

N° d'ordre

N° de série

Thèse de Doctorat

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Option : Biochimie

Par : KEBIECHE Mohamed

Thème

***Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la
plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète
expérimental et l'hépatotoxicité induite par
l'Epirubicine***

Soutenu le :22/11/2009

Devant le jury :

Président	: Mme BENLATRECHE C.	Prof. Université Mentouri-Constantine
Rapporteur	: Mme MERAIHI Z.	Prof. Université Mentouri-Constantine
Examineurs	: Mr SOULIMANI R.	Prof. Université de P. Verlaine- Metz, France
	Mr MADANI K.	Prof. Université MIRA, Bejaia
	Mr LAGHOUCI S.	Prof. Université de Jijel

Liste des abréviations

ALAT	Alanine amino transférase
ASAT	Aspartate amino transférase
A	Absorbance
CCl₄	Tétrachlorure de carbone
CAT	Catalase
DTNB	5-5'-dithiobis2-nitrobenzoïque
DNID	Diabète non insulino dépendant
DID	Diabète insulino dépendant
DPPH	2, 2-diphénylpicrylhydrazyl
EB	Extrait butanolique
EPI	Epirubicine
ED	Eau distillée
Fl O°	Flavonoïd radical
FADH	Flavine Adénosine Dinucléotide, forme réduite
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GLP-1	Glucagon like peptide-1
HNE	4-hydroxynonenal
HO	Hème oxygénase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
IP	Intrapéritonéal
L	Litre
MDA	Malondialdéhyde
Mole	Mole/L
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBT	Nitro blue Tetrazolium
NO	Nitric oxide
NOS	NOsynthase
OH°	Le radical hydroxyl
O₂°	Anion superoxyde
ONOO°	Peroxynitrite
PCG	Pourcentage de la chute de la glycémie
QR	Quercétine
RRL	<i>Ranunculus repens</i> L
ROS	Reactive oxygen species
ROO°	Radical peroxy
RPE	Résonance para-électrique
SOD	Superoxyde dismutase
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
TBARS	<u>Thiobarbituric acid reactive substances</u>
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Acide trichloroacétique
TEP	Tétraétoxypropane
TNB	Thionitrobenzoïque
UI	Unité internationale
μU	Microunité

Sommaire

	Page
Introduction générale.....	1
 <i>Partie 1 : Effet des extraits de flavonoïdes de <i>Ranunculus repens</i> L (RRL) et de la quercétine sur le diabète</i>	
Introduction.....	3
 1. Le diabète.....	 5
1.1. Définitions et généralités.....	5
1.2. Le pancréas et l'insulinosécrétion.....	6
1.3. La pancréatotoxicité à l'alloxane.....	11
1.4. De l'hyperglycémie chronique aux complications organiques.....	11
1.5. Le diabète et le stress oxydatif.....	12
1.6. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité.....	12
1.7. Plantes antidiabétiques.....	13
 2. Les flavonoïdes-généralités.....	 15
2.1. Définitions et historique	15
2.2. Les composés phénoliques.....	15
2.2.1 Biosynthèse des composés phénoliques.....	17
2.2.2. Structure et classification.....	19
2.3. Pharmacologie des flavonoïdes.....	20
2.3.1. Biodisponibilité.....	20
2.3.2. Absorption intestinale et métabolisme.....	20
2.4. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes.....	21
2.4.1. Propriétés anti-inflammatoire et immunologique.....	21
2.4.2. Propriétés antivirales et antibiotiques.....	22
2.4.3. Propriétés antinéoplasiques.....	23
2.4.4. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes.....	23
2.4.5. Propriétés pro-oxydantes des flavonoïdes.....	24
2.5. Distribution de flavonoïdes.....	25
2.6. La plante <i>Ranunculus repens</i> L.....	26

2.5.1. Systématique de la plante.....	26
2.5.2. Biologie de <i>Ranunculus repens</i> L.....	26
2.5.3. Ethnopharmacologie de <i>Ranunculus repens</i> L.....	27
3. Matériel et méthodes d'analyse.....	28
3.1 Préparation des extraits phénoliques.....	28
3.1.1. Extraction des flavonoïdes	28
3.1.2. Dosage des polyphénols.....	29
3.1.3. Dosage des flavanoides.....	29
3.1.4. Evaluation du pouvoir oxydant des flavonoïdes.....	31
3.2. Expérimentation animale.....	32
3.2.1. Animaux et conditions d'hébergement	32
3.2.2. La recherche de toxicité des flavanoids de RRL	32
3.2.3. Test de tolérance au glucose.....	32
3.2.4. Evaluation de l'effet des flavanoids sur le stockage de glycogène hépatique et l'insulinosécrétion.....	33
3.2.5. Evaluation de l'activité antidiabétique des composés phénoliques.....	37
3.2.6. Effet préventif des extraits de flavonoïdes de RRL et de la quercétine sur le diabète induit par l'alloxane.....	38
3.2.7. Recherche des mécanismes de prévention des extraits butanolique de RRL et de la quercétine.....	39
3.2.8. Evaluation statistique.....	42
3.3. Résultats et interprétation.....	43
3.3.1. Extraction et dosages des composés phénoliques.....	43
3.3.2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire.....	44
3.3.3. Effet des flavonoïdes sur la tolérance au glucose.....	45
3.3.4. Evaluation du stockage de glycogène hépatique et la glycosylation de glucose <i>in vitro</i>	46
3.3.5. Effet antidiabétique des flavonoïdes en aigu et en subchronique chez les rats diabétiques.....	51
3.3. 6. Effet préventif des flavonoïdes contre le diabète induit à l'alloxane.....	54
3.4. Discussion	59
3.4.1. Les flavonoïdes de <i>Ranunculus repens</i> L.....	59
3.4.2. Etude de l'activité des flavonoïdes et leur mécanisme d'action.....	61

3.4.3. Activité antidiabétique des flavonoïdes.....	63
3.4.4. Effet protecteur des flavonoïdes et mécanismes d'action contre le diabète induit par l'alloxane.....	64
3.4.5. Effet de l'alloxane et les flavonoïdes du RRL sur les cellules du pancréas : mécanisme d'action.....	66
Conclusion.....	68
Références bibliographiques.....	69

Partie 2 : Effet des extraits de flavonoïdes de RRL et de la quercétine sur l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine

Introduction.....	81
Le stress oxydant.....	83
1. Définitions.....	83
2. Les espèces réactives de l'oxygène et leur origine.....	84
2.1. Les radicaux libres oxygénés	84
2.2.3. Rôle pathologique des espèces actives de l'oxygène.....	94
2.2.4. Les systèmes « scavenger » des radicaux libres.....	99
• Les systèmes endogènes enzymatiques.....	99
• Les systèmes endogènes non enzymatiques.....	103
2.2. Les systèmes exogènes antioxydants.....	104
3. Etude expérimentale de l'effet hépatoprotecteur des flavonoïdes.....	111
3.1. Matériel et méthodes.....	112
3.1.1. Induction de l'hépatotoxicité par l'Epirubicine.....	112
3.1.2. Le sérum et le test de la fonction hépatique	112
3.1.3. Préparation des fractions de cytosol et de la matrice mitochondriale.....	112
• La préparation de cytosol des hépatocytes.....	112
• La préparation de la matrice mitochondriale.....	113
3.1.4. Evaluation biochimique du statut oxydatif dans le cytosol et les mitochondries.....	113
3.2. Résultats et interprétation	115

3.2.1. Effet de l'épirubicine sur la fonction hépatique et l'action hépatoprotecteur des flavonoïdes.....	115
3.2.2. Evaluation <i>in vivo</i> de la peroxydation lipidique dans le cytosol et la mitochondrie.....	115
3.2.3. Evaluation des systèmes antioxydants dans le cytosol hépatique.....	117
3.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique CAT et SOD dans les mitochondries.....	117
3.3. Discussion.....	118
Conclusion.....	121
Conclusion générale.....	122
Références bibliographiques.....	124
Annexes	

Introduction générale

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides entraînant une hyperglycémie. A l'origine, le terme "diabète" désignait diverses maladies caractérisées par une élimination importante d'urines, une déshydratation et une soif intense [Calop et al., 2008]. Cette pathologie se distinguait par la saveur sucrée des urines et fut nommée diabète sucré [Rodier, 2001 ; Sharma, 2008]. Elle est répandue dans le monde où on dénombre 5 à 7% de la population mondiale [Weaber, 2007 ; Sharma et al., 2008 ; Singh P. and Kakkar P., 2009 ; Zhou et al., 2009].

Selon l'OMS [Guermaz, 2008], l'Algérie en compte 5 millions tout diabète confondu. Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultante d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de cette hormone [Rodier, 2001 ; Sharma et al., 2008]. Le diabète type 1, insulino-dépendant (DID), est actuellement maîtrisé surtout après la synthèse de l'insuline recombinante [Johnson, 1983]. Pour le diabète type 2 (DNID), le champ de recherche est encore ouvert.

Au niveau des sociétés industrielles, les recherches et les tentatives en pharmacothérapie ont permis d'établir l'insulinothérapie pour lutter contre le diabète juvénile et le contrôle du régime alimentaire associé à la prise de molécules antidiabétiques (sulphonylurés, biguanide, méthformine, ...) pour le traitement et la lutte contre le DNID [Marles, 1994 ; Dey lucey et al., 2002].

Dans certaines sociétés traditionnelles non industrialisées (Chine, certains pays africains et latino-américains...), la prise en charge médicamenteuse de pathologies dites chroniques (tel le diabète) est en grande partie assurée par l'utilisation de plantes médicinales et alimentaires [Sharma et al, 2008 ; Guermaz, 2008 ; Singh, 2009 ; Zhou et al., 2009]. En effet, la vie humaine sur terre est étroitement liée à l'exploitation des plantes. Ces dernières ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. A côté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisable par l'homme en particulier dans le domaine pharmacologique [Marouf et Joël, 2007].

De nos jours, plus de 3000 flavonoïdes sont identifiés et se trouvent localiser particulièrement dans les pigments floraux ou dans les feuilles [Marfak, 2003]. Les flavonoïdes sont reconnus essentiellement pour leur action antioxydante [Bruneton, 1999],

modulatrice de l'activité de certaines enzymes, vasculoprotectrice [Vitor et al., 2004] [Ghedira, 2005], anti-inflammatoire [Chen et al., 2008] et antidiabétique [Marfak, 2003].

L'existence d'une pharmacopée traditionnelle antidiabétique destinée au traitement de la pathologie diabétique sévit et son existence est confirmée par les praticiens et les médecins qui la pratiquent [Sharma et al, 2008 ; Singh, 2009].

Il paraît difficile voire impossible de répertorier la totalité des plantes actives et efficaces sur ce genre de pathologie. Aussi, dans notre travail, nous nous sommes limités à l'étude de la plante *Ranunculus repens* L très utilisée de façon traditionnelle (ses jeunes pousses de feuilles en décoction et en infusion) dans le traitement du diabète sucré dans la région de Jijel (ville de l'Est algérien). Ses effets avérés sur le diabète, nous ont donc poussés à démontrer expérimentalement, le ou les principes actifs et d'en comprendre les mécanismes d'action. Par ailleurs, selon la documentation consultée [Coles, 1977 ; Lovett-Doust et al., 1990 ; Khan et al., 2006], cette plante n'a pas été étudiée tant sur le plan phytochimique que pharmacologique.

Notre stratégie expérimentale comporte donc les axes suivants :

- Ø Un fractionnement des flavonoïdes par entraînement avec différents solvants organiques
- Ø Un modèle de rat diabétique est conçu pour tester l'efficacité des extraits de la plante et étudier également leurs mécanismes d'action *in vitro* et *in vivo*. Pour cette étude la quercétine est utilisée comme témoin positif, connue pour ses propriétés antiradicalaires [Boots, 2008 ; Coskun, 2005] et antioxydantes [Boots, 2008 ; Erlund , 2004].
- Ø Une étude parallèle est entreprise pour évaluer la toxicité hépatique médicamenteuse causée par l'Epirubicine (antibiotique anticancéreux). Les activités antihépatotoxiques, hépatoprotectrices et antioxydantes des extraits de flavonoïdes sont comparées à l'effet de la quercétine.

Le travail est divisé en 2 sections : une section comportant les deux premiers points et une autre pour la dernière étude.

Introduction

Le diabète est une maladie métabolique grave menaçant, d'une manière croissante, la santé publique dans le monde. Elle touche environ 4% de la population mondiale et on s'attend à une augmentation de 5,4% en 2025 [Al-Achi, 2005]. Les patients atteints de diabète ont le stress oxydatif élevé et une altération des systèmes de défense anti-oxydant, qui semblent contribuer à l'initiation et la progression des complications du diabète induit [Kim et al., 2006]. Les systèmes de défenses antioxydants existant dans l'organisme sont susceptibles de moduler le niveau du stress oxydatif intracellulaire. En effet, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase (enzymes antioxydantes), peuvent catalyser la dismutation des radicaux libres ou leur neutralisation [Rudge et al., 2007]. Le diabète entraîne de graves déséquilibres métaboliques, des changements dans de nombreux tissus en particulier le pancréas [McCord et al., 1971] où Ihara et al., 1999, ont noté une augmentation des marqueurs du stress oxydatif dans les îlots pancréatiques de rats diabétiques. Le malondialdéhyde reflète le degré de peroxydation lipidique, l'augmentation de sa production joue un rôle important dans le contrôle de la progression du diabète [Ilhan et al., 2001].

Malgré l'utilisation des hypoglycémifiants comme drogues antidiabétiques, le diabète et ses complications constituent une grande problématique dans la prise en charge thérapeutique des diabétiques et la réussite du traitement serait d'un intérêt grandiose, malgré l'avancée de nouvelles molécules thérapeutiques. Les médicaments modernes, y compris l'insuline et les hypoglycémifiants oraux (les biguanides, les sulfonurées), leur administration régulière engendre d'effets indésirables [Nissen and Wolski, 2007]. Récemment, les diabétologues sont arrivés à l'évidence d'un complément thérapeutique constitué par les extraits de plantes est nécessaire pour optimiser le traitement du diabète [Bagchi et al., 1997 ; Kim et al., 2002 ; Jin et al., 2008].

Les plantes sont reconnues comme une merveilleuse source de médicaments. Actuellement 1200 espèces de plantes sont utilisées comme médicaments dans la thérapeutique traditionnelle du diabète [Marles and Farnsworth, 1995]. Cependant pour la plupart d'entre elles les preuves scientifiques ne sont pas encore élucidées.

Les antioxydants jouent un rôle majeur dans la protection contre les dommages oxydatifs moléculaire [Evans, 2007]. En plus du stress oxydatif, l'action de l'insuline est également

perturbée chez les diabétiques, ce qui entraîne une augmentation de la production hépatique de glucose. Ainsi, l'effet des composés phytochimiques sur les tissus tel que le foie, qui régule le métabolisme du glucose, est un domaine intéressant à explorer. En effet, les flavonoïdes sont longuement reconnus pour avoir un effet anti-inflammatoire, antioxydant, antiallergique, antithrombotique, antiviral et anticancérinogène [Carroll et al., 1998]. Cependant peu d'informations sont disponibles sur leur potentiel à réguler et contrôler le glucose sanguin chez l'homme.

L'objectif de la présente étude est la validation de l'effet antidiabétique de la plante *Ranunculus repens* L (poudre de feuilles séchées), reconnue par la tradimédecine dans le traitement du diabète ainsi que le potentiel antioxydant en utilisant des outils biochimiques. Dans ce contexte, une étude sera entreprise pour comprendre les mécanismes moléculaires d'action des fractions riches en flavonoïdes de la plante. Un autre objectif fixé également par cette investigation est l'étude de la variation du status redox des cellules pancréatiques sous l'effet du diabète.

Le test de tolérance au glucose en utilisant les différents extraits de flavonoïdes, glycogène hépatique, la sécrétion d'insuline, test de glycosylation *in vitro*, activité des enzymes antioxydantes, glutathion et peroxydation lipidique ont été analysés chez le diabète induit par l'alloxane afin d'évaluer l'effet des flavonoïdes sur certains paramètres moléculaires et biochimiques des cellules pancréatiques.

1. Le diabète

1.1. Définitions et généralités

Le diabète est une maladie fréquente, connue depuis fort longtemps, très répandue en ce début de XXI^{ème} siècle. C'est une pathologie chronique, caractérisée par une hyperglycémie. Lorsque la glycémie dans le sang, mesurée à jeun, devient supérieure à 1,26 g par litre, la personne est considérée comme diabétique. Cette maladie est incurable, mais peut néanmoins être traitée efficacement [Buysschaert et al., 1998 ; Raccach, 2004].

Le diabète est un désordre du métabolisme lipidique, glucidique et protéique attribué à la production diminuée de l'insuline ou à une résistance anormale à cette hormone qui entraîne une hausse du taux de glucose.

On peut distinguer plusieurs types de diabète :

- **Le diabète insulino-dépendant (DID) :** Concerne le plus souvent les enfants, mais il peut survenir à tout âge. Les cellules qui sécrètent l'insuline sont détruites jusqu'à 90% de leur quantité normale (causes auto-immunes ou idiopathiques). Il est lié à un déficit en insuline [Raccach, 2004 ; Calop et al., 2008].

- **Diabète non insulino-dépendant (DNID) :** Ce type de diabète débute généralement après l'âge de 40 ans et représente 90% de l'ensemble des cas mondiaux [Buysschaert et al., 1998 ; Raccach, 2004]. Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline. L'insuline est soit basse ou soit élevée (insulinorésistance prédominante ou insulinopénie prédominante) [Calop et al., 2008 ; Raccach, 2004].

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

Le diabète aboutit à des complications comme les maladies cardio-vasculaires et rénales. Ces complications peuvent être retardées, diminuées ou empêchées en maintenant une glycémie près de la normale (0.7 - 0.8 g/l) [Raccach, 2004].

Les maladies coronariennes sont présentes chez 8 à 20 % des diabétiques au-delà de 45 ans et cette fréquence augmente avec l'âge [Raccach, 2004]. Le diabète est la cause principale de nouveau cas de cécité chez des adultes diabétiques entre 30 et 75 ans. Les diabétiques au-delà de 65 ans sont deux fois plus souvent hospitalisés pour des problèmes liés au fonctionnement des reins que les personnes non atteintes [Sharma et al., 1993 ; Buysschaert et al., 1998 ; Raccach, 2004].

Les diabétiques de *type 2*, précisément, sans aucun passé coronaire ont un risque d'infarctus myocardique aussi élevé que celui des témoins non diabétiques [Sharma et al., 1993 ; Buysschaert et al., 1998].

1. 2. Le pancréas et l'insulino-sécrétion

Bien que les apports de glucose soient très variables dans le temps, la glycémie reste toujours comprise entre 0.7 et 0.8 g/l [Raccach, 2004]. Cette régulation est assurée par les sécrétions endocrines du pancréas qui pénètrent dans le flot sanguin par la veine mésentérique [Buysschaert et al., 1998].

Le pancréas est une glande double, à la fois exocrine et endocrine, située dans une anse du duodénum. La glande endocrine est représentée par de petits îlots cellulaires disséminés dans le parenchyme exocrine, les îlots de Langerhans, dont le diamètre varie de 100 à 300 μ m et dont le total ne représente guère que 1% environ de la glande, soit un poids total de 1 à 2 g). (figure 1).

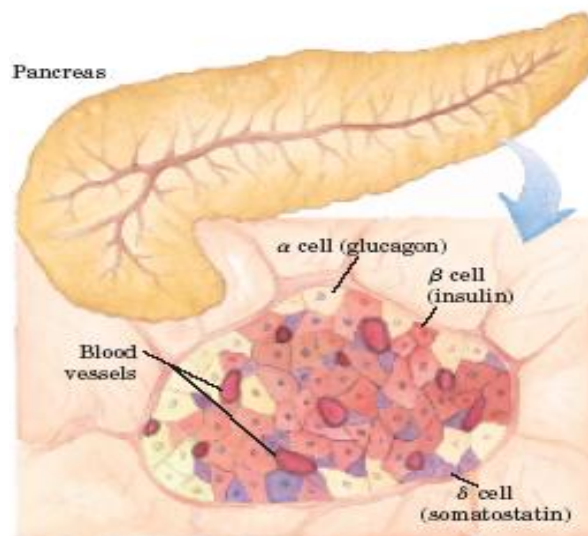


Figure 1 : Les systèmes endocriniens du pancréas [Nelson et Cox, 2004]

Les sécrétions de l'insuline rejoignent la circulation sanguine via le foie. Le pancréas sécrète plusieurs hormones (Nelson et Cox, 2004) :

1/ L'insuline : hormone peptidique synthétisée dans les glandulaires des îlots de langerhans ou cellules Bêta. L'incapacité de ces cellules à produire suffisamment l'insuline, entraîne un diabète. Cette fragilité intervienne dans les mécanismes qui conduisent à la destruction de la cellule bêta, sous l'effet d'agents diabétogènes, comme l'Alloxane [Malaisse et al., 1982 ; Oberley, 1988]. L'action de l'insuline est représentée sur la figure suivante (figure2):

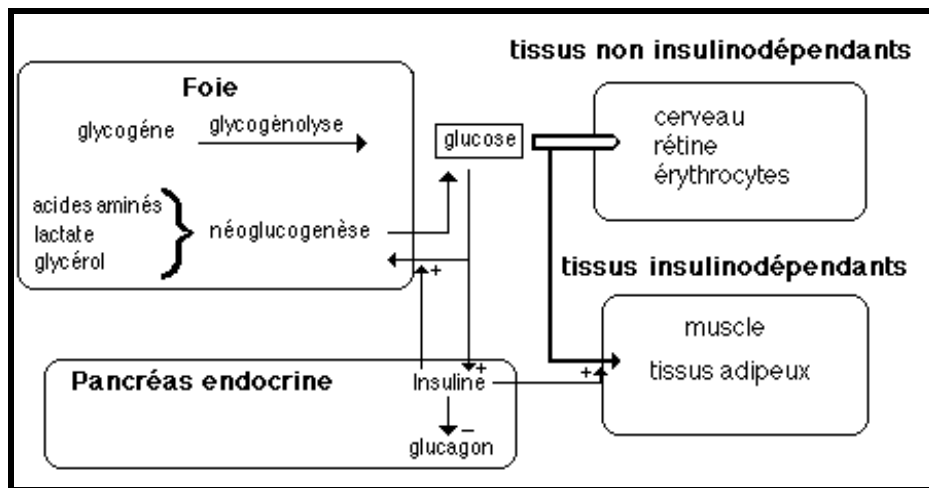


Figure 2 : Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline [Oberley, 1988].

Au niveau des cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans les cellules en augmentant la perméabilité de leur membrane via des récepteurs au glucose exemple GLUT 4 [Malaisse et al., 1982 ; Oberley, 1988]. Au niveau du foie, elle stimule la glycogénogenèse.

La capacité, plus ou moins grande, de l'insuline à favoriser l'utilisation du glucose par les tissus périphériques définit le degré de sensibilité à l'insuline d'une personne. Chez les humains obèses et/ou diabétiques, cette action de l'insuline est fortement réduite et cette perturbation est due à un défaut au niveau du transport du glucose [Buysschaert et al., 1999 ;

Raccach, 2004 ; Weaber, 2007]. Les mécanismes par lesquels l'insuline stimule ce processus dans les cellules musculaires et adipeuses soient indiqués dans la figure 3.

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'insuline stimule l'enrichissement de la membrane plasmique en transporteurs GLUT 4, où des vésicules contenant les transporteurs fusionnent avec la membrane [Wang et al., 1997]. Une autre hormone d'origine intestinale, le GLP-1, est également capable d'augmenter le nombre de récepteurs GLUT4 et GLUT1 sur les adipocytes *in vitro* [Wang et al., 1997].

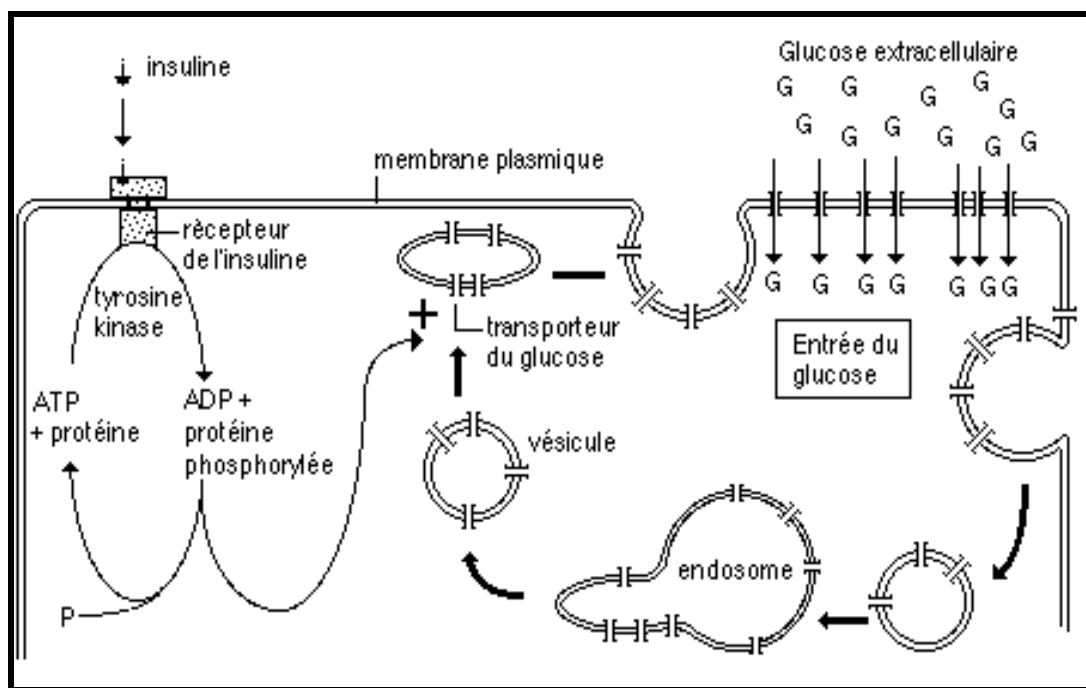


Figure 3 : Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline [Kahn, 1992].

L'insulino-résistance est une réponse biologique *in vivo* à l'insuline expliquée par une sécrétion réduite ou par son action défectueuse. Elle est caractéristique du diabète non insulino-dépendant et concerne la majorité des tissus cibles comme le foie qui va augmenter sa production en glucose, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Les mécanismes responsables peuvent se situer à différents niveaux du métabolisme insulinique, y compris au

niveau du récepteur à l'insuline des cellules cibles [Buysschaert et al., 1999 ; Raccach, 2004] (figure 4).

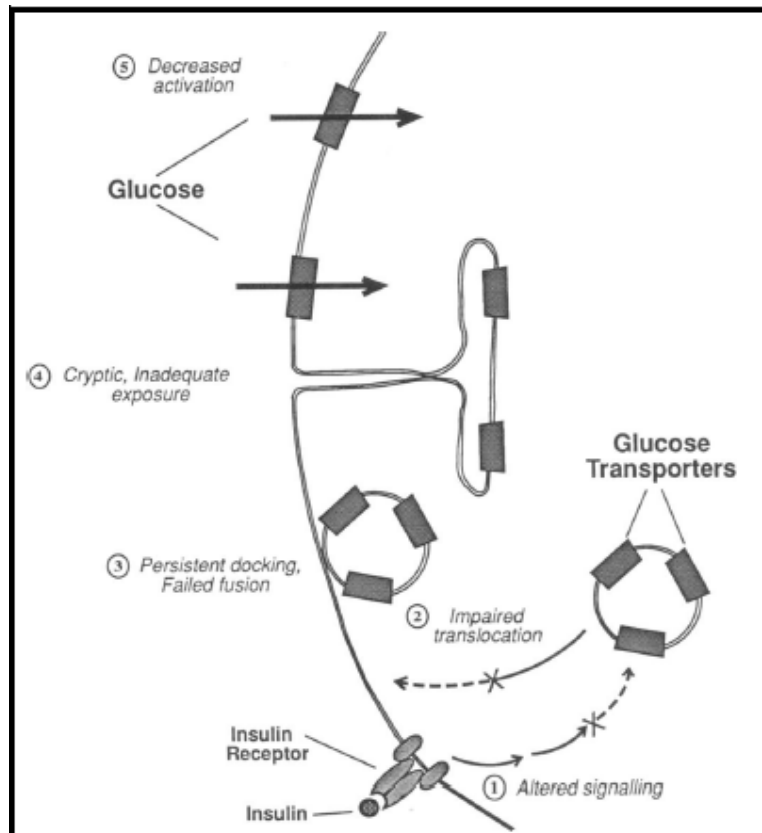


Figure 4 : Les mécanismes de l'insulino-résistance [Kahn, 1992]

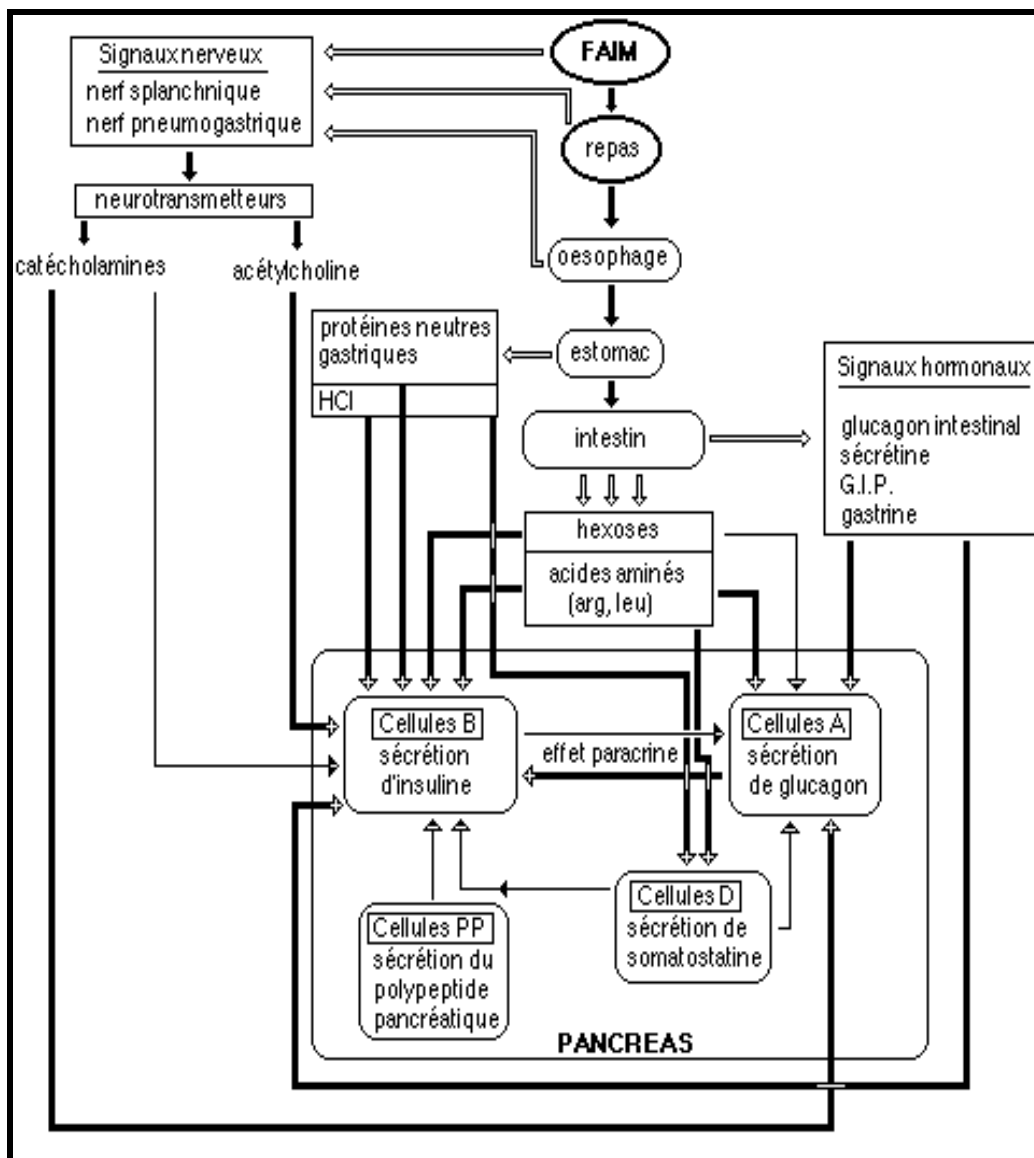
(1) signalisation déficiente, (2) translocation affaiblie, (3) fusion échouée, (4) fusion partielle et exposition au milieu extracellulaire inadéquate, or (5) réduction de l'activation des transporteurs de glucose.

2/ **Le glucagon** : hormone peptidique synthétisée par les cellules α , qui est une hormone hyperglycémiant. C'est un facteur antagoniste de l'insuline. Cette hormone agit en stimulant la glycogénolyse hépatique.

3/ **La somatostatine** : hormone peptidique synthétisée par les cellules γ dont le rôle est hyperglycémiant.

Chez les mammifères, l'organisme contrôle l'équilibre entre la consommation cellulaire du glucose et sa production endogène hépatique et les apports exogènes. Les facteurs hormonaux

comme l'insuline et le glucagon, des neurotransmetteurs et autres molécules participent à la régulation du métabolisme glucidique afin de maintenir l'homéostasie (figure 5). Certains des signaux hormonaux favorisant la production d'insuline ont été étudiés dans le but de corriger le DNID tel que le glucagon intestinal (GLP-1) [Nauck, 1998].



1.3. La pancréatotoxicité à l'alloxane

L'Alloxane est un composé organique basé sur un squelette de l'hétérocyclique de la pyrimidine (figure 6). Ce composé a une haute affinité pour l'eau existant sous forme monohydratée. Les données caractérisant l'Alloxane dans les conditions standards sont les suivantes :

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

Structure chimique : $C_4H_2N_2O_4$

Masse moléculaire : 160,09 g/mol.

Point fondant : 253°C.

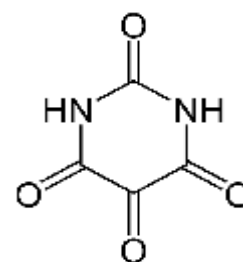


Figure 6. Structure chimique de l'Alloxane.

L'Alloxane est un agent oxydant fort excentre une activité cytotoxique sur les cellules β par le produit de sa réduction, l'acide diallurique [Grankvist et al., 1981]. Il établit un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes, associé à l'internalisation de fortes doses de calcium dans le cytosol provoquant ainsi la destruction rapide des cellules β [Ammon et al., 1983 ; Lenzen et al., 1996]. Cet effet délétère est inhérent à la vulnérabilité de ces cellules au stress oxydatif en raison d'une part, de leur pauvreté en cu^{++}/zn^{++} super oxyde dismutase, en catalase et en glutathion peroxydase, d'autre part au faible contenu en glutathion réduit [Grankvist et al., 1981]. cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction des cellules β sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'Alloxane [Grankvist et al., 1981; Ammon et al., 1983 ; Lenzen et al., 1996].

1. 4. Hyperglycémie chronique et complications organiques

L'hyperglycémie chronique est associée à des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les nerfs, les reins, le cœur et les vaisseaux [Raccach, 2004], qui provoquent un risque de mortalité très élevé. A titre d'exemple la mortalité cardiovasculaire en France chez les personnes atteintes d'un diabète de type 2 est approximativement le double de celle des sujets non diabétique [Drouin et al., 1999 ; Buysschaert et al., 1999].

1. 5. Le diabète et le stress oxydatif

Les complications du diabète sont fortement liées à certain nombre de facteurs. A coté de l'hyperglycémie chronique et la glycation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif [Guerci et al., 2001 ; Punitha et al., 2005]. En effet, le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités d'espèces oxygénées activées dont font partie les radicaux libres ($O_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$,..., le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet). Le patient diabétique présente une surproduction des ROS d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif à l'origine des micro et des macro angiopathies [Pincemail et al., 1999 ; Huang et al., 2004].

1. 6. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité

Généralement, tous ces agents antidiabétiques causent différents effets secondaires qui varient selon la classe et la génération du médicament. Précisément, les sulfamides, insulinosécrétagogues, provoquent un état d'hypoglycémie. Cet effet est considéré comme principal à coté de l'hyponatrémie, l'hépatite, les atteintes hématologiques, l'éventuelle réaction dermatologique ainsi qu'un gain de poids dû à l'hyperinsulinémie [Marles and Farnsworth, 1994 ; Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002].

Suite à leurs effets secondaires néfastes, certains Biguanides, inhibiteurs de la néoglucogénèse et l'absorption intestinale du glucose, sont éliminés du marché. La metformine, le biguanide le plus commercialisé dans le monde, n'est plus disponible qu'aux USA car il provoque une acidose lactique, une fatigue, des nausées et une toxicité rénale [Dey lucey et al., 2002].

L'acarbose ($C_{25}H_{43}NO_{18}$), un médicament de la classe des inhibiteurs des alpha-glucosidases présente divers effets secondaires, comme les gaz, le ballonnement et la diarrhée [Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002].

1. 7. Plantes antidiabétiques

Pour pallier aux effets secondaires des traitements antidiabétiques, les recherches scientifiques portent sur 1123 plantes utilisées traditionnellement contre le diabète [Raccah, 2004]. La minorité étudiée concerne les plantes suivantes : *Momordica charantia*,

Catharanthus roseus, *Trigonella foenum-graecum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, et autres [Al-Achi, 2005].

Les guanidines furent extraits la première fois à partir de *Galega officinalis*, qui constituent une source naturelle pour la semi-synthèse des Biguanides les moins toxiques que les guanidines [Dey lucey et al., 2002]. D'autres composés végétaux montrent une activité biologique (voir tableau1).

Tableau 1. Composés végétaux à vertus antidiabétiques.

<i>Composé</i>	<i>Nature chimique</i>	<i>Source</i>	<i>Mécanisme d'action possible</i>
Polypeptide P	Polypeptide	<i>Momordica charantia</i>	Insulinomimétique administré par voie sous cutanée chez des diabétiques de type1 [Marles and Farnsworth, 1995].
Charantine	Hétéroside stéroïdique	<i>Momordica charantia</i> [Dey lucey et al., 2002] <i>Momordica foetida</i> [Marles and Farnsworth, 1995]	* Mécanisme d'action exacte reste inconnu. Des études ont rapporté que: * Le jus de <i>M. charantia</i> peut améliorer la tolérance au glucose chez les diabétiques de type 2 [Welihinda et al., 1986]. * L'extrait aqueux de <i>M. charantia</i> diminue la glycémie post prandial avec une réduction du taux de l'hémoglobine glycosylée [Srivastava et al., 1993]. * Il augmente l'utilisation hépatique du glucose et inhibe la néoglucogenèse, il réprime l'insulinorésistance en augmentant le taux des transporteurs membranaires de glucose [Al-Achi, 2005]
Trigonelline	Alcaloïde	<i>Trigonella foenumgreacum</i> [Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002]	Les extraits bruts ont montré les effets suivants : * Diminution de la glycémie post prandial. * Diminution du taux de glucagon, somatostatine, insuline, cholestérol total et des triglycérides * Augmentation du taux d'HDL-Cholestérol [Ribes et al., 1984]. * Resensibilisation des cellules à l'action de l'insuline [Al-Achi, 2005]
Allyl propyl disulfide	Dérivés de la cystéine	<i>Allium cepa</i>	Ces deux composés semblent agir par compétition avec l'insuline sur son récepteur [Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002 ; Al-Achi, 2005].
Diallyl disulfide oxide		<i>Allium sativum</i>	
Ginsenosides	Hétéroside stéroïdique	<i>Panax ginseng</i>	* La plante provoque une augmentation du nombre des transporteurs de glucose * Stimulation de la synthèse de l'insuline [Al-Achi, 2005].

2. Les flavonoïdes-généralités

2.1. Définitions et historique

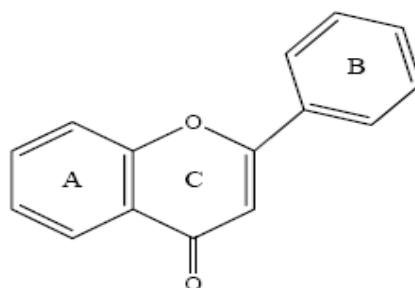
Le nom *flavonoïde* est dérivé du mot « Flavus » en latin, qui signifie jaune. L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C par *Szent Gyorgyi* en 1938 [Szent-Görgyi, 1938 ; Bruneton, 1993].

Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace [Szent-Görgyi, 1938]. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïdique [Bruneton, 1993]. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines ; par contre, les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants [Alan et Miller, 1996] ou posséder des propriétés biologiques diverses qui seront développées dans ce chapitre.

2.2. Les composés flavonoïdiques

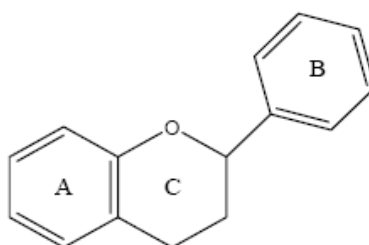
Ce sont des composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour [Alan et Miller, 1996 ; Rajnerayanama et al., 2001]. Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets [Bruneton, 1993 ; Rajnerayanama et al., 2001].

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau FLAVONE ou 2-PHENYL CHROMONE (figure 7) portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau FLAVONE est lui-même un dérivé du noyau FLAVANE de base [Bruneton, 1993], (figure 8).



NOYAU FLAVONE

Figure 7 : Structure du FLAVONE [Bruneton, 1993 ; Elicoh-Middleton, 2000].



NOYAU FLAVANE

Figure 8 : Structrue du FLAVANE [Bruneton, 1993 ; Elicoh-Middleton, 2000].

Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné, cycle C [Bruneton, 1993 ; Elicoh-Middleton, 2000].

2.2.1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles [Elicoh-Middleton, 2000].

Les composés de départ de la biosynthèse des flavonoides sont le malonyl CoA et les dérivés CoA de l'acide cinnamique, le cinnamoyl CoA [Gerhard, 1993]. Ces composés sont formés suite à deux voies complémentaires, voie acétate malonate et voie shikimate [Hollman et al.,

1999 ; Elicoh-Middleton, 2000]. La voie shikimate conduit à la synthèse de l'acide cinnamique et donc au cycle B et à la chaîne en C3 qui formera le cycle oxygéné C de la structure de base des flavonoïdes. Les précurseurs de cette voie sont l'érythrose 4-phosphate de la voie des pentoses et le PEP résultant de la glycolyse [Marfak, 2003]. La voie acétate malonate constitue la voie de synthèse du noyau A. Ce système aromatique est formé par condensation répétée d'unités d'acétate [Gerhard, 1993]. Ces deux voies sont alors condensées pour engendrer un précurseur commun la 4, 2',4',6' tétrahydroxychalcone avec la catalyse de la chalcone synthase [Elicoh-Middleton, 2000]. Ce pigment jaune est métabolisé en différentes classes des flavonoides sous l'action d'enzymes spécifiques (figure 9).

Des réactions post-biosynthétiques sont enfin effectuées pour donner la structure finale aux flavonoides telles que la glycosylation, l'acylation...formes natives sur lesquelles se trouvent in vivo [Marfak, 2003]. Il existe cependant des flavonoides non glycosylés comme la quercétine [Bruneton, 1993 ; Remesy et al., 1996 ; Elicoh-Middleton, 2000 ;].

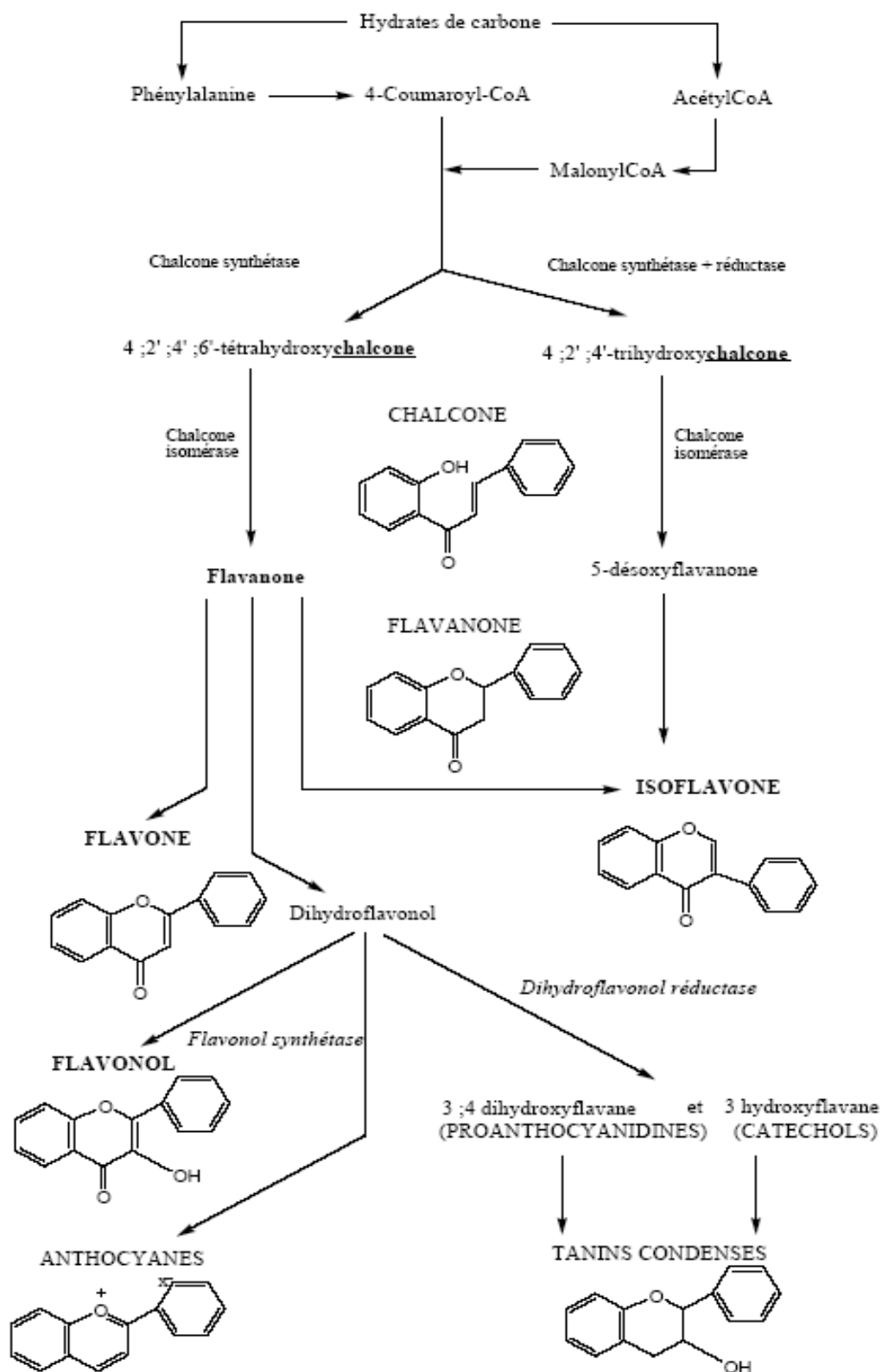


Figure 9 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes [Gerhard, 1993].

2.2.2. Structure et classification.

Les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : *flavones*, *flavonols*, *flavanones*, *flavanonols*, *isoflavones*, *isoflavanones*, *chalcones*, *aurones* et *anthocyanes* [Harborne et Williams, 2000 ; Kuresh et al., 2002].

Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire [Julies et Christin, 2002].

Les flavonoïdes se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme d'hétérosides qui résultent de la combinaison du groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique : l'*aglycone* ou la *génine*, avec élimination d'eau. La partie osidique peut être mono-, di- ou trisaccharidique. La partie glycarique est formée soit d'hexoses (D-glucose , D-galactose , D-allose ...) ou de pentoses (D-apiose , L-arabinose , L-ramnose ...) ou avec des acides (D-glucuronique , D-galacturonique ...). La partie osidique peut être linéaire ou ramifiée [Gerhard, 1993].

La liaison GENINE-OSE existe entre un hydroxyle phénolique ou d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné et un -OH ou un -CH de la fonction hémiacétalique du ou des ose(s). On obtient alors des O-HETEROSIDES ou des C-HETEROSIDES (figure 10), [Milane, 2004].

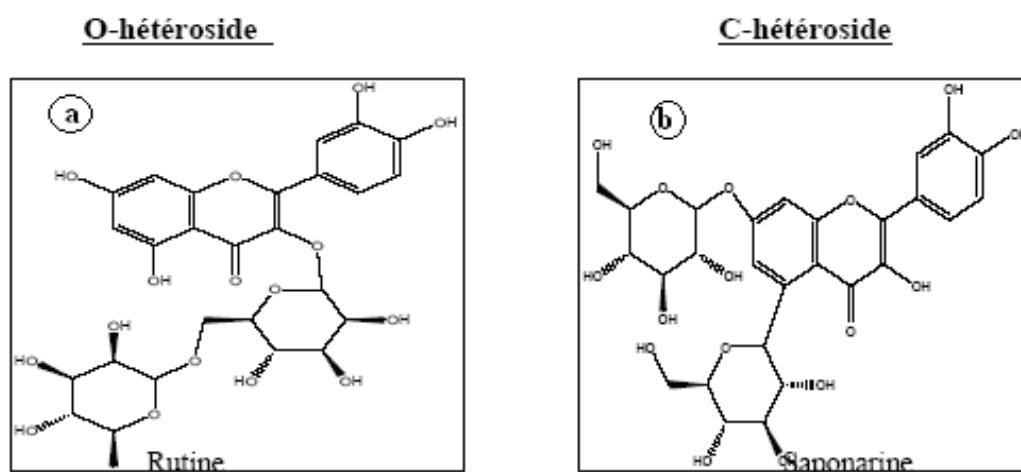


Figure 10 : Structure chimique deux flavonoïdes : **a** : la rutine ; **b** : la saponarine

- Il existe différentes génines :

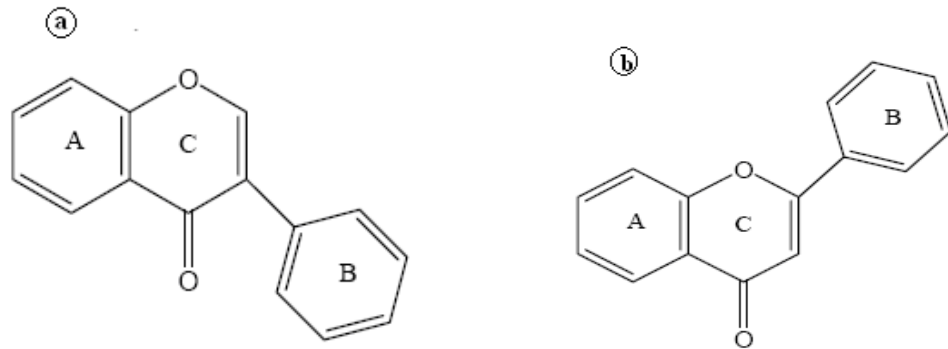


Figure 11 : Exemple de deux structures de flavonoïdes : a : flavone ; b : isoflavone.

2.3. Pharmacocinétique des flavonoïdes

2.3.1. Biodisponibilité

Les études de Vanessa et al. (2003) montrent que cette biodisponibilité dépend de trois facteurs essentiels : La capacité de transport à travers la bordure en brosse des anthérocytes, l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et de la capacité de la sécrétion biliaire. Les flavonoïdes présentent une faible biodisponibilité avec une élimination lente qui diffère d'un flavonoïde à l'autre. En prenant comme exemple, la quercétine, le principal flavonoïde consommé par l'homme dans ses aliments (persil, oignon, myrtilles, cerises) [Remesy et al., 1996], après 174 min, un temps de demi-vie d'absorption de 52 min, de distribution de 228 min et d'élimination de 1008 min [Elicoh-Middeleton et al., 2000]. In vitro, le pouvoir antioxydant de nombreux flavonoïdes est supérieur à celui de la vitamine C et de la vitamine E [Elicoh-Middeleton et al., 2000].

2.3.2. Absorption intestinale et métabolisme

Les *flavonoïdes* sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes. Cette particularité va leur conférer des métabolismes différents. Les formes libres (aglycones) peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle [Hollman et al., 1997 ; Hollman and Katan, 1998] tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées, sous l'influence des glycosidases, par la flore intestinale au niveau du côlon avant d'être absorbées [Manach et al.,

1995 ; Manach et al., 2004]. Cependant les formes libres issues de cette hydrolyse peuvent également être dégradées par la microflore en acide phénolique, lui même absorbé ou éliminé via les fèces [Williams et al., 2004].

Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie [Haslam, 1998]. Les métabolites, glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale [Haslam, 1998]). En effet, les flavonoïdes sont transformés, dans l'entérocyte, en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation [Crespy et al., 2004]. Une partie de ces flavonoïdes est déversée dans le sang tandis qu'une autre est destinée vers la lumière intestinale ce qui constitue l'un des mécanismes de contrôle de l'absorption intestinale de ces substances phénoliques [Gee et al., 2000 ; Crespy et al., 2004].

Dans le sang, les *flavonoïdes* ne sont pas présents sous leur forme native car ils ont été transformés, à cause de leur transformation au niveau du foie et de la cellule intestinale. La fraction des *flavonoïdes* conjugués destinée finalement vers les tissus pourrait avoir un effet biologique potentiel ou serait éliminée dans les urines. Cependant, d'autres flavonoïdes conjugués pourraient être déversés dans l'intestin via la bile et y être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale libérant ainsi de nouveaux aglycones en constituant probablement un recyclage entérohépatique des flavonoïdes qui permet le maintien d'une concentration non négligeable dans le sang [Manach et al., 1995 ; Rechner et al., 2000].

2.4. Propriétés pharmacologique des flavonoïdes

2.4.1. Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [Da Silva et al., 1994 ; Galati et al., 1994 ; Middleton, 1996]. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T [Mookerjee et al., 1986 ; Namgoong et al., 1994]. Leur effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine

est active sur les lymphocytes B [Mookerjee et al., 1986]. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) [Mookerjee et al., 1986 ; Namgoong et al., 1994]. Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes [Middleton and Drzewiecki, 1984]. La quercétine a un effet anti inflammatoire en inhibant les enzymes de synthèse [la cyclo-oxygénase (pour les postaglandines) et la li-oxygénase (pour les leucotriènes) des principaux médiateurs de l'inflammation [Middleton and Drzewiecki, 1984].

2.4.2. Propriétés antivirales et antibiotiques

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale de cellules en culture. Une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral [Milane, 2004]:

- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte,
- au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales,
- au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales permettant ainsi une bonne protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours [Vrijssen et al., 1987]. D'autres chercheurs [Muecsi and Pragai, 1985] ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées.

Les travaux de Spedding et al. (1989) ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ils ont démontré que les flavonoïdes sont de bons inhibiteurs de la reverse transcriptase. Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la reverse transcriptase virale [Ono et al., 1990a ; Ono et al., 1990b]. Certains travaux de recherche [Mahmood et al., 1993] ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV (la gpl20), en empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte. Enfin, les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1 qui assure l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte [Mahmood et al., 1993 ; Fesen et al., 1994].

Des études [Ohemeng et al., 1993 ; Sato et al., 1995] ont apporté l'évidence de l'effet bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase d'une bactérie *staphylococcus aureus*. Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer: L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes ; la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer ; l'inhibition du métabolisme microbien [Mila and Scalbert, 1994].

2.4.3. Propriétés antinéoplasiques

Des études réalisées chez la souris ont mis en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs de tumeurs [Kato et al., 1983]. La quercétine, par exemple, est l'un de ces phénoliques capables de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz(a)anthracène) ou la NMU (Nnitrosométhylurée) [Verma et al., 1988].

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques notamment en stimulant les systèmes de détoxification [Wattenberg Lee, 1983 ; Bu-Abbas et al., 1995]. En donnant à des rats ou à des souris une alimentation contenant de la flavone ou de la quercétine, des chercheurs [Nijhoff et al., 1995] ont observé des effets chimiopréventifs à divers niveaux en particulier au niveau du foie par une stimulation de la glutathion-S-transférase. Enfin, les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes [Obermeier et al., 1995 ; Lasker et al., 1984].

2.4.4. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes

Les polyphénols et surtout les flavonoides sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules [Van Acker et al., 1995]. En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique, puisqu'ils la préviennent comme l' α -tocophérol. Ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives [Laughton et al., 1989 ; Puppo,1992]. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que cuivre et fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss [Puppo,

1992 ; Van Acker et al., 1995]. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL [Laughton et al., 1989 ; De Whalley et al., 1990].

2.4.5. Propriétés prooxydantes des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes mais ils sont susceptibles d'avoir un effet prooxydant [Kessler et al., 2002]. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène [Laughton et al., 1989 ; Yen et al., 1997]. L'activité prooxydante de ces substances est le résultat de leur capacité à réduire les métaux comme le Fe^{+3} pour donner Fe^{+2} lequel réagira avec O_2 ou H_2O_2 avec génération d'initiateurs de l'oxydation [Kessler et al., 2002]. En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro* [Yen et al., 1997 ; Kessler et al., 2002]. Cependant, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes.

2.5. Distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes se répartissent dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique), et parfois dans les racines [Milane, 2004]. Au niveau cellulaire, les flavonoïdes de type hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux [Bruneton, 1993]. Chez les angiospermes la diversité structurale des flavonoïdes est maximale avec une trentaine de flavonoïdes identifiés chez les *Astéracées* [Bruneton, 1993 ; Milane, 2004]. En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Le tableau 2 illustre la répartition des 4-oxo-flavonoïdes dans quelques fruits et légumes.

Tableau 2 : Teneur en flavonoïdes dans quelques fruits et légumes [Remesy et al., 1996].

Fruits et légumes	mg/kg poids	Aglycones
Pamplemousse	2700/6000	Hespérétine
Orange	1700/2800	Naringénine
Persil	500	Apigénine
Laitue	320	Quercétine
Oignon	300	Quercétine + Kaempférol
Endives	290	Kaempférol
Myrtilles cultivées	165	Quercétine
Chou frisé	150	Quercétine + Kaempférol
Ciboulette	110	Quercétine + Kaempférol
Chou frisé (serré)	105	Quercétine + Kaempférol
Poireau	100	Quercétine + Kaempférol
Céleri	100	Apigénine + Lutéoline
Cerises aigres	100	Quercétine + Kaempférol
Cassis	80	Quercétine + Kaempférol
Haricots verts	70	Quercétine + Kaempférol
Choux de Bruxelles	65	Quercétine + Kaempférol
Raisins	50/100	Quercétine + Kaempférol
Abricots	55	Quercétine
Mûres	50	Quercétine + Kaempférol
Brocolis	35	Quercétine + Kaempférol
Pommes	30	Quercétine
Groseilles	30	Quercétine + Kaempférol
Framboises	30	Quercétine + Kaempférol
Prunes	30	Quercétine + Kaempférol
Cerises douces	12	Quercétine + Kaempférol

2.6. La plante *Ranunculus repens* L (RRL)

2.6.1. Systématique de la plante

La plante RRL est une espèce vivace herbacée, généralement duveteuse à longs stolons rampants, les feuilles triangulaires ont trois dentés, celui du milieu étant pétiolé. Les fleurs ont cinq pétales jaunes, cinq sépales dressés et beaucoup d'étamines. Le réceptacle porte de nombreux carpelles qui, à maturité, donnent des akènes à bec grêle [Gerard and Camille, 2003], (Figure 12).

ü **Systématique** [Gerard and Camille, 2003 ; Pierre, 2003]:

- ▼ Phylum: *Dictotylédone*.
- ▼ Famille : *Ranunculaceae*.
- ▼ Ordre : *Ranale* ou polycarpique.
- ▼ Genre: *Ranunculus*.
- ▼ Espèce: *Ranunculus repens* L.
- ▼ Nom Arabe: Mergheris (El-houdane).
- ▼ Nom commun : Ranunculus rampante.

2.6.2. Biologie de *Ranunculus repens* L

La *Ranunculus repens* L est une herbe rampante avec des racines fibreuse, elle est commune dans les pâturages, champs et dans les zones humides aux climats tempérés. Elle produit de nouvelles plantes ou clones qui se développe à travers les stolons qui poussent dans les aisselles des feuilles (Figure 12). Au printemps des stolons latéraux sont produits dans les feuilles et la production de stolons continue jusqu'à la fin de l'été. Une à deux stolons par plante sont communes mais il y a des plantes qui peuvent avoir jusqu'à cinq ainsi que des branches secondaires [Holm et al., 1997]. En automne, quand les rameaux sont établis le stolon devient pâle et meurt laissant des rosettes physiologiquement indépendantes se développer et deviennent des fleurs. La saison prochaine pendant que la plante originale pâlit et meurt, la nouvelle plante peut persister durant l'hiver comme une petite rosette. Le court caudex stocke les matières nutritives qui permettent l'accélération de la croissance en printemps (entre Avril et Juin) [Holm et al., 1997 ; Sarukhan, 1976]. Une enquête a révélée que chaque fleur produisait une vingtaine de graines. En général, la saison de fleurs est entre

Avril à Juillet [Alex, 2001]. Cette floraison est suivie de fruits en deux semaines. La *Ranunculus repens* est résistante à la gelée et survit à la sécheresse modérée [Holm et al., 1997].



Figure 12: La plante *Ranunculus repens* L dans son milieu systématique (Chekfa, Jijel, Est Algérie).

1.6.3. Ethnopharmacologie de la *Ranunculus repens* L

Ranunculus repens L est une plante appartient à la famille *Ranunculaceae*, communément appelée EL-Faiha (Berbère). Dans la médecine traditionnelle, les feuilles séchées sont utilisée sous forme d'infusion pour traiter le diabète sucré et la jaunisse en petite Kabylie (Est d'Algérie). Selon les résultats d'une étude non publiées, cette plante parait riche en composés polyphénoliques et contient une teneur importante en flavonoïdes. La consultation de la littérature scientifique ne montre aucune recherche phytopharmacologique sur cette plante [Holm et al., 1997 ; Sarukhan, 1976 ; Alex, 2001].

3. Matériel et méthodes

3.1 Préparation des extraits phénoliques

Les jeunes pousses de feuilles de *Ranunculus repens* L ont été récoltées au mois d' avril 2004 dans la région de Chekfa (Wilaya de Jijel, Est Algérie) au cours de la période de floraison. Après leur identification par le Laboratoire de phytopharmacologie, Université de Jijel, les échantillons de feuilles sont nettoyés puis mis à sécher à température ambiante dans un endroit aéré à l'ombre pour mieux conserver les molécules sensibles à la chaleur et à la lumière. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction des flavonoïdes.

3.1.1. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon la méthode de Markham (1982), avec modification inspirée selon la méthode de Bruneton (1993). Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques (Figure 13). Cette méthode comprend deux grandes étapes : la première phase d'extraction se fait avec le méthanol pour solubiliser les flavonoïdes et la deuxième est réalisée avec l'éther diéthylique (extraction des génines libres) et l'acétate d'éthyle (extraction des monoglycosides) et le n-butanol(pour solubiliser les di et les triglycosides).

L'extraction des flavonoïdes est effectuée à partir de la matière sèche finement broyée par du méthanol 85% (10% W/v). Le macérât est filtré sur Büchner sous pression réduite puis soumis à une évaporation à basse pression à 35°C (Rota Vapor, Büchi 461, Germany). La phase aqueuse ainsi obtenue est conservée 48 heures à 40°C pour accélérer la diffusion des molécules dans les solvants puis filtrée. Le filtrat est débarrassé des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole (v/v) pour donner une phase aqueuse. Afin de séparer les flavonoïdes en fractions aglycones, monoglycosides et di et triglycosides, la phase aqueuse est mélangée avec l'éther diéthylique (v/v) pour obtenir une phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés. La phase aqueuse restante subit à son tour trois extractions avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certains flavonoïdes aglycones mais surtout les monoglycosides. La

phase aqueuse restante est mélangée avec le *n*-butanol pour récupérer notamment les flavonoïdes di et triglycosides. La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires. Les quatre fractions récoltées sont concentrées par évaporation à basse pression à 35°C puis lyophilisées pendant 24 heures (ALPHA 1-2 LD, Fisher Bioblock). La lyophilisation permet d'obtenir un produit facilement soluble dans l'eau et qui, après addition d'eau, présente les mêmes caractéristiques que le produit d'origine. Chaque Lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction, exprimé en gramme de lyophilisat par 100 g de matière sèche.

3.1.2. Dosage des polyphénols

L'évaluation des polyphénols totaux est réalisée selon la méthode du bleu de Prusse de Price et Butler, 1977 [Butler, 1989], modifiée par Graham (1992) pour donner une meilleur stabilité de la couleur. La différence entre la méthode originale et la méthode modifiée réside dans l'utilisation du FeCl_3 à la place du $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ comme second réactif.

Une prise d'essai de 0.1 ml de méthanol (contenant 0.02 mg de l'extrait *n*-butanolique, 0.02 mg de l'extrait d'acétate d'éthyle, 0.06 mg de l'extrait d'éther éthylique ou 0.04 mg de l'extrait aqueux) est mélangée avec 3 ml d'eau distillée. 15 min après l'addition successive de 1 ml de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.016 M et de 1 ml de FeCl_3 (0.02 M dans HCl 0.1 N), 5 ml de stabilisant (mélange d'eau bi distillée, de l'acide phosphorique 85 % et de la gomme arabique 1% (dans les proportions 3 :1 :1 v/v/v) sont ajoutés et l'absorbance est lue à 700 nm (Shimadzu UV 1601, Japan).

Une gamme étalon est établie séparément avec l'acide gallique (25-200 µg/ml) (figure 1, Annexe 1) pour calculer la concentration des polyphénols dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de lyophilisat

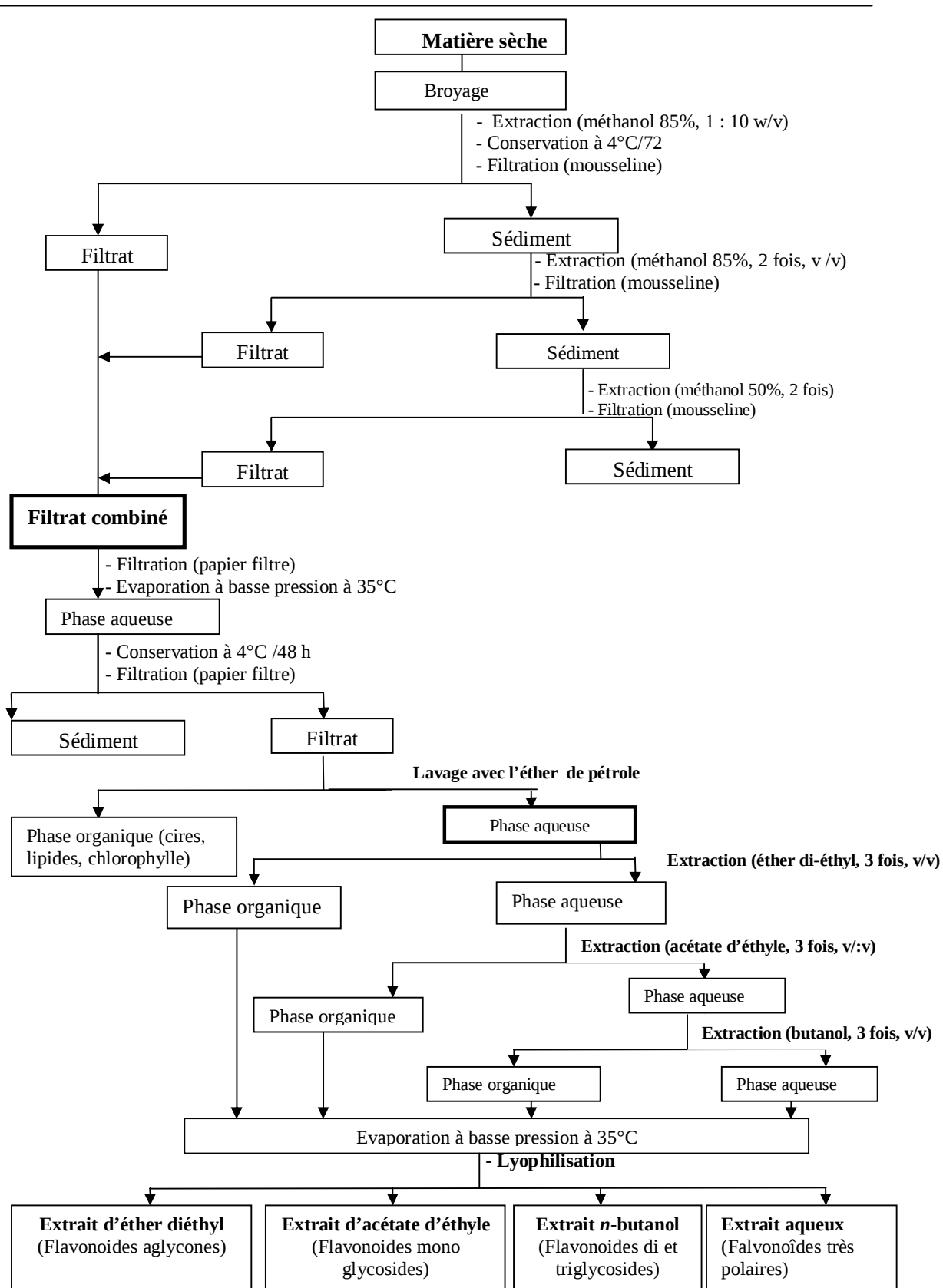


Figure 13 : Protocole de fractionnement des flavonoïdes de RRL

3.1.3 Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les différentes fractions est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium [Bahorun et al., 1996]. Brièvement, les échantillons sont préparés par la dissolution des lyophilisats obtenus lors de l'extraction dans le méthanol : extrait d'éther diéthylique 0.14 mg/ml ; extrait d'acétate d'éthyle 0.06 mg /ml ; extrait de n-butanol 0.02 mg/ml ; extrait aqueux 0.2 mg/ml. A 1 ml de chaque échantillon est ajouté 1ml de L'AlCl₃ 2% dans le méthanol. Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (1-25 µg/ml) (figure 2, *Aannexe 1*) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de lyophilisat.

3.1.4. Evaluation du pouvoir oxydant des flavonoides

La capacité antiradicalaire des flavonoïdes di et triglycosydes (EB) est évaluée *in vitro* par la méthode de DPPH° (2, 2 - Diphenyl-1-picrylhydrazyl) rapporté par Wahllandir et al. (1979). Brièvement, 15µl de différentes concentrations de flavonoïdes 0.1, 0.2 et 0.4 mg/ml, (0.158, 0.079 et 0.039 mg d'équivalent en quercétine (en considérant leur pourcentage dans le lyophilisat), sont ajoutés à 1.5 ml de DPPH° dans une solution éthanol (100µM). Un tube standard est préparé avec la vitamine C (0.158 mg/ml). L'absorbance est lue chaque 30 s durant 5 min à 515 nm. L'effet éboueur des flavonoïdes est exprimé en pourcentage de DPPH° réduit en partant du 100% du témoin (DPPH° seul) selon la relation suivante:

$$\% \text{ de réduction} = [A_T - A_E/A_T].100$$

A_T: Absorbance du témoin après 5min.

A_E: Absorbance de l'essai après 5 min.

3.2. Expérimentation animale

3.2.1. Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux d'expérience sont des rats males de variété *Wistar* (Institut Pasteur, Alger) pesant entre 220-250 g. Tous les animaux de statut sanitaire EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques).

Dès leur réception, les rats sont placés aléatoirement en groupe de 6 dans des cages standard pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans les différentes expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréat, Alger) et sont maintenus dans une animalerie à température constante (22 ± 2) °C soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. La phase obscure de ce cycle commence à 12h et les différentes expériences ont toujours lieu de 13h à 18h en raison de l'activité nocturne de l'animal (phase active).

3.2.2. Recherche de la toxicité des flavonoïdes de RRL

La DL_{50} des extraits flavonoïdiques de *Ranunculus repens* L n'est pas connue dans la littérature consultée ainsi la recherche d'une éventuelle toxicité de la plante est nécessaire. Pour ce faire, l'extrait butanolique de RRL aux doses de : 25, 250, 500, 1000, 2000 mg/kg dans une solution physiologique (Na Cl 0.9%) sont administrés par voie orale aux cinq groupes de rats et la solution physiologique au sixième groupe servant de contrôle. Les rats sont mis à l'observation continue durant 72h concernant les symptômes de toxicité, le changement de comportement et la mortalité [Litchfield and Wilcoxon, 1949].

3.2.3. Test de tolérance au glucose

Le pouvoir hypoglycémiant est mesuré afin de déterminer la dose la plus efficace des différents extraits flavonoïdiques de RRL (extrait d'éther diéthylique, extrait d'acétate d'éthyle, extrait n-butanolique). Les trois extraits sont mis en suspension dans une solution de sérum physiologique (Na Cl 0.9%) puis administrés à des rats par voie orale (100 mg de lyophilisat/ kg) une heure avant le gavage gastrique d'une solution de glucose à la dose de 4 g/kg. Les animaux témoins sont répartis en groupe témoin recevant une solution

physiologique, un groupe hyperglycémique recevant une solution de glucose (4 g/ kg) et un troisième groupe standard recevant la glibenclamide (médicament hypoglycémiant) à la dose de 2.5 mg/kg [Silva et al., 2002] une heure avant l'administration du glucose par voie orale. L'évolution de la glycémie est suivie avant et chaque demi heure sur une durée de 2 heures de traitement. Le dosage de glucose sérique est réalisé par une méthode colorimétrique utilisant des Kits (Biomérieux, France) sur un automate multiparamétrique (TECHNICON, Germany). Le pourcentage de la chute de la glycémie (PCG), est utilisé comme index de l'activité hypoglycémique des flavonoïdes [Puri, 2001].

3.2.4. Evaluation de l'effet des flavonoïdes sur le stockage de glycogène hépatique et l'insulinosécrétion

3.2.4.1. Evaluation du stockage de glycogène hépatique

L'évaluation du taux de la teneur hépatique en glycogène chez les rats hyperglycémiques est réalisé selon le protocole suivant : 2 groupes de rats sont préparés : le premier sert de contrôle, reçoit une solution de glucose à la dose de 4g/kg dans une solution physiologique par voie orale ; le second constitue le lot traité par les flavonoïdes à la dose de 100 mg/kg, par voie orale, après une heure d'administration du glucose 4g/kg dans une solution physiologique. 3 heures l'effet des flavonoïdes, Les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale et subissent une dissection abdominale. Les foies sont prélevés et fixés dans le Bouin (formol/ acide picrique/ acide acétique).

L'évaluation de glycogène est réalisée par deux méthodes différentes, une méthode colorimétrique et une méthode histochimique [Dedier, 1994] :

- **Méthode colorimétrique**

5 grammes de foie frais sont coupés en petits morceaux et bouillis ensuite dans 50 ml d'eau distillée pendant 2 minutes. Les fragments de foie sont égouttés à l'aide d'une passoire et broyés avec le mortier. 25 ml d'eau distillée sont ajoutés au broyat et la suspension obtenue est bouillie pendant 5 minutes. Le bouillon est filtré sous vide sur Büchner puis le filtrat est récupéré avec 3 gouttes d'HCl (pour précipiter les protéines) et est filtré à nouveau. Le filtrat est traité par 4 fois son volume d'alcool 95% puis filtré sous vide et le filtrat final est repris avec 2 ml d'eau distillée (figure 14).

Pour doser le glycogène, 3 ml d'eau distillée et une goutte de Lugol sont ajoutés à 1 ml d'extrait de glycogène obtenu et la densité optique de la coloration brun acajou est lue à 470 nm [Dedier, 1994].

La concentration de glycogène est déduite à partir d'une gamme étalon établie avec du glycogène pure comme standard figure 1, (*Annexe1*,).

- **Méthode Histochimique**

- **Préparation des blocs:** Après fixation dans le Bouin (on réalise une dissection de l'abdomen afin d'extraire le foie. Le foie est bien lavé et puis conservé dans un fixateur [solution du Bouin (formol / acide picrique / acide acétique)].

Les fragments des foies sont déshydratés par submersion dans des bains d'éthanol à des concentrations allant en ordre croissant : 60 %, 70% ,80%, et 100%.

Après déshydratation par l'éthanol, les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondue. Le xylène occupe la place de l'eau et donc facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. La durée de chaque bain est de 24 heures. Les échantillons des foies sont placés dans des moules (barres de Leucart) et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la coupe.

- **Réalisation des coupes et coloration :** les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 3µm d'épaisseur. A l'aide d'une pince très fine, les coupes sont placées sur des lames couvertes de gélatine qui sont ensuite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure.

Pour mettre en évidence les hépatocytes, les coupes sont d'abord réhydratées par submersion successivement dans les bains suivants : 2 bains de toluène (30 min), 5 bains d'éthanol à des concentrations décroissantes : 100%, 90%, 80%,70%, 60% (5 min chacun). Après rinçage dans de l'eau distillée, les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline (8 min) pour colorer les noyaux, l'excès de colorant est enlevé par l'acide chlorhydrique. Elles sont mises ensuite dans un bain d'éosine (8 min) pour colorer le cytoplasme, l'excès de colorant est enlevé par l'éthanol.

Pour mettre en évidence les granules de glycogène hépatique, les lames ayant subi la coloration de base, sont submergées dans un bain de Lugol (l'eau iodé) pendant 15 min puis dans un bain d'éthanol pour éliminer l'excès du réactif. Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et prêtent à l'observation microscopique (objectif x 100).

Pour éviter les interférences de couleurs, une deuxième coloration de base est faite ensuite par le bleu de méthylène qui remplace l'hématoxyline et l'éosine dont le but est d'améliorer l'observation des coupes et les granules de glycogènes.

3.2.4.2. Evaluation de l'effet des flavonoïdes sur l'insulinosécrétion

Pour évaluer l'effet de l'extrait butanolique sur la sécrétion insulinique, un groupe de rats normoglycémique est traité par une monoprise de flavonoïdes (EB) à la dose de 100 mg/kg. Deux autres groupes témoin et standard reçoivent respectivement de la solution physiologique et de glibenclamide (2,5 mg/kg). L'insulinémie est mesurée avant gavage et après 60 et 90 min par une méthode immuno-enzymatique de type ELISA [Monti et al., 1995], (AxSYM Insulin reagent pack, Abbott Laboratory, USA). Ce dosage est effectué sur le sérum, après centrifugation en évitant l'hémolyse qui gêne le dosage immuno-enzymatique et dans les plus brefs délais afin d'éviter la destruction de l'hormone par les insulinasés plasmatiques.

3.2.4.3. Effet des flavonoïdes sur la complexation du glucose *in vitro* : Test de glycosylation

Le but de ce test est d'estimer la capacité des flavonoïdes à complexer le glucose libre *in vitro*, donc démontrer leur rôle de "glucophage". Bien que les conditions *in vivo* et *in vitro* soient différentes, ce test pourra nous renseigner sur un des mécanismes hypoglycémisants des flavonoïdes. Pour cela, 10 µl d'une solution glucosée (0.61g/l) est mélangé avec 10 µl de chaque extrait flavonoïdique (Aglycones, monoglycosides, di et triglycosides) à différentes concentrations : 1 mg, 2mg et 4 mg/ml. Le témoin est constitué par 10µl d'eau distillée. Le mélange ainsi obtenu est incubé à 37°C pendant 15 min. Le dosage de glucose non lié aux extraits flavonoïques est mesuré selon la méthode de Bertrand précédemment décrite.

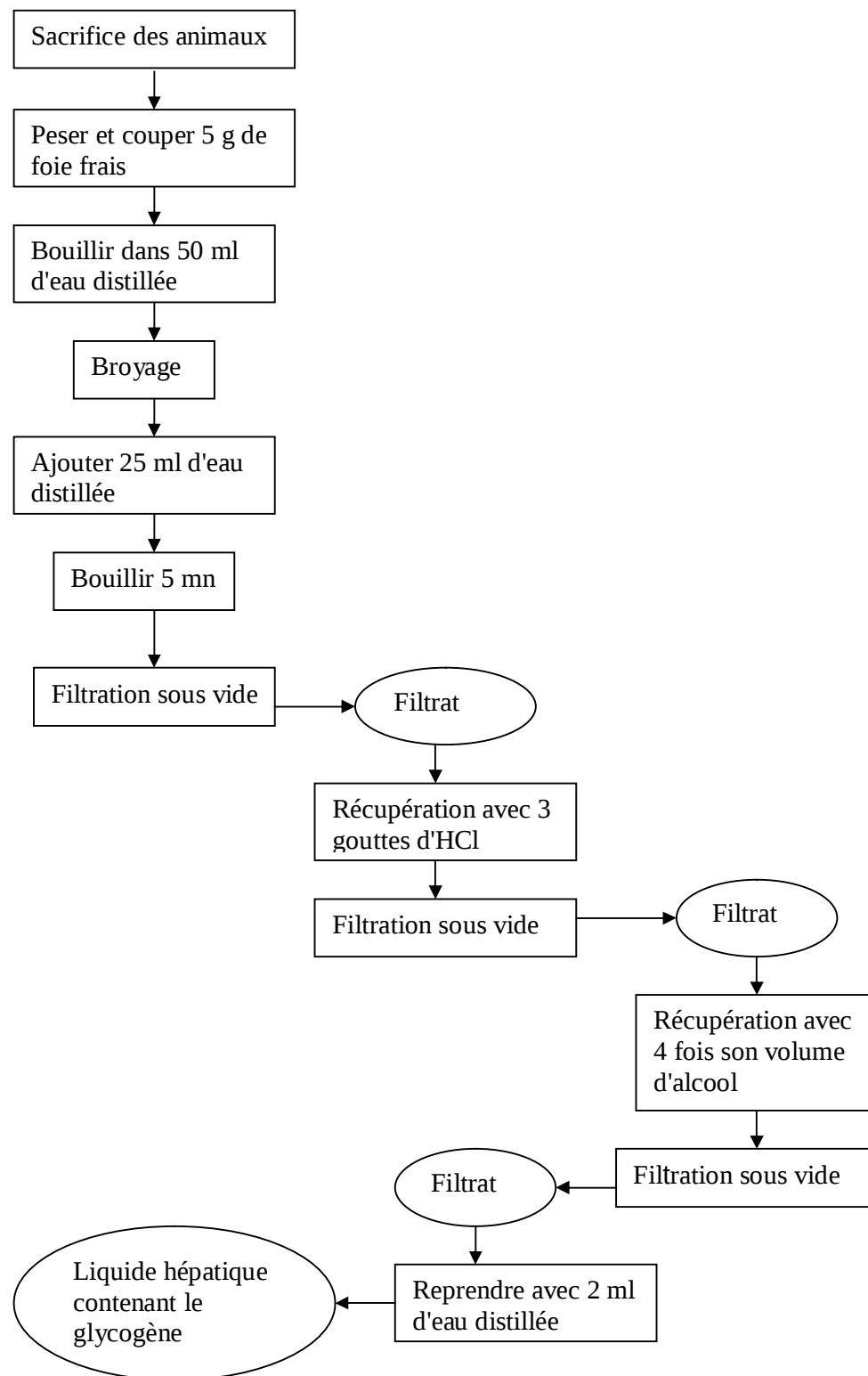


Figure 14 : Protocole d'extraction du glycogène hépatique

3.2.5. Evaluation de l'activité antidiabétique des composés phénoliques

3.2.5.1 Induction de diabète expérimental

Pour évaluer l'activité antidiabétique des flavonoïdes, un modèle de rat diabétique induit par l'alloxane est réalisé. L'injection de l'alloxane par voie intra péritonéale (125 mg/Kg de poids) déclenche un diabète chez le rat [Diatewa et al., 2004], sachant que l'alloxane monohydrate est inducteur de diabète qui provoque une nécrose sélective sur les cellules bêta du pancréas donnant ainsi une déficience insulinaire chronique [Dhanabal et al., 2007].

L'alloxane monohydrate (Pharmacia, St.Quentin en Yvelines, France), reconstitué juste avant l'administration dans une solution physiologique (Na Cl 0.9%) pour constituer la concentration décrite précédemment pour être injecté au rat une semaine après l'injection, une évaluation de glucose sanguin est effectuée et les rats dont le glucose sanguin est supérieur à 2 g/l sont considérés diabétiques et répartis aléatoirement en groupe de 5.

3.2.5.2. Effet aigu de l'extrait butanolique sur les rats diabétiques

Le test de tolérance au glucose montre une meilleure amélioration de la tolérance des animaux au glucose avec l'extrait n-butanolique, (EB) (di et triglycosides)

Afin d'évaluer l'effet antidiabétique de l'extrait n-butanolique, 5 groupes de 5 rats sont utilisés: le groupe 1, contrôle diabétique recevant 1 ml d'une solution physiologique (Na Cl 0.9%) par voie orale ; les groupes 2, 3 et 4 reçoivent respectivement l'extrait EB de la RRL par voie orale en une seule dose de 200, 400 mg/kg et 600 mg/kg dans une solution physiologique ; le groupe 5, contrôle standard, reçoit la Glibenglamide à la dose de 2,5mg/kg, p.o. La glycémie des animaux est mesurée avant gavage et à 30, 60, 90 et 120 min après le traitement.

3.2.5.3. Effet subchronique de l'extrait butanolique (EB) sur les rats diabétiques

Pour évaluer l'effet antidiabétique de l'extrait butanolique sur les rats diabétique durant 28 jours, trois groupes de rats sont utilisés à cet effet. Un groupe diabétique et un groupe standard reçoivent par gavage respectivement une dose quotidienne de 200 mg/kg de flavonoïdes et de 2,5 mg/kg de glibenclamide ; un groupe témoin diabétique reçoit une solution physiologique (Na Cl 0.9%). La glycémie des animaux est mesurée à J+7, J+14, J+21 et J+28.

3.2.5.4. Le prélèvement du sang

2 ml de sang sur EDTA 8,5 % sont prélevés au besoin à l'aide d'une pipette pasteur à travers le sinus rétro-orbital au niveau de l'œil des rats. Le sang récupéré est immédiatement centrifugé à 4000 t/min pendant 10 minutes à 10°C centrifugeuse (Bioblock Sscientific Centrifugeuse 55702), pour l'analyse des paramètres biochimiques.

3.2.6. Effet préventif des extraits de flavonoïdes et de la quercétine sur le diabète induit par l'alloxane

L'activité antioxydante des flavonoïdes est étudiée *in vivo* 5 heures après l'injection de l'alloxane. Deux groupes prétraités par les flavonoïdes ou la quercétine sont comparés à un groupe témoin. Après le traitement, les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale et les pancréas sont prélevés.

Le 1^{er} groupe reçoit, par voie orale, deux doses de 200 mg de lyophilisat /kg (0.794 mg équivalent de quercétine) avant et après deux heures de l'injection de l'alloxane, le second est traité par la quercétine pure à la même dose (témoin positif) en fin le 3eme groupe (témoin négatif) a reçu la solution physiologique en plus de l'injection de l'alloxane.

La glycémie et l'insulinémie sont mesurées avant et après dix jours de traitement (injection de l'alloxane et/ou de flavonoïdes).

3.2.7. Recherche des mécanismes de prévention des extraits butanoliques de RRL

3.2.7.1. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique dans le pancréas est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode d'Ohkawa et al. (1979)]. Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 530 nm). Le principe de cette méthode est résumé ainsi (figure 15) :

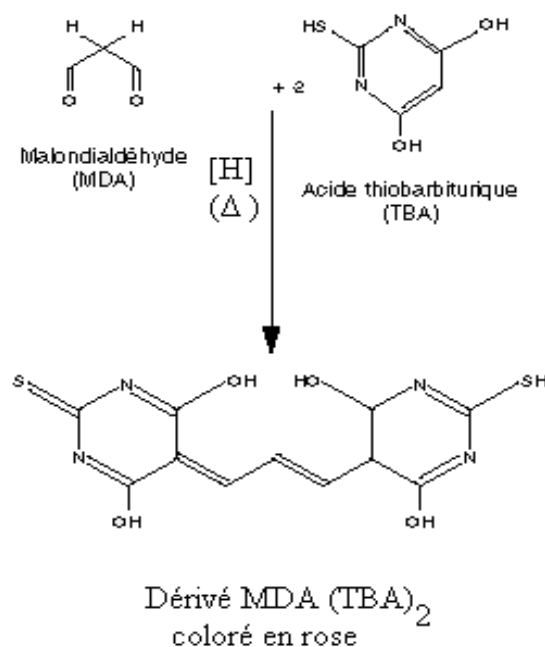


Figure 15: Principe du dosage du malondialdéhyde

Pour le dosage du MDA, 1 g de pancréas est additionné à 3 ml de solution de KCl (1,15 M) puis broyage par un homogénéiseur de Dounce (Kontes, *Glass companyan ISO-9001 steered firm, New Jersey USA*). À 0,5 ml de l'homogénat 0,5 ml d'acide trichloracétique 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/minute, l'absorbance est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre (LKB II) à 532 nm.

La concentration de MDA est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec 1, 1, 3,3 tétraétoxypropane qui donne le MDA après son hydrolyse en solution figure 4, (Annexe1). Les résultats du dosage sont exprimés en nmol/gramme de pancréas.

3.2.7.2. Dosage de glutathion pancréatique (GSH)

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm, selon la réaction suivante (figure 16) :

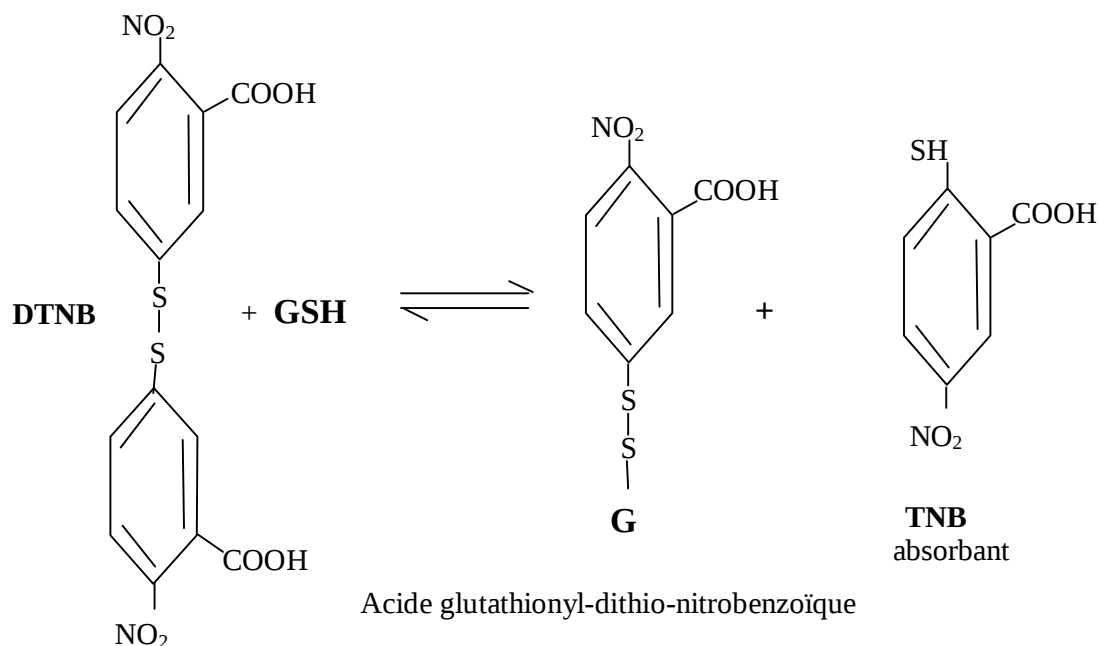


Figure 16 : Principe de dosage du glutathion

Pour ce dosage, un gramme de pancréas (frais ou congelé) est homogénéisé dans trois volumes de TCA 5 % à l'aide d'un broyeur de Dounce puis centrifugé à 2000 rpm. 50 µl de surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 8). À 3 ml du mélange de dilution, 20 µl de DTNB (0,01 M) sont additionnés.

L'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Les concentrations sont exprimées en nmol/gramme de foie. Elles sont déduites à

partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec le glutathion figure 4, (Annexe 1).

3.2.7.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité enzymatique de CAT est déterminée par la méthode de Clairborne (1985). Le principe est basé sur la disparition de l'H₂O₂ en présence de la source enzymatique à 25 C° selon la réaction suivante :



Avant l'évaluation de l'activité enzymatique de CAT, une fraction enzymatique est préparée selon la méthode d'Iqbal et al. (2003) comme suit : 2 g de pancréas sont coupés et homogénéisés dans 3 volumes de tampon phosphate (0.1M, pH 7.4) contenant du KCl (1.17%) par un homogénéisateur de Dounce. L'homogénat est centrifugé à 2000 rpm durant 15 min à 4 °C. Le surnageant obtenu est centrifugé à 9600 rpm durant 30 minutes à 4 °C (Centrifugeuse SIGMA 6k15) et le surnageant final représente la source utilisée pour l'évaluation de l'activité des enzymes (catalase et superoxyde dismutase).

Pour cela, un mélange est constitué de 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄, 0.1 M, pH 7.2), 0.975 ml de H₂O₂ fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml de la source d'enzyme (le cytosol). L'absorbance est lue à 560nm chaque minute pendant 2 minutes et l'activité enzymatique est calculée en terme d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI / min/g de protéine), selon la formule :

$$\text{UI/g} = (2.3033/T) \times (\log A_1/A_2) / \text{g de protéine.}$$

A₁ : Absorbance à la première minute.

A₂ : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

La concentration cytosolique des protéines est évaluée par la méthode de Lowry (1951), dans les mêmes conditions, une gamme étalon est établie en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) avec le réactif phénolique de Folin, figure 6 (annexe1). L'absorbance est lue à 750 nm.

3.2.7.4. Evaluation de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

L'évaluation de la SOD est réalisée sur le cytosol par la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Un mélange est constitué de 2 ml du milieu réactif (Cyanide de Sodium 10^{-2} M, solution de NBT(nitrobleu de tetrazolium) à 1.76×10^{-4} M, EDTA 66 mmol, Methionine 10^{-2} M, Riboflavine 2 μ mol, pH 7.8) et 5 μ L de cytosol. Ce mélange est exposé à la lumière d'une lampe de 15 Watt pendant 10 min pour induire la photoréaction de La riboflavine et de l'O₂. La réduction de NBT par les anions superoxydes en formazan est suivie par le spectrophotomètre à 560 nm. L'activité enzymatique est calculée en termes d'UI/mg de protéines.

3.2.8. Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test *t* de Student. La valeur trouvée par le calcul du *t* peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur *p* tel que :

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative ns ;
- $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative* ;
- $0,05 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative**;
- $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative***.

Le calcul statistique est réalisé par Statview[®] 4.5 statistical package (Abacus Concepts, Int).

3.3. Résultats et interprétation

3.3.1. Extraction et dosage des composés phénoliques

L'extraction des flavonoïdes par la méthode d'affrontement par les solvants organiques à partir de la poudre des jeunes pousses de feuilles de la plante RRL, montre que l'extrait aqueux représente le rendement le plus élevé (20%) suivi de l'extrait butanolique (18%) puis de l'extrait d'acétate d'éthyle (6%). Le rendement le plus faible (1%) est obtenu par l'extrait d'éther éthylique (Tableau. 3).

Tableau 3 : Evaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonïdes des extraits de *Ranunculus repens* L.

Extrait	Rendement moyen (%)	Polyphénols (mg équivalent d'acide gallique/g de lyophilisat)	Flavonoïdes (mg équivalent de quercétine/g de Lyophilisat)
Ether diéthylique	1	60	50
Acétate d'éthyle	6	270	160
Butanol	18	516	397
Eau	20	150	25

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode modifiée de bleu de Prusse montre, en plus de sa sensibilité, une reproductivité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon, $r = 0.96$ (figure 4, *annexe1*).

Les résultats de dosage de polyphénols révèlent que les extraits butanolique/acétate d'éthyle contiennent respectivement 516 mg et 270 mg d'équivalent d'acide gallique/g de lyophilisat. Les extraits aqueux/ d'éther diéthylique en contiennent moins avec des concentrations successives de 150 et 60 mg /g (Tableau 4).

L'évaluation quantitative des flavonoïdes (la quercétine sert de standard) montre une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde (1 à 25 µg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $r = 0.96$ (figure 5, *Annexe 1*).

Les teneurs en flavonoïdes varient dans les mêmes proportions que celle des polyphénols: l'extrait butanolique est plus riche en flavonoïdes (397 mg/g) suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (160 mg/g). Les extraits d'éther diéthylique et aqueux ont une teneur moindre (50 mg/g et 25 mg/g respectivement, (Tableau 3).

2.2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes

L'activité antiradicalaire *in vitro* des flavonoïdes est évaluée par la diminution du taux de DPPH° dosé après l'addition des flavonoïdes à différentes concentrations (figure 17).

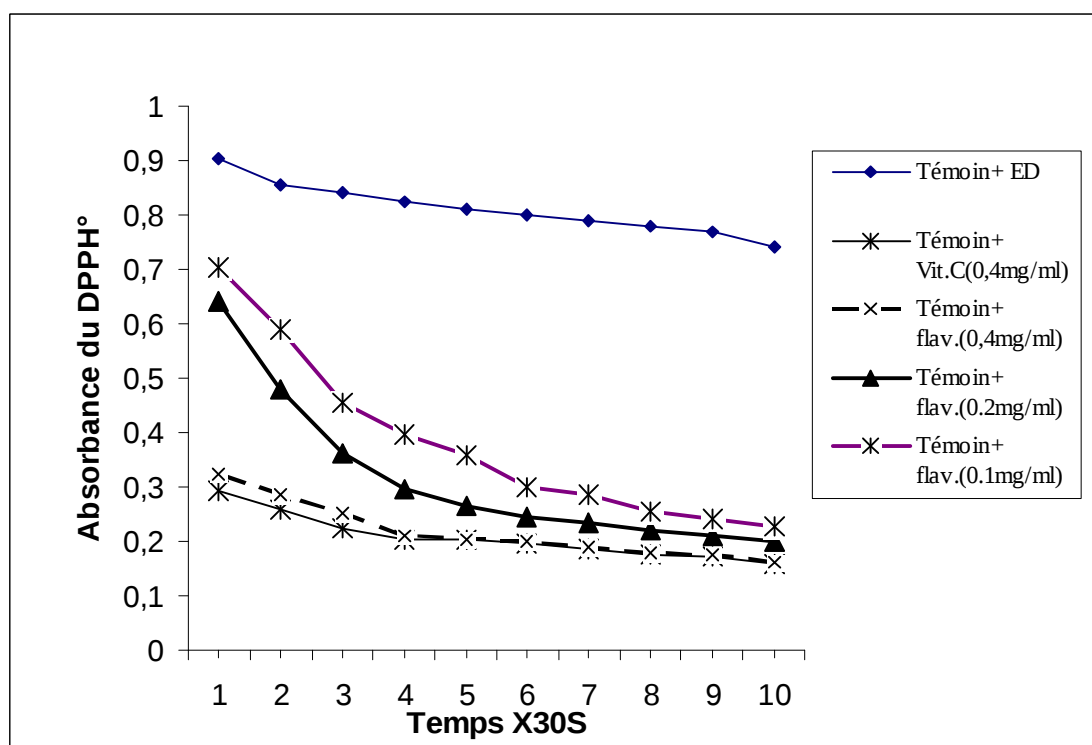


Figure 17: Pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes (moyenne de 3 essais).

La lecture de cette figure, montre que l'effet antiradicalaire des extraits de flavonoïdes est dose dépendant. Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes vis à vis du DPPH°, le plus élevé (78, 24 %) est observé avec une dose de 0.4 mg /ml; pouvoir équivalent à celui qu'exerce la vitamine C (78 ,51%) à la même concentration.

3.3.3. Effet des flavonoïdes sur la tolérance au glucose

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose chez les animaux hyperglycémiques traités par les différents flavonoïdes sont rassemblés dans le tableau 1 (*annexe2*) et illustrés dans la figure 18.

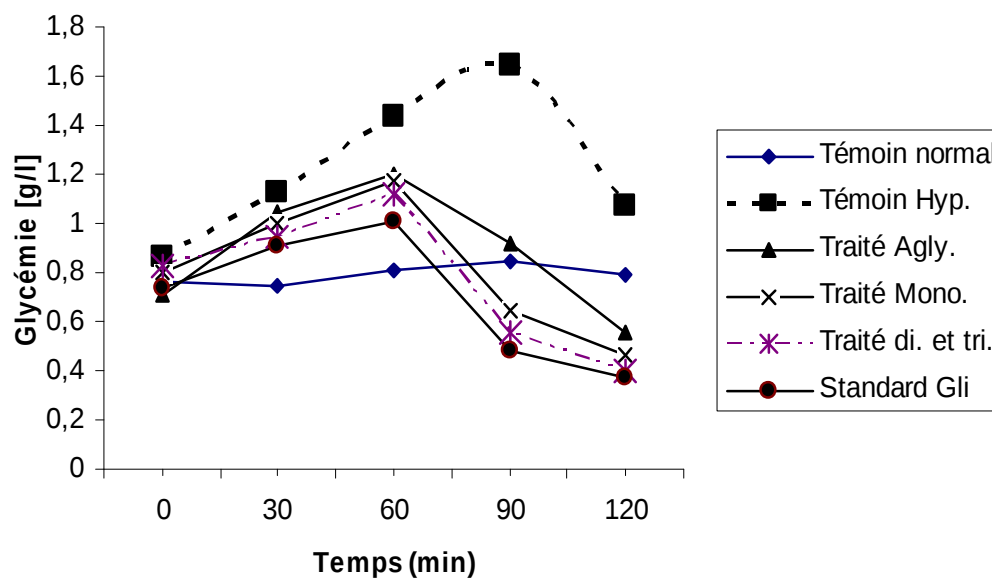


Figure 18 : Evolution de la tolérance au glucose chez les rats hyperglycémiques traités par les différents types de flavonoïdes.

Nous constatons un effet bénéfique des flavonoïdes et de la glibenclamide lorsque les rats sont prétraités par ces substances : l'hyperglycémie est tardive chez cette catégorie de rats prétraités par rapport aux rats non traités (90 min contre 60 min respectivement).

Cet effet est hautement significatif ($p < 0.001$) pour tous les rats traités par les flavonoïdes par rapport au groupe témoin (traitement avec l'eau physiologique à 9‰ de NaCl).

Par ailleurs, on assiste à une réduction de la glycémie après 120 min du gavage relativement au témoin. En effet, les monoglycosides et les di et triglycosides ont réduit la glycémie à 0.46 ± 0.02 g/l et 0.40 ± 0.02 g/l, respectivement d'une manière significative) en comparaison avec les témoins normaux. Un effet équivalent est observé avec le glibenclamide (0.37 ± 0.02 g/l). Le glucose s'est probablement fixé sur les fonctions OH des flavonoïdes pour réduire la teneur en glycémie.

3.3.4. Evaluation du stockage de glycogène hépatique et la glycosylation de glucose *in vitro*

3.3.4.1. Effet des flavonoïdes sur le stockage de glycogène hépatique

- **Méthode biochimique**

L'effet des flavonoïdes sur le stockage de glycogène hépatique est représenté dans le tableau 4.

Tableau 4 : Variation de la quantité du glycogène hépatique stocké en fonction de la dose des flavonoïdes.

Rats	Glycogène (mg /ml)
Groupe Témoin + sol. phys	2.72 ± 0.134
Groupe Aglycones	4.43 ± 0.503 **
Groupe Monoglycosides	4.63 ± 0.107 ***
Groupe di et triglycosides	6.60 ± 0.715 ***
Groupe standard glibenclamide	5.45 ± 0. 436 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type.

*(test de Student: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, groupes comparés au témoin)*

L'analyse du tableau 4 montre que la dose de 100 mg /kg provoque une augmentation très hautement significative de la quantité du glycogène hépatique stocké sous l'effet des glycosides : 4.63 ± 0.503 mg/ml ; 6.60 ± 0.415 mg /ml respectivement pour les mono et di et triglycosides. Un effet est observé avec les aglycones (4.43 ± 0.503 mg /ml contre 2.72 ± 0.134 mg /ml pour le groupe témoin). Par ailleurs, l'analyse de ces résultats montre un effet des flavonoides équivalent à celui de la glibenclamide prise comme standard ($5.45 \pm 0. 436$ mg/ml).

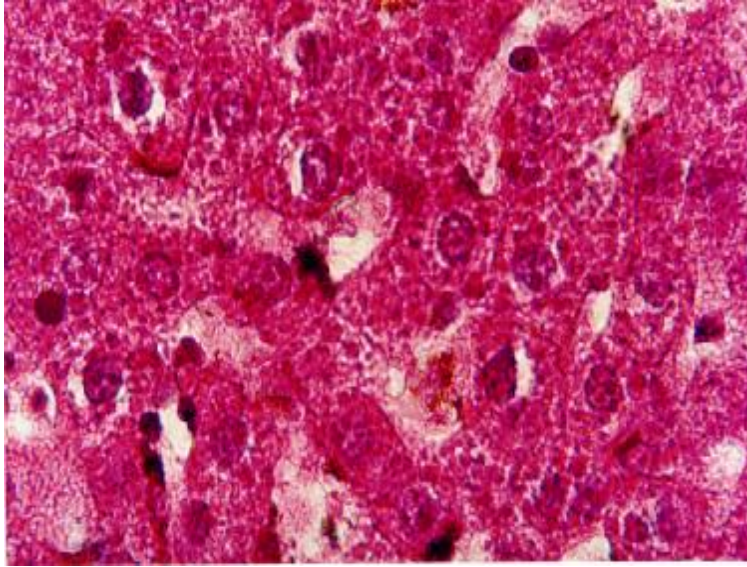


Photo 1 : Tissu hépatique du rat témoin [Coloration par l'hématoxyline +éosine + Lugol. (X100s.

Le cytoplasme des hépatocytes renferme des granules de glycogènes colorés en brun acajou qui se répartissent d'une manière non homogène et moins dense témoignant d'une faible teneur de glycogène hépatique.

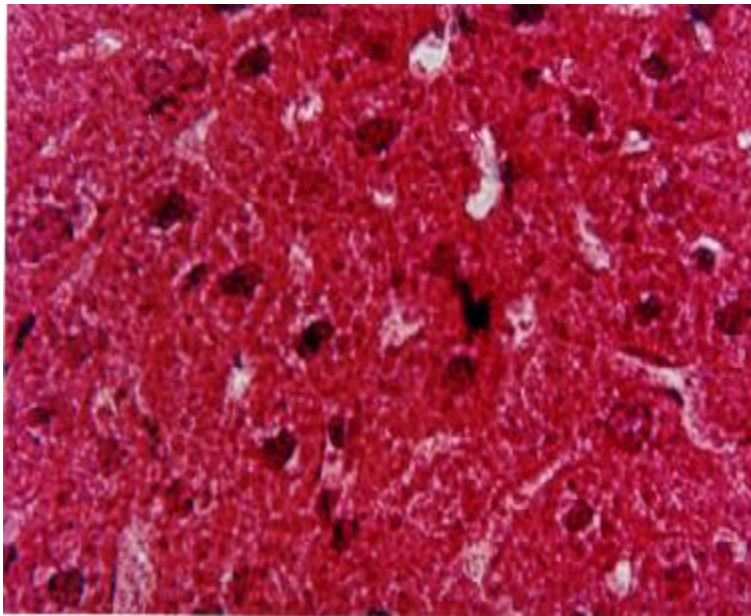


Photo 2 : Tissu hépatique du rat traité par 100mg/kg de di et triglycosides[Coloration par l'hématoxyline + éosine + Lugol .(X100)].

Le brun acajou qui colore le glycogène hépatocytaire se montre plus dense et se répartit d'une manière homogène dans tout le cytoplasme

- **Méthode histochimique**

Le tissu hépatique est formé de lobules de forme polyédrique, au centre des lobules se trouvent la veine centrolobulaire. Les hépatocytes ont une forme polygonale, chaque hépatocyte contient un noyau arrondi, le cytoplasme renferme un réticulum endoplasmique très abondant et des granules de glycogène.

Chez le témoin (photo 1), nous observons un cytoplasme hépatocytaire qui renferme des granules de glycogène de couleur brun-acajou. Ces granules ne sont pas réparties de façon homogène dans tout le cytoplasme. Par contre, le traitement par les di et triglycosides montre un tissu hépatique (photo2) où le glycogène se répartit sous forme d'agrégats de façon plus abondante et diffuse dans tout le cytoplasme à l'exception des espaces périnucléaires par rapport au témoin. Nous notons les mêmes observations chez le tissu du groupe de rats traités par les aglycones et les monoglycosides (photo 2).

La deuxième coloration réalisée avec le bleu de méthylène (photo 3) montre des cellules et des granules de glycogène plus claires par rapport à celle réalisée avec l'hématoxyline et l'éosine (photo 4). Les granules de glycogène hépatique sont très denses dans le foie des rats prétraités par les Flavonoïdes di et triglycosides que celui prélevé sur des rats non traités par ces flavonoïdes (comparez les photo3 et 4).

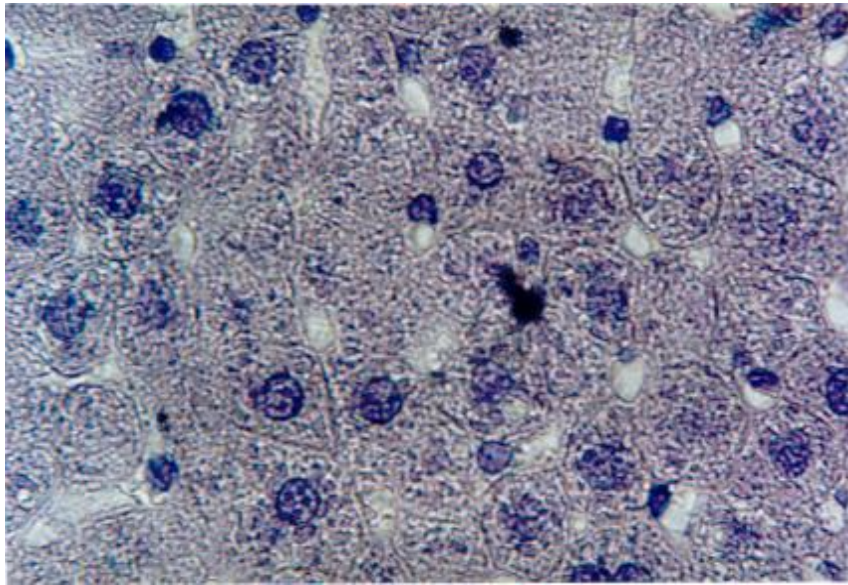


Photo 3 : Tissu hépatique du rat témoin [Coloration par le bleu de méthylène + Lugol (X100)].

Les granules de glycogène hépatique sont moins abondantes et de densité très faible témoignant d'une pauvreté apparente du foie en glycogène.

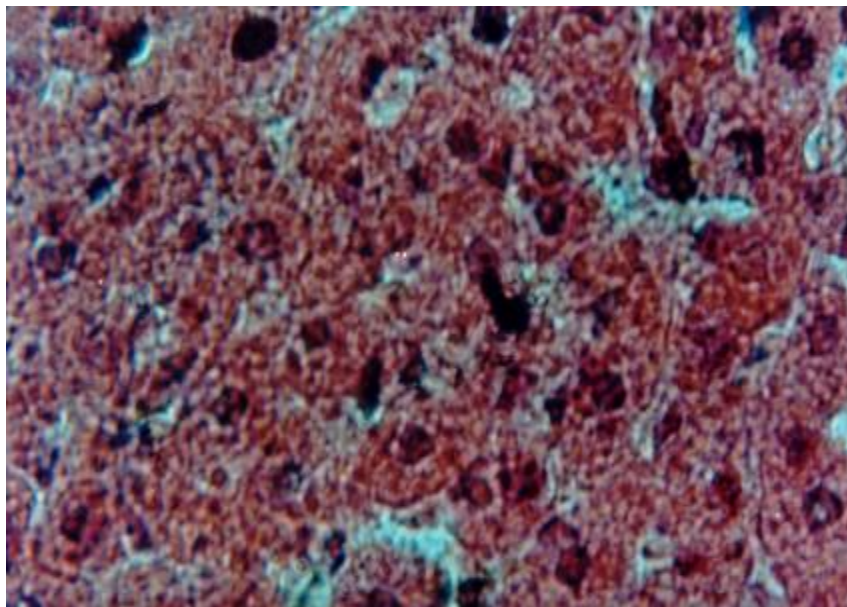


Photo 4 : Tissu hépatique du rat traité par 100mg/kg des di et triglycosides[Coloration par le bleu de méthylène + Lugol (X100)].

Cette coloration réalisée avec le bleu de méthylène plus le Lugol est plus dense et se répartissant d'une manière abondante dans tout le cytoplasme.

3.3.4.2. Effet des flavonoïdes sur l'insulinosécrétion chez les rats

Les résultats de l'effet des flavonoïdes sur la sécrétion insulinique sont regroupés dans le tableau 2 (annexe2) et illustrés par la figure 19.

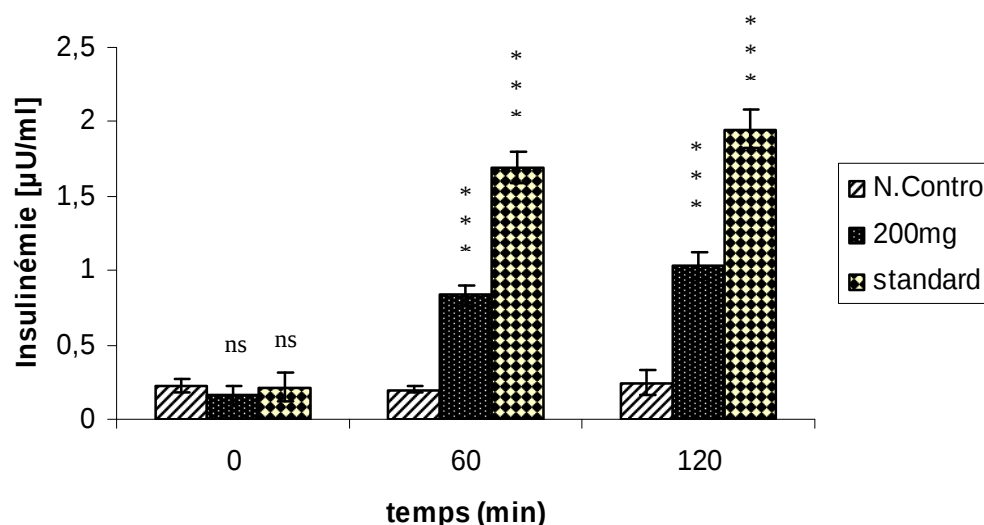


Figure 19 : Variation de l'insulinémie chez les rats normoglycémiques traités par les flavonoïdes (groupes traités comparés au groupe témoin).

Nous constatons qu'il y a une variation positive de l'insulinémie dans le sang des rats traités. En effet, les valeurs de l'insulinémie obtenues sont significativement élevées tant pour les animaux traités par les flavonoïdes que par la glibenclamide par rapport à celles obtenues sur le sang des rats non traités ($p < 0.001$). Il faut noter également que cette hyperinsulinémie reste significativement élevée durant un temps de 120 min au moins.

3.3.4.3. Effet de glycosylation des flavonoïdes

Les résultats de l'effet des flavonoïdes sur la complexation du glucose *in vitro* sont rassemblés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Variation du pourcentage de réduction du glucose dans les tubes à la dose initiale de 0.61 g/l additionnés de flavonoïdes.

Flavonoïdes	[Glucose] (g /l)	Pourcentage de réduction du glucose dans les tubes
<u>Aglycones</u>		
1 mg /ml	0.33	45.90 %
2 mg /ml	0.25	59.01 %
4 mg /ml	0.23	62.29 %
<u>Monoglycosides</u>		
1 mg /ml	0.23	62.29 %
2 mg /ml	0.21	65.57 %
4 mg /ml	0.20	67.21 %
<u>Di et triglycosides</u>		
1 mg /ml	0.19	68.85 %
2 mg /ml	0.11	81.96 %
4 mg /ml	0.09	85.20 %

$$\% \text{ de réduction de glucose} = (\text{Tube T} - \text{Tube E} / \text{T}) \times 100$$

Tel que : T, tube témoin ; E, tube échantillon

Il y a une chute importante de la concentration initiale de glucose dans les tubes contenant les flavonoïdes par rapport au tube témoin. En effet, le pourcentage de réduction de glucose peut atteindre une valeur de 85% dans le cas des di et triglycosides à la dose de 4mg/ml.

3.3.5. Effet antidiabétique des flavonoïdes en aigu et en subchronique chez les rats diabétiques

3.3.5.1. Variation de la glycémie chez les rats diabétiques traités en aigu (monoprise)

Les résultats de l'effet antidiabétique de l'extrait butanolique de RRL sur les rats diabétiques traités en monoprise à la dose de 200, 400 et 600mg/kg sont rassemblés dans le tableau 3 (*annexe2*) et illustrés par la figure 20. Nous avons constaté qu'il y'a eu une diminution significative importante de la glycémie au cours des 120 minutes pour tous les groupes ayant reçu un traitement par les flavonoïdes à différentes doses. En effet, à partir de

30 minutes, la différence du taux de la glycémie des groupes diabétiques traités est déjà significative ($p < 0.05$, $p < 0.001$) par rapport à la glycémie initiale des diabétiques témoins non traités. Cette chute de glycémie continue dans le temps et d'une manière différentielle en fonction des doses de flavonoïdes administrées pour atteindre la limite de 1.90 ± 0.175 g/l pour la dose de 600 mg/kg, 2.25 ± 0.12 g/l pour la dose de 400 mg/kg et 2.75 ± 0.128 g/l pour la dose de 200 mg/kg. Toutes ces valeurs sont très hautement significatives par rapport à la glycémie initiale du même groupe ou du groupe témoin. Il faut noter que la glycémie la plus réduite (1.90 ± 0.175 g/l pour la dose de 600 mg/kg) après 120 min du traitement n'a aucune différence significative avec celle obtenue avec la glibenclamide dans la même durée (1.75 ± 0.153 g/l), (figure 21).

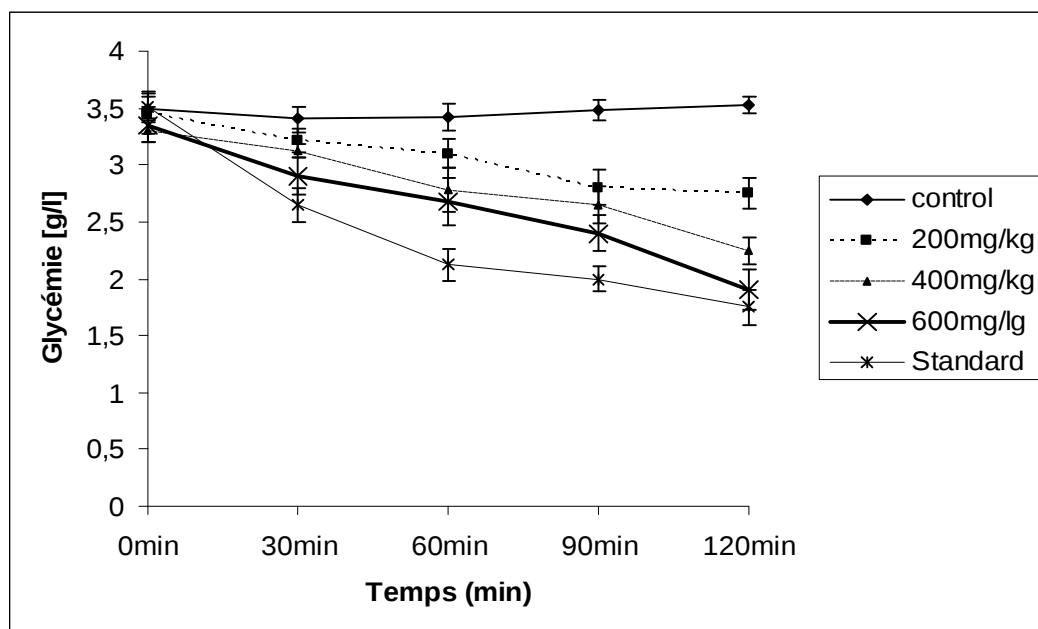


Figure 20 : Effet temps de l'extrait butanolique à différentes doses sur la glycémie chez les rats diabétiques (Les valeurs données sont en Moyenne $\pm$ ecart type).

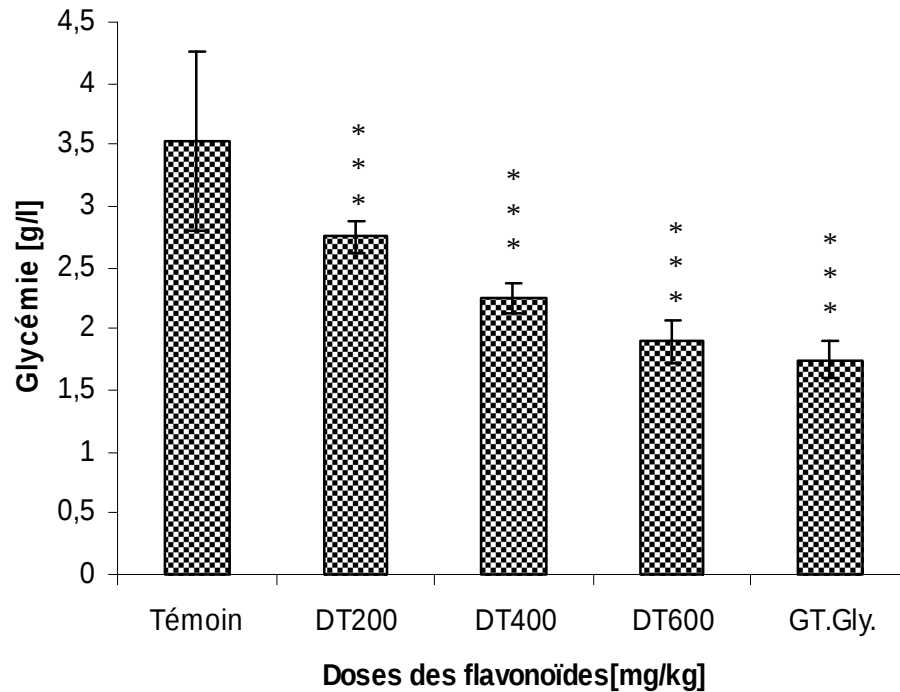


Figure 21 : Effet dose de l'extrait butanolique sur la glycémie chez les rats diabétiques durant 120 min suivant le traitement et comparaison avec le groupe témoin NaCl 0.9%. *Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type. test de Student: *** $p < 0.001$; groupes comparés au groupe témoin .*

3.3.5.2. La variation de la glycémie chez les rats diabétiques traités en subchronique.

Les résultats de l'effet antidiabétique de l'extrait butanolique de RRL sur les rats diabétiques durant 28 jours à la dose quotidienne de 200 mg/kg sont regroupés dans le tableau 4 (*annexe2*) et illustrés par la figure 22.

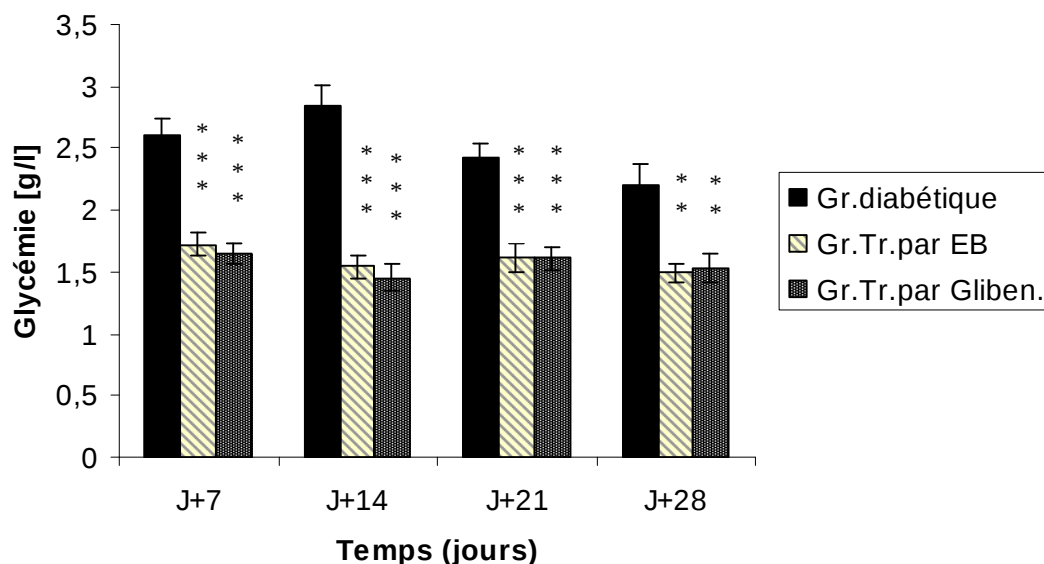


Figure 22: Variation de la glycémie dans le cas d'un traitement de 28 jours par l'EB et le standard, chez les rats diabétiques. Les valeurs sont données en moyenne $\pm$ Ecart type. Test de Student: ** $p < 0.01$; *** $P < 0.001$: groupes comparés au groupe témoin Na Cl 0.9%.

Nous constatons qu'il y a une réduction très significative et /ou hautement significative de la glycémie ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) chez les rats diabétiques sur les quatre semaines de traitement par l'extrait. Ces taux glycémiques ne présentent aucune différence significative avec ceux obtenus avec le groupe standard. Néanmoins, la glycémie de base n'est pas atteinte dans les deux traitements.

3.3. 6. Effet préventif des flavonoïdes contre le diabète induit à l'alloxane

Les résultats de l'effet préventif et protecteur des flavonoïdes sont rassemblés dans le tableau 6. Nous avons constaté des différences significatives ($p < 0.01$), tant au niveau de l'insulinémie qu'au niveau de la glycémie après 10 jours du prétraitement des animaux alloxanisés par les composés phénoliques. En effet, l'insulinémie est restée autour de sa valeur initiale chez les des groupes prétraités par l'extrait de flavonoïdes ou par la quercétine (0.238 ± 0.052 et 0.218 ± 0.018 $\mu\text{U/ml}$) par contre celle des témoins non protégés (0.108 ± 0.015 $\mu\text{U/ml}$) a diminuée significativement après 10 jours de l'injection de l'alloxane ($p < 0.01$) par rapport à sa valeur initiale (à J0) (0.228 ± 0.041 $\mu\text{U/ml}$) dans le même groupe d'animaux. Pour la glycémie, une stabilité est constatée au niveau du taux sanguin de glucose au dixième jour après le

prétraitement par les flavonoïdes chez les groupes protégés par les flavonoïdes (1.02 ± 0.09 et 0.95 ± 0.12 g/l) par rapport à sa valeur initiale (J_0). Par contre une hyperglycémie significative ($p < 0.001$) est obtenue chez les rats non protégés contre l'alloxane (2.42 ± 0.15 g/l) par rapport à la glycémie initiale du même groupe (0.94 ± 0.12 g/l).

Tableau 6 : Variation de la glycémie et l'insulinémie chez les rats prétraités ou non par les flavonoïdes.

Groupes et traitement des rats	Insulinémie [μ U/ml]		Glycémie [g/l]	
	J_0	$J_0 + 10$	J_0	$J_0 + 10$
Témoin+alloxane + sol. Physio.	0.228 ± 0.041	$0.108 \pm 0.015^{++}$	0.94 ± 0.12	$2.42 \pm 0.15^{+++}$
Traité + alloxane + flavonoïdes	0.242 ± 0.035	$0.238 \pm 0.052^{**}$	0.92 ± 0.11	$1.02 \pm 0.09^{***}$
Traité + alloxane + quercétine	0.231 ± 0.022	$0.218 \pm 0.018^{**}$	0.79 ± 0.09	$0.95 \pm 0.12^{***}$

Les valeurs sont données en moyenne $\pm$ Ecart type. test de Student: $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$: groupe comparé au groupe témoin Alloxane + Na Cl 0.9% ; $++ p < 0.01$, $+++ p < 0.001$: groupes comparés à lui même à J_0 (avant l'injection de l'alloxane).

3.3.6.1. Recherche des mécanismes de prévention contre le diabète induit par l'alloxane

3.3.6.1.1. Effet des flavonoïdes sur la peroxydation lipidique

La figure 23 illustre l'effet des flavonoïdes sur la variation du MDA cytosolique dans les cellules pancréatiques chez les rats alloxanisés prétraités ou non par les composés phénoliques.

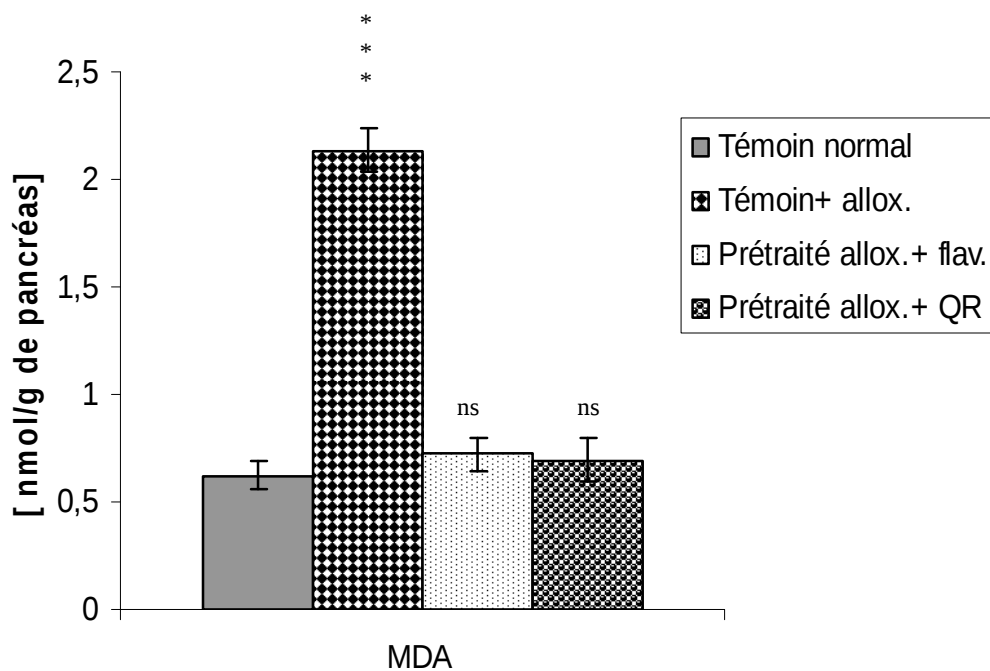


Figure 23 : Effet des flavonoïdes sur la production du MDA dans les cellules pancréatique
Les valeurs sont données en moyenne $\pm$ Ecart type. test de Student: *** $p < 0.001$: groupes comparés au groupe témoin Na Cl 0.9%.

Nous avons constaté une élévation très hautement significative ($p < 0.001$) du MDA chez les rats recevant l'alloxane et non traités (2.132 ± 0.102 nmol) par rapport au groupe témoin normal (0.621 ± 0.064 nmol). Par ailleurs, aucune variation significative du MDA n'est constatée chez les rats recevant l'alloxane et prétraités par l'extrait de flavonoïdes et la quercétine (leurs valeurs respectives 0.721 ± 0.078 nmol et 0.694 ± 0.099 nmol n'ont aucune différence significative avec celle obtenue avec le témoin normal). Ce résultat explique probablement la protection des animaux par les flavonoïdes contre le stress oxydatif.

3.3.6.1.2. Effet des flavonoïdes sur le niveau cytosolique de GSH dans le pancréas

La figure 24 illustre l'effet des flavonoïdes sur la variation de GSH cytosolique dans les cellules pancréatique chez les rats recevant de l'alloxane prétraités ou non par les composés phénoliques.

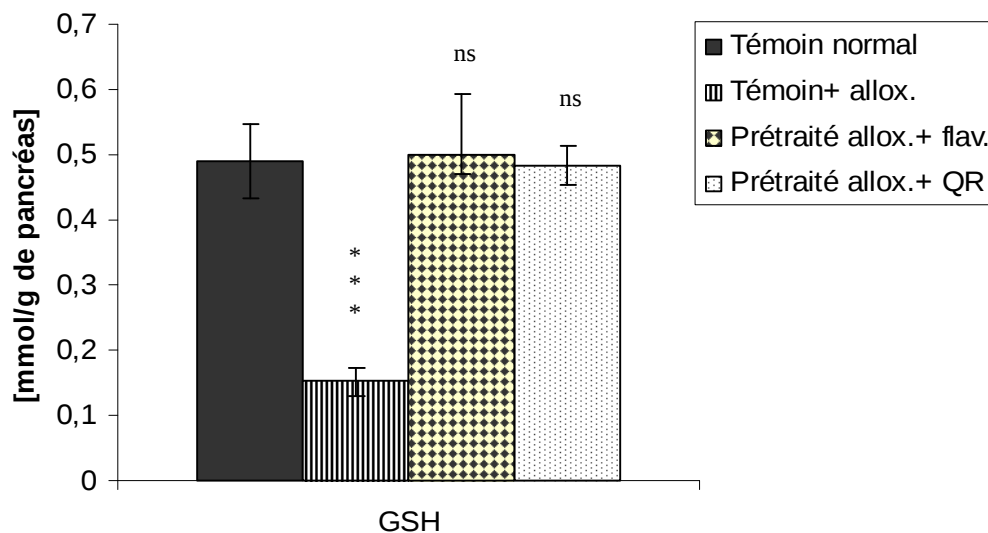


Figure 24. : Effet des flavonoïdes sur le niveau cytosolique de GSH dans le pancréas

Les valeurs sont données en moyenne $\pm$ Ecart type. test de Student: *** $p < 0.001$

Groupes comparés au groupe témoin Na Cl 0.9%.

Nous avons remarqué une élévation très hautement significative ($p < 0.001$) de GSH chez les rats recevant l'alloxane et non traités (0.152 ± 0.023 mmol) par rapport au groupe témoin normal (0.49 ± 0.057 mmol). Par contre, aucune variation significative de GSH n'est constatée chez les rats recevant l'alloxane et prétraités par l'extrait de flavonoïdes et la quercétine car leurs valeurs respectives 0.501 ± 0.092 mmol et 0.484 ± 0.031 mmol n'ont aucune différence significative avec celle du témoin normal.

3.3.6.1.3. Effet des flavonoïdes sur la catalase et super oxyde dismutase

Les résultats de l'effet des flavonoïdes sur les deux enzymes sont reportés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Effet des flavonoïdes sur l'activité des enzymes antioxydants, CAT et SOD chez les rats recevant l'alloxane et traités ou non par les flavonoïdes.

Traitement des animaux	Protéine mg/ml	Activité de CAT [UI/mg Pr]	Activité de SOD [UI/mg Pr]
Témoin normal+sol. phy	4.21± 0.030	0.582± 0.093	17.42 ±2.13
Témoin allox. + sol.phy	3.52 ± 0.045*	0.294 ± 0.042 **	6.23 ± 0.78***
Prétraité allox. + Flav.	4.85 ± 0.06 ns	0.492 ± 0.031 ^{ns}	14.98 ± 1.79 ^{ns}
Prétraité allox. + QE	5.12 ± 0.09 ns	0. 543 ± 0.076 ^{ns}	18.15 ± 3.21 ^{ns}

Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type. Test de Student : ns, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$: groupes comparés au groupe témoin normal+ Na Cl.

L'activité de la CAT et la SOD dans l'homogénat de pancréas a significativement diminué ($p < 0.01$, $p < 0.001$) chez les rats recevant l'alloxane seul (0.294 ± 0.042 UI) par rapport à celle mesurée chez les témoins qui ne reçoivent que la solution physiologique (0.582 ± 0.093 UI). L'activité enzymatique de ce système antioxydant est conservée à son niveau normal chez les rats prétraités par l'extrait de flavonoïdes et de la quercétine, ses valeurs respectives de 0.492 ± 0.031 UI et 0.543 ± 0.076 UI n'ont aucune différence significative par rapport à celle obtenue avec les rats témoins (tableau 7).

L'activité de la CAT et la SOD est exprimée par mg de protéines. Une courbe d'étalonnage des protéines est élaborée à cet effet (figure 6, *annexe1*).

3.4. Discussion

Le diabète sucré est une maladie métabolique chronique qui touche 5 à 7% de la population mondiale [Singh P. and Kakkar P., 2009 ; Zhou et al., 2009]. Cette maladie est classée en deux types (DID et DNID) selon l'étiologie individuelle de chaque patient. 95% des diabétiques sont diagnostiqués avec le type 2 [Attele et al., 2002]. La cause principale du diabète type 2 est la résistance à l'insuline et/ou la déficience des récepteurs pour cette hormone qui peut causer une hyperglycémie [Laakso, 2001]. Par conséquent, la stratégie clé dans le traitement de patients atteints de diabète de type 2 est le maintien d'une normoglycémie.

Les agents oraux antidiabétiques courants, représentés par les insulinosécréteurs, les sensibilisants de l'insuline et les inhibiteurs de la glucosidase, ont une action modeste avec une efficacité limitée [Yu et al., 2000]. Par exemple plusieurs études ont indiqué que la metformine avait peu ou pas d'effet sur l'utilisation périphérique de glucose stimulée par l'insuline chez les sujets obèses diabétiques [Inzucchi et al., 1998 ; Yu et al., 2000] et non diabétiques [Fendri et al., 1993].

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

La médecine populaire pratiquée par l'homme à travers le monde est basée essentiellement sur l'utilisation des plantes comme sources de substances naturelles actives. Parmi ces substances, les composés phénoliques et notamment les flavonoïdes qui occupent une place importante dans le traitement de nombreuses pathologies entre autres le diabète sucré, la jaunisse, le système vasculaire. En se basant sur les enquêtes ethnobotaniques au niveau locale (petite Kabylie, Algérie), il s'est avéré que la plante RRL est bien utilisée par les populations campagnardes pour traiter le diabète.

3.4.1. Les flavonoïdes de *Ranunculus repens* L

Du fait que la plante RRL est largement utilisée localement par la tradimédecine, nous sommes tentés de réaliser une séparation des flavonoïdes et afin d'obtenir une bonne séparation de ses principes actifs responsables sur son activité antidiabétique validant ainsi utilité, la méthode d'extraction adoptée est basée sur la solubilité différentielle des flavonoïdes dans les solvants organiques. Dans la présente étude, un rendement élevé (20%) est obtenu avec l'extrait aqueux de RRL contenant les composés phénoliques les plus hydrosolubles. Le rendement de l'extrait butanolique, renfermant surtout les di et triglycosides, est relativement élevé (18%). Par contre, le rendement de l'extrait d'acétate d'éthyle renfermant certains aglycones et les monoglycosides, est trois fois plus faibles que celui de l'extrait butanolique (6%) et l'extrait d'éther éthylique, riche en aglycones, donne un rendement encore très faible (1%). Sachant que le nombre de lavages effectué dans le protocole d'extraction pourrait conduire à des pertes substantielles des aglycones d'où les inconvénients de la méthode d'affrontement par les solvants.

La méthode modifiée du bleu de Prusse de Graham (1992), s'est avérée efficace pour le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits. Cette méthode a été choisie car elle satisfait aux critères de reproductibilité et de faisabilité. L'évaluation quantitative de ces composés phénoliques montre que la quantité des polyphénols (51,6%) dans l'extrait butanolique est importante en comparaison avec les autres extraits, l'extrait d'éther éthylique en est pauvre (6%).

Il est intéressant de déterminer la quantité de flavonoïdes dans les extraits de RRL afin de mieux les caractériser. Le dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium montre une intensité élevée de l'absorbance des complexes formés entre les flavonoïdes et L'AlCl_3 . En effet, la détermination de la quantité des flavonoïdes dans les extraits de RRL montre l'extrait d'éther éthylique faible avec un rendement de 60 mg/ g de lyophilisat, par contre les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol en contiennent plus avec des rendements respectifs de 160 mg/g et 397 mg/g de lyophilisat. Comme pour les polyphénols l'extrait butanolique est le riche en flavonoïdes.

L'analyse par HPLC (résultats non publiés) qui montre que cet extrait contient surtout des rutinosides (38%), de la quercétine (18%), du kaempférol (12%) sous forme aglycone ou glycoside.

3.4.2. Etude de l'activité des flavonoïdes et leur mécanisme d'action

L'étude préliminaire de cette activité concerne à *priori*, l'activité antihyperglycémiant des flavonoïdes le cas d'une hyperglycémie expérimentale afin d'évaluer la portée de la tolérance au glucose par les tissus périphériques des animaux traités par les différents extraits de flavonoïdes et à *fortiori*, la recherche de mécanismes de cette activité moyennant des méthodes biochimiques.

3.4. 2.1. Etude de l'activité antihyperglycémiant

Les résultats de cette étude montrent que tous les extraits de flavonoïdes utilisés sont d'une activité antihyperglycémiant. La meilleure activité est obtenue avec les formes glycosylées donnant un effet comparable à celle de l'hypoglycémiant oral, la glibenclamide. En effet, à partir de 30 min après le gavage, les différents flavonoïdes et la glibenclamide ont freiné l'augmentation de la glycémie en l'empêchant ainsi d'atteindre le pic glycémique obtenu avec le témoin hyperglycémique à 90 min du gavage et en le déplaçant dans le temps à 60 min. Plus encore, ces substances actives ont provoqué une hypoglycémie plus ou moins importante à partir de 90 min de l'administration telle que l'a bien montrée la courbe de l'effet temps des flavonoïdes sur la glycémie des animaux traités.

Ces résultats montrent à l'évidence une utilisation très active de glucose par les tissus périphériques, expliquée par une élévation de la tolérance au glucose au niveau de ces tissus quand les animaux sont traités par les composés phénoliques. L'augmentation de la tolérance des tissus au glucose est mentionné dans des rapports de plusieurs travaux sur les extraits flavonoïdiques de différentes plantes telles que *Biophytum sensitivum* et *Gongronema latifolium* [McCord et al., 1971 ; Lenzen et al., 1996].

3.4.2.2. La recherche des mécanismes possibles d'action

De par une augmentation significative de l'insulinémie chez les rats normaux traités par les flavonoïdes, la présente étude met en évidence de l'effet tropique des extraits de flavonoïdes et de la quercétine vis-à-vis de l'insulinosécrétion. Autrement dit, les cellules β sont stimulées par ces substances bioactives et ont augmenté la sécrétion de l'insuline durant la première et la deuxième heure des traitements des rats. Cette l'hyperinsulinémie est suggérée être à l'origine de l'hypoglycémie constatée à 90 min du gavage, c'est pourquoi il est prépondérant d'administrer une dose flavonoïdique plus réduite pour éviter la chute de glucose sanguin au deçà de la normoglycémie. Cet effet tropique des composés phénoliques sur l'insulinosécrétion a été apporté par les travaux de Puri [Puri, 2001] et de Venkateswaran et al. [Venkateswaran et Pari, 2002]. Dans ce contexte, un certain nombre d'autres plantes se sont avérées pourvues de l'activité antihyperglycémique avec un effet stimulant sur la régulation et la libération de l'insuline [Esmaili and Yazdanparas, 2004 ; Sharma et al., 2006].

D'après la littérature consultée, la plante *Ranunculus repens* L n'a pas eu l'attention des chercheurs dans leurs investigations tant sur le plan biochimique que pharmacologique. Cependant, les résultats de la présente étude sont en accord avec les travaux de Cunha et al. (2008), de Dhanabal et al. (2007), de Adeneye et al. (2007) et de Puri (2001) sur les flavonoïdes des extraits alcooliques respectivement de la plante *Leandra lacunosa*, *Nymphaea stellataqui*, *Musanga cecropioide* et de *Biophytum sensitivum*, où il a été prouvé l'activité antihyperglycémique de ces extraits chez les rats.

Dans la présente étude, l'élévation de la tolérance des tissus au glucose provoquée par les flavonoïdes, pourrait expliquer l'élévation significative de la teneur hépatique en glycogène chez les animaux prétraités par les flavonoïdes par rapport aux témoins. En effet, ce stockage massif de glycogène dans le foie peut se produire suite à une internalisation intense de glucose dans les hépatocytes. Le passage du glucose du sang vers les tissus périphériques, en l'occurrence les tissus hépatiques, est susceptible d'être facilité par différents effets des substances phénoliques et/ou insuliniques, nous pouvons citer parmi d'autres : une activation de la glycogénogenèse [Subash-Babu et al., 2008], une activation du transporteur de glucose (GluT) et une potentialisation de l'effet insulinique [Wang et al., 1997].

L'augmentation de la teneur hépatique et musculaire en glycogène a été constatée également chez le diabète induit par la streptozotocine chez les souris après leur traitement par des extraits riches en flavonoïdes [Sharma et al., 2008]. Sachant que la glyco-génogénèse hépatique ou musculaire est corrélée à l'activité de l'insuline qui régule le dépôt glyco-génique par la stimulation de la glycogène synthase et l'inhibition de glycogène phosphorylase [Pari et Saravanan, 2007 ; Subash-Babu et al., 2008].

Par ailleurs, le test positif de complexation de glucose ou la glycosylation des flavonoïdes peut nous renseigner sur la possibilité d'attribuer le rôle de « glucophage » à ces substances, c'est-à-dire la capacité de fixer le glucose, et intégrer ainsi cet effet parmi les actions possibles des composés phénoliques sur la glycémie des animaux traités. Il faut noter dans ce contexte que les flavonoïdes ont naturellement tendance à lier des oses pour donner les flavonoïdes glycosides [Bruneton, 1993], ce qui justifie raisonnablement la possibilité de leur glycation dans les solutions glucosées.

3.4.3. Activité antidiabétique des flavonoïdes

Une normalisation durable de la glycémie diminue le risque de développer des micro-maladies vasculaires et de réduire les complications de cette maladie. Les thérapies conventionnelles du diabète ont de nombreuses lacunes, par exemple les effets secondaires comme le stress oxydatif [Guerci et al., 2001 ; Huang et al., 2004 ; Punitha et al., 2005] et l'intolérance à l'insuline [Raccach, 2004]. Il a été montré que des extraits de plantes ont les mêmes efficacités que les médicaments antidiabétiques et sans effets secondaires [Kim et al., 2006].

Dans la présente étude, l'extrait butanolique après son administration à la dose de 200mg/kg aux animaux diabétiques (en monodose ou en doses répétées sur une durée de 28 jours), a provoqué un effet hypoglycémiant significatif ($p < 0.01$) de 33 %.

Le même effet a été démontré par d'autres auteurs avec le traitement des rats diabétiques par des extraits alcooliques d'autres plantes (*Musanga cecropioides*, *Berberis aristata*) [Adeneye et al., 2008 ; Singh et Kakkar, 2009] avec le traitement des rats alloxanisés avec une dose de 250 mg/kg d'extraits méthanoliques de 16% et de 50% de réduction de glycémie.

Cunha et al. (2008) ont eu une corrélation positive de la chute de la glycémie à l'insulinosécrétion.

D'autres auteurs [Esmaili and Yazdanparas, 2004 ; Sharma et al., 2006 ; Sharma et al., 2008 ; Shipra et al., 2009] ont démontré que les extraits flavonoïques des plantes *Eugenia jambolana*, *Cassia auriculata* L et *Teucrium polium* stimulent et régénèrent les cellules β du pancréas.

3.4.4. Effet protecteur des flavonoïdes et mécanismes d'action contre le diabète induit par l'alloxane

Le diabète induit à l'alloxane est un modèle bien connu du diabète expérimental [Dhanabal et al., 2007]. Nous avons constaté une hyperglycémie après dix jours de l'administration de l'alloxane monohydrate aux animaux, d'une chute significative de l'insulinémie. Ce composé peut causer une nécrose sévère des cellules β pancréatiques. Cet effet est expliqué par le fait que l'alloxane est pourvu d'un pouvoir producteur du peroxyde d'hydrogène et d'autres radicaux libres qui sont à l'origine de cette nécrose cellulaire des cellules β [Lenzen and Munday, 1991]. La sensibilité de ces cellules au stress oxydatif est attribuée également à un taux faible en antioxydants du pancréas par rapport aux autres tissus [Lenzen et al., 1996]. Cet effet prooxydant de l'alloxane produit une hyperglycémie suite à la chute de l'insulminosécrétion et aggrave le statut redox par l'autooxydation du glucose [Sakurai et Tsuchiya, 1988 ; Abir et al., 2005].

Les rats prétraités par les flavonoïdes ont été protégés contre l'effet délétère et diabétogène de l'alloxane ainsi aucune variation significative n'est constatée tant pour la glycémie que pour l'insulinémie après dix jours du traitement alloxanique associé aux flavonoïdes. Ces résultats sont en accords avec des travaux sur des extraits de flavonoïdes ou des formes pures dans le cas de diabète induit à l'alloxane [Abir et al., 2005] ou à la streptozotocine [Coskun et al., 2005].

3.4.4.1. Action des flavonoïdes sur la peroxydation des lipides

L'évaluation de la peroxydation lipidique produite dans les cellules pancréatiques a montré la génération d'un taux significativement élevé de MDA cytosolique dans le pancréas, chez les rats alloxanisés et non protégés par les flavonoïdes, par rapport aux animaux prétraités par ces composés phénoliques. Par ailleurs une telle hyperperoxydation pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox cellulaire dans le pancréas en faveur des prooxydants,

car l'alloxane s'est avéré générateur de radicaux libres qui, par leur pouvoir oxydant, sont à l'origine de l'oxydation de l'ADN, de lipides et de carbohydrates aboutissant ainsi à la mort des cellules β et l'installation du diabète [Quinlan et Gutteridge, 1988 ; Huk et al., 1998]. Par contre les extraits de flavonoïdes de RRL et de la quecétine se sont avérés des composés chémoprotecteurs cellulaires pourvus d'un pouvoir antiperoxydant jouant un effet écran contre l'effet délétère des radicaux libres, ce qui explique le maintien de MDA à son niveau cytosolique normal dans le pancréas des rats traités par l'alloxane en association avec ces composés phénoliques.

3.4.4.2. Effet des flavonoïdes sur la déplétion du GSH et les enzymes antioxydantes

Les résultats de la présente étude ont montré un déséquilibre dans le statut redox cytosolique en faveur des prooxydants mettant les cellules pancréatique dans un état de stress oxydatif. En effet la teneur du pancréas en glutathion, déjà nativement faible par rapport aux autres organes [Lenzen et al., 1996], a subi une baisse significative juste après cinq heures des traitements chez les rats alloxanisés et non protégés par les flavonoïdes.

Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques cellulaires figurent en première ligne la SOD et la CAT. L'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, est éliminé et maintenu à un niveau de concentration assez bas par la SOD qui catalyse sa desmutation en H_2O_2 . Ce dernier est transformé en H_2O et O_2 par la CAT. L'évaluation biochimique de l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants (la catalase et la superoxyde desmutase) a mis en évidence une réduction significative de l'activité cytosolique de ces enzymes dans le pancréas des mêmes animaux. Au même moment, le prétraitement des rats administrés d'alloxane par les flavonoïdes a pu maintenir les systèmes de défense cellulaire antioxydants (GSH, CAT et SOD) à leur niveau cellulaire normal pour empêcher ainsi la perte de l'équilibre redox prooxydants / antioxydants constatée avec les animaux non protégés par les flavonoïdes.

La cellule dispose pour sa protection au GSH porteur d'une fonction thiol qui constitue un système antioxydant de la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques [Morin et al., 2001]. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les

enzymes antioxydantes telles la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde desmutase [Morin et al., 2001]. Lors du traitement des animaux par l'alloxane, les taux de GSH sont nettement diminués suite à leur action de neutralisation des radicaux libres générés par l'alloxane [Huk et al., 1998] ce phénomène aussi provoque sa déplétion et facilite la peroxydation des lipides et l'oxydation des groupements thiols des protéines [Lopez-Lazaro et al., 2000 ; Vessal et al., 1992]. Cependant, le prétraitement des animaux par les flavonoïdes a empêché la diminution de GSH observée chez les rats recevant le diabétogène seul en maintenant le niveau cellulaire normal de ce tripeptide. Autrement dit, les extraits de flavonoïdes et la quercétine ont un effet scavenger, c'est-à-dire au lieu que les radicaux libres produits par l'alloxane [Quinlan et Gutteridge, 1988 ; Huk et al., 1998] se neutralisent par le GSH ils vont plutôt être captés par les composés phénoliques en maintenant ainsi le taux normal de glutathion des cellules pancréatiques.

Des études scientifiques [Hii et Howell, 1984 ; Nuraliev et Avezov, 1992 ; Wolff, 1993 ; Coskun et al., 2005] ont démontré l'effet protecteur des flavonoïdes (extraits bruts ou molécules purifiées) vis-à-vis du diabète provoqué par la streptozotocine ou l'alloxane. Ces travaux ont montré l'évidence de l'effet chemoprotecteur et antiradicalaire des flavonoïdes contre la peroxydation lipidique, et donc de la formation du [El-Missiry et al., 2000].

3.4.5. Effet de l'alloxane et les flavonoïdes de RRL sur les cellules du pancréas : Mécanisme d'action

Certes, la toxicité de l'alloxane a été étudiée par plusieurs auteurs, néanmoins le mécanisme de son effet prooxydant sur le statut redox cellulaire reste fractionné. Ce produit diabétogène induit des dommages pancréatiques notamment au niveau des cellules β via les radicaux libres produits lors de sa métabolisation [Ammon et al., 1983 ; Lenzen et al., 1996]. Ces derniers sont neutralisés par le GSH, système de première défense antiradicalaire, ce qui provoque une déplétion accrue de sa teneur intracellulaire (notre étude ; Singh et Kakkar, 2009).

Les espèces réactives de l'oxygène sont susceptibles d'épuiser l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants de la cellule (SOD, CAT...), aboutissant finalement à un déséquilibre du système redox cellulaire au profit des prooxydants. Cet état de stress oxydatif favorise les réactions en cascade des radicaux libres avec les molécules biologiques. Une lipoperoxydation (au niveau des biomembranes cellulaires) est amorcée et provoque ainsi

augmentation du niveau intracellulaire du MDA. L'oxydation des acides gras insaturés des phospholipides membranaires est susceptible de déformer la structure des membranes et provoquer en conséquence sa perméabilité et la mort cellulaire [Lopez-Lazaro et al., 2000 ; Servais, 2004 ; Dhanabal et al., 2007].

Le constat tiré de l'observation des résultats de la présente étude est que les flavonoïdes de RRL administrés en association avec l'alloxane à la dose de 200mg/kg, ont maintenu l'équilibre de la balance antioxydant / prooxydant des cellules pancréatiques. Cet équilibre est maintenu sous l'effet de l'action antioxydante des composés phénoliques contre les ROS générés par l'alloxane, pouvoir antiradicalaire déjà démontré au début de ces travaux *in vitro* avec le DPPH°. Les systèmes enzymatiques de défense antioxydants (SOD, CAT) ne sont pas donc altérés et le taux cellulaire du GSH est conservé sous l'effet chimoprotecteur des flavonoïdes, puisque la variation du MDA cellulaire reste normale témoignant de l'absence d'une lipoperoxydation sensible et d'une intégrité cellulaire.

Cet effet est confirmé par une absence de nécrose des cellules β du pancréas des animaux prétraités par les flavonoïdes.

Conclusion

Dans cette présente étude, la méthode d'affrontement par les solvants appliquée dans l'extraction des polyphénols indique une richesse de la plante RRL en composés phénoliques, avec une teneur importante en flavonoïdes. Ces substances sont dotées d'un pouvoir antiradicalaire très élevé comparé à celui de la vitamine C.

L'évaluation de l'effet antihyperglycémique des extraits de flavonoïdes chez les rats a mis en évidence une tolérance élevée des tissus au glucose, ce qui attribue une action insulinomimique à ces substances qui stimulent la néoglycogénèse favorisant ainsi le stockage du glucose.

Par ailleurs, il a été observé que les flavonoïdes de la plante RRL stimulent la sécrétion de l'insuline qui internalise le glucose dans le foie et qui le transforme en glycogène.

Les résultats obtenus de l'étude de l'activité préventive des extraits flavonoïdiques comme la quercétine possèdent également un pouvoir chimoprotecteur de ces composés contre l'effet délétère et diabétogène de l'alloxane qui se manifeste par le maintien de l'équilibre redox des cellules pancréatiques malgré l'effet prooxydant et cytotoxique de l'alloxane.

Néanmoins, la purification et l'identification des flavonoïdes ayant une activité antidiabétique et antioxydante restent fortement recommandée pour approfondir non seulement les connaissances sur les différents flavonoïdes pourvus de cette activité mais aussi pour cerner d'une manière plus fine les différentes actions possibles de ces composés et leur synergie.

La culture des cellules β de Langerhans reste un moyen indispensable qui permet une étude cytotoxique plus spécifique d'une part et une évaluation biochimique et pharmacologique de l'activité antidiabétogène et antioxydante des flavonoïdes sur un seul type cellulaire d'autre part.

Bibliographie Partie 1

Alan L., Miller N. D., 1996. Antioxidant flavonoids : Structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1(2): 103-111.

Alex J.F. 2001. Ontario weeds – Description, illustration and keys to their identification. Ontario ministry of agriculture, *Food and rural affaires*. Guelph-Ontario. Canada.

Adeneye A.A., Ajagbonna O.P., Ayodele O.W., 2007. Hypoglycemic and antidiabetic activities on the stem bark aqueous and ethanol extracts of *Musanga cecropioides* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia* 78: 502–505.

Abir T. El-Alfy, Amany A.E. Ahmed, Amal J. Fatani, 2005. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacological Research* 52 : 264–270.

Attele A.S., Zhou Y.P., Xie J.T., Wu J.A., Zhang L., Dey L., Pugh, W., Rue P.A., Polonsky K.S., Yuan C.S., 2002. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes* 51: 1851–1858.

Al-Achi A., 2005. Herbs that affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care*. 8(7): 325-330.

Ammon HP., Hagele R., Youssif N.1983. A possible role of intracellulair and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. *Endocrinology*, 112: 720-6.

Bagchi D, Garg A, Krohn R, Bagchi M, Tran M, Stohs S., 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*; 95:179–90.

Beauchamp C., Fridovich I., 1971. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem*. 44: 276-287.

Bhavna Sharma, G. Viswanath, Rajani Salunke, Partha Roy.2008. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry* 110 : 697–705

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La Voisier TEC et DOC*, Paris. 5^{ème} édition. p.250-270.

Boots A.W., Guido R.M.M.,Aalt Bast H., 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 585 : 325-337

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La Voisier TEC et DOC*, Paris. 2^{ème} édition. p.268-277.

Buysschaert M., Vandeleene B., Parus I., Hermans MP., 1999. Le diabète sucré d'une réalité d'aujourd'hui à un défi de demain. *Louvain Med*.118: S189-S195.

Bu-Abbas A., Clifford M. N., Ioannides C., Walker R., 1995. Stimulation of rat hepatic UDP glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food chem. Toxicol.*, 33(1): 27-30.

Butler L.G., 1989. Sorghum polyphenols. In: Toxicant of plant origin. *Ed. Cheeke PR.CRC Press* (New york), vol. 4. Chap. 5: 95-121.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Vasseur J., Gazin JC., Pinkas M., Luyckx M., Gazin M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch/drug Res*:1-6.

Calop J., Limat S., Frnandez C., 2008. pharmacie clinique et thérapeutique. 3^{ème} Ed. Masson, *Elsevier Masson*, Paris. pp.417-427.

Carroll, K. K., Guthrie, N., So, F. V., & Chambers, A. F., 1998. Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids. In C.A. Rice-Evans & L. Packer (Eds.), *Flavonoids in health and disease* (pp. 437–446). *New York: Marcel Dekker Inc.*

Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L., Zhao J.W., (2008). Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci Lett.* [Epub ahead of print]

Clairborne A., 1985. Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), *CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL*, pp. 283-284.

Coles S.M., 1977. *Ranunculus repens* L. in Europe. *Watsonia* 11: 353-366.

Coskun O., Kanter M., Korkmaz A., Oter S., 2005. Quercetin, flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research* 51: 117–123

Cunha W.R., Arantes G.M., Ferreira D.S., Lucarini R., Silva M.L.A., Furtado N.AJ.C, Da Silva F., Crotti A.E.M., Araújo A.R.B., 2008. Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosa* in normal and alloxan-induced diabetic rats , *Fitoterapia* 79: 356–360

Crespy V., Morand C., Besson C., Manach C., Denigne C., Remesy C., 2004. Comparaison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr*, 131: 2109-2114.

Cushnie T.P., Lamb A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26: 343–356.

Dhanabal S.P., Mohan Maruga Raja M.K., Ramanathan M., Suresh B., 2007. a Hypoglycemic activity of *Nymphaea stellata* leaves ethanolic extract in alloxan induced diabetic rats, *Fitoterapia* 78: 288–291

Drouin P., Buckle JF., Charbonnel B., Eschwege E., Guillausseau PJ., Plauin PF., Daninos JM., Balarac N., Sauvanet JP., 1999. Diagnostic et classification du diabète sucré : les nouvelles critères. *Diabète et métabolisme*. 25:72-83.

Da Silva E.J.A., Oliveira, A. B., Lapa, A.J., 1994. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and coumestrol, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(2) : 118-22.

De Whalley C. V., Rankin S. M., Hoult J. R. S., Jessup W., Leake D. S., 1990. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem.Pharmacol.* 39(11) : 1743-50.

Dedier Pol, 1994. Travaux pratique de biologie, *Bordas Eds* ; Chap. 2 : 54-83.

Dey lucey MD., Anoja S., Attele DDS., Chun-Su Yuan MD., 2002. Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review*. 7(1): 45-58.

Diatewa M., Samba C.B., Assah T.C., Abena A.A., 2004. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cordia alliodora* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* : 92- 229.

Elicio-Middleton Jr. Chithan K., Theoharis C., 2000. Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.

El-Missiry M.A., El Gindy A.M., 2000. Amelioration of alloxan induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann Nutr Metab*; 44:97–100.

Esmaili, M.A., Yazdanparaz, R., 2004. Hypoglycemic effect of *Teucrium polium*: 265 studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology* 95: 27– 266.

Erlund I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 24, 851–874.

Ellman G. L., 1959. Plasma antioxidants. *Arch. Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77

Evans, J.L., 2007. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance? *Indian Journal Medical Research* 125: 355–372.

Fendri S., Debussche X., Puy H., 1993. Metformin effects on peripheral sensitivity to insulin in non diabetic obese subjects. *Diabetes Metab*, 19 : 245-249.

Fesen M. R., Pommier Y., Leteurtre F., Hiroguchi S., Yung J., Kohn K. W., 1994. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol.* 48(3): 595-608.

Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., Forestieri A. M., Trovato A., Tripodo M. M., 1994. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 40(11) : 709-12.

-
- Gerard D., Camille T., 2003.** Les plantes bio-indicatrices : guide de diagnostic des sols, édition promoteur, Paris, p. 200.
- Graham HD., Szabo S., 1992.** Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J*; 6: 825-832.
- Grover J.K., Yadav S., Vats V., 2002.** Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 81–100.
- Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois phytothérapeutique, 4 : 162-169.
- Guermaz R., Zekri S., Hatri A., Kessal F., Brouri M., 2008.** Le diabète de type 2 en Algérie : poids actuel et à venir. *La Revue de Médecine Interne* ; Volume 29, Supplement 1 : S49-S50
- Grankvist K., Marklund SL., Taljedal IB. 1981.** CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J*, 199: 393-398.
- Gerhard R., 1993.** Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. *Lavoisier Tec and Doc*, pp 333-339.
- Gee J., Dupont M. S. Day A. J., Plumb G. W., Williamson G., Johnson I., J., 2000.** Intestinal transport of quercetin glucosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathways. *J Nutr*, 130:2765-2771.
- Guerci B., Bohme P., Kearney-Schwartz A., Zannad F., Drouin P., 2001.** Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 27: 436-447.
- Hollman P. C., Bijlsman M. N., Van-Gameren V., Gnossen E. P., De Vris J. H., Hatan M. B., 1999.** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids glycosides in man. *Free radical Res.* 31: 569-573.
- Harborne, J. B., Williams C.A., 2000.** Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Huk I., Brokovich V., Nanobashvili J., Weigel G., Neumayer C., Partika L., Patton N., Malinski T., 1998.** Bioflavonoid quercetin scavenger superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Brit J Surg*, 85: 1080-1085
- Hollman P.C.H., Katan M.B., 1998.** Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol.suppl.* 25:237-239.
- Hollman P.C.H., Van Trijp J.M.P., Gaag M.V.D., Mengelers M.J.B., Katan M.B., 1997.** Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.*, 418:152-156.

Haslam E.T., 1998. Bitterness and astringency. In: *Practical polyphenolics* (from structure to molecular recognition and physiological action) *Cambridge University Press*, pp. 178-225.

Holm L., Doll J., Holm E., Pancho J. H., 1997. World weeds – Natural Histories and description. *John Wiley and sons, Inc.* Toronto. Canada. pp.58-87.

Hii C.S., Howell S.L.,1984. Effects of epicatechin on rat islets of Langerhans. *Diabetes* ;33:291–6.

Huang DJ., Lin C.D., Chen HJ., Lin Y.H., 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam ‘Tainong 57’) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 179-186.

Ihara, Y., Toyokuni, S., Uchida, K., Odaka, H., Tanaka, T., Ikeda, H., Hiai, H., Seino, Y., Yamada, Y., 1999. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 927–932.

Iqbal M., Som D.S., Yasumasa O., Masayoshi F., Shigero O., 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolising enzymes in male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and toxicology* 92: 33-38.

Inzucchi S.E., Maggs D.G., Spollett G.R., 1998. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 338 : 867-872.

Ilhan, N., Halifeoglu, I., Ozercan, H.I., 2001. Tissue malondialdehyde and adenosine triphosphatase level after experimental liver ischaemia-reperfusion damage. *Cell Biochem. Funct.* 19: 207–212.

Jin, L., Xue, H.Y., Jin, L.J., Li, S.Y., Xu, Y.P., 2008. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 582:162–167.

Johnson I.S. 1983. Human insulin from recombinant DNA technology. American Association for the Advancement of Science. *Science*, Vol 219, Issue 4585: 632-637.

Julies A., Christin M., 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22: 19-44.

Kanter M, Meral I, Dede S, Gunduz H, Cemek M, Ozbek H., 2003. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* ;50: 264–8.

Kahn B.B., 1992. Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest.*, 89: 1367-71.

Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., Sugimura T., 1983. Inhibition of 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis* 4(10):1301-5.

Kessler M., Ubeau G., Jung L., 2002. Anti-and pro-oxydant activity of rutine and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55 : 1-11.

Khan,-W-N; Lodhi,-M-A; Ali,-I; Azhar-Ul-Haq; Malik,-A; Bilal,-S; Gul,-R; Choudhary,-M-I., 2006. New natural urease inhibitors from *Ranunculus repens*. *J-Enzyme-Inhib-Med-Chem.* 2006 Feb; 21(1): 17-9.

Kim S. H., Hyun S. H., Choung S. Y., 2006. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2): 119-123.

Kim, Y.Y., Kang, H.J., Ko, S.K., Chung, S.H., 2002. Sopungsungi-won (SP) prevents the onset of hyperglycemia and hyperlipidemia in Zucker diabetic fatty rats. *Arch. Pharm. Res.* 25: 923-931.

Kim, S.H., Hyun, S.H., Choung, S.Y., 2006. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J. Ethnopharmacol.* 104: 119-123.

Kuresh A., Youdim A., Jeremy P. E., Spencer., Hangen S., Rice-Evans C., 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem.*, 383: 503-519.

Lasker J. M., Huang M.T., Conney A. H., 1984. In vitro and in vivo activation of oxidative drug metabolism by flavonoids. *J.pharmacol. exp. ther.* 229(1): 162-70.

Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Hoult J., Robin S., 1989. Antioxydant and pro-oxydant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.* 38 (17): 2859-2865.

Lenzen S., Drinkgern J., Tiedge M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 20: 463-6.

Litchfield J.T., Wilcoxon F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96: 99-113.

Lowry OH., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193: 265-275.

Lovett-Doust J., Lovett-Doust L., Groth A.T., 1990. The biology of Canadian weeds. 95. *Ranunculus repens*. *Can. J. Plant Sci.* 70: 1123-1141.

Lopez-Lazaro M., Martin-Cordero C., Ayuso M., J., 2000. Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poison. *Z Naturforsch.* 55 (11-12): 898-902.

Lenzen S, Munday R., 1991. Thiol group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its *N*-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol*; 42:1385-91.

Laakso M., 2001. Insulin resistance and its impact on the approach to therapy of type 2 diabetes. *International Journal of Clinical Practice Supplement* : 8-12.

Marles, R.J., Farnsworth, N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137–189.

McCord, J.M., Keele Jr., B.B., Fridovich, I., 1971. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68 : 1024–1027.

Malaisse WJ., Malaisse-Lage F, Sener A, Pipeleers DG., 1982. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B-cell. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 79: 927-930.

Marfak A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. *Thèse de doctorat de l'Universités de Limoges*, pp. 24-42.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesty C., Jimenez L., 2004. Polyphenols: Sources and bioavailability. *Amj chin Nutr*, 79 (5): 727-747.

Manach C., Morand C., Texier O., Favier M. L., Agullo G., Regerat F., Remesy C, 1995. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*, 125: 1911-1922.

Middleton, E. J., 1996. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol.* 34(5): 344-348.

Mookerjee B. K., Lee T. P., Logue G. P., Lippes H. A. , Middleton E. , 1986. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo.Res.* 213 : 511-20.

Mucsi I., Pragai B. M., 1985. Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* 41(7) : 930-1.

Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., BurkeA., Hay A. J., 1993. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.* 46(7): 1257-71.

Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur* ; pp. 13-36.

Marouf A., Joël R., 2007. La botanique de A à Z. Edition Dunod, Paris, p.66-82.

Middleton, E. J., 1996. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol.* 34 (5): 344-348.

Middleton E. J., Drzewiecki G., 1984. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 33(21): 3333-8.

Markham KR., 1982. Technics of flavonoids identification. *Academic Press* (London); Chap.1 et 2: 1-113.

Marles R.J., Farnsworth N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137-189

Marles R.J., Farnsworth N.R., 1994. Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res.* 1994; 6:149-187.

Monti L.D., Sandoli E.P., Phan V.C., 1995. A sensitive and reliable method for assaying true human insulin without interaction with human proinsulin-like molecules. *Acta Diabetol.*: 32- 57.

Mila I., Scalbert A., 1994. Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, 381(2) : 749- 755.

Morin D., Thierry H., Spedding M., Tillement J., P., 2001. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *J Physiol Pharmacol.* 13: 22-67.

Nauck M.A. 1998. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* Oct; 35(3): 117-29.

Namgoong S. Y., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S., Kim H. P., 1994. Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 54(5) : 313-20.

Nelson D.L., Cox M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Ed. W H Freeman and Co. Ltd, 4 th edition, Newyork.p. 881-901.

Nissen, S.E., Wolski, K., 2007. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes, *N. Engl. J. Med.* 356: 2457–2471.

Nijhoff W. A., Bosboom M. A., Smidt M. H., Peters W. H., 1995. Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alpha-angelicalactone and flavone. *The Netherlands Carcinogenesis* 16(3) : 607-12.

Nuraliev IN, Avezov GA. 1992. The efficacy of quercetin in alloxan diabetes.*Exp Clin Pharmacol*; 55:42–4.

Obermeier M. T., White R. E., Yang C. S., 1995. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Pharm. Res.* 25(6): 575-84.

Oberley LW. 1988. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 5: 113-124.

Ohemeng K. A., Schwender C. F., Fu K. P., Barrett J. F., 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3(2): 225-30.

Ohkawa H., Ohishi, N., Yagi K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.

Ono K., Nakane H., 1990. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA

polymerases by several flavonoids. *J. Biochem.* 108 (4): 609-13.

Ono K., Nakane H., Fukushima M., Chermann J. C., Barre-Sinoussi F., 1990. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* 190(3) : 469-76.

Pari L., Saravanan R., 2007. Beneficial effect of succinic acid monoethyl ester on erythrocyte membrane bound enzymes and antioxidant status in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes, *Chem. Biol. Interact.* **169** (2007):15-24.

Punitha ISR., Rajendran K., Shirwaikar A., Shirwaikar A., 2005. Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocinnicotinamide induced diabetic rats. *eCAM.* 2(3): 375-381.

Puppo A., 1992. Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*, 31(1):85-88.

Pierre L., 2000. Le savoir des plantes, Ellipses édition. Marketing, Paris cedex 15, p. 44.

Pritchard J. K.A., Patel S.T., Karpen C.W., Newman H.A., Panganamala R.V., 1986. Triglyceride-lowering effect of dietary vitamin E in streptozocin-induced diabetic rats. Increased lipoprotein lipase activity in livers of diabetic rats fed high dietary vitamin E. *Diabetes* ;35:278-81.

Puri D., 2001. The insulinotropic activity of a Nepalese medicinal plant, *Biophytum sensitivum*: Preliminary experimental study, *Journal of Ethnopharmacology* 78: 89-93.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne JO., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.* 4 (5): 12-23.

Quinlan G, Gutteridge J., 1988. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids, carbohydrates in the presence of iron and copper salts. *Biol Med*, 5:341-8.

Rajnerayanama K., Reddy M., Charluviadi M. R., Krishna D. R., 2001. Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.

Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regierat F., 1996. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* 32 (1) :17-27.

Read, M. A., 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. *Am. J. Pathol.* 147(2) : 235-7.

Rechner A. R., Spencer J. P. E., Kuhine G., Rice-Evans C., 2000. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid and derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med*, 30: 1213-1222.

Raccach D., 2004. Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*. 1(1): 29-42.

Ribes G., Sauvaire Y., Baccou JC., 1984. Effects of fenugreek seeds on endocrine pancreatic secretions in dogs. *Ann Nutr Metab*. 1984; 28:37-43.

Rodier M. 2001. Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, vol.25 - n°2 : 5-18.

Rudge, M.V., Damasceno, D.C., Volpato, G.T., Almeida, F.C., Calderon, I.M., Lemonica, I.P., 2007. Effect of Ginkgo biloba on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40: 1095–1099.

Sakurai T, Tsuchiya S., 1988. Superoxide productin from nonenzymatically glycated proteins. *FEBS Lett* ; 236:406–10.

Servais S., 2004. Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon1, France*, pp. 19-35.

Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S., 2006. Antihyperglycemic effect of 300 the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 367–373.

Sharma B., Viswanath G., Salunke R., Roy P., 2008. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry* 110: 697–705.

Sharma A.K., In: Galadari E.O., Behara I., Manchandra M., Abdulrazzaq S.K., Mehra M.K. 1993. Diabetes Mellitus and its Complications: An Update, 1st ed. *Macmillan*, New Delhi. pp. 54-114.

Shipra G., Sharmaa S.B., Kumar Bansalb S., Prabhua K.M., 2009. Antihyperglycemic and hypolipidemic activity of aqueous extract of *Cassia auriculata* L. leaves in experimental diabetes, *J. Ethnopharmacol.* doi:10.1016/j.jep. 02. 019.

Silva B.M., Szpoganicz B., Pizzolatti M.G., Willrich M.V., De Sousa E., 2002. Acute effect of Bayhinia forficata on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethonopharmacology* : 1-5.

Singh J.,Kakkar P., 2009. Antihyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* doi:10.1016/j.jep.02.038.

Srivastava Y., Venkatakrishna-Bhatt H., Verma Y.,1993. Antidiabetic and adaptogenic properties of *Momorica charantia* extract. An experimental and clinical evaluation. *Phytother Res.* ;7:285-289.

Szent-Györgyi A., 1938. Therapeutic properties of vitamins. *Presse Medicale* 46 (995): 1893-1971.

Spedding G., Ratty A., Middleton E. J., 1989. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir. Res.* 12(2) : 99-110.

Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Iinuma M., 1995. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother. Res.* 9(7): 509-12.

Sarukhan J., 1976. On relative pressures and energy allocation in population of *Ranunculus repens*, *R. bulbosus* and *R. acris*, *Ann. Missouri Bot. Garden* 62: 7-20.

Subash-Babu P., Ignacimuthu S., Agastian P., 2008. Insulin secretagogue effect of *Ichnocarpus frutescence* leaf extract in experimental diabetes: A dose-dependent study. *Chemico-Biological interactions*, 172(2) :159-171.

Van Acker S., Tromp M., Haenen G. R. M. M., van der Vijgh W., Bast A., 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 214(3) :755-9.

Vanessa C., Christine M., Catherine B., Nicole C., 2003. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of compound. *Am J Physiol*, 284: G980- 988.

Verma A., K., Johnson J. A., Gould M. N., Tanner M. A., 1988. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by the dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 48(20) : 5754-8.

Venkateswaran S, Pari L. Flavonoids in food. *Journal of Clinical Nutrition* 2002; 11: 206.

Vessal M, Hemmati M, Vasie M., 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* ,135:357–64.

Vrijssen R., Van Hoof L. M., Vlietinck A. J., Vanden Berghe D. A., Boeye A., 1987. The poliovirus induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antivir. Res.* 7(1): 35-42.

Vitor RF, Mota-Filipe H, Teixeira G., 2004. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J Ethnopharmacol* 93 (2-3): 363-70

Weaber G., 2007. Diabétologie expérimentale. *Revue médicale de la Suisse Romande.* 120 : 907-913.

Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM. 1997. Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol* . Dec; 19 (3): 241-8.

Welihinda J., Karunanayake EH., Sheriff MH., Jayasinghe KS., 1986. Effect of *Momorica charantia* on glucose tolerance in maturity onset diabetes. *J Ethnopharmacology*. 17:277-282.

Williams R. I., Spencer J. P., Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. *Free Radic Biol Med*, 36(7): 838-849.

Wahllandir A., Soboll S., Sies, H., Linke I., Muller M., 1979. FEBES Lett 97, 138- 140.

Wattenberg Lee W., 1983. Anticarcinogenic effects of several minor dietary components. *Foods,Proc. Int. Conf.* 157-66.

Weaber G., 2007. Diabétologie expérimentale. *Revue médicale de la Suisse Romande*. 120: 907-913.

Wolff S.P., 1993. Diabetes mellitus and free radical. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 1993; 49: 643–9.

Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H., 1997. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *J.Agr. Food Chem.* 45 : 30-34.

Yu J.G., Kruszynska Y.T., Mulford M.I., 2000. A comparison of troglitazone and metformin on insulin requirements in euglycemic intensively insulin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes*, , 48 : 2414-2421.

Zhou I., Zhou S., Tang J., Zhang K., Guang L., Huang Y., Xu Y., Ying Y., Zhang L., Li D., 2009. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 606 : 262–268.

Introduction

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres résultant du métabolisme de l'oxygène. Chez l'homme, les principaux ROS, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^\cdot$), le monoxyde nitrique ($NO^\cdot$), sont constamment générés à l'intérieur de cellules suite à l'exposition aux xénobiotiques dans notre environnement ambiant et / ou à un certain nombre de métabolites endogènes impliquant des enzymes d'oxydo-réduction et de la chaîne respiratoire lors de transfert d'électrons [Borg and Reeber, 2008]. Dans les conditions biologiques normales, il existe un équilibre entre les taux intracellulaires des ROS et les systèmes antioxydants endogènes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT, la glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion (GSH). Il est connu que l'exposition des organismes à des facteurs exogènes et endogènes pourvus d'un pouvoir prooxydant pouvant produire un déséquilibre redox intracellulaire au profit d'une vaste gamme de ROS [Halliwell and Gutteridge, 2007]. Ensuite, ces ROS sont susceptibles d'oxyder les molécules environnantes en milieu biologique (les acides nucléiques, les lipides, les glucides, les protéines) [Farber, 1994] en provoquant des lésions cellulaires se terminant par la nécrose ou l'apoptose [Halliwell and Gutteridge, 2007]. Cette oxydation de diverses biomolécules est également un facteur étiologique essentiel impliqué dans de nombreuses pathologies chroniques telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, la cirrhose, la maladie d'Alzheimer .., [Pong, 2003].

Ces perturbations se répercutent sur le foie où Il a été montré par des études épidémiologiques, que la prévalence de la toxicomanie et les substances toxiques, pharmacologiques ou non, susceptibles d'induire diverses hépatopathologies est en progression rapide dans les pays en développement [Bissel et al., 2001].

Toute médication n'est pas saine entraîne des effets secondaires surtout les radicaux libres qu'il faut atténuer par un apport nutritionnel adéquat. Malgré un grand nombre d'études ayant été faites dans ce contexte, la compréhension des mécanismes de l'induction des lésions hépatiques est encore insuffisante et n'a pas convaincu les laboratoires pharmaceutiques d'arrêter et de supprimer les médicaments les plus toxiques. Par ailleurs, il est reconnu que l'intervention de la nutrition peut augmenter l'apport de phyto-antioxydants pouvant réduire la menace des radicaux libres [Arora et al., 2003].

Les flavonoïdes présents dans les plantes possèdent un fort effet antioxydant [Pannala et al., 1997]. Ils ont également un pouvoir chémoprotecteur contre plusieurs maladies [Halliwell et Gutteridge, 2007 ; Borg et Reeber, 2008].

Les médicaments anticancéreux comme la daunorubicine, la doxorubicine et l'épirubicine (EPI) ont des effets cardiotoxiques [Nielsen et al., 1990 ; Allen, 1992 ; Goebel, 1993 ; Mazué et al., 1995]. Les mécanismes biochimiques impliqués dans la cardiotoxicité ne sont pas clairement élucidés, mais il a été suggéré que l'épirubicine est susceptible d'induire une cardiotoxicité en produisant des ROS au cours de son métabolisme [Germain et al., 2003]. Par contre, selon la littérature l'hépatotoxicité induite par l'EPI, s'est avérée moins documentée et notre présente étude s'inscrit dans la mise en évidence, à *priori*, des aspects biochimiques et toxicologiques de l'hépatotoxicité induite par l'EPI au niveau cytosolique et mitochondriale et à *fortiori*, une évaluation de l'effet chémoprotecteur de ces mêmes compartimentations cellulaires suite de l'administration des extraits de flavonoïdes de la RRL et de la quercétine en association avec cet anticancéreux chez les rats.

Le stress oxydant

1. Définition

Pour définir le stress oxydant, il faut d'abord définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 . Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, $NO^\bullet$, $ROO^\bullet$...), mais également les composés non radicalaires ($ROOH$, H_2O_2 , 1O_2), [Milane, 2004].

Il est important d'évoquer alors le paradoxe de l' O_2 : il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais est aussi la source des ROS qui peuvent provoquer des dommages aux macromolécules biologiques (ADN, protéines, phospholipides membranaires...), [Droge, 2002]. Les ROS sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée en agissant comme second messenger [Thannickal et Fanburg, 2000 ; Droge, 2002].

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès [Pincemail et al., 1999]. Dans ce cas, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre [Pincemail et al., 2000]. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution et certaines pathologies comme le diabète, le cancer, le SIDA, l'inflammation, pathologies cardiovasculaires) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre production de radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif [Pincemail et al., 1999 ; Pincemail et al., 2000].

2. Les espèces réactives de l'oxygène et leur origine

2.1. Les radicaux libres oxygénés

Dans les molécules, les atomes sont assemblés par des liaisons covalentes établies par mise en commun d'électrons de spins opposés. Tout apport d'énergie suffisant est susceptible

d'entraîner la rupture de ces liaisons pour donner des entités chimiques qui possèdent un électron non apparié, dit « célibataire », sur une orbitale externe. Ces entités chimiques sont appelées radicaux libres. Parmi les espèces radicalaires, les plus intéressantes se trouvent les formes activées de l'oxygène [Curtin et al., 2002 ; Milane, 2004 ; Haton, 2005]. La réactivité particulière de l'oxygène est due à la structure biradicalaire de la molécule O_2 .

En effet, si l'oxygène moléculaire est très stable vis-à-vis des substances à électrons appariés, la molécule réagit énergétiquement avec les radicaux libres [Milane, 2004]. Ces derniers sont des espèces chimiques présentant un ou plusieurs électrons célibataires (le radical hydroxyle $\cdot OH$, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, l'oxyde nitrique $NO^{\cdot}$...). Ils sont produits naturellement dans

l'organisme (radicaux primaires) [Milane, 2004 ; Borg and Reeber, 2008 ; Haton, 2005] :

- au niveau de la respiration mitochondriale lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en H_2O ;
- au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes ;
- par diverses oxydases cellulaires ;
- au cours de la phagocytose.

Ces radicaux libres primaires sont capables d'extraire un électron des molécules voisines pour compléter la vacance de leur orbital en produisant de ce fait d'autres radicaux libres dit secondaires, donc sont les sous produits des réactions d'oxydation et de réduction [Borg and Reeber, 2008]. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux [Yoshikawa et al., 2000]. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ROS) [Fulbert and Cals, 1992 ; Crompton, 1999 ; Yoshikawa et al., 2000].

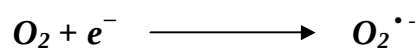
La réactivité de ces espèces n'est pas uniforme pour tous radicaux de l'oxygène et elle est très variable selon la nature du radical [Milane, 2004]. Chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) comme le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs à d'autres espèces plus réactives [Borg and Reeber, 2008]. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme

médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message de neurones [Borg and Reeber, 2008 ; Milane, 2004].

En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxydes ($\text{ROO}^\bullet$) ou surtout le radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) sont extrêmement réactifs avec la plupart des molécules des tissus vivants [Favier, 2003]. Ces radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, pourtant réactifs et toxiques, sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire les bactéries des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose [Favier, 2003 ; Dalton et al., 2002].

Les principaux radicaux libres oxygénés sont les suivants [Milane, 2004 ; Haton, 2005 ; Borg et Reeber, 2008] :

- ***l'anion superoxyde*** : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde :



Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions, c'est également un réducteur

- ***le radical hydroxyle*** : $^\bullet\text{OH}$, Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique, il est d'une très faible distance de diffusion.

- ***le radical peroxyde*** : $\text{ROO}^\bullet$, intermédiaire réactif avec les lipides

- ***l'oxygène singulet*** : $^1\text{O}_2$, forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité, réagit avec les macromolécules biologiques (ADN, Protéines, lipoprotéines...).

Par ailleurs les radicaux libres ont un pouvoir antioxydant différent d'un radical à un autre ; aussi ils sont présents par ordre croissant de leur pouvoir oxydant dans le tableau 1.

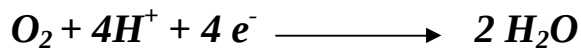
Tableau 1 : Principaux radicaux libres et comparaison de leur pouvoir oxydant [Crompton, 1999 ; Haton, 2005].

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
• Radical hydroxyle	• $\cdot OH$
• Radical alkoxyde	• $RO \cdot$
• Radical hydroperoxyde	• $HOO \cdot$
• Radical peroxyde	• $ROO \cdot$
• Radical oxyde nitrique	• $NO \cdot$
• Radical alkoxyde	• $RO \cdot$
• Peroxyde d'hydrogène*	• H_2O_2
• Peroxynitrite	• $ONOO \cdot$
• Anion superoxyde	• $O_2^{\cdot -}$

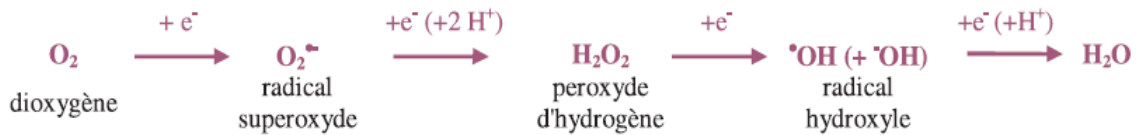
* Espèce active de l'oxygène, non radicalaire

Ü L'origine endogène des ROS

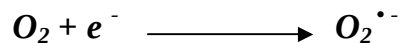
Selon certains auteurs [Dalton et al., 2002 ; Fulbert and Cals, 1992 ; Yoshikawa et al., 2000 ; Tillement, 2001] les radicaux libres peuvent avoir plusieurs origines. Ils sont issus du métabolisme physiologique mais ils peuvent aussi être, produits lors de « déviations » du métabolisme cellulaire. En effet, la respiration oxydative est la principale source d'énergie pour les cellules aérobies. L'acétylcoenzyme A issue des métabolismes glucidique, protidique et lipidique entre dans le cycle de KREBS pour l'oxydation complète du reste acétyle en CO_2 + H_2O . Les électrons transportés via la chaîne respiratoire, sous forme de coenzymes réduites (FADH₂, NADH, NADPH) vont transférer leur pouvoir réducteur sur les systèmes transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire et permettre aussi la synthèse d'ATP. Ce transfert d'électron est soldé par la synthèse de l'eau à partir de l'oxygène dans l'étape ultime de la chaîne respiratoire mitochondriale :



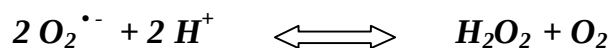
La réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O_2 , en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 et $\bullet OH$ selon la réaction suivante [Gardès et al., 2003] :



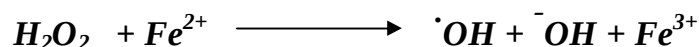
Cependant, une réduction incomplète de l' O_2 peut apparaître pour 1 à 2% de l'oxygène moléculaire conduisant alors à la formation de radicaux libres oxygénés : l'oxygène singulet 1O_2 et surtout l'anion $O_2^{\bullet -}$ [Milane, 2004 ; Haton, 2005 ; Borg et Reeber, 2008]. Si ce dernier est libéré dans un milieu dépourvu de protons, il peut exercer ses effets délétères, telles les doubles couches phospholipidiques des membranes cellulaires dont la structure a tendance à augmenter la durée de vie des radicaux libres [Milane, 2004 ; Favier, 2004]. Si cet anion est libéré dans un milieu protoné, il subit une dismutation, que ce soit spontanément ou en présence d'une dismutase, phénomène au cours duquel l'anion $O_2^{\bullet -}$ dismute en eau oxygénée :



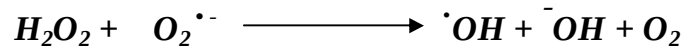
SOD



Il faut noter que la formation initiale de l'anion superoxyde est à l'origine du phénomène radicalaire car en donnant le peroxyde d'hydrogène par dismutation ce dernier peut alors se transformer en radical hydroxyle $\bullet OH$ par la réaction de Fenton:



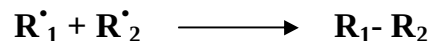
Le peroxyde d'hydrogène est susceptible de réagir avec le radical superoxyde en donnant également le radical hydroxyle selon la réaction de Habber-Weiss :



La vitesse de la réaction de dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ est maximale à pH = 4,8, mais est très lente à pH = 7, c'est pourquoi la cellule a besoin d'une superoxyde dismutase pour accélérer cette réaction en multipliant sa vitesse par 10^{10} au pH physiologique [Milane, 2004].

D'une manière générale, la durée de vie des radicaux libres est très courte (10^{-4} s) et aussi instable. Ils sont très réactifs car ils cherchent un électron afin de ré-apparier leur électron célibataire. Ceci peut se faire au coût de la création d'un nouveau radical libre et alors une propagation en chaîne s'installe. Ce processus intracellulaire est limité par la compartimentation cellulaire et peut s'arrêter selon [Tillement, 2001 ; Milane, 2004 ; Borg et Reeber, 2008] par :

- La recombinaison des radicaux libres entre eux :

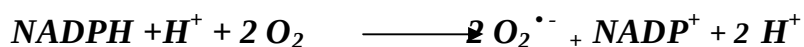


Ceci est possible s'il s'agit de chaînes organiques contenant uniquement des liaisons saturées [Borg et Reeber, 2008].

Quand l'organisme subit une attaque bactérienne, la réaction du système immunitaire est de *facto* par une inflammation accompagnée de cellules phagocytaires activées qui libèrent des enzymes, des médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine, et l'anion superoxyde accompagné d'autres dérivés oxygénés comme l'acide hypochloreux ($HClO$) et les radicaux $\bullet OH$, H_2O_2 et 1O_2 . [Tillement, 2001 ; Milane, 2004].

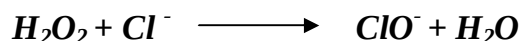
En effet, la phagocytose des germes bactériens s'accompagne, d'une production massive d'anions superoxydes par le métabolisme leucocytaire : c'est ce qu'on appelle la «flambée respiratoire » (Respiratory burst). Une NADPH oxydase, activée par la protéine kinase C et l'acide arachidonique libéré par la phospholipase A2 (PLA2) intervient et permet la synthèse

de $O_2^{\bullet -}$ au prix d'une forte consommation d' O_2 [Henderson et al., 1989 ; Hill et al., 1989 ; Rahman et al., 1996 ; Milane, 2004].

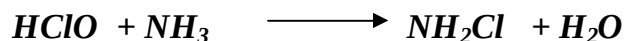
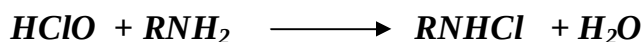


Les anions superoxydes produits subissent une dismutation soit spontanée soit enzymatique [Hill et al., 1989 ; Rahman et al., 1996].

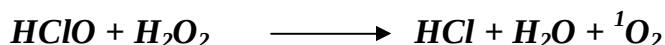
Au cours de la phagocytose et la formation de phagosome, ce dernier renferme une enzyme s'appelée la myéloperoxydase, catalyse en présence de H_2O_2 et d'ions Cl^- la formation de dérivés halogénés toxiques :



L'hypochlorite en captant un proton peut réagir à son tour avec les fonctions amines ou l'ion ammonium pour donner des chloramines :



En présence de H_2O_2 l'acide hypochloreux peut donner l'oxygène singulet

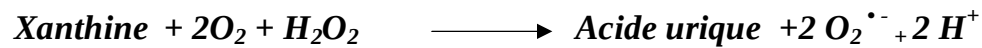


Lors de la phagocytose, il y a donc formation d'un taux élevé de radicaux libres oxygénés ($\cdot OH$, H_2O_2 , $O_2^{\bullet -}$ et 1O_2 , et des chloramines à vertu bactéricide [Servais, 2004 ; Favier, 2004] agissant contre les infections microbiennes en lysant les agents microbiens phagocytés. Dans le cas d'une granulomatose septique ou une inhibition de la myéloperoxydase par une corticothérapie, l'organisme devient alors fragile et très sensible aux agressions microbiennes [Milane, 2004] d'où les bienfaits des chloramines.

Par ailleurs, la biosynthèse des prostaglandines est amorcée à *priori* par la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par l'action hydrolytique de PLA_2 .

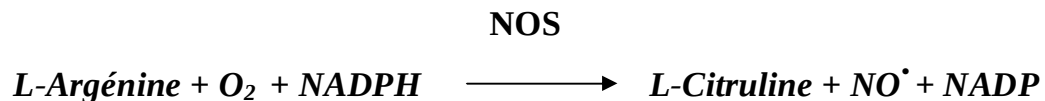
Deux enzymes, la lipooxygénase et la cyclooxygénase, liées aux membranes plasmiques et microsomales, transforment l'acide arachidonique libéré en dérivés (le thromboxane, les prostaglandines ou les leucotriènes), après action de la lipooxygénase, la transformation d'un hydroperoxyde, l'acide hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE) en acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) s'accompagne de la libération du radical hydroxyle $\cdot OH$ [Hill et al., 1989 ; Harrison, 2002 ; Milan, 2004]].

De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production de radicaux libres oxygénés. La xanthine-déshydrogénase est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion, cette enzyme est modifiée en xanthine-oxydase qui génère du superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine :



Ainsi, cette voie de production de dérivés réactifs de l'oxygène participe probablement au stress oxydatif chez tout patient présentant une pathologie ischémique, comme l'infarctus ou les états de choc, les bas débits régionaux sévères, les microthromboses [Le Bot et al., 1988]

Par ailleurs, beaucoup de cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote $NO^{\cdot}$ à partir d'arginine et d'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase (NOS). Cette production est physiologique et joue par exemple un rôle majeur dans le tonus vasculaire [Servais, 2004]:



Une seconde forme de NO-synthase existe : sous l'action des cytokines et des endotoxines libérées lors d'un sepsis, cette forme est inductible et produit de grandes quantités de $NO^{\cdot}$.

À forte concentration, le $NO^{\cdot}$ devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec un radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$ pour former un puissant oxydant : le peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$. En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ($NO_2^{\cdot}$, $\cdot OH$, etc.) [Hill et al., 1989 ; Haton, 2005].

Le réticulum cytoplasmique renferme des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques et produit ainsi les ROS, qui semblent réguler les fonctions du réticulum comme par exemple la sécrétion des protéines [Schisler and Singh, 1989 ; Milan, 2004].

Dans le peroxysome également, il y a une production intense de H_2O_2 suite à la présence de nombreuses enzymes qui génèrent le peroxyde pour être utilisé substrat par la catalase peroxysomiale afin de réaliser des réactions de peroxydation avec d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein [Schisler and Singh, 1989].

Ü L'origine exogène des ROS

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres du type $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, 1O_2 et de molécules génératrices de radicaux libres tel que H_2O_2 , par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants [Sinha et al., 1989]. Par ailleurs les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène [Sinha et al., 1989 ; Milane, 2004].

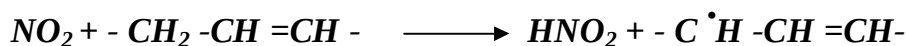
L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $O_2^{\bullet-}$ [Albano et al., 1994 ; Albano et al., 1999]. Selon ces mêmes auteurs, l'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des *NADPH* oxydase, *NADPH* cytochrome réductase et du cytochrome P 450. Enfin, selon Schisler et Singh (1989), l'alcool diminue l'activité des enzymes de protection (SOD-GSH-Px). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère. Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (*NO*) et le dioxyde d'azote (*NO*₂), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de

radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires selon 2 réactions :

- Réaction réversible :



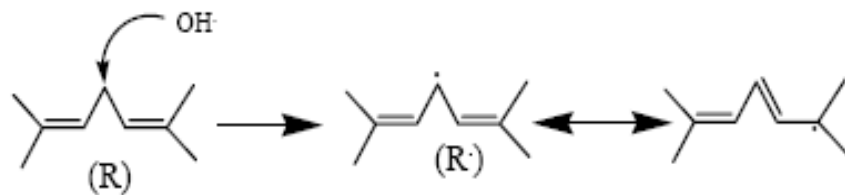
- Réaction irréversible:



NO et *NO*₂ peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux *OH*[•] [Servais, 2004]. La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires : elle contient *NO* et *NO*₂, renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages des alvéoles pulmonaires [Servais, 2004]. D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons, comme le tétrachlorure de carbone (*CCl*₄) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire des radicaux *CCl*₃[•] et mis en évidence dans des hépatocytes de rat par résonance paramagnétique électronique (RPE). La réduction de *CCl*₄ en *CCl*₃[•] s'effectue, soit sous l'action du cytochrome P₄₅₀ hépatique *CCl*₄ + *e*⁻ → *Cl*⁻ + *CCl*₃[•], soit en présence de fer ferreux *CCl*₄ + *Fe*²⁺ → *Fe*³⁺ + *CCl*₃[•] [Milane, 2004]. Par ailleurs le *CCl*₃[•] est capable d'induire l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés et une production importante des hydroperoxydes lipidiques [Knecht et Mason, 1988].

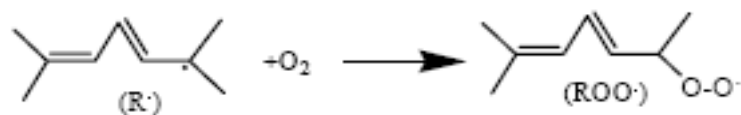
Par ailleurs, des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité en agissant selon un mécanisme de transfert d'électron [Pein et al., 1995 ; Sinha et al., 1989]. Des travaux réalisés sur des cultures de cellules tumorales mammaires, l'adriamycine est bioactivée en radical semiquinone de l'adriamycine (*SQ*[•]) par réduction enzymatique (cytochrome P450), ce radical peut réagir avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde [Sinha et al., 1989]. Pour une autre anthracycline, la daunorubicine, la réduction en radical libre (*DSO*[•]) se réalise alors que la molécule est déjà intercalée dans l'ADN [Sinha et al., 1989]. Enfin, sur des cultures de cardiomyocytes, l'épirubicine, un autre dérivé des anthracyclines, s'avère inducteur d'une toxicité avérée modifiant les propriétés physicochimiques des membranes cellulaires par la génération des radicaux libres [Pein et al., 1995].

Etape 1 : Initiation



Le radical formé ($R^{\bullet}$) subit un réarrangement interne, dû à une tautomérie liée au déplacement de la double liaison la plus proche de l'électron célibataire, et existe donc sous 2 formes en équilibre.

Etape 2 : Addition de l'oxygène



En présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde ($ROO^{\bullet}$).

Etape 3 : Propagation et amplification

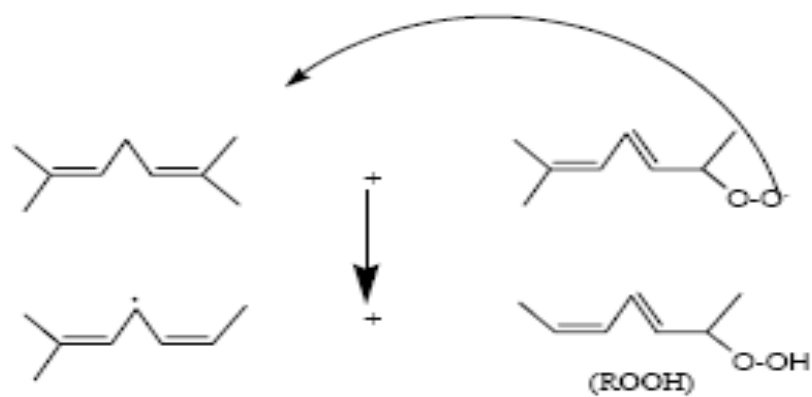


Figure 1' : Le mécanisme de la peroxydation lipidique

2.2.3. Rôle pathologique des espèces actives de l'oxygène

Plusieurs études [Halliwell et Cross, 1994 ; Cadet et al., 2002 ; Favier, 2003 ; Halliwell et Gutteridge, 2007] ont bien montré le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies. En effet, La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides [Favier, 2003]. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique [Favier, 2003 ; Halliwell et Gutteridge, 2007]. Toutes ces cascades vont avoir des répercussions sur les biomolécules.

v Les lipides : Les lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés, sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, de par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxy, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonaldialdéhyde ou l'hydroxynonanal. La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes. On peut détailler le mécanisme de cette peroxydation en trois étapes consécutives, figure 1', [Gardès et al., 2003].

Le radical peroxyde ($ROO^{\bullet}$) qui déstabilise une deuxième molécule d'AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique ($ROOH$) et à un nouveau radical ($R^{\bullet}$). Cette auto-oxydation se propage et s'amplifie d'un acide gras à l'autre.

Les implications chimiques et les différents produits engendrés par ce mécanisme sont résumés dans la figure 2'.

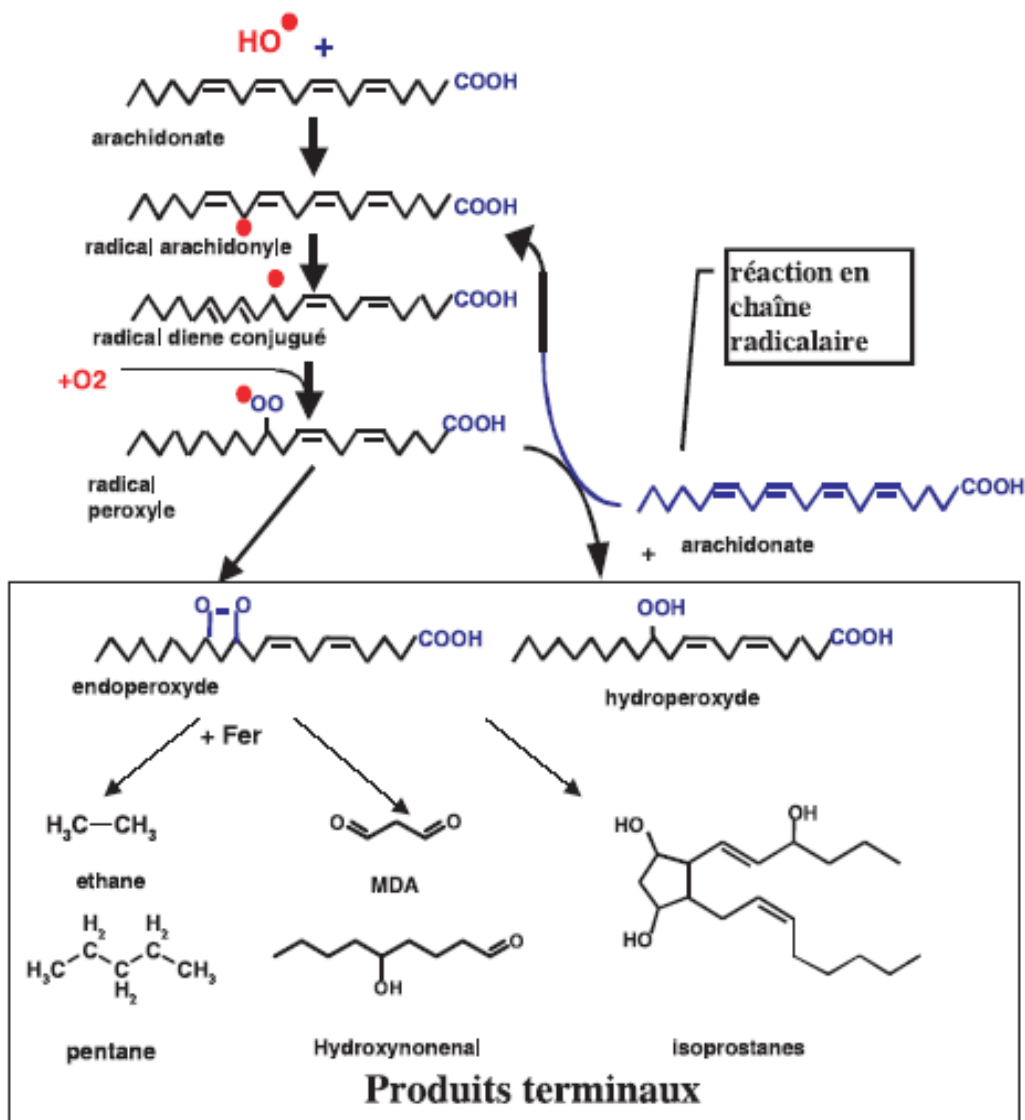


Figure 2' : Réactions en chaîne de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux [Favier, 2003].

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La réaction en chaîne prolonge les effets intramembranaires des radicaux libres, même si l'agression radicalaire s'estompe [Milane, 2004]. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques : les

hydroperoxydes et leurs dérivés [Halliwell et Gutteridge, 2007]. Les hydroperoxydes lipidiques sont relativement stables; en présence de fer, ils sont transformés en radicaux alkoxy ($\text{RO}^\bullet$). Parmi leurs dérivés, le MDA (malondialdéhyde) a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement et peut donc être considéré un marqueur de la peroxydation lipidique et peut également former des liaisons avec les bases de l'ADN et devenir un mutagène [Milane, 2004 ; Favier, 2003].

Par ailleurs, les ROS s'attaquent aux lipoprotéines circulantes aboutissant à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires [Favier, 2003].

v L'ADN : Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au minimum, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par $\text{OH}^\bullet$ peuvent être générées, parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines [Von Sonntag, 1987 ; Favier, 2003].

Par exemple, dans le cas de l'ADN, le radical hydroxyle réagit avec les bases en s'additionnant sur les doubles liaisons (voir figure 3').

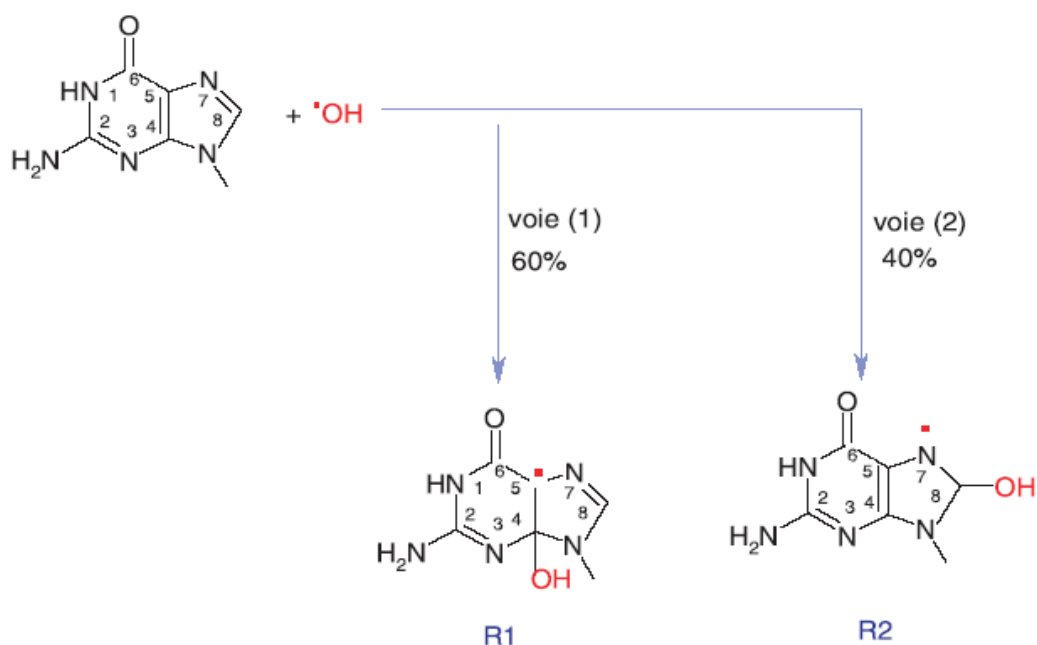


Figure 3' : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine [Singal et al., 1988].

Deux radicaux libres sont formés : R1 (centré sur l'atome de carbone 5) et R2 (centré sur l'atome d'azote 7). Ce dernier (R2) donne naissance à la 8-oxoguanine, un des principaux marqueurs du stress oxydant dans l'ADN [Singal et al., 1988].

Des dommages indirects peuvent résulter également de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés [Favier, 2003].

v Les protéines] : Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent une fonction thiol (SH) [Favier, 2003]. Comme les protéines de transport qui deviennent inactivées suite à leur oxydation [Avissar et al., 1989 ; Favier, 2003]. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées [Halliwell and Gutteridge, 2007]. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, transporteurs, récepteurs...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome [Favier, 2003].

Les protéines oxydées deviennent alors très hydrophobes (pertes des groupes ionisables et/ou extériorisation de zones hydrophobes centrales). Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules et s'associent aux lipides pour former des dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés [Avissar et al., 1989 ; Favier, 2003]. Les radicaux libres sont également responsables d'une fragmentation des macromolécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique), qui forment de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques. Les acides aminés, les plus sensibles à leur action, sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine, la cystéine (figure 4').

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que des stress importants provoquent une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates [Duvall, 1986] (figure 5'). De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression [Favier, 2003 ; Halliwell et Gutteridge, 2007]

2.2.4. Les systèmes « scavenger » des radicaux libres

Les systèmes antioxydants entraînant le piégeage des radicaux libres sont enzymatiques et non enzymatiques [Germain et al., 2003 ; Le Bot et al., 1988 ; Gardès et al., 2003 ; Avissar et al., 1989].

Ø Les systèmes endogènes enzymatiques

- **La superoxyde dismutase ou EC 1.15.1.1. (SOD)**

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elle assure, ainsi, la première ligne de défense contre le stress oxydant. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera les superoxyde-dismutases (Mates et al., 1999 ; Milane, 2004):

- SOD à manganèse (Mn-SOD) : protège la mitochondrie.

-
- SOD à cuivre zinc, protège le cytosol (cCu-ZnSOD)
 - La face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD).
 - Le plasma sanguin (pCu-ZnSOD).

Pour leur effet antioxydant, les superoxyde-dismutases sont utilisées en thérapeutique : dans les maladies inflammatoires chroniques, les anions superoxydes relargués par les phagocytes activés stimulent et amplifient la réponse inflammatoire. L'administration de SOD peut prévenir les lésions tissulaires dues à l'anion superoxyde [Milane, 2004]. Les SOD semblent également réduire l'étendue de l'infarctus du myocarde [Avissar et al., 1989 ; Milane, 2004].

- **Le système glutathions peroxydases ou EC 1.11.1.9. (GSH-Px)**

Ses enzymes sont sélénio-dépendantes contenant 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine [Milane, 2004]. Elles se trouvent dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau. Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure [Favier, 2003 ; Servais, 2004]. Ces enzymes sont, sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol [Favier, 2003].

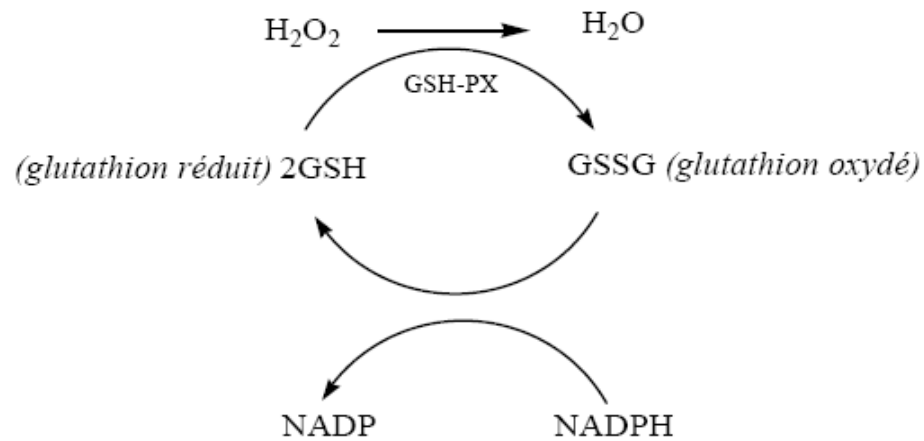
L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase qui utilise le NADPH comme donneur d'électron, c'est pourquoi le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule [Mates et al., 1999 ; Servais, 2004]

Avissar et al. (1989), ont, à partir de cultures cellulaires, individualisé 2 formes de GSH-Px qui diffèrent par leur structure, leur activité et leurs sites antigéniques :

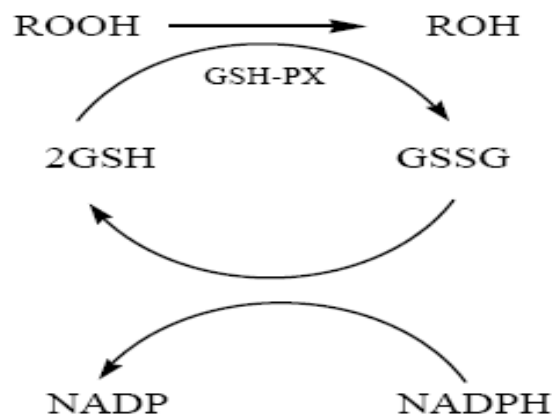
- une forme à localisation intracellulaire
- une forme glycosylée riche en ponts disulfures, à localisation extracellulaire.

Les GSH-Px ont une action détoxiquante vis-à-vis de 2 substrats :

- **le peroxyde d'hydrogène :**



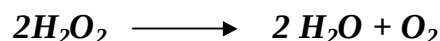
- **les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides :**



L'activité de détoxification des GSH-Px face aux hydroperoxydes nécessite une autre enzyme, la PLA_2 . Cette phospholipase libère les peroxydes d'acides gras des membranes cellulaires en hydrolysant les fonctions esters des phospholipides membranaires. Les peroxydes libérés dans le cytosol sont alors transformés par la GSH-Px tandis que la chaîne d'acides gras manquante est resynthétisée [Avissar et al., 1989 ; Milane, 2004].

- **La catalase ou EC 1.11.1.6. (CAT)**

La catalase est une enzyme répartie dans les tissus [Milane,2004 ; Borg et Reeber, 2008]. Elle catalyse la décomposition de H_2O_2 selon la réaction suivante :



Le H_2O_2 n'a pas de charge à sa surface ce qui rend ce ROS très lipophile et peu réactif en milieu aqueux. Le peroxyde d'hydrogène peut néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité, associée à sa capacité à traverser les membranes biologiques, fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse [Marfak, 2003]. Il réagit avec tous les substrats organiques et pouvant se transformer en radical hydroxyle $\cdot OH$ par la réaction de Fenton ou par la réaction de Haber-Weiss [Avissar et al., 1989 ; Haton, 2005].

La CAT est localisée principalement dans le peroxyosome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme. La GPx et la CAT permettent ainsi l'élimination de H_2O_2 . Toute fois la CAT semble jouer un rôle plus important en présence de forte concentration de H_2O_2 . Aussi elle empêche le peroxyde d'hydrogène de participer à la réaction de Fenton, alors que la GPx prend en charge le hydroperoxydes et H_2O_2 même en faible quantité, pour lesquels elle est considérée la source majeure de protection [Avissar et al., 1989 ; Milane,2004 ; Borg et Reeber, 2008].

- **Les thioredoxines peroxydases ou EC1.11.1.15. (Prx)**

Ce sont des petites protéines à activité antioxydante, localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxyosomes, associés aux noyaux et aux membranes [Avissar et al., 1989]. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant à travers une activité peroxydase, où l' H_2O_2 , le peroxy-nitrite et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats [Avissar et al., 1989]. Ils jouent un rôle très important dans la détoxification vue leur quantité importante (0.1 à 0.8% de protéines solubles cellulaires) et leur large distribution cellulaire [Favier, 2003 ; Milane, 2004].

- **L'hème oxygénase ou EC 1.14.93. (HO)**

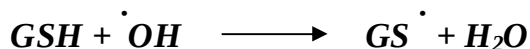
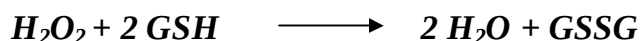
Le système oxygénase permet la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer [Koolman et Rohm, 1999 ; Ryter et Tyrell, 2000]: L'effet protecteur de l'HO contre le stress oxydant est indirect, puisqu'il est relié au fait que :

- La biliverdine se transforme en bilirubine à activité antioxydante [Ryter et Tyrell, 2000].
- Le fer produit par l'activité de l'HO stimule la synthèse de la ferritine, qui est aussi impliquée également dans la réponse antioxydante [Milane, 2004].

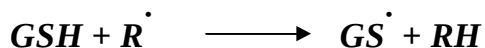
Ø Les systèmes endogènes non enzymatiques

§ **Les protéines de stress thermique** : Ces protéines interviennent dans la réparation des dommages oxydatifs induits au niveau des protéines par un stress oxydant [Milane, 2004].

• **Les antioxydants non enzymatiques** : Parmi ces antioxydants se trouvent les thiols (SH) dont certains sont synthétisés *in vivo*, comme le glutathion (GSH) [Favier, 2003]. Le glutathion est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly) dont la concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} mol.L⁻¹ [Halliwell and Gutteridge, 1999]. La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur, qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles :



Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone $R\cdot$ [Favier, 2003 ; Gardès et al., 2003] :



En effet dans ce cas, un phénomène de « réparation » des radicaux $R\cdot$ en RH se produit, par opposition à l'oxydation possible des radicaux $R\cdot$ par O_2 , donnant naissance à des radicaux peroxy $RO_2\cdot$ [Gardès et al., 2003].

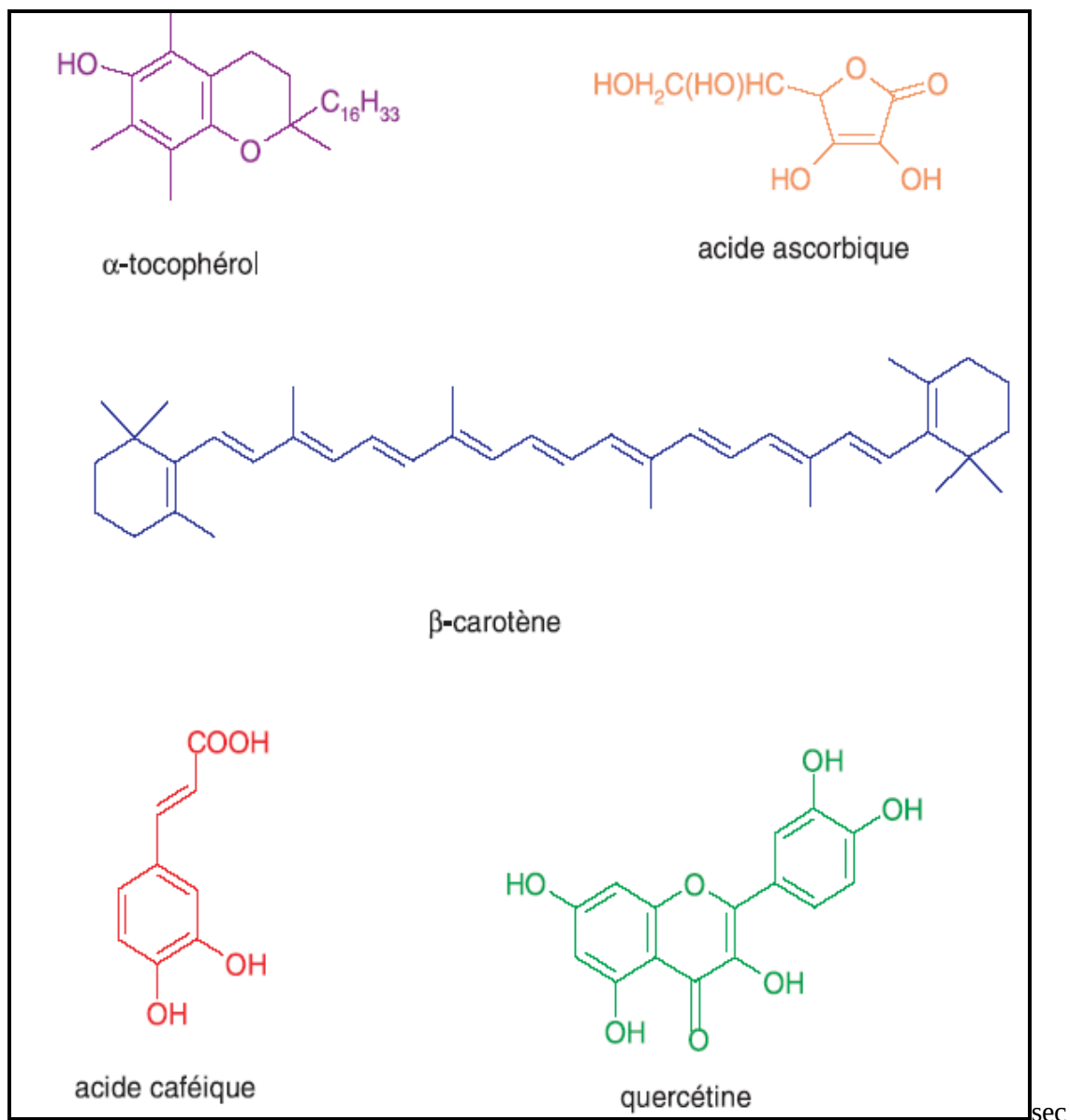
Cependant, les radicaux thiyles $GS^\bullet$ formés lors des réactions sus-citées, sont loin d'être eux-mêmes « inoffensifs » car leurs réactions ultérieures peuvent générer de nouveaux radicaux libres susceptibles d'initier à leur tour des dommages moléculaires [Gardès et al., 2003]. Par conséquent, l'effet protecteur des thiols reste relativement limitée. La régénération de la fonction thiol SH semble se faire, *in vivo*, à l'aide d'autres réducteurs tels que l'ascorbate (Vit. C) [Milane, 2004 ; Gardès et al., 2003] et le système glutathions peroxydase [Milane, 2004].

2.2. Les systèmes exogènes antioxydants

Toute substance capable de capter l'électron célibataire d'un radical libre sans donner elle-même un produit radicalaire est définie comme un piègeur de radicaux libres [Schisler and Singh, 1989 ; Tillement, 2001]. Ces piègeurs se caractérisent par leur affinité élevée pour les radicaux libres et leur spécificité pour certains d'entre eux. Les antioxydants d'origine alimentaire, comme l'ascorbate, les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols présents dans certains fruits et légumes (persil, oignon, myrtilles, cerises), exercent des effets protecteurs importants *in vivo* [Van Acker et al., 1996 ; Gardès et al., 2003 ; Halliwell and Gutteridge, 2007]. Les oligoéléments (Se, Zn, Cu, Mn, ...) sont des cofacteurs indispensables pour les enzymes antioxydantes [Favier, 2003 ; Milane, 2004].

• La vitamine C :

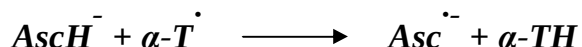
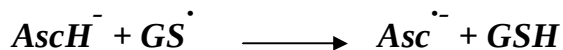
La molécule d'acide ascorbique (figure 6') et sa forme déprotonée, l'ascorbate (présent majoritairement à pH physiologique), est agent réducteur [Favier, 2003]. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot OH$ mais aussi avec l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et les radicaux peroxydes $RO_2^\bullet$. En réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate ($AsCH^+$) est oxydé en radical ascorbyle ($AsC^{\bullet +}$) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. Par conséquent, à l'opposé du radical thiyle $GS^\bullet$ susceptible d'initier de nombreuses réactions secondaires, le radical ascorbyle $AsC^{\bullet +}$ ne développe pas de réactions ultérieures dommageables [Gardès et al., 2003].



sec

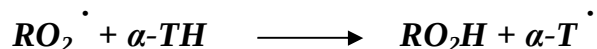
Figure 6' : Structure d'origine alimentaire de quelques antioxydants : α -tocophérol, acide ascorbique, β -carotène, acide caféique et quercétine [Gardèse et al., 2003].

Une propriété importante de l'ascorbate est la « réparation » possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol (α -TH) à partir de leurs formes radicalaires. L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle [Halliwell and Gutteridge, 2007]:



- **Les Tocophérols :** Ils existent plusieurs variantes de tocophérols naturels (d- α , d- β , d- γ et d- δ - tocophérols), le d- α -tocophérol (vitamine E) est celui qui est le plus efficace *in vivo*. C'est un antioxydant liposoluble, en raison de sa longue chaîne aliphatique comportant 16 atomes de carbone (figure 6). Le d- α -tocophérol est donc localisé parmi les chaînes d'acides gras des phospholipides constituant les membranes et les lipoprotéines [Milane, 2004 ; Servais, 2004].

Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques $RO_2^\bullet$ qui propagent les chaînes de peroxydation [Gardès et al. 2003] . La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice (α -TH), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, $\alpha-T^\bullet$, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde [Gardès et al. 2003]:



L' α -tocophérol capte également les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée $HO_2^\bullet$), les radicaux hydroxyles $^\bullet OH$, ainsi que l'oxygène singulet 1O_2 (espèce réactive de l'oxygène, non radicalaire). Le recyclage de la vitamine E est assuré par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate (réaction ci-dessus), lui permettant de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises [Servais, 2004].

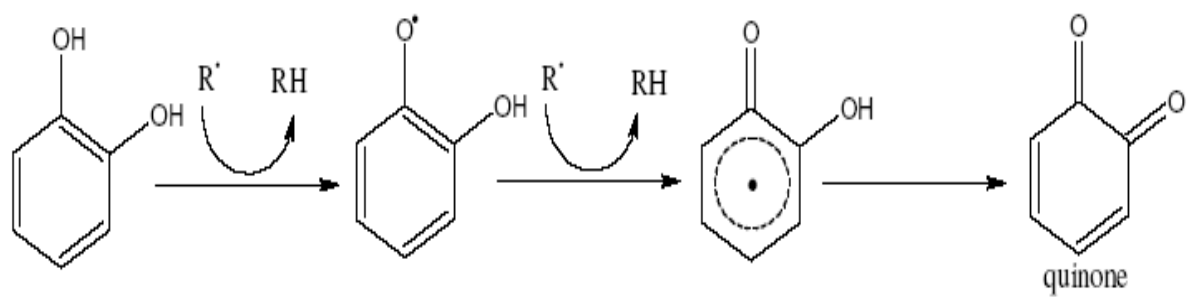
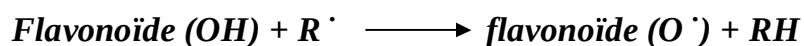


Figure 7' : Piégeage des ROS ($R^\bullet$) par les flavonoïdes [Van Acker, 1996].

- **Les caroténoïdes** : ils sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet 1O_2 , ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire [Gardès et al., 2003; Milane, 2004]. D'après Burton et Ingold (1984), l'effet antioxydant du β -carotène serait dû à une interaction entre le radical et le système de doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur qui serait stabilisé par résonance.

- **Les flavonoïdes** : Tous les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluant, infections... ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants cellulaires (lipides et macromolécules) contre le stress oxydant [Bors et al., 1997]. Ils sont de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot OH$, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et peroxydes $RO_2^{\cdot}$ [Gardès et al., 2003; Milane, 2004]. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. La quercétine, flavonoïde non glycosylé, est la plus antioxydante [Milane, 2004]. Le piégeage des radicaux libre se fait selon la réaction [Cao et al., 1997; Marfak, 2003] :



Où $R^{\cdot}$ représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxy ($FL-O^{\cdot}$) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (figure 7') et un anion superoxyde avec l'oxygène.

Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Nous constatons que la capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox du couple $Fl-O^{\cdot} / Fl-OH$ mais aussi de la réactivité du radical flavonoxy [Marfak, 2003].

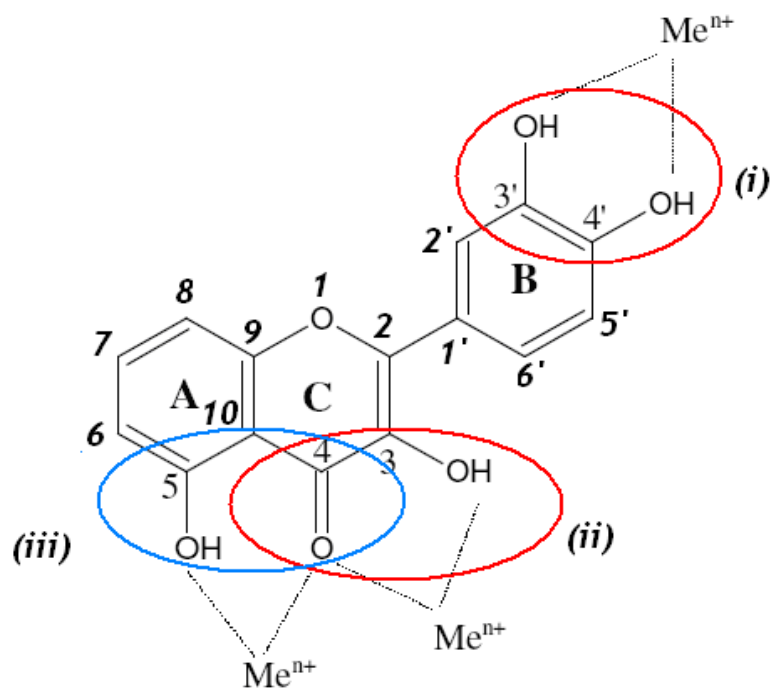


Figure 8' : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) [Milane, 2004].

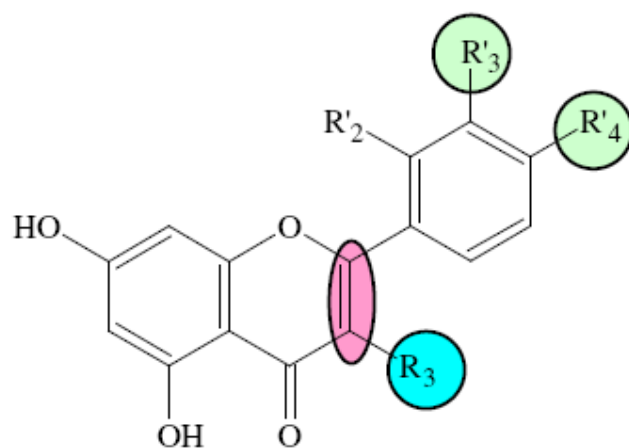


Figure 9' : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes [Van Acker, 1996].

Par ailleurs, les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques. Des études menées par Van Acker et al. [Van Acker, 1996], montrent l'aptitude des flavonoïdes à chélater les minéraux. La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés dans ce travail. On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques dans la figure 8' :

(i) un noyau catéchol sur le cycle B, **(ii)** les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et **(iii)** les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

En fin, selon la communauté scientifique, la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, est en relation avec ceux qui combinent les trois critères suivants:

1. La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxyle et participe à la délocalisation des électrons.
2. La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
3. La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (figure 9').

3. Etude expérimentale de l'effet hépatoprotecteur des flavonoïdes contre le stress oxydatif induit par l'Epirubicine (EPI) dans l'hépatocyte et la mitochondrie

La prise de médicaments anticancéreux provoque des intoxications hépatiques. Des études épidémiologiques ont démontré que les maladies hépatiques causées par les substances toxiques et pharmacologiques en particulier par les substances anticancéreuses [Bissel et al., 2001]. Des travaux de recherche ont montré que les dérivés des anthracyclines tels que l'Epirubicine, daunorubicine et doxorubicine engendrent un effet toxique sur le foie et le cœur [Le Bot et al., 1988 ; Mazué et al., 1995 ; Nielsen et al., 1990 ; Goebel, 1993]. Chez l'homme le risque de la cardiotoxicité augmente exponentiellement au-delà de la dose cumulative [Allen, 1992].

Cependant, les mécanismes impliqués, dans l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité [Le Bot et al., 1988 ; Germain et al., 2003] par l'épirubicine ne sont pas clairement identifiés. D'autres travaux scientifiques suggèrent que la toxicité causée par ces anticancéreux ou leurs métabolites est médiée par la production des radicaux libres.[Le Bot et al., 1988 ; Germain et al., 2003].

Dans cette deuxième partie de notre travail expérimental, nous allons investir d'abord le degré de toxicité produit par l'EPI au niveau du foie car selon la littérature consultée [Nielsen et al., 1990 ; Goebel, 1993 ; Mazué et al., 1995 ; Germain et al., 2003], nous estimons qu'elle n'a pas été étudiée sur le plan cellulaire que subcellulaire.

En plus de cette étude nous allons examiner le statut antitoxique des flavonoïdes de RRL et de la quercétine contre la toxicité provoquée par l'EPI. L'utilisation de ces composés phénoliques est motivée par les résultats de la première partie de la présente étude montre la possibilité d'attribuer le statut d'antioxydant et cytoprotecteur à ces substances naturelles dans le cas du diabète induit par l'alloxane.

3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. Induction de l'hépatotoxicité par l'Epirubicine

Avant d'induire l'hépatotoxicité, l'EPI, l'extrait de flavonoïdes (EB) et la quercétine sont reconstitués dans une solution saline (0.9%) juste avant les traitements. Les animaux sont répartis comme suit : Groupe1, témoin normal reçoit deux fois 1 ml de la solution saline, la première par gavage avant 24 heures et la seconde par voie péritonéale ; Groupe 2, traité par l'EPI, reçoit par gavage 1 ml la solution saline deux fois également, la première par gavage avant 24 h et la seconde juste après l'administration par voie intra péritonéale d'une dose monoprise de 1 ml EPI à 9 mg/kg [Dobbs et al., 2003]; Group 3, préventif, reçoit deux fois 1 ml de l'extrait de flavonoïdes par gavage à la dose de 100ml/kg, la première avant 24 h et la seconde après l'administration d'une monoprise de 1ml d'EP par voie intra péritonéale à la dose de 9mg/kg ; Groupe 4, reçoit la quercétine à la dose de 33mg/kg, de la même manière que l'extrait de flavonoïdes.

3.1.2. Le sérum et le test de la fonction hépatique

Après les différents traitements, les rats sont décapités par dislocation cervicale après un jeûn de 24 heure afin de collecter le sang dans des tubes non héparinés puis centrifuger à 3000 rpm à 4° C pendant 10 min pour récupérer le sérum (Sigma 1-15K, Bioblock scientifique). Les activités enzymatiques de l'ASAT et de L'ALAT, biomarqueurs de la fonction hépatique, sont déterminées par colorimétrie selon la méthode de Reitman et al. (1957) en utilisant des Kits du commerce (Biomérieux, France), sur un automate multiparamétrique (TECHNICON, Germany).

3.1.3. Préparation des fractions de cytosol et de la matrice mitochondriale

- **Préparation de cytosol des hépatocytes**

La fraction cytosolique est extraite selon la méthode décrite par Sanmugapriya et Venkataman (2005). Après le sacrifice des rats, les foies sont immédiatement prélevés par dissection et perfusés avec une solution saline froide (0.86%) afin de drainer tout le sang restant dans le foie. En suite les tissus hépatiques sont coupés en petits morceaux, pesés et homogénéisés (homogénéisation avec 3 volumes de tampon phosphate 0.1 M; pH 7.4 contenant KCl 1.17%).

Le surnageant est centrifugé à 10000 rpm pendant 45 min à 4°C et le surnageant obtenu est utilisé comme source de CAT et de SOD. Le dosage des protéines dans les fractions cytosoliques est réalisé par la méthode de Lowry (1951).

- **Préparation de la matrice mitochondriale**

La matrice mitochondriale est préparée selon la méthode décrite par Rustin et al. (1994) avec quelques modifications. Les morceaux de foie sont mis dans un tampon glacé d'isolation des mitochondries (10 mM tris-HCl, pH 7.4, 250 mM Sucrose, 0.5 mM EDTA et 0.5% bovin serum albumin). Après homogénéisation des fragments, l'homogénat obtenu est centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C. Les pellets de mitochondries sont lavés deux fois avec le tampon d'isolation puis re-suspendus dans la même solution tampon. La matrice mitochondriale est extraite par congélation et décongélation suivi immédiatement par homogénéisation répétée des préparations fraîches de mitochondries afin d'éclater les mitochondries. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min, le surnageant obtenu est considéré la source de CAT, Mn-SOD et MDA. Le dosage des protéines dans les fractions mitochondriales est réalisé par la méthode de Lowry (1951).

3.4. Evaluation biochimique du statut oxydatif dans le cytosol et les

mitochondries

Le MDA est évalué par le méthode de Ohckawa et al. (1979) ; le dosage de GSH par la méthode d'Ellman (1951) ; les activités de la CAT par la méthode de Clairborne (1985) ; et de la SOD la méthode décrite par Beauchamp et Fridovich (1971). L'activité enzymatique spécifique est calculée en termes d'UI/mg de protéines.

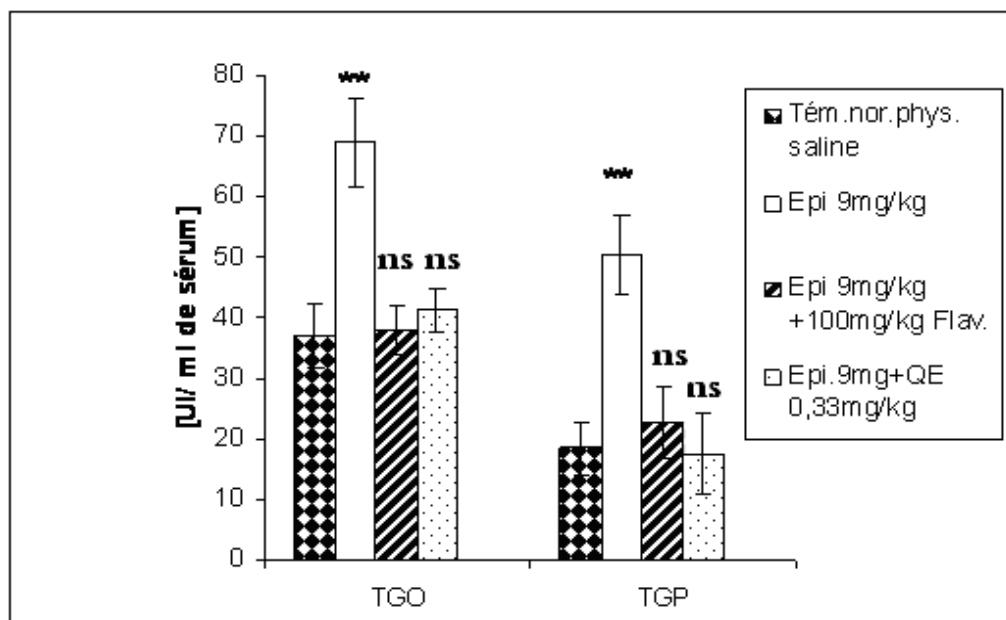


Figure 10'. Effet de l'EPI et les flavonoïdes sur la fonction hépatique et sa libération des transaminases ASAT et ALAT. Les valeurs sont données en moyenne $\pm$ Ecart type. ** $P < 0.01$, groupes comparés au groupe témoin.

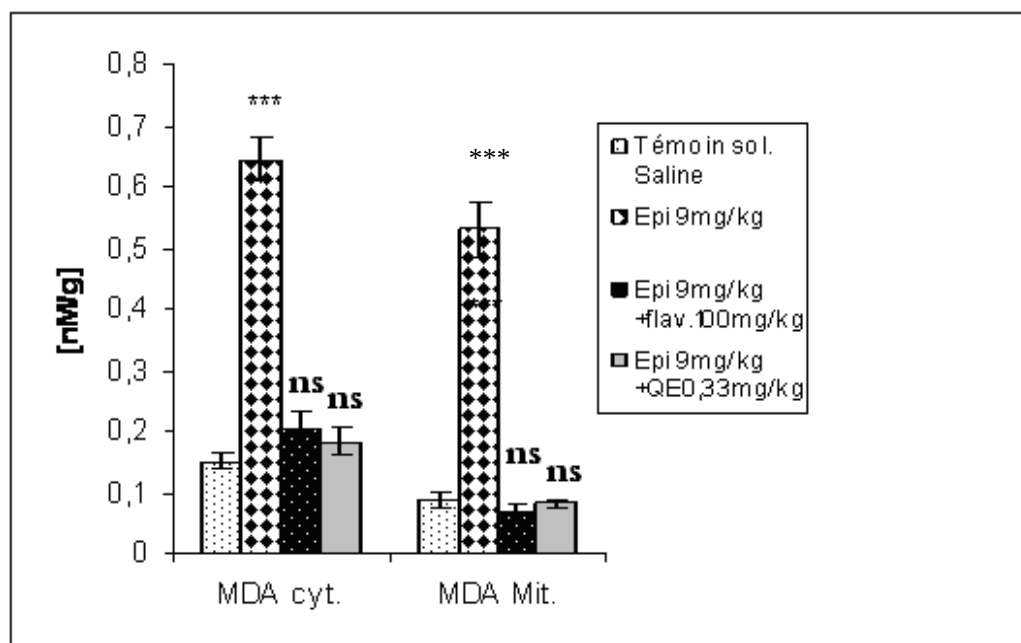


Figure 11'. Effet des flavonoïdes sur la teneur en MDA cytosolique et mitochondriale des hépatocytes sous l'effet d'un stress oxydatif induit par l'EPI chez les rats. Les valeurs sont données en moyenne $\pm$ Ecart type. *** $P < 0.001$ groupes comparés au témoin.

3.2. Résultats et interprétation

3.2.1. Effet de l'épirubicine sur la fonction hépatique et l'action hépatoprotecteur des flavonoïdes

L'effet de l'épirubicine sur les fonctions hépatiques avec ou sans l'extrait de flavonoïdes est illustré par la figure 10'. Sur cette figure on constate une élévation significative ($p < 0.05$, $p < 0.01$) du niveau sérique de TGO chez les rats traités par l'EPI (69.5 ± 10.53 UI/ml) contre (37 ± 5.35 UI/ml) pour le groupe témoin.

L'administration des extraits flavonoïdiques tamponne, l'effet du médicament anticancéreux et normalise la valeur de cette enzyme (38 ± 4.08 IU/ml) contre (37 ± 5.35 UI/ml) contre le témoin. Les mêmes remarques pour les variations de la TGP : avec épurubicine 50.25 ± 9.42 UI/ml contre EPI et flavonoïdes : 22.75 ± 5.85 IU/ml.

Les flavonoïdes de la RRL préservent le foie contre la toxicité provoquée par l' EPI, médicament anticancéreux

3.2.2. Evaluation *in vivo* de la peroxydation lipidique dans le cytosol et la mitochondrie

L'effet de l'EPI sur le métabolisme des lipides (cytosol et mitochondrie) est illustré par la figure 11'. La lipoperoxydation est matérialisée par une augmentation du MDA : 0.644 ± 0.035 nmol /g (cytosol) et 0.530 ± 0.059 nmol/g (mitochondrie) comparé au groupe témoin respectif : (0.151 ± 0.011 nmol/g) ; (0.089 ± 0.014 nmol/g).

Le prétraitement par les flavonoïdes diminue l'oxydation des lipides chez les rats et normalise la valeur du MDA : 0.206 ± 0.026 nmol/g (cytosol) ; 0.069 ± 0.013 nmol/g (mitochondrie) comparé au groupe témoin respectif : (0.151 ± 0.011 nmol/g) ; (0.089 ± 0.014 nmol/g).

Conclusion : Comme pour les transaminases hépatiques, les flavonoïdes atténuent le stress oxydatif des lipides induit par l'EPI.

Tableau 2. Effet préventif des flavonoïdes sur le système antioxydant des hépatocytes sous l'effet d'un stress oxydant induit par l'EPI chez les rats.

Paramètres Gr. de Rats	Protéines [mg/ml]	CAT [UI/mg Pr.]	CU/ZN SOD [UI/mg Pr]	GSH [mM/g liver]
Control Solu. Saline	5,93± 0.53	0,615± 0.08	15,32± 2.13	2,74 ± 0.21
Epi. 9mg/kg	4.2 ± 0.25*	0,334 ± 0.07***	06,007± 0.76**	0,53 ± .06***
Epi. 9mg/kg+ BE 100mg/kg	6.42 ± 0.55 ns	0.53 ± 0.05 ns	12 ± 0.731ns	2.46 ± 0.18 ns
Epi. 9mg/kg+QE 0.33mg/kg	6,02 ± 0.78 ns	0,51 ± 0.09 ns	12,26 ± 1.42 ns	2,63 ± 0.32 ns

Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type. Comparaisons faites entre les groupes traités et le groupe normal. * $P < 0.05$ représente une différence significative; ** $P < 0.01$ représente une différence hautement significative ; *** $P < 0.001$ représente une différence très hautement significative.

Tableau 3. Effet préventif des flavonoïdes sur la défense enzymatique antioxydant, CAT et Mn-SOD, dans les mitochondries des hépatocytes, sous l'effet d'un stress oxydant induit par l'EPI chez les rats.

Paramètres Gr, et Traitements	Pr. [mg/ml]	CAT [UI/mg Pr.]	SOD [UI/mg Pr.]
Control, phys. Saline	0. 291 ± 0.05	6. 264 ± 1.428	190. 56 ± 16.72
Epi.9mg/kg	0. 088 ± 0.02 *	01.099 ± 0.20 **	6.23 ± 2.69 ***
Epi. 9mg/kg+BE100mg/kg	0. 261± 0.04 ns	04.98 ± 0.93 ns	174. 25 ± 28.30 ns
Epi.9mg/kg+QE0.33mg/kg	0. 242 ± 0.03 ns	05. 82 ± 1. 27 ns	2 05.44 ±1.27 ns

Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type. Comparaisons faites entre les groupes traités et le groupe normal. * $P < 0.05$ représente une différence significative; ** $P < 0.01$ représente une différence hautement significative ; *** $P < 0.001$ représente une différence très hautement significative.

3.2.3. Evaluation des systèmes antioxydant dans le cytosol hépatique

La lecture du tableau 2 montre que l'administration de l'EPI provoque une diminution significative ($p < 0.001$, $p < 0.01$) des niveaux de GSH, CAT and Cu/Zn-SOD chez les rats traités avec l'EPI comparés au groupe normal. Par ailleurs, le prétraitement des animaux par l'extrait de flavonoïdes (100 mg/kg) et la quercétine (33 mg/kg) associés avec l'EPI, a normalisé la teneur cellulaire en ces facteurs antioxydants dans l'hépatocyte.

3.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique CAT et SOD dans les mitochondries

Comme dans le cytosol les teneurs mitochondriales des enzymes antioxydant, CAT et Mn-SOD sont significativement réduites ($p < 0.01$, $p < 0.001$) chez les rats traités par L'EPI seul comparés au groupe normal (tableau 3), le traitement des animaux par l'extrait de flavonoïdes et la quercétine qui a maintenu le niveau mitochondrial normal de ces enzymes.

Les activités enzymatiques sont normalisées lorsque les animaux subissent un prétraitement par les extraits flavonoïdes en particulier l'extrait acqueux.

3.3. Discussion

L'épirubicine est un anticancéreux dérivé de la doxorubicine. Cet analogue des anthracyclines est l'un des médicaments les plus utilisés en clinique thérapeutique à cause de son efficacité thérapeutique et sa faible cardiotoxicité [Li et al., 2005]. Il est métabolisé dans le foie chez les animaux et l'homme pour donner des métabolites tels que l'épirubicinol, EPI glucuronide [Weenen et al., 1984]. La doxorubicine et l'épirubicine sont considérés les plus toxiques des anthracyclines dans les hépatocytes [Weenen, 1984 ; Le Bot et al., 1988]. Malgré cette toxicité, l'EPI continue à être utilisé en Europe comme agent anticancéreux [Andersson et al., 1999]. Par ailleurs, il a été clairement démontré que la culture des myocardiocytes en présence d'EPI, manque de viabilité cellulaire suite à des perturbations des membranes cellulaires sous l'effet de la génération des radicaux libres oxygénés [Germain et al., 2003]. Les travaux de Ganziani (1983), le Bot et al. (1988) et Twelves et al. (1992) ont clairement démontré une corrélation entre l'EPI et l'activité des transaminases sériques chez les patients cancéreux ayant reçu ce médicament.

Cependant, l'effet de l'EPI sur le statut redox hépatocytaire n'est pas suffisamment investi par les chercheurs et selon la littérature consultée, les données biochimiques concernant l'hépatotoxicité induite par l'EPI *in vivo* restent fractionnées et confuses. Nous avons donc investi les marqueurs du stress oxydatif généré par l'EPI dans le cytosol et les mitochondries de l'hépatocyte. Cette présente étude se veut d'étudier également l'effet antioxydant et hépatoprotecteur des flavonoïdes extraits de RRL et de la quercétine contre l'hépatotoxicité induite par l'EPI.

Pour évaluer la toxicité engendrée par l'EPI, le médicament est administré en monodose de 9 mg/kg par voie intra péritonéale [Dobbs et al., 2003] pour assurer une toxicité aigue [Twelves et al., 1992]. Effectivement, après 24 heures de traitement, nous avons constaté une augmentation de 187 % (ASAT) et de 271% (ALAT). Cette élévation significative de l'activité des transaminases sériques expliquent une nécrose hépatocytaire sévère [Ganzina, 1983 ; Dobbs et al., 2003].

Par contre l'administration préventive des flavonoïdes à la dose de 100 mg/kg en association avec l'EPI a atténué l'effet provoqué par le médicament seul et normalise leurs activités comme dans le cas d'un traitement préventif par la quercétine (33 mg/kg). L'effet préventif

est observé dans le cas d'une hépatotoxicité induite par le CCl₄ [Ashork et al., 2002 ; Sanmugapriya and Venkataraman, 2006] ou le cyclophosphamide et la vinblastine [Lahouel et al., 2004 ; Kaur et al., 2006].

Le modèle de la toxicité hépatique induite par l'EPI n'est pas bien connu chez les animaux d'expérimentation, pour cette raison nous avons comparé nos résultats à l'effet provoqué par d'autres médicaments chimiothérapeutiques et substances hépatotoxiques.

Dans cette présente étude, les résultats ont montré clairement une élévation significative du MDA cytosolique et mitochondrial, lorsque les animaux sont traités avec l'EPI, traduisant une augmentation de la lipoperoxydation et par conséquent des dommages tissulaires par la formation excessive des radicaux libres [Sanmugapriya and Venkataraman, 2006]. Ce constat est susceptible d'expliquer la fuite des transaminases hépatiques et leur passage dans le sang. Par contre, l'administration préventive de l'extrait de flavonoïdes et de la quercétine associés avec l'EPI, maintiennent l'équilibre du système redox intrahépatocytaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes extraits de la Propolis dans le cas de l'hépatotoxicité induite par le cyclophosphamide et la vinblastine [Lahouel et al., 2004].

Le glutathion réduit (GSH), antioxydant non enzymatique, constitue la première ligne de défense antiradicalaire [Raja et al., 2007]. La déplétion du GSH hépatique est souvent associée à l'hépatotoxicité médicamenteuse [Hewawasam et al., 2003 ; Raja et al., 2007] comme le cyclophosphamide et la vinblastine [Lahouel et al., 2004]. Dans cette présente étude, les résultats ont révélé une déplétion significative du GSH hépatique chez les animaux traités à l'EPI. Par contre, la teneur hépatocytaire de ce tripeptide est maintenue à son niveau cellulaire normal quand les rats sont traités par l'EPI associé aux flavonoïdes. Cet effet démontre le pouvoir chémoprotecteur antiradicalaire des polyphénols en général. Ces molécules sont donc capables d'empêcher la chute du GSH et stimulent sa régénération à partir de GSSG [Martin, 2003] suite à la neutralisation des ROS par les flavonoïdes.

Comme nous l'avons au début de l'étude, les flavonoïdes sont des puissants scavengers de DPPH° d'une manière concentration-dépendante (page 44).

Les ROS, par une vie très courte et une réactivité élevée, sont analysés indirectement par l'évaluation des enzymes antioxydantes : la SOD et la CAT. La SOD dismute les anions O_2° en H_2O_2 et O_2 , La CAT décompose H_2O_2 en O_2 et H_2O . Ces réactions constituent un ensemble soutenu contre les ROS [Venukumar et Latha, 2002 ; Halliwell et Gutteridge, 2007]. La réduction de l'activité de la SOD et la CAT est observée non seulement dans le cytosol mais également dans les substructures cellulaires, les mitochondries chez les animaux traités avec de l'EPI (médicament anticancéreux) où nous avons observé une chute importante pour la Mn-SOD. Ce résultat peut expliquer une production intensive de l'anion suproxyde suite au traitement des animaux par le médicament. Par contre, le prétraitement des animaux par les extraits de flavonoïdes atténue complètement ces effets puisque les taux du SOD et de CAT reviennent à la normale.

Ces résultats expliquent la propriété antioxydante des flavonoïdes démontrés dans plusieurs travaux [Favier, 2003 ; Marfak, 2003; Servais, 2004 ; Milane, 2004 ; Halliwell et Gutteridge, 2007].

Conclusion

Dans la présente étude, l'évidence de l'hépatotoxicité sous l'effet de l'EPI est confirmée. Cet anticancéreux est susceptible de causer un dommage profond suite à la production intensive de radicaux libres provoquant un déséquilibre dans le statut redox cellulaire au profit des prooxydants. En effet, il a été constaté que le système de défense antioxydant a diminué significativement tant dans le cytosol que dans les mitochondries, organelles principales de la production des anions suroxydes (par la chaîne respiratoire en détress), laissant la place aux prooxydants responsables de la lipopéroxydation et la destruction des structures membranaires. Les cellules hépatiques une fois lésées et leurs membranes perforées libèrent des enzymes transaminasiques (ASAT et ALAT) dans le sang.

L'extrait flavonoïdique et la quercétine (un flavonoïde non glycosylé de référence) jouent un rôle chémoprotecteur vis-à-vis du stress oxydatif produit dans le cytosol et les mitochondries de l'hépatocyte, lors de l'administration de L'EPI aux animaux de laboratoire. Par leur pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène, ils possèdent une activité antioxydante.

Il ressort clairement de notre étude que les extraits de flavonoïdes de la plante *Ranunculus repens* L et de la quercétine sont des substances intéressantes riche en thérapeutique, par leur pouvoir antioxydant et chémoprotecteur dans le foie.

Cependant, une investigation plus approfondie est nécessaire pour élucider certaines zones d'ombres et en expliquer les mécanismes. Malgré la faisabilité de l'utilisation d'un extrait flavonoïdique de la RRL en conformité avec la pratique thérapeutique quant à l'utilisation de cette plante par les populations en compagnie de la région de Jijel (Algérie), il est bien recommandé de mener une étude phytochimique visant l'identification et la purification des principes actifs de cet extrait. Par ailleurs, le fait que le statut redox mitochondrial est perturbé par l'EPI, il serait intéressant d'étudier l'effet de ce dernier sur le fonctionnement mitochondrial et l'éventualité d'une action proapoptotique des anthracyclines (comme l'EPI).

Conclusion générale

Dans ce travail, l'extraction des polyphénols montre une richesse de la plante *Ranunculus repens* L en polyphénols avec un taux très élevé des flavonoïdes. Ces composés phénoliques s'avèrent d'un pouvoir antiradicalaire important comparés à la vitamine C.

Dans la première partie de ce travail, les résultats obtenus montrent une importante activité antihyperglycémique des flavonoïdes de la plante RRL. Cet effet se traduit par une internalisation de glucose sanguin dans les tissus périphériques, comme le foie et son stockage substantiel sous forme de glycogène hépatique et également par une activation de l'insulinosécrétion chez les animaux de laboratoire. L'administration de ces composés phénoliques à un modèle de rat diabétique induit par l'alloxane montre un effet antidiabétique dans le temps soutenant ainsi l'utilisation de cette plante en tradimédecine contre le diabète.

Dans ce travail, le traitement des rats alloxanisés par l'extrait butanolique de flavonoïdes et de la quercétine permet la mise en évidence d'un effet chémoprotecteur et préventif de ces substances contre l'induction alloxanique du diabète. Dans ce contexte, les résultats de la recherche de mécanismes d'action de ces composés montrent une activité antioxydante permettant la neutralisation des radicaux libres oxygénés générés par l'alloxane au niveau des cellules pancréatiques. Effectivement le statut redox cellulaire est maintenu à son équilibre en normalisant le taux des systèmes antioxydant des cellules pancréatiques (SOD, CAT, GSH) chez les rats alloxanisés traités par les flavonoïdes ce qui empêche une lipoperoxydation excessive et protège ainsi la mort des cellules β et l'installation du diabète.

Dans la deuxième partie de notre travail, l'étude de l'effet chémoprotecteur et préventif des flavonoïdes contre le déséquilibre du statut redox cellulaire a été étendue à une hépatotoxicité induite par l'épirubicine, médicament anticancéreux. Après la mise en évidence de la toxicité cytosolique et mitochondriale de cette anthracycline exprimée par un dysfonctionnement hépatique (libération dans le sang des transaminases hépatiques) et un stress oxydant, cette étude a permis de montrer encore une fois le potentiel antioxydant de ces substances. Le déséquilibre de la balance prooxydants / antioxydants au profit des ROS tant dans le cytosol que dans les mitochondries et le dysfonctionnement hépatique (fuite des transaminases), obtenus après l'administration de l'épirubicine aux animaux de laboratoire, est normalisé par

un prétraitement des rats avec les flavonoïdes de la plante RRL et de la quercétine pure. Cet effet est exprimé encore une fois par la normalisation des paramètres antioxydants tels que les enzymes antioxydantes (SOD et CAT) ou le GSH dans le cytosol et les mitochondries. Cet équilibre redox constaté dans les deux compartimentations, prévient une peroxydation pathologique dans le foie qui reste fonctionnel suite à une normalisation des transaminases chez les animaux traités avec l'EPI.

Il ressort clairement de ce travail qu'en plus de leur activité antihyperglycémique et antidiabétique, les extraits de flavonoïdes de la plante *Ranunculus repens* L (comparé à la quercétine) sont pourvus d'un pouvoir antiradicalaire et antioxydant pouvant jouer un rôle chémoprotecteur et préventif contre la pancréatotoxicité et l'hépatotoxicité induite respectivement par l'alloxane et l'épirubicine.

Bibliographie partie 2

Albano E., French S., Ingelmann-Sundberg M., 1999. Hydroxethyl radicals in ethanol hepatotoxicity, *Frontiers in Bioscience*; 4: 533-540.

Albano E., Tomasi A., Ingelmann-Sundberg M., 1994. Spin trapping of alcohol-derived radicals in microsomes and reconstituted systems by electron spin resonance; *Meth. Enzymo.*, 233: 117-127.

Allen, A., 1992. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semiological Oncology* 19: 529- 542.

Andersson, B., Eksborg, S., Vidal, R., Sundberg, M., Carlberg, M., 1999. Anthraquinone-induced cell injury: Acute toxicity of carminomycin, epirubicin, idarubicin and mitoxantrone in isolated cardiomyocytes. *Toxicology* 135: 11-20.

Arora, S., kaur, k., Kaur, S. 2003. Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals. *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis supplements* 1: 301-312.

Ashork Shenoy, K., Somayaji, S.N., Bairy, K.L., 2002. Evaluation of hepatoprotectiveactivity of Gingo bilobain rats. *Indian Journal of Pharmacology* 46 (2): 170-174.

Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z., 1989. Plasma selenium-dependent glutathioneperoxidase. *J.Biol. Chem.* , 2 : 15850-15855.

Beauchamp C., Fridovich I., 1971. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem.* 44:276-287.

Bissel D.M., Gores G. J., Laskin D.L., Hoorhagle J.H., 2001. Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. *Hepathology* 33 : 1009-1013.

Borg J.M., Reeber A., 2008. Biochimie métabolique, *Ellipses*, France, pp: 257-269.

Bors W., Michel C., Stettmaier K., 1997. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* 6: 399-402.

Burton G.W., Ingold K.U., 1984. 13-carotene an unusual type of lipid antioxydant. *Sciences*, 224: 569-573.

Cao G., Sofic E., Prior RL., 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22:749-60.

Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Crompton M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *J. Biochem.*, 341: 233-249.

Clairborne A., 1985. Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), CRC handbook of methods for oxygen radical research. *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp. 283-284.

Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress. in *Apoptosis J. immunol. Methode*, 265, p. 49-72.

Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A., 2002. Regulation of gene expression by reactive oxygen, *Signalling*, 14, p. 879.

Delattre J., Beaudoux J-L., Bonnefort-Rousselot D., 2005. Radicaux libres et stress oxydant : Aspect biologiques et pathologiques. Tec et Doc Lavoisier, Londres -Pris -New York.

Dobbs, N.A., Twelves, C.J., Gregory, W., Cruikshank, C., Richards, M.A., Rubens, R.D., 2003. Epirubicin in patients with liver dysfunction: development and evaluation of a novel dose modification scheme. *European Journal of Cancer* 39, 580-586.

Droge W., 2002. Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.

Duvall E., Wyllie A.H., 1986. Death and cell. *Immunol. Today*; 7:115-119.

Ellman G. L., 1959. Plasma antioxidants. *Arch. Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77

Favier A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique*, novembre, pp: 108-115.

Farber, J.L., 1994. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Environmental Health perspectives* 102 : 17-24.

Fulbert J.C., Cals M.J., 1992. Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol.*, 49(1) : 66-77.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, novembre-décembre: 91-96.

Ganzina, F., 1983. 4-Epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data. *Cancer Treat Rev* 10: 1-22.

Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., 2002. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.*, 383(6), p. 93.

Germain E., Bonnet P., Aubourg L., Grangepon M.C., Chajès V., Bounoux P., 2003. Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacological Research* 47: 111-117.

Goebel, M., 1993. Oral idarubicin -an anthracycline derivative with unique properties. *Annals of Hematology*, 66, 33-43.

Haliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3 th ed. *Oxford; Clarendone press*; 22.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 th ed. *Oxford university Press*, pp: 20-31.

Halliwell B., Cross C. E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Parps.* 102 (Suppl. 10): 5-12.

Haton C., 2005. Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thèse de doctorat de l'université de Paris VI*, France, pp :43-58.

Harrison R., 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now, *Free Radic-bio-med* 33, pp. 774-797.

Henderson L.M., Chappell J.B., Jones O.T.G., 1989. Superoxide generation is inhibited by phospholipase A. *Biochem. J.*, 2: 249-255, 1989.

Hewawasam, R.P., Jayatilaka, K.A.P.W., Pathirana, C., Mudduwa,, L.K.B., 2003. Protective effect of *Asteracantha longifolia* extracts mouse liver injury induced by carbon tetrachloride and paracetamol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55: 1413-1418

Hill K.E., White J.G., Rao G.H.R., 1989. Role of glutathione and glutathione peroxylase in human platelet arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins*, 3: 21-32.

Kaur, G., Alam, M.S., Jabbar, Z., Javed, K., Athar, M., 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of ethnopharmacology* 108: 240-348.

Knecht K.T., Mason R.P., 1988. In vivo Radical trapping and biliary secretion of Radical adducts of carbon tetrachloride-derived free Radical metabolites. *Drug Metab. Dispos.* 813-817.

Koolman J., Rohm K.M., 1999. Atlas de poche de biochimie. Edition *Medecine Science Flammarion*, pp. 189-221.

Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P., 2004. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamid and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxidation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie* 52 : 314-322.

Le Bot M.A., Bégué J.M., Kernaleguen D., Robert J., Ratanasavanh D., Riché C., Guillouzo A., 1988. Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin,

epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 37: 3877-87.

Li R., Dong L., Huang J., 2005. Ultra performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma. *Analytica chimica Acta* 546: 167-173.

Lowry OH., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193 : 265-275.

Marfak A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges*, pp 24-42.

Martin F., 2003. Vannin-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditerranée, centre de l'immunologie de Marseille- Luminy NCERM U 136-CNRS MR6102*, pp.17-19.

Mates J.M.; Perez-Gomez C., Nunez de Castro I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32: 595-603.

Mazué, G., Iatropoulos, M., Imondi, A., Castellino., S., Brughera, M., Podestà, A., Della Torre, P., Moneta, D., 1995. Anthracyclines: a review of general and special toxicity studies. *Int. J. Oncology* 7: 713-726.

Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur*. pp : 13-36.

Nielsen, D., Jensen, J.B., Dom Bernowski, P., Munck, O., Fogh, J., Brynjoff, L., Havsteen, H., Hansen, M., 1990. Epirubicin cardiotoxicity: a study of 135 patients with advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 8: 1806-1810.

Ohkawa H., Ohishi, N., Yagi K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.

Olanow C.W., 1993. Trends in *Neuro. Science*. 16, p. 439-444.

Pong, K., 2003. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opinion in Biological therapy* 3: 127-139.

Pannala, A. S., Rice-Evans, C. A., Haliwell, B., Singh, S., 1997. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochemical and Biophysical research Communications* 232: 164-168.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J., 1999. Evaluation du stress oxydant: une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*. 4, p. 148-154.

Pincemail J., Siquet J., Chappelle J.P., 2000. Evaluation des concentration plasmatiques en antioxydants anticorps contre les LDL oxydées et homocysteine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann .Biol. Chin.* 58 : 178-185.

Pein F., Vassal G., Sakiroglu C., Tournade MF., Lemerle J., 1995. Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives Pédiatriques.* 1995 ; 2(10) : 988-999.

Rahman I., Morrisson D., Donaldson K., Maccnee W., 1996. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154: 1055-1060.

Raja, S., Nazeer Ahamed, K.F.H, Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P.K., 2007. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of ethnopharmacology* 109: 41-47.

Reitman S., Frankel S., AMER J., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American journal of Clinical Pathology* 28: 56-63.

Rustin P., Chrétien D., Bourgeron T., Gérard B., Rotig A., Munnich A., 1994. Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chem. Acta.* 228 : 35-51.

Ryter S.F., Tyrell R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways : role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro and antioxidant properties. *Free Rad. Res.*, 36: 1299-1306.

Servais S., 2004. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3, *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1*, France, pp. 19-35.

Schisler N.J., Singh S.M., 1989. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med.* 7: 117-123.

Sinha B.K., Mimnaugh E.G., Myers C.E., 1989. Adryamicin activation and oxygen free Radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res.* 49 : 3844-3848.

Singal P.K., Petkau A. Gerrard J.M., 1988. Free Radicals in health and disease. *Mol.Cell. Biochem.* 121-122.

Sanmugapriya E., Venkataraman S., 2006. Studies of hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. Seeds on CCl4 induced acute hepatic injury in experimental rats. *Journal of ethnopharmacology* 105: 154-160.

Thannickal V. J., Fanburg B. L., 2000. Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol.* 279: L1005- L1028

Tillement J.H., 2001. Protection in vitro des fonctions mitochondriales cérébrales par le E-resveratrol dans les états d'anoxie suivie de réoxygénation. *Bull. Acad. Med.*, 185 (8):

1429-1445.

Twelves, C.J., Dobbs N.A., Michael, V., 1992. Clinical pharmacokinetics of epirubicin : The importance of liver biochemistry tests. *Br. J. Cancer* 66: 765-769.

Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast A., 1996. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 331-342.

Venukumar, M.R., Latha, M.S., 2002. Antioxidant activity of *Curculigo orchoides* in carbon tetrachloride induced hepatopathy in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 17: 80-87.

Von Sonntag C., 1987. Enzymes (chap. 14), *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, London, p. 429.

Weenen, H., Van Maanen, J.M.S., de Planque M.M., 1984. Metabolism of 4' modified analogs of doxorubicin. Unique glucuronidation pathway for 4'-epidoxorubicin. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol* 20: 919-926.

Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., Toyokuni S., 2000. Free radical in chemistry, biology and medicine. Ed. *Oica International*, London, pp: 31-42.

Annexe 1

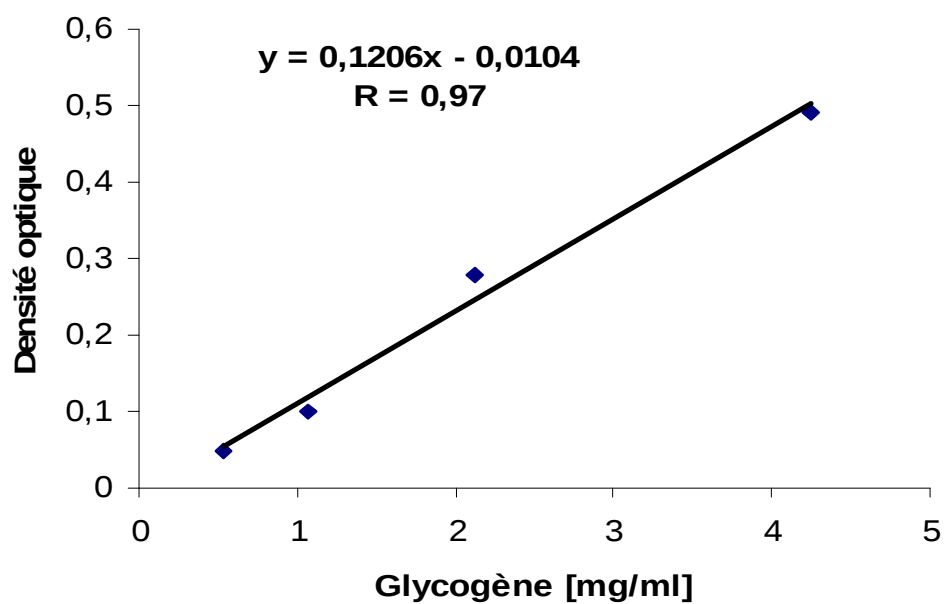


Figure 1. Courbe d'étalonnage de glycogène avec le réactif de Lugol (Moyenne de 3 essais).

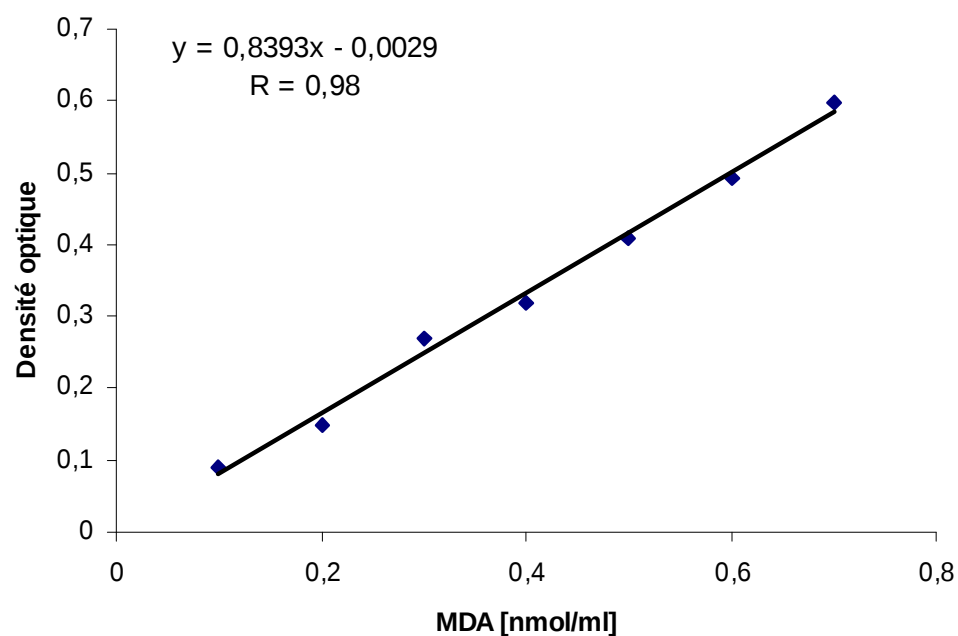


Figure 2. Courbe d'étalonnage du MDA avec le réactif TBA (Moyenne de 3 essais).

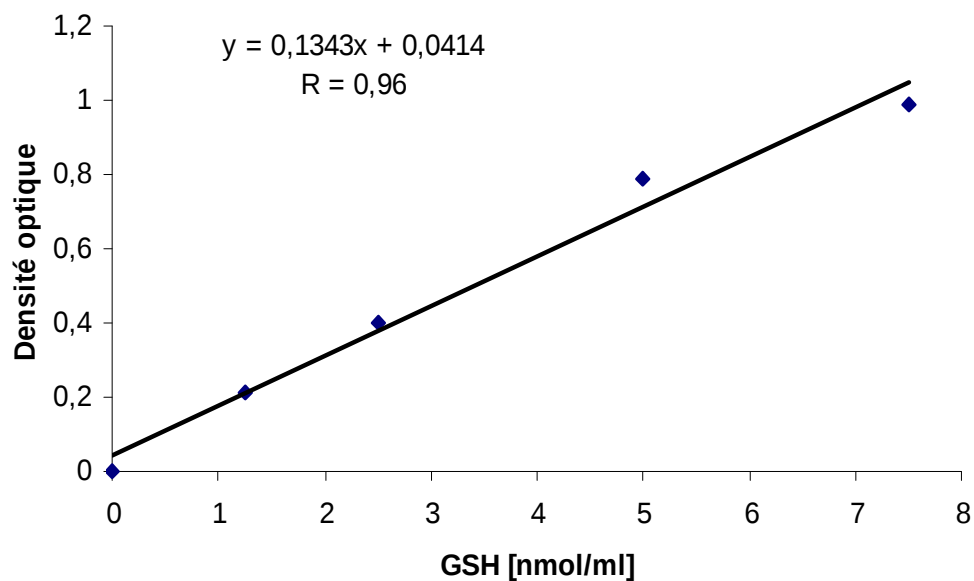


Figure 3 : Courbe étalon du GSH avec le réactif de DTNB, (Moyenne de trois essais).

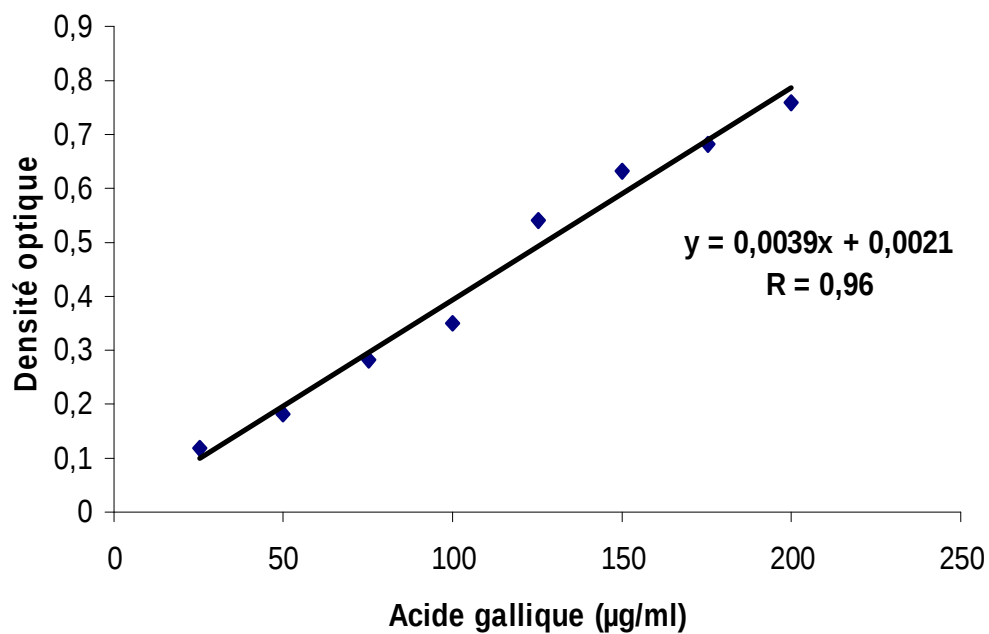


Figure 4 : Courbe étalon du dosage des polyphénols (acide gallique comme standard), (Moyenne de 3 essais).

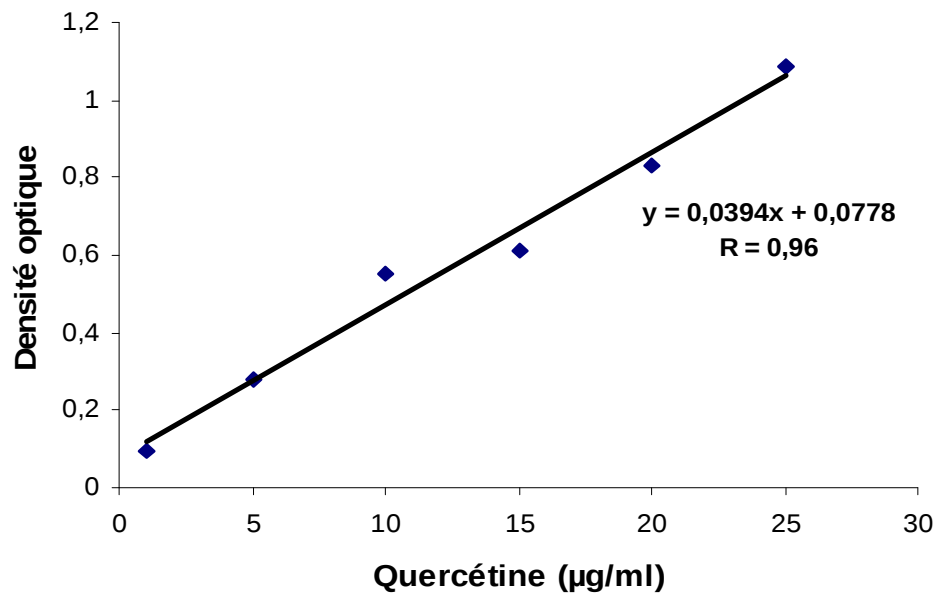


Figure 5 : Courbe étalon du dosage des flavonoïdes (quercétine avec le réactif de L'AlCl₃ Moyenne de 3 essais).

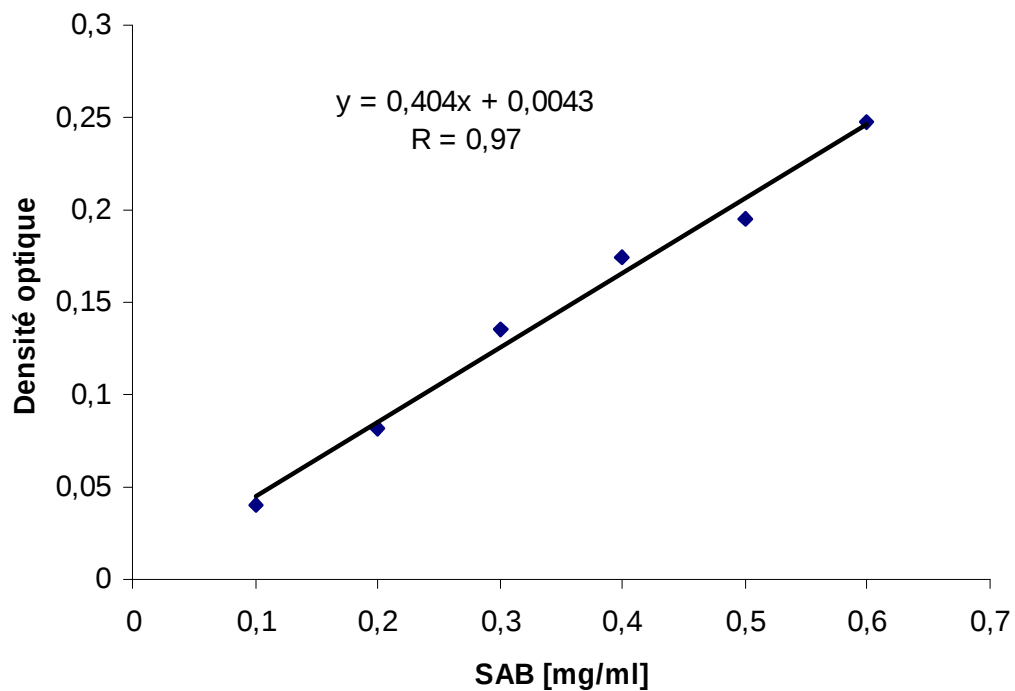


Figure 6 : Courbe étalon du dosage des protéines (sérum albumine bovine comme standard avec le réactif de Folin, moyenne de trois essais).

Annexe 2

Tableau 1 : Variation de la tolérance au glucose en fonction du temps après le traitement des rats par les différents types de flavonoïdes.

Temps Rats traités	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Témoin normal Sol. Physiolog.	0.76 ± 0.08	0.75 ± 0.08	0.81 ± 0.02	0.85 ± 0.05	0.82 ± 0.03
Témoin hyperglycémique	0.86 ± 0.06	1.13 ± 0.08	1.44 ± 0.05	1.65 ± 0.12	1.07 ± 0.06
Groupe traité Aglycones	0.71 ± 0.05ns	1.05 ± 0.11 ns	1.20 ± 0.04 **	0.92 ± 0.03***	0.55 ± 0.02 ***
Groupe traité Monoglycoside	0.80 ± 0.04ns	1.00 ± 0.08 ns	1.17 ± 0.04 **	0.65 ± 0.12***	0.46 ± 0.02 ***
Groupe traité di et triglycoside	0.83 ± 0.10ns	0.95 ± 0.06 *	1.12 ± 0.15 *	0.55 ± 0.12***	0.40 ± 0.02 ***
Groupe traité Glibenclamide	0.74 ± 0.09ns	0.91 ± 0.09 ns	1.01 ± 0.12**	0.48 ± 0.01***	0.37 ± 0.02 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Ecart type., test de Student : ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, groupes comparés au témoin hyperglycémique.

Tableau 2 : Variation de l'insulinémie chez les rats normoglycémiques traités par les flavonoïdes.

Traitement des animaux	Temps après le traitement		
	t = 0 min	t = 60 min	t = 120min
	Insulinémie (μU/ml)		
Groupe Témoin normal, Solution physiologique	0,228±0.04	0,196±0.022	0,245±0.085
Groupe traité 200mg/kg de flavonoïdes	0,165±0.053 ns	0,831±0.061***	1,031±0.089***
Groupe standard, 2.5 de mg/kg de glibenclamide	0,215±0.094 ns	1,692±0.106***	1,952±0.122***

Les valeurs sont données en Moyenne ± Ecart type, n=5. ; *** $P < 0.001$, les groupes traités sont comparés avec le groupe témoin normal.

Tableau 3. Variation de la glycémie en fonction du temps et de la dose chez les rats diabétiques traités en aigu par l'extrait butanolique.

Temps (min)	La glycémie (g/l)				
	Témoin diabétique	Diabétique traité + EB 200 mg/kg	Diabétique traité + EB 400 mg/kg	Diabétique traité + EB 600 mg/kg	Diabétique standard + Gliben. 2.5 mg/kg
0	3.50 ± 0.098	3.45 ± 0.183ns	3.30 ± 0.097ns	3.35 ± 0.154ns	3.51 ± 0.138ns
30	3.45 ± 0.112	3.21 ± 0.102*	3.12 ± 0.063*	2.90 ± 0.160***	2.65 ± 0.150***
60	3.42 ± 0.121	3.10 ± 0.126**	2.78 ± 0.196***	2.68 ± 0.207***	2.12 ± 0.135***
90	3.48 ± 0.084	2.80 ± 0.159***	2.65 ± 0.16***	2.40 ± 0.152***	2.00 ± 0.116***
120	3.52 ± 0.072	2.75 ± 0.128***	2.25 ± 0.12***	1.90 ± 0.175***	1.75 ± 0.153***

Les valeurs sont données en Moyenne ± Ecart type, n=5. *P<0.05; **P< 0.01; ***P< 0.001, groupes comparés aux témoins diabétiques.

Tableau 4 : Variation de la glycémie dans le temps (à J+28), chez les rats diabétiques traités par l'extrait butanolique et le standard.

Rats \ Temps	J+7	J+14	J+21	J+28
Gr.diabétique	2,61 ± 0,13	2,85 ± 0,17	2,43 ± 0,11	2,21 ± 0,16
Gr.Tr.par EB	1,72 ± 0,09**	1,54 ± 0,1***	1,62 ± 0,12***	1,49 ± 0,07**
Gr.Tr.par Gliben.	1,65 ± 0,08**	1,45 ± 0,11***	1,61 ± 0,09***	1,53 ± 0,12**

Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type. (test de Student: ** p< 0.01, *** p < 0.001)

* : groupes comparés au groupe témoin diabétique.

Abstract

In the present study, the antihyperglycemic, anti-diabetic and antioxidant effects of the *n*-Butanol extract (BE) obtained from air part of *Ranunculus repens L* plant and quercetin were investigated in normal glucose-fed hyperglycemia, in alloxan induced diabetes and in epirubicin (EPI) toxicity of the rats. The results of this study show antihyperglycemic and antidiabetic activity of the phenolic compounds. And to elucidate a possible mechanism of action of this plant extract, the glycogen liver rate, insulin secretion and the in vitro chelating effect of glucose by plant compounds were also investigated. The flavonoids reduced significantly blood glucose in a dose-dependant manner (200,400,600 mg/kg) in both hyperglycemic and diabetic rats after oral administration as oral hypoglycemic drug, glibenclamide (2.5 mg/kg). We show that flavonoids extracts was able significantly to complex the glucose in vitro, induce insulin secretion of beta cells and to active glycogenesis in liver as shown by the abundance of glycogen granulation in liver histochemical preparation after administration of flavonoids extract. In addition these flavonoids extract and quercetin possess a chemoprotector power against malondialdehyde formation (MDA, lipid peroxidation product) and reduction of antioxidant systems such SOD, CAT and GSH in alloxan-induced diabetic rats. The equilibrium disorder of redox status after alloxan administration is reestablished by flavonoids pretreatment of alloxanised rats. The flavonoids markedly inhibited lipid peroxidation process in pancreatic cells and the proportioning of cytosolic SOD, CAT and GSH showed a significant elevation to establish equilibrium of redox status and consequently protect beta cells and prevent diabetes.

The anticancer therapy with EPI produces acute hepatotoxicity by generation of free radicals. However, the oxidative status of the liver cells and mitochondria has been investigated in EPI toxicity of the rats. In this present study, we investigated in first the prooxidant effect of EPI and its implication on both hepatic cells and mitochondria function. EPI injection in rats at dose of 9 mg/kg induced hepatic dysfunction revealed by a significant increase in serum of glutamate oxaloacetate transaminases and glutamate pyruvate transaminases. Oxidative stress in liver cells and mitochondria was provoked by EPI since a statistically significant reduction of CAT, SOD and GSH levels, and significant increase of MDA level, indicator of lipid peroxidation which could perforate the biologic

membranes, were observed. In second, the protective effect of quercetin (33 mg/kg) and flavonoids extract of RRL (100 mg/kg) against oxidative stress induced by EPI was also investigated. Indeed, the pretreatment of rats with flavonoids protected liver cells and mitochondria from oxidative stress permitting, on one hand, the prevention of hepatic dysfunction on maintaining the normal level of serum transaminases following inhibition of their hepatic leakage by preventing lipid peroxidation. Thus, the prevention of the cellular membranes perforation, and in the other hand maintaining also antioxidant defense system in mitochondria and cytosol of hepatocytes.

Taken together, this data reveal that flavonoids extract of *Ranunculus repens* L extract and quercetin possess an interesting virtue to be antihyperglycemic and antidiabetic with positive action on liver glycogenesis and insulin secretion. These phenolic compounds have also antiradical and antioxidant power that confers them chemoprotection role against oxidative stress generated in pancreas cells and liver respectively by alloxan and epirubicin.

Key words: flavonoids extract; *Ranunculus repens* L; alloxane; antidiabetic effect; épirubicin; Hepatotoxicity; Oxidative stress; Quercetin; Hepatoprotective effect.

Nom : KEBIECHE
Prénom : Mohamed
Doctorat en sciences : option biochimie

Thème : *Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L :
Effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'épirubicine*

Résumé

L'effet antidiabétique et antioxydant des extraits de flavonoïdes de *Ranunculus repens* L et de la quercétine sont étudiés dans le cas du diabète induit par l'alloxane et l'hépatotoxicité provoquée par l'EPI chez les rats *Wistar Albinos*. Ces composés phénoliques se sont montrés antihyperglycémiques et antidiabétiques. Ils ont également une capacité antidiabétogène dans le cas du diabète induit par l'alloxane qui déséquilibre le statut redox des cellules pancréatiques au profit du stress oxydatif. L'activité de ces flavonoïdes se traduit par un effet significativement positif sur l'internalisation cellulaire du glucose par les tissus périphériques et le stockage de glycogène hépatique, un effet insulinosécrétoire sur les cellules β et une action antioxydante et chémoprotectrice des cellules pancréatiques intoxiquées par l'alloxane chez le rat. Cet effet préventif des composés phénoliques sur les cellules est exprimé par la réduction de la lipoperoxydation avec un taux normal du MDA et la normalisation du niveau cytosolique des systèmes antioxydants (SOD, CAT et GSH) ce qui maintient, par conséquent, un statut redox cellulaire en équilibre après l'administration de l'alloxane. Par ailleurs, la thérapie anticancéreuse avec l'EPI induit une hépatotoxicité néfaste sur les cellules hépatiques et la fonction des mitochondries. L'injection de l'EPI chez le rat, à la dose de 9 mg / kg, induit un dysfonctionnement hépatique se révélant par une augmentation significative des taux sériques de ASAT et ALAT. L'EPI provoque un stress oxydatif dans le cytosol et les mitochondries des hépatocytes en réduisant significativement la CAT, la SOD et GSH et en augmentant également le niveau du MDA dans les deux compartimentations cellulaires, résultat d'une peroxydation excessive qui provoque la lyse et la libération des transaminases hépatiques et leur augmentation significative dans le sang. Or le prétraitement des rats avec les flavonoïdes protège les cellules du foie et les mitochondries de l'attaque des ROS générés par l'EPI permettant ainsi, d'une part la prévention des rats d'un dysfonctionnement hépatique et d'autre part le maintien d'un statut redox équilibré tant dans le cytosol que dans les mitochondries des hépatocytes. Ils s'avèrent, en fin de cette étude, que les flavonoïdes extraits de RRL ou sous forme pure sont dotés d'une activité antihyperglycémique et antidiabétique avec une action positive sur la glycogénèse hépatique et l'insulinosécrétion. Ces composés phénoliques sont pourvus également d'un pouvoir antiradicalaire et antioxydant qui leur confère un rôle chémoprotecteur contre le stress oxydatif généré dans le foie et le pancréas respectivement par l'EPI et l'alloxane.

Mots clés: Alloxane, diabète, flavonoïdes, *Ranunculus repens* L ; effet antidiabétique ; épirubicine; hépatotoxicité; stress oxydant; quercétine; chémoprotecteur.

Encadreur : MERAIHI Z. Prof.

Soutenue à L'UMC, le 22/11/2009.