

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



*Ministère de l'Enseignement
Supérieur Et de la Recherche
Scientifique*

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEEN



Faculté des Sciences de la Nature de la Vie et des
sciences de la terre et de l'Univers - Département de
Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie
Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

**EFFETS ANTIOXYDANTS ET IMMUNOMODULATEURS D'UNE
PLANTE MEDICINALE NORD AFRICAINE, *ZIZYPHUS LOTUS L.*
(SEDRA) : ETUDE DES DIFFERENTS EXTRAITS**

Présentée par : **BENAMMAR CHAHID ELHOCINE**

Soutenue le 30/ 05 /2011 devant le jury composé de :

CHABANE SARI DAOUDI	Pr., Univ. ABB - Tlemcen	Président
BELARBI Meriem	Pr., Univ. ABB - Tlemcen	Examinatrice
BENDAHMANE Malika	Maître de Conférences, Univ. Djillali Liabès - SBA	Examinatrice
HICHAMI Aziz	Maître de Conférences, Univ. de Bourgogne, Dijon, France	Examinateur
KHAN Naim Antar	Pr., Univ. de Bourgogne, Dijon, France	Co-Encadreur
ALLALI Hocine	Maître de Conférences, Univ. ABB - Tlemcen	Encadreur

Année Universitaire 2010/2011

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



*Ministère de l'Enseignement
Supérieur Et de la Recherche
Scientifique*

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEM



Faculté des Sciences de la Nature de la Vie et des
sciences de la terre et de l'Univers - Département de
Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LaPRONA)

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

**EFFETS ANTIOXYDANTS ET IMMUNOMODULATEURS D'UNE
PLANTE MEDICINALE NORD AFRICAINE, *ZIZYPHUS LOTUS L.*
(SEDRA) : ETUDE DES DIFFERENTS EXTRAITS**

Présentée par : **BENAMMAR CHAHID ELHOCINE**

Soutenue le / /2011 devant le jury composé de :

CHABANE SARI DAOUDI	Pr., Univ. ABB - Tlemcen	Président
BELARBI Meriem	Pr., Univ. ABB - Tlemcen	Examinatrice
BENDAHMANE Malika	Maître de Conférences, Univ. Djillali Liabès - SBA	Examinatrice
HICHAMI Aziz	Maître de Conférences, Univ. de Bourgogne, Dijon, France	Examinateur
KHAN Naim Antar	Pr., Univ. de Bourgogne, Dijon, France	Co-Encadreur
ALLALI Hocine	Maître de Conférences, Univ. ABB - Tlemcen	Encadreur

CITATION

« Des chercheurs qui cherchent,
on en trouve.

Des chercheurs qui trouvent, on
en cherche. »

Charles De GAULLE

Je dédie ce travail

Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux - le Tout Miséricordieux - Que Dieu bénisse le Prophète Mouhammad, Imam des Bienheureux et Sauvegarde des Purifiés - ainsi que sa Noble Famille et ses Satisfaisants compagnons- *Amin*.

Je rends grâce à Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.

-A mon père : élever, éduquer constituent les actes les plus nobles de la vie. Grandir dans un environnement sain, avec toutes les qualités humaines c'est-à-dire la discipline, l'ordre, l'assiduité et la persévérance forment l'être humain. Ma force, ma persévérance c'est à toi papa que je le dois et ma réussite aussi.

Merci pour tout et que Dieu t'accorde longue vie pour qu'à mon tour je puisse te témoigner ma gratitude. *Amin*

-A ma regrettée ma mère : qui nous a quittés il y'a quelques années. J'aurai bien voulu que tu sois là pour assister à ce jour mémorable de ma vie. Mais Allah t'a plutôt rappelée auprès de lui, c'est aussi ça la volonté divine. Elle est toujours présente dans mon cœur , était toujours souriante, toujours de bonne humeur, disponible et attentive. Tu incarnais toutes les qualités d'une bonne mère et d'une bonne épouse. Tu as su inculquer à tes enfants l'esprit de partage, l'honnêteté et le travail. Ce

travail est le fruit de tes efforts et de tes sacrifices. Voilà ton grand fils aussi devenir ce que tu as voulu qu'il soit. Que le Tout puissant et le Miséricordieux t'accueillent dans son paradis éternel. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis. "Paix à ton âme." *Amin*

-A ma femme : toi, qui as toujours supporté mes caprices, toi, qui m'as toujours soutenu pendant les moments pénibles, toi qui pleures quand je souffre, toi qui es heureuse quand je souris. Vraiment les mots sont faibles pour traduire ma reconnaissance et mon affection. Ce travail est aussi le tien.

Puisse Dieu te prêter longue vie pour que tu atteignes tes objectifs et t'accorder beaucoup de bonheur. Que notre mariage soit préservé. *Amin*

-A mes enfants ; je prie Dieu le tout puissant afin de me les garder en bonne santé et je leur souhaite de la réussite dans la vie et au niveau des études.

-A tous mes frères, sœurs, cousins et cousines : l'éducation de notre famille est un atout pour la réussite de chacun. Le savoir est un capital inestimable, c'est la vie et l'avenir. Rester persévérant et accrocher vous à vos études. La réussite est à la portée de vos mains. Je suis fier de vous.

Merci à tous de m'avoir aidé et encouragé. Que Dieu préserve l'unité, la cohésion et la force de notre famille. *Amin*

-A mes beaux parents : Je vous prie de trouver à travers ce travail le témoignage de ma profonde gratitude pour vos conseils et encouragements.

Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur. *Amin*

Remerciements :

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide des différentes personnes. Je leur exprime ici ma plus profonde gratitude :

-Au Docteur Allali hocine, Maître de Conférences au département de chimie à Tlemcen, mon directeur de thèse, tout d'abord, qui m'a donné ma chance en acceptant de me proposer un sujet de thèse, et en effectuant avec moi les démarches de demande de bourse. Votre aide, votre rigueur dans le travail,

vos conseils et votre disponibilité m'a permis de réaliser ce travail. Je vous pris d'accepter, l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect. Je le remercie pour le temps qu'il m'a consacré.

-Au Professeur Naim A. KHAN, directeur du laboratoire UPRES 4183 « Lipides & Signalisation Cellulaire », Science Vie, Dijon (France), qui a contribué à l'obtention de cette bourse en donnant son avis favorable et qui a rendu ce travail réalisable en devenant mon co-directeur de thèse officiel. Sans cette bourse, cette thèse n'aurait pas vu le jour. Je le remercie pour sa disponibilité et ses encouragements lors de la rédaction. Je tiens à le remercier pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis de réaliser mon travail de doctorat. C'est dans ce laboratoire de renommée et présentant un environnement stimulant que j'ai eu le plaisir de passer ces 18 mois. J'ai toujours été admirablement impressionné par votre immense culture scientifique, votre rigueur dans le travail et votre amour du travail bien fait.

Vous demeurez une grande référence dans le monde scientifique notamment dans ce domaine. Malgré vos multiples occupations, vous avez dirigé ce travail avec une très grande rigueur scientifique. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

J'ai également apprécié de profiter des conseils. Je remercie également de m'avoir permis de présenter quelques uns de mes résultats lors de congrès nationaux et internationaux.

-Au Docteur A. Hichami, maître de conférences en Biologie à l'UPRES4183 « Lipides & Signalisation Cellulaire », Dijon (France), j'ai passé presque 18 mois en son compagnie, toujours agréable, il m'a apporté son aide à de nombreuses reprises. Son sourire fut salvateur dans les grands moments de stress. Sa disponibilité, ses encouragements et son amitié m'ont énormément aidé à aller au bout de ce travail et à vaincre le découragement. Je n'aurais certainement pas pu

mener à bien cette thèse sans son aide, je lui adresse mes remerciements les plus sincères.

-A Madame Josiane Prost, pour son aide technique lors de ses jours à Dijon, pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences, pour sa gentillesse et ses qualités humaines. Je vous exprime ici toute ma gratitude.

-A Anne Marie Simonin-Guengard, je tiens à te remercier pour l'aide que tu m'a apportée et ainsi tu m'as aidé à surmonter les moments les plus difficiles. Mener cette thèse à son terme a été une épreuve longue semée d'embûches, nombreux ceux qui m'ont aidé à surmonter.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

-A Monsieur Chabane Sari Daoudi, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature de la Vie et des sciences de la terre et de l'Univers, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen et directeur de notre laboratoire des Produits Naturels « Laprona ». Que je tiens à remercier vivement pour sa compréhension et son ouverture aux valeurs humaines qui ont été grandement appréciés. Votre souci du travail bien fait, votre disponibilité, Je vous prie de trouver ici toute ma gratitude pour avoir accepté de présider le jury de ce travail. Qu'il veuille bien recevoir ici mes plus vifs remerciements et mon profond respect.

-A Madame Belarbi Meriem, Professeur, et Vice doyenne de la poste graduation, faculté des Sciences de la Nature de la Vie des sciences de la terre et de l'Univers, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Vous nous avez fait l'honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations. Je vous admire pour vos connaissances scientifiques et

pour vos compétences professionnelles. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère admiration et mon profond respect.

- **A Madame Bendahmane Malika**, Maître de Conférences, Département de Biologie , Université Djilali Liabès , Sidi Bel Abbes, pour avoir été une lectrice attentive de cette thèse en tant que rapporteur. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et de pouvoir ainsi bénéficier de vos compétences. Je vous exprime ici toute ma gratitude.

- **A Monsieur Aziz Hichami**, Maître de conférences en Biologie à l'UPRES4183 « Lipides & Signalisation Cellulaire », Dijon (France), Qui m'a accordé le grand honneur de juger ce travail en acceptant de siéger dans ce jury. Je le remercie vivement de me consacrer de son temps précieux pour juger ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et ma respectueuse considération.

Je dédie aussi ce travail

Au personnel de notre département, je remercie tous les collègues de notre département de Biologie à Tlemcen en Algérie ainsi que les membres de notre laboratoire des substances naturelles Laprona pour l'aide et les encouragements.

Que je tiens à remercier vivement pour sa compréhension et son ouverture aux valeurs humaines qui ont été grandement appréciés. Qu'il veuille bien recevoir ici mes plus vifs remerciements et mon profond respect.

A mes camarades du laboratoire de Dijon, pour toute l'affection et la tendresse que vous avez manifestées à mon égard et les moments agréables passés ensemble. Je remercie plus particulièrement docteurs Béatrice Mercier et Akadiri yessoufou.

Recevez à travers ce travail toute ma reconnaissance. Bonne chance pour le futur.

Je n'oublierai pas les aides permanentes reçues du personnel administratif du département de Physiologie (Dijon), Monique Baudoin et Michel Saunier.

Une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, café ou un repas pendant ces 18 mois : Nassima, Issam, Souleymane, Gado, Eugène, Oussama, et toute la troupe du très convivial laboratoire de l'unité EA 8341 Lipides et signalisation cellulaire (Dijon).

A tout le personnel des différents laboratoires, pour l'accueil et la bonne atmosphère durant ces travaux. Pour les bons moments que nous avons partagés ensemble. Trouvez à travers ce travail toute ma reconnaissance et mon affection.

Au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, ces personnes, ainsi que le comité d'attribution des bourses de doctorat, qui m'ont permis de me lancer dans cette aventure. Je leurs en suis extrêmement reconnaissant.

A mes amis (e), je vous remercie pour le soutien que vous m'avez accordé et beaucoup de courage à vous tous.

Enfin, parallèlement aux études, aux expériences, aux nuits blanches passées au laboratoire ou devant l'ordinateur, il y'a toujours une vie agréable en dehors de cette ambiance en compagnie des gens qu'on aime, je remercie d'avantage SaadAllah, Ahmed, Yacine, Youcef, Benouada et toute l'équipe de football à Fontaine Douche (Dijon), pour leur générosité et leur accueil, je n'oublierai jamais, quelles que soient les circonstances du temps et du lieu, les soirées que nous avons passées ensemble.

C'est un bonheur exceptionnel que d'effectuer des recherches dans le cadre d'une thèse de doctorat qui plus est, dans celui de la magnifique ville de Dijon et de sa région.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué directement et indirectement à l'aboutissement de cette thèse ; que celles et ceux que j'ai pu oublier de mentionner se trouvent ici reconnus. Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

**Ce travail rentre dans le cadre de la coopération et des
échanges interuniversitaires, Accord programme de
Coopération Algéro-Français :
PNE/ENSEIGNANT/FRANCE/2008-2010**

**Il a été réalisé
A l'UPRES –EA 4183 « Lipides et Signalisation
Cellulaire »
Faculté des Sciences Gabriel,
Université de Bourgogne, Dijon, France**

Apports personnels

*Liste des Publications et
Communications*

Certains aspects du présent travail ont été partiellement publiés ou présentés lors des congrès nationaux et internationaux.

Communications Nationales :

1) -**Benammar C**, Nedjraoui M, Taleb S. **Contribution à l'analyse chimique de l'aliment destiné au poulet de chair, produit par l'unité d'alimentation de Remchi. (Tlemcen)**

Forum Scientifique International-écologie et environnement Tlemcen, le 17 mai 2005.

-Benammar C, Merzouk H. Détermination du pouvoir antioxydant des diabétiques de la région de Tlemcen.

2) -Benammar F, **Benammar C**, Benkada D. **Contribution à l'étude des caractéristiques physico-chimique et analyse par chromatographie de l'huile essentielle de *Ruta chalenpensis* L (Fidjel).** Forum Scientifique International-écologie et environnement Tlemcen, le 18-19 avril 2006.

3) -**Benammar C**, Saker M, Merzouk H. **Stress oxydatif et diabète dans la région de Tlemcen.** Symposium Algéro-Français de pharmacologie sur le stress, Bejaia le 10-12 sept. 2006.

4) -Hassani, **Benammar C**. **Contribution à l'étude de la qualité physico chimique et microbiologique de deux miels (miel de Niger, miel de Tlemcen).** Forum Scientifique National de SNV, Santé Nutrition et Environnement, Tlemcen le 17 septembre 2007.

Communications internationales

5) -Benammar F, **Benammar C**, Benkada D. **Etude comparative des huiles essentielles de *Ruta chalenpensis* (Fidjel) au niveau des différentes stations de Tlemcen.** IIème Symposium international sur les plantes médicinales SIPAM II, Marrakech (Maroc) le mars 2006.

6) -**Benammar C**, Belarbi M, Allali H. **Contribution à l'étude physico-chimique et du pouvoir antimicrobien de *Zizyphus lotus* L. de le Région de Tlemcen.** Congrès international sur les plantes Médicinales et aromatiques CIPMA-2007 Fès le 22 mars 2007.

7) -**Benammar C**, Hichami A, Hichami A, Yessoufou A, Simonin A, Belharbi M, Allali H et Khan N. ***Zizyphus lotus* (L.) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation.** *Clin. Fund. Pharmacol .Volume 23, Supplément 1 , juin 2009.*

Congrès de physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeute, P2T 2009, Marseille (France) le 15-17 avril 2009.

8) -**Benammar C**, Hichami A, M Bendahmane, Yessoufou A, Simonin A-M, Allali H et Khan N **Antidiabetic and antioxidant effects of extracts of *Zizyphus lotus L.* in wistar rats.**

Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutes, P2T 2010, Bordeaux (France) le 20 mars 2010.

9) -**Benammar C**, Hichami A, M Belarbi, Yessoufou A, Simonin A-M, Allali H et Khan N **Effets antioxydants et immunomodulateurs d'une plante médicinale nord africaine, *Zizyphus lotus L.* (sedra) : Etude des différents extraits.**

Association Tunisienne de Toxicologie, 2^{èmes} Journées Scientifique de l'ATT et le 5^{èmes} Symposium International de Monastir : Processus Toxiques, leurs relations avec l'environnement et la santé. Monastir 17-19 Décembre 2010.

Publications internationales

9) -**Benammar C**, Hichami A, Yessoufou A, Simonin A-M, Belarbi M, Allali H et Khan N.

Zizyphus lotus (L.) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation. BMC Complementary and Alternative Medicine 2010, 10:54.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Première partie : « Effets antioxydants et immunomodulateurs de <i>Zizyphus lotus. L</i> (Sedra) sur la prolifération des cellules T humaines. ».....	8
Revue bibliographique.....	9
1.La plante <i>Zizyphus lotus L</i> (Sedra).....	10
2.Vitamines antioxydantes.....	13
2.1. Vitamine A.....	13
2.1.1.La vitamine A et système immunitaire.....	14
2.2. Vitamine E.....	15
2.2.1.Vitamine E et système immunitaire.....	18
2.3. Vitamine C.....	18
2.3.1.Vitamine C et système immunitaire.....	18
3. Acides gras polyinsaturées et système immunitaire.....	19
4. Activation des lymphocytes T.....	22
4.1. Récepteur des cellules T (T cell receptor TCR).....	22
4.2. Activation des lymphocytes T.....	23
Matériels et Méthodes.....	25

1. Matériels végétal.....	26
1.1. Préparation des extraits aqueux de <i>Zizyphus lotus</i> . L.....	26
2. Dosage des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse.....	26
3. Dosage des vitamines A et E sériques.....	27
4. Dosage de la vitamine C.....	27
5. Evaluation du statut antioxydant.....	27
6. Test de prolifération cellulaire et blastogenèse des cellules T.....	28
7. Etude de l'expression de l'IL- 2 par la technique de RT-PCR en temps réel :.....	28
7.1.Extraction des ARNs totaux et traitement à la DNase.....	28
7.2.Technique de RT-PCR.....	29
7.3. PCR quantitative.....	29
Résultats.....	31
1. Composition en acides gras.....	32
2. Dosage des vitamines.....	33
3. Mesure du KRL.....	33
4. Les effets de <i>Zizyphus lotus</i> L. sur la blastogenèses et l'expression IL-2.....	34
5. Les effets de <i>Zizyphus lotus</i> L. sur l'expression IL-2.....	34
Discussion.....	36
Conclusion.....	40
Deuxième partie : « Effets antidiabétiques et antioxydantes d'extraits de pulpe et tige de <i>Zizyphus lotus</i> L. chez le rat Wistar. ».....	42
Revue bibliographique.....	43
1. Diabète.....	44
1.1. Diabète de type1.....	46
1.2. Diabète de type 2.....	46
2. Métabolisme du glucose.....	47
2. 1. Rappels physiologiques.....	47
2. 2. Rôle de l'insuline.....	48
2. 2. 1. Aspects généraux.....	48
2. 2. 2. Régulation de l'insulinosécrétion.....	49
2. 2. 3. Effets métaboliques de l'insuline.....	50

3. Statut antioxydant.....	51
3.1. Les radicaux libres.....	52
3.1.1. Espèces réactives de l’oxygène (ERO).....	52
3.1.2. Espèces réactives dérivées de l’azote.....	55
3.2. Défense de l’organisme contre le stress oxydatif.....	56
3.2.1. Systèmes antioxydants endogènes.....	54
3.2.2. Antioxydants non enzymatiques.....	57
3.2.3. Systèmes antioxydants exogènes.....	58
4. Diabète et stress oxydatif.....	59
Matériels et méthodes.....	61
1. Choix du modèle expérimental.....	62
2. Généralités du suivi des rats	62
2.1. Animaux et régimes.....	62
2.2. Gavage.....	63
2.3. Test oral de tolérance au glucose (GTT).....	63
2.4. Le sacrifice des animaux et les prélèvements d’organes.....	63
3. Analyses biochimiques.....	64
3.1. Glycémie.....	64
4. Evaluation du statut antioxydant.....	64
4.1. Dosage de l’activité de la glutathion peroxydase.....	65
4.2. Dosage de l’activité de la glutathion réductase.....	65
4.3. Dosage de l’activité de la superoxyde dismutase.....	65
4.4. Dosage de l’activité de la catalase.....	65
4.5. Détermination de la teneur en glutathion total.....	66
5. Evaluation du pouvoir anti-oxydant de molécules par le test ORAC.....	66
6. Analyse statistique.....	67
Résultats.....	68
1. Mesure de la glycémie.....	69
2. Test de tolérance au glucose.....	69
3. Mesure du statut antioxydant dans le sérum.....	70
4. Mesure de l’activité ORAC.....	71
5. Mesure de l’activité des enzymes antioxydantes endogènes.....	72
5.1. Dosage de l’activité de la catalase	72

5.2. Dosage de l'activité des enzymes : glutathion peroxydase (GSH-Px), glutathion réductase (GSSH-Red) et superoxyde dimutase (SOD).....	73
5.3. Mesure du taux de Glutathion réduit et total.....	75
6. Estimation des antioxydants exogènes.....	76
6.1. Teneurs en vitamines A, E et C sériques.....	76
Discussion.....	78
Conclusion générale.....	83
Références bibliographiques.....	86
Publication.....	98

Liste des Tableaux

Tableau 1: Séquences des couples d'oliginucléotides.....	30
Tableau 2: Composition en acides gras (g/100 g de lipides totaux) des différentes parties de <i>Zizyphus lotus</i> (L.).....	32
Tableau 3 : Teneur en Vitamines dans les différentes parties de <i>Zizyphus lotus</i> (L.).....	33
Tableau 4 : Nature des différentes espèces radicalaire impliquées dans le stress oxydatif.....	53
Tableau 5 : Estimation des apports quotidiens optimaux en antioxydants.....	59
Tableau 6 : Evolution de la glycémie (g/L) des rats normaux et diabétiques traités ou non durant 3 semaines par 300 mg/kg d'extrait de pulpe et tige.....	69
Tableau 7: Activité de différentes enzymes antioxydantes dans le pancréas d'animaux contrôles et diabétiques.....	73
Tableau 8 : Activité de différentes enzymes antioxydantes dans les érythrocytes d'animaux contrôles et diabétiques.....	74
Tableau 9 : Activité de différentes enzymes antioxydantes dans le foie d'animaux contrôles et diabétiques.....	75

Liste des Figures

Figure 1: <i>Zizyphus lotus</i> L.....	12
Figure2: Fruits de <i>Zizyphus lotus</i> L.....	12
Figure 3 : Epine de <i>Zizyphus lotus</i> L.....	12
Figure 4 : Fleur de <i>Zizyphus lotus</i> L.....	12
Figure 5: Structure chimique de la vitamine A et du bêta-carotène	14
Figure 6: La vitamine A (all-trans-RA) l'acide rétinoïque (9-cis-RA).....	15
Figure 7 : Structure chimique de la vitamine E.....	16
Figure 8: Rôle de la vitamine E dans l'inhibition de la propagation des radicaux libres et sa régénération par la vitamine C.....	17
Figure 9 : Représentation schématique de la biosynthèse des AGPI des familles n-6 et n-3.....	20
Figure 10: Pouvoir antioxydant des différentes parties de la plante.....	33
Figure 11 : Effet des différents extraits de <i>Zizyphus lotus</i> L sur la prolifération cellulaire.....	34
Figure 12: Les mesures de l'activité des différentes parties de <i>Zizyphus lotus</i> L. sur l'expression de l'IL-2.....	35
Figure 13 : Mode d'action de l'insuline.....	50
Figure 14 : Balance oxydants/ antioxydants en faveur d'un stress oxydatif.....	52

Figure 15 : Production de radicaux libres oxygénés et azotés ainsi que d'autres espèces réactives dans les cellules de mammifères.....	54
Figure 16 . Elimination des radicaux libres oxygénés et azotés ainsi que d'autres espèces réactives, chez les mammifères.....	58
Figure 17 : Cinétique de piégeage des espèces radicalaires (produites par l'AAPH) par la β -phycoérythrine en présence de Trolox.....	66
Figure 18 : Test de tolérance chez des rats normaux traités, effectué pendant 2 heures, par gavage de 3 g/kg de glucose.....	70
Figure 19 : Test de l'hémolyse de globule rouges par le sérum d'animaux contrôles et diabétiques (STZ).....	71
Figure 20 : Test de l'ORAC d'animaux contrôles et diabétiques.....	72
Figure 21 : Teneurs sériques en vitamines A, E et C.....	77

Liste d'abréviations

AA : Acides aminés
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
ATP : Adénosine triphosphate
ARN: Acide ribonucleique
AG : Acide gras
Ag : Antigène
APC : Allophycocyanine
BCR : B Cell Receptor
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
CCM : Chromatographie sur couche mince
Cu : Cuivre
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
DT2 : Diabète de type 2
ERO : Espèces réactives dérivées de l'oxygène
EDTA-Na ₂ : Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
HCL : Acide chloridrique
H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène
GR: Globules rouges
GH-RH : GH releasing hormone
GLUT-2 : glucose transporter-2
GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
Hb : Hémoglobine
KCL : Chlorure de potassium
IL-2 : interleukine- 2
IL-4 : interleukine-4
IP : Intrapéritoniale
MgCl₂ : Chlorure de magnésium hexahydraté
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Nacl : Chlorure de sodium
OMS : Organisme Mondiale de la Santé
ORAC : Oxygen-Radical Absorbance Capacity assay
KRL : Kit Radicaux Libres
PCR : Réaction en chaine par polymérase (Polymérase Chaine Reaction)
RLO : Radicaux libres oxygénés
ROS : Substances réactives à l'oxygène,
SAT : Statut anti-oxydant total
Se : Sélénium
SOD : Superoxyde dismutase
UI : Unité internationale
TCR : T Cell Receptor
Zn : Zinc

Introduction

générale

1

La phytothérapie est une science des plantes médicinales (Provost,1991), elle vient du mot grec « phuton » : plante et « Thérapie » : traitement, signifie traitement par les plantes (Carillon, 2000). L'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante (O.M.S, 2000). La science des plantes médicinales est vieille comme le monde (Brelet , 2002) et semble avoir pris naissance en même temps que l'homme. Elle s'est développée parallèlement dans toutes les civilisations avant de se croiser, suivant le jeu des conquêtes et des voyages (Furnham et al ., 2000)

Avec la venue de la science médicale qui n'accordait aucun crédit aux vertus médicinales des plantes, les traditions se sont perdues, et ont été mal transmises. Il est donc difficile de discerner parmi toutes les recettes de grands-mères et les traditions folkloriques les véritables usages des plantes médicinales. Nos grands-mères connaissaient les effets bénéfiques des plantes mais ne comprenaient pas toujours leurs spécificités, certaines de leurs connaissances furent mal transmises et d'autres étaient mauvaises (Provost, 1991).

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé des hommes (Carillon, 2000). A l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles représentent près de 60% des médicaments, dont nous disposons (O.M.S, 2000). Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nées de la modification chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme tête de séries (Fouché *et al.*, 2000)

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan. Nous distinguons 2 types de phytothérapie (Lamnaouer, 2000):

- *Une pratique traditionnelle*, parfois très ancienne, basée sur l'utilisation des plantes médicinales selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'O.M.S., cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans les pays en voie de développement. C'est une médecine parallèle du fait l'absence d'études Clinique.
- *Une pratique basée sur l'avancée scientifique et la recherche* des principes actifs des plantes (Larousse, 2001).

La longue tradition de médecine végétale se poursuit jusqu'à nos jours en Inde, en Chine et dans beaucoup de pays africains et sud-américains. En Afrique, jusqu'à 80% de la population utilise la médecine traditionnelle. Précisément dans certains pays d'Afrique, les plantes médicinales représentent la seule source de traitement pour près de 90% de la population. Dans les pays asiatiques, cette médecine continue d'être largement utilisée (O.M.S., 2003).

Actuellement Plusieurs pays d'Afrique y compris l'Algérie mènent des Investigations visant à développer des médicaments issus de plantes de médecine traditionnelle. En réalisant des études phytochimiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques pour la mise au point de médicaments traditionnels améliorés (M.T.A.) utilisés, entre autre, dans le traitement du diabète non insulino-dépendant. En 1978, l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) s'est

résolument engagée à revaloriser la pharmacopée traditionnelle afin de pouvoir satisfaire aux besoins de santé des populations.

Notre travail s'inscrit dans cette perspective et a été motivé par :

- la volonté de promouvoir et de valoriser les plantes médicinales de l'Algérie
- la nécessité de faciliter l'accès des populations aux médicaments à moindre coût compte tenu du prix élevé des médicaments conventionnels dans les pathologies inflammatoires et microbiennes
- la volonté de connaître le principe actif, puisque Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses
- la contribution à l'étude de l'activité biologique.

L'O.M.S. (2003) a répertorié plus de 22000 plantes médicinales utilisées par les médecines traditionnelles, mais seulement quelques centaines sont employées couramment aujourd'hui. Elles ont toutes une activité pharmacologique reconnue et constituent un réservoir de matières premières à la source de presque la moitié des spécialités pharmaceutiques classiques (Fouché *et al.*, 2000). Ainsi de l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Hostettmann *et al.*, 1998).

Le diabète constitue un problème de santé publique. En 1998, l'OMS estimait à 135 millions le nombre de personnes qui souffraient du diabète et prévoyait une augmentation de 122 % en 2025. Pour la même période, il est prévu, dans les pays en développement,

2

une augmentation de 170 % du nombre d'individus affectés par le diabète sucré, soit de 84 à 228 millions (Who, 2002). La prise en charge des diabétiques nécessite des moyens importants et n'est pas toujours à la portée de la majeure partie de la population africaine.

De nombreuses recettes à base de plantes sont utilisées en médecine traditionnelle africaine pour la prise en charge du diabète. De nombreuses études scientifiques ont démontré les propriétés hypoglycémiantes de plantes africaines comme **Ocimum gratissimum**, *Nauclea*

latifolia. *Vernonia amygdalina* (Gbolade, 2009), *Sclerocarya birrea*, *Cassia occidentalis* et *Striga* sp. (Gueye, 1973 ; Coulibaly, 1989 ; Yaro, 1992).

En Algérie, la prévalence du diabète est en progression rapide et le nombre maximal de personnes diabétiques varie entre 1 et 1,5 millions (Belhadj, 2005). Ce nombre a augmenté et atteint 2,5 millions de diabétiques. L'évolution croissante du nombre de diabétiques est liée à l'influence de facteurs environnementaux. Plusieurs paramètres ont été mis en cause, en particulier un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants. En effet, l'excès de nourriture hypercalorique, combiné à un mode de vie sédentaire, induit une surabondance de glucides et d'acides gras dans le muscle et le tissu adipeux, conduisant à la génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène, particulièrement de l'anion superoxyde, issu de la chaîne mitochondriale de transport d'électron (Brownlee, 2001). Au cours de l'hyperglycémie, cette génération d'espèces radicalaires est importante provoquant des dommages cellulaires (Wright *et al.*, 2006).

Le stress oxydatif a non seulement un rôle dans les complications vasculaires liées au diabète, mais aussi dans l'aggravation de l'insulino-résistance et de la destruction des cellules β pancréatiques (Baynes, 1991). Les cellules β sont vulnérables au stress oxydatif en raison, d'une part, du rôle des radicaux libres comme seconds messagers des interleukines dans la réaction auto-immune (Rabinovitch, 1998) et d'autre part, de leur pauvreté en enzymes antioxydantes (Cu/Zn-SOD, catalase, GSH-Px) et en glutathion réduit (Lenzen *et al.*, 1996). Il a été montré que l'hyperglycémie et l'augmentation des acides gras libres dans le sang des diabétiques entraînent une activation de la NAD(P)H oxydase et une production accrue formation of superoxide O₂⁻ qui est une espèce réactive de l'oxygène (Baynes, 1991). En effet, L'oxygène moléculaire (O₂) est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites

3

et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR). Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la défense de l'organisme contre les bactéries. Aux doses excessives, les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme. La surproduction des EOR au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de

l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus dû au vieillissement.

Une étude a mis en évidence que des cellules insulinosécrétrices surexprimant des enzymes antioxydantes (la glutathion peroxydase, la catalase ou la Cu/Zn superoxyde dismutase), sont protégées contre l'effet délétère d'agents oxydants (Tanaka *et al.*, 2002). Au cours du diabète, il y'a une augmentation des radicaux libres et une altération des défenses due à la glycation des enzymes antioxydantes, et à la diminution de leurs cofacteurs (Zn, Se, Cu) (Strain, 1991). Il a été mis en évidence, chez des patients diabétiques de type 2, que le stress oxydatif est augmenté en réponse à une hyperglycémie post-prandiale (Ceriello *et al.*, 2002). Cette augmentation des radicaux libres induit une vasoconstriction associée au diabète de type 1 et de type 2 (Hink *et al.*, 2001).

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités antioxydantes. Les substances antioxydantes contenues dans les plantes ou les herbes, tels que les polyphénols les vitamines A, C et E peuvent être isolées puis utilisées dans le traitement de stress oxydatif (Packer *et al.*, 1999 ; Middleton *et al.*, 2000).

Ce travail vise la valorisation du jujubier, une plante de la flore de la région de Tlemcen, utilisée en médecine traditionnelle. Cela permettra de relier les éléments d'informations apportés par les ethnobotanistes aux effets physiologiques observés par les biologistes.

Le jujubier est un arbre cité dans plusieurs histoires légendaires :

- Le jujubier doit son nom latin à une légende d'après laquelle ses rameaux auraient servi à confectionner la couronne d'épines du Christ. Il est également évoqué dans le

4

Coran et considéré par des musulmans comme arbre sacré, ou arbre du paradis.

- Selon une légende grecque, la nymphe *Lotus* qui voulait échapper aux assiduités de Priape « demanda à être changée en un arbuste épineux à fleurs rouges que l'on croit être le jujubier ».
- Une tradition arabe veut que le jujubier du Paradis ait autant de feuilles que d'êtres vivants au monde «chaque feuille portant le nom d'une personne et ceux de ses père et mère ».

Lors de la cérémonie appelée « Nuit du Milieu de Shaaban » l'arbre, dit-on, est secoué « et lorsqu'une personne est destinée à mourir dans l'année qui vient, la feuille sur laquelle son nom est gravé tombe; si elle doit mourir très prochainement, sa feuille est presque entièrement desséchée, seule une petite section demeure verte ; selon le temps qui lui reste à vivre, la partie verte est plus ou moins grande » (Claudine, 2007).

La contribution des laboratoires suivants a énormément aidé à la réalisation de ce travail :

- Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyse (COSNA), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

- Laboratoire des Produits Naturels, (Laprona) Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

- Laboratoire « Lipides et Signalisation Cellulaire » UPRES EA 4183 , Faculté des Sciences Gabriel, Université de Bourgogne, Dijon, France sous la direction du Professeur N. A. KHAN. Ce dernier laboratoire s'est fixée comme objectif de rechercher les effets bénéfiques sur la santé de *Zizyphus lotus* L en évaluant ses propriétés immunomodulatrices, antioxydante et antidiabétique.

Comme nous ne disposons d'aucune étude qui différencie l'activité biologique des différentes parties de la plante, on a choisis de mener notre étude de front en utilisant les 5 parties de *Zizyphus lotus* L : les feuilles, la racine, le noyau, la tige et la pulpe. Ainsi nous avons effectué deux études une première *in vitro* et qui constitue la première partie de la thèse et la seconde *in vivo* présentée dans la deuxième partie de la thèse.

Première partie de thèse étude in vitro :

Comme on s'était intéressé au pouvoir antioxydant et immunomodulateur de *Zizyphus lotus* L. Nous avons procédé comme suit :

- 1) nous avons préparé les extraits aqueux des différentes parties, pour cela nous avons effectué une décoction (100 g plante /500ml)

5

et une lyophilisation du surnageant après l'avoir filtré

- 2) nous avons analysé et quantifié les vitamines antioxydantes (vitamines A, E et C) et les acides gras dans les différentes parties de la plante

- 3) nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antioxydant des différentes parties de *Zizyphus lotus* L. Le principe est d'évaluer la protection de la lyse des globules rouges, en présence de

radicaux libres, par les extraits de *Zizyphus lotus* L. en référence un standard dérivé de la vit E qui est le trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

4) comme le diabète est associé à une altération du système immunitaire nous avons évalué l'effet immunomodulateur de *Zizyphus lotus* L. Pour cela nous avons évalué l'effet des différentes parties de *Zizyphus lotus* L. sur la prolifération cellulaire T et sur l'expression de l'ARNm de l'IL2. IL2 est cruciale pour la prolifération cellulaire immunitaire T.

Nous avons utilisé comme modèle les cellules T humaines les cellules Jurkat, une lignée cellulaire classiquement utilisée pour étudier le fonctionnement des lymphocytes T humaines *in vitro*.

Deuxième partie de thèse, étude in vitro :

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'effet antidiabétique et antioxydant des différentes parties de la plante. Pour ce faire nous avons rendu des rats Wistar diabétiques par injection de la streptozotocine (STZ) puis on les a gavés avec les extraits aqueux des différentes parties de la plante *Zizyphus lotus* L. pendant trois semaines. Comme nous avons observé que seuls les extraits de tige et pulpe diminuent la glycémie, nous nous sommes intéressés par la suite uniquement à ces deux parties de la plante.

Nous avons étudié les paramètres liés au diabète :

- 1- Nous avons évalué l'effet des extraits de *Zizyphus lotus* L sur la glycémie,
- 2- Nous avons évalué l'effet des extraits de *Zizyphus lotus* L sur le statut antioxydant global du plasma (test ORAC, KRL),
- 3- Nous avons évalué l'effets des extrait de *Zizyphus lotus* L sur la concentration des vitamines antioxydantes plasmatiques (vitamines plasmatiques A, E et C), et sur l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dimutase cytosolique (Cu/Zn-SOD), catalase, glutathion peroxydase (GSH-Px), glutathion réductase (GSSH-Red), dans les globules rouges ainsi que dans certains tissus comme le foie et pancréas. Nous avons également mesuré le glutathion dans ces organes.

Première

partie :

« Effets antioxydants et immunomodulateurs de *Zizyphus lotus. L* sur la prolifération des cellules T humaines. »

*Revue
bibliographique*

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes constituent une richesse des pays africains et une source importante de matières premières pour l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire.

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Hostettmann *et al.*, 1998).

La longue tradition de médecine végétale se poursuit jusqu'à nos jours en Inde, en Chine et dans beaucoup de pays africains et sud-américains. La médecine traditionnelle se rapporte aux pratiques et approches utilisant, séparément ou de façon combinée des médicaments d'origine végétale, animale et minérale, des thérapies spirituelles, des techniques et exercices manuels pour diagnostiquer, prévenir et traiter des maladies ou pour maintenir ou améliorer le bien être (Furnham *et al.*, 2000).

1. La plante *Zizyphus lotus* L (Sedra):

La plante que nous avons retenue est une dicotylédone. Il s'agit d'une Rhamnacée, *Zizyphus lotus* L., appelée localement Sedra. Le choix de celle-ci a été guidé par les indications d'usage traditionnel mais aussi par le fait que cette plante appartient à une famille botanique riche en molécules ayant des activités biologiques variées. *Zizyphus lotus* L. est réputée en médecine traditionnelle algérienne. Son identification botanique est réalisée par Pr Benabadji Nouri du Département de biologie Université Aboubekr Belkaïd –Tlemcen. La famille des Rhamnacées est une famille des plantes dicotylédones qui comprend 900 espèces auprès de 58 genres. Ce sont des arbres, des arbustes, des lianes ou des plantes herbacées (Waston *et al.*, 1992;

Punt *et al.*, 2003). Les Rhamnacées sont plus particulièrement présentes dans les régions tropicales et subtropicales.

Le mot *Zizyphus* vient du grec *Zizyphos* mais le mot n'apparaît qu'au deuxième siècle, et qui viendrait du nom arabe *Zizouf*. Environ 100 espèces principalement dans les régions tropicales et subtropicales de l'Asie et des Amériques existent, tandis que quelques espèces vivent en Afrique et dans les régions tempérées (Bonnet, 2001).

9

Les espèces de *Zizyphus* ont plusieurs caractéristiques physiologiques et morphologiques qui peuvent contribuer à leurs capacités à s'adapter aux environnements arides.

Le jujubier est peu exigeant en eau. Cet arbrisseau a une croissance très lente et commence à porter des fruits vers l'âge de 4 ans. Ils peuvent continuer à paraître vers 20 à 25 ans. Les fruits sont cueillis parfaitement murs en septembre-octobre. C'est la période au cours de laquelle ils se détachent facilement (Bonnet, 2001).

Il existe environ 122 espèces de ce genre dont voici quelques un :

- *Zizyphus Jujuba* (chinois jujube)
- *Zizyphus Mauritiana* L. : jujubier indien c'est un arbuste à rameaux cotonneux et à feuilles tomenteuses dessous ; fruits très petits. (Yi-ling., and Pan-Kai,(1982); Catoire *et al.*, 1999).
- *Zizyphus spina-christi* L. Wild. : C'est un arbuste, très épineux avec des rameaux flexibles, grêle disposé en zigzag (Lemoine, 2005), pouvant atteindre 6 m ; à feuilles ovales glauques et à petits fruits globuleux, plus ou moins ovoïdes (d'environ 15 mm), à pulpe charnue comestible.

Le *Zizyphus lotus* L. appelé également jujubier des Lotophages ou jujubier de Berbérie pousse sur les rives sud de la Méditerranée jusqu'en Afghanistan.

Il est issu de la famille des Rhamnacées (Baba Aissa, 1999). C'est un arbrisseau sous forme de buisson ne dépassant pas 2.5 m à rameaux flexueux, très épineux gris blanc poussant en zigzag (Claudine, 2007). Les feuilles sont petites courtes, et ovales plus au moins elliptiques de 1 à 2 cm de longueurs et de 7 mm de largeur (Bayer and Butter, 2000). Elles sont moins deux fois plus longues que larges, à marges fortement dentées. Elles sont lisses et brillantes sur les deux faces, et présentent trois nervures longitudinales saillantes partant du pétiole (Baba Aissa, 1999)

Les fleurs de *Zizyphus lotus* L. sont très visibles de couleurs jaunes avec des sépales ouvertes en étoiles, des petits pétales et un ovaire supère bisexuel et fleurissent en juin (Baba Aissa, 1999 ; Claudine, 2007). Un fruit ovoïde-ovale, ayant la forme et la grosseur d'une belle olive. D'abord vert puis jaune, il devient rouge foncé quand il est mûr, en octobre. Sa pulpe épaisse peut être d'un blanc

verdâtre et d'une saveur à la fois douce et acidulée ou brun jaunâtre, un peu glutineuse, à saveur sucrée et fade (Bayer and Butter, 2000).

L'aire de répartition du *Zizyphus lotus* L. s'étale sur tout le Nord du Maghreb (Quezel, and Santa, 1963). *Zizyphus lotus* L. est très répandu dans les régions arides d'Algérie du Sud, Ain Ouessara et Maessad (wilaya de Djelfa) à climat aride et Taghit wilaya de Bechar au climat saharien (Mounni, S., 2008). On peut donner quelques appellations, en Français : jujubier, dindonnier ; en Italien : ginggido; en arabe : sedra, djerdjer, azar, n'beg.

10



Figure 1: *Zizyphus lotus* L.



Figure2: Fruits de *Zizyphus lotus* L.



Figure 3 : Epine de *Zizyphus lotus* L.



Figure 4 : Fleur de *Zizyphus lotus* L.

<http://www.botanic.co.il/a/picschow.asp?qseur=zizlot2>

Zizyphus lotus L. est une plante médicinale utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme sédatif, analgésique, tonique et anti-inflammatoire (Claudine, 2007 ; Mounni, 2008, Ghedira, 1994). Le décocté des racines est utilisé par les personnes diabétiques comme

11

hypoglycémiant (Lahlou, 2002 ; Allali, 2008). *Zizyphus lotus* L. est également, utilisé pour soigner le tube digestif et le foie (Baba Aissa., 1999). Les feuilles de *Zizyphus lotus* L. sont utilisées contre les piqûres des vipères au Sahara (Benchalah, 2004), et les fruits sont préconisés dans le traitement de la gorge et les affections respiratoires (Baba Aissa, 1999 ; Borgi, 2007).

L'intérêt de l'activité anti-inflammatoire est dû aux des saponosides et des oligomères flavonoïques totaux (OFT) des racines. Les résultats des travaux de l'équipe de (Borgi, and Chouchane, 2007), ont montré que les saponosides et les OFT des écorces de racines de *Zizyphus lotus* L montrent une inhibition maximale de l'œdème de la patte (induit expérimentalement chez la souris) de l'ordre de 88.23 et 75.19 % respectivement à 3 heures après l'injection de l'agent inflammatoire. De plus, cette même équipe a prouvé que d'autres extraits des racines (aqueux, chloroformique, acétate d'éthyle et méthanolique) et l'extrait des saponosides des feuilles possédaient des activités anti-inflammatoire et analgésique (Borgi *et al.*, 2008). Les extraits obtenus par épuisements successifs à l'éther de pétrole, au chloroforme, à l'acétate d'éthyle et au méthanol se sont avérés très actifs *in vitro* vis-à-vis de neuf souches de champignons pathogènes (Lahlou *et al.*, 2002). (Ghedira *et al.*, 1995) ont rapporté que le mélange des alcaloïdes possède une activité antibactérienne. Borgi *et al.* (2007) ont montré que les extraits aqueux des racines, des feuilles et des fruits possèdent une activité anti-ulcérogénique. En 1978, l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) s'est résolument

engagée à revaloriser la pharmacopée traditionnelle afin de pouvoir satisfaire aux besoins de santé des populations. Notre travail s'inscrit dans cette perspective.

2. Vitamines antioxydantes :

Ce sont des substances dont l'organisme ne peut en général faire la synthèse, nécessaires à l'organisme et à sa croissance agissant à doses minimes, dépourvues de valeur calorique intrinsèque et qui doivent être apportées par le régime alimentaires. Les vitamines ont le plus souvent un rôle de cofacteur dans les synthèses enzymatiques et membranaires. Les besoins en vitamines sont impératifs en période de croissance (Hercberg *et al.*, 1998).

2.1. Vitamine A : Elle est une vitamine liposoluble. Dans l'organisme, elle existe sous forme de rétinol, de rétinal, d'acide rétinoïque (RA) et de rétinyl phosphate. Ces molécules sont altérées par l'oxygène de l'air, altérations accélérées par la lumière et la chaleur. Les aliments d'origine animale (viandes, produits laitiers et surtout foie) contiennent du rétinol et des esters

12

de rétinol alors que les végétaux contiennent essentiellement des carotènes qui sont des précurseurs de vitamine A. Une molécule de bêta-carotène, par hydrolyse de la liaison 15-15' sous l'influence d'une caroténoïde monooxygénase (β -carotène 15,15' monooxygénase), donne deux molécules de vitamine A. Par contre, les deux autres carotènes (alpha et gamma) ne donnent naissance qu'à une seule molécule de vitamine A.

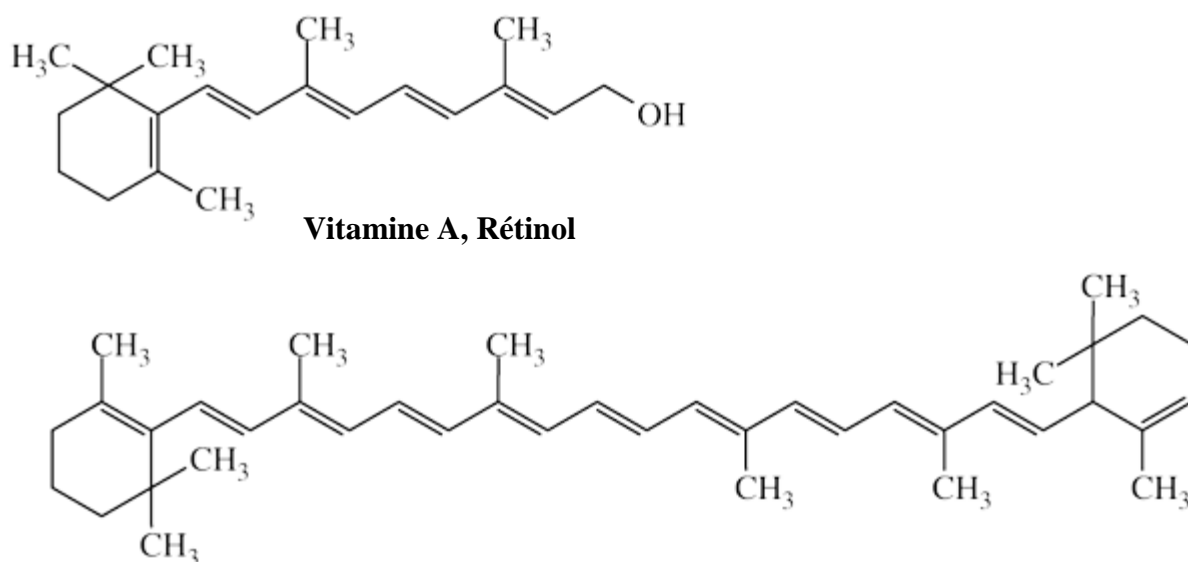


Figure 5: Structure chimique de la vitamine A et du bêta-carotène

Les besoins en vitamine A sont estimés à environ 5 000 UI par jour. Une unité internationale de vitamine A correspond à 0,3µg de rétinol. Le rétinol est considéré comme l'unité de base, le rétinol-équivalent, ce qui permet de comparer l'activité vitaminique des différents dérivés de la vitamine A. La forme la plus utile de vitamine A est le rétinol, bien qu'on puisse également en trouver sous forme de rétinal ou d'acide rétinoïque.

La vitamine A est impliquée dans la croissance des os et la synthèse de pigments de l'œil. Le rétinol est parfois utilisé dans le traitement des acnés sévères. La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet ($1O_2$) et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés.

2.1.1. La vitamine A et système immunitaire : La vitamine A est un stimulant pour l'immunité. Le manque de vitamine A diminue la réponse du système immunitaire à certaines bactéries et certains virus. Sans vitamine A, les cellules ne peuvent ni croître ni se différencier, ce qui réduit l'efficacité du système immunitaire (Pino-Lagos et *al.*, 2008).

13

De même, la vitamine A diminue l'inflammation et une carence en vitamine A (CVA) exacerbe la réponse inflammatoire. Cette propriété anti-inflammatoire de la vitamine A est due à l'induction de la différenciation des cellules T en cellules T régulatrices ($CD4^+ FOXP3^+$). En effet dans les cellules la vitamine A est transformée en acide rétinoïque (RA).

Le rétinol comme le RA va être transporté jusqu'au noyau grâce à des transporteurs appelés CRBP (cellular retinol binding protein) et CRABP (cellular retinoid acid-binding protein). Dans le noyau, on trouve des récepteurs à l'acide rétinoïque appelés RAR (retinoic acid receptor), de type α , β et γ , et les récepteurs de RA appelés RXR (retinoic X receptor) α , β et γ . Ces récepteurs nucléaires RAR et RXR se lient sur leurs éléments de réponse cibles appelés RARE (retinoic acid responsive elements) et contrôlent l'expression des gènes. C'est ainsi que le RA induit l'expression génique de l'IL4 qui oriente la différenciation cellulaire T vers le phénotype Th2, induit l'apoptose des cellules T (Szondy, 1998) et diminue la réactivité des cellules CD8 en induisant leur différenciation en CD8 régulatrices faiblement cytotoxiques (Kishi, M, 2001) (Fig 6)

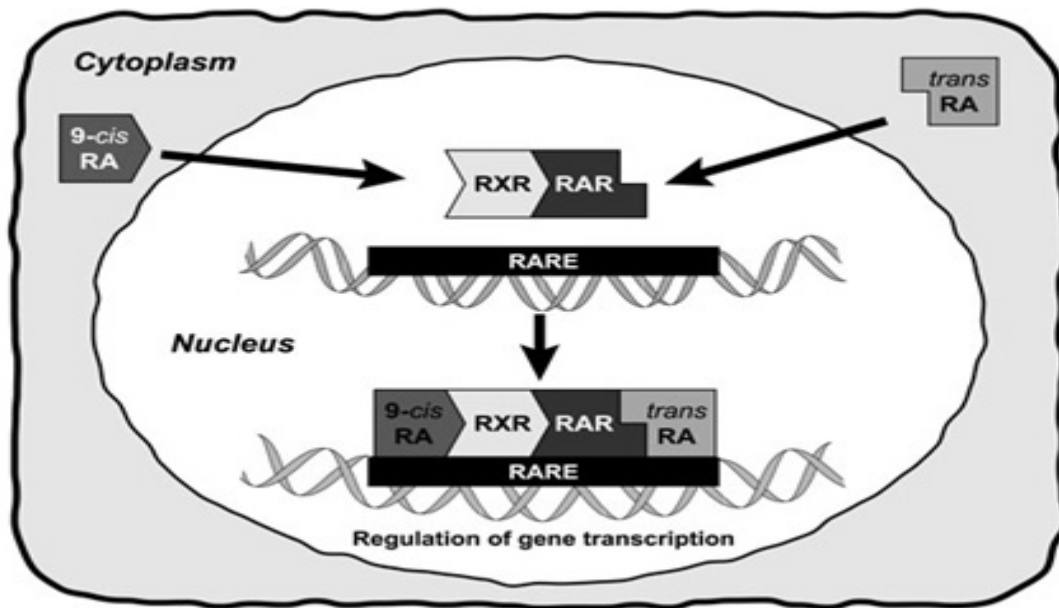
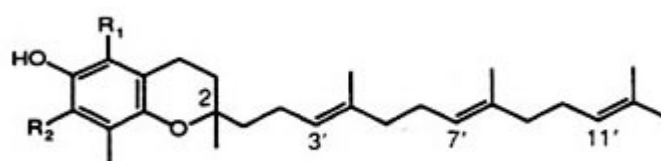


Figure 6: La vitamine A (all-trans-RA) et l'acide rétinoïque (9-cis-RA) sont transportés au noyau où ils se lient à leurs récepteurs nucléaires. Le récepteur nucléaire de vitamine A est

14

RAR (récepteurs acides rétinoïc) et celui de acide rétinoïque est RXR (retinoid receptors). RAR et RXR forment un hétérodimaire RAR/RXR, qui se lie à sur l'ADN au niveau des éléments de réponse au rétinoïdes (RARES) pour réguler transcription de gène.

2.2. Vitamine E : désigne une famille de molécules chimiques liposolubles. Elle existe quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L'alpha-tocophérol (α -ToCH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Les radicaux tocophéryles sont régénérés par l'acide ascorbique et, sans cette synergie, les tocophérols sont inactifs (Carr *et al.*, 2000). Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -ToCH, connu comme inhibiteur de la propagation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2 et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Pryor, 2000 ; Khalil, 2002).



R ¹	R ²	
CH ₃	CH ₃	α -Tocopherol
CH ₃	H	β -Tocopherol
H	CH ₃	γ -Tocopherol
H	H	δ -Tocopherol

Figure 7 : Structure chimique de la vitamine E

La fonction la plus connue de la vitamine E est celui d'antioxydant capable de protéger la vitamine A, les carotènes et les acides gras polyinsaturés (AGPI) de l'oxydation et de piéger les radicaux peroxydes ($\text{LOO}\cdot$) pour donner des hydroperoxydes (LOOH) stables et peu réactifs.

15

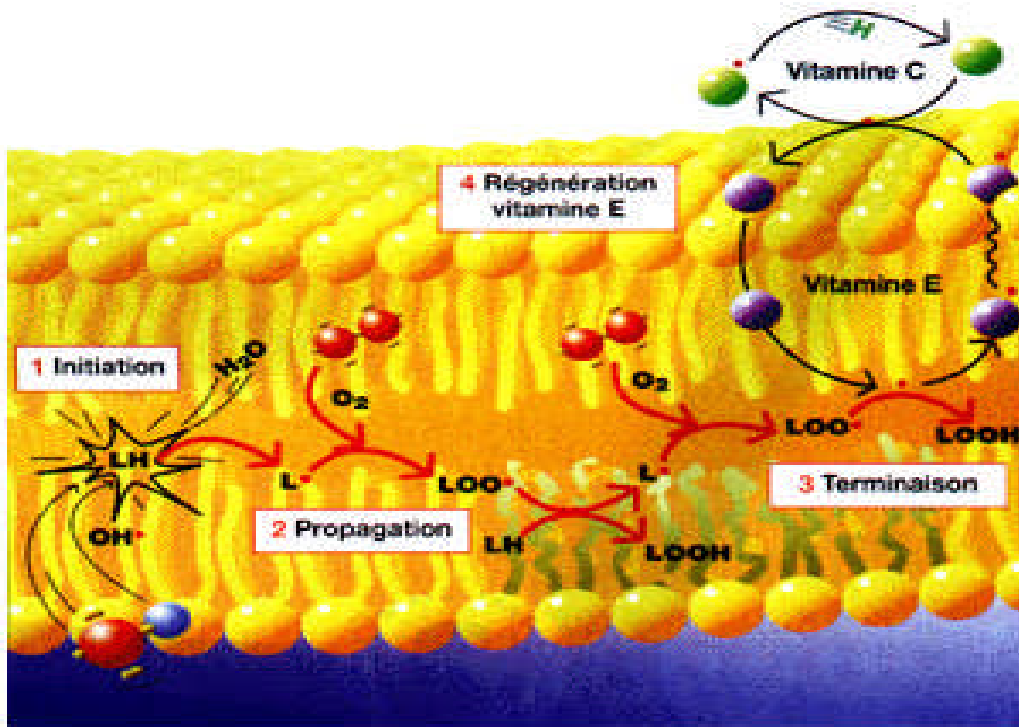


Figure 8: Rôle de la vitamine E dans l'inhibition de la propagation des radicaux libres et sa régénération par la vitamine C

Ceci interrompt la cascade de peroxydation induite par les radicaux libres. Ensuite la vitamine E oxydée est régénérée par la vitamine C. L'action antioxydante de la vitamine E est extrêmement efficace et l'on estime qu'une molécule d'alpha-tocophérol peut inhiber la peroxydation de 1000 molécules d'acides gras polyinsaturés et il y aurait en moyenne dans la membrane une molécule de vitamine E pour 500 molécules d'acide gras.

La vitamine E améliore non seulement les défenses antioxydantes, mais semble aussi aider le corps face aux problèmes de résistance à l'insuline. Les recherches révèlent qu'un faible taux de vitamine E représente un indice fiable et indépendant du développement du diabète de type 2. Les individus qui affichent un faible taux de vitamine E présentent un risque cinq fois plus élevées de développer le diabète que ceux qui jouissent d'un taux normal de cette vitamine.

16

2.2.1. Vitamine E et système immunitaire : La vitamine E exerce un effet immunostimulateur associé à une résistance accrue contre les agents infectieux (Han et *al.*, 2000). En effet, la vitamine E induit la différenciation des cellules T vers le phénotype Th1 et augmente, **in vitro** la prolifération des cellules T, et la production de l'IL- 2. (Meydani et *al.*, 1997).

Alpha-tocophérol exerce aussi des effets anti-inflammatoires *in vitro et in vivo*. L'alpha-tocophérol diminue la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, et le TNF α) et diminue également l'adhérence des monocytes à l'endothélium. En outre, l'alpha-tocophérol diminue le niveau de protéine C (marqueurs inflammatoires) chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (Singh and Jialal., 2004).

2.3. Vitamine C : La vitamine C (ou acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL, produite par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, la vit C passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui sera régénérée par le glutathion. La vitamine C est facilement oxydée par de nombreux oxydants, en particulier le dioxygène de l'air. C'est pourquoi la vitamine C est un antioxygène : réagissant avec le dioxygène, elle empêche celui-ci d'oxyder les constituants des aliments et protège ainsi les corps gras contre le rancissement, limite l'oxydation des ions nitrite en ions nitrate. Les fruits du jujubier sont riche en acide

ascorbique (192-359 mg/100 g) en quantité importante, ce qui représente deux à quatre fois sa teneur dans les agrumes, (Jawanda and Bal., 1978).

La vitamine C permet également la régénération du radical tocophéroxyle (Vit E•), formé au cours de la réaction de protection anti-radicalaire, en tocophérol . Elle réduit la glycosylation et augmente l'activité des enzymes antioxydantes (Chen *et al.*, 2000 ; Kojo, 2004).

2.3.1. Vitamine C et système immunitaire : Le Docteur Linus Pauling, titulaire du Prix Nobel, était, il y a trente ans, le premier à décrire et à souligner l'importance de doses élevées de vitamine C. Actuellement plusieurs preuves attestent que la vitamine C plus du repos sont les meilleures armes contre la grippe. La concentration de vitamine C dans les phagocytes est beaucoup plus élevée que celle dans le plasma, ce qui indique que la vitamine C pourrait avoir des rôles fonctionnelles dans ces cellules du système immunitaire. En effet les phagocytes activés (bouffées respiratoires) libèrent un ensemble d'agents oxydants destinés à tuer les virus et les bactéries. Beaucoup de ces oxydants sont nocifs

17

pour les cellules hôtes. La vitamine C, un antioxydant, protège les cellules immunitaires (phagocytes) contre les oxydants qu'elles libèrent. Par ailleurs, la supplémentation en vitamine C renforce le système immunitaire dans la lutte antimicrobienne en augmentant l'activité des cellules tueuses, la prolifération des lymphocytes et chimiotactisme (Wintergerst *et al.*, 2005).

3. Acides gras polyinsaturés et système immunitaire :

Chez l'Homme, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont synthétisés à partir de deux précurseurs, l'acide linoléique (C18:2 n-6, LA) pour la famille n-6 et l'acide α -linoléique (C18: 3 n-3, ALA) pour la famille n-3. Ces deux acides gras sont dits « acides gras essentiels » car les mammifères ne peuvent pas les synthétiser et il faut qu'ils soient apportés par l'alimentation.

Ces précurseurs sont ensuite allongés et dénaturés par l'intervention d'élongases et de désaturases pour donner naissance à des acides gras polyinsaturés à plus longue chaîne et biologiquement actifs. Les principaux AGPI de la famille n-6 sont l'acide γ -linoléique (20:3 n-6, GLA) et l'acide arachidonique (20:4 n-6, AA). En ce qui concerne les AGPI de la famille n-3, les principaux représentants sont l'acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3, EPA) et l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3, DHA) (Figure 9).

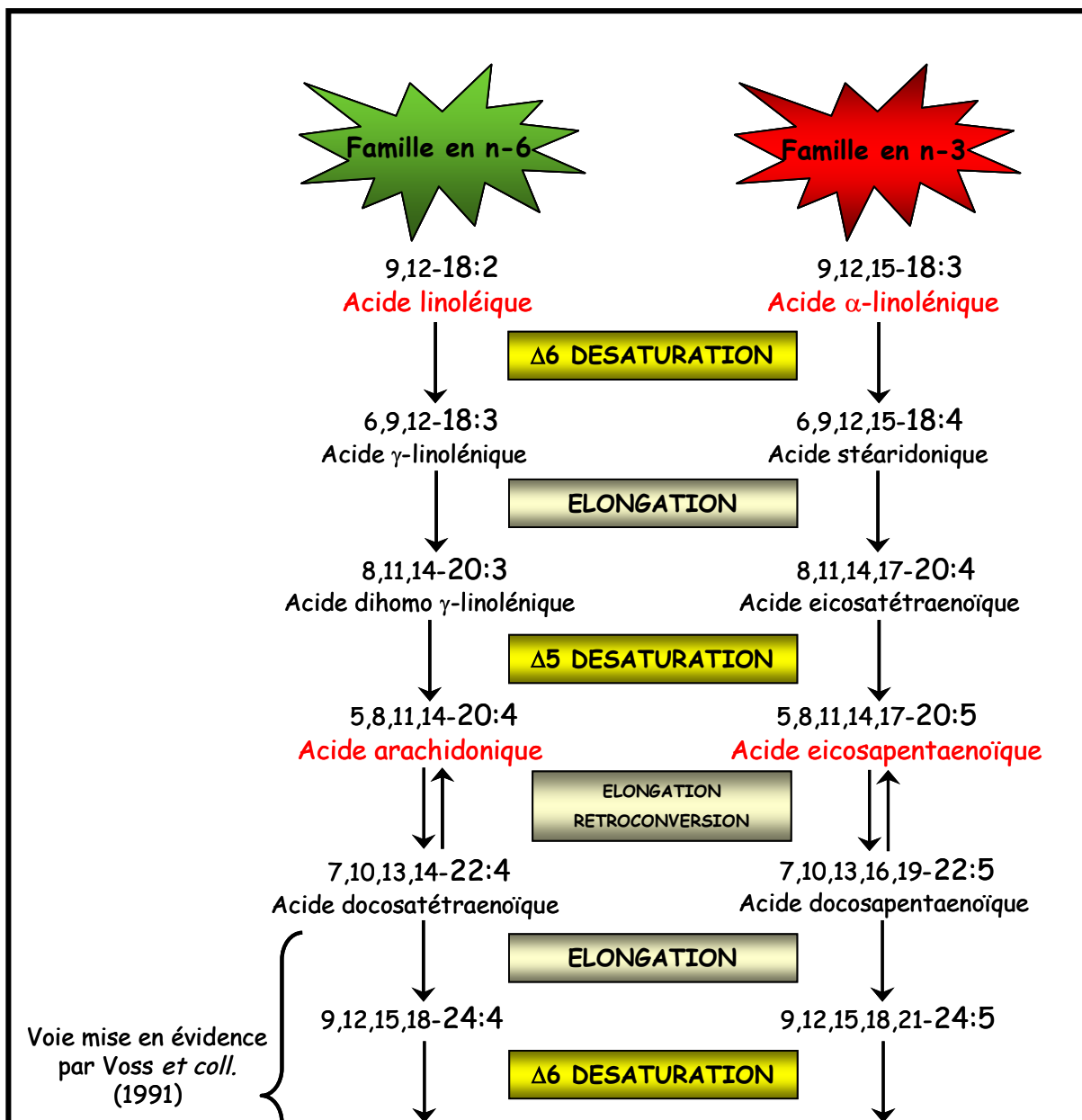


Figure 9 : Représentation schématique de la biosynthèse des AGPI des familles n-6 et n-3.

De nombreux travaux ont mis en évidence que les AGPI n-3 ont tendance à diminuer les réponses immunitaires en modulant notamment la prolifération des cellules immuno-compétentes (Khan and Hichami, 2002). Ainsi, Kelley *et al.* (1991) ont mis en évidence chez l'Homme, qu'une augmentation de la consommation de graines de lin, riches en acide α -linoléinique (ALA), diminue la prolifération des lymphocytes en culture stimulés par des mitogènes. De même, la consommation quotidienne de 1,23g d'EPA et de DHA, sans supplémentation en vitamine E, entraîne une diminution de la prolifération des cellules mononuclées et de la production de certaines cytokines *in vitro* (Kelley *et al.*, 1992). L'ajout de différents AGPI n-3 sur des lymphocytes en culture et leurs effets sur la prolifération des lymphocytes T et B, indique que des concentrations faibles en ces acides gras ($< 3 \mu\text{M}$) augmentent ces fonctions *in vitro*, tandis que des concentrations élevées ($> 30 \mu\text{M}$) les inhibent (Calder *et al.*, 1992). Des réductions de la prolifération (jusqu'à 65%) ont été également observées sur des cellules T humaines isolées à partir du sang périphérique (Thies *et coll.*, 2001). L'activité biologique dépend du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras. En effet, les acides gras saturés ont moins d'effets que les AGPI.

La production de l'IL-2 est indispensable pour la prolifération des cellules T. Cette cytokine agit de façon autocrine et/ou paracrine via son récepteur présent sur les cellules T.

Plusieurs études ont montré que les AGPI n-3 inhibent la prolifération des lymphocytes T de souris et humains (Calder, 1997), en inhibant la production d'IL-2 ou en inhibant l'expression de son récepteur (IL-2R) (Soyland *et al.*, 1993).

Les acides gras agissent également sur la différenciation des cellules T, notamment les cellules T CD4⁺. La décision finale pour une cellule CD4 de se différencier en cellules Th1 ou Th2 est prise au cours de sa première rencontre avec l'antigène. Des études ont mis en évidence que l'EPA et le DHA diminuent la production de l'IL-2 par les cellules Th1 et stimulent la production d'IL-4 issues des Th2 (Arrington *et al.*, 2001 ; Khan *et al.* (2006) ont récemment démontré qu'un régime enrichi en AGPI n-3, diminue le taux d'expression des cytokines de type Th1 et augmente celui des cytokines de type 2, chez des rates gestantes rendues diabétiques ainsi que chez leurs progénitures macrosomiques.

20

En ce qui concerne les AGPI de la famille n-6, il semblerait qu'ils n'aient pas d'effet sur la prolifération des cellules T, *ex vivo*. Cependant, les études réalisées ont été très controversées car les concentrations en acide gras utilisées ainsi que la durée des régimes variaient d'une étude à l'autre.

4.Activation des lymphocytes T :

Dans cette partie, nous verrons les mécanismes impliqués dans l'activation des lymphocytes T et les voies de signalisation déclenchées à partir du TCR, en portant une attention particulière au signal calcique, voies étudiées dans la présente thèse.

4.1.Récepteur des cellules T (*T-cell receptor*, TCR) : Le TCR est composé de deux chaînes polypeptidiques hétérodimères (chaînes α et β ou, plus rarement, chaînes γ et δ), liées de manière covalente par des ponts disulfures. Ces chaînes sont composées de domaines constants et variables. Les parties variables se situent vers l'extrémité N-terminale et sont responsables de la reconnaissance d'un antigène présenté par une molécule de CMH. Les parties variables sont générées par un réarrangement génique complexe, produisant ainsi de grandes possibilités d'affinité à différents peptides.

Contrairement aux CMH, un seul type de TCR est exprimé sur un lymphocyte. La sous-population T α β représente environ 85% des lymphocytes T sanguins. Seuls les lymphocytes T, réagissant contre un antigène reconnu spécifiquement par leur TCR, vont générer une réponse immunitaire. Le TCR est accompagné de plusieurs autres molécules de surface

essentielles à l'activation d'un lymphocyte T. Parmi celles-ci, on distingue le CD3. Le CD3 est un complexe protéique formé de 5 chaînes différentes (les chaînes γ , δ , ϵ , ζ et η) qui s'associent pour former 3 dimères : un hétérodimère gamma et epsilon ($\gamma\epsilon$), un hétérodimère delta et epsilon ($\delta\epsilon$) et, soit un homodimère formé de deux chaînes zêta ($\zeta\zeta$), soit un hétérodimère zêta et éta ($\zeta\eta$). L'hétérodimère $\zeta\eta$ ne se retrouve que dans 10% des CD3 sont responsables de la signalisation moléculaire du TCR, menant à l'activation du lymphocyte. Chacune des chaînes du CD3 possède des sites de phosphorylation de tyrosine au niveau intracellulaire (ITAM, « immunoreceptor tyrosine – based activation motif »). Ces ITAM servent de substrat pour des kinases de la famille Src (Lrc et Fyn) (Huang and Wange, 2004 ; Razzaq *et al.*, 2004). Il se déclenche alors une cascade complexe d'activation de différentes enzymes.

La particularité de la reconnaissance, par le lymphocyte T, du peptide antigénique en association avec des deux classes de CMH, impose l'existence de corécepteurs.

21

Associés au complexe TCR-CD3, ces corécepteurs. Associés au complexe TCR-CD3, ces corécepteurs sont des molécules CD4 et CD8 capables de distinguer, respectivement, les molécules de CMH de classe II et I. On distingue selon le CMH deux populations de Lymphocytes T :

- les lymphocytes T auxiliaires ou Helper exposant la molécule CD4 qui est une glycoprotéine monocaténaire transmembranaire de 54 kDa dont la portion extracellulaire comporte 4 domaines. La molécule de CD4 est capable de se lier à la partie invariante du CMH de classe II. Les Ag présentés sont des Ag exogènes qui ont été endocytés par les CPA.
- Les lymphocytes T cytotoxiques exposant la molécule CD8 qui est un hétérodimère constitué de deux chaînes (α et β) liées de manière covalente. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires transmembranaire distincts mais de poids moléculaire identique (32 kDa) possédant un seul domaine extracellulaire . Ce domaine reconnaît la partie invariante des molécules de CMH de classe I. Les Ag présentés sont des Ag endogènes, produits par toutes les cellules musculées de l'organisme.
- Le TCR est une glycoprotéine de la membrane plasmique, composé de deux unités (α et β). Le complexe CD3 est associé à se récepteur et ses sous-unités sont organisées en deux hétérodimères ($\delta\epsilon$ et $\gamma\epsilon$) et un homodimère ($\zeta\zeta$). Elles portent toutes le motif ITAM (Immune Receptor Tyrosine-based Activation Motif) nécessaire à la transmission du signal du TCR. La molécule CD8 est un hétérodimère formé d'une chaîne α et d'une chaîne β , chacune a un seul domaine variable, associées de manière

covalente par un pont disulfure. Les molécules de CD4 et CD8 sont impliquées dans la reconnaissance de la classe de CMH portée par la CPA. Ces deux récepteurs sont associés entre autre à une protéine tyrosine kinase de la famille Src, la protéine Lck, nécessaire à la signalisation du TCR. Les lymphocytes nécessitent un second signal, le signal co-stimulateur qui est délivré par la liaison de la molécule CD28, présente sur les lymphocytes, à la molécule B7 présente, quand à elle, à la surface des CPA.

4.2. Activation des lymphocytes T

Suite à l'activation du TCR, l'une des premières étapes de l'activation lymphocytaire est la phosphorylation des motifs ITAM des sous-unités de CD3, par les tyrosines kinases de la famille Src, comme Lck et Fyn. Lck qui est liée constitutivement sous forme inactive à l'extrémité cytoplasmique du récepteur CD4 ou CD8,

22

selon le type de lymphocyte (Favero and Lafont, 1998). Suite à la stimulation du TCR, cette kinase est redirigée, par son récepteur porteur, vers des structures particulières de la membrane riches en cholestérol et en glycosphingolipides appelés radeaux lipidiques ou lipid rafts (He *et al.*, 2005).

La tyrosine kinase Lck est activée par déphosphorylation d'un phosphate inhibiteur présent sur un résidu tyrosine en C-terminal de la protéine, par la phosphatase transmembranaire CD45. Par la suite, les tyrosines phosphorylées des ITAM offrent des sites de recrutement pour d'autres kinases comme ZAP-70. ZAP-70, une fois recrutée au niveau du TCR, est phosphorylée et activée par Lck. ZAP-70, une fois activée, peut alors phosphoryler, à son tour, des protéines adaptatrices dont les principales sont LAT, SLP-76. Ces protéines adaptatrices ont pour fonction d'assembler les complexes moléculaires responsables de la signalisation tels que Grb-2 et Gads, et les enzymes telles que PI3K et PLC γ 1 (Huang and Wange, 2004). Ainsi, le rôle central du LAT dans la signalisation de TCR est sa capacité si phosphorylé, de former des complexes à la membrane de plasma de laquelle un certain nombre de signalisation cascade commencent. Le manque d'expression de LAT désaccouple la phosphorylation proximale de tyrosine de TCR de ces cascades de signalisation descendant.

**Matériels et
méthodes**

1. Matériel végétal

1-1. Préparation des extraits aqueux de *Zizyphus lotus* L : *Zizyphus lotus* L, provient de la wilaya de Tlemcen située à l'ouest Algérien entre 35°05' et 35°25' de latitudes nord et entre 0°15' et 2°15' de longitude ouest.

Le matériel végétal est constitué par les différentes parties de notre plante, feuille, racine, tige, noyau et pulpe. Collectées le mois de septembre 2007 dans la wilaya de Tlemcen, Après séchage, à l'air libre et à l'abri de la lumière et de la chaleur vive, les différentes parties ont été pilées au mortier traditionnel pour obtenir une poudre grossière, puis réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur à hélice (type Retsch SM 2000). Nous avons obtenu une poudre fine de couleur gris verdâtre claire et conservées dans les flacons en verre fumé. C'est cette poudre que nous avons utilisé pour nos investigations pharmacologiques.

Décoction : 100g de poudre sont suspendues dans 500 ml d'eau distillé puis chauffées pendant 45mn à 75°C. La décoction est ensuite refroidie, filtrée, congelée à -80°C puis lyophilisée (lyophilisateur Christ Alpha 1-2 LD). La poudre de *Zizyphus lotus* L lyophilisée. Le lyophilisat est stocké à température ambiante, puis remis en suspension dans les tampons adéquats en fonction des expériences envisagées.

2. Dosage des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse:

L'analyse s'effectue sur un aliquote de 100 mg d'extraits de notre plante en deux étapes comme suit :

Etape 1- Saponification-Méthylation des acides gras

Après avoir ajouté 200 μL de méthanol, la saponification est réalisée avec 1 mL de NaOH méthanolique (50mM), suivie d'une incubation à 80°C, 15 minutes. La saponification par NaOH méthanolique va apporter les hydrogènes nécessaires à la libération des Acides Gras du glycérol. Un choc thermique est réalisé en plongeant les tubes dans un bac à glace, la méthylation est alors faite par ajout de 2mL de BF₃ méthanolique (BF₃ jouant le rôle de catalyseur) puis incubation, 80°C, 15 minutes. Après un deuxième choc thermique, nous ajoutons 2 mL de NaCl saturé à 35% et 1 mL d'Hexane pour extraire les acides gras en prélevant la phase supérieure de la réaction. Les tubes sont ensuite bouchés sous azote avant leur injection en CPG.

25

Etape2- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

*** Principe :**

Comme la Chromatographie Liquide Haute Pression et la Chromatographie sur Couche Mince, la CPG repose sur la rétention différentielle de molécules contenues dans une phase mobile par une phase stationnaire. Ici contrairement à la CCM ou l'HPLC, la phase mobile est l'hélium qui est un vecteur qui « propulse » les molécules dans une colonne de 30 m de long et de 0,32 mm de \varnothing dans laquelle est greffé 0,25 μm de phase stationnaire.

Les échantillons traversent la colonne sous forme gazeuse, ils doivent être vaporisés : On injecte le contenu de la seringue (8 μl) puis on augmente rapidement la température du four. De ce fait le solvant se vaporise très vite et « part » rapidement sans entraîner l'échantillon.

*** Intérêt du standard interne :**

Ce standard, contient un Acide gras absent de l'échantillon (un Acide gras impaire du monde animal), ici le standard est le 19 :0. Cet Acide Gras va se comporter de la même façon que les Acides Gras présents, donc en comparant les aires de pics du chromatogramme et connaissant la masse de standard injectée, les quantités d'Acides Gras présents peuvent être calculées.

3. Dosage des vitamines A et E sériques : Les teneurs en vitamines A et E sériques sont déterminées par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) (Varian, Les Ulis, France). Brièvement, le lyophilisat des plantes est repris par l'eau distillée (1 mg/ml) puis extrait à l'hexane. Les vitamines sont séparées par HPLC en phase inverse avec comme phase stationnaire une colonne C18, (HP OPS hypersil C18; 200 mm. 4.6mm: Lara spiral, avec thermostat à 35°C) et phase mobile méthanol/eau (98/2, V/V) et un débit de 1 ml/mn. La quantification est effectuée en utilisant un standard interne, le tocol (Lara Spiral, Couternon, France), ajouté avant l'extraction à l'hexane (Jezequel-Cuer *et al.*, 1995).

4. Dosage de la vitamine C : Le dosage de la vitamine C, est réalisé selon la méthode de Roe and Kuetler (1943). Brièvement, après précipitation de protéine par 10 % l'acide trichloroacétique et centrifugation, le surnageant (500 µL) est repris par 100 µl d'un mélange réactionnel contenant : l'acide sulfurique (9 N) contenant dinitrophénylhydrazine (3%), thio-urée (0.4 %) et le sulfate de cuivre (0.05 %) puis incubé à 37 °C pendant 3 h. la réaction est arrêtée par ajout de 750 µl d'acide sulfurique 65 % (V/V), puis l'absorbance a été enregistré à 520 nm. La concentration en vitamine C du milieu est obtenue à partir d'une gamme étalon d'acide ascorbique.

26

5. Evaluation du statut antioxydant : La méthode mise au point par Blache and Prost (1992) mesure la résistance des hématies à l'hémolyse induite par les radicaux libres. Cette méthode consiste à incuber des globules rouges dilué au 1:40 (vol/vol) dans un tampon iso-osmotique kit Radicaux libres (KRL) en présence d'un générateur de radicaux libres (GRL, kirial SA). La cinétique de la lyse des GR est suivie par une lecture continue de l'absorbance à 620 nm (37°C). Le temps de demie vie, qui correspond à la lyse de 50% des hématies, est retenu pour les comparaisons entre les groupes.

Cette résistance est utilisée comme marqueur de la résistance globale de l'organisme au dommage oxydatif. Elle représente l'état de l'ensemble des défenses antioxydantes de l'organisme (Blache and Prost, 1992). En effet, les auteurs ont montré que, dans les conditions expérimentales utilisées, si au moins l'une des composants du système de détoxification antiradicalaire (antioxydants, enzymes) est altéré, une diminution de la demi-vie des hématies est observée.

6. Test de prolifération cellulaire et blastogénèse des cellules T : Les cellules Jurkat T (0.1×10^6 des cellules/160 µL) ont été suspendues dans RPMI sans sérum et ensemencées dans des plaques 96 puits) (Nunc, Roskilde, le Danemark), puis incubées pendant

4 h avec des concentrations croissantes de *Zizyphus lotus* L (0,05, 0,1 et 0,2 mg/ml), avant de les stimuler avec CD3 anti-(30 µg/ml). Les cellules ont été distribuées en **sexplicates** comme suit : 160 µL de suspension cellulaire, 20 µL d'extrait de *Zizyphus lotus* L et 20 µL d'Anti-CD3. Après 36 h, 20 µL [³H] thymidine (20 Ci/ mmol, 0.5 µCi/puits) ont été ajoutés et 12 h plus tard, les cellules sont filtrées (filtre en laine de verre) par un récolteur de cellules (Dynatech, Burlington, MA, USA), puis la radioactivité de l'ADN piégée sur ce filtre est mesurée dans un compteur (Beckman, Fullerton, CA, USA) en présence de 2 ml de liquide scintillant (d'Optifluor-O ; Packard)

7. Etude de l'expression de l'IL- 2 par la technique de RT-PCR en temps réel

7.1. Extraction des ARNs totaux et traitement à la Dnase : Les cellules sont cultivées comme décrit ci-dessus en présence des extraits de *Zizyphus lotus* L., puis stimulées ou non avec anti CD3 pendant 2 heures. Le culot sec des cellules est resuspendu dans 500 µl de Trizol (Life Technology) puis lysées par passage dans une seringue 21G. Par la suite, les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 10 mn. Après cette incubation, un volume de 100 µl de chloroforme est ajouté dans les tubes de lyse puis vortexé 15 secondes puis réincubé 2 à 3 min à température ambiante.

27

Après centrifugation du lysat cellulaire (12 000g, 4° C, pendant 15 mn), les phases supérieures (phase aqueuses transparentes) contenant les ARNs ont été récupérées dans des tubes eppendorf stériles en laissant les ADNs se trouvant entre la phase supérieure et la phase colorée contenant les protéines en bas du tube. Pour précipiter les ARNs, un volume de 250 µl d'isopropanol a été ajouté en secouant à la main les tubes eppendorf avant de les incuber 10 min à température ambiante. Une centrifugation à 14000.g pendant 20 mn à 4°C a permis d'éliminer le surnageant et de récupérer un culot blanchâtre contenant les ARNs qui ont été lavés avec 1 ml d'éthanol froid à 70% puis centrifugés à 12000.g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été écarté et le culot d'ARN a été séché après avoir couvert les tubes Eppendorf. Une fois séché, les ARNs ont été resuspendus dans 15 µl de Tris-EDTA. Pour vérifier la consommation des ARNs, la densité optique (DO) des ARNs a été mesurée par spectromètre à 260 et 280 nm. Le rapport DO260/ DO280 obtenu a été supérieur à 1.5 ce qui confirmait la pureté de ces ARNs.

7.2. Technique de RT-PCR : La RT-PCR est une technique qui permet d'utiliser l'ARN comme matrice pour l'amplification d'une séquence d'ADNs double brin cible. Cette opération s'effectue *in vitro* après la transcription inverse des ARNs par extension de deux amorces situés

da part et d'autre de la cible à amplifier grâce à une ADN polymérase . L'amplification est effectuée par la répétition de cycles de dénaturation, hybridation et extension qui assurent une duplication exponentielle de chaque brin.

Brièvement, dans un volume final de 10 μ L, 1 μ g d'ARN totaux est incubé en présence d'oligo (dT) 25 ng. μ l⁻¹, et de dNTP 2mM, pendant 5 min à 65°C, puis immédiatement placé sur la glace avant l'étape de transcription. Au milieu précédent sont ajoutés le tampon 5X (concentration finale : Tris-HCL 20mM, pH 6.9, KCL 90 mM, MgCl₂ 4.6mM), l'inhibiteur d'ARNase (4U/ μ l) et le DTT (10 μ M). La réaction est initiée pendant 2 min à 42°C. La synthèse du premier brin débute lorsque la transcriptase inverse SuperScript II (10 U/ μ l au final) est ajoutée. Le tout est incubé 75 min à 42°C, puis à 94°C, puis inactiver l'enzyme. A chaque échantillon sont ajoutés 40 μ l d'eau stérile.

7.3. PCR quantitative : Les réactions de PCR quantitative en temps réel sont réalisées dans un appareil de détection en temps réel iCycler IQ TM (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Dans un volume final de 25 μ L, sont ajoutés 5 μ L d'ADNc, préparé par transcription inverse , puis les amorces sens et anti-sens de l'IL-2 et de la β -actine (tableau) à 15 mmol/l de concentration finale. Ensuite, on ajoute le réactif IQ TM SYBR Green (Bio-Rad) contenant KCL 50 mM , Tris-HCL 20 mM , pH8.4 , dNTP 0.2 mM, ADN polymérase iTaq 25 U.ml⁻¹ ,

28

MgCl₂ 3 mM, SYBR Green I, fluorescéine 10 nM en concentrations finales. Le fluorochrome SYBR Green I est un intercalant fluorescent de l'ADN et l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé. Les conditions utilisées pour la réaction d'amplification de la séquence cible de la β -actine et de l'IL-2 sont les suivantes :

- étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 3 min, suivie de 40 cycles à 94°C pendant 30s, 50°C pendant 30s et 72°C pendant 30s. L'amplification du gène de la β -actine est utilisée pour vérifier l'homogénéité de l'ADNc utilisé. Le gène de la β -actine dont l'expression est constitutif, sert de contrôle interne. La calibration est effectuée en réalisant des PCR quantitatives sur une gamme de dilution des ADNc de la β -actine et de l'IL-2.

Les résultats ont été évalués par le logiciel iCycler iQ incluant les courbes standards permettant de déterminer l'efficacité de l'amplification (E) et le seuil du cycle (Ct). La quantification relative des ARNm, dans les différents groupes, a été déterminée par l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta$ Ct (Livak, and Schmittgen, 2001), dans laquelle $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct du gène d'IL-2 - Δ Ct du gène de Beta actine. Δ Ct = Ct des cellules traitées par extrait de plantes - Ct du groupe control. La quantité relative (RQ) a été calculée selon la formule : $RQ = (1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$.

Gènes amplifiés	Type d'amorce	Séquences des amorces
β -actine	sens	5'-ATGATATCGCCGCGCTCGTCGTC-3'
	anti-sens	5'-AGGTCCCGGCCAGCCAGGTCCAG-3'
IL-2	Sens	5'-CACTAATTCTTGCACTTGTCAC-3'
	anti-sens	5'-CCTTCTTGGGCATGTAAAAC-3'.

Tableau 1: Séquences des couples d'oligonucléotides

Résultats

30

1. Composition en acides gras

La lecture du tableau 2 montre que les graines de fruits étaient plus riches en acides gras que les autres parties de la plante. Par ailleurs, *Zizyphus lotus.L*, semble être une bonne source de gras saturés (16:0 et 18:0), mono-insaturés (18:1 n-9) et polyinsaturés (18:2 n-6) des acides gras. En ce qui concerne les acides gras essentiels, l'acide linoléique est présent dans toutes les parties de la plante. la pulpe du fruit a été jugée la plus riche source d'acide linoléique . L'acide linoléique n'est pas détecté dans la tige, la pulpe de fruits et de racines de *Zizyphus lotus L* (tableau 2). L'eicosatrienoïque (20:3 n-3), un agent intermédiaire entre l'acide linoléique et l'acide docosahexaenoïque, est présent seulement dans le noyau de fruits, tiges et racines. L'acide arachidonique a été détecté seulement dans les feuilles de *Zizyphus lotus L* (tableau 2).

Les acides gras	Noyau	Feuilles	tige	pulpe	racine	Statistiques
14:0	0.15 ± 0.028	0	0	0	0	

Les acides gras	Noyau	Feuilles	tige	pulpe	racine	Statistiques
16:0	10.8 ± 1.80 ^a	43.41 ± 1.82 ^b	33.80 ± 1.95 ^c	27.59 ± 1.77 ^d	38.76 ± 1.59 ^e	b:a, c, d, e p < 0.001
16:1	0.130 ± 0.22 ^a	5.96 ± 0.63 ^b	0	0	0	a:b p < 0.001
18:0	5.45 ± 1.50 ^a	22.15 ± 1.31 ^b	24.40 ± 1.62 ^c	11.25 ± 1.31 ^d	22.00 ± 0.69 ^e	c:d, a p < 0.001
18:1n-9	62.79 ± 1.33 ^a	6.30 ± 1.50 ^b	21.73 ± 1.94 ^c	24.52 ± 0.13 ^d	19.73 ± 1.80 ^e	a:b, c, d, e p < 0.001
18:2n-6	14.22 ± 1.96 ^a	6.20 ± 1.67 ^b	11.10 ± 1.72 ^c	36.63 ± 1.26 ^d	13.24 ± 0.11 ^e	d:a, b, c, e p < 0.001
18:3n-3	1.30 ± 0.64 ^a	9.15 ± 1.95 ^b	0	0	0	a:b p < 0.001
19:0	0	0	0	0	0	
20:1	3.12 ± 1.40 ^a	2.17 ± 0.31 ^b	0	0	0	a:b NS
20:2n-9	0.20 ± 0.057 ^a	1.53 ± 0.60 ^b	0	0	0	a:b NS
20:3n-3	0.83 ± 0.035 ^a	0	8.95 ± 0.91 ^b	0	2.59 ± 0.63 ^c	b: a, c p < 0.001
20:4n-6	0	1.58 ± 0.95	0	0	0	
20:0	0.1 ± 0.058	0	0	0	0	
24:0	0.9 ± 0.92 ^a	1.54 ± 0.61 ^b	0	0	3.66 ± 1.18 ^c	c:a, b p < 0.001

Tableau 2: Composition en acides gras (g/100 g de lipides totaux) des différentes parties de *Zizyphus lotus* (L.)

Différents acides gras ont été déterminés comme décrit dans Matériels et Méthodes. Les valeurs sont des moyennes ± SEM. Chaque valeur représente la moyenne de trois déterminations. NS = différences insignifiantes

31

2. Dosage des vitamines

Le Tableau 3 montre que la concentration de vitamine A et C était plus élevée dans la pulpe de fruits que dans les feuilles, racines et tiges du *Zizyphus lotus* L. Fait intéressant, la vitamine A n'a pas pu être détectée dans le noyau de fruits, cependant il est riche en vitamine C. La concentration de vitamine A et C dans d'autres parties de la plante a été classée comme suit: pulpe < feuilles < racine < tige. les feuilles de *Zizyphus lotus* L possèdent la concentration plus élevées de vitamine E en comparaison à la racine, pulpe, tige et noyau de fruits. La racine et la tige contiennent le même taux de vitamine E. (tableau 3).

Vitamines (mg/100mg)	Feuille	Racine	Pulpe	Tige	Noyau
Vitamine A	13.52±0.06 ^(a)	6.45±0.09 ^(b)	71.63±1.23 ^(c)	3.8±0.96 ^(d)	nd

Vitamine C	63.40±1.23 ^(e)	47.20±0.82 ^(f)	190.65±1.48 ^(g)	24.65±1.22 ^(h)	170.84±0.63 ⁽ⁱ⁾
Vitamine E	155.71±1.08 ^(j)	4.7±0.23 ^(k)	11.23±1.36 ^(l)	4.5±0.097 ^(m)	9.2±0.54 ⁽ⁿ⁾

Tableau 3 : Teneur en Vitamines dans les différentes parties de *Zizyphus lotus* L.

3. Mesure du KRL

La Figure 10 montre que c'est la pulpe qui possède la capacité anti-oxydante la plus élevée, ensuite vient le noyau et la feuille et enfin c'est la tige et la racine qui représentent les parties les moins antioxydantes de la plante.

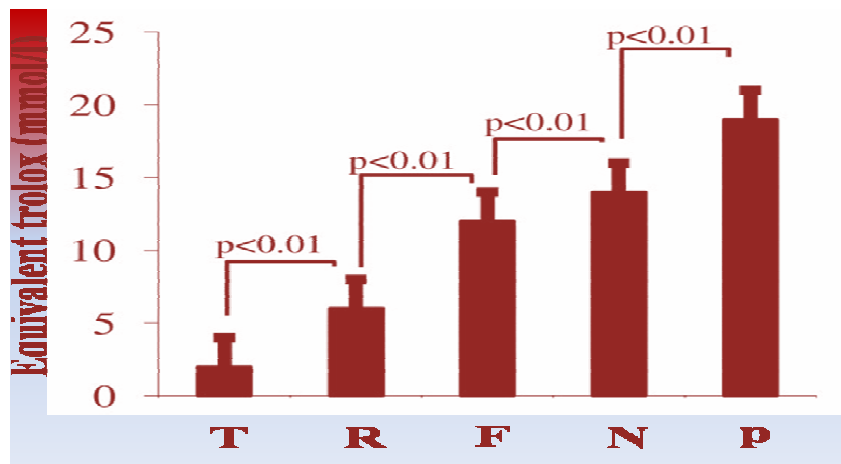


Figure 10: Pouvoir antioxydant des différentes parties de la plante

T: Tige R: Racine F: Feuille N: Noyau P: Pulpe

4. Les effets de *Zizyphus lotus* L. sur la blastogénèse et l'expression IL-2

32

Nous avons observé que l'anti-CD3 induit une forte prolifération des cellules T Jurkat, de même les extraits seul de *Zizyphus lotus* L. n'ont aucun effet sur la blastogénèse basale de ces cellules (résultats non montré). Cependant, tous les extraits ont significativement diminué, de façon dose dépendante, la prolifération de T-cellule induite par l'anti-CD3 (Fig 11). On peut noter que c'est la feuille et la racine qui exercent le plus puissant effet inhibiteur de la blastogénèse induite par antiCD3.

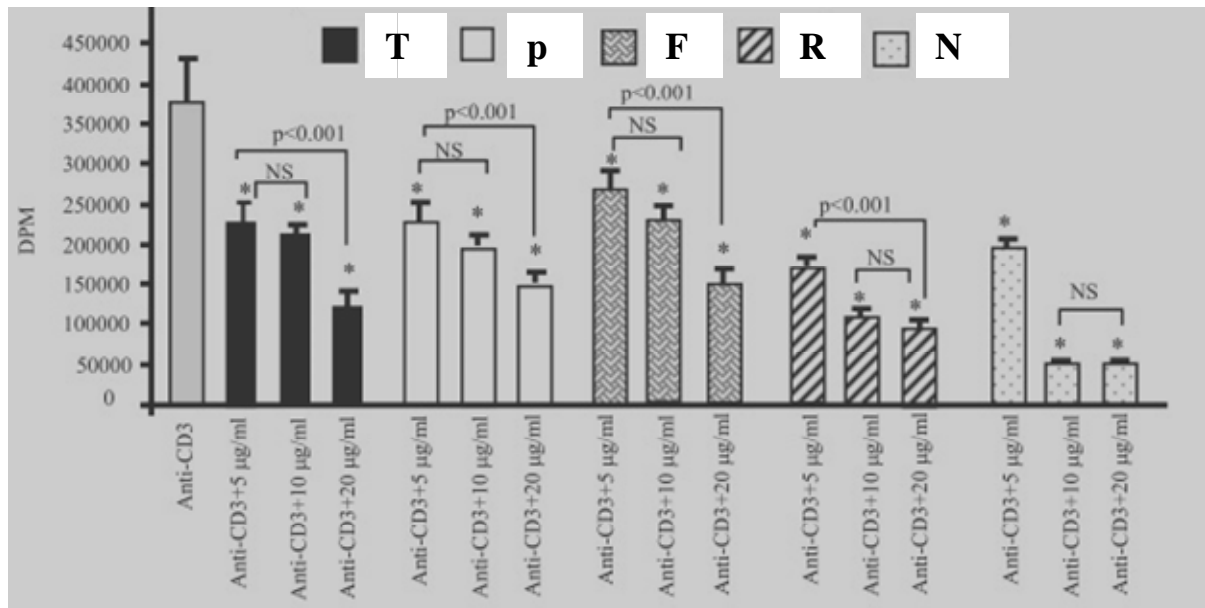


Figure 11: Effet des différents extraits de *Zizyphus lotus L* sur la prolifération cellulaire
 T:Tige R: Racine F: Feuille N: Noyau P: Pulpe

5. Les effets de *Zizyphus lotus L.* sur l'expression IL-2

Nous avons aussi évalué l'expression de l'ARNm de l'IL-2 et nous avons remarqué que les différents extraits de *Zizyphus lotus L.* ont manifestés des effets inhibiteurs (Fi 12). L'effet inhibiteur le plus puissant a été observé à 20µg/ml.

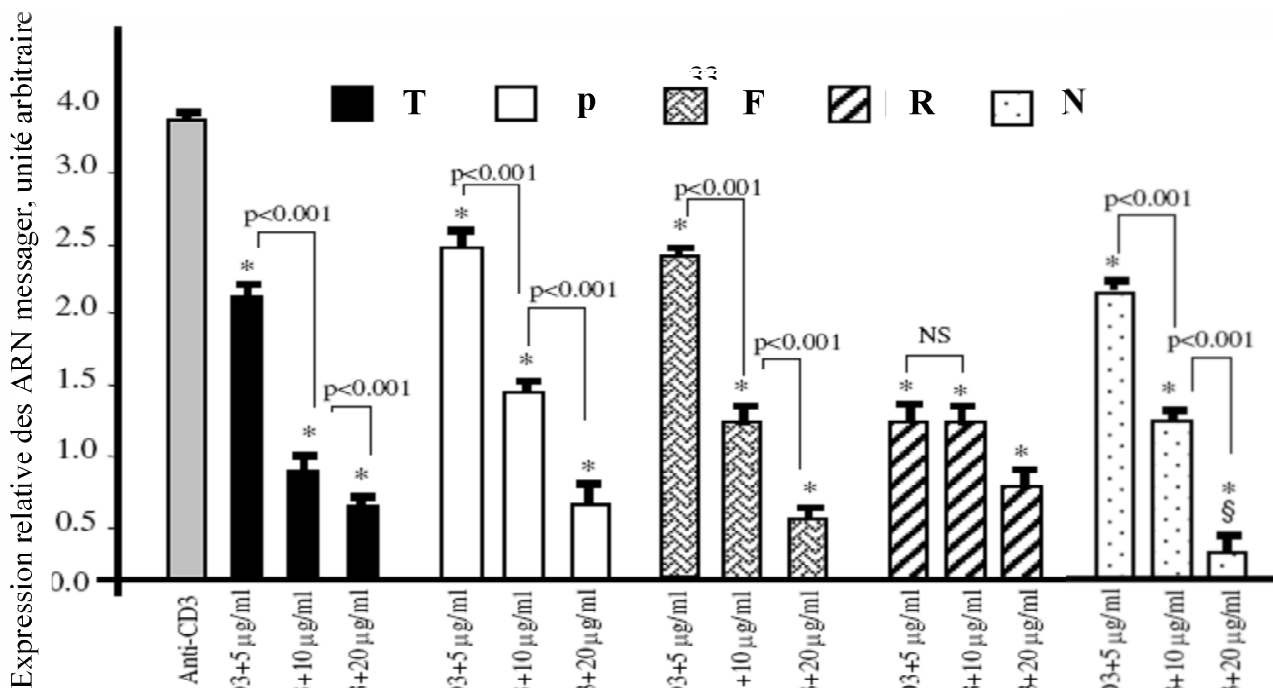


Figure 12: Les mesures de l'activité des différentes parties de *Zizyphus lotus* L. sur l'expression de l'IL-2.

Abréviations ; T: Tige R: Racine F: Feuille N: Noyau P: Pulpe

Discussion

Les anomalies des cellules T sont considérées comme la principale cause de maladies auto-immunes comme le diabète de type 1. Dans le diabète de type 2 également, l'activation permanente des monocytes par le contexte pro-inflammatoire associé à cette maladie, contribue à l'augmentation de résistance à l'insuline et à la perte de fonction sécrétaire d'insuline par les cellules des îlots pancréatiques (King, 2008).

La popularité du Jujubier comme source de nourriture et de médicaments n'a pas cessée de croître depuis des milliers d'années (Baytop, 1984 ; Gultekin, 2007).

Ces effets bénéfiques peuvent être liés à la présence de composés biologiquement actifs (Kalt et al., 2008). Dans notre étude, nous avons constaté que les extraits des différentes parties de *Zizyphus lotus L* exercent une activité antioxydante. Par conséquent, il est possible que l'activité antioxydante de *Zizyphus lotus L* (Desf.) puisse être attribuée aux vitamines antioxydantes présente dans *Zizyphus lotus L*. Pour cela, nous avons analysé la composition en vitamines dans les différentes parties de *Zizyphus lotus L* et nous avons cherché s'il existe une corrélation entre l'abondance des vitamines et la capacité antioxydante de la plante. Pour cela nous avons utilisé le test de corrélation de *de Spearman* (R_s), dans ce test on admet qu'il existe une forte corrélation entre deux paramètres lorsque le coefficient de corrélation (R_s) est proche de 1.

Les résultats de ce test montrent qu'il existe une forte corrélation entre la capacité antioxydante et l'abondance dans *Zizyphus Lotus L* de vitamines A ($R_s = 0,95$), vitamine C ($R_s = 0,82$) et vitamine E ($R_s = 0,68$). Nos résultats sont soutenus par ceux de Lenucci et al. (2006) qui ont démontré que l'activité antioxydante du jujubier est probablement due à sa teneur en vitamines antioxydantes. Cet argument explique le haut pouvoir antioxydant de la pulpe qui est la plus riche en vitamine A. L'extrait du noyau, qui est le plus riche de vitamine C exerce également un puissant effet antioxydant. L'extrait de feuille qui contient le plus de vitamine E, mais moins de vitamine C et A que la pulpe, exerce également une activité antioxydante significative. Il est également possible que l'activité antioxydante de la pulpe soit due, en partie, à la présence de polyphénols comme ils l'ont suggéré Lamien-Meda et al. (2008) et qui ont récemment rapporté que *Zizyphus mauritania* (L.) est riche en polyphénols. Ces chercheurs ont en outre évalué la capacité antioxydante des extraits de *Zizyphus mauritania* et ont finalement conclu que ce sont les polyphénols des fruits qui étaient

36

responsables de leur propriété anti-oxydante. Cependant, dans cette étude, nous n'avons pas pu déterminer les concentrations de polyphénols dans nos extraits. Néanmoins, nos résultats démontrent clairement que *Zizyphus lotus L*, possède des propriétés anti-oxydantes.

La présente étude montre également que la décoction de *Zizyphus lotus L* exerce une activité immunosuppressive. Nos résultats sont en bon accord avec ceux d'Adhvaryu et al. (2007) qui

ont également observé que les extraits de *Zizyphus lotus* L exercent des effets immunomodulateurs chez les rongeurs.

L'induction de la transcription du gène de l'IL-2 représente un événement critique et indispensable pour la prolifération des cellules T et leurs fonctions effectrices. Nous avons observé que les différents extraits inhibent la blastogenèse des cellules T et l'expression de l'ARNm de IL-2. Toutefois, nous avons observé que l'extrait du noyau est le plus puissant immunosuppresseur puisque cet extrait, à la concentration 10 µg/ml, inhibe de l'ordre de 86 % la prolifération des cellules T, tandis qu'à la même concentration, les extraits de la tige, pulpe, feuilles et racines inhibent la prolifération des cellules T d'environ, 38 %, 43 %, 29 % et 72 % , respectivement.

Les effets immunosuppresseurs significatif de l'extrait de noyau ne peut pas être attribués à sa teneur en vitamines puisque cet extrait ne contient pas de vitamine A, et sa teneur en vitamine E est plus faible que celle de la pulpe et des feuilles, de même sa teneur en vitamine C est plus faible que celle de la pulpe. Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'effet antiprolifératif du jujubier et sa teneur en vitamines. Cependant, il existe une forte corrélation ($R_s = 0.70$) entre la teneur en acides gras n-3 et l'effet antiprolifératif de *Zizyphus lotus* L

Par conséquent, il est possible que les acides gras puissent être responsables de cet effet immunosuppresseur. En effet, le noyau est le plus riche en acides gras n-3, notamment, deux types d'acides gras de la série n-3 connus pour leurs activités immunosuppressive à savoir l'acide linoléique (18:3 n-3) et l'acide eicosatriénoïque (20:3 n-3). Silva *et al.* (1995) ont rapporté que l'huile de *Zizyphus mistol*, qui est riche en l'acide eicosatriénoïque, module la croissance tumorale dans des modèles animaux (Muñoz *et al.* 1995).

Nos résultats sont corroborés par ceux Guil-Guerrero *et al.* (2004) qui ont détecté dans *Zizyphus jujuba*, cultivée en Espagne,

tous les acides gras que nous avons rapporté dans la présente étude. Il est important de noter que la composition en acides gras de *Zizyphus lotus* L dépend de plusieurs paramètres qui peuvent varier d'un pays à l'autre tels que le type d'irrigation, l'ensoleillement et le stade de maturité.

Il a été bien établi que les acides gras n-3 exercent une activité anti-inflammatoire et immunosuppressive à la fois dans les études cliniques et expérimentales (Calder *et al.* , 2006).

En effet, il s'est avéré que les extraits de *Zizyphus lotus* L. possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Baytop, 1984). Il est également important de souligner l'absence d'effets de des extraits *Zizyphus lotus*. L sur la prolifération basales des cellules T. Ce qui suggère que les extraits *Zizyphus lotus*. L dans des conditions normales ne modulent pas la prolifération des cellules T. Ces effets ressemblent à ceux des acides gras n-3 qui n'influencent pas la prolifération des cellules T normales issus des sujets sains (Kelley et al, 1998). En effet, les meilleurs immunosuppresseurs sont ceux qui modulent uniquement l'activation anormale de cellules T observable, entre autres, dans le cas des maladies auto- immunes (Chapkin et al, 2009).

En ce qui concerne le mécanisme d'action des acides gras, il a été bien établi qu'ils interfèrent avec les voies de signalisation intracellulaire, en particulier avec la cascade des MAP kinases comme ERK1/2 et p38 MAP kinase (Khan, 2010 ; Kim et al, 2010). D'ailleurs, Chan et al. (2006) ont démontré qu'un mélange d'herbes contenant les extraits *Zizyphus lotus* L, interfèrent avec la phosphorylation de ERK1 / 2 et p38 dans les cellules T.

Conclusion



39

Pour résumer, nous pouvons affirmer que des extraits aqueux de différents *parties* *Zizyphus lotus* L. exercent un potentiel thérapeutique certain, puisqu'ils possèdent des propriétés antioxydantes et immunosuppressives. À notre connaissance, mis à part une étude qui a montré qu'un mélange de plantes de la médecine chinoise contenant de *Zizyphus jujube* L. exercent un effet immunomodulateur (Chan et *al*, 2006), aucune étude n'a, jusqu'ici, été menée sur les effets de *Zizyphus lotus* L. (Desf.) dans l'activation des cellules T. D'autres

études sont nécessaires pour élucider les effets des différents extraits de cette plante dans la progression de maladies auto-immunes ou de transplantation d'organes.

Deuxième partie

**Effets antidiabétiques et
antioxydantes d'extraits de
pulpe et tige *Zizyphus lotus*
L chez le rat Wistar**

Revue
bibliographique



1. Diabète

Le diabète, longtemps considéré comme une maladie des pays riches, est devenu, depuis quelques années, un problème majeur de santé publique, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, notamment en zone tropicale (Monteiro *et al.*, 1991; Rolfe *et al.*, 1992). En 1997, environ 127 millions de personnes diabétiques ont été recensées dans le monde et ce chiffre atteindra, vers 2010, 221 millions (Amos *et al.*, 1997). De plus, on estime *qu'en Afrique la prévalence du diabète va être multipliée par un facteur de deux ou trois* (Amos *et al.*, 1997). La morbidité du diabète est signalée alarmante sur le continent Africain : Egypte (Arab, 1992), Libye (Kadiki *et al.*, 1987), Mali (Pichard *et al.*, 1988), Soudan (Elamin *et al.*, 1994), Tanzanie (McLarty *et al.*, 1996), Nigeria (Ndububa *et al.*, 1994), Cameroun (Ducorps *et al.*, 1997) et Bénin (Djrolo *et al.*, 1998). Il est à noter que des formes particulières du diabète sont connues avec un contraste entre le milieu sahélo-saharien où le sexe féminin est plus touché et le milieu sub-saharien où le sexe masculin est plus concerné, sans ignorer les aspects controversés de la physiopathologie spécifique du diabète en Afrique (Sidibe, 2000).

Bien que les critères classiques tels que, l'âge du diagnostic de la maladie, l'obésité et ses symptômes, les antécédents familiaux, la tendance spontanée à la cétose et un contexte d'auto-immunité, permettent de classer, dans les pays développés, les deux types majeurs de la maladie, diabète du type 1 ou diabète insulino-dépendant et diabète du type 2 ou diabète non-insulino-dépendant (Keen, 1986), une proportion non négligeable de patients diabétiques, dans les pays tropicaux d'Afrique sub-saharienne et d'Asie du sud-est, demeurent inclassables (Mohan *et al.*, 1992., and West, 1980). Les auteurs comme Alberti (1993) ont même considéré que, selon ces critères, d'autres formes de diabète sont exclues. En Afrique et en Asie du sud, le problème semble être plus complexe, puisque des formes intermédiaires ont été décrites chez des patients jeunes et adultes ayant un poids normal mais avec une grande variabilité de la cétose et du besoin en insuline (Ahren and Corrigan, 1985). Ces formes particulières de diabète ont fait naître le concept de « diabète tropical ». Le principal facteur évoqué dans le diabète tropical est la malnutrition (OMS, 1985).

- **Diabète en Algérie :** Le nombre des diabétiques en Algérie est passé d'un million de personnes en 1993, à plus de 2 500 000 personnes en 2007, soit 10% de la population. Ces statistiques établies par l'OMS, ont été révélées, par le président de la Fédération Algérienne des associations des malades diabétiques (FAAD),

et ce, lors de la célébration de la Journée nationale des personnes diabétiques, au Munatec de Blida. Placé sous le patronage du ministre de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière, cette rencontre a été organisée par la fédération algérienne des associations de diabétiques.

Le diabète est considéré comme une maladie chronique, invalidante et coûteuse, qui s'accompagne souvent de graves complications.

Les 25% des jeunes malades, sont des insulino-dépendants, alors que 10% des citoyens ignorent être atteints par cette maladie. Malgré la gravité de cette maladie, ainsi que la cherté des médicaments, 40% des malades diabétiques ne sont pas encore assurés et sont parfois totalement démunies. De ce fait, ces derniers ne savent pas s'ils doivent choisir entre manger ou alors acheter leurs médicaments. Toutefois, ils sont exposés à des complications très graves telles la gangrène ou la cécité.

Cette maladie, avec laquelle on apprend à vivre tout au long de sa vie, fait encore peur aujourd'hui. Le diabète correspond à une élévation anormale de la glycémie, définie par le taux de sucre dans le sang. Près de 90 % des diabétiques vivent pendant des années avec cette maladie sans le savoir car le diabète ne provoque en général pas de manifestations pendant une très longue période. Le diagnostic du diabète s'effectue le plus souvent lorsque les premières complications surviennent. Un délai de 7 ans environ s'écoule entre le moment où une glycémie est anormalement élevée sans avoir été repérée à ce moment là et le diagnostic du diabète.

Trois mesures peuvent être réalisées pour diagnostiquer un diabète :

- Lorsque la glycémie à jeun est supérieure à 1.26 g.L-1 à deux reprises, le sujet est diabétique (Stumvoll et *al.*, 2005). A partir de cette valeur seuil, apparait à plus ou moins long terme, le risque de survenue de complications touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins. Cependant, si la glycémie est comprise entre 1.10 et 1.26 g.L-1 , le sujet est hyperglycémique à jeun (intolérance au glucose). Ces sujets ne sont pas diabétiques mais sont à haut risque de le devenir en l'absence de mesures hygiénodiabétiques.
- Principe du Test de Tolérance Orale au Glucose (TTOG) ou Hyperglycémie provoquée par voie Orale (HGPO) : mesure de la glycémie à jeun du patient, puis ingestion de 75 g de glucose ou 1g/kg de glucose si le patient est en surpoids, à dissoudre dans l'eau avant l'ingestion qui dure 15 minutes.

- On mesure la glycémie toutes les 30 min pendant 2h. Si au bout des 2 heures, la glycémie est supérieure à 2 g.L-1, le patient est diabétique. Cette méthode est très coûteuse donc non réalisable pour l'ensemble de la population.
- Glycémie supérieure à 2 g.L-1 à n'importe quel moment de la journée, associée à des signes cliniques tels que la polyurie, la polydipsie et un amaigrissement.

On distingue deux formes principales de diabète :

- le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1
- le diabète non insulino-dépendant ou diabète de type 2.

1.1 .Diabète de type 1

Le diabète de type 1, également appelé diabète insulino-dépendant ou autrefois, diabète juvénile, est une maladie liée à la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Ces cellules sont chargées du contrôle de la glycémie par la production d'insuline, leur destruction entraîne une absence d'insulino-sécrétion et donc une hyperglycémie. L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 32% de cellules β fonctionnelle. Dans le cas de diabète de type 1, l'insuline, administrée par injection, est indispensable afin d'éviter le développement rapide d'une cétose et l'évolution vers le coma. Le type 1 est plus fréquent chez l'enfant et l'adolescent, mais peut également survenir chez le jeune adulte (< 30 ans) et il concerne 10 % des diabétiques. On ne retrouve des antécédents familiaux que dans 8 % des cas. Les taux d'incidence les plus élevés apparaissent clairement se situer dans l'hémisphère nord, et plus particulièrement en Europe. Ceci laisse supposer l'existence d'une susceptibilité génétique

1.2.Diabète de type 2

Il comprend un ensemble plus hétérogène de situations cliniques où l'on ne retrouve pas d'association HLA (*Human Leucocyte Antigen*), pas de cétose, et pas d'auto-anticorps ; on l'appelle aussi diabète de la maturité ou diabète gras et il est environ dix fois plus fréquent que le diabète de type 1. On ne connaît pas réellement la cause de cette maladie. Les patients souffrant du diabète de type 2 ne sont pas dépendants d'insuline pour survivre, et un certain degré d'insensibilité périphérique à l'insuline a été mis en évidence chez la plupart de ces malades (DeFronzo and Ferrannini, 1991). En effet, ce diabète est dû à une insuffisance endocrine du pancréas à faire face à un état d'insulinorésistance qui est le plus souvent associé à une obésité. Les mécanismes de cette insulinorésistance ne sont pas complètement élucidés.

On retrouve une diminution des récepteurs à l'insuline qui serait en partie le résultat d'une *down-regulation* en réponse à un hyperinsulinisme, lui-même étant la conséquence possible d'un trouble de l'insulinosécrétion. On a aussi évoqué le rôle des acides gras circulants qui, en trop grande quantité, inhibent l'utilisation périphérique du glucose par un phénomène de compétition de l'oxydation entre les lipides et les glucides.

La traduction clinique du diabète - ou des diabètes -, est différente selon qu'il s'agit de diabète insulino-dépendant ou non insulino-dépendant. Ainsi, à un stade évolué, le diabète de type 1 est associé à un tableau clinique d'amaigrissement, de fonte musculaire, de fatigue, de cétoacidose débutante et de déshydratation. A un stade moins avancé, on observe les signes traduisant la carence en insuline que sont la perte de poids assez rapide, la fatigue anormale, la polyurie et la polydipsie. Ce tableau clinique peut évoquer à tort une hyperthyroïdie. La présentation clinique du diabète de type 2 est habituellement asymptomatique, et le diagnostic se fait sur la présence d'une hyperglycémie. Parfois, cette anomalie biologique est associée à un certain degré de fatigue ou de polyurie, voire à une déshydratation évidente. Citons aussi quelques manifestations cliniques parfois révélatrices de la maladie : une candidose génitale, des lésions de folliculites, ou encore des troubles visuels en rapport avec l'hyperglycémie. (Tchobroutsky, 1987).

2. Métabolisme du glucose

2. 1. Rappels physiologiques

Le glucose est le substrat énergétique le plus rapidement utilisable par les cellules de l'organisme. La glycémie est déterminée par l'équilibre entre le glucose libéré dans le compartiment extracellulaire (apports exogènes, réserves endogènes) et le glucose consommé par les différents tissus de l'organisme. Le glucose ingéré lors d'un repas est absorbé au niveau de l'intestin grêle, puis passe dans le système porte jusqu'au foie où une partie (environ 30%) est captée par les hépatocytes puis métabolisée. Le reste (environ 70%), passe dans la circulation systémique pour être utilisé par des tissus périphériques, essentiellement les muscles. Entre les périodes de repas, des réserves endogènes de glucose permettent de fournir du sucre aux organes si nécessaire. Ces réserves sont essentiellement constituées dans le foie, car il contient du glycogène d'une part, et est capable de produire du glucose par la gluconéogenèse d'autre part.

Le glycogène hépatique est une forme de stockage de glucose immédiatement mobilisable en cas de besoin tel un jeûne ou un exercice musculaire important.

La gluconéogenèse quant à elle fournit du glucose endogène à partir de substrats non glucidiques que sont le lactate pyruvate, les acides aminés et le glycérol, généralement lors de jeûne prolongé.

Certains organes comme le foie, le muscle, et le tissu adipeux dépendent de l'insuline pour utiliser le glucose. D'autres, au contraire, peuvent assimiler le glucose sans insuline. Il s'agit du cerveau, de la médullaire rénale, de la rétine, des muscles squelettique et des hématies.

Dans ces organes, l'utilisation du glucose est fonction du niveau de glycémie. Plusieurs hormones interviennent dans la régulation du métabolisme glucidique. La seule hormone hypoglycémiante est l'insuline, qui stimule la synthèse de glycogène et de lipides, ainsi que le transport de glucose à l'intérieur des cellules. Par ailleurs, elle inhibe la gluconéogenèse et la glycogénolyse hépatique. Les autres hormones, au nombre de 4, sont hyperglycémiantes (Porcellati et *al.*, 2003). Il s'agit du glucagon, des catécholamines, de l'hormone de croissance, et des glucocorticoïdes (Vella et *al.*, 2003). Le glucagon augmente la production de glucose par le foie par le biais d'une stimulation de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse, et en diminuant la production de glycogène. Les catécholamines agissent en stimulant la libération de glycogène hépatique. L'hormone de croissance et l'IGF-1 (*insuline-like growth factor*) stimulent la production hépatique de glucose et réduit son utilisation périphérique (Frystyk et *al.*, 2003). Finalement, les glucocorticoïdes potentialisent les effets du glucagon et des catécholamines, et entraînent une insulino-résistance.

2. 2. Rôle de l'insuline

2. 2. 1. Aspects généraux

In vivo, l'insuline résulte de la maturation protéolytique d'un polypeptide précurseur inactif, la proinsuline ($t_{1/2} = 30$ min). Cette molécule précurseur est produite par le réticulum endoplasmique des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Lors de sa maturation, cette molécule est clivée et transportée dans l'appareil de Golgi, où elle est stockée dans des granules sécrétoires. La maturation de ces granules aboutit à l'insuline mature et fonctionnelle, peptide composé de 2 chaînes d'acides aminés unies par des ponts disulfures, et à un petit peptide, le C-peptide. L'insuline circule sous forme libre dans le plasma, et possède une courte demi-vie de l'ordre de quelques minutes ($t_{1/2} = 4$ min) en raison d'un important effet de premier passage hépatique. Rappelons ici que l'insuline est la pierre angulaire du traitement du diabète et qu'elle a été administrée pour la première fois à un humain en 1922 (Best, 1956).

2. 2. 2. Régulation de l'insulinosécrétion

Un pancréas humain normal sécrète 40 à 50 unités d'insuline par jour. La concentration basale d'insuline dans le sang lors de période de jeûne est d'environ 0,4 ng/ml (ou 69 pmol/l).

Une dizaine de minutes après l'ingestion d'un repas, on observe une augmentation de la concentration sanguine périphérique d'insuline, qui atteint son pic après environ 30 à 457 minutes. Chez le sujet normal, il est rare que le taux d'insuline s'élève au-delà de 690 pmol/l après un repas.

Par la suite, il y a une diminution assez rapide de la glycémie qui revient aux valeurs basales après 90 à 120 minutes environ. Plusieurs molécules stimulent la sécrétion de l'insuline. Le glucose représente le stimulus principal, mais certains acides aminés (arginine, leucine, lysine) ont aussi un effet stimulant direct. Il existe une sécrétion basale d'insuline (c'est-à-dire en l'absence de stimuli) en présence d'une glycémie normale, à savoir 4,4-5,6 mmol/l. Parmi les hormones, l'acétylcholine, le glucagon, l'hormone de croissance, et des hormones gastro-intestinales comme le VIP (*Vaso Intestinal Peptide*) et la gastrine favorisent l'insulinosécrétion. Au contraire, l'adrénaline, la noradrénaline et la somatostatine ont un effet inhibiteur direct sur la sécrétion de l'insuline.

La régulation de la glycémie est aussi assurée par le système nerveux :

- *Le système sympathique* : Une diminution du glucose stimule les récepteurs hormonaux et par l'intermédiaire d'un mécanisme réflexe, qui agit sur la médullosurrénale, il y a une libération de l'adrénaline qui a tendance à augmenter la sécrétion du glucagon et diminuer ainsi celle de l'insuline (stimulation α adrénergique) ;
- *Le système parasympathique* : Il participe à la coordination des réponses hyper et hypoglycémiques. Il intervient à la fois par son effet insulino-sécréteur ; et à moindre degré par stimulation de sécrétion de glucagon. La sécrétion stimulée d'insuline en réponse à une charge alimentaire en glucose est en fait une sécrétion biphasique. En effet, on observe une phase précoce de sécrétion d'insuline, suivie d'une phase de sécrétion retardée si la glycémie reste élevée. Toutefois, si la glycémie reste élevée de façon prolongée (> 24 heures), on observe une phase de désensibilisation réversible des cellules β du pancréas en réponse au glucose. Les molécules de glucose pénètrent dans les cellules β par diffusion passive, mais facilitée par l'existence d'un transporteur membranaire spécifique appelé GLUT-2 (glucose transporter-2). Etant donné son affinité moyenne pour le glucose, ce transporteur agit surtout durant les phases d'hyperglycémie.

L'action de l'insuline au niveau des tissus cibles se fait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (Stephens and Pilch, 1995). De fait, l'action de l'insuline au niveau des cellules du tissu adipeux, du foie, et des muscles est médiée par l'interaction entre la molécule d'insuline et les récepteurs spécifiques, comme le GLUT-4 (Stephens and Pilch, 1995). 8 fois l'insuline liée à son récepteur, on assiste à un phénomène d'internalisation des récepteurs aboutissant à l'action même de l'insuline.

Il apparaît clairement que des anomalies des récepteurs à l'insuline, que ce soit leur concentration, leur affinité ou les deux, vont affecter l'action et l'effet de l'insuline.

Ainsi, au cours du phénomène de « down-regulation », on assiste à une diminution des récepteurs à l'insuline en présence de taux d'insuline chroniquement élevé. Les situations cliniques au cours desquelles on observe ce phénomène sont principalement l'obésité et l'hyperinsulinisme chronique d'origine exogène.

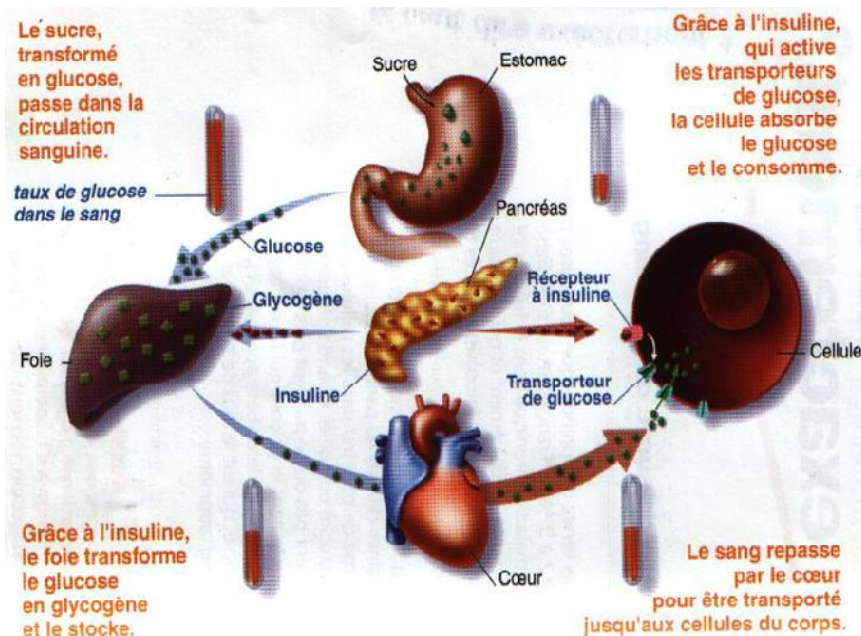


Figure 13 : Mode d'action de l'insuline. (Stephens and Pilch, 1995).

2. 2. 3. Effets métaboliques de l'insuline

L'effet métabolique principal de l'insuline est de promouvoir le stockage des nutriments ingérés (figure 13). Les principaux tissus bénéficiant de cette hormone sont le foie, le tissu adipeux et les muscles.

Le foie est le premier organe qu'atteint l'insuline par la circulation sanguine. A ce niveau, cette hormone induit un phénomène anabolique, puisqu'elle stimule la production de glycogène et inhibe simultanément sa dégradation par le biais d'une modulation enzymatique du cycle de synthèse. On assiste aussi en présence d'insuline à une augmentation de synthèse de protéines, de triglycérides et de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) par le foie. La gluconéogenèse est inhibée et la glycolyse est accrue. En augmentant le transport des acides aminés et la fonction ribosomale, l'insuline stimule la synthèse protéique du muscle.

De plus, la synthèse de glycogène est accrue pour palier aux dépenses musculaires. Bien que ce tissu stocke environ 600 g de glycogène (chez un individu de 70 kg), cette source d'énergie ne peut être utilisée directement en raison du manque de glucose-6-phosphatase, et doit donc transiter par le foie pour le transformer en glucose *via* le lactate.

Le tissu adipeux, ou graisse, est le mode de stockage d'énergie le plus efficace, car il fournit 9 kcal par gramme de tissu. Au niveau de ce tissu, l'insuline augmente la formation de triglycéride dans l'adipocyte par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Premièrement, la lipoprotéine-lipase est activée, ce qui a pour conséquence une hydrolyse des triglycérides attachés aux lipoprotéines circulantes. Deuxièmement, en augmentant le transport de glucose vers les adipocytes, l'insuline permet une meilleure utilisation de l' α -glycérol phosphate, une substance importante dans l'estérification des acides gras libres en triglycérides. Finalement, l'insuline empêche la lipolyse intracellulaire en inhibant la lipoprotéine-lipase intracellulaire.

3. Statut antioxydant

Plusieurs désordres métaboliques sont liés à la résistance à l'insuline et à l'hypertension artérielle, tels que l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie et le stress oxydatif, pouvant aussi conduire au développement du syndrome métabolique. En effet, des études réalisées chez l'homme et chez des modèles animaux d'hypertension artérielle et de résistance à l'insuline ont montré une élévation marquée de la production de radicaux libres, ainsi qu'une diminution des systèmes de défense antioxydants (Cai and Harrison, 2000 ; John and Schneider, 2003). Un défaut du système de défense antioxydant et/ou une élévation anormale de différentes molécules oxydatives modifient la balance oxydants/anti-oxydants en faveur d'un système pro-oxydant qui va générer un stress oxydatif (Fig 14).

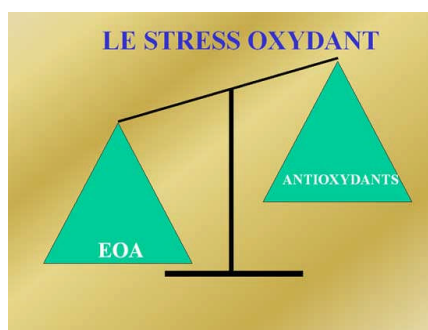


Figure 14 : Balance oxydants/ antioxydants en faveur d'un stress oxydatif

3.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, possédant un électron célibataire (ou électron non apparié) sur sa couche périphérique, qui est beaucoup plus réactive que la molécule ou l'atome dont elle est issue. La majorité des espèces radicalaires sont dérivées de l'oxygène, mais certaines peuvent être dérivées du soufre ($RS\bullet$, les thiyles) ou de l'azote ($\bullet NO$) qui possède un électron partagé entre son atome d'azote et son atome d'oxygène.

Les espèces radicalaires, dérivées de l'oxygène ou de l'azote, ont un rôle physiologique important en agissant à faibles concentrations comme des messagers secondaires capables de :

- réguler le phénomène d'apoptose qui est un suicide programmé des cellules, évitant ainsi leur évolution vers un état cancéreux (Slater et *al.*, 1995),
- activer des facteurs de transcription (NFkB, p38-MAP Kinase), eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire,
- moduler l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes anti-oxydantes. Dans le cas du diabète, c'est l'auto-oxydation du glucose qui donne naissance à des radicaux libres.

3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène ont différentes structures dont les principales formules sont rassemblées dans le (Tableau 4).

Dans les cellules de mammifères, les radicaux libres proviennent essentiellement de réaction enzymatique et découlent principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire ou du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

Radicaux libres du stress oxydatif
O•2 : radical sueroxyde
H O•2 : radical perhydroxyde
OH : radiacel hydroxyde
R O•2 : radical peroxyde
R O•2 : radical alkoxyde

Tableau 4 : Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydatif.

En effet, la production de radicaux libres est une conséquence inévitable de la respiration aérobie qui consomme de l'oxygène moléculaire (O₂). Le métabolisme énergétique des organismes aérobies dépend de la phosphorylation oxydative, processus par lequel l'énergie du transfert d'électrons formés lors du cycle de Krebs à partir du NADH, est transformée en une liaison phosphate dans la molécule d'ATP. C'est l'oxygène moléculaire qui sert d'accepteur final des électrons lors de ce transfert (d'où le nom de chaîne respiratoire) : 1 molécule d' O₂ est réduite par 4 électrons en 2 molécules d'H₂O par la cytochrome c oxydase. l'O₂ est un bi-radical avec deux électrons célibataires mais il ne peut pas accepter simultanément les électrons nécessaires à sa réduction en H₂O. Ainsi, la réduction incomplète de l'O₂ en H₂O peut conduire à la formation d'intermédiaires réduits, hautement réactifs. La production des radicaux libres n'est pas négligeable puisque 2% des électrons de la chaîne de transfert conduisant à leur formation en conditions physiologiques normales (Nohl and Hegner , 1978).

Les ERO peuvent également provenir d'autres réactions métaboliques cellulaires spécifiques à certaines cellules, par exemple lors de la désamination de la dopamine par la monoamine oxydase dans les neurones dopaminergiques.

Leur production peut aussi être liée à des facteurs environnementaux. Ils peuvent par exemple être produits à la suite de l'exposition des cellules à différentes molécules, telles que la peptide Aβ impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Behl et *al.*, 1994), les rayons ultra-violet (Scharffeter-kochanek et *al.*, 1997) (Tableau 4).

Les radicaux libres, en réagissant avec les molécules non radicalaires, plus stables, vont soit leur arracher un électron soit leur en céder un, conduisant à la formation en chaîne de nouveaux radicaux libres.

Si deux radicaux libres joignent leurs électrons libres, ils forment une espèce non-radicalaire mais réactive (Figure 10).

Les espèces réactives de l'oxygène sont, en particulier, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singlet (1O_2). On dénombre plus de 100 espèces réactives

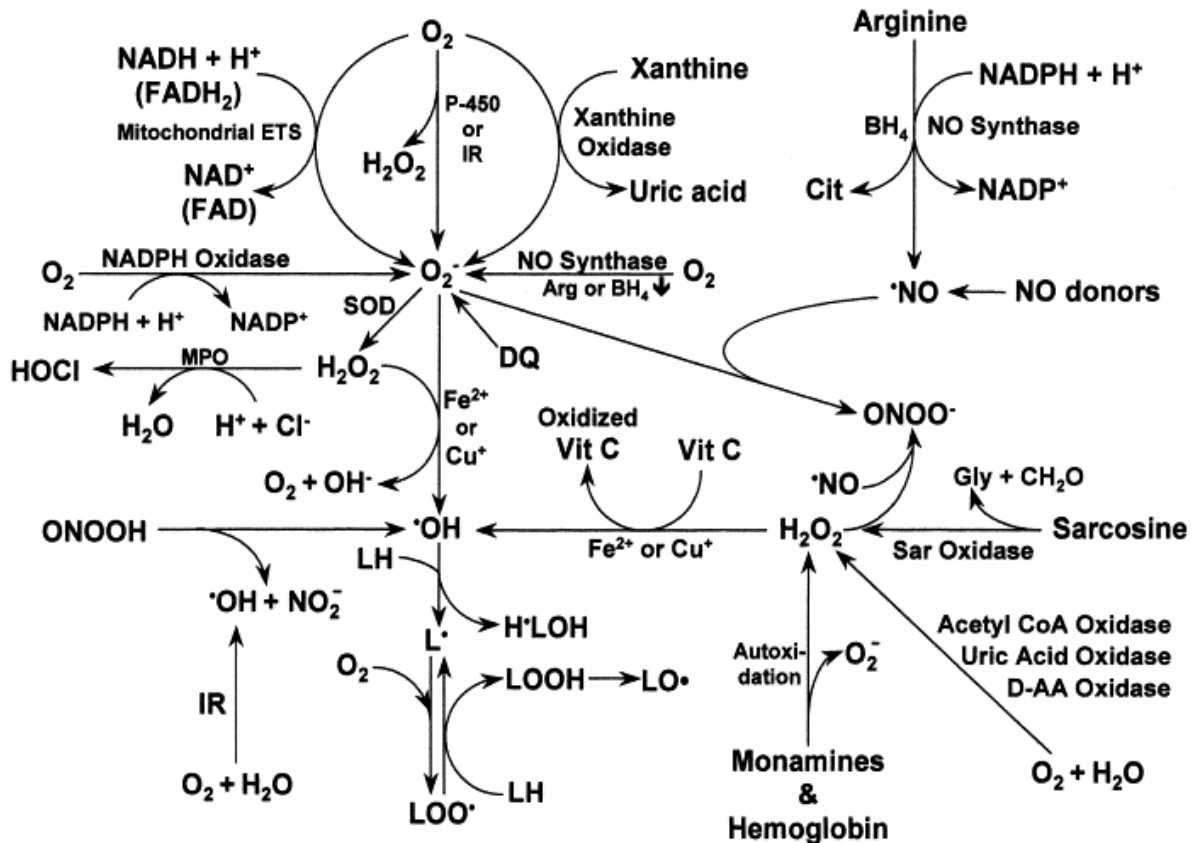


Figure 15: Production de radicaux libres oxygénés et azotés ainsi que d'autres espèces réactives dans les cellules de mammifères (Fang and *al.*, 2002)

AA, acides aminés : Arg, L-arginine ; BH₄, (6R)-5, 6, 7, 8, -tétrahydro-L-biopterine ; CH₂O, formaldéhyde ; Cit, L-citrulline ; DQ, diquat ; FAD, flavine adénine dinucléotide (oxydée) ; FADH₂, flavine adénine dinucléotide (réduite) ; Gly, glycine ; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène ; HOCl, acide hypochloreux ; H•LOH, radical hydroxylipidique ; IR, radiation ionisante ; L•, radical lipidique ; LH, lipide (acides gras poly-insaturés) ; LO•, radical alkoxy lipidique ; LOO•, radical peroxy lipidique ; LOOH, hydroperoxyde lipidique ; MPO, myéloperoxydase ; NAD⁺, nicotinamide adénine dinucléotide (oxydé) ; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide (réduit) ; NADP⁺, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (oxydé) ; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit) ; NO, oxyde nitrique ; O₂⁻, anion superoxyde ; •OH, radical hydroxyl ; ONOO⁻, peroxydinitrite ; P-450, cytochrome P-450 ; Sar, sarcosine ; SOD, superoxyde dismutase ; STE, système de transport des électrons ; Vit C, vitamine C (acide ascorbique) ; Vit E, vitamine E (α -tocophérol).

La production et l'intervention dans de nombreuses fonctions cellulaires des ERO sont réalisées dans 3 compartiments :

la mitochondrie (précédemment citée), le cytosol et le noyau. L' O_2 est incapable de traverser les structures membranaires, c'est pourquoi son action est essentiellement localisée en deux pools non communicants, l'un mitochondrial, l'autre cytosolique.

3.1.2. Espèces réactives dérivées de l'azote

Le monoxyde d'azote est un composé radicalaire ($\dot{N}-O$) produit par les cellules de l'endothélium vasculaire, grâce à la NO synthase (NOS).

On distingue deux types d'enzymes :

- la NOS constitutive (endothéliale ou neuronale), présente dans l'endothélium vasculaire, est en permanence active et produit de faibles quantités de NO. La NOS endothéliale est impliquée dans la régulation de l'homéostasie vasculaire.
- la NOS inductible, présente dans les macrophages, est normalement inactive mais se manifeste en réponse à un stimulus inflammatoire et produit de grandes quantités de NO.

Le monoxyde d'azote (NO) et, plus particulièrement les espèces réactives de l'azote, peuvent engendrer un stress oxydatif intracellulaire, interagir avec l'ADN et avec le métabolisme mitochondrial, réguler les processus de transduction et d'apoptose.

L'implication du NO dans la survenue de nombreuses pathologies comme le diabète , l'athérosclérose, le cancer, témoigne de son rôle paradoxalement délétère. Le stress oxydatif est une cause majeure majeure de souffrances cellulaires, associée à de fortes concentrations en NO. En l'absence d'ions superoxyde, le NO est un inhibiteur de la peroxydation lipidique et de la formation des produits secondaires (hydroxydes d'AGPI et isoprostanes). Sa Réaction avec un radical lipidique peroxyde conduit à un peroxy-nitrique lipidique (LOONO), ce qui entraîne l'arrêt immédiat de la propagation. Cependant, en présence d' O_2 , le NO réagit pour former du peroxy-nitrite ($\dot{O}ONO$). Ce composé, d'une très grande réactivité, va endommager les protéines, les lipides en initiant la peroxydation lipidique et les acides nucléiques (Beckman, and Koppenol ,1996). Il diffuse largement à travers les membranes. Le peroxy-nitrite ($\dot{O}ONO$) peut mener à la formation d' H_2O_2 (Stamler et al. , 1992). Le peroxyde d'hydrogène et le fer, libéré par la ferritine sous l'action du NO, sont également des acteurs du stress oxydatif.

La présence de NO peut conduire à l'oxydation du glutathion réduit, la cellule perd ainsi une grande partie de sa capacité de défense contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

3.2. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif

Pour protéger ses tissus contre les effets nocifs des radicaux libres, l'organisme possède des mécanismes de riposte anti-radicalaire polymorphe, à la fois préventive et curative (Haliwell, 1994). Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat. Cette définition s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques tels que l'hème oxygénase, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion réductase et la glutathion peroxydase et des mécanismes non enzymatiques tels que les chélateurs de métaux de transition, la céruloplasmine, la ferritine, la métallothionéine, l'albumine et la bilirubine.

Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et qui jouent le rôle de piègeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons) ; le plus important est le glutathion réduit (GSH) qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes ou le radical monoxyde d'azote. D'autres antioxydants exogènes apportés par l'alimentation participent à la neutralisation des radicaux libres qui sont hydro- ou liposolubles tels que l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, le β -carotène et les flavonoïdes.

Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires. Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire.

3.2.1. Systèmes antioxydants endogènes (Fig 16)

- *Les enzymes*

- **les superoxydes dismutases (SOD)** à cuivre et à manganèse : responsables de la dismutation de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Fridovich, 1978). Elles ont des localisations cellulaires différentes : cytosolique, mitochondriale ou extracellulaire. La Cu/Zn-SOD nécessite des ions cuivre pour assurer l'activité catalytique et des ions zinc pour stabiliser la molécule. La Cu/Zn-SOD, de localisation cytoplasmique, est exprimée dans toutes les cellules et son activité est particulièrement importante dans le foie, les érythrocytes, le cerveau et les neurones.

Mn-SOD est plus fortement exprimée dans le cœur, le cerveau, le foie et les reins. En revanche, les érythrocytes ne possèdent pas de mitochondries n'ont pas d'activité Mn-SOD.

- **La catalase** est une enzyme fer dépendante capable de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau et est présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes. Son activité la plus importante est dans les érythrocytes, les érythrocytes et les reins.
- **La glutathion peroxydase (GSH-Px)**, sont des enzymes sélénium dépendantes, capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques par oxydation du glutathion réduit (GSH). On distingue 5 isoenzymes de la GSH-Px chez les eucaryotes, la plus abondante étant la GSH-Px cytoplasmique (90%) et mitochondriale (10%). Elle est ubiquitaire, mais particulièrement présente dans les érythrocytes, le foie et les reins.
- **La glutathion réductase (GSSG-Red)** régénère le glutathion réduit en utilisant le NAD(P)H comme cofacteur, est localisée avec la glutathion peroxydase, réduit le GSSG en GSH. Elle se trouve dans le cytosol et les mitochondries.

3.2.2. Antioxydants non enzymatiques

- Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine) qui capte les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), alkoxyles ($\text{RO}\bullet$) et prévient l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur, en plus de son rôle de substrat dans la réaction catalysée par la glutathion peroxydase. Il est essentiellement présent sous forme réduite. Le GSH est impliqué comme cofacteur pour l'activité de la glutathion peroxydase et dans le métabolisme des ascorbates. C'est aussi un composé piègeur endogène synthétisé par les cellules. Il protège, non seulement, contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes. Dans le cerveau, le GSH joue un rôle important dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Butterfield et *al.*, 2002 ; Drake et *al.*, 2004). Le GSH est plus abondant dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie (Masella et *al.*, 2005).

- L'acide urique, majoritairement ionisé sous forme d'urate, est capable de réagir avec les radicaux hydroxyles pour former une espèce radicalaire relativement stable.

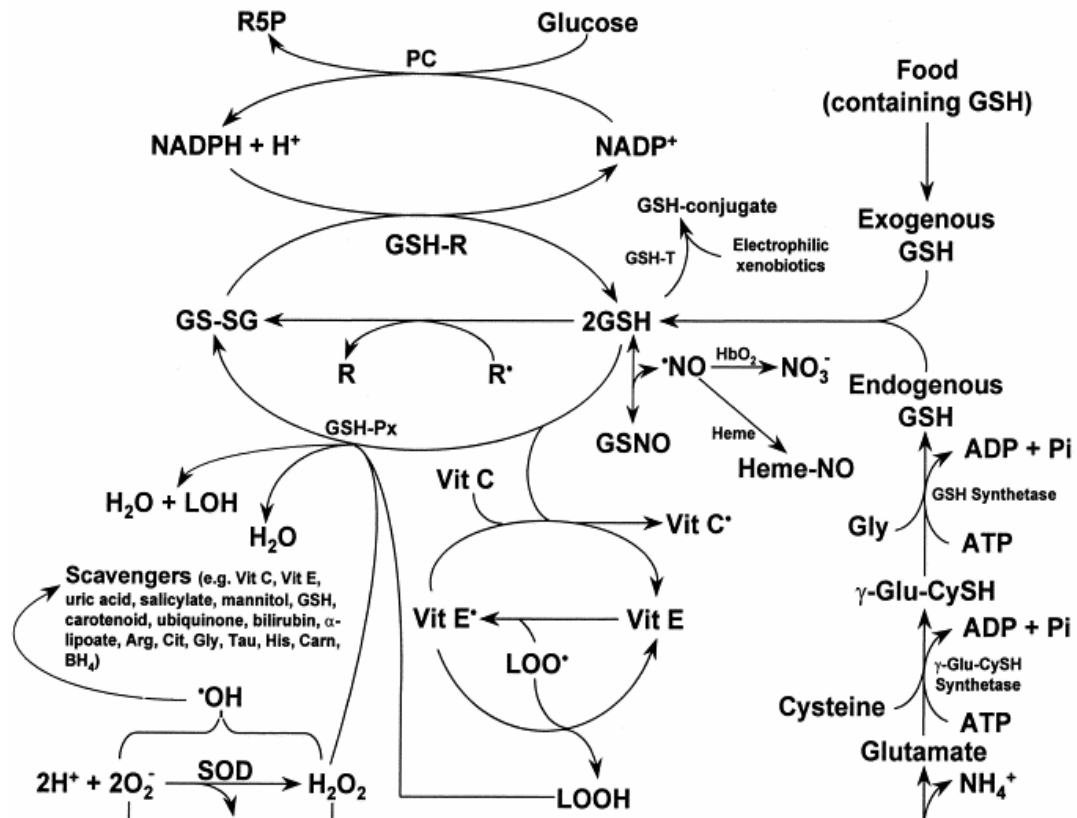


Figure 16 : Elimination des radicaux libres oxygénés et azotés ainsi que d'autres espèces réactives, chez les mammifères (Fang *et al.*, 2002)

ADP, adénosine diphosphate ; Arg, L-arginine, BH₄, (6R)-5, 6, 7, 8, -tétra hydro-L-biopterine ; Carn, carnosine ; Cat, catalase ; Cit, L-citrulline ; Cyt C, Cytochrome C ; STE, système de transport des électrons ; Glu, L-glutamate ; GPD, glutaminase phospho-dépendante ; Gly, glycine ; γ -Glu-CySH, γ -glutamyl-cystéine ; GS-SG, glutathion dissulfide oxydé, GSH, glutathion réduit ; GSH-Px, glutathion peroxydase ; GSH-R, glutathion réductase ; GSH-T, glutathion S-transférase ; GSNO, glutathion nytrosylé ; HbO₂, oxyhémoglobine ; Hème-NO, hème-oxyde nitrique ; His, histidine ; LOH, alcool lipide ; LOO^{*}, radical peroxy lipidique ; LOOH, hydroperoxyde lipidique ; ^{*}NO, oxyde nitrique ; NO₃⁻, nitrate ; O₂⁻, anion superoxyde ; ONOO⁻, hydroperoxyde lipidique ; ^{*}NO, oxyde nitrique ; NO₃⁻, nitrate ; O₂⁻, anion superoxyde ; ONOO⁻, peroxydinitrite ; PC, cycle des pentoses ; R^{*}, radical ; R, non-radical ; R5P, ribulose-5-phosphate ; SOD, superoxyde dismutase ; Tau, taurine ; Vit C, vitamine C (acide ascorbique) ; Vit C^{*}, radical de la vitamine C ; Vit E, vitamine E (α -tocophérol) ; Vit E^{*}, radical de la vitamine E.

3.2.3. Systèmes antioxydants exogènes

Nos aliments jouent un rôle primordial dans notre capacité de défense vis-à-vis de la production non contrôlée des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène. La prévention du stress oxydatif et de ses conséquences implique l'optimisation des apports en antioxydants par l'alimentation. Parmi les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes, il y'a le fait qu'ils ont une teneur élevée en antioxydants (Prior, 2003).

En effet, une alimentation riche en antioxydants, et en particulier en certains micronutriments (vitamines C, E, caroténoïdes, sélénium, zinc) diminue le risque de survenue de maladies cardiovasculaires (Busserolles et *al.*, 2003), alors qu'à l'inverse, une consommation pauvre en fruits et légumes et/ou de faibles taux sanguins d'antioxydants accroissent le risque de développer ces pathologies (Rissanen et *al.*, 2003).

Outre les vitamines, les polyphénols sont présents dans de nombreux fruits et légumes (environ 400 espèces chimiques) avec des teneurs variables. Ils ont une activité antioxydante plus élevée par exemple que celle de la vitamine E et ils inhibent la peroxydation lipidique.

De même, les oligoéléments comme le sélénium et le zinc sont présents dans le site actif de plusieurs enzymes antioxydantes. Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathion peroxydases séléno-dépendantes. IL permet de maintenir le pool de glutathion réduit, ce qui protège les membranes, en particulier des groupements thiols. Le zinc assure la stabilisation de la Cu/Zn-SOD. Le zinc protège également les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer et inhibe la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène.

L'optimisation des apports en antioxydants par l'alimentation est nécessaire afin de contribuer à la prévention nutritionnelle de nombreuses pathologies où le stress oxydatif est présent. Les apports quotidiens optimaux sont notés dans le Tableau 5.

Nutriment antioxydant	Apport usuel	Apport nutritionnel conseillé
Vitamine C	60-80 mg	110 mg
Vitamine E	5- 10 mg	12 mg
Vitamine A	300 µg	500- 600 µg
Sélénium	40 µg	60- 80 µg
Zinc	7- 10 mg	10- 12 mg

Tableau 5 : Estimation des apports quotidiens optimaux en antioxydants (Fao/Who, 1998).

4. Diabète et stress oxydatif

le stress oxydatif est impliqué dans la destruction des cellules β pancréatique (Hotta *et al.*,1998) et pourrait largement contribuer aux lésions tissulaires associées à l'hyperglycémie chronique. Les cellules β sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif en raison, d'une part, de leur pauvreté en CU/Zn SOD, catalase, GPx et glutathion réduit (Lenzen *et al.*,1996) et d'autre part du rôle des radicaux libres comme seconds messagers des interleukines dans la réaction auto-immune (Rabinovitch, 1998). Il a été montré que l'hyperglycémie et l'augmentation des acides gras libres dans le sang des diabétiques entraînent une activation de la NAD(P)H oxydase et une production d' O_2^- (Baynes, 1991). De plus, l'augmentation des radicaux libres altère la vaso-relaxation que ce soit au cours du diabète de type 1 ou du diabète de type 2 (Hink *et al.*,2001) .

Une étude récente a mis en évidence le rôle de la GPx dan la protection des cellules β pancréatiques contre le stress oxydatif dans un modèle de glucotoxicité (Tanaka *et al.*,2002). Au cours du diabète, il y a non seulement une augmentation des radicaux libres mais en plus une altération des défenses due à la glycation des enzymes antioxydantes, et à la perturbation de la concentration de leurs cofacteurs (Zn, Se, Cu) (Strain, 1991).

*Matériels
et méthodes*

1. Choix du modèle expérimental

Le rat de laboratoire est un modèle expérimental couramment utilisé pour son disponibilité des données physiologiques chez le rat est importante ce qui en fait un modèle de choix pour l'expérimentation. Cependant, quelques limites existent dans ce modèle.

2. Généralités du suivi des rats :

2.1. Animaux et régimes : L'étude est réalisée sur 32 rats mâles de souche Wistar (Dijon, France), âgés de 8 semaines et pesant 220g à 230g en début d'expérimentation. Les rats sont maintenus dans une animalerie à la température constante de 24°C et une humidité de $60 \pm 5\%$, avec un cycle circadien (12h jour/ 12h nuit). A leur arrivée, les animaux sont alimentés avec un régime standard pour rongeur (UAR) pendant 1 semaine pour une phase d'adaptation. L'eau de boisson et la nourriture sont données à volonté. Après cette phase d'adaptation les rats sont rendu diabétique par injection de Streptozotocine.

Le diabète peut être induit chez l'animal par différentes techniques dont l'injection de la Streptozotocine (STZ) qui est largement utilisée (Szkudelski, 2001). La STZ est un glucosamine nitrosé (Anderson et *al*, 1974; Povoski et *al*, 1993), elle entraîne un effet cytotoxique sélectif des cellules β des îlots de Langerhans (Anderson et *al*, 1974 ; Robbins et *al*, 1980 ; Crouch et *al*, 1978). Le mécanisme d'action de cet agent diabéto-gène reste encore mal connu. Cependant, les études postérieures ont montré son action sur les îlots de Langerhans en réduisant la masse des cellules par conséquent une insulino-pénie caractéristique d'une hyperglycémie chronique ou transitoire (Aughstee, 2000; Szkudelski, 2001; Chen et Ianuzzo, 1981).

Dans la présente étude, le diabète est induit par injection intra péritonéale d'une dose unique de STZ (60 mg/kg), diluée dans un tampon citrate (pH 4.5). Les rats témoins non diabétiques sont injectés (IP) avec du tampon citrate. Après l'installation de l'hyperglycémie (environ 2 g/l), les rats diabétiques ont été réparties d'une façon aléatoire en 3 sous lots de 8 rats, pour être ensuite gavés quotidiennement avec les extraits de plante comme suit :

- les rats témoins ayant uniquement du tampon citrate.

- rats témoins gavés de tige
- rats témoins gavés avec des extraits aqueux de pulpe

61

- les rats diabétiques sans traitement
- rats diabétiques gavés avec des extraits aqueux de tige
- rats diabétiques gavés avec des extraits aqueux de pulpe

2.2. Gavage

Les rats étaient pesées chaque jour juste avant de les gaver avec la phase aqueuse de décoction de tige ou pulpe (300 mg /kg de rat).

Nous avons choisi d'administrer les extraits de plantes par voie orale pour de multiples raisons :

D'une part, car le choix de la plante s'était fondé sur des bases ethnopharmacologiques; les gens l'utilisent pour traiter le diabète sucré en avalant les tisanes qui en découlent ou en la consommant entièrement. Subséquemment, c'est la voie la plus proche de la réalité, c'est la mère nature.

D'autre part, c'est une voie d'administration physiologique, elle offre certain nombre de critères, d'efficacité et de commodité. De plus elle ne nécessite aucun matériel particulier. De point de vue pharmacologique, la voie orale est la plus couramment utilisée (70 à 80% des médicaments sont administrés *per os*). Cette voie est, généralement, bien acceptée par les patients (Bourin and Jolliet, 1999).

Les données rassemblées sur l'utilisation traditionnelle de cette herbe font ressortir que la plante était consommée sous sa forme brute. De ce fait, on s'est basé sur l'extrait aqueux qui contient les plus de composés présents dans la plante.

2.3. Test oral de tolérance au glucose (GTT)

Après trois semaines de gavage par les extraits de plante, les rats sont mis à jeun pendant 12h avant d'effectuer le GTT . La glycémie a été mesurée avant de gaver les rats avec une 3 g/kg de glucose. Ensuite la glycémie à été mesurée à différents temps pendant 120mn. La glycémie est mesurée par un glycomètre (One Touch, France) sur une goutte de sang obtenue après incision de l'extrémité de la queue de rat.

2.4. Le sacrifice des animaux et les prélèvements d'organes

Après trois semaines de gavage, les rats à jeun sont préalablement anesthésiés par injection intrapéritoniale de phénobarbital (30mg/kg de poids corporel). Le sang est prélevé par ponction de l'aorte abdominale en présence de 0.1% d'EDTA-Na₂,

62

pour éviter sa coagulation, puis centrifugé à 1000 g pendant 20mn à 4° C afin de séparer le plasma des hématies. Les rats sont ensuite sacrifiés par exsanguination *via* l'aorte abdominale. Les différents organes (rate, foie, pancréas, tissus adipeux, muscle, ..) sont prélevés, rincés avec une solution de NaCl froid à 0,9%, et conservés à -80°C.

3. Analyses biochimiques

3.1. Glycémie

Le dosage de la glycémie est effectué par méthode enzymatique colorimétrique (Kit Biocon, Germany), après oxydation enzymatique en présence de la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec le phénol et le α -amino-antipyrine pour former la quinonéimine, indicateur de couleur violette. La lecture se fait à une longueur d'onde $\lambda=546\text{nm}$.

4. Evaluation du statut antioxydant

La méthode mise au point par Blache and Prost (1992) mesure la résistance des hématies à l'hémolyse induite par les radicaux libres. Cette résistance est utilisée comme marqueur de la résistance globale de l'organisme au dommage oxydatif. Elle représente l'état de l'ensemble des défenses antioxydantes de l'organisme (Blache and Prost, 1992).

Le sang prélevé est dilué (1 :30, v : v) avec le tampon KRL (300 mosm/L) pH 7,4. Ensuite 50 μ l de sang dilué sont déposés sur une microplaque (96 puits) puis est ajouté un générateur de radicaux libres (GRL) (Kirial, SA, Couternon, France). La cinétique de l'hémolyse est suivie par spectrophotométrie à 620 nm, grâce à un analyseur de plaque (iEMS reader MF, Lara Spiral) permettant une régulation thermique à 37°C et une agitation circulaire des plaques.

La cinétique d'hémolyse permet de déterminer le T 50%, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que 50% des hématies soient hémolysées. Plus le T 50% est long, meilleure est la résistance des membranes érythrocytaires aux radicaux libres.

Les essais sont réalisés en triple exemplaire, le temps nécessaire pour atteindre 50% de l'hémolyse totale est retenu comme valeur de référence pour comparer les différents groupes.

Une variante de cette méthode permet de déterminer la capacité antioxydante du plasma et des hématies lavées en les laissant incubé avec des hématies "contrôle" (provenant d'un rat

Wistar) et en présence du GRL. 50 µl de sang contrôle et de plasma ou d'hématies lavées sont dilués dans le tampon KRL (1 :25, 1 :30, 1 : 63 60, v : v, respectivement) puis déposés sur une microplaque. Le GRL est ensuite rajouté et la cinétique de l'hémolyse est suivie comme décrite précédemment.

63

4.1. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase

L'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px) est déterminée par la méthode de Paglia and Valentine (1967), utilisant l'hydroperoxyde de cumène comme substrat. Une unité de GSH-Px est définie comme la quantité d'enzyme responsable d'une diminution de 90% de la concentration de glutathion par minute à une concentration de glutathion de 1 mM. L'activité de l'enzyme érythrocytaire est déterminée par la décroissance du NADPH dans le milieu et est comparée à l'activité connue d'une solution de GSH-Px. La GPx érythrocytaire est exprimée en U/mg d'hémoglobine.

4.2. Dosage de l'activité de la glutathion réductase

L'activité de la glutathion réductase (GSSH-Red) est déterminée par la mesure du taux d'oxydation du NADPH en présence de glutathion oxydé (Goldberg and Spooner, 1992). L'unité de l'activité de cette enzyme est définie comme la quantité d'enzyme capable d'oxyder 1 mmol de NADPH par min. L'activité de l'enzyme érythrocytaire est déterminée par la décroissance du NADPH dans le milieu et est comparée à l'activité connue d'une solution de GSSH-Red. L'activité érythrocytaire de cette enzyme est exprimée en U/mg d'hémoglobine.

4.3. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est mesurée par l'oxydation du NADPH (Elstner et al., 1983) et est comparée à celle d'une solution de SOD d'activité connue. L'activité érythrocytaire de cette enzyme est exprimée en U/mg d'hémoglobine.

4.4. Dosage de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est déterminée selon la méthode de Aiebi, (1974) par mesure du taux de décomposition du H₂O₂ à une longueur d'onde égale à 420 nm.

4.5. Détermination de la teneur en glutathion total

100 µL de globules rouges sont dilués dans 15 volumes d'acide perchlorique (2g/ L). Après centrifugation à 1000 x g pendant 10 min, 200µL de surnageant sont prélevés pour le dosage du glutathion total, selon la technique d'Anderson, (1985).

5. Evaluation du pouvoir antioxydant de molécules par le test ORAC

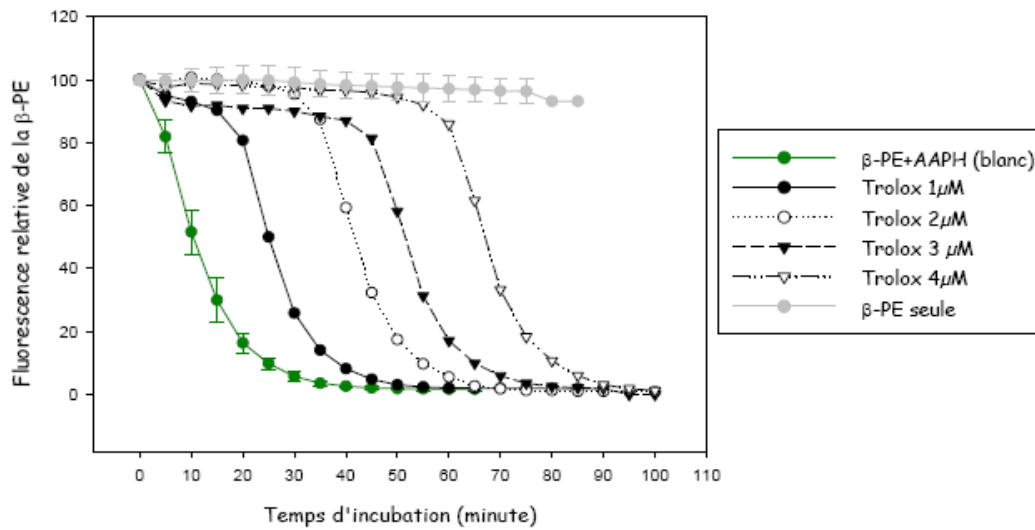
La mesure de l'ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) développée par Cao (Cao et al, 1993) est une méthode simple et reproductible permettant de mesurer la capacité anti-oxydante globale du plasma (Benderitter *et al*, 2003) en utilisant l'allophycocyanine (APC) protéine fluorescente dont la structure est sensible a un stress oxydatif.

64

Cette technique repose sur les propriétés de fluorescence de l'APC dont l'exposition à un système générateur de radicaux libres entraîne une dégradation de la protéine et donc une diminution de sa fluorescence (Fig 17).

Nous avons mesuré l'ORAC dans le plasma de rat comme suit : dans une cuve de Spectrofluorimètre on effectue un mélange (2 ml finale) contenant 37.5 nmol/l d'APC dans tampon phosphate (pH 7.0) en absence (blanc) ou présence de 20 µl de trolox (Un analogue hydrosoluble de la vitamineE, (1µM finale) ou de 20 µl de plasma. On mesure la fluorescence basale (Temps 0) dans un Spectrofluorimètre SFM25 Kontron (excitation à 651 nm et émission à 598), ensuite on démarre la réaction par l'ajout générateur de radicaux (CuSO₄, 9 µmol/l et H₂O₂, 0,3%). La mesure de fluorescence émise se fait en continue jusqu'à sa disparition.

Le trolox est utilisé comme antioxydant de référence pour calculer la valeur d'ORAC. Une unité ORAC est définie comme la protection (l'aire sous la courbe) générée par 1µM trolox. La valeur ORAC du plasma est calculé comme suit : $ORAC \text{ U/ml} = (A_{\text{plasma}} - A_{\text{blanc}}) / (A_{\text{trolox}} - A_{\text{blanc}})$, A représente l'aire sous la courbe de décroissance de la fluorescence de l'APC.



65

Figure 17 : Cinétique de piégeage des espèces radicalaires (produites par l’AAPH) par la β -phycoérythrine en présence de Trolox.

6. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous formes de moyennes \pm E.S (erreur satandard) de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test t de Student avec variables indépendantes, à l’aide du logiciel STATISTICA (Version 4.1, Statasoft, Tulsa, USA). Les moyennes sont considérées comme significativement différentes lorsque $P < 0.05$.

Résultats



1-Mesure de la glycémie

Les résultats obtenus durant les 3 semaines montrent une légère diminution de la glycémie (exprimés en g/l) des rats diabétiques traités avec nos deux extraits, pulpe et tige. Celle-ci reste statistiquement non significatif (Tableau 4). Il ressort aussi de cette étape que nos extraits n'ont aucun impact sur la glycémie des rats normaux où il est constatable que l'extrait étudié à 300 mg/kg par voie orale administré quotidiennement au rats normaux n'était pas toxique (résultats non démontrés).

Déchiffrant, attentivement, l'évolution de la glycémie des rats diabétiques témoins. La glycémie augmente à la deuxième semaine. Junod **et al** (1969) ont étudié la relation entre la dose de la STZ et son effet diabétogène. Ils ont rapporté que la STZ à une dose de 55 mg/kg administrée par voie intraveineuse provoque une hyperglycémie de l'ordre de 3.4 g/l /24 heure.

Paramètres	1er semaine	2ième semaine	3ième semaine
Contrôles	0.96±0.02 ^a	1.04±0.07 ^e	0.95±0.07 ⁱ
STZ	2.24±0.24 ^b	3.2±0.98 ^f	3.01±1.13 ^j
STZ + Pulpe	1.98±0.06 ^c	2.04±0.00 ^g	2.00±0.06 ^k
STZ + Tige	1.98±0.07 ^d	2.04±0.02 ^h	2.00±0.03 ^l

Tableau 6 : Evolution de la glycémie (g/L) des rats normaux et diabétiques traités ou non durant 3 semaines par 300 mg/kg d'extrait de pulpe et tige. Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student (a vs b, e vs f, i vs j p<0.01) (b vs c,d p<0.05) (F vs g, h p<0.05) (i vs k, l p<0.05).

2. Test de tolérance au glucose :

Chez des rats normaux traités 1 h auparavant avec 300mg/kg d'extrait, le gavage de 3 g/kg de glucose, entraîne un état d'hyperglycémie supérieur à la normal (témoins). La Figure 15 montre l'évolution de la glycémie durant les 2 heures.

68

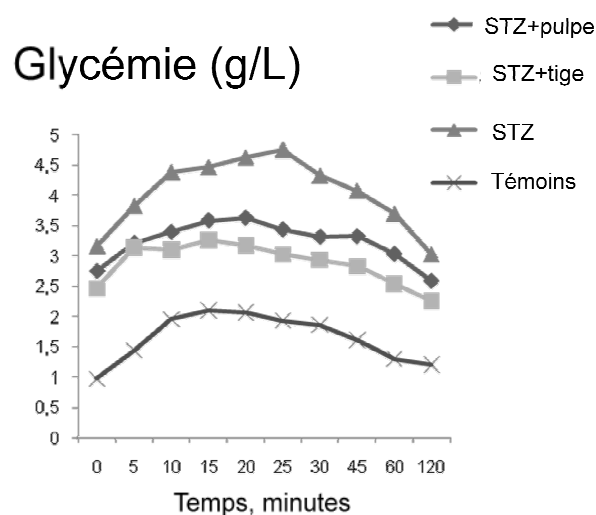


Figure 18 : Test de tolérance chez des rats normaux traités, effectué pendant 2 heures, par gavage de 3 g/kg de glucose

Ainsi, on constate que l'hyperglycémie devient normale dans 2h chez les animaux contrôles. L'hyperglycémie diminue aussi chez les animaux diabétiques. Il est intéressant de noter que les extraits de pulpe et de tiges diminuent rapidement la forme « cloche » de l'hyperglycémie chez les animaux diabétiques, suggérant que ces extraits ont des effets inhibiteurs de sur le diabète. Il faut noter que l'hyperglycémie chez les animaux reste toujours élevé même après deux heures (Figure 18).

3.Mesure du statut antioxydant dans le sérum:

Nous avons utilisé le test de KRL pour élucider le statut antioxydant dans le sérum d'animaux contrôles et diabétiques. Nous observons que le % de l'hémolyse est plus faible chez les animaux diabétiques. L'administration d'extraits de pulpe et de tige tendent à normaliser les valeurs de KRL.

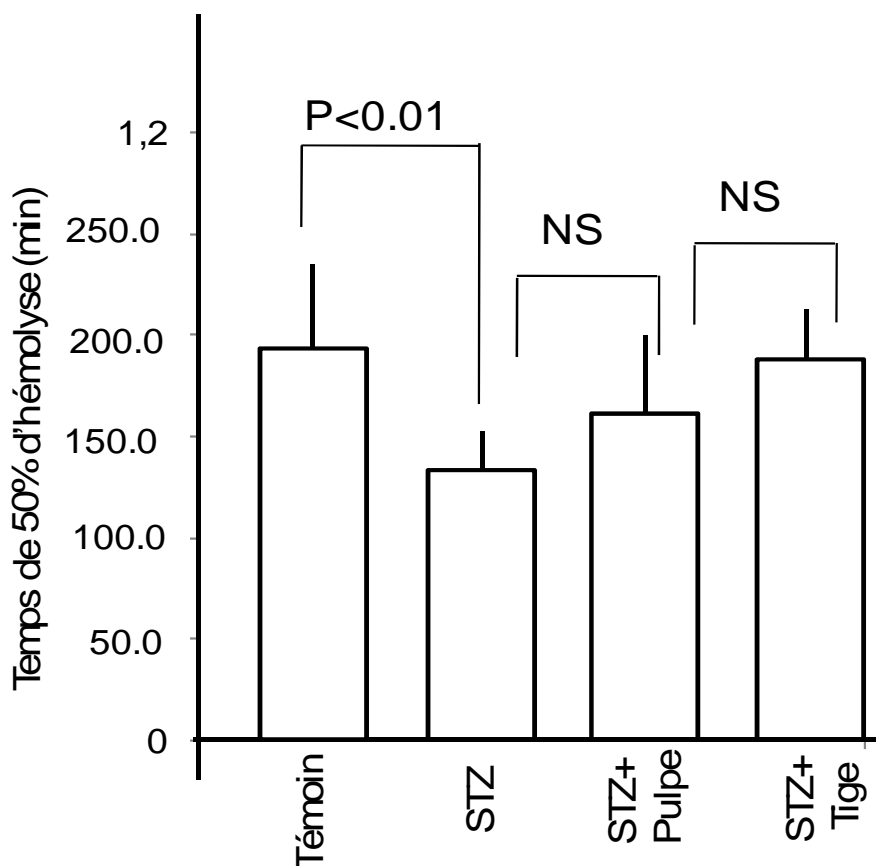


Figure 19 : Test de l'hémolyse de globule rouges par le sérum d'animaux contrôles et diabétiques (STZ). Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student. NS = pas de différence significative.

4. Mesure de l'activité de l'ORAC :

Le mesure de l' l'ORAC dans plasma des rats démontrent que le statut antioxydant des animaux diabétiques diminue.

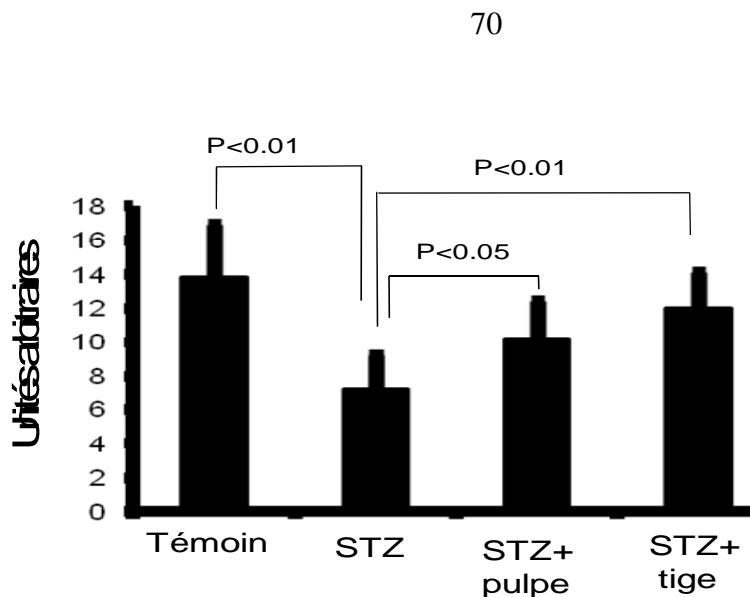


Figure 20 : Test de l'ORAC d'animaux contrôles et diabétiques. Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student.

De plus, les extraits de pulpe et de tiges augmentent les valeurs des l'ORAC. Ces observations suggèrent que ces extraits exercent des effets bénéfiques sur l'altération du statut antioxydant induite par le diabète.

5. Mesure de l'activité des enzymes antioxydantes endogènes.

5.1. Dosage de l'activité de la catalase :

L'activité de catalase a été déterminée dans trois compartiments d'animaux (les érythrocytes, le foie et le pancréas).

Le diabète augmente l'activité catalase uniquement dans le foie (Tableau 9). Le diabète induit également une augmentation non significative de la catalase dans le pancréas et les érythrocytes. De plus, les extraits de pulpe et de tige diminuent de façon non significative l'activité catalase chez les animaux diabétiques (Tableau 7).

Pancréas :

		<u>Catalase</u>	
Contrôles		41±9,6	NS
STZ		62±16	NS
STZ + Pulpe		46±19	NS
STZ + Tige		45±14	NS

<u>Glutathion Réductase</u>		<u>Glutathion peroxydase</u>	
Contrôles	0,32± 0,056	Contrôles	13,25± 2,16
STZ	0,13± 0,075	STZ	19,30± 1,16
STZ + Pulpe	0,13± 0,075	STZ + Pulpe	13,50± 2,05
STZ + tige	0,11± 0,060	STZ + Tige	12,10± 1,52
	p<0,01		p<0,01
	NS		p<0,01
	NS		p<0,01

<u>Glutathion Total</u>		<u>Glutathion réduit</u>	
Contrôles	5,45± 1,96	Contrôles	1,38± 0,96
STZ	2,56± 1,26	STZ	1,00± 0,89
STZ + Pulpe	3,10± 1,19	STZ + Pulpe	1,22± 0,85
STZ + Tige	3,37± 1,23	STZ + Tige	0,95± 0,46
	NS		NS
	NS		NS
	NS		NS

<u>Superoxyde dismutase</u>	
Contrôles	8,97± 2,16
STZ	10,56 ± 2,6
STZ + Pulpe	7,88± 2,04
STZ + Tige	8,66± 2,15
	NS
	NS
	NS

Tableau 7: Activité de différentes enzymes antioxydantes dans le pancréas d'animaux contrôles et diabétiques. Le Tableau indique l'activité de catalase (U/mg protéine), glutathion réductase et peroxydase (U/mg protéine), superoxyde dismutase (U/mg protéine). On note aussi la concentration de glutathion total et réduit (nmol/mg protéine). Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student.

5.2. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px), glutathion réductase (GSSH-Red) et superoxyde dimutase (SOD)

- Glutathion réductase (GSSH-Red)

Nous constatons que l'activité de glutathion réductase (GSSH-Red) diminue dans le pancréas d'animaux diabétiques. Il est intéressant de noter que l'activité GSSH-Red n'est pas modifiée dans les globules rouges et foie d'animaux diabétiques (Tableau 7). Les extraits de pulpe et de tiges aussi ne modifient pas l'activité de GSSH-Red dans ces trois compartiments.

72

- Glutathion peroxydase (GSH-Px)

En ce qui concerne, l'activité de glutathion peroxydase (GSH-Px), son activité augmente dans les globules rouges, le foie et le pancréas d'animaux diabétiques et les extraits de *Zizyphus lotus la* diminuent d'une manière très significative (Tableau 8).

Erythrocytes:

		<u>Catalase</u>			
Contrôles		7.85± 2.31] NS		
STZ		8.56± 2.66			
STZ + Pulpe		8.71± 2.78] NS		
STZ + Tige		8.63± 2.71			
		<u>Glutathion Réductase</u>		<u>Glutathion peroxydase</u>	
Contrôles	9.22± 2.95] NS	Contrôles	12.99± 2.56] p<0.01
STZ	6.00± 2.13		STZ	18.73± 2.49	
STZ + Pulpe	7.19± 1.87] NS	STZ + Pulpe	11.58± 2.43] p<0.01
STZ + Tige	7.48± 1.98		STZ + Tige	10.68± 2.31	
		<u>Glutathion Réduit</u>		<u>Glutathion Total</u>	
Contrôles	3.97± 1.96] NS	Contrôles	18.67± 3.59] NS
STZ	1.54± 0.74		STZ	13.42± 3.25	
STZ + Pulpe	3.24± 1.81] NS	STZ + Pulpe	15.13± 3.19] NS
STZ + Tige	3.44± 1.89		STZ + Tige	16.17± 3.45	
		<u>Superoxyde dismutase</u>			
Contrôles		19.03± 3.98] NS		
STZ		21.65± 4.23			
STZ + Pulpe		12.15± 2.31] NS		
STZ + Tige		15.23± 3.54			

Tableau 8 : Activité de différentes enzymes antioxydantes dans les érythrocytes d'animaux contrôles et diabétiques. Le Tableau indique l'activité de catalase (U/mg protéine), glutathion réductase et peroxydase (U/mg protéine), superoxyde dismutase (U/mg protéine). On note aussi la concentration de glutathion total et réduit (nmol/mg protéine). Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student.

- Superoxyde dimutase (SOD)

Lorsqu'on compare l'activité de SOD dans les trois compartiments, on constate que le diabète ne modifie pas son activité dans les globules rouges et le pancréas, cependant, il elle diminue dans le foie d'animaux diabétiques (Tableau 9). Les extraits de pulpe et de tiges diminuent de façon significative l'activité de SOD dans et le foie sans modifier celle des

globules rouges et du pancréas chez les animaux rendus diabétiques par l'administration de la streptozotocine.

Foie :		Catalase	
Contrôles		25± 2	$p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$
STZ		38± 2	
STZ + Pulpe		26±19	
STZ + Tige		25±14	
Glutathion Réductase		Glutathion peroxydase	
Contrôles	18,32± 2,056	Contrôles	13,71± 2,36
STZ	18,13± 2,075	STZ	18,36± 1,86
STZ + Pulpe	17,13± 2,075	STZ + Pulpe	12,20± 1,95
STZ + Tige	17,11± 2,60	STZ + Tige	11,10± 1,25
	NS		$p < 0,01$
	NS		$p < 0,01$
	NS		$p < 0,01$
Glutathion Total		Glutathion réduit	
Contrôles	7,45± 2,96	Contrôles	2,88± 1,76
STZ	5,16± 3,26	STZ	1,63± 1,99
STZ + Pulpe	6,10± 2,19	STZ + Pulpe	2,22± 0,85
STZ + Tige	6,37± 2,23	STZ + Tige	2,95± 0,06
	NS		$p > 0,01$
	NS		$p > 0,05$
	NS		$p > 0,01$
Superoxyde dismutase			
Contrôles		23,84± 3,16	$p > 0,01$
STZ		15,13 ± 3,66	$p > 0,01$
STZ + Pulpe		22,47± 3,04	$p > 0,01$
STZ + Tige		22,66± 3,15	$p > 0,01$

Tableau 9 : Activité de différentes enzymes antioxydantes dans le foie d'animaux contrôles et diabétiques. Le Tableau indique l'activité de catalase (U/mg protéine), glutathion réductase et peroxydase (U/mg protéine), superoxyde dismutase (U/mg protéine). On note aussi la concentration de glutathion total et réduit (nmol/mg protéine). Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student.

5.3. Mesure du taux de Glutathion réduit et total

- Glutathion réduit

La production de glutathion est le résultat de l'activité des enzymes telles que le glutathion peroxydase et le glutathion réductase. Nous avons étudié la production de glutathion total et du glutathion réduits dans les globules rouges, le pancréas et le foie d'animaux diabétiques et contrôles.

Ainsi, nous avons constaté que la concentration de glutathion réduit diminue de façon non significative dans les érythrocytes, le pancréas et le foie d'animaux diabétiques (Tableau 8). Les extraits de pulpe et de tige ne modifié pas de manière significative la quantité de glutathion réduit ; cependant, ces extraits semblent augmenter la concentration de glutathion total dans les érythrocytes et le foie d'animaux diabétiques.

-Glutathion total

Le diabète diminue de façon non significative le glutathion total dans les globules rouges et le pancréas, cette diminution est plus importante et significative dans le foie. Ces extraits semblent augmenter, mais de façon non significative, la concentration de glutathion total ces trois compartiments chez les animaux diabétiques.

6. Estimation des antioxydants exogènes

6.1. Teneurs des vitamines A, E et C sériques

Nous avons dosé les concentrations sériques de trois vitamines A, E et C chez les animaux diabétiques, traités ou non par les extraits de pulpe et de tige de *Zizyphus lotus* L. Ces vitamines exercent des effets antioxydants.

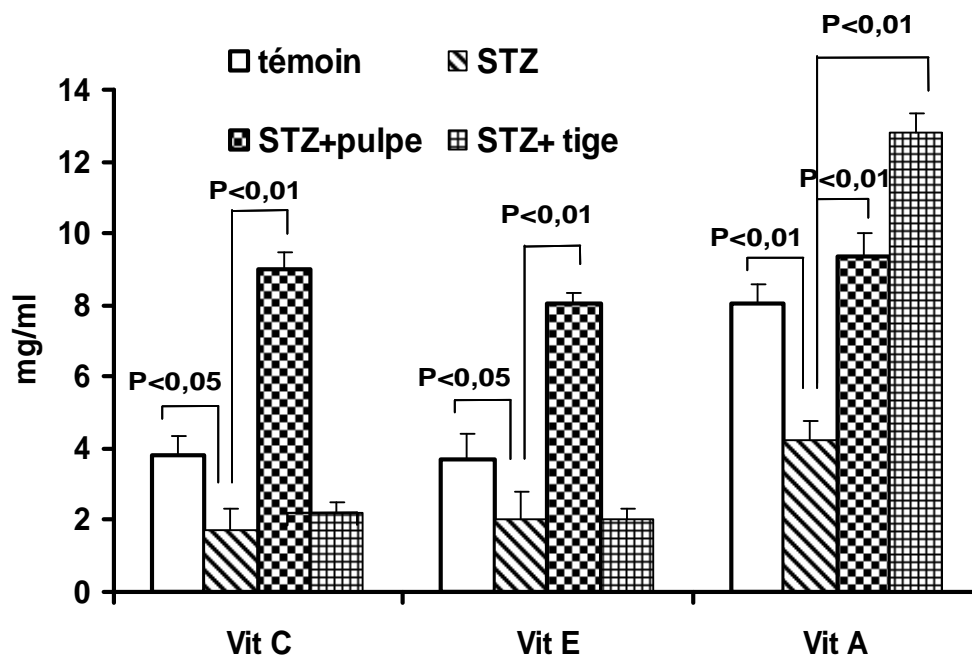


Figure 21: Teneurs sériques en vitamines A, E et C

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES des 8 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student

Ainsi, nous avons constaté que la concentration des vitamines A et E diminue d'une manière très significative chez les animaux diabétiques (Fig 21). De plus, la concentration de vitamine C chez les animaux diabétiques n'est pas diminuée de façon significative. Les extraits de pulpe et de tige ne semblent pas augmenter les teneurs de ces trois vitamines chez les rats diabétiques.

Discussion



L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche de nouvelles substances à activité biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des secrets des plantes médicinales dont la présente étude qui est consacrée à la recherche d'éventuels effets antidiabétiques à partir des extraits pulpe et tige de *Zizyphus lotus L.*

Dans cette direction de recherche, le choix de la plante, la voie d'administration, le diabète induit ainsi que les paramètres suivis sont des points essentiels à discuter. *Zizyphus lotus L* comme d'autre plantes du même genre est très utilisé pour traiter le diabète sucré, notamment, chez la population Algérienne.

Le but de ce travail est d'évaluer si l'administration de nos deux extraits aqueux lyophilisés, pulpe et tige de *Zizyphus lotus L.* peuvent améliorer, la glycémie, les variations nutritionnelles, statut redox chez les rats rendu diabétiques. Nous avons choisies seulement deux parties de la plante, c'est-à-dire, la tige et la pulpe pour effectuer ces études sur les animaux diabétiques. La dose des extraits lyophilisés (300mg / Kg PC) administrée chez les animaux a été choisie. Notre choix a été guidé par une étude pilote (non-démontré dans cette thèse) qui montre les effets bénéfiques de ces deux extrait sur l'hyperglycémie. Ces observations sont aussi évidente par l'étude de la glycémie pendant 3 semaines de suivie d'animaux diabétiques où ces deux extraits diminuent de façon claire le taux de glucose chez les animaux administrés de la streptozotocine. De plus, l'expérience sur la tolérance au glucose indique que ces extraits de *Zizyphus lotus L* diminuent le taux de glucose circulant. Ces observations aussi suggèrent que les extraits de pulpe et de tige favorisent l'utilisation de glucose. Quels sont les mécanismes, impliqués dans ces phénomènes ? Ainsi, il est possible que les deux extraits augmentent soit la production de l'insuline qui déclenche l'oxydation de glucose, ou soit la glycogénèse. Cependant, ces hypothèses restent à vérifier ultérieurement. Il nous reste aussi de réaliser une étude sur les coupes histologiques pour savoir si les extraits induisent la régénération du pancréas d'animaux diabétiques.

Le stress oxydatif, par l'intermédiaire des dommages induits par les radicaux libres, semble être à l'origine du développement de plusieurs maladies, en particulier du diabète de type 2 (Panchnadikar and Bhonde, 2003 ; Friedman et *al.*, 2003).

Par ailleurs, des études ont montré que l'hyperglycémie induit la genèse d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier de l'anion superoxyde, chez l'animal (Kim et *al.*, 2003) et chez l'homme (Ceriollo et *al.*, 1998). De plus, chez les rats diabétiques, l'hyperglycémie altère encore d'avantage le système antioxydant (Friedman et *al.*, 2003).

La protection contre les effets délétères des radicaux oxygénés s'effectue à l'aide des enzymes antioxydantes, telles que les superoxydes dismutases et les glutathions peroxydases, qui transforment des radicaux très pro-oxydants en substances inoffensives, et les antioxydants d'origine nutritionnelle, les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E) l'acide ascorbique (vitamine C) qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme, dont les apports peuvent prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydatif.

La Cu/Zn-SOD est l'enzyme responsable de la dismutation de l'anion superoxyde (O_2°) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et sa faible activité peut conduire à une importante concentration d' O_2° comme cela a été mis en évidence dans le diabète de type 2 chez le rat (Bitar et *al.*, 2005) et chez l'homme (Ceriollo et *al.*, 1998). Dans notre étude, nous avons aussi constaté que l'activité de SOD diminue d'une manière très significative dans le foie d'animaux diabétiques. Cette activité n'est pas modifiée dans les globules rouges. Cette observations suggèrent que la transformation de (O_2°) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) diminue dans l'organe qui est impliqué dans le métabolisme lipidique et l'élimination des produits toxiques et la partie périphérique (les globules rouges) est épargné par ces modifications. L'activité réduite de SOD dans le foie peut aussi être liée à la glycation non enzymatique des protéines, causée par l'hyperglycémie. L'inactivation de la Cu/Zn-SOD par une réaction de glycation a été montré *in vitro* dans les érythrocytes de patients diabétiques (Oda et *al.*, 1994). Une carence en cuivre s'accompagne d'une diminution des défenses antiradicalaires (Busserolles, 2004) et en particulier de l'activité de la SOD cytosolique (Cu /Zn-SOD), qui est dépendante du cuivre. Il est intéressant de noter que les extraits de pulpe et de tige normalisent l'activité de SOD chez les animaux diabétiques, suggérant que le *Zizyphys lotus* L diminue la production des radiaux libres et par conséquent exercent des effets bénéfiques lors du diabète.

L'augmentation de la SOD pourrait constituer une protection contre l'élévation de l'anion superoxyde. En effet, la SOD, en catalysant la décomposition de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2),

prévient contre d'éventuelle génération de radicaux libres (Yu, 1994). Les radicaux superoxyde sont converties par le SOD en H_2O_2 qui sont détruits par la catalase. Ce processus peut entraîner une lipoperoxydation si le H_2O_2 n'est pas décomposé immédiatement (Gumsulu et al., 2002).

En effet, nous avons constaté une augmentation de l'activité de catalase dans le foie de rats diabétiques, indiquant que l'organisme déclenche les mécanismes pour diminuer le statut antioxydant lors du diabète.

Le glutathion (GSH) étant le substrat de la GSH-Px, le contenu en GSH détermine l'activité de l'enzyme. De plus, le GSH est un important antioxydant qui maintient les concentrations d'autres antioxydants, tels que l'acide ascorbique et l' α -tocophérol, dans leur forme réduite active. Il existe un effet de synergie entre les vitamines antioxydantes. En effet, l'acide ascorbique et l' α -tocophérol se protègent mutuellement contre l'attaque radicalaire, mais ces deux vitamines protègent aussi le rétinol (Pincemail et al., 2002) en augmentant sa concentration. Dans notre étude, nous avons constaté que le taux de GSH diminue seulement dans le foie d'animaux diabétiques. Nos résultats corroborent une étude qui démontre une corrélation entre l'hyperglycémie et la diminution en GSH, entraînant une élévation du stress oxydatif (Giugliano, 1996). De plus, il semble que les extraits de pulpe et de tige régèrent le taux de GSH dans le foie d'animaux diabétiques.

Dans cette étude, nous avons constaté que le taux de différentes vitamines A, E, et C, considérées comme des agents antioxydants, diminuent de façon significative chez les animaux diabétiques. L'extrait de pulpe augmente toutes ces vitamines chez les diabétiques. Nous avons également observé que l'extrait de la tige induit une augmentation de vit A, cette augmentation est beaucoup plus importante que celle induite par la pulpe. En effet, plusieurs études ont montré, chez le rat diabétique, une diminution des teneurs en acide ascorbique dans le plasma, le foie et les reins (McLennan et al., 1988 ; Young et al., 1995). Cette baisse de vitamine C peut être due à une excrétion urinaire élevée d'acide ascorbique (Yue et al., 1990).

Par ailleurs, le rôle de l'acide ascorbique est similaire à celui du GSH puisqu'il est aussi un piègeur de radicaux libres, et l'utilisation amplifiée de cette vitamine fait suite au stress oxydatif présent dans le diabète.

L'acide ascorbique est aussi utilisé dans la régénération de l' α -tocophérol (Lee and Dabrowski, 2003). Les deux extraits des *Zizyphus lotus* ne modifient pas la concentration de GSH, suggérant que ces extraits, bien qu'ils soient bénéfiques lors du diabète, n'agissent pas sur la régénération de taux de GSH. Nous avons aussi observé que l'activité de glutathion peroxidase (GSH-Px) augmente dans les globules rouges, le pancréas et le foie d'animaux diabétiques. L'augmentation de l'activité de la GSH-Px dans les cellules les protégerait du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie (Tanaka et al., 2002). Le foie et le pancréas sont des organes centraux pour les métabolismes, il paraît donc important qu'ils possèdent un système de défense antioxydant performant, afin de neutraliser la surproduction de radicaux libres.

Au cours du diabète, l'excès de radicaux libres est également à l'origine de l'augmentation de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des acides aminés (Friedman et al., 2003). Nous avons aussi observé qu'une augmentation de GSH-Px est associée à une baisse de l'activité de GSH-réductase dans le pancréas.

Lorsqu'on examine le statut total antioxydant en déterminant l'activité de l'ORAC et KRL dans le sang, on note, à nouveau, que les animaux diabétiques démontrent une baisse de ces indicateurs et les deux extraits de *Zizyphus lotus* L semble normaliser leur concentrations.

L'ensemble de ces observations démontrent que les animaux diabétiques présentent l'hyperglycémie et une baisse de statut antioxydant et les extraits de pulpe et de tige de *Zizyphus lotus* L, en augmentant les vitamines anti oxydantes, exercent des effets bénéfiques au cours de cette pathologie.

Conclusion
générale

Cette thèse est divisée en deux parties :

-la première partie est consacrée à une étude *in vitro* où nous avons étudié les propriétés anti-oxydantes et les effets immunomodulateurs de *Zizyphus lotus* L

-la deuxième partie *in vivo* est destinée à l'élucidation d'effets antidiabétiques et anti-oxydants chez les rats ayant reçu de la streptozotocine.

Ces deux études sont complémentaires l'une avec l'autre.

Dans la première partie, nous avons déterminé la quantité de vitamines antioxydante et nous constatons que la pulpe est la partie la plus riche en vitamines A et C. La pulpe contient aussi les acides gras polyinsaturés de la famille n-3 qui sont considérés comme des agents immunosuppresseurs. C'est pourquoi, nous avons élucidé les effets immunomodulateurs des différentes parties de la plante sur la prolifération des cellules -T humaines. Ainsi, nous constatons que grâce à la présence des différentes vitamines et acides gras, les différents extraits, particulièrement la pulpe, exercent un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules -T humaines et sur la transcription du gène de l'interleukine-2. Ces observations suggèrent que le *Zizyphus lotus* L peut être utilisé dans la modulation de la progression des pathologies auto-immunes.

Le fait que le diabète de type I est une maladie auto-immune, nous avons cherché, dans la deuxième partie, les effets anti-diabétiques de *Zizyphus lotus* L. Notre étude a mis en évidence les effets des deux extraits sur l'évolution de la glycémie. Ce travail a aussi permis d'évaluer les effets de ces extraits sur le statut antioxydant en étudiant des défenses antioxydantes dans le sang, pancréas et foie, ainsi que la mesure de l'ORAC et de KRL.

Nous avons pu montrer, chez les rats diabétiques traités avec la pulpe et la tige en comparaison avec les témoins et les diabétiques que les premiers induisent une diminution de la

glycémie. Nos résultats démontrent que les extraits aqueux de *Zizyphus lotus* L, doses de 300 mg/kg présente un effet hypoglycémiant remarquable trois semaine après gavage. L'effet hypoglycémiant maximum ($p < 0,001$) a été observé 3 semaines après le traitement des rats avec les doses de 300 mg/kg (25% et 24% respectivement de réduction).

83

Le statut antioxydant total chez les diabétiques en comparant avec les témoins est altéré dans le sang accompagné d'une baisse de l'activité des enzymes antioxydantes, en particulier de la Cu/Zn-SOD dans le foie, d'une diminution des concentrations plasmatiques en différentes vitamines (A, C et E).

Le statut antioxydant total dans le sang reflète l'état général de l'organisme, il correspond au bilan de la balance oxydants/antioxydants de tous les tissus. Dans notre étude, le déséquilibre de la balance indique qu'il existe un stress oxydatif chez les rats diabétiques non traités. Toutes, chaque tissu a son propre système de défense et l'efficacité de ce système peut varier entre les différents tissus.

Aucun traitement du diabète ne peut se passer de produits de synthèses (insuline injectable pour le diabète de type 1, et anti diabétiques oraux pour le diabète de type 2) associés d'un régime alimentaire hypo glucidique strict adapté à chaque cas clinique.

Même si le traitement du diabète ne peut se passer de médicaments de synthèse, certaines plantes médicinales peuvent constituer des appoints utiles qui permettent de diminuer les doses d'insuline pour les diabétiques insulino dépendant ou des hypoglycémiant oraux pour les diabètes non insulino dépendant en donnant un plus grand confort de vie au malade et en diminuant l'importance des effets secondaires liés aux médicaments antidiabétiques chimio thérapeutiques qui sont loin d'être négligeables.

Recommandations :

- Poursuivre l'étude des propriétés pharmacologiques
- Envisager la culture des plantes entrant dans la fabrication des phytomédicaments.
- Assurer une libre circulation des phytomédicaments au-delà même des frontières en vue du traitement des maladies courantes des populations.

- Renforcer les politiques nationales en matière de Médecine et Pharmacopée Traditionnelles afin d'encourager la coopération sous - régionale et africaine.

84

Références

Bibliographique

S

- Aebi, H.(1974). Catalase. In: Berg Meyer, H.(Ed), *Methods of Enzymatic Analysis*; second ed Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 673-684.
- Adhvaryu , MR., Reddy, N., and Parabia, MH.(2007). Effects of four Indian medicinal herbs on Isoniazid-, Rifampicin- and Pyrazinamide-induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. *World J Gastroenterol*, 13:3199-3205.
- Ahren, B., and Corrigan, CB.(1985). Intermittent need for insulin in a subgroup of diabetic patients in Tanzania. *Diabetic Med*, 2: 262-264.
- Anderson, ME. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* ,113:546-55.
- Anderson, T., Schein, PS., McMenamin, G., and Cooney, DA.(1974). Streptozotocin Diabetes: Correlation with extent of expression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *Journal of clinical investigation*, 54:672-677.
- Aughsteeen , AA.(2000). An ultrastructural study the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans. *J of Electron Microscopy*, 9(5):681-690.
- Alberti, KGMM.(1993). Problems related to definitions and epidemiology of Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: studies throughout the world. *Diabetologia*, 6: 978-984.
- Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S., and Benabadji, N.(2008) . Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 20 (4):2701-2710.
- Arab, M.(1992). Diabetes mellitus in Egypt. *World Health Stat. Bull*, 45: 334-337.
- Amos, AF., McCarty, DJ., and Zimmet, P.(1997). The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med*, 14 (suppl. 5): S1-85.
- Arrington, JL., McMurray, DN., Switzer, KC., Fan ,YY.,and Chapkin, RS. (2001). Docosahexaenoic acid suppresses function of the CD28 costimulatory membrane receptor in primary murine and Jurkat T cells. *J. Nutr.* 131: 1147-1153.

-Baba Aissa, F.(1999). Encyclopédie des plantes utilisées. Flore d'Algérie et du Maghreb - Substance végétale, Edition Librairie Moderne, Rouiba, p. 145.

- Baytop, T.(1984). Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present) Nobel Press, Istanbul, Turkey.

-Baynes, JW.(1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40 : 405-412.

-Bayer, E., and Butter, K.(2000). Guide de la flore méditerranéenne p. 280.

-Blach, D., and Prost , M.(1992). Free Radical attack : Biological test for human resistance capability. In : ponnamperna C, Gerrke CW, editors. A lunar- based chemical analysis laboratory. Hampton, Virginia (USA) : Depak, A, p. 82-98.

86

-Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., and Schubert, D.(1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, 77 (6): 817-27.

-Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Pouget, JP., and Voisin, P.(2003). *Radiat Res.*, The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation.

-Benchalal, A., Bouziane, H., and Maka, M.(2004) . Fleur du Sahara, arbres et arbustes, voyage au cœur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie*, 6; 191-197.

-Best, C.(1956). The first clinical use of insulin. *Diabetes* 5, 65-67.

-Belhadj, M.(2005). Guide de la diabétologie. le diabète en Algérie. Deuxième congrès Maghrébin, Fes .

-Bitar, M.S., Wahid, S., Mustafa, S., Al-Saleh, E., Dhaunsi, G.S., and Al-Mulla, F.(2005). Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes . *Eur J Pharmacol*, 511(1) : 53-64.

-Brownlee, M.(2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414.

-Busserolles, J.(2004). Fructose, stress oxydant et déviation métabolique. *NAFAS*, 2(1) : 21-4.

- Busserolles, J., Gueux, E., Rock, E., Demigné, C., Mazur, A., and Rayssiguier, Y. (2003).Oligofructose provides protection against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J Nutr*.

-Butterfield, DA., Pocernich, CB., and Drake, J.(2002). Elevated glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer 's disease. *Drug. Disc.Res*, 56: 428-37.

-Borgi , W., Bouraoui , A., and Chouchane., N.(2007). Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extrats. *Ethnopharmacology*, 112(2): 228-231.

- Borgi, W., Chouchane, N.(2007). Activité anti-inflammatoire des saponosides et des flavonoïdes des écorces des racines de *Zizyphus lotus* (L.). *Revue des Régions Arides* , p.289-286.

-Borgi, W., Recio, M.C., Rios , J.L., and Chouchane, N.(2008). Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. *South African journal of botany*, 74:320-324.

-Bonnet , J.(2001). Larousse des arbres - Dictionnaire des arbres et des arbustes p. 512.

-Bourin, M., and Jolliet, P.(1999). Pharmacologie générale et pratique. *Ed ellipse*. Paris, p142.

-Brelet, C.(2002): Médecines du monde. Histoire et pratiques des médecines traditionnelles, Paris. Editions Robert Laffont , p. 158.

87

-Cao, G., Alessio., HM., and Cutler, RG.(1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med* , 14: 303-311.

-Cai,H., and Harrison, D.G.(2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress .*Circ Res*, 87(10): 840-4.

-Calder, PC., Krauss-Etschmann, S., de Jong, EC., Dupont, C, Frick, JS., Frokiaer, H., Heinrich, J., Garn, H., Koletzko, S., Lack, G., Mattelio, G., Renz, H., Sangild, PT., Schrezenmeir, J., Stulnig, TM., Thymann, T., Wold, AE., and Koletzko, B.(2006). Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br J Nutr*, 96:774-790.

-Carr, A., Zhu, B., and Frei, B.(2000). Potentiel anthiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha- tocopherol (vitamin E). *Circ. Res*, 56 : 428-37.

-Catoire, C., Henri, Z., and Bouet, C.(1999).Dossier et article édité par fruits oublier jujubes et jujubier.

-Carillon, E.(2000). La phytothérapie face à l'évolution médicale.

-Ceriello, A., Quagliario, L., Catone, B., Pascon, R., Piazzola, M., Bais, M., Marra, G., Tonutti, L., Taboga, C., and Motz, E.(2002). Role of hyperglycemia in nitrotyrosine posprandial generation. *Diabetes Care*, 25(8) : 1439-43.

-Ceriollo, A., Bartolotti, N., Crescentini, A., Motz, E., Lizzio.S., Russo, A., Ezsol.Z, Tonutti.L., and Taboga, C.(1998). Antioxidant defenses are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest*, 28(4) : 329-33.

-Chan, AS., Yip, EC., Yung, LY., Pang, H., Luk, SC., Pang, SF., and Wong, YH.(2006). CKBM stimulates MAPKs but inhibits LPS-induced IFN-gamma in lymphocytes. *Phyther Res*, 20:725-731.

-Chapkin, RS., Kim, W., Lupton, JR., and McMurray, DN.(2009).Dietarydocosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation.Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 81:187-191.

-Chen, K ., Sun, J., Carr, AC., Morrow, JD., Zeind, J., and Frei, B.(2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload.

-Chen, V., and Ianuzza, CD.(1981). Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can J Physiol Pharmacol*, 60: 1251-1256.

-Crouch, R., Kimsey, G., Priest, DG., Sarda., and Buse, MG.(1978). Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal uperoxide dismutase. *Diabetologia*, 15:53-57.

-Claudine, R. (2007). Le nom de l'arbre : le grenadier, le caroubier, le jujubier, le pistachier et l'arbousier. Actes sud le Majan, 1^{er} edition France, p. 45-62.

88

-Coulibaly, B., Coulibaly, K., Koumaré , A., and Keita, A.(1989). *Médecine traditionnelle et pharmacopée* 3(1), p. 25.

-DeFronzo, RA.,and Ferraninni, E.(1991). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14: 173-9.

-Djrolo, F., Hougbe, H., Avode, G., Attolou, V., Addra, B., Kodjoh, N., Avimadje, M., Monteiro, B., Zohoun, Th., and Hountondji, A.(1998). Le diabète lié à la malnutrition (Diabète tropical) a propos d'un cas observé en Médecine interne à Cotonou. *Médecine d'Afr. Noire*, 45: 538-542.

-Ducorps, M., Ndong, W., Jupkwo, B., Belmejdoub, G., Poirier, JM., Mayaudon,H., and Bauduceau. B.(1997).Epidemiological aspects of diabetes in Cameroon: what is the role of tropical diabetes? *Diabetes Metab*, 23: 61-67.

-Drake, J., Petroze, R., Castegna, A., Ding, Q., Keller, JK., Markesbery, WR., Lovel,MA., and Butteflied, DA. (2004). 4-Hydroxynonenal oxidatively modifies histones: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett*, 356: 155-58.

-Elamin ,A., Kheir, KM., and Tuvemo, T. (1994).Diabetic ketoacidosis in children in Khartoum City, Sudan. *East Afr. Med. J.* 71: 102-5.

-Elstener, EF., Youngman, RJ., and Obwald, W.(1983). Superoxide dismutase. In: Methods of enzymatique analysis. *Berg Meyer H ed*, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 293-302.

-Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G.(2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10): 872-9.

- Favero, J.,and Lafont, V.(1998). Effector pathways regulating T cell activation. *Biochem Pharmacol*, 56,1539-1547.

- Fao/Who.(1998). Expert consultation on Human Vitamin and Mineral Requirement, Bangkok, Thailand.

-Furnham, A., and Vincent, C.(2000). Reasons for using CAM. In: Kelner M and Wellman B (Eds), Complementary and Alternative Medicine,. Challenge and Change. 61–78. Harwood. Amsterdam.

-Fouché, J., Marquet, A., and Hambuckers, A.(2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament, Observation du monde des plantes.

-Fridovich, I.(1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201 (4359): 875-80.

-Frystyk, J., Nyholm, B., and Skjaerbaek, C.(2003). The circulating IGF system and its relationship with 24-h glucose regulation and insulin sensitivity in healthy subjects. *Clin Endocrinol*, 58: 777-84.

89

-Friedman, J., Peleg, E., Kagan, T., Shnider, S., and Rosenthal, T.(2003). Oxidative stress in hypertensive, diabetes , and diabetes hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 16(12) : 1049-52.

-Ghedira, K., Chemli, R., Caron, C., Nuzillard, J., and Zeches, M.(1994). Four cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*. *Phytochemistry*, 38:767-772.

-Guil-Guerrero, JL., Díaz Delgado, A., Matallana González, MC.,and Torija Isasa, ME. (2004).Fatty acids and carotenes in some ber (*Ziziphus jujuba* Mill) varieties.*Plant Foods Hum Nutr*, 59:23-7.

- Goldberg, DM., and Spooner, RJ.(1992). Glutathione reductase. In: Methods of enzymatic analysis 2nd ed. *Berg Meyer H ed*, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 258-65.

- Gbolade, AA. (2009). Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos State, Nigeria. *J Ethnopharmacol.* ;121(1):135-9.

-Gultekin, HC.(2007). An unknown fruit (jujube). *Popular Sci J*, 11:41-43.

- Gueye, M.(1973). Contribution à l'étude pharmacodynamique d'une plante antidiabétique (*Sclerocarya birrea*). *thèse en pharmacie Dakar* , p. 73.

-Gumsulu, S., Sarikcioglu, SA., Sahin, E., Yargicoglu, P., and Agar, A.(2002). Influence of different stress models on the antioxidant status and lipid peroxidation in rats erythrocytes. *Free radic. Res*, 36 : 1277-82.

-Giugliano, D., Ceriello, A., and G. Paolisso.(1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19(3) : 257-67.

-Haliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344, 721-724.

-Han, S.N., Wu, D.,and Ha, W.K. (2000). Vitamin E supplementation increases T helper 1 cytokine production of old mice infected with influenza virus. *Immunology* 100: 487–493.

-Hercberg, S., Preziosi, P., and Briancon, S.(1998). A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population : the SU.VI.MAX study-design, methods, and participant characteristics. *Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants. Control Clin Trials*, 19 : 336-351.

- He, H. T., Lellouch, A., and Marguet, D. (2005). Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Semin Immunol*, 17, 23-33.

- Huang, Y.,and Wange, R.(2004). T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J Biol Chem*, 279, 28827-28830.

-Hink, U., H. Li., Mollnau, M., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaiss, F., Stahl, R.A., Wamholtz, A., Meinertz, T., Griendling, K., , Harrisson, D. G., Forstermann, U., and Munzel, T.(2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*, 88(2) : E14-22.

90

- Hostettman, K., Otterat, P., and Olfender, W.(1998). The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs. *Chimia* 52, 10-17.

-Hotta, M., Taschiro, F., Ikemani, H., Niwa, H., Ogihara, T., Yadoi, J., and Miyazaki, J. (1998). Pancreatic cell specific expression of thioredoxin, and antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J ExpMed*, 186, 1445-1451.

-Jawanda., and Bal, J.S.(1978). The ber highly paying and rich in value. *Indian Hort*, 23: 19-21.

- Jezequel-Cuer, M., Le Moel, G., Mounié, J., Le Bizec, C., Vernet, M.H., Artur, Y., Laschi-Loquerie, A., and Troupel ,S.(1995). Determination of serum or plasma alpha-tocopherol by high performance liquid chromatography: optimization of operative models. *Annales de Biologie Clinique (Paris)* 53, pp. 343–352.

-Junod, A., Lambert, AE., and Stauffacher, W.(1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J of Clinical Investigation*, 48:2129-2139.

-John, S., and Schmieder, R.E.(2003). Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia. *Curr hypertens Rep*, 5(3):199-207.

-Kalt,W., Forney, CF., Martin, A., and Prior, RL.(1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem*, 47:4638-4464.

-Kadiki, OA., Gerryo, SE., and Khan, M.(1987). Childhod diabetes mellitus in Benghazi (Libya). *J. Trop. Pediatr*, 33: 136-39.

-Kelley, DS., Taylor, PC., Nelson, GJ., and Mackey, BE. (1998). Dietary docosahexaenoic acid and immunocompetence in young healthy men. *Lipids*, 33:559-66.

-Kelley, DS., Branch, LB., Love, JE., Taylor, PC., Rivera, YM., and Iacono, JM.(1992). Salmon diet and human immune status. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46: 397-404.

-Keen, H.(1986).Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *World Book Diabet Pract*, 2:8-15.

-Khalil, A.(2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin E against atherosclerosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 80 : 662-9.

- Khan, NA., Yessoufou ,A., Kim, M., and Hichami, A. (2006). N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun.* Jun; 26(4):268-77.

-Khan, NA. (2010). Polyunsaturated fatty acids in the modulation of T-cell signalling. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82:179-187.

-Khan, NA., and Hichami, A.(2002). Role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the modulation of T-cell signaling. *Recent Adv. Res. Lipids* 6: 65-75.

91

-Kim,W., Khan, NA., McMurray, DN., Prior, IA., Wang, N., and Chapkin, RS.(2010). Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog Lipid Res*, 49:250-261.

- King, GL.(2008). The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*, 79:1527-1534.

- Kim, I.J., Kim, Y.K., Son, S.M., Hong, K.W., and Kim, C.D.(2003). Enhanced vascular production of superoxide in OLETF rat after the onset of hyperglycemia. *Diabetes Res Clin Pract*, 60 : 11-8.

-Kojo, S.(2004).Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem*, 11(8): 1041-64.

-Lahlou, M., El Mahi, M., and Hammouchi, J.(2002). Evaluation of antifungal and molluscicidal activities of Moroccan *Zizyphus lotus* L. Desf, *Annales pharmaceutiques françaises*, 60:410-414.

- Larousse, Encyclopédie des plantes médicinales.(2001). Identification, préparations, soins. ISBN 2-03-560252-1, p. 12-22.

-Lamien-Meda, A., Lamien, CE., Compaoré, MM., Meda, RN., Kiendrebeogo, M., Zeba, B., Millogo, JF., and Nacoulma , OG.(2008). Polyphenol content and antioxidant

- Lamnaouer, D.(2000).Plantes médicinales du Maroc : Usage et toxicité.

- Larousse, Encyclopédie des plantes médicinales.(2001). Identification, préparations, soins. ISBN 2-03-560252-1, p. 12-22.

-Lee, K.J. , and Dabrowski,K. (2003). Interaction of vitamin C and E in yellow perch (*Perca flavescens*) nutrition and reproduction. *Br. J. Nutr*, Vol. 89: 589-596.activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, 13:581-594.

- Lenucci, MS., Cadinu, D., Taurino, M, Piro, G., and Dalessandro, G.(2006). Antioxidant

composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *J Agric Food Chem*, 54:2606-2613.

-Lenzen, S., Drinkgern, J., and Tiedge, M.(1996).Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues.*Free Radic Biol Med*, 20 : 463-466.

-Lemoine, C.(2005). Les fleurs méditerranéennes, Editions Jean-Paul Gisserot p. 14.

-Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C.(2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems : involvement of glutathione and glutathione-related enzymes.*J.Nutr.Biochem*, 16: 577-86.

-McLennan, S., Yue, D.K., Fisher, E., C , Capogreco, C Hefferman, S., Ross, G.R., and Turtle, J.R.(1988). Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. Relationship with collagen and polyol pathway abnormalities. *Diabetes*, 37(3) :359-61.

92

-McLarty, DG., Unwin, N., Kitange, HM., and Alberti, KG.(1996). Diabetes mellitus as a cause of death in sub-Saharan Africa: results of a community base study in Tanzania. The adult morbidity and mortality project. *Diabet. Med*,13: 990-994.

-Meydani, S.N., Meydani, M., Blumberg, J.B. (1997). Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy subjects. *JAMA* 277: 1380–1386.

-Middelton, E., Kandaswami, C., And Theoarides, TC.(2000). The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation. *Heart Disease & cance*, 52: 675-752.

-Mounni, S.(2008). Etude de la fraction glucidique des fruits de *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L., et *Zizyphus lotus* L., Mémoire de Magistère en Agronomie, Université de Batna,.

-Mohan, V., Premalatha, G., and Pitchumoni, CS.(2003).Tropical chronic pancreatitis: an update. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 36: 337-346.

-Monteiro, B., Gninafon, M., and Amoussou, KJ. (1991).Contribution à l'étude épidémiologique du diabète sucré de l'adulte au CNHU de Cotonou. *Méd. Afrique Noire*, 38: 263-269.

-Muñoz, SF., Silva, RA., Lamarque, A., Guzmán, CA., and Eynard, AR. (1995).Protective capability of dietary *Zizyphus mistol* seed oil, rich in 18:3, n-3, on the development of two murine mammary gland adenocarcinomas with high or low metastatic potential. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 53:135-138.

-Ndububa, DA., and Erhabor, GE.(1994).Diabetic mortalities in Ilesa, Nigeria: a retrospective study. *Centr. Afr. J. Med* 40, 286-289.

-Nohl, H., and Hegner, D.(1978). Do mitochondria produce oxygen radical in vivo? *Eur J Biochem*, 82 (2): 563-7.

- Organisation mondiale de la santé.(2000).Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.

-Organisation mondiale de la santé.(2003). Médecine traditionnelle.

- Organisation mondiale de la santé.(1978). Pharmacopée traditionnelle.

-Oda, A., Bannai, C., Yamaoka, T., Katori, T., Matsushima ., and Yamashita, K.(1994). Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by in vitro glycosylation and in erythrocytes of diabetic patients. *Horm Metab Res*, 26(1) : 1-4.

-Panchnadikar, A., and Bhonde, R.(2003). Can stress provide protection to pancreatic beta-cells and prevent diabetes ? *Med Hypotheses*, 60(3) : 356-9.

-Paglia,D.E., and Valentine, W.N.(1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* , 70(1), 158-169.

93

-Packer, L., Rimbach, G., and Virgili, F.(1999). Antioxidant activity and biological properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus Maritima*) bark, Pycnogenol.,*Free Radic. Biol. Med*, 27: 704-24.

- Prior, R.L.(2003) .Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr*, 78 (3 Suppl): 570S-578S.

-Pryor, W.(2000). Vitamin E and heart disease : basic science to clinical intervention trials. *Free Rad. Bio. Med*, 28 : 141- 64.

-Provost, M.(1991). Les plantes qui guérissent, Quebec. ISBN 2-89406-054-8, p. 12.

-Pichard, E., Berthe, G., Traore, HA., and Dembele, M.(1988). Les acidocétoses au Mali. A propos de vingt cas. *Ann. Soc. Belge Med. Trop*, 68: 67-72.

-Pino-Lagos, K., Benson ,MJ., and Noelle, RJ. (2008). Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*. Nov;1143:170-87.

-Porcellati, F., Pampanelli, S., and Rossetti, P.(2003). Counterregulatory hormone and symptom responses to insulin-induced hypoglycaemia in the postprandial state in humans. *Diabetes*, 52: 2774-83.

-Povoski, SP., McCullough, PJ., and Zhou, W.(1993). Induction of diabetes mellitus in Syrian Golden Hamster using stored equilibrium solutions of streptozotocin. *American association for laboratory animal science*, 43(4):310-314.

-Punt , W., Marks, A., and Hoen, P.(2003). Rhamnaceae, *Review of palaeobotany and palynology*, 123:57-66.

-Pincemail, J., Sergent, O., Detry, O., Gaspar, Y., Cheramy-Bien, J.P., Cillard, J., Meurisse, M., and Defraigne, J.O. (2002). Intracellular free iron content of rat liver tissue after cold ischemia. *Transplant Proc*, 34 (3): 759-61.

-Quezel, P., and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre national de la recherche scientifique, Paris p. 616-620.

- Rabinovitch, A. (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependant diabetes mellitus; *Diabetes Metab Rev*, 14, 129-151.

- Razzaq, T., Ozegbe, P., Jury, E., Sembi, P., Blackwell, N., and Kabouridis, P.(2004). Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology*, 113, 413-426.

- Rissanen, TH., Voutilainen, S., Nyysönen, K., Salonen, R., Kaplan, GA.,and Salonen, JT.(2003).Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic –

-Roe, J., and Kuetler, C.(1943). The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J BIO Chem* 147:399-407.

94

- Rissanen, TH., Voutilainen, S., Nyysönen, K., Salonen, R., Kaplan, GA.,and Salonen, JT.(2003).Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr*, 77:133-8.

-Robbins, MJ., Sharp, RA., Slonim, AE.,and Burr, M.(1980). Protection against streptozotocin-induced diabetes by uperoxide dismutase. *Diabetologia*, 18:55-58.

- Rolfe, M., Tang, CM., Walker, RW., Bassey, E., and George, M.(1992).Diabetes mellitus in Gambia, West Africa. *Diabet Med*, 9: 484-488.

-Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blandschum, R., and Wenk, J.(1997). UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem*, 378 (11): 1247-57

-Sidibe, EH.(2000). Complications majeures du diabète sucré en Afrique. *Ann. Med. Int*, 151: 624-628.

-Stamler, J.S., Singel, D.J., and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox –activated forms. *Science*; 258 (5090): 1898-902.

-Soyland, E., Nenseter, MS., Braathen, L., and Drevon, CA. (1993). Very long chain n-3 andn-6 polyunsaturated fatty acids inhibit proliferation of human T-lymphocytes in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 112-121.

-Slater, A. F., C. Stefan, I. Nobel, D.J. van den Dobbelsteen and S. Orrenius.(1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett.*; 82-83: 149-53.

-Stephens, J., and Pilch, P.(1995). The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4,the major insulin-responsive glucose transporter. *Endocr Rev*, 16(4), 529.

-Silva, RA., Muñoz, SE., Guzmán, CA., and Eynard, AR.(1995). Effects of dietary n-3, n-6 and n-9 polyunsaturated fatty acids on benzo(a)pyrene-induced forestomach tumorigenesis in C57BL6J mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 53:273-277.

-Singh, U., and Jialal, I. (2004). Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci. Dec*;1031:195-203. Review.

-Strain, J. (1991).Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes. *Proc Nutr Soc*, 50: 591-604.

-Stumvoll, M.(2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. DOI:10.1016/S0140-6736(05)61032-X . *Lancet*, 365: 1333-46.

-Szkudelski, T.(2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rats pancreas. *Physiol Res*, 50:536-546.

-Szondy, Z.(1998).Cell Death Differ. Jan; 5(1):4-10. [50] Kishi, M.(2001). *Biochem Biophys Res Commun. Mar 26*;394(1):228-32.

95

-Tanaka, Y., Tranb, P., Harmon, J., and Robertson, RP.(2002). A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic B cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Medical Science* , 99: 12363-12368.

-Tchobroutsky, G.(1987). Diabète sucré, in: *Traité de Médecine*, 2ème ed. Flammarion Médecine Science, Paris.

-Vella, A., Service, FJ., and O'Brien, PC.(2003). Glucose counterregulatory hormones in the 72-hour fast. *Endocr Pract* 9: 115-8.

-Wright ,E., Jr.,Scism-Bacon, L.J and Glass, L.C.(2006). Oxidative stress in type 2 diabetes the role of fasting and posprandial glycemia.*In J Clin Pract*, 60(3) : 308-14.

-Waston, L., and Dallwitz, M.J. (1992).The families of flowering plants,. *Heart Disease Risk Factor Study. Am J Clin Nutr*, 77:133-8.

-West, KM.(1980). Secondary diabetes: the spectrum of the diabetic syndrome. *Diabetes in the tropic*. Raven Press, 249-255

-Who, (révisé en avril 2002). Aide-mémoire n° 138.(www.who.int/inf-fs/fr/am138.html).

-Wintergerst, ES., Maggini, S., and Hornig, DH. (2006). Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab*;50(2):85-94. Epub 2005 Dec 21. Review.

- Yaro, B.(1992). Contribution à l'étude du traitement traditionnel du diabète au Mali. *thèse en pharmacie, Bamako*, p. 133..

-Yi-ling, Chen.,and pan-Kai, Chou.(1982). *Rhamnacea*.

-Young.I.S., Tate, S., Lightbody, J.H., McMaster, D., and Trimble, E.R. (1995). The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetes rat. *Free Radic Biol Med*, 18(5) : 833-40.

-Yue, K.D., McLennan, S., McGill, E., Fisher, E., Hefferman., Capogreco, C., and Turtle, J.R. (1990). Abnormalities of ascorbic acid metabolism and diabetic control : differences between diabetic patients and diabetic rats.*Diabetics Res Clin Pract*, 9(3) : 239-44.

-Yu, BP.(1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev*, 74 : 139-62.

96

RESUME

Cette étude porte sur la valorisation d'un arbrisseau fruitier appelé *Zizyphus lotus* L. (Rhamnacees) connu dans la région de Tlemcen sous le nom vernaculaire Sedra. C'est une plante utile, en médecine populaire, pour soigner le tube digestif, le foie et les affections respiratoires. Elle est connue pour ses activités : anti-inflammatoire, anti-ulcérogénique, analgésique et antidiabétique.

Nous avons démontré dans un premier temps que les différentes parties de cette plante possèdent des propriétés antioxydantes et elles sont riches en vitamines anti-oxydantes A et C et acides gras polyinsaturés de la famille n-3. Nous avons constaté que différents extraits de cette plante, particulièrement la pulpe, exercent un effet immuno-suppresseur sur les cellules – T humaines. Nous avons aussi constaté que chez le rat rendu diabétique par l'administration de la streptozotocine que les deux extraits aqueux, pulpe et tige, diminuent l'hyperglycémie et corrigent plus ou moins le statut anti-oxydant de ces animaux.

En conclusion, le *Zizyphus lotus* L peut être utilisé dans le traitement de certaines maladies associées à un dysfonctionnement du système immunitaire lié à l'inflammation et au diabète.

Mots clés : *Zizyphus lotus* L., Streptozotocine, diabète, système immunitaire

ABSTRAT

The present study was conducted on the shrub, called *Zizyphus lotus* L (Rhamnacea) which is known as Sedra in the region of Tlemsen. This plant is very well-known in the traditional medicine to cure gastro-intestinal tract, liver and other different respiratory infections. It is also known for its anti-inflammatory, analgesic, anti-ulcer and anti-diabetic properties.

We have shown, at first hand, that different parts of the plant possess anti-oxidant properties and they are enriched in different anti-oxidant vitamins like A and C, and some polyunsaturated fatty acids of the n-3 family. We have noticed that different extracts of this plant, particularly the fruit pulp, act as immunosuppressors on human T-cell lines. We have also observed in the rat, rendered diabetic by the administration of the streptozotocine, that two aqueous extracts of fruit pulp and stem diminish hyperglycemia and correct more or less anti-oxidant status of these animals.

In conclusion, the *Zizyphus lotus* L can be used in the treatment of some pathologies associated with immune dysfunctions like inflammation and diabetes mellitus.

Key-words : *Zizyphus lotus* L., Streptozotocine, diabetes mellitus, immune system

موجز

تركز هذه الدراسة على وضع شجيرة السدر يسمى بستان زهرة اللوتس لام (*Rhamnaceae*) *Zizyphus lotus* L المعروفة في منطقة تلمسان تحت اسم سدرية العامية. هذا نبات مفيد في الطب الشعبي لعلاج الجهاز الهضمي والكبد وأمراض الجهاز التنفسي. ومعروف عنها أنها لأنشطتها : المضادة للالتهابات ، والمضادة للمقرح ، مسكنة للألم والمضادة لمرض السكر.

أظهرنا في البداية أن أجزاء مختلفة من هذا النبات تملك خصائص مضادة للأكسدة وغنية والفيتامينات المضادة للأكسدة وجيم والأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة من 3 - ن. وجدنا أن مقتطفات مختلفة من هذا النبات ، وخصوصا اللب ، الى تأثيرات على خلايا تي المناعية البشرية. وجدنا أيضا أن الفران التي السكري من قبل الإدارة بالستربتوزوتوسين كل من مستخلص المائي ، ولب الورق وينبع ، وارتفاع السكر في الدم وانخفاض الصحيح أكثر أو أقل حالة المضادة للأكسدة من هذه الحيوانات.

وفي الختام ، يمكن أن تستخدم لوتس لام السدر في علاج بعض الأمراض المرتبطة ضعف جهاز المناعة المرتبطة الالتهاب ومرض السكري.

كلمات البحث : السدر لوتس لام ، بالستربتوزوتوسين والسكري والجهاز المناعي