β pancréatiques. Cependant, il est fondé que l'Alloxane n'est pas spécifique au pancréas, mais aussi aux autres organes tels que : les reins, le cerveau, et le système hématopoïétique (50). Toutefois la fragilité excessive des cellules β à l'Alloxane est due notamment à sa pauvreté en Cu/Zn superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase (21,22). Les effets de l'Alloxane ont été bloqués après l'administration des polyphénols aux rats alloxanisés, résultats concordant avec d'autres travaux étudiant l'extrait polyphénolique (40), ce qui nous confirme leur capacité à limiter le stress oxydant par le piégeage des radicaux libres.

Il faut noter aussi que les polyphénols pourraient aussi agir par d'autres mécanismes médiés au niveau cellulaire. Un certain nombre d'effets biologiques de plus en plus largement documentés n'est pas directement lié au rôle antioxydant (47) puisque d'autres mécanismes moléculaires à l'origine des effets biologiques impliqués dans la détoxification de carcinogènes par exemple commencent à être mieux compris (50) ainsi que les mécanismes donnant des effets anti-inflammatoires de polyphénols deviennent de plus en plus documentés (51).

1. T.Bahorun. Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source D'approvisionnement potentielle.File://C:\Document %20 and %20 Setting\ MESSRS\ Mon%20 document\ Substance...
2. LAROUSSE, 2002.Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, répartition, soins-LAROUSSE. PARIS.
3. Temple NJ, 2000, Antioxydants and disease:more questions than answers. Nutrition Res, Page 449-459.
4. Lyras L,Cairns NJ ,Jenner A et al,1997, An assessment of oxidative damage to proteins, lipids,DNA in brain from patients with Alzheimers, disease,JNeurochem,Page 2061-2069.
5. [http://WWW.vetpharm. Unizh. Ch/gf/PELANZEN/RANUNCUL. gif](http://WWW.vetpharm.Unizh.Ch/gf/PELANZEN/RANUNCUL.gif).
6. [htt: // www.google.fr/Ranunculus repens L.htm](http://www.google.fr/Ranunculus%20repens%20L.htm).
7. STICHMANN WILFRIED, Guide Vigot de la flore d'Europe: plus de 1300 photos en couleurs. Page:164.
8. Bruneton Jean, 1993; Pharmacognosie:phytochimie, plantes médecine mans, deuxieme édition, page 266-274.
9. HERTOGE M.G.1997; Antioxydant Flavonols. Site Internet.
10. Wetterson JJ, Butler LG, 1983.Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves.J Agr Food C hem; 31:41-45.
11. Hagerman AE, Butler LG, 1978.Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins.J Agr Food Chem; 26: page: 809-812.
12. Garcia-Veguera C, Bridle P, Ferreres F, Tomas-Barberan FA.Influence of variety, maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams.Z LebensmUntersforsch; 199: page: 433-436.
13. Morton LW,Abu amsha Caccetta R ,Puddey IB,Croft KD ,2000.Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds:Relevance to cardiovascular disease.Clin Exp pharmacol Physiol;27,page:152-159.
14. Harbowy ME, Balentine DA, 1997.Tea chemistry. Crit Rev Plant Sci; 16:page: 415-480.
15. Encarta 2004
16. Morin Y, 2002. Petit la rousse de la médecine. 3^{ème} édition.Page : 674.

17. MALAISSE WJ, MALAISSE-LAGE F, SENER A, PIPELEERS DG. 1982, Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B-cell. Proc Natl Acad Sci USA, 79: 927-930.
18. OBERLEY LW. Free radicals and diabetes. Free Radic Biol Med, 1988, 5: 133-124.
19. GUILLAUSSEAU, P.J.1995, stratégie thérapeutiques:Le diabète NID. Editions scientifique et culturelles .Page : 1-6.
20. <http://www.palomar.edu> MSDS.
21. GRANKVIST K, MARKLUND SL, TALJEDAL IB. 1981 CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. biochemJ, 199: page 393-398.
22. LENZEN S, DRINKGERN J, TIEDGE M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. Free Radic Biol Med. 20: page: 463-466.
23. AMMON HP, HAGELE R, YOUSSEF N et AL. 1983; A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release Endocrinology, 112: page: 720-726
24. <http://www.google.fr/search?q=Alloxane+%2Bdiab%C3%A8te%2Bpdf&hl=fr&lr=&start=10&sa=N>.
25. KHALFA S, Le diabète sucré page : 3-4.
26. HARRISON.R.T, 1992 principes de médecine interne: 5^{ème} édition. FLAMMARISON Médecine- SCINCES. Paris: page: 1739.
27. www.ht.sc.gc.ca/hpb/publicat/diabete99/index.f.html-14k.
28. Dr N.ALIANE.2002,(Centre hospitalo-universitaire deTizi-Ouzou): Diabétologie .page: 35
29. Sies H, 1991. Oxidative stress: introduction. In: oxidative stress, oxidants and oxidants. H. soies Ed. London: London academic press. Page. XV-XXII:
30. Favier A, 2003, Le stress oxydant. Intéret conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique. Mécanismes biochimiques.
31. File: // G:\Le stress oxydant. Htm.
32. Novelli GP, 1997. Rôle of free radicals in septic shock. J Physiol pharmacol,

48: page 517-527.

33. Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., 2000, Free radicals in chemistry, Biology and médecine, Ed. Oica internationale, Londres.
34. Alain. Favier@ujf-gronoble.fr rédacteur Michel. Seve@ujfgrenoble.FR dernière mise à jour Mercredi 09 mai 2001.
35. Ernster L and Daline G, 1995. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. BBA 1271: page 195-204.
36. Alleva R, Tomasetti M, 1997, Bompadre S and Lituanie P. Oxidation of LDL and their subfraction: kinetic aspects and COQ10 content. Mol Aspects Med 18: s, page 105-112.
37. M.E.J. Leani et J. Burns, Tentatives pharmacologiques et Nutritionnelles pour corriger le stress oxydatif. University of Glasgow, department of human Nutrition. Glasgow Royal Infirmary, Glasgow. Royaume-Uni.
38. Rehman A, NOUROOZ J, Moller W et al, 1999. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. FEBS Lett, 448:120-122.
39. LEFEVRE, G, BELJEAN- LEYMARIE.M, F. BEYERLE, D. 1998. Evaluation de la Peroxydation lipidique par le dosage des substances thiobarbiturique. <http://WWW.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/biorech/abc/does/00/00/C5/C1/article...>
40. Claudia P: Soto, Blanca L. pecez, Liliane P. favari and Josel. Reyes (1998). Prevention of Alloxane-Induced Diabetes Mellitus in the Rat by silymarin, volume 119. Issue 2, February 1998, page 125-129.
41. F.J. Alacron-Aguilar, M. Jimenez-Estrada, R. Reyes-chilpa R. Roman-Ramos. (1999). hypoglycemic effect of extracts and fraction from *Psacalium decompositum* in healthy and Alloxan- diabetic mice. Journal of ethnopharmacology 72 (2000) 21-27.
42. Wahlandirt. sobolls, siesH, Linkej. And muller M. 1979. febes Lett 97 : page 138-140.
43. ORKA WAH; ohishi N. and Yankee. ; 1979. Assay of lipid peroxydes in animal tissue by thiobarbituric reaction. Analytical biochemistry, 95: page 351-358.
44. Claiborne A; 1985. Catalase activity. In: CRC hand book of methods for oxygen radical research. Ed Greenwald RA. CRC press. Boca Raton, page 283-284.

45. ELL M A G.L.1959. Plasma antipxidants. Arch biochembiphys, 82: page 70-77.
46. Barham, D, and Tinder P, 1972 Analyst, 97: page142.
47. Lairon D: Biodisponibilité et effets biologiques des antioxydants de nature polyphénolique.
<http://greenhealth.congres.free.fr/private/congres2000/BIODISPONI%207.htm>.
48. MATHEWSCE, LEITEREH. 1999. Resistance of ALR/Lt islets to free radical.- mediated diabetogenic stress is inherited as adminanttrait. Diabetogenic stress is inherited as adminant trait. Diabetes, 48: page 2189-2196.
49. Dalton T.P. shertzer HG. Puga A , 2002.Regulation of gene expression by reactive oxygen,signaling,14.Page : 879.
50. Wasserman W et Fahl W.1997.Functional antioxidant responsive elements. Proc Natl Acad Sci.94: page 5361-5366.
51. Young J, Nielsen S, Haraldsdottir J,Dneshvar B, Lauridsen S,Knuthsen P, Crozier A,Sandstrom B and Dragsted L.1999.Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. Am J Clin Nutr. 69, 87-94.

Présenté par : -DEBIECHE Dalila -HIMROUCHE Yasmina -KHELALF Lamia	Titre : L'effet antioxydant des polyphénols dans le cas d'une toxicité pancréatique induite à l'Alloxane chez les rats Wister Albinos.	Date de soutenance : Juillet 2006
---	---	---

Résumé

Depuis long temps, la vie de l'homme est liée au monde des plantes, celles-là, en plus de leur utilisation dans l'alimentation elles sont aussi utilisées dans la thérapie de beaucoup de maladies. Or, à l'heure actuelle les plantes sont délaissées pour le compte médicaments de synthèse. Aujourd'hui la pharmacopée n'est pas toujours efficace pour certaines maladies : sida, cancer, le diabète, il faudrait alors investir la tradimédecine de nouveau.

Notre étude s'inscrit dans cette optique puisque nous avons investi les substances polyphénoliques de la plante *Ranunculus repens L* qui nous a permis de vérifier le rôle antioxydant des polyphénols dans la réduction de l'hyperglycémie par un rôle préventif dans le cas d' une pancréatotoxicité à l'Alloxane.

Mots clés : Polyphénols, RRL, Peroxydation lipidique, Pancréas, Alloxane, Stress oxydatif, Radicaux libres, MDA.

ملخص

منذ زمن طويل كانت حياة الإنسان مرتبطة بعالم النباتات ، هذه الأخيرة استعملت كمصدر للغذاء و التداوي . لكن في هذه الساعة تركت مكانها للأدوية المصنعة. أما في الوقت الحالي لم تستطع الصناعة الصيدلانية إيجاد الأدوية الفعالة لبعض الأمراض مثل : السيدا ، السرطان ، داء السكري ، وبالتالي لا بد من الإستثمار في إستعمال ادبب سنقليدي من جديد.

و دراستنا في هذا المجال تخص نبتة محددة و هي *Ranunculus repens L* مكنت من توضيح دور البيونيفينولات كمضادات للأكسدة في التخفيض من نسبة السكر في الدم للوقاية من التسمم البنكرياسي وهذا عن طريق الأوكسمان.

Summary

Since long time, the man's life is bound to the world of the plants, those, in addition to their use in the food they are also used in the therapy of a lot of illnesses. However, at the present time the plants are abandoned for the account medicines of synthesis.

Today the pharmacopeia is not always efficient for some illnesses: AIDS, cancer, the diabetes, it would be necessary to invest the tradimédecine then again.

Our survey appears in this optics since we invested the substances polyphénoliques of the *Ranunculus plant repent L* that allowed us to verify the anti-oxidizing role of the polyphénols in the reduction of the hyperglyceamia by a preventive role in the case of a pancréatotoxicité to the alloxan.