

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
UNIVERSITÉ DES FRÈRES
MENTOURI CONSTANTINE

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie /Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° série:

N° ordre:

Mémoire de Master

Spécialité : Biochimie/Nutrition Moléculaire et Santé

Présenté par

MARHOUNE Nesrine et BOULEBTINA Fouzia

Extraction des polyphénols ou des flavonoïdes des feuilles de mûres sauvages (*Rubus fruticosus*) **par le** méthanol ou dans un milieu aqueux: *Test de tolérance au glucose et activité anti-oxydante*

Soutenu le 04 Juillet 2017

Devant le jury :

Président : Mme ZAMA DJ.

Professeur, Université Frères Mentouri Constantine 1

Encadreur : Mme MERAIHI Z.

Professeur. Université Frères Mentouri Constantine 1

Co-encadreur: Mr BOULDJADJ R.

M.A.A, Université Frères Mentouri Constantine 1

Examineur: Mme DAKHMOUCHE SH.

M.C.B, ENS, Assia djebar constantine.

Année Universitaire 2016/2017

Remerciements

Ce sujet a été proposé par Madame MERAIHI Zahia, Professeur Université Frères Mentouri Constantine 1, département de Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des sciences de la nature et de la vie, on lui exprime nos plus vifs remerciements ainsi que nos profondes gratitude pour avoir orienté, dirigé ce travail et également pour tous ses conseils dans l'élaboration et la conception de ce mémoire.

Nous exprimons nos sincères remerciements à notre Co-encadreur monsieur BOULDJADJ Redouane qui nous dirigées ce travail dans le laboratoire, Avec une grande patience, consiels, et sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions vivement les membres de jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail, notamment :

Madame ZAMA Djamilia professeur à l'université de Constantine, d'avoir accepté de juger ce travail.

Madame DAKHMOUCHE SH, université Assia djebar Constantine examinatrice de ce travail.

Nos derniers remerciements, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

**A celles qui a inséré le gout de la vie et le sens de la
Responsabilitémerci**

MERE

**A celui a été toujours la source d'inscription
et le courage ...merci**

PERE

A mes frères

A mes sœurs

A toutes mes amis de près ou de loin

A tout ma famille

Boulebtina Fouzia

Dédicace

Grâce à toi mon dieu, je m'incline devant ta puissance et ta
miséricorde,
pour te remercier de l'aide et du courage que tu m'as donné au
cours de la
réalisation de ce modeste travail, que je dédie :

A ma mère : Zouhra

A mon père: Abd El hak

A mes frères : Mohamed, Hichem et Ishak

A toute ma famille;

A tous mes camarades de promotion.

A mon binôme Fouzia

Nesrine

Liste des figures

Figure01 : Les principales classes des polyphénols.....	3
Figure02 : Structure des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.....	4
Figure03 : Structure des acides Hydroxycinamiques.....	5
Figure04 : Structure des lignanes.....	5
Figure05 : Structure de base des stilbènes (trans ou cis).....	6
Figure06 : Structures chimiques de resveratrol (A), pterostilbène(B) et du 3'-hydroxypterostilbène (C).....	6
Figure07 : Squelette de base des flavonoïdes.....	7
Figure 08 : Structure de tanins condensés.....	11
Figure09 : Structure de tanins hydrolysable (1-O-galloyl-4,6-hexahydroxydipheno β-D-glucose (OGβDG).....	11
Figure10 : Biosynthèse des polyphénols végétaux.....	12
Figure11 : Les effets possibles de la quercétine sur le foie, le muscle, le pancréas et l'intestin grêle pour maintenir un niveau de glycémie normal.....	14
Figure12 : Rôle des flavonoïdes dans le traitement de l'hyperglycémie en ciblant divers cellulaires dans le pancréas, le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc.....	14
Figure13 : hypothétique qui montre l'effet possible des flavonoïdes aux niveaux de certains médiateurs inflammatoires dans les macrophages.....	16
Figure14 : Effet du resvératrol sur le processus d'athérosclérose.....	17
Figure15 : Rôle des polyphénols dans la santé humaine.....	17
Figure16 : Formation des radicaux libres des ROS au niveau de la chaîne respiratoire.....	20
Figure17 : Métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires.....	21
Figure18 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.....	22

Figure19 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine.....	23
Figure20 : Oxydation des fonctions thiols de la cystéine.....	23
Figure21 : Attaque radicalaire des protéines.....	24
Figure22 : Régulation de la production des espèces oxygénées activées (EOA) par des systèmes antioxydants.....	25
Figure23 : La réaction d'oxydoréduction de l'acide ascorbique.....	27
Figure24 : Structure des 2 formes actives de vitamine D (D2 et D3).....	28
Figure25 : structure de l'alpha-tocopérol.....	28
Figure26 : Structure des carotènes.....	29
Figure 27 : Représentation schématique des gènes sélectionnés dans la région HLA.....	31
Figure 28 : Structure et récepteur de l'insuline.....	33
Figure 29 : La voie de signalisation de l'insuline.....	34
Figure 30 : Inhibition du signal insuline par phosphorylation sur Ser/thr des protéines IRS.....	35
Figure31 : Systématique de <i>Rubus fruticosus</i> , famille des rosaceae.....	36
Figure32 : <i>Rubus fruticosus</i> :tige et feuilles au stade de bourgeonnement (A) et ses fruits (B).....	37
Figure33 : La répartition mondiale de la Ronce.....	37
Figure34 : Cycle de développement de <i>Rubus fruticosus</i>	39
Figure35 : Profil de l' HPLC représente la nature des polyphénols qui compose les fruits de mûres.....	39
Figure36 : Structures de certains composés phénoliques typiques détectés dans les fruits de mûres.....	40
Figure37 : Polyphénols identifiés dans l'extrait de feuilles de mûre, en utilisant l'analyse.....	40

Figure38 : Géolocalisation du matériel végétal récolté de l'El KHROUB.....	43
Figure39 : Les feuilles de la plante séchées après 8 jours à température de 25°C(A).....	43
Figure40 : Macération en milieu aqueux.....	44
Figure41 : Filtration sous vide du macérât.....	45
Figure42 : de couleur du à une réduction du molybdate d'ammonium(Jaune) avec le noyau phénol du CFR (Bleu).....	45
Figure43 : Protocole de dosage des polyphénols selon la méthode de Folin-Ciocalteu.....	45
Figure44 : Réaction entre $AlCl_3^{3+}$ et les flavonoïdes.....	46
Figure45 : Forme réduite du radical DPPH.....	47
Figure46 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test PR entre le complexe ferricyanidine ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH).....	49
Figure47 : Etape de préparation de l'extrait méthanolique.....	50
Figure48 : Comparaison entre les rendements de l'extraction méthanolique et aqueux.....	53
Figure49 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Moyenne±SD de trois essais).....	54
Figure50 : Teneur en polyphénols totaux dans les deux extraits méthanolique et aqueux en équivalent d'acide gallique.....	54
Figure 51 : Courbe d'étalonnage de quercétine	56
Figure 52 : Taux des flavonoides dans kles deux extraits aqueux et méthanolique exprimé en équivalent de quercétine (mg/ml).....	56
Figure 53 : Poucentage d'inhibition du radical DPPH° (chaque valeur représente la moyenne de 3 essais ±SD).....	57
Figure 54 : Valeur de IC50 (en µg/ml) des antioxydants de références et des deux extraits testés.....	58
Figure 55 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	59

Figure 56 : Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des deux extraits lors de développement de la concentration.....	59
Figure 57 : Cinétique représente l'évolution de l'activité antioxydante des deux extraits aqueux et méthanolique	60
Figure 58 : Effet dose-réponse de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de mûre on comparaison avec le metformine et de l'eau distillée.....	62

Liste des tableaux

Tableau01 : Différentes classes des flavonoïdes et quelques représentants.....	8
Tableau02 : Quelques classes de flavonoïdes et leurs activités biologiques.....	9
Tableau03 : Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	16
Tableau04 : Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	19
Tableau05 : Les polyphénols dans les fruits demûres.....	39
Tableau06 : Les différentes classes des polyphénols dans les fruits demûres.....	39
Tableau07 : Les différentes classes des polyphénols dans l'extrait de feuilles mûre, en utilisant l'analyse UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/Ms analysis.....	40
Tableau 08 : Composition en polyphénols dans les feuilles de mûre.....	41
Tableau 09 : Evolution de la glycémie chez les rats normoglycémiques en fonction du temps et des concentrations des extraits	63
Tableau 10 : Réduction de l'hyperglycémie induite par le glucose chez les rats post-traités avec des deux extraits des feuilles de la plante <i>Rubus fruticosus</i> et la metformine.....	65

Liste des abréviations

ATP : adénosine triphosphate

ADN : L'acide désoxyribonucléique

AMPK : protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate

AMPC : Adenosine monophosphate cyclique

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

BHA : butyl hydroxyanilineole.

BHT: butylhydroxytoluène.

DO : densité optique

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

DMSO : diméthylsulfoxyde

EAG : équivalent d'acide gallique

EQ : équivalent de quercétine

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ERK1/2 : extracellulaire signal régulées par protéine kinase

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

GPXS : glutathion peroxydases

g: gramme

H : hydrogène

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H₂O : l'eau

I%: pourcentage d'inhibition.

IC₅₀ : concentration inhibitrice

IRS2 : substrat 2 de récepteur d'insuline

LDL : lipoprotéines de petite densité

M :molaire

MeOH :méthanol

mg/g : milligramme par gramme.

mg/ml : milligramme par millilitre

µg/ml :microgramme par millilitre

ml: millilitre

MPO :myeloperoxydase

NO :monoxyde d'azote

O₂⁻ :l'anion superoxyde

O₂ :oxygène

PKA : protéine kinase A

PLA₂ :phospholipase A₂

PGH₂ :prostaglandine H₂

PPM :phosphomolybdate

R :rendement

R-SOH :acide sulfénique

R-SO₂H:acide sulfinique

R-SO₃H:acide solfonique

SOD :superoxyde dismutases

TCA : Acide trichlorure acétique

% : pourcentage.

Résumé

L'objectif de cette étude est la mise en évidence de l'activité hypoglycémiant (*in vivo*) et anti-oxydante (*in Vitro*) des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de la plante *Rubus fruticosus*, couramment utilisées dans la médecine traditionnelle comme agent antidiabétique ou antihypertensif.

Les polyphénols et les flavonoïdes de cette plante sont extraits dans du méthanol ou dans de l'eau distillée (milieu aqueux).

Les teneurs en polyphénols (estimée par le test de Folin-Ciocalteu) et en flavonoïdes (par le test d'AlCl₃) sont différentes : 268,529 mg EAG/gEXS dans l'extrait méthanolique contre 87,058 mg EAG/g EXS dans l'extrait aqueux. Les polyphénols des feuilles de *Rubus fruticosus* sont donc mieux extraits dans le méthanol que le milieu aqueux.

En ce qui concerne les teneurs en flavonoïdes, l'extrait méthanolique contient 55,909 mg EQ/g EXS vs 54,192mg EQ/g EXS dans l'extrait aqueux. Les teneurs en flavonoïdes sont équivalentes dans les deux milieux d'extraction.

Le test de tolérance au glucose réalisé sur des rats de race Albinos pendant une durée de 150 min où les extraits des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* (méthanolique ou aqueux) sont administrés par voie orale. Les résultats indiquent un effet dose dépendante de l'extrait aqueux à la dose de 500mg/kg. L'extrait possède donc un effet hypoglycémiant. Plusieurs mécanismes hypoglycémiant existent parmi eux la capacité antioxydante des polyphénols et des flavonoïdes.

Trois tests pour évaluer l'activité anti-oxydante des extraits méthanolique ou aqueux des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* : le test de piégeage de radical libre (DPPH), test pouvoir réducteur (PR) et le test de la Capacité Antioxydante Totale (CAT). Les résultats sur l'activité antiradicalaire et antioxydante montrent que ces polyphénols présentent dans les extraits ont une capacité de piéger le radical DPPH[•] avec des IC₅₀ de 20,70 et 95,82µg/ml pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement cette capacité antioxydante est confirmée par les tests de la capacité antioxydante totale et du pouvoir réducteur. L'extrait aqueux est plus performant dans son pouvoir antioxydant.

Conclusion : Les polyphénols et les flavonoïdes des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* ont des capacités anti-oxydante et hypoglycémiant (antidiabétique).

Mots clé : Feuilles de *Rubus fruticosus* , activité antioxydante (test DPPH, test FRAP et test CAT) , Test de tolérance au glucose.

Abstract

The objective of this study is to demonstrate the hypoglycemic activity (in vivo) and the antioxidant activity (in vitro), this leaves of the plant *Rubus fruticosus* commonly used in traditional medicine as antimicrobial, antidiabetic, and antidiarrheal agent.

The polyphenols and flavonoids content of this plant are extracted by methanol or aqueous solvent. The levels of polyphenols (estimated by the test of Folin-Ciocalteu) and flavonoids (by the AlCl₃ test) are different: 268,529mg EAG/g EXS in the methanol extract compared to 87,058mg EAG/g EXS in the aqueous extract. So the polyphenols inside the leaves of the plant are better extracted in the methanol the aqueous medium.

As regards the flavonoid contents, the methanolic extract contains 55.909 mg EQ / g EXS vs 54.192 mg EQ / g EXS in the aqueous extract. The flavonoids of the two extracts had equivalent contents in the two solvents.

The glucose tolerance test carried out on Albinos rats for a period of 150 min where the extracts of the plants of *Rubus fruticosus* (methanolic or aqueous) are administered orally. The results indicate a dose dependent effect of the aqueous extract at the dose of 500 mg / kg. The extract therefore has a hypoglycaemic effect. Several hypoglycaemic mechanisms exist among them the antioxidant capacity of polyphenols and flavonoids.

The antioxidant capacity of this polyphenolic extract was evaluated in vitro by three different test: DPPH° free radical scavenging assay, reducing power(RP) and total antioxidant capacity (CAT) test, the results of the antiradical and antioxidant activity, shown that the polyphenols present in the extracts have a high capacity to trap the DPPH° radical with IC 50s of 20,70 and 95,82 µg/ml for the methanolic and aqueous extract respectively, this capacity antioxidant is confirmed by tests of total antioxidant capacity and reducing power(RP).

Conclusion: leaves of the plant *Rubus fruticosus* have anti-oxidant and antidiabetic capacities.

Key words: *Rubus fruticosus* leaves, antioxidant activity (DPPH test, FRAP test and CAT test), Antidiabetic activity.

ملخص

تهدف هذه الدراسة الي تسليط الضوء علي النشاط المسؤول عن خفض نسبة السكر في الدم (في الجسم الحي) و كذلك المضاد للأكسدة (في المختبر) للبوليفينول و الفلافونويد الموجود في اوراق التوت البري () والذي غالبا يستعمل في الطب التقليدي لخفض نسبة السكر في الدم و كذلك ارتفاع الضغط الدموي لإنسان

بعد انحلال البوليفينول و الفلافونويد في المحلول الميثانولي او في الماء المقطر نقوم بحساب كمية البوليفينول فيها بواسطة الاختبار

folin-ciocalteu و كذلك كمية الفلافونويد عن طريق اختبار AICI3 حيث اظهرت النتائج ان 268,529 ملغ/EAG غ/EXS من البوليفينول يوجد في المحلول الميثانولي في حين 268,529 ملغ/EAG غ/EXSالوني في الماء المقطر ومنه نستنتج ان يوجد بوليفينول اوراق التوت البري تتحل بكترة في المحلول الميثانول مقارنة بالماء المقطر

فيما يتعلق بمركبات الفلافونويد فان المحلول الميثانولي و الماء المقطر يحتويان على كمية متعادلة 55, 909 ملغ/EQ غ/EXS (في المحلول الميثانولي) و 268,529 ملغ/EQ غ/EXS (في الماء المقطر)

بعد ذلك اجرينا اختبار تحمل الغلوكوز على فاران بيضاء لمدة 150 دقيقة حيث نقدم لهم مستخلص التوت البري (ميثانولي اومائي) عن طريق الفم تشير النتائج ان تأثير الجرعات المرتبطة يكون كبير عند القيمة 500ملغ/كيلوغرام ومنه نستنتج ان

المقتطفات المائية لها خاصية مخفضة لسكر في الدم

تم قمنا بتلات اختبارات لتقييم النشاط المضاد لأكسدة بالنسبة للمستخلص الميثانولي او المائي لاوراق توت البري وهي

اختبار محاصرة الجذور الحرة (DPPH) اختبار الحد من القوة (PR) واختبار القدرات إجمالي مضادات الأكسدة CAT

أظهرت نتائج محاصرة الجذري ونشاط مضادات الأكسدة أن هذه البوليفينول الموجودة في مستخلص قدرة على اعتراض الجذور الحرة DPPH عن طريق IC50 يقدر ب 20.70 للمستخلص المثلي و 82,95 µg/ml المستخلص المائي

هذه النتائج اكدها اختبار إجمالي القدرة المضادة للأكسدة والحد من القوة و منه المستخلص المائي أكثر فعالية في مضادات الأكسدة

الخلاصة: أوراق النبات يمتلك قدرة مضادة للأكسدة و لمرض السكر

الكلمات الرئيسية: أوراق *Rubus fruticosus* النشاط المضاد لسكر CAT و اختبار FP, اختبار DPPH

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction générale	1

PARTIE I :SYNTHESE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.Généralités.....	3
1.1. Classification des polyphénols	3
1.2. Composés polyphénolique non flavonoïdiques.....	4
1.2.1.Les acides phénoliques.....	4
dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.....	4
Les acides Hydroxycinamiques.....	4
1.2.2.Les Lignanes.....	5
1.2.3. Les stilbènes.....	6
1.3. Composés polyphénoliques flavonoïdiques.....	7
1.3.1. Les flavonoïdes.....	7
Différentes classes des flavonoïdes.....	7
1.3.2. Les tanins.....	10
Les tanins condensés.....	11
Les tanins hydrolysables.....	11
1.4.Biosynthèse de polyphénols	12

1.4.1. La voie de l'acide shikimique.....	12
4.2. La voie de l'acide malonique.....	12
1. 1.5.Les propriétés biologiques des polyphénols.....	13
Inhibition des enzymes par les polyphénols.....	13
Polyphénols et diabète.....	14
Polyphénols et inflammation.....	15
2. Le stress oxydant.....	19
2.1. Origine de formation des ROS.....	19
Chaîne Respiratoire Mitochondriale.....	21
Les phagocytes.....	21
L'environnement.....	22
2.2.Principales cibles biologiques des ROS.....	22
Les lipides membranaires.....	23
L'acide désoxyribonucléique ou ADN.....	23
Les protéines.....	24
Les lipoprotéines.....	25
2.3.Les défenses antioxydantes.....	26
<i>2.3.1. Système antioxydante enzymatique.....</i>	<i>27</i>
Les superoxydesdismutases (SOD).....	26
Catalase.....	27
Les glutathion peroxydases.....	27
Le système thiorédoxines.....	27
<i>2.3.2. Système antioxydante non enzymatique.....</i>	<i>28</i>
3.Le diabète et le stress oxydant.....	32
Diabète type 1.....	32
Diabète type 2.....	32

4. Le matériel végétal utilisé dans cette étude : arbuste <i>Rubus fruticosus</i>.....	37
4.1. Distribution mondial.....	37
4.2. Classification botanique de l'espèce <i>Rubus fruticosus</i>.....	38
4.3. Composition en polyphénols du fruits.....	40
4.4. Composition en polyphénols des feuilles.....	41

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS.....	43
1.1. Matériel végétal.....	43
1.2. Préparation des extraits.....	43
2.METHODES.....	45
2.1.Dosage des polyphénols Totaux.....	45
Principe.....	45
2.2.Dosage des flavonoides.....	46
Principe.....	46
2.3. Détermination de l'activité antioxydant des deux extraits in vitro.....	47
2.3.1.Le test de piégeage du radical DPPH.....	47
Principe.....	47
2.3.2.Dosage de la capacité antioxydante totale.....	48
2.3.3. Dosage du pouvoir réducteur.....	49
3.Etude in vivo : l'effet hypoglycéméque et anti-hyperglycémique des 2 extraits méthanolique et aqueux préparées à partir des feuilles de mûre.....	50
3.1. Animaux.....	50
3.2. Préparation des extraits pour le gavage.....	50
3.3. Effet dose-réponse des deux extraits méthanolique et aqueux sur la glycémie des rats normoglycémique.....	51

3.4. Etude des effet dose-réponse de l'extrait aqueux et méthanolique de la plante lors du test de tolérance au glucose (Mesure de la glycémie chez les rats post-traités).....	51
4.Méthode d'analyse statistique et des tracée des graphiques.....	52

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

1.Détermination du rendement et de la teneur en polyphénols.....	53
2.Détermination de la teneur en flavonoides totaux.....	55
3.Evaluation des activités antioxydants in vitro des polyphénols et des flavonoides.....	57
3.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	57
3.2.Capacité antioxydante totale (CAT).....	59
3.3. Le pouvoir réducteur.....	60
4. Test in vivo : Effets dose-réponse des deux extraits méthanolique et aqueux sur la glycémie des rats normoglycémiques.....	62
Conclusion et perspectives.....	67

Références bibliographiques

Introduction

Introduction

La phytothérapie a existé depuis l'antiquité. Les plantes, par leur métabolisme secondaire, synthétisent des métabolites de nature variée où plusieurs études scientifiques ont démontré leurs effets bénéfiques sur plusieurs pathologies (**Katalinic et al, 2006, Umeno et al, 2016**).

L'Algérie, grâce à sa situation géographique, son relief, sa grande variété de climats et de sols, possède une flore variée dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, la steppe et les oasis sahariennes, renfermant plus de 4125 plantes vasculaires inventoriées réparties en 123 Familles botaniques (**Nouioua, 2012**).

Plusieurs plantes ont été identifiées comme ayant un potentiel antioxydant (**Lee et al., 2000, Yawadio et al, 2008; Živković et al, 2010**). Les phénols, en particulier les bioflavonoïdes, sont très intéressants par leur propriété antioxydante en raison de leur origine naturelle et de leur capacité d'agir comme piègeurs de radicaux libres (**Hertog et al, 1993, Simonetti et al, 1997, Katalinic et al, 2006**).

Le diabète est une maladie considérée par l'OMS depuis 2013 comme une épidémie dont la prévalence ne cesse d'augmenter au cours de ces dernières années. Actuellement, il existe 300 millions d'adultes qui vivent avec le diabète, principalement dans les pays en voie de développements (**Bernard et al, 2013**).

Le diabète est lié principalement au stress oxydant qui favorise le développement de la pathologie en perturbant l'insulino-sécrétion (**Auberval, 2010**). La nature de l'alimentation représente une bonne source de molécules antioxydantes (comme les vitamines E et C, les caroténoïdes, les polyphénols et autres molécules) qui anéantissent le stress provoqué par la pathologie.

Les polyphénols agissent par plusieurs mécanismes sur le diabète :

1. Diminuent l'activité antioxydante (**Simonetti et al, 1997, Umeno et al, 2016**)
2. Inhibent les activités des glycosidases : α -amylase (**Gulati et al, 2012**), maltase (**Mukhopadhyay Piyasi, Prajapati, 2015**)
3. Inhibent l'inflammation via la voie NF κ B, ou la phospholipase A2 (PLA2), la cyclooxygénase2 (COX2) et la lipoxygénase (LOX) (**Hui et Chi, 2017**) ou les cytokines TNF α et Il1 β (**Visnagri et al, 2014**).
4. Stimulent la sécrétion d'insuline et réduisent l'apoptose et favorisent la prolifération des cellules β pancréatiques (**Mukhopadhyay, Prajapati, 2015** et **Neha Lavle, Priyanka Shukla, 2016**)
5. Favorisent l'internalisation du glucose dans les cellules musculaires via le GluT4 (**Mukhopadhyay Piyasi, Prajapati, 2015, Neha Lavle, Priyanka Shukla, 2016**)

Dans la présente étude, nous avons ciblé l'effet hypoglycémiant (étude *in vivo* sur des rats Albinos) et l'effet antioxydant (étude *in vitro*) des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de la plante *Rubus fruticosus*.

Ce mémoire comporte trois parties :

- Une étude bibliographique sur :

a)- Les polyphénols, leur classification et leurs propriétés biologiques.

b)- Etude moléculaire du stress oxydante.

c)- Le diabète et les mécanismes moléculaires impliqués

- Un chapitre réservé à la description des méthodes utilisées.

Etude bibliographique

1. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal et sont issus du métabolisme secondaire (Zhang *et al*, 2016) localisés dans les racines jusqu'aux fruits (Kim *et al*, 2014). Ils jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement (Ganesan *et al*, 2017). Plus de 9000 composés phénoliques naturels sont identifiés (Hu *et al*, 2017).

Les polyphénols possèdent des propriétés biologiques diverses : antioxydant, antidiabétique, anticancéreux, anti-inflammatoire, cardioprotecteur, ostéoprotecteur, neuroprotecteur, antihypertenseur, anti-âge, antiseptique, protecteur cérébrovasculaire, réducteur de cholestérol, hépatoprotecteur, antifongique, antibactérien (Ganesan *et al*, 2017).

1.1. Classification des polyphénols

Leur classification est basée essentiellement sur la structure, et est divisée en deux catégories (Hu *et al*, 2017) :

- ✓ Les flavonoïdes : les flavonols, isoflavonones, flavanols, proanthocyanidines, anthocyanines, flavanones, flavones.
- ✓ Les non flavonoïdes : les stilbénes, les acides phénoliques et les lignanes (Oliver *et al*, 2016).

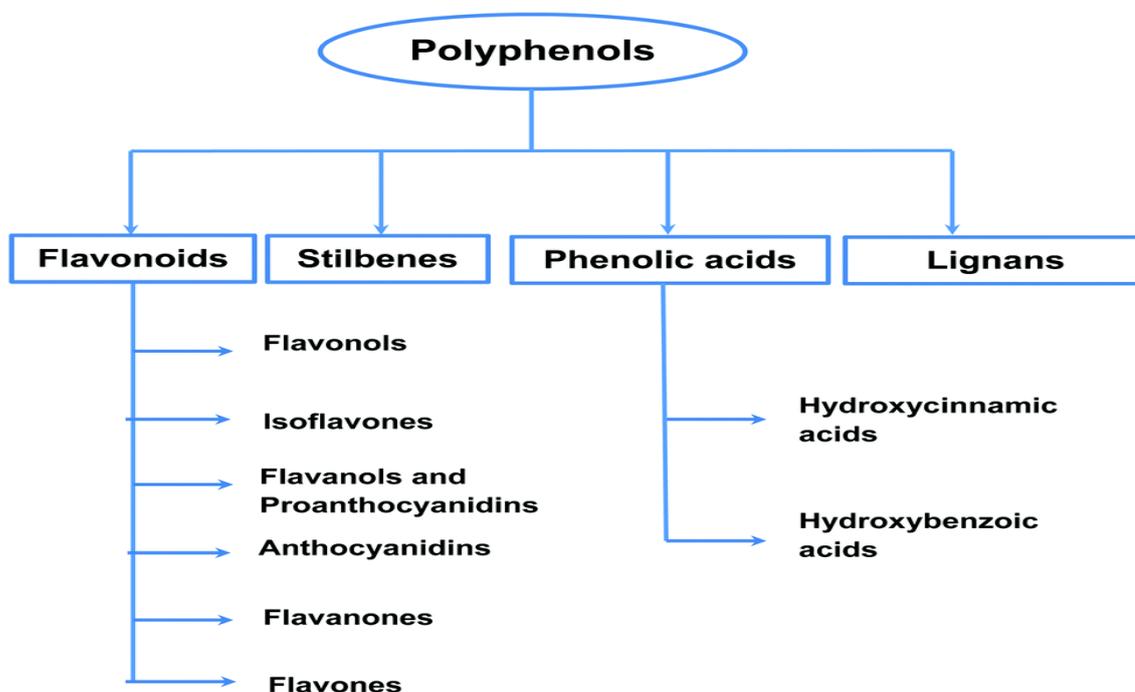


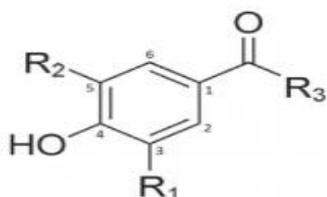
Figure 1 : Les principales classe des polyphénols (Oliver *et al*, 2016).

1.2. Composés polyphénolique non flavonoidiques

1.2.1. Les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique et ils sont représentés par deux sous-classes (Sandrina *et al*, 2014) :

- ✓ Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.
- ✓ Les dérivés de l'acide hydroxycinamique.
- **Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque** : sont des dérivées de l'acide benzoïque et ont une structure de base (C6-C3), sous forme libre ou combinée à l'état d'esters ou hétérosides. Cette dernière est abondante dans les fruits et légumes : les fraises et les épices (Hosseini *et al*, 2016).

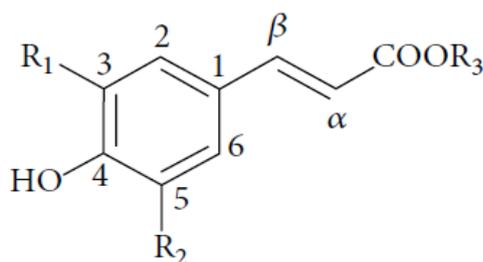


	R ₁	R ₂	R ₃
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	H	H	OH
Protocatechuic acid	OH	H	OH
Gallic acid	OH	OH	OH
Vanillic acid	OCH ₃	H	OH
Syringic acid	OCH ₃	OCH ₃	OH
Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	H	H	OCH ₃
Methyl gallate	OH	OH	OCH ₃
Ethyl protocatechuate	OH	H	OCH ₂ CH ₃

Figure 2 : Structure des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (Farhoosh *et al*, 2016).

- **Les acides Hydroxycinamiques** (C6-C3) : abondants dans les feuilles de thé, les graines de café, le vin rouge, les fruits variés .Ils sont souvent estérifiés et peuvent être combinés à des sucres (O-acylglucosides) (Hosseini *et al*, 2016). L'acide Hydrocinamique possède plusieurs activités thérapeutiques : anti-inflammatoire, antioxydant, cardioprotecteur (Alam *et al*, 2016).

L'acide caféique est le représentant principal de cette catégorie (Scalbert *et al*, 2015).



	R1	R2	R3
<i>p</i> -Coumaric	H	H	H
Caffeicacid	OH	H	H
Ferulicacid	OCH3	H	H
Sinapicacid	OCH3	OCH3	H

Figure 3 : Structure des acides Hydroxycinamiques (Teixeira et al, 2013).

1.2.2. Les Lignanes (C6-C3-C6)

Les lignanes forment la classe des composés phénoliques les plus répandus dans le règne végétal (Sang et Zhu 2014). Ils ont une structure dimérique lors de l'oxydation de deux unités de phénylpropanoïde C6-C3 (Teponno et Kusar 2016)

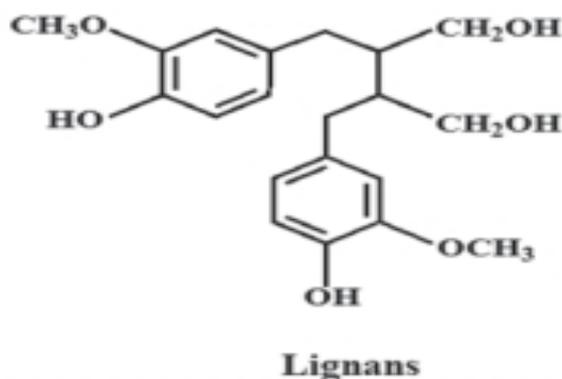


Figure 4: Structure des lignanes (Casarin et al, 2014).

Les lignanes sont associés à la fibre végétale de nombreux aliments comme les céréales, les noix, les graines, les légumes et les boissons (le thé, le café ou le vin) (Seth et al, 2015).

1.2.3. Les stilbènes (C6-C2-C6)

Les stilbènes sont, naturellement, présents dans une grande variété de produits alimentaires comme les raisins, les baies, les cacahuètes, le vin rouge (Tsai et al, 2017) et certaines plantes

médicinales comme *Polygonum cuspidatum*, *Rhodomyrtus tomentosa*, *Rheumundum latum* (Reinisalo et al, 2015).

La structure de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatique joints par un pont d'éthylène. Deux isomères optiques existent naturellement : *cis* et *trans*, avec des propriétés chimiques et biologiques différentes (Tsai et al, 2017).

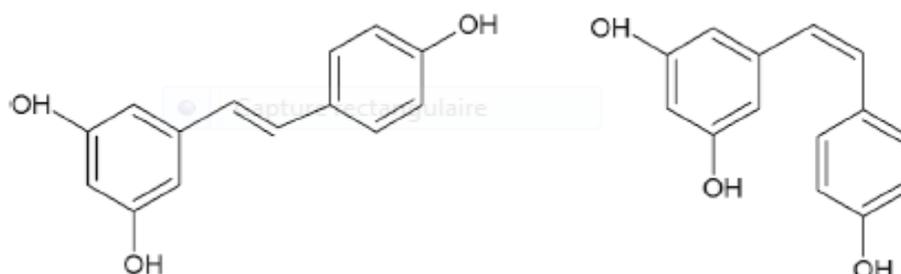


Figure 5 : Structure de base des stilbènes (trans ou cis) (Sergides et al, 2015).

Les stilbènes sont des phytoalexines synthétisées par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes : champignons, bactéries et virus (Hurtado et al, 2017). Ils possèdent un large spectre d'effets thérapeutiques : antioxydant, anticancéreux, cardioprotecteur et neuroprotecteur (Filippis et al, 2017).

Les stilbènes les mieux connus sont le *trans*-resvératrol, le pterostilbène et le 3'-hydroxypterostilbène (Tsai et al, 2017).

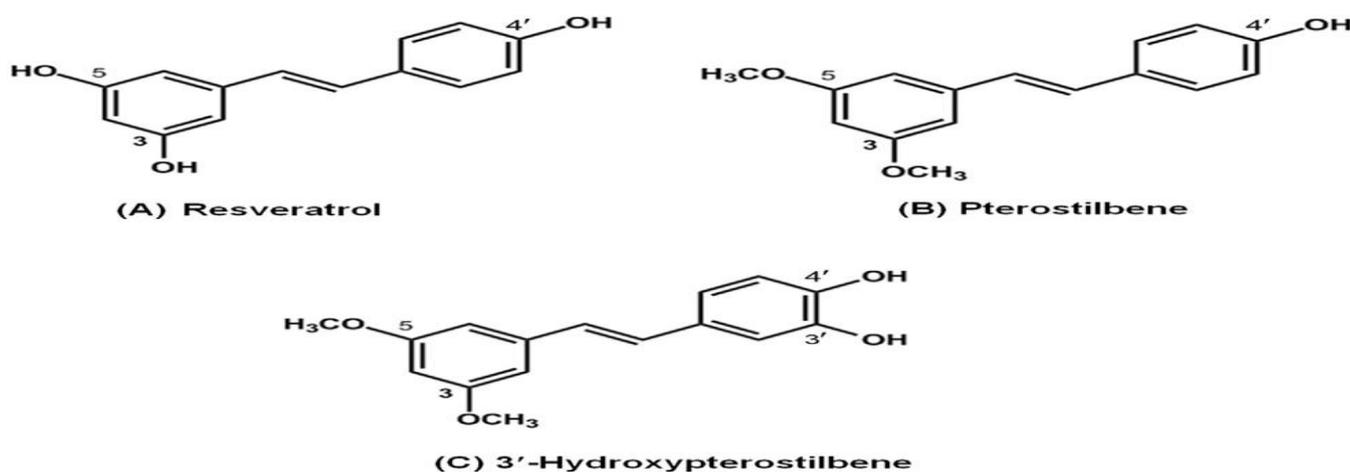


Figure 6 : Structures chimiques de resvératrol (A), pterostilbène (B) et du 3'-hydroxypterostilbène (C) (Tsai et al, 2017).

Le resvératrol est le stilbène le plus largement étudié à ce jour, en raison de ses multiples effets bénéfiques sur la santé humaine (Nivelle et al, 2017). Cette molécule possède de nombreuses actions thérapeutiques : anti-inflammatoire, antioxydant, cardioprotecteur, antidiabétique, anti-âge et anticancéreux (Tang et al, 2017).

1.3. Composés polyphénoliques flavonoïdiques

1.3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une très large gamme des composés phénoliques généralement présents dans la règne végétal (Seleemet *et al*, 2017). Ils forment les pigments responsables de la coloration des fruits, des fleurs et parfois des feuilles. A l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme hétérosides (Cirimi *et al*, 2016).

Leur squelette de base est constitué de 15 atomes de carbone formant deux noyaux aromatiques et un hétérocycle central de type pyrane, soit la structure C6-C3-C6 (Hatahet *et al*, 2017).

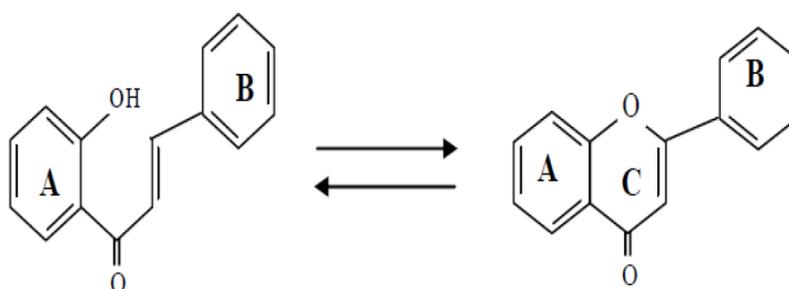


Figure 7 : Squelette de base des flavonoïdes (Heller *et al*, 1993).

Les flavonoïdes jouant de nombreux rôles dans les processus vitaux des plantes : défense contre les prédateurs, attraction des pollinisateurs, pigmentation des organes, croissance, protection contre les ultra-violets (Jiang *et al*, 2016).

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : flavones, flavanols, flavonols, isoflavones, flavanones et anthocyanes (Malgorzata *et al*, 2017).

Tableau 1 : Différentes classes des flavonoïdes et quelques représentants de Polyphénols alimentaires (NKHILI *et al*, 2009).

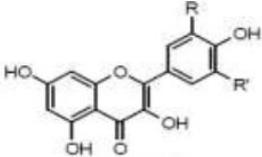
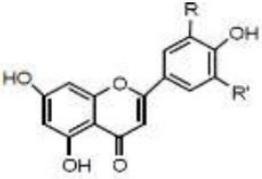
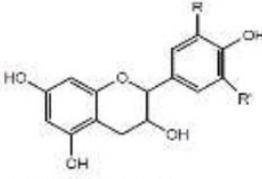
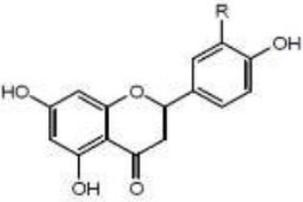
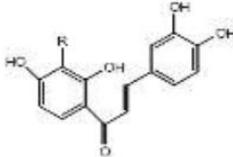
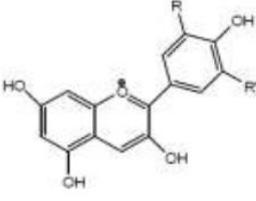
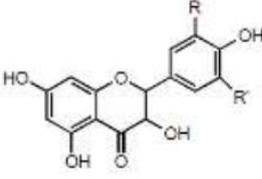
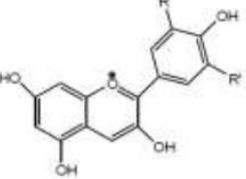
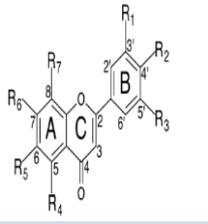
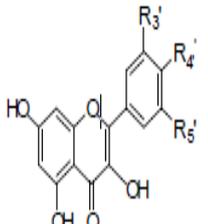
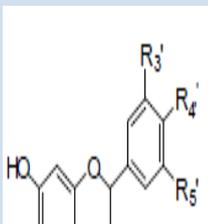
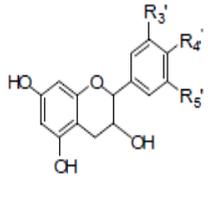
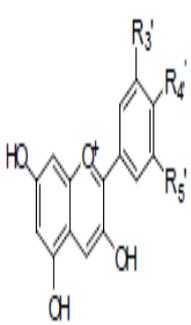
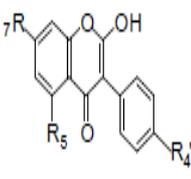
<p>Flavonols</p>  <p>R=R'=H: Kaempférol R= OH, R' = H: Quercétine R= OCH₃, R' = H: Isorhamnétine R=R' = OH: Myricétine</p>	<p>Flavones</p>  <p>R=R'=H: Apigénine R= OH, R' = H: Lutéoline R-R' = OCH₃: Tricin</p>
<p>Flavan-3-ols</p>  <p>R=R'=H: Afzélicine R = OH, R' = H : Catéchine R - R' = OH : Gallocatéchine</p>	<p>Flavanones</p>  <p>R= H : Naringénine R= OH : Eriodictyol</p>
<p>Chalcones</p>  <p>R = H : Butéine R = OH : Okanéine</p>	<p>Aurones</p>  <p>R = R' = H : Pélagonidine R = OH, R' = H : Cyanidine R = OCH₃, R' = H : Péonidine R = R' = OH : Délphinidine R = R' = OCH₃ : Malvidine R = OH, R' = OCH₃ : Pétunidine</p>
<p>Flavanonols</p>  <p>R= OH, R' =H: Taxifoline R= OH, R' = OH: Ampéloptol</p>	<p>Anthocyanes</p>  <p>R = R' = H : Pélagonidine R = OH, R' = H : Cyanidine R = OCH₃, R' = H : Péonidine R = R' = OH : Délphinidine R = R' = OCH₃ : Malvidine R = OH, R' = OCH₃ : Pétunidine</p>

Tableau 2 : Quelques classes de flavonoïdes et leurs activités biologiques

Classes	Structure chimique	R3	R4	R5	Exemples	Propriétés	Références
Flavones		H O H O H	OH OH OCH3	H H H	Apigénine Lutéoline diosmétine	Antioxydant -anticancéreuses	-Katarzyna Malgorzata, 2017. -Nan Jiang 1,2, Andrea I.2016
flavonols		H O H O H	OH OH OH	H H O H	Kaempférol Quercétine myrecétine	antihistaminique, anti-inflammatoire et antioxydante	-SantaCirmi, Nadia Ferlazzo, 2016 -Katarzyna Malgorzata, 2017. -Nan Jiang 1,2, Andrea I. 2016
flavanones		H O H	OH OH	H H	Naringénine Eriodictyol	Neutralisation des radicaux libres. - amélioration de l'absorption de la vitamine C. - la prévention des cancers de la peau.	Katarzyna Malgorzata, 2017 -Nan Jiang 1,2, Andrea I.2016) -ColinD. Kay, Gema Pereira-Caro, 2017
Flavanols		O H	OH	H	catéchine	-Antioxydant -anticancéreux	-Katarzyna Malgorzata, 2017 -Nan Jiang 1,2, Andrea I.2016

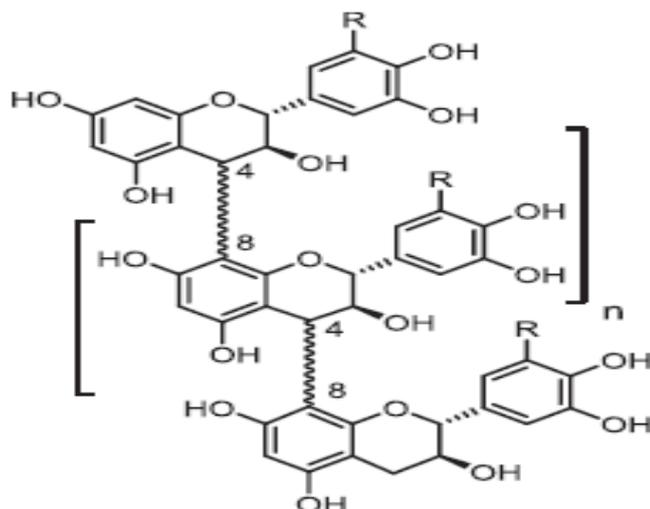
anthocyanes		H	OH	H	Pelargonidine	- lutte contre le vieillissement cellulaire en améliorant	-Katarzyna Malgorzata, 2017 -Nan Jiang 1,2, Andrea I.2016
		O	OH	H	Cyanidine	l'élasticité et la densité de la peau.	
		H	OH	O	Delphénidine	- couleurs brillantes des fruits et des légumes.	
		O		H		-antiseptique urinaire.	
Isoflavones		R4	R5	R7	Daidezine	-	Katarzyna Malgorzata, 2017 Nan Jiang 1,2, Andrea I.2016
		O	OH	O	Genisteine	phytoestrogéniques.	
		H	O-	H			
		H	Glu	O			
				H			

1.3.2. Les tanins

Les tanins représentent une classe très importante des polyphénols, combinés à des protéines et à d'autres polymères organiques comme les glucides, les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes pour former un précipité (Sekowski et al, 2016). Ces composés, naturellement produits par les plantes, se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines (Makkar, 2003). ils sont particulièrement abondants dans les caroubes, les fèves, le thé, le vin, l'écorce des grenades, les graines (Devin et al, 2014)

Chez les végétaux supérieurs, deux groupes des tanins se distinguent par leur structure (Arbenz et al, 2015) :

- ✓ **Les tanins condensés** : sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ol reliés par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (Klongsiriwet et al, 2015).



Condensed tannins:

R = H: procyanidins

R = OH: prodelphinidins

Figure 8 : Structure de tanins condensés (Ropiak et al, 2017).

- ✓ **Les tanins hydrolysables :** formés d'esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés en particulier l'acide éllagique (Alice et al, 2015). Ces molécules sont facilement hydrolysables par voie chimique ou voie enzymatique (Jiménez et al, 2014).

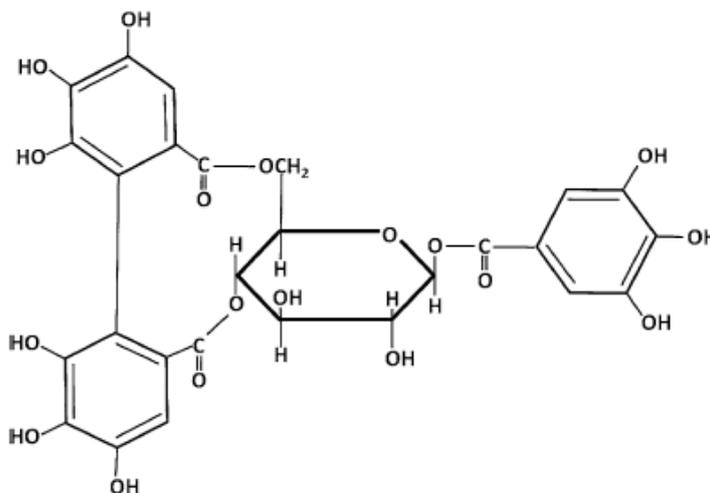


Figure 9 : Structure de tanins hydrolysable (1-O-galloyl-4,6-hexahydroxydiphenyl- β -D-glucose (OG β DG) (Arbenz et al, 2015).

1.4. Biosynthèse de polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales:

1.4.1. La voie de l'acide shikimique

La voie de shikimate est une série de sept étapes métaboliques, qui convertissent le phosphoénolpyruvate (PEP, de la voie glycolytique) et de l'érythrose 4-phosphate (Ery4P de

la voie du pentose phosphate) au chorismate (Widhalm et al, 2015), précurseur des acides aminés aromatiques (AAA) : le L-phénylalanine (Phe), la L-tyrosine(Tyr) et L-tryptophane précurseurs pour la production des métabolites secondaires tel que les polyphénols (Zhu et al, 2016).

1.4.2. La voie de l'acide malonique

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl-CoA donnant le malonate après condensation de 2 acétyl-CoA. A travers cette voie que s'effectue la chaînes polycétoniques obtenues par condensation répétée d'unités « acétate»qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Widhalm et al, 2015).

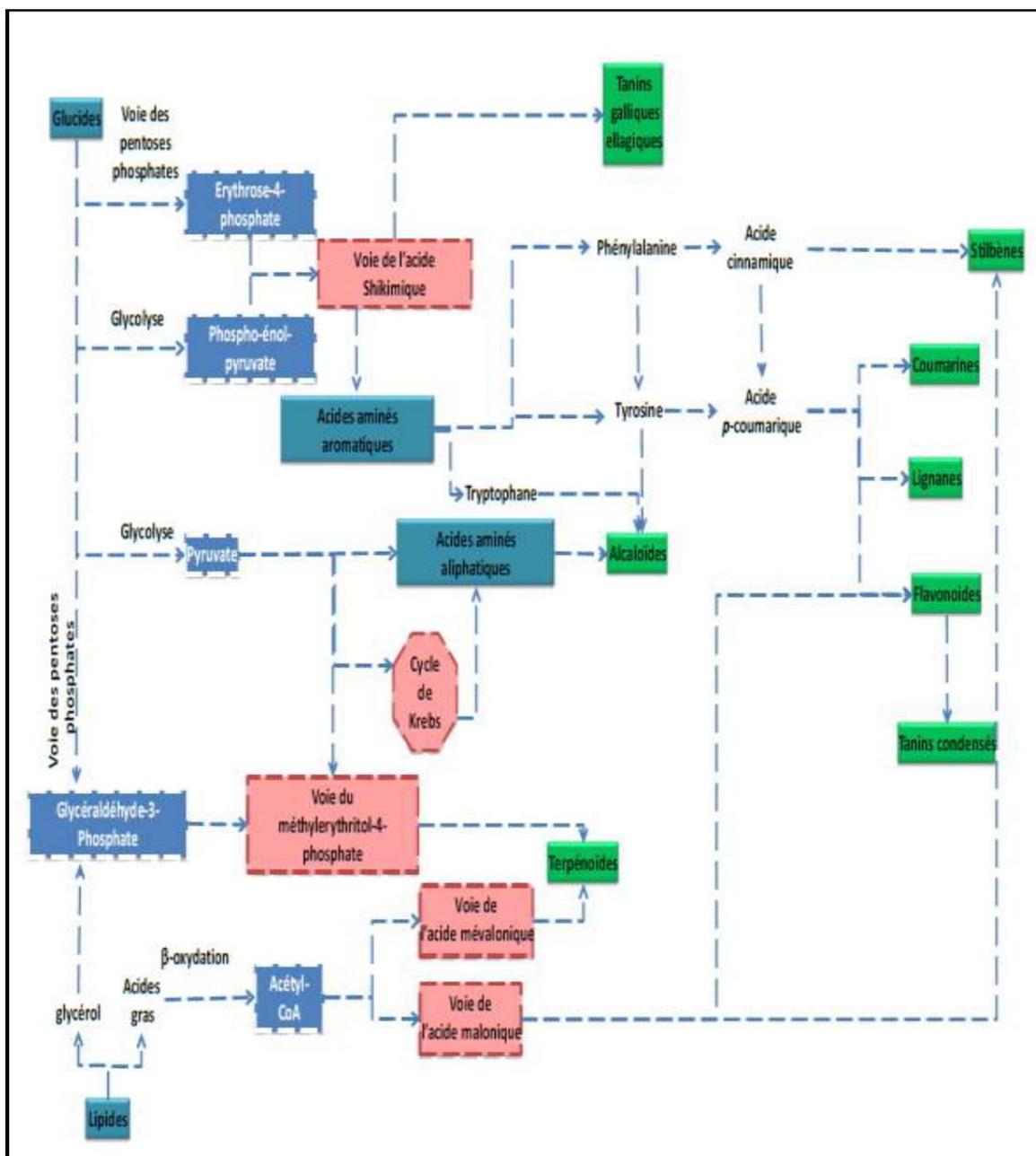


Figure10: Biosynthèse des polyphénols végétaux (Aharoni et al, 2011)

1.5. Les propriétés biologiques des polyphénols

Des effets protecteurs lors de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis des différentes pathologies (diabète, inflammation, maladie cardiovasculaires...) ont été mis en évidence d'un point de vue épidémiologique expérimental. Aussi, de nombreuses études penchent sur le mode d'actions des polyphénols qui, par leurs propriétés réductrices, sont utilisés dans la prévention ou la thérapie de ses pathologies :

➤ Inhibition des enzymes par les polyphénols

Les polyphénols possèdent une grande variété des protéines, via des interactions de cycles aromatiques et des liaisons hydrogènes (groupements OH), les flavones, les flavonols et les flavonoïdes aglycones se lient aux protéines globulaires, aux enzymes et aux récepteurs (Tsai *et al*, 2017).

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant par les polyphénols, les flavonoïdes, molécules susceptibles d'être impliquées dans cet effet par la formation de complexes inhibiteur-enzyme et par piégeage direct des radicaux libres (Akbarian *et al*, 2016).

Les flavonoïdes inhibent également les métalloenzymes (CYTP450, ... etc.), la lipoxigénase, l'amyéloperoxydase et la NADPH oxydase (Leyva *et al*, 2016).

➤ Polyphénols et diabète

Beaucoup d'études (Piyasi *al*, 2015, Neha *et al*, 2016) ont révélé que les flavonoïdes ont le potentiel d'atténuer le trouble du métabolisme du glucose et d'agir comme antidiabétiques puissants par plusieurs mécanismes:

- ✓ Inhibent les activités des enzymes digestives : α -amylase, α -glucosidase (Hyun *et al*, 2016).
- ✓ Améliorent la sécrétion d'insuline, réduisent l'apoptose et favorisent la prolifération des cellules β pancréatiques.
- ✓ Atténuent la résistance à l'insuline, l'inflammation et le stress oxydant dans les organes cibles.
- ✓ Stimulent l'absorption de glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc via les Glut 4 (Piyasi et Prajapati, 2015, Lavle N et Shukla, 2016)

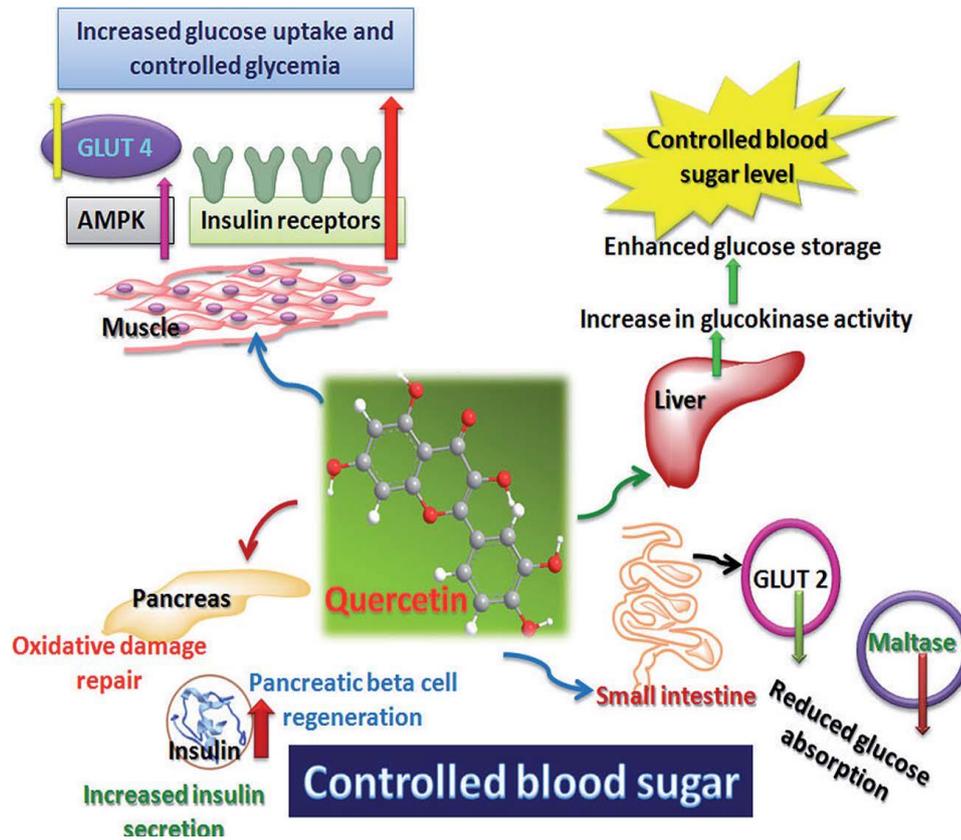


Figure 11: Les effets possibles de la quercétine sur le foie, le muscle, le pancréas et l'intestin grêle pour maintenir un niveau de glycémie normal (Piyasi et al, 2015).

Ces inhibitions ou activation des flavonoïdes est expliquée en détail par la figure suivante :

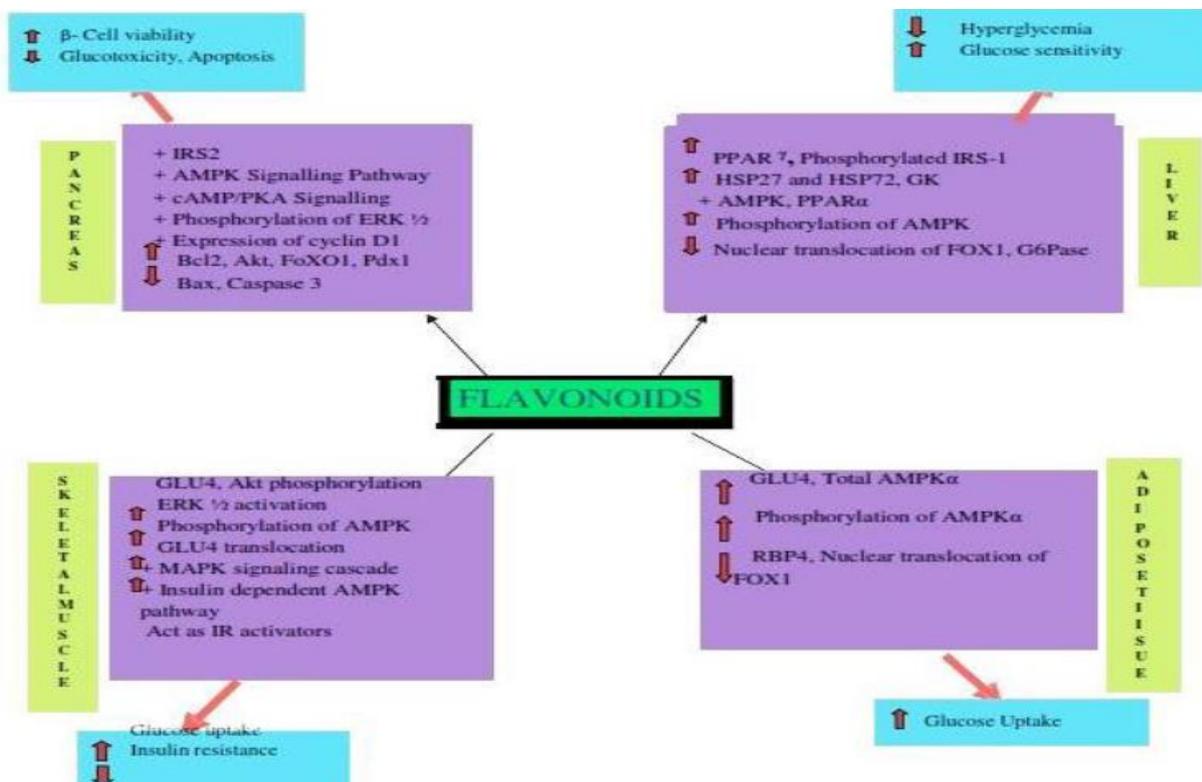


Figure 12 : Rôle des flavonoïdes dans le traitement de l'hyperglycémie en ciblant diverses voies cellulaires dans le pancréas, le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc (Lavle et al, 2016).

La quercétine (flavonoïde non glycosylée) a un effet protecteur contre les dommages des cellules β en exerçant ces effets antioxydant et anti-apoptotiques. Cela facilite la régénération des cellules β en stimulant les cellules souches à se régénérer et se différencier en cellule d'îlots pancréatiques (Piyasi et al, 2015).

Au niveau des muscles, la quercétine accélère la fonction du transporteur de glucose 4 (GLUT 4) et du récepteur d'insuline, ce qui entraîne une absorption élevée de glucose et le maintien d'une glycémie normale. Au niveau hépatique, l'activité de glucokinase est augmentée et aboutit à une augmentation du stockage en glycogène. Dans l'intestin grêle, les flavonoïdes diminuent les activités du maltase et du transporteur de glucose (GLUT 2) conduisant à une diminution de l'absorption du glucose dans le milieu intestinal (Piyasi et al, 2015).

➤ Polyphénols et inflammation

Les propriétés anti inflammatoires des flavonoïdes est démontrée par plusieurs études et selon différents mécanismes:

- ✓ Inhibition des enzymes métabolisant l'acide arachidonique (AA), la phospholipase A2 (PLA2), la cyclooxygénase (COX) et la lipoxygénase (LOX) (Tsai et al, 2017) .
- ✓ Inhibent l'enzyme de production d'oxyde nitrique (NO), nitrique Oxyde synthase (NOS) réduisent la production d'acide arachidonique (AA), de prostaglandine, les leucotriènes et les NO, qui sont des médiateurs cruciaux de inflammation (Leyva et al, 2016).
- ✓ Les polyphenols inhibent la production de ROS et l'enzyme pro-oxydante comme NOS et le balayage du radical qui favorise l'inflammation et cause des dommages aux tissus (Sonar et al, 2016).
- ✓ Agents anti-cytokine par l'inhibition de la sécrétion et l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Yu et al, 2016).

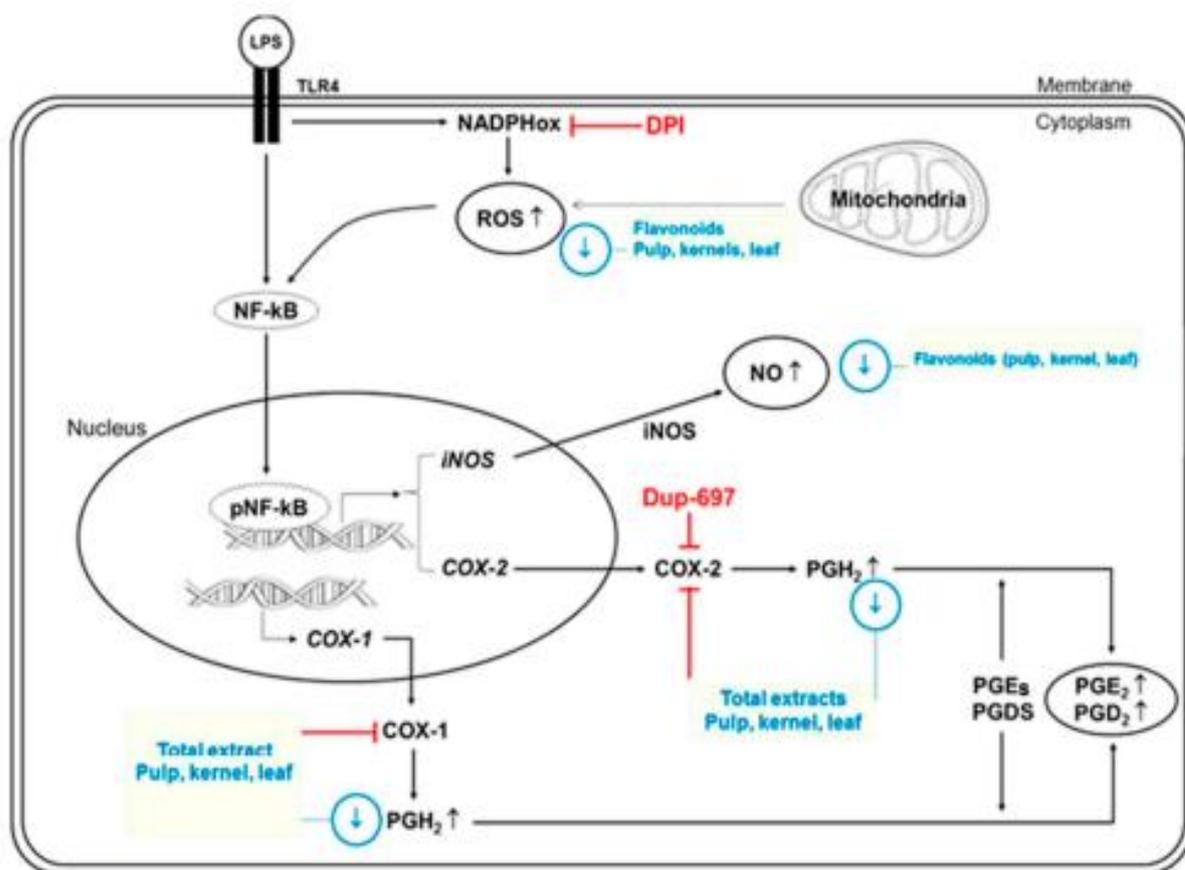


Figure 13 : Effets possibles des flavonoïdes au niveau de certains médiateurs inflammatoires dans les macrophages (Leyva et al, 2016).

Le tableau 03 résume l’action, au niveau moléculaire, de molécules de flavonoides

Tableau 03: Rôle des flavonoïdes comme modulateurs de cytokines (Leyva et al, 2016).

Quelques flavonoides	Effet	Mécanisme moléculaire impliqué
Apigénine	Réduction de la production de NO et de la prostaglandine E ₂ (PGE ₂), Inhibition de la sécrétion de TNF alpha	Inhibition de l’expression de gène responsable de la synthèse des NOS, COX2, Il6, Il1β et TNF alpha, amélioration de p38-MAPK et la phosphorylation de ERK et JNK.
Fistine	Diminution de l’expression et de la sécrétion de TNF alpha, Il1β et le Il8	Inhibition de la phosphorylation de p38, JNK et ERK.
Luteoline	Réduction de la production de NO, Il6, MCP-1 et TNF alpha.	Réduction de l’expression de NOS et de COX2.
Naringénine	Diminution de la sécrétion NO, TNF alpha	Inhibition de NOS et de COX
Quercétine	Inhibition de la production de NO, TNF alpha et d’IL-1β	Inhibition de l’activité de NF-kB et AP-1

Par leur effet anti inflammatoire, les flavonoides réduisent l'athérosclérose par réduction de l'adhérence plaquettaire et l'agrégation notamment, les peroxydations des lipides, empêchent la formation des ROS, inhibent de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses (Erin et al, 2016).

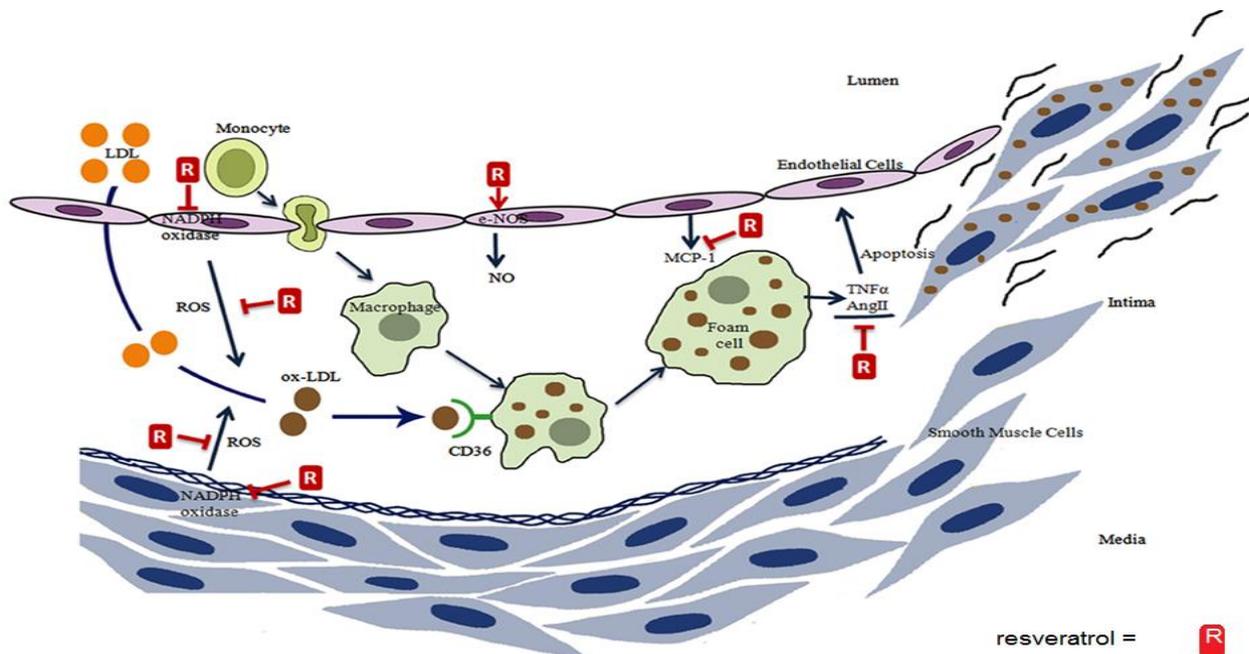


Figure 14 : Effet du resvératrol sur le processus d'athérosclérose (Leyva et al, 2016).

Le resvératrol (R) empêche la formation des ROS directement par l'inhibition de NADPH oxydase, inactive la formation de NOS, inhibe l'expression du monocyte chemoattractant protéine-1 (MCP-1), inhibe le Facteur de nécrose tumorale (TNF-α) et l'angiotensine II (AngII) induite par la cellule endothéliale apoptotique (Catalogol et al, 2012).

D'autres pathologies résumées dans la figure suivante :

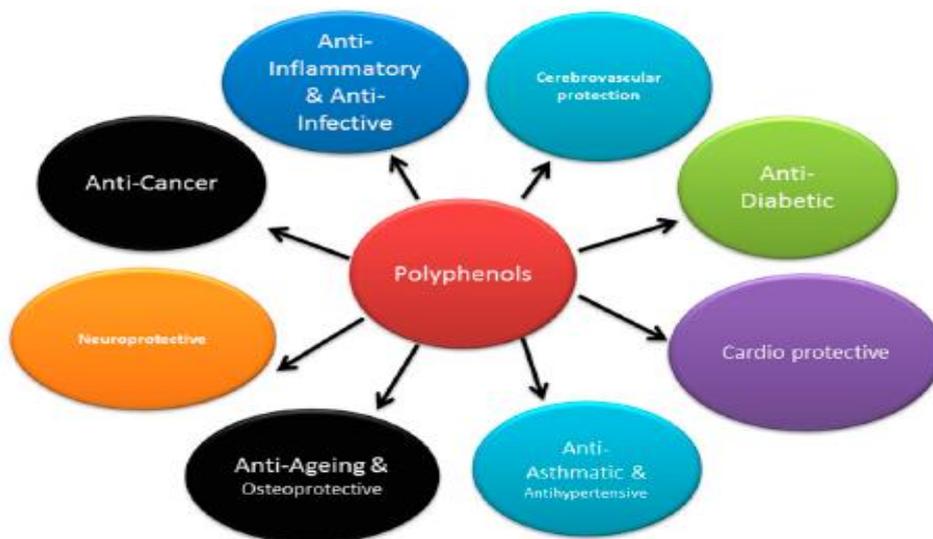


Figure15 : Rôle des polyphénols dans la santé humaine (Ganesan et al, 2017).

En conclusion : les polyphénols ont des effets bénéfiques pour la santé et peuvent être utilisés en supplémentation nutritionnelle pour alléger les effets néfastes des pathologies. Leur action est avérée pour certaines pathologies : diabète, cancers, cardiopathologies, pathologies cognitives....

2. Le stress oxydant

Dans cette partie, nous faisons une synthèse des connaissances sur le stress oxydant.

Les radicaux libres, sont des molécules non complètement oxydées, avec un électron célibataire (**Zou et al, 2008**)

2.1. Origine de formation des ROS

La plupart de ces substances vient de la chaîne phosphorylante, la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette chaîne métabolique joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en deux molécules d'eau. Cette réaction de réduction directe impliquant la présence de quatre électrons est rendue possible grâce à la chaîne respiratoire localisée dans la membrane interne de la mitochondrie. Les conséquences de cette activité mitochondriale seront doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournira à la cellule l'énergie nécessaire à son fonctionnement (36 molécules d'ATP) et d'autre part, suite à des imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale, environ 0,4 à 4 % de l'oxygène ne sera pas correctement converti en eau, ce qui génère des radicaux libres ou ROS « Radical oxygen species » (**Jeremy, 2006**)

Tableau 4 : Les principales espèces réactives de l'oxygène.

Espèce réactives	Réaction de formation	Propriétés
L'anion superoxyde : $O_2^{\bullet -}$	Formé par la réduction <u>monoélectrique</u> de l'oxygène : addition d'un seul électron. $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$	C'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ROS. (Finaud, 2008)
Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2	Produit à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysé par le <u>superoxydedismutase</u> . (Goldstein et al, 1994) $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (OH^\bullet).
Le radical hydroxyle : HO^\bullet	Formé par la réaction de Fenton à partir de l' H_2O_2 en présence de métaux de transition : l'ion ferreux qui réagit avec le peroxyde d'hydrogène. (Wardman & Candeias, 1996) $Fe^{2+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{3+}$ $O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2$ $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^\bullet + OH^- + Fe^{3+}$	C'est le radical le plus avide d'électron et le plus dangereux pour l'organisme.
L'oxygène singulet : 1O_2		Forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité. (Delattre et al, 2005).

La production des ROS dans les cellules humaines est essentiellement d'origine enzymatique (Beaudeau, 2006) et résulte de plusieurs mécanismes :

✓ *Chaîne Respiratoire Mitochondriale*

La mitochondrie représente le site majeur de production cellulaire du ROS : dans les cellules nonphagocytaires 80 % de l'anion superoxyde proviennent du fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet une proportion significative de l'oxygène (2 à 3 %) échappe à la réduction complète en H₂O et subit une réduction monoélectronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire pour donner naissance à l'anion superoxyde (O₂⁻), qui est le précurseur des ROS (Davezies, 2006)

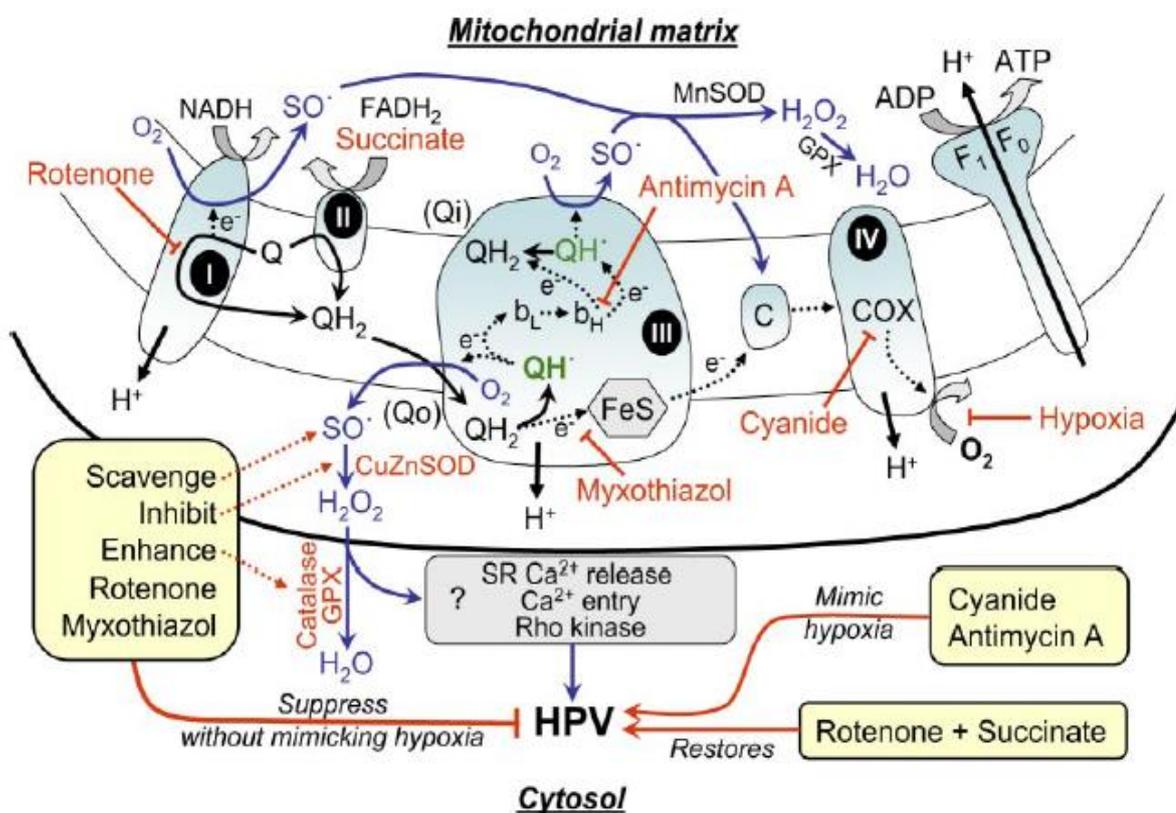


Figure 16: Formation des radicaux libres des ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Davezies, 2006).

✓ *Les phagocytes*

La phagocytose des bactéries et parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'ROS connue sous le nom d'explosion respiratoire. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase va donner lieu à la production de l'anion superoxyde (O₂⁻) qui sera dismuté (H₂O₂) grâce l'action des superoxydes dismutases (SOD), le peroxyde d'hydrogène en présence de l'ion ferreux va former le radical hydroxyle (OH[•]). Le mélange d'O₂⁻, OH[•] et l'eau oxygénée H₂O₂ et présence de chlore et sous l'effet de

myéloperoxydase (MPO) va donner de l'acide hypochlorique. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries. (Favier, 2003)

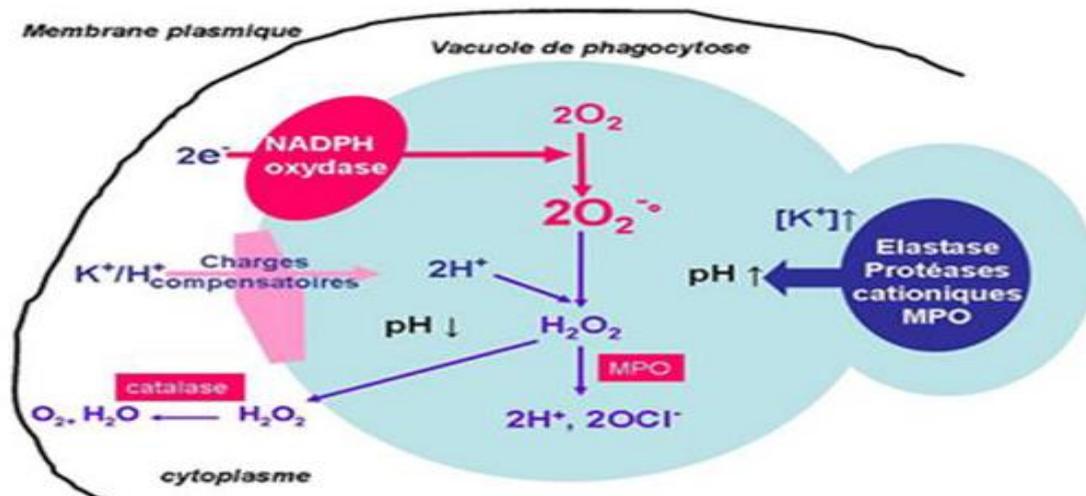


Figure17 : Métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires (Favier, 2003).

✓ *L'environnement*

Des facteurs environnementaux peuvent contribuer à la formation d'entités radicalaires. Une production importante d'ERO est observée lors d'une intoxication par des métaux lourds (cadmium, mercure, arsenic) ou dans les phénomènes d'irradiations provoquant des dommages au niveau de l'ADN. Par ailleurs, la fumée de tabac, l'alcool ou même certains médicaments (Xénobiotiques) peuvent être une source de radicaux libres par oxydations de ces composés au niveau du cytochrome P450 (Favier, 2003).

2.2. Principales cibles biologiques des ROS

Les ROS avides d'électrons pour se stabiliser, s'attaquent in vivo aux biomolécules.

✓ *Les lipides membranaires*

Le radical hydroxyle se lie à liaisons acides grasse polyinsaturées des membranes. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire (Favier, 2007). La cascade d'oxydation est représenté dans la figure qui va suivre

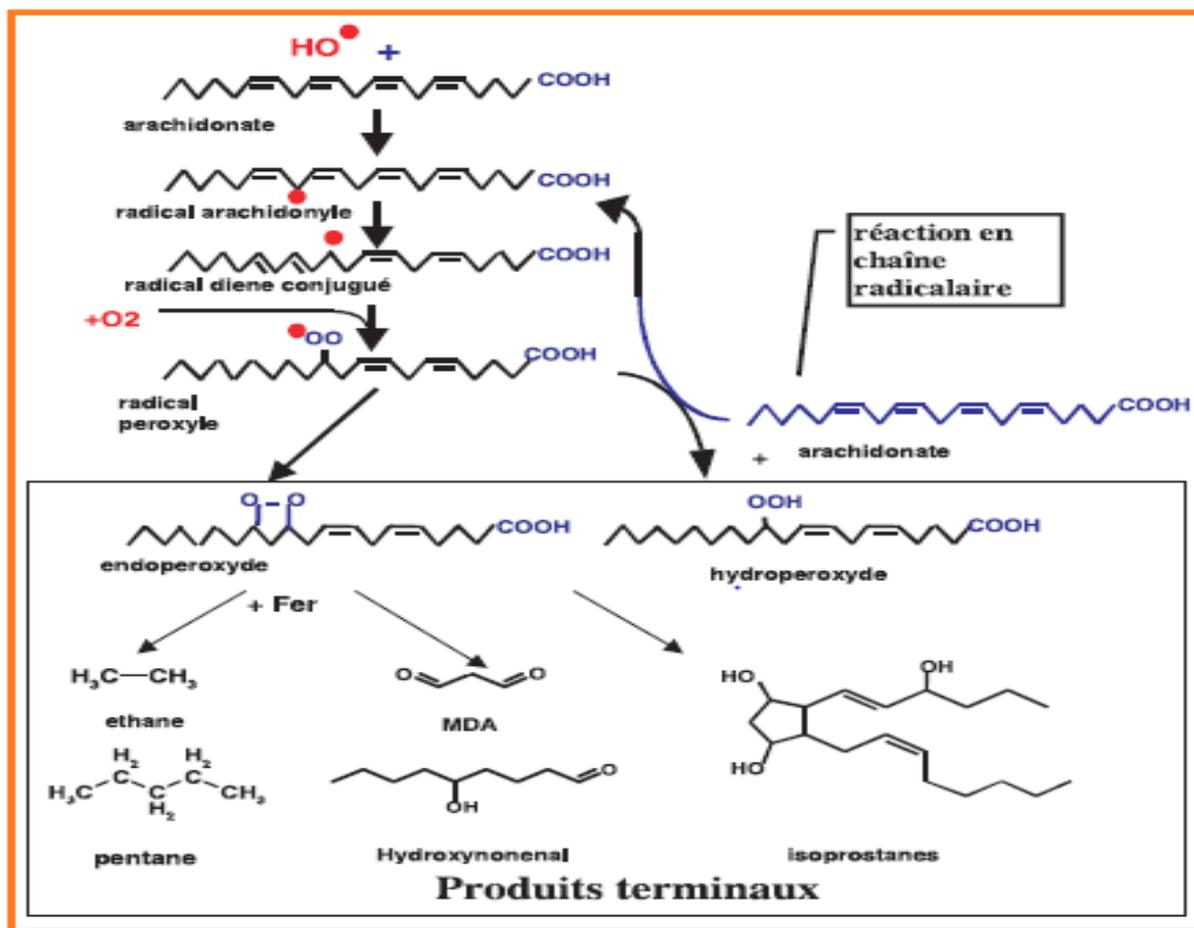


Figure 18 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2007)

Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonénel) et en alcanes (éthan, éthylène) (Haleng *et al.*, 2007).

✓ *L'acide désoxyribonucléique ou ADN*

Le radical hydroxyle OH^\bullet peut agir avec la base guanine pour former la 8-hydroxy-2'déoxyguanosine (8-OH.dG). Cette base au lieu de s'apparier avec la base cytosine, elle va s'associer avec une autre base « Adénine » conduisant à des changements au niveau du cadre de lecture et donc des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Haleng *et al.*, 2007)

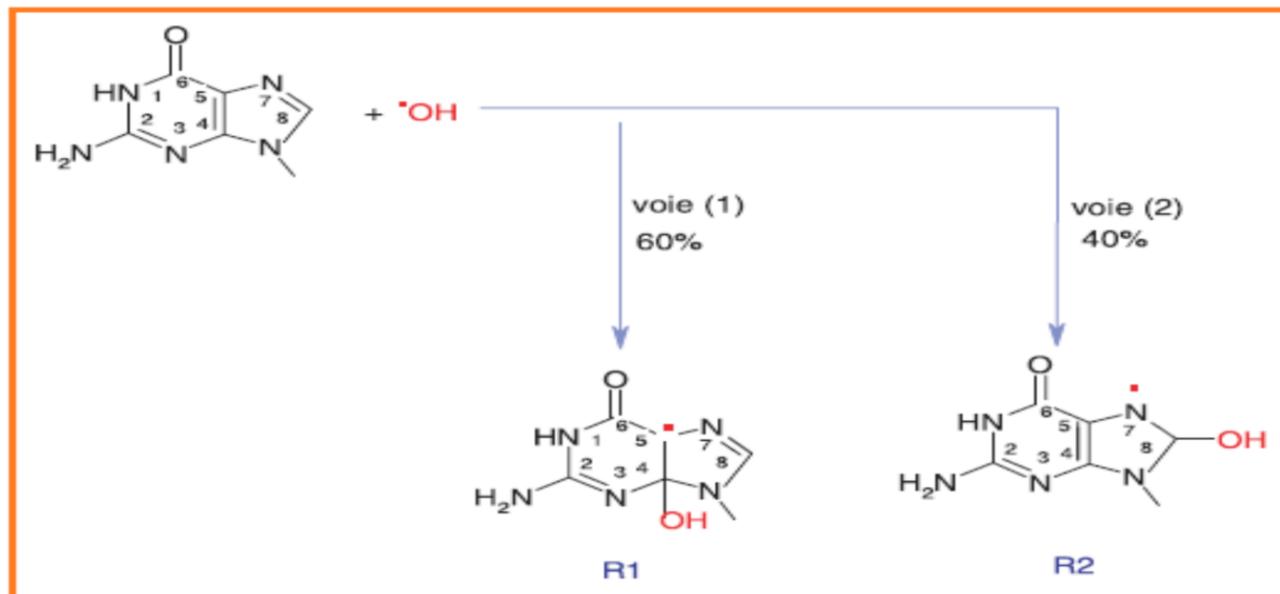


Figure 19 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine. (Gardès et al, 2005)

✓ Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine (Haleng et al, 2007). Exemple : l'oxydation des fonctions thiols de la cystéine donne l'acide sulfénique (R-SOH), puis l'acide sulfinique (R-SO₂H) et sulfonique (R-SO₃H). Les acides sulfiniques et sulfoniques sont stables et que leur oxydation est irréversible, alors que l'oxydation de l'acide sulfénique est réversible sous l'action du glutathion et/ou de la thiorédoxine (Migdal et al, 2011)

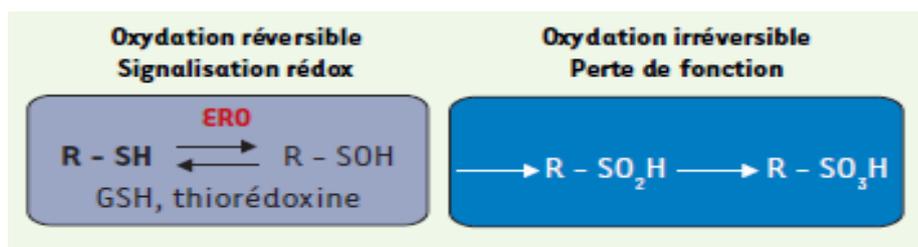


Figure 20: Oxydation des fonctions thiols de la cystéine (Migdal et al, 2011)

Concernant la chaîne peptidique l'oxydation est initiée par le radical hydroxyle qui enlève un atome d'hydrogène sur le carbone α d'une liaison peptidique en donnant naissance à un radical centré sur le carbone. En absence d'oxygène deux radicaux centrés sur le carbone peuvent réagir ensemble pour former des liaisons croisées ou interchaînes. D'autre part et en présence d'oxygène une réaction d'addition a lieu pour former un radicalperoxyde (Migdal et al, 2011)

Après une série de réactions complètes, un radical alkoxyde est formé, étape nécessaire à la fragmentation de la chaîne polypeptidique.

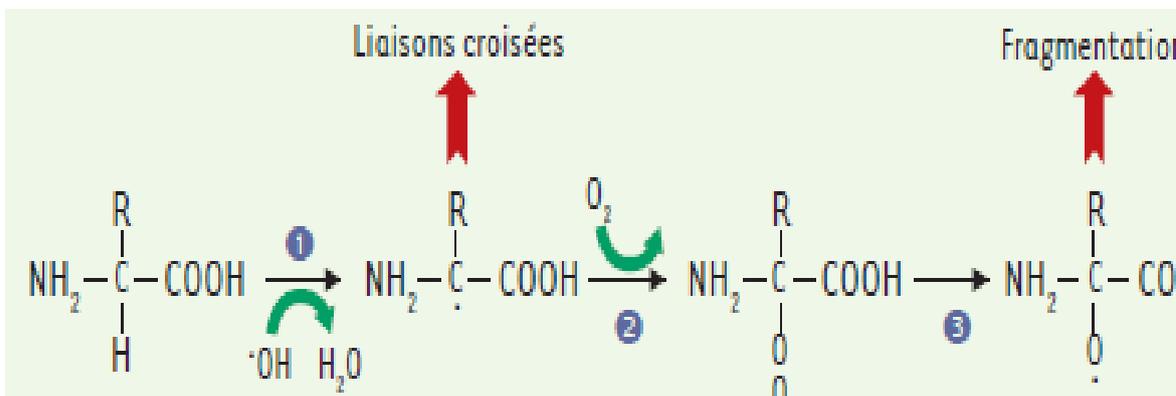


Figure 21 : Attaque radicalaire des protéines (Migdal et al, 2011)

✓ *Les lipoprotéines*

La production excessive des ROS perturbe le métabolisme du cholestérol, à l'état normal ce dernier est transporté vers les cellules par les lipoprotéines type LDL afin de couvrir leurs besoins, mais dans les situations de stress, Les LDL sont oxydées, de ce fait les cellules ne peuvent pas les reconnaître, donc ils ne captent plus ce cholestérol. Celui-ci s'accumule alors dans la paroi vasculaire. Cette présence entraîne le recrutement de cellules inflammatoire (monocytes et macrophages) qui se chargent de cholestérol sans pour autant être capable de l'évacuer. Une réaction inflammatoire se développe au sein de la paroi vasculaire et donne naissance à la plaque d'athérome (Philippe, 2006) et à la résistance à l'insuline qui conduit au diabète type 2 (Strycharz et al, 2017).

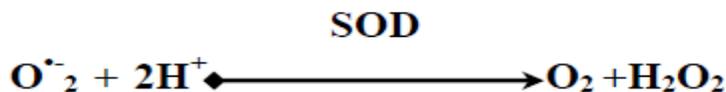
2.3. Les défenses antioxydantes

Dans le cas d'une production physiologique de radicaux libres, l'organisme dispos d'un système efficace de protection qui lui permet de lutter contre ces espèces radicalaires. Ce système s'appelle les capacités anti-oxydantes.

✓ *Le système antioxydant enzymatique*

a- Les superoxydes dismutases (SOD) : (EC : 1.15.1.1)

Elles constituent la première ligne de protection contre les ROS, elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, empêchant ainsi la coexistence de ces deux espèces radicalaires, et par conséquent la génération du radical hydroxyle. Il existe trois types de SOD ayant une localisation différente : une SOD cytoplasmique dimérique à cuivre et zinc, une SOD extracellulaire tétramérique à cuivre et zinc, et une SOD mitochondriale tétramérique à manganèse. (Haleng J. et al., 2007)



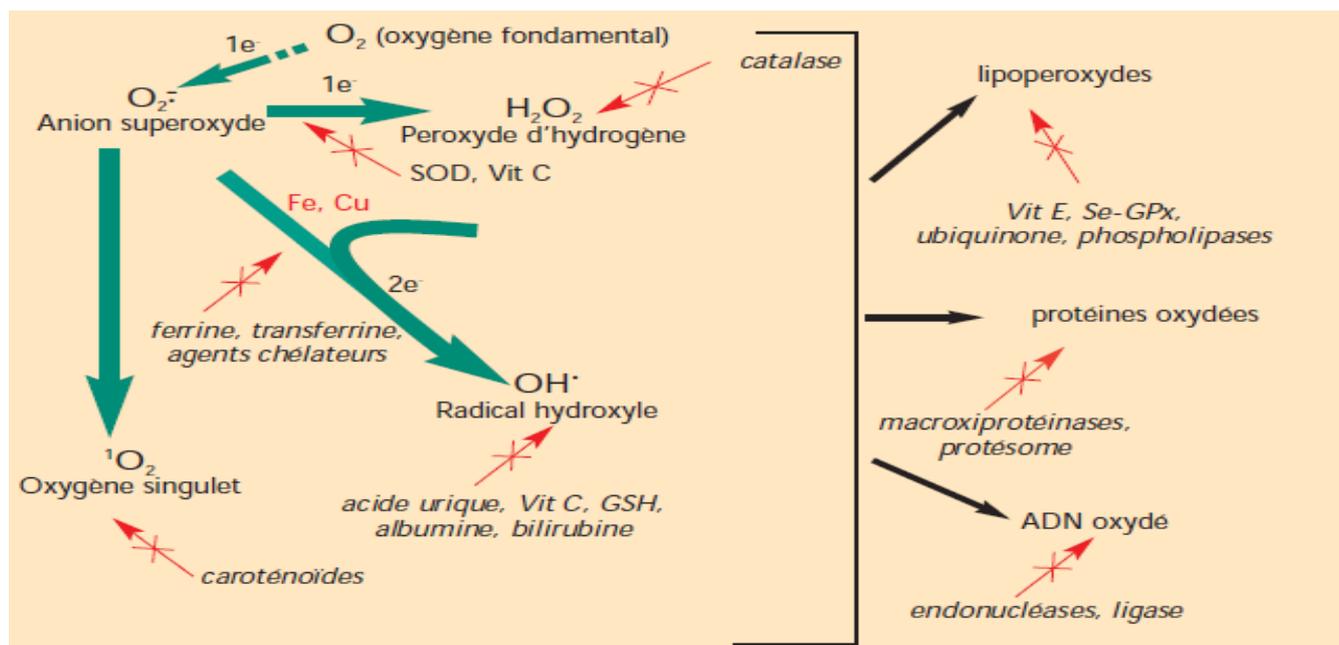


Figure 22 : Régulation de la production des espèces oxygénées activées (EOA) par des systèmes antioxydants. (Pincemail et al, 2001). SOD :superoxyde-dismutase ; Se - GPx : glutathion-peroxydase sélénodépendante ; GSH : glutathion.

b-Catalase : (EC : 1.11.1.6)

Cette enzyme joue un rôle important dans l'élimination de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intracellulaire produit généralement sous l'action de SOD (superoxydedismutase). H_2O_2 est toxique pour les cellules (Kravea et al, 2017).



c-Les glutathion peroxydases (GPxs) : (EC : 1.11.1.9)

Des sélénoprotéines, catalysent la réaction de réduction des peroxydes aux dépens de son substrat spécifique (le glutathion). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

Il existe en 5 isoformes : LaGPx 1 cytoplasmique et mitochondriale, La GPx2 gastro-intestinale, La GPx3 et la GPx4 plasmique, et la GPx5 Épидidymaire (Delattre et al, 2005).

d-Le système thiorédoxines

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif.

e-Glutathion-S-transférase(GST) : (EC 2.5.1.18)

C'est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (**Renuka et al, 2003**).

La glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (**Zhihua et al, 2004**) (**Gattás et al, 2004**).

L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit :



✓ ***Système antioxydante non enzymatique***

Certains aliments sont riches en antioxydants, comme les omégas 3 (poissons, huile de lin, noix, noisettes), en polyphénols (fruits et légumes), vitamines anti-oxydantes (Vit C, Vit E, VitD) et certains minéraux, cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Se, Mg, Cu, Zn, Fe).

a-Les omégas 3

Les acides gras polyinsaturés omégas 3 (AGPI) sont des acides gras essentiels qui doivent être dérivés de l'alimentation, ne peut être fabriqué par l'homme et d'autres mammifères en raison du manque de l'enzyme endogène pour la désaturation des omégas 3 (**Artemis et Simopoulos, 2016**)

b- Les polyphénols

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants, qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité anti-oxydante aussi importante. Les groupes hydroxyles des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes, ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu. (**Enrique et al, 2012**)

c- La vitamine C

L'acide ascorbique joue un rôle antioxydant très important, qui est lui aussi lié à sa capacité à donner des électrons. Ces électrons vont être donnés de manière séquentielle.

Dans un premier temps, l'acide ascorbique va perdre un électron et former un radical ascorbyle assez stable (10^{-5} secondes) comparé aux autres radicaux libres. Ce radical ascorbyle va ensuite perdre

un électron et va donner l'acide déhydroascorbique. Sa stabilité est importante, de l'ordre de quelques minutes. Le passage de la forme oxydée à la forme réduite, et inversement, va dépendre majoritairement de pH. L'acide L-ascorbique et l'acide déhydroascorbique forment un couple redox (ou oxydant/réducteur) avec un passage par une forme intermédiaire (le radical ascorbyl) qui va permettre de capter les radicaux libres. Cette interaction avec les radicaux libres est responsable de son potentiel antioxydant (Pescheux, 2016)

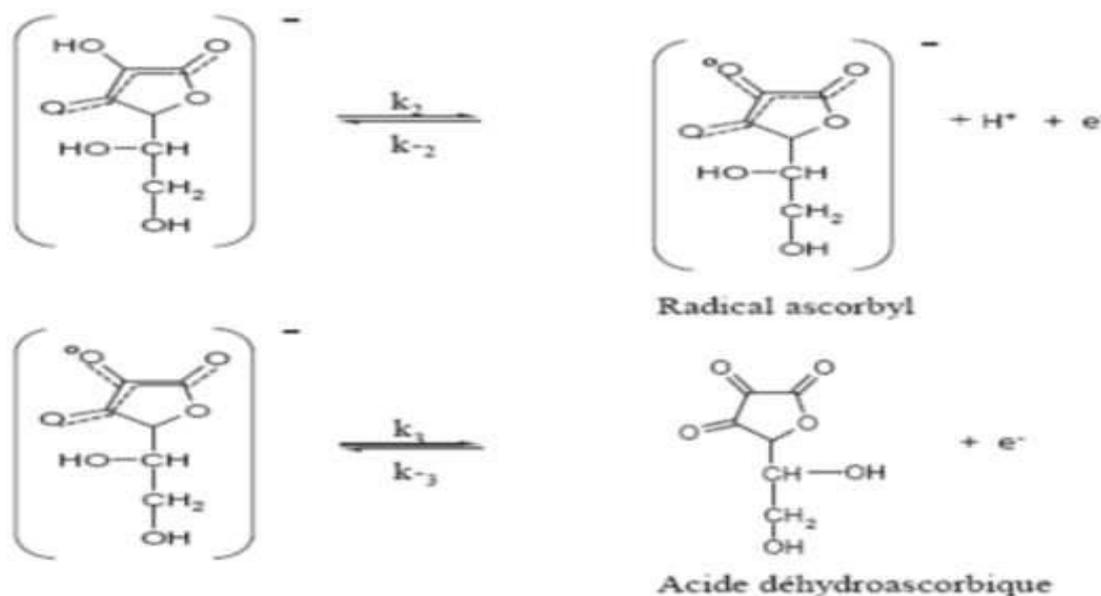


Figure 23 : La réaction d'oxydoréduction de l'acide ascorbique (Pescheux, 2016)

d-Vitamine D

La vitamine D contribue non seulement à maintenir le métabolisme normal du calcium, mais aussi à une vaste gamme d'actions non classiques (Mokhtari et al, 2017). Parmi ces actions on trouve l'activité antioxydante. Qui se traduit par :

- ✓ Un effet inducteur de l'expression des enzymes impliquées dans la défense antioxydante : superoxyde dismutase (SOD) et le Glutathion (GSH).
- ✓ Un effet inhibiteur de l'expression de la NADPH oxydase.

Il y a peu d'études consacrées à l'action antioxydante de vitamine D et son mécanisme moléculaire impliqué (Mokhtari et al, 2017).

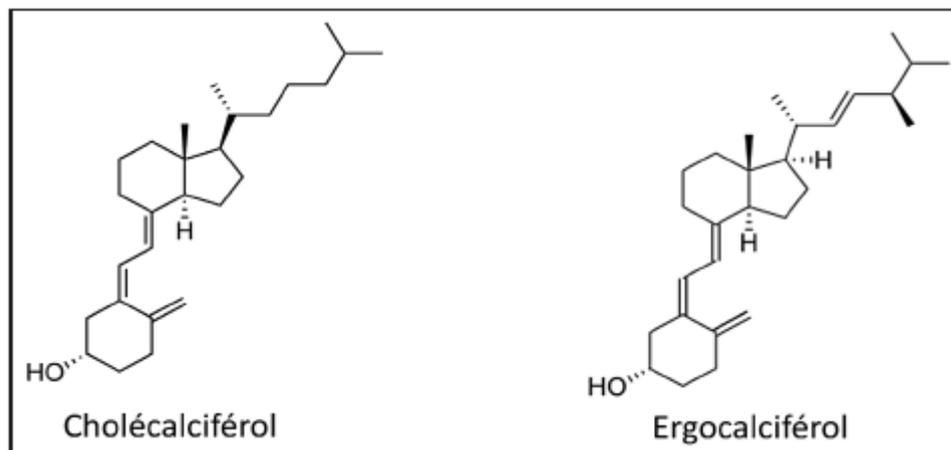


Figure24 : Structure des 2 formes actives de vitamine D (D2 et D3) (Landrier , 2014).

e-Vitamine E

La vitamine E intervient dans l'inactivation des formes réactives de l'oxygène et est donc impliquée dans la problématique du stress oxydant. Le terme vitamine E correspond à 2 grands groupes de molécules : les tocophérols et les tocotriénols (Cuverlier, 2003).

L'isoforme de vitamine E, possédant la plus forte activité antioxydante, est l' α -tocophérol, dans lequel la partie hydrophobe possède des fonctions OH dont l'atome d'hydrogène est facilement amovible, qui contribue ainsi à la neutralisation des radicaux libres

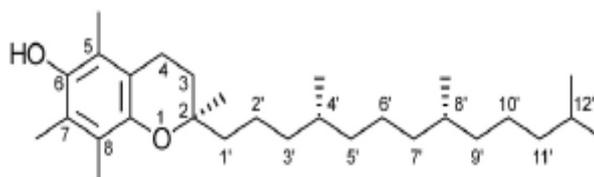


Figure 25: structure de l' α -tocopérol (Fereidoon et Adriano, 2016)

f- Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des composés liposolubles largement répandus dans la nature, ayant diverses propriétés biologiques (Westphal et al, 2015).

Tous les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire (C₄₀H₅₆) avec de nombreuses doubles liaisons. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène, également appelé provitamine A. (Halenge et al, 2007)

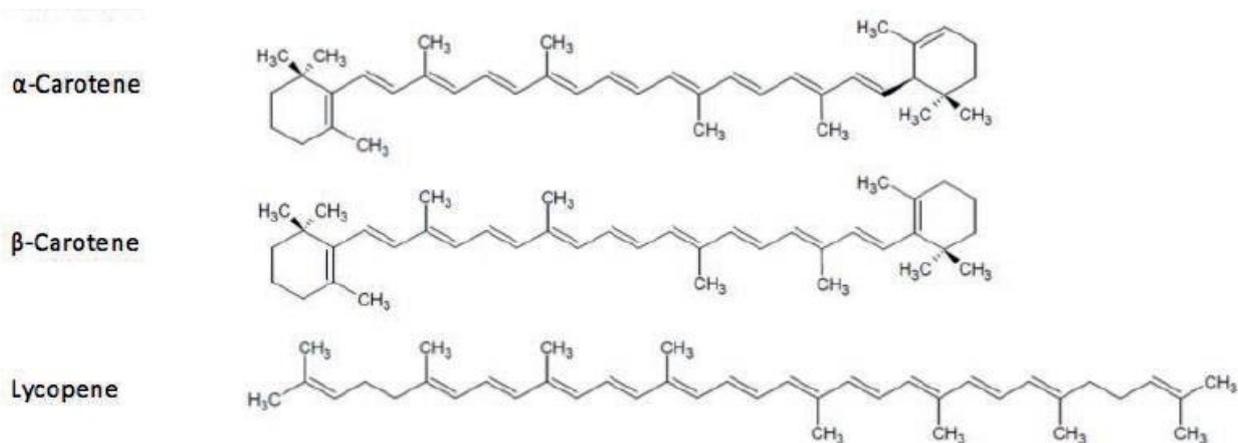


Figure 26 : Structure des carotènes (Westphal et al, 2015).

Les oligoéléments

a-Le sélénium (Se)

Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx (Haleng et al, 2007).

b-Le zinc (Zn)

Le zinc exerce une action antioxydante par le biais de plusieurs mécanismes :

- il protège de l'oxydation les groupes sulfhydryls de certaines protéines (enzymes).
 - il peut avoir un effet antioxydant direct en captant les radicaux OH⁻.
- il joue aussi un rôle fondamental dans la structure d'enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase (SOD).

c-Le cuivre (Cu)

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, le cytochrome C oxydase, la dopamine β-hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) et peut – lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant (Haleng, 2007).

1.2. Pathologie associée au stress oxydant : le diabète

Le diabète représente un gros problème de santé publique qui touche plus de 300 millions d'individus dans le monde, avec une morbidité et une mortalité significatives. En plus des effets délétères de la maladie elle-même, ces complications à long terme peuvent considérablement diminuer la qualité de la vie des patients atteints de diabète (Bang et al, 2017). Le diabète sucré est un trouble endocrinien chronique caractérisé par la présence d'une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun

supérieure à 1,26g/l (7mmol/l) à deux reprises (**Grimaldi, 2000**), attribuable à une carence insulinique relative ou absolue (**Franc, 2015**).

Il existe deux grands types de diabètes (**Grimaldi, 2000**):

- Le diabète insulino-dépendant (type 1), qui survient le plus souvent avant l'âge de 20 ans et représente 10 à 15% des diabètes.
- Le diabète non insulino-dépendant (type 2), qui survient le plus souvent après l'âge de 50 ans et représente 85 à 90 % des diabètes

- ***Le diabète type 1***

Le diabète de type 1 est une maladie chronique caractérisée par la destruction des cellules bêta qui produisent l'insuline dans le cadre d'une susceptibilité génétique, probablement en réaction à un facteur d'environnement qui reste encore inconnu. La présence d'anticorps circulants spécifiques, la susceptibilité génétique principalement associée au système CMH (major histocompatibility complex). Le rôle de l'immunité cellulaire suggèrent fortement une précipitation auto-immune. Les auto-anticorps circulants permettent de prédire la survenue d'un diabète avant l'élévation de la glycémie dans les populations à risque (**Marchand et Thivolet, 2016**).

Chez l'homme, le DT1 est une affection dont l'expression clinique est hétérogène. Ceci concerne la grande variabilité de l'âge de survenue, son association éventuelle à d'autres affections auto-immunes et son caractère familial ou, beaucoup plus souvent, sporadique (90% des cas). Les facteurs qui déterminent cette hétérogénéité ne sont pas connus.

Plusieurs études ont montré qu'il existait une prédisposition génétique au DT1. En effet, le fait d'appartenir à la famille d'un patient diabétique de type 1 induit une prédisposition génétique pour développer un DT1. Ainsi, 6 à 10 % des malades ont des antécédents familiaux de diabète au premier degré, soit une prévalence environ 20 fois supérieure à celle de la population générale où la prévalence est de l'ordre de 0,3%. De plus, les jumeaux homozygotes ont un taux de concordance pour le DT1 d'environ 50%, soit plus de 100 fois supérieur à la prévalence observée dans la population générale, ce qui démontre un impact majeur de la génétique

L'association avec le diabète se fait essentiellement avec certains allèles de gènes de classe 2 codant pour les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) DR et DQ dont certains sont prédisposant et d'autres protecteurs. Le génotype conférant le risque le plus élevé est représenté par une hétérozygotie DR3-DQ2/DR4-DQ8 (DQ8 pour DQA1*0301, DQB1*0302). En revanche, le génotype HLA DQB1*0602 confère une protection vis-à-vis du risque de diabète. Le système HLA abrite aussi d'autres gènes impliqués dans la genèse du diabète, comme l'allèle de classe I HLA 1A-24

ou d'autres gènes de classe III comme le TNF- α . Il existe, par ailleurs, d'autres gènes de prédisposition à distance du système HLA et au moins 25 régions sont repérées (**Benmohammed, 2015**)

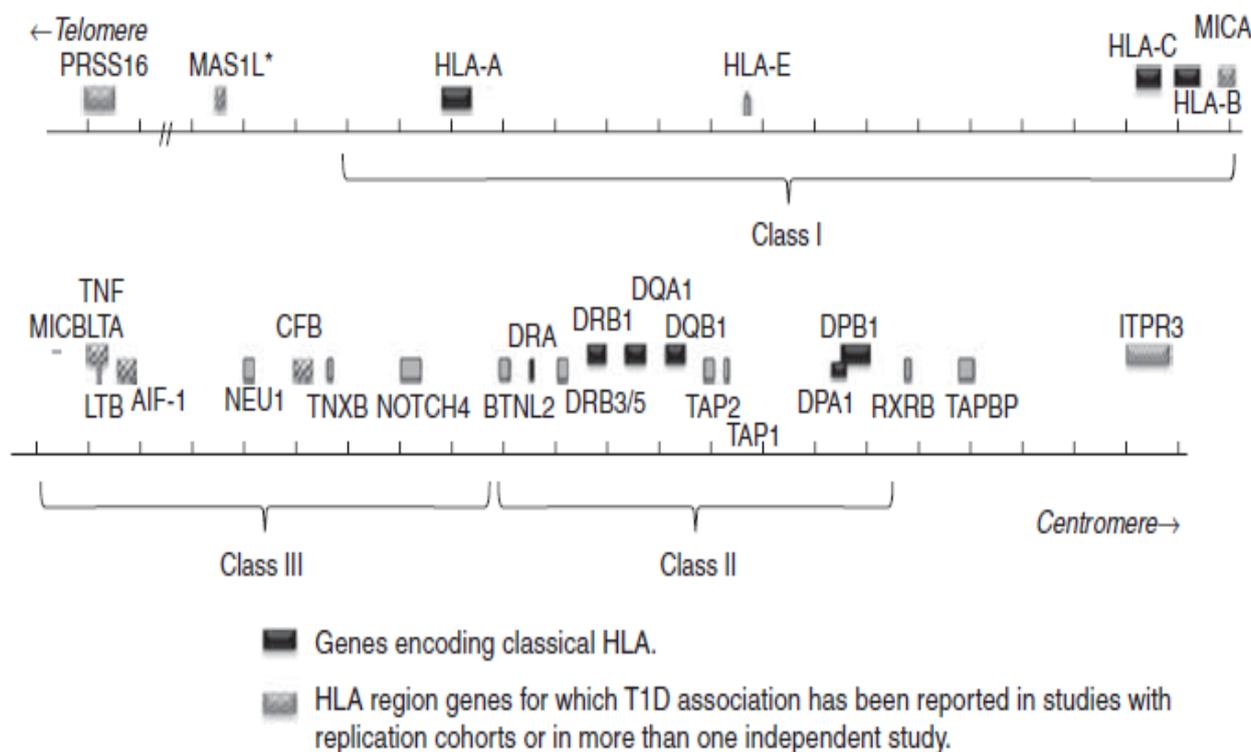


Figure 27 : Représentation schématique des gènes sélectionnés dans la région HLA. Les gènes HLA classiques sont représentés en noir. D'autres gènes ne sont pas signalés comme étant T1D-associé. Les limites approximatives des régions de classe I, de classe III et de classe II sont indiquées par crochets (**Janelle, 2012**).

Le développement de toute maladie auto-immune traduit la rupture de la tolérance immunitaire vis-à-vis de certains antigènes du soi. Ces antigènes peptidiques sont présentés aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages, principalement) grâce aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'interaction de ces molécules du CMH avec les récepteurs à l'antigène des lymphocytes T (TCR) conduit à une activation lymphocytaire spécifique à l'antigène présenté. Cette activation implique donc un complexe peptidique associant le TCR et les molécules CD3, mais elle met également en jeu des co-signaux qui amplifient ce phénomène d'activation et induit la prolifération des lymphocytes T. Parmi ces signaux de co-stimulation, citons le rôle crucial des molécules B7 et CD28, ainsi que CD40 et CD40L.

Dans les années 1970 ont été découvertes (**Laporte-Daube C, 2013**):

- ✓ la présence d'auto-anticorps sur les coupes de pancréas.
- ✓ l'expression de molécules du CMH spécifiques chez les patients atteints de diabète de type 1.

- ✓ l'existence de lymphocytes T activés contre des antigènes exprimés par les cellules β .

Les cellules β du pancréas expriment le VDR (Vitamin D resptor) et ont une activité 1 α -hydroxylase. La vitamine D participe à la modulation de la sécrétion de l'insuline et de la sensibilité à l'insuline, en régulant les flux calciques transmembranaires et la concentration calcique extracellulaire. Les propriétés immuno-modulatrices de la vitamine D peuvent agir sur le processus auto-immun qui conduit au DT1. L'administration de vitamine D chez les souris permet de prévenir la réaction immunitaire contre les îlots de Langerhans et la survenue du diabète. Chez certaines populations, l'association entre un ou des polymorphismes du gène VDR et le risque de DT1 est rapportée. Dans une étude de cohorte, il a été montré que l'administration de vitamine D régulièrement pendant la première année de vie réduisait le risque relatif de survenue d'un DT1 avant 33 ans dans près de 90 % en comparaison avec l'absence de supplémentation (**Bahri et al, 2013**)

- ***Le diabète type 2***

Le diabète type 2 est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique dont les éléments physiopathologiques comprennent une résistance accrue des tissus périphériques (foie, muscles) à l'action de l'insuline, une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas, une sécrétion de glucagon inappropriée, ainsi qu'une diminution de l'effet des incrétines (hormones intestinales stimulant la sécrétion postprandiale de l'insuline) (**Slama-chaudhry et al, 2013**).

Il existe un facteur génétique indéniable dans la transmission du diabète de type 2, faisant intervenir probablement des mécanismes polygéniques. D'après les études familiales, 30% environ des diabétiques de type 2 ont au moins un parent diabétique dans leur famille. Lorsque les deux parents sont diabétiques de type 2, le risque pour les enfants de développer la pathologie est multiplié par deux comparé au risque encouru si un seul des parents est concerné (**Bernard et al, 2013**)

Près de 90% des sujets diabétiques de type 2 présentent ou ont présenté un excès pondéral. L'obésité est un facteur de risque évident de développement du diabète de type 2. Le type de l'obésité, caractérisé par le mode de répartition des masses adipeuses, doit être également considéré de manière attentive. En effet, c'est la répartition des graisses de type androïde, c'est à dire au niveau abdominal et périviscéral, qui semble délétère sur le plan métabolique. A l'opposé, l'obésité gynoïde (répartition des graisses à la partie inférieure du corps) aurait un effet protecteur vis à vis de ces complications métaboliques (**Abbasi et al, 2017**).

Le récepteur de l'insuline RI appartient à la famille des récepteurs de facteurs de croissance qui possèdent une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. Le RI est formé de deux chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfure à deux chaînes β transmembranaires. On peut

considérer le récepteur comme un hétérodimère pré-associé dans la membrane. Chaque sous-unité α possède un domaine complet de liaison de l'hormone situé de part et d'autre d'une séquence riche en cystéines permettant l'établissement de ponts disulfure structurant ce domaine. Cependant, une seule molécule d'insuline, en se liant avec une haute affinité sur les deux sous-unités α , va permettre d'activer complètement le récepteur. Les sites vacants ne peuvent alors être occupés qu'avec une basse affinité par une autre molécule d'insuline, du fait de l'encombrement stérique du domaine de liaison par la première molécule et ne participent pas à l'activation du récepteur (Mangmool *et al*, 2016)

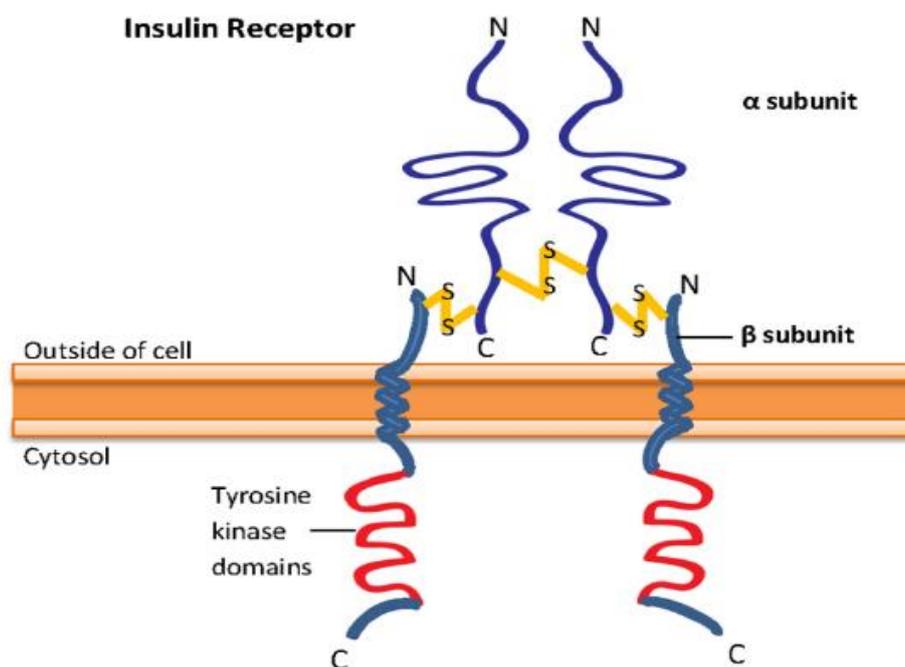


Figure 29: Structure de récepteur de l'insuline (Mangmool *et al*, 2016)

Lors de la liaison de l'insuline à son récepteur, une cascade d'événements intracellulaires dans les cellules est initiée. Le récepteur d'insuline en état de phosphorylation active des protéines de substrat telles que Shc et IRS. La phosphorylation de Shc favorise la formation du complexe Shc / Grb-2 / SOS qui stimule la voie MAP kinase, entraînant la mitogénèse, la croissance cellulaire et la différenciation (Mangmool *et al*, 2016) :

Les protéines IRS phosphorylées interagissent avec de nombreuses autres protéines de signalisation, y compris Grb-2 et PI3K et changent la fonction cellulaire. PI3K catalyse la formation de PIP3 qui, à son tour, active Akt et aPKC, et contrôle de nombreux aspects de l'action de l'insuline, y compris la synthèse des protéines, la synthèse du glycogène, et le transport de glucose par translocation de GLUT4 à la membrane plasmique. Le glucose qui pénètre dans les cellules est rapidement phosphorylé par l'hexokinase pour générer du glucose-6-phosphate (G-6-P) et est ensuite

utilisé pour le métabolisme et / ou stocké dans les cellules sous forme de glycogène ou TG (Strycharz et al, 2017).

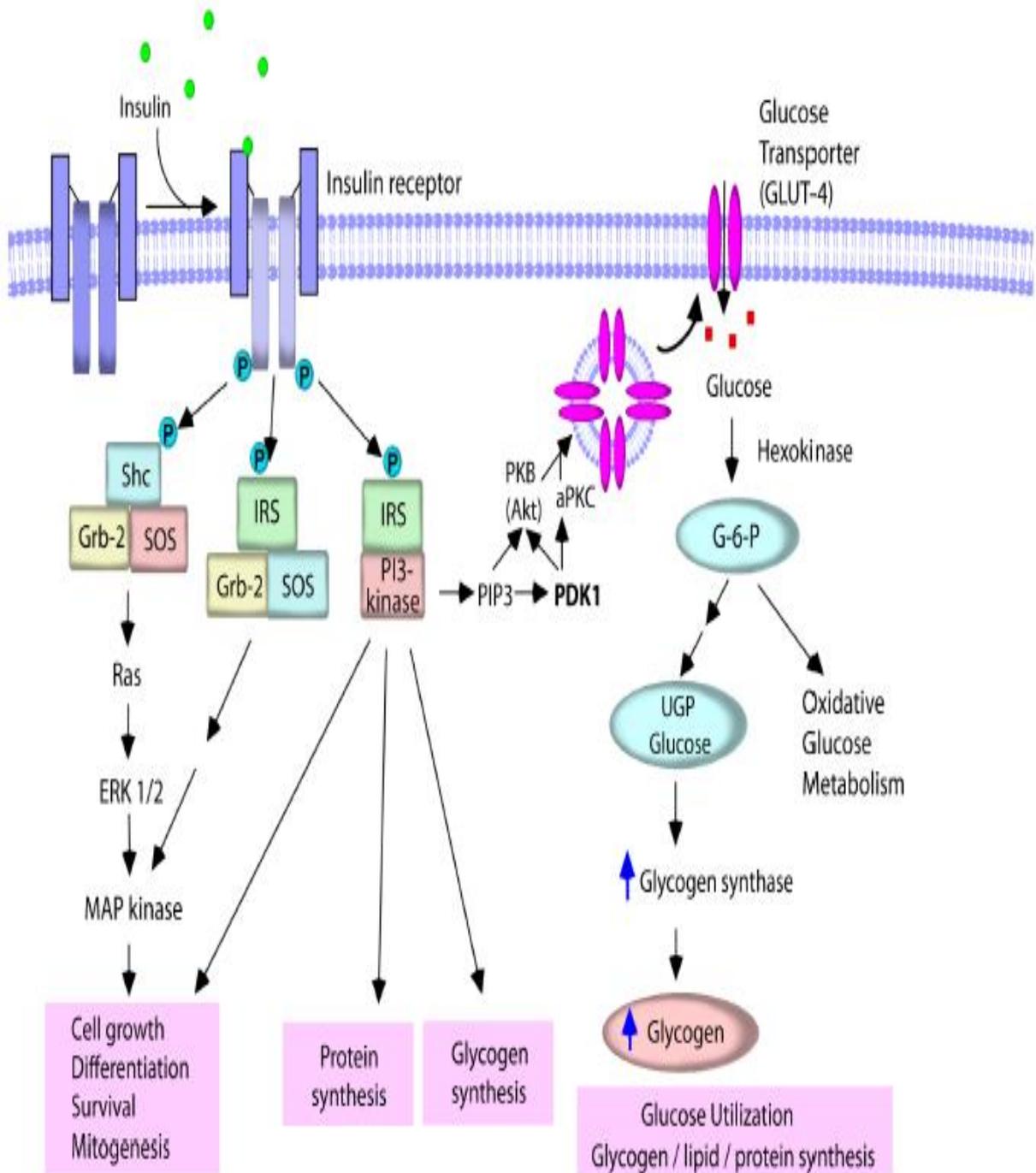


Figure 30 : la voie de signalisation de l'insuline (Mangmool et al, 2016)

La phosphorylation des résidus sérine ou thréonine semble jouer, vis-à-vis du récepteur et des protéines IRS, un rôle antagoniste de celui de la phosphorylation des seuls résidus tyrosine, intervenant probablement de façon majeure dans les mécanismes de résistance à l'insuline. Cette phosphorylation des résidus sérine ou thréonine permettrait de mettre fin à l'activation physiologique du récepteur, son exacerbation en pathologie ayant en revanche un rôle délétère induisant une résistance à l'hormone (Capeau, 2003)

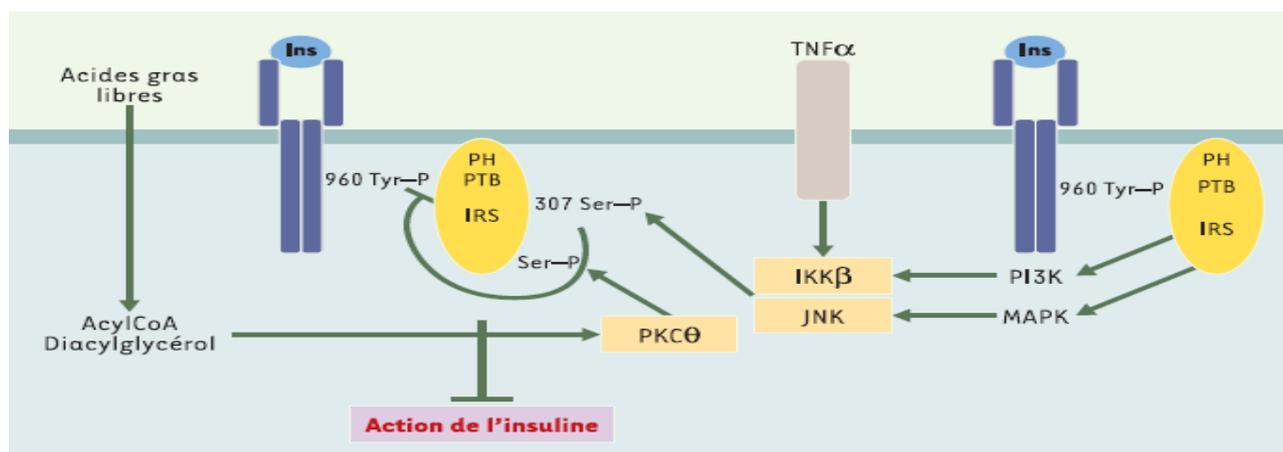


Figure 31 : Inhibition du signal insuline par phosphorylation sur Ser/Thr des protéines IRS (Capeau, 2003)

Cette phosphorylation peut résulter d'un rétrocontrôle du signal insuline ou de l'action d'autres agents comme le TNF α (tumor necrosis factor α) et les acides gras libres, mais aussi de l'IL - 1 β , et même l'insuline. La kinase IKK β (inhibitor of nuclear factor κ B kinase), la MAP-kinase et surtout la Jun kinase (JNK) sont capables d'effectuer de telles phosphorylations. En phosphorylant la sérine 307 de l'IRS1 murin, la JNK empêche l'interaction du domaine PTB de IRS1/2 avec la tyrosine 960 phosphorylée du RI et donc la transmission du signal insulinique. Cette kinase est activée par l'insuline et par le TNF α . Par ailleurs, l'élévation des acides gras libres et l'accumulation du diacylglycérol et d'acylCoA pourraient conduire à une activation de la PKC θ et à une phosphorylation de l'IRS1 sur les résidus Ser/Thr (Capeau , 2003).

4. Le matériel végétal utilisé dans cette étude : arbuste *Rubus fruticosus*

L'arbuste *Rubus fruticosus* fait partie de la famille des Rosacées qui cohabitent avec les Fabacées, les Crassulacées, les Saxifragacées, les Platanacées et quelques autres. Elle compte environ 120 genres et 3 000 espèces (30 genres et 150 espèces dans la flore de France) vivant principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord. Elle partage avec les Fabacées le fait d'avoir des feuilles stipulées et des graines exalbuminées. Elle en diffère par ses fleurs presque toujours régulières et ses fruits de nature variée qui ne sont jamais une gousse (Reille, 2016).

Noms communs synonymes : Ronce arbrisseau, Aronce, Catimuron, Mûrier sauvage, Mûrier des haies, Mûrier de renard, Mûron, Mûre (Wehrle, 1985).

La famille des Rosacées est divisée en 5 sous-familles :

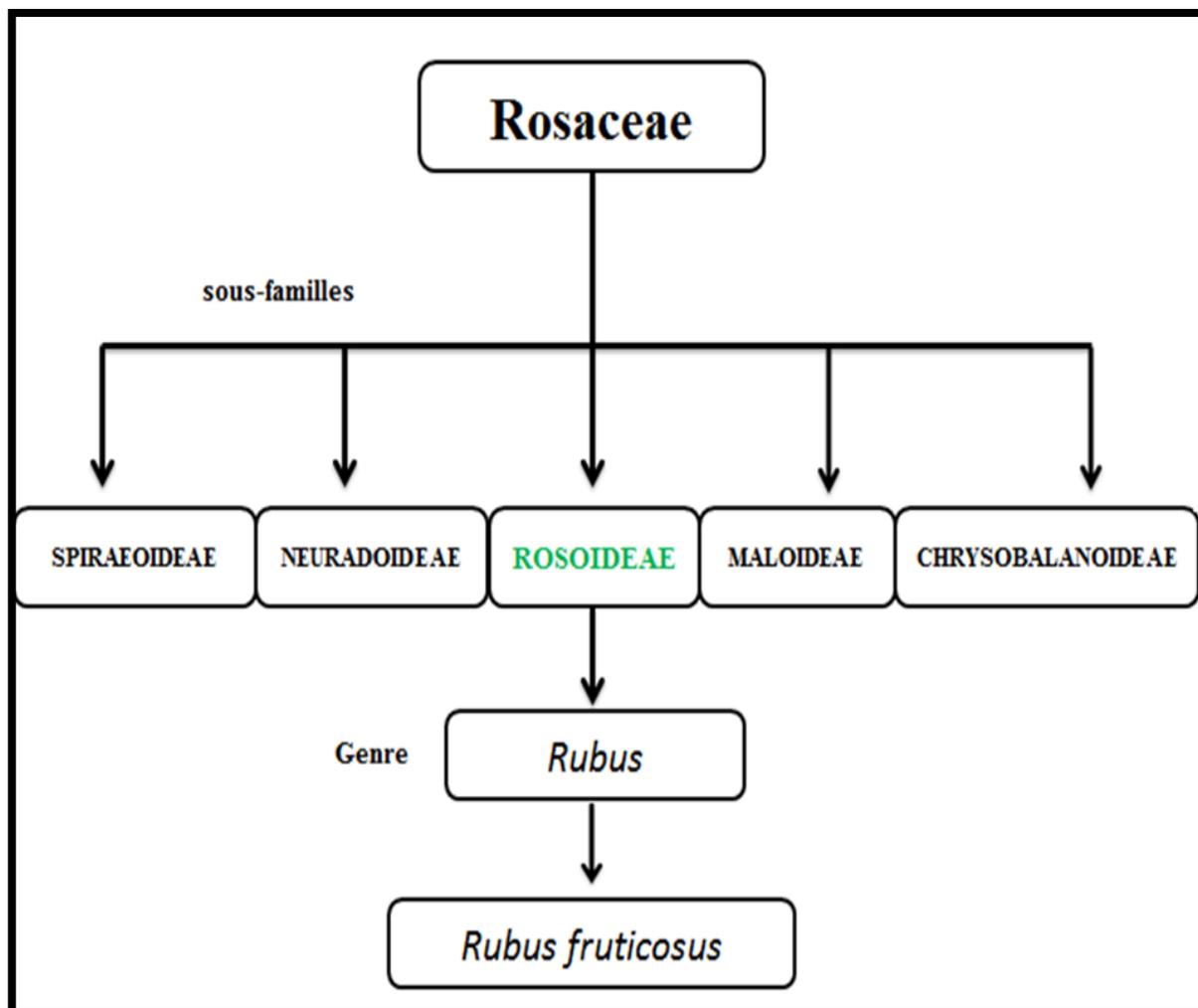


Figure 32 : Systématique de *Rubus fruticosus*, famille des rosaceae (Bulletin annuel, 2011)

Nom botanique de l'espèce étudiée : *Rubus fruticosus* (Famille des Rosacées).

Les ronces sont des sous-arbrisseaux vivaces, plus ou moins épineux, dont la souche ligneuse produit de longs rejets d'une longueur moyenne de 2 m, appelés turions ou sarments, à section anguleuse. Ces rejets sont bisannuels et sont munis d'aiguillons droits ou crochus plus ou moins nombreux. A la fin de la première année, les turions se recourbent, touchent terre à leur extrémité et s'enracinent (Zia-Ul-Haq et al, 2014).

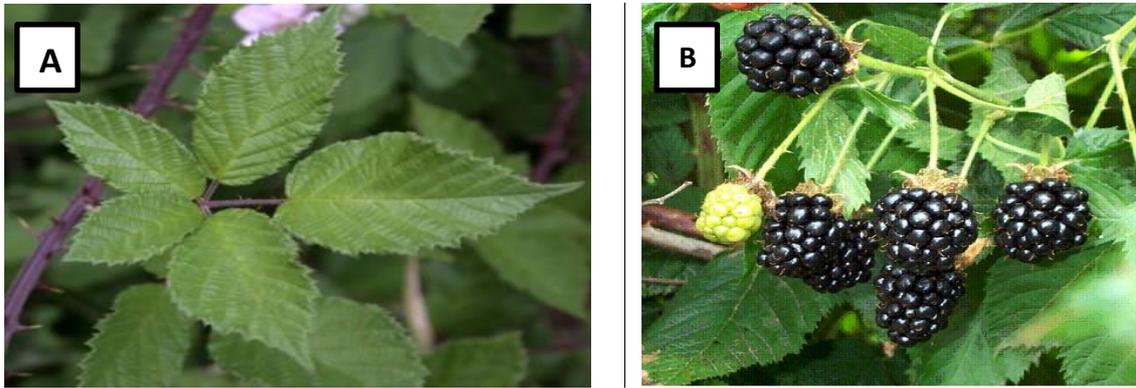


Figure 33: *Rubus fruticosus* : tige et feuilles au stade bourgeonnement (A) et ses fruits (B)

Le fruit de *Rubus fruticosus* ressemble avec le "fruit" du mûrier noir, (*Morus nigra*). C'est un type de fruit assez rare dans le monde botanique, mais commun à tout le genre *Rubus* (auquel appartient le framboisier, *Rubus idaeus*). C'est un assemblage de petites drupes : chacun des globules charnus de la mûre est l'homologue d'une cerise, un petit fruit charnu à noyau, contenant une seule graine (Reille, 2016).

4.1. Distribution mondiale

On trouve l'espèce *Rubus fruticosus* entre le 30^e et le 65^e parallèle de l'hémisphère Nord et entre le 28^e et 40^e parallèle de l'hémisphère sud. Son aire de répartition s'étend sur toute l'Europe, L'Afrique du Nord (Atlas), l'Afrique australe, le Sud-Est de l'Australie, la Nouvelle-Zélande, les Etats-Unis et le Chili. La ronce est également présente plus près de l'Equateur, mais à des altitudes plus élevées (on en trouve jusqu'à plus de 2 000 m d'altitude) (Wehrlen, 1985).

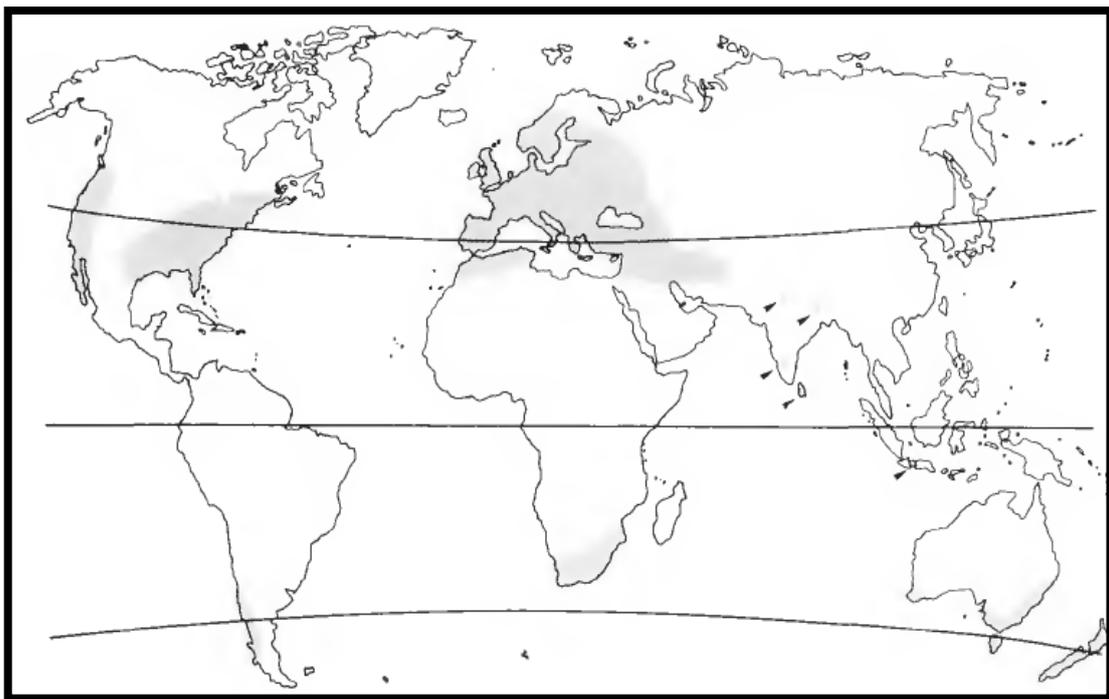


Figure 34 : La répartition mondiale de la Ronce. (Wehrlen, 1985)

4.2. Classification botanique l'espèce *Rubus fruticosus*

La ronce commune, ronce des bois ou ronce des haies (*Rubus fruticosus*) est un arbrisseau épineux de la famille des rosacées, d'après la classification il est une dicotylédone classée de la manière suivante (Zia-Ul-Haq et al, 2014):

Règne : **Plantae**

Sous-règne : **Tracheobionta**

Division : **Magnoliophyta**

Classe : **Magnoliopsida**

Sous-classe : **Rosidae**

Ordre : **Rosales**

Famille : **Rosaceae**

Genre : ***Rubus***

Espèce : ***Rubus fruticosus***

Le Rubus fruticosus est un Chaméphyte herbacé à base ligneuse : les pousses sont végétatives durant la première année et florifères durant la seconde année. Le renouvellement des sarments s'effectue par des pousses basales. Les uns, arqués, sont issus de bourgeons inférieurs, fixés sur la base des sarments en place, les autres, plus vigoureux, sont issus directement de bourgeons fixés sur la souche, donnant l'illusion de pseudo-drageons (Montegut, 1982).

Généralement, en fin de seconde année, les rameaux meurent et se dessèchent (Richardson, 1980) citent le cas de tiges ayant vécu 3 ans). Le rameau arqué qui les a portés meurt et disparaît presque totalement à son tour. Il ne conserve vivant que la base d'où étaient parties les ramifications de l'année, porteuses des boutons floraux pour l'année suivante, et ainsi de suite. Les sarments arqués de deux ans qui portent les inflorescences peuvent se marcotter en entrant en contact avec le sol.

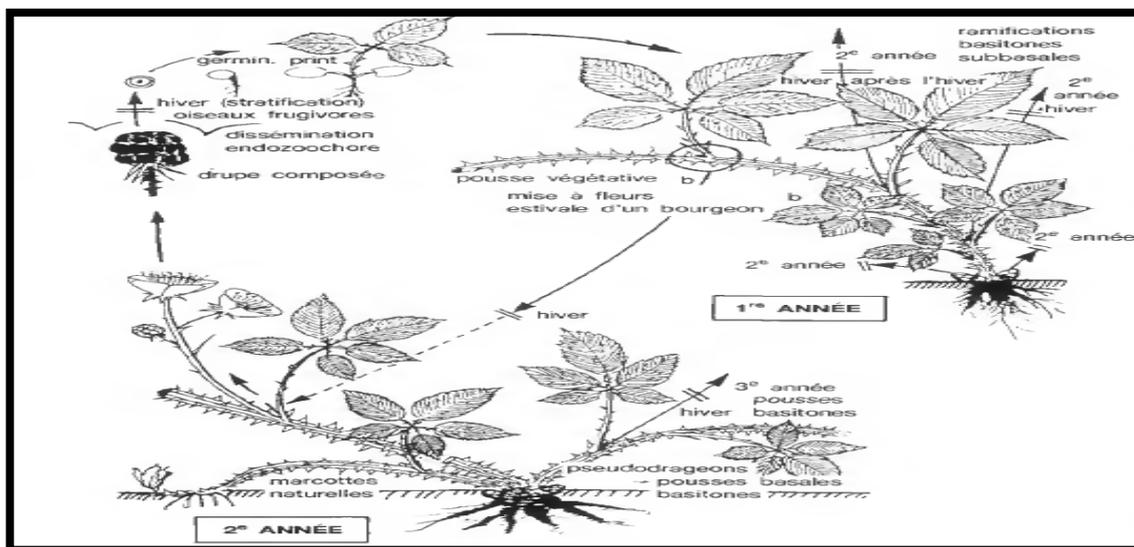


Figure 35: Cycle de développement de *Rubus fruticosus* (D'après Montegut, 1982)

4.3. Composition en polyphénols du fruit

Les polyphénols sont des composés organiques, très abondants dans les fruits de mûres, qui jouent également un rôle sur la physiologie des plantes, particulièrement dans la défense contre les biotiques et le stress abiotique. (Huang et al, 2012)

Tableau 5 : Les polyphénols dans les fruits de mûres (Base Phénol explorer, 2013)

Les polyphénols	Quantité (mg/100g)
Flavonoïdes	199,23
Acides phénoliques	57,43
Polyphénols	256,66

La teneur en flavonoïdes des fruits de mûres constitue la moitié des polyphénols (Base Phénol explorer, 2013).

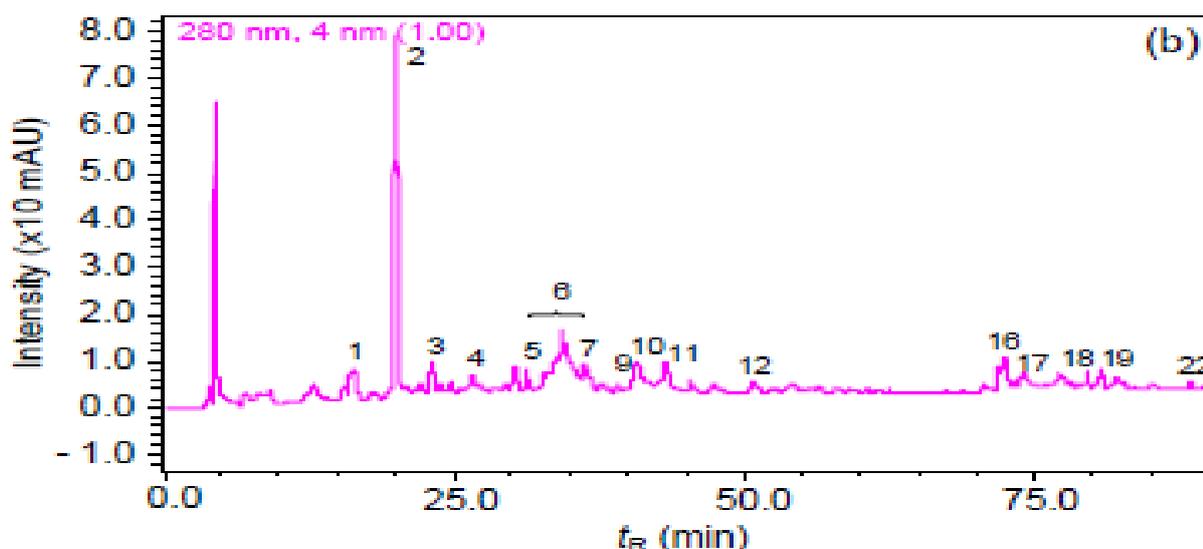
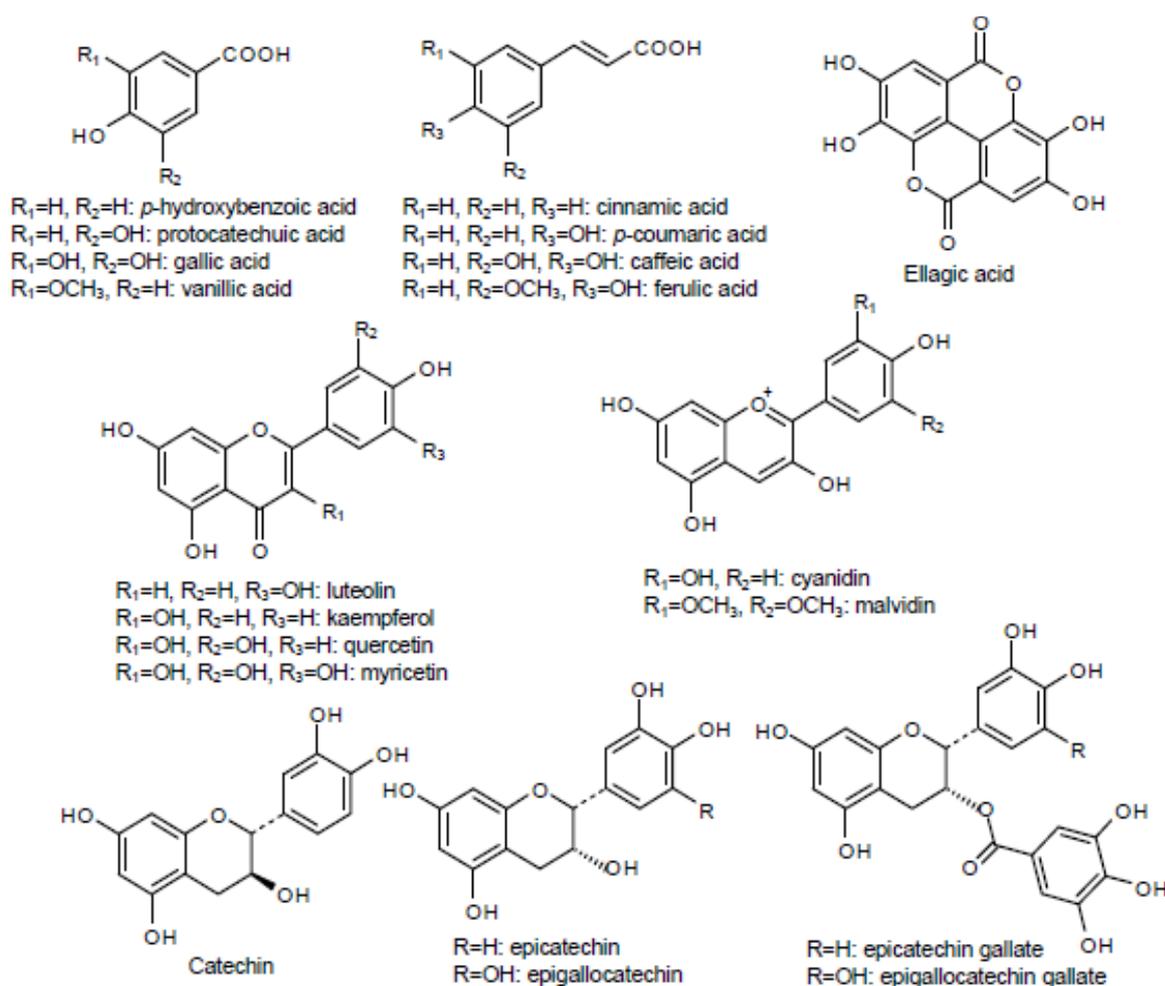


Figure 36 : Profil de l' HPLC représente la nature des polyphénols qui compose les fruits de mûres (Huang et al, 2012)

Tableau 6 : Composition en polyphénol des fruits de mûres (Huang et al, 2012)

Numéro de pic	Composant
1	Acide gallique.
2	Gallocatechine.
3	Acide protocatechique.
4	Epigallocatechine.
5	Catechine.
6	Tannins (Proanthocyanidine).
7	Acide hydroxybenzoïque.
9	Acide caféïque.
10	malvidin-3-galactoside.
11	malvidin-3-glucoside.
12	p-coumaric acid.
16	quercetin-3-rutinoside.
17	Acide éllagique.
18	Myricetine.
19	quercetin-3-rhamnoside.
22	Luteoline.

**Figure 37 :** Structures de certains composés phénoliques typiques détectés dans les fruits de mûres (Huang et al, 2012)

4.4. Composition en polyphénols des feuilles

Les feuilles de mûres sont utilisées depuis très longtemps pour leurs diverses propriétés et composants, au Japon notamment, qui utilisent les jeunes riches en micronutriments et en polyphénols (Huang *et al*, 2012) bénéfiques pour la santé humaine.

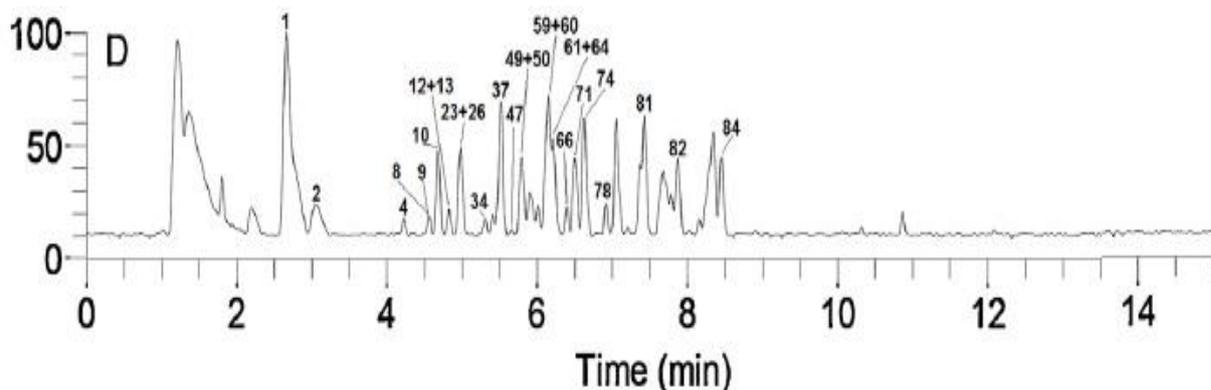


Figure 38 : Polyphénols identifiés dans l'extrait de feuilles de mûre, en utilisant l'analyse UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/Ms analysis (Aleksandra *et al*, 2016)

Tableau 8 : Composition en polyphénols des feuilles de mûres (Aleksandra *et al*, 2016)

N° de pic	Structure	Nom de composé
1	C7H5O5 ⁻	Acide gallique.
2	C13H15O7 ⁻	Acide gallique hexoside.
4	C13H15O7 ⁻	Acide dihydroxybenzoïque hexoside.
8	C18H23O13 ⁻	Acide dihydroxybenzoïque.
9	C16H17O9 ⁻	Acide 3-O-caffeoylquinique.
10	C15H17O9 ⁻	Acide caféique hexoside isomère 1
12	C15H15O9 ⁻	Acide p-coumaroylhexarique isomère 1
13	C13H13O8 ⁻	Acide caffeoylthreonique isomère 1
23	C15H17O9 ⁻	Acide cafeique hexoside isomère 3
26	C16H17O8 ⁻	Acide 3-O-P coumaroylquinique.
34	C20H13O14 ⁻	Acide ellagique hexuronide.
37	C17H19O9 ⁻	Méthyl 3-O-caffeoylquininate.
47	C16H19O9 ⁻	Acide ferulique hexoside.
49	C17H19O9 ⁻	Méthyl 4-O-caffeoylquininate.
50	C19H13O12 ⁻	Acide éllagique pentoside.
59	C21H19O12 ⁻	Quercitine-3-O- hexoside.
60	C21H17O13 ⁻	Quercitine -3-O-hexuronide.
61	C14H5O8 ⁻	Acide ellagique.
64	C27H20O15 ⁻	Kaempférol-7-O(6''-O rhmnosyl)hexoside.
66	C28H31O16 ⁻	Isorhamnetine-7-O(6''-O rhmnosyl)hexoside
71	C21H10O11 ⁻	Kampférol3-O-hexoside isomère 2.
74	C22H19O13 ⁻	Isorhamnetine 3-O-hexuronide.
78	C22H19O11 ⁻	Acide dicaffeoylthreonique.
81	C30H25O13 ⁻	Kaempférol3-O-(6''O-P-coumaroyl)hexoside.
82	C15H9O7 ⁻	Quercetine.
84	C15H9O6 ⁻	Kampeférol.

La molécule 1-Deoxynojirimycine (DNJ) des mûres possède de nombreuses activités biologiques : activité antihyperglycémiant, anti-obésité et anti-virale (**Zhao-Jun et al, 2016**).

- La DNJ(1-Deoxynojirimycine) se lie de manière compétitive au site catalytique de glucosidase de l'intestin et inhibe ainsi son absorption de glucose (Chao-wei W. et al.,2016). la 1-dexynojirimicine DNJ, connu sous le nom de moranoline, bloque donc l'absorption des glucides par l'organisme, aussi la consommation de l'extrait des feuilles est recommandée dans un régime de perte de poids (**Hyerisam, 2013**)
- Activité anti-virale : Les molécules dérivées de la déoxynojirimycine (DNJ) perturbent le repliement et l'assemblage des glycoprotéines d'enveloppe et inhibent la formation de particules virales (**Chapel et al, 2004**)

Les molécules alkylées à courte chaîne (NB-DNJ) semblent agir différemment : un mauvais repliement et une mauvaise glycosylation des protéines d'enveloppe incorporées dans les virions pour le NB-DNJ, une modification de la composition en dimères des virions et une inhibition potentielle de l'activité canal ionique de la protéine p7 dans le cas du NN-DNJ/NN-DGJ (**Chapel et al, 2004**)

Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Génie Microbiologiques et Applications et au niveau de l'Animalerie, Chaâbat Erssas, Université des frères Mentouri Constantine 1.

1. Matériels

1.1 Matériel végétal

L'étude a été menée sur les feuilles d'une plante de la famille de rosacées, *Rubus fruticosus*, connue sur le nom murier sauvage, récoltées durant la période de bourgeonnement au mois de février 2017 à la commune d'El khroub de la région de Constantine (Est Algérie).



Figure 39 : Géolocalisation du matériel végétal récolté de l'El khroub (Map data 2017, Google)

L'échantillon est ensuite lavé puis séché. Le séchage de cette plante a été effectué dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires et aussi de la chaleur pendant 8 jours.



Figure 40 : Les feuilles de la plante séchées après 8 jours à température de 25°C (A).

Elles sont ensuite broyées en poudre (B), conservées à température ambiante jusqu'au jour de leur utilisation.

1.2. Préparation des extraits

Deux solvants sont utilisés dans l'étape de l'extraction de principe actif : le méthanol (solvant organique) et l'eau (milieu aqueux).

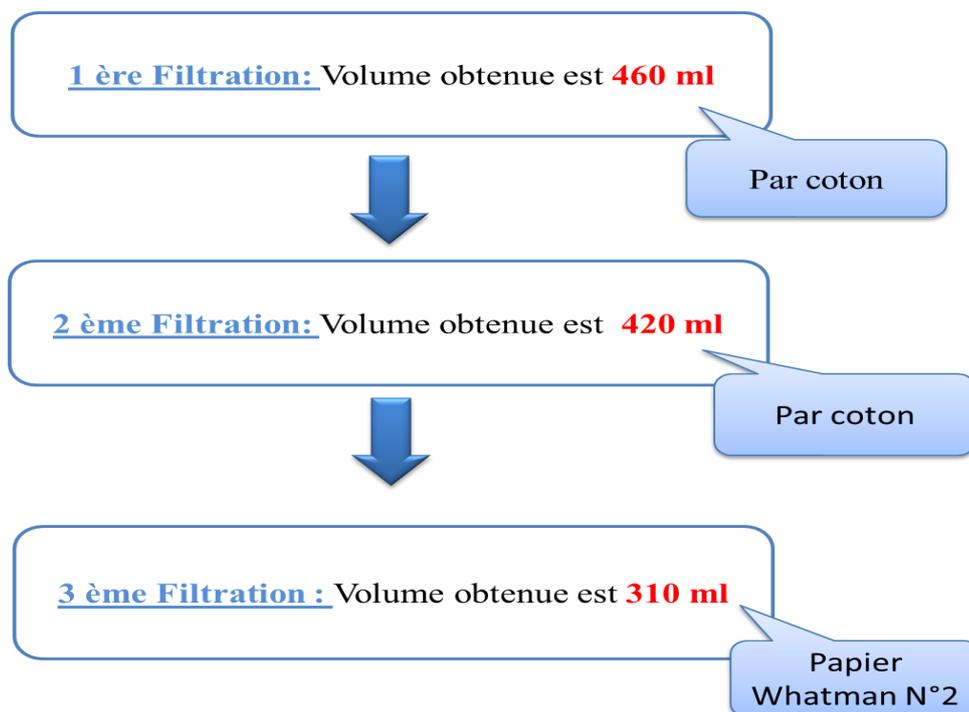
Extraction par le méthanol

25 g poudre de feuilles mises à macérer dans 500ml de méthanol à 100 % (w : v) sous une agitation magnétique (Kika) pendant 48 heures (photo ci-joint).



Figure 41: Macération en milieu aqueux.

Le macérât est filtré 3 fois successives (les deux premières filtrations sur coton et la dernière sur papier filtre Whatman N°2) comme le décrit le protocole suivant :



L'extrait méthanolique est séché dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. L'extrait sec est récupéré par grattage puis conservé au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

✓ ***Extraction par l'eau distillée***

11 g de la matière sèche des feuilles sont mélangés à 220 ml de l'eau distillée, l'ensemble est agité à température ambiante pendant 24 heures. La macérât est ensuite filtré une fois sur du coton et une deuxième fois sur du papier whatman N° 2 par une filtration sous vide.



Figure 42 : Filtration sous vide du macérât.

Le volume de filtrat généré est divisé dans les boites de pétri pour l'étape de séchage dans l'étuve.

2-Méthodes

2-1 Dosages des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (*Biochem*) a été décrit en 1965 par *Singleton et Rossi*, largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origine diverse.

Principe :

La quantification des polyphénols totaux est réalisée par une méthode à base de Folin-Ciocalteu (CFR). Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$, *Sigma Aldrich*) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$, *Sigma Aldrich*) dans lesquels le tungstène et le molybdène sont à l'état oxydé. Mais en présence d'un réducteur (dans ce cas le cycle phénolique), le bleu de tungstène et le bleu de molybdène est formé (*Agbor al, 2014*)

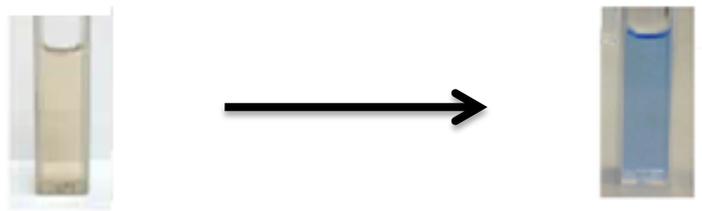


Figure 43: Changement de couleur du à une réduction du molybdate d'ammonium (Jaune) avec le noyau phénol du CFR (Bleu) (*Agbor et al, 2014*)

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2006 par *wong et al.*

125 μ l d'extrait végétal dilué dans l'eau et le méthanol (Méthanol/Eau ; 1 : 1 ; v/v) est mélangé avec 500 μ l d'eau distillée et 125 μ l de réactif Folin-Ciocalteu. Après 5 minutes, 1250 μ l à 2% de bicarbonate

de sodium (Na_2CO_3) et $1000\mu\text{l}$ sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 90 minutes à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de l'acide gallique à 1mg/ml dilué dans le méthanol et de l'eau distillée (Méthanol/Eau ; 1 : 1 ; v/v), préparer en parallèle et dans les mêmes conditions opératoires avec des concentrations variant de 0 à $500\mu\text{g/ml}$.

2.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification de contenu flavonoïque est estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe avec les flavonoïdes.

Principe :

L'addition de chlorure d'ammonium entraîne la formation d'un complexe organométallique (Flavonoïde- Al^{3+}). Dans ce complexe les ions Al^{3+} vont réagir avec les fonctions alcools des 2 cycles aromatique et hétérocycle de la structure flavoïdique. Cette réaction elle va générer un changement de la charge et de la couleur de milieu réactionnel. (couleur jaune).

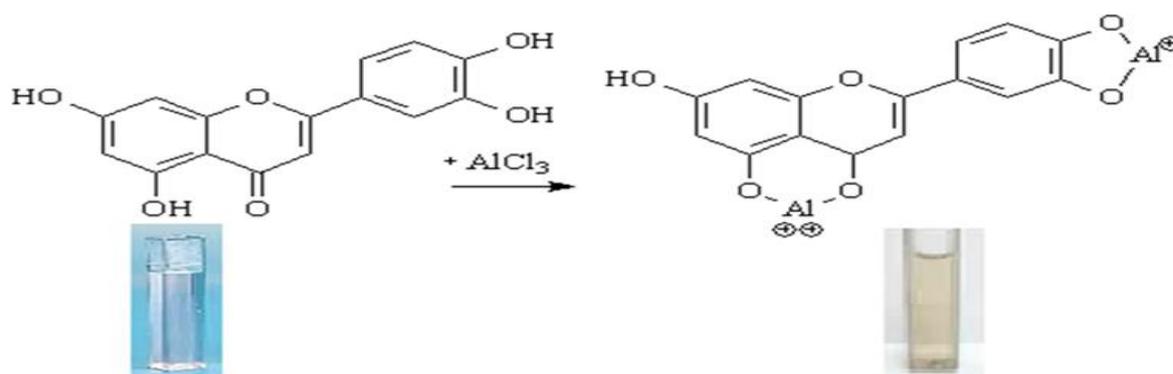


Figure 44: Réaction entre AlCl_3 et les flavonoïdes (Molnàr et al, 2014)

Méthode de dosage

Le protocole expérimental est décrit par **Quitteir et al, 2000**, Un millilitre d'extrait préparé dans du méthanol et de l'eau (Méthanol/Eau ; 1 : 1 ; v/v) est ajouté à 1ml de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Solution méthanolique de 2%). Après 1 heure de réaction, l'absorbance est lue à 415 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par la quercétine à différentes concentrations (0- $100\mu\text{g/ml}$), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent de quercétine par 1 g poids sec de l'extrait (mg EQU/g EXS). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

2.3. Détermination de l'activité antioxydant des deux extraits *in vitro*

✓ Le test de piégeage du radical DPPH

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité du protocole (Molyneux, 2004).

Principe :

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe pas, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde à 517 nm.

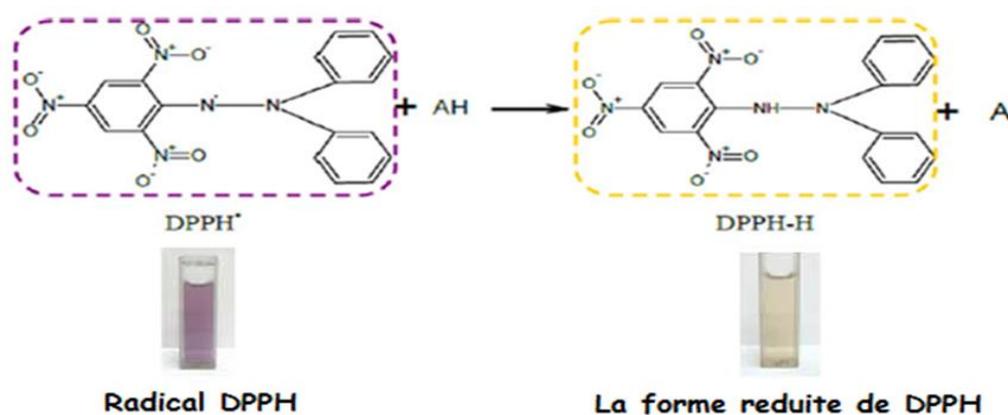


Figure 45 : Forme réduite du radical DPPH (Molyneux, 2004)

La solution de DPPH à 0,2mM, soit 27,60mg dans 350ml de méthanol, doit être préparée à l'obscurité et sous agitation facilitant la solubilisation de la poudre DPPH.

Méthode de dosage

Dans notre étude, ce test a été évalué suivant le protocole appliqué en 2007 par Kuramasamy *et al.* Brièvement, 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,2 mM) a été mélangé avec 1 ml de différentes dilutions des extraits de plante (0-1 mg/ml). Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 1 ml de la solution de DPPH et de 1 ml de méthanol.

Les témoins positifs (Butylhydroxytoluène, (BHT), Hydroxyanisole (BHA), et l'acide ascorbique) et le blanc sont préparés dans les mêmes conditions opératoires.

L'absorbance lue est ensuite transformée en pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorbance de la solution témoin. Le tracé de la relation entre le pourcentage d'inhibition et la concentration en composés phénoliques n'étant pas linéaire mais logarithmique.

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

PI : pourcentage d'inhibition.

DO témoin : absorbance du témoin négatif.

DO extrait : absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration inhibitrice à 50% ou IC 50.

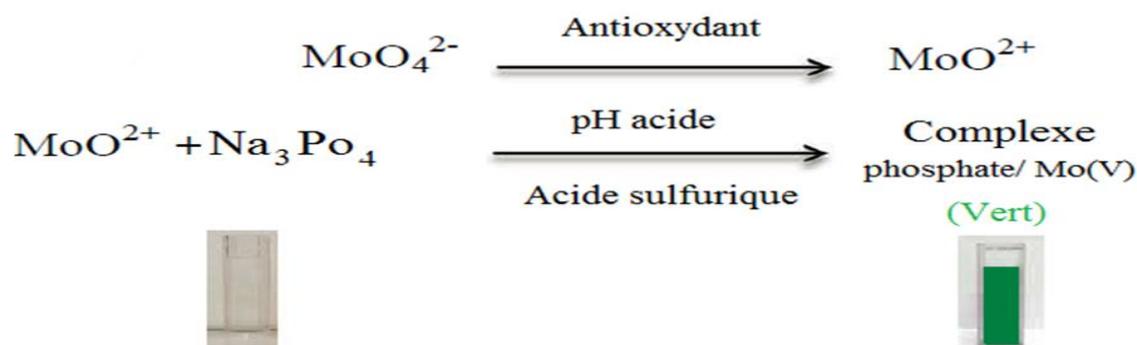
Plus la valeur de IC 50 est faible la propriété anti-oxydante de l'extrait est grande donc l'extrait est efficace

✓ *Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate »*

Le test du PPM (PhosPhoMolybdate) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant (**Prieto et al, 1999**).

Principe :

Cette méthode est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) en présence des composés antioxydants et donc la formation d'un complexe vert de phosphate/Mo à un pH acide.



La capacité anti-oxydante totale est exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait sec.

Méthode de dosage

Le protocole expérimental suivi est celui de **Prieto et al (1999)**, la méthode consiste à introduire dans un tube 200 µl de chaque extrait à différentes concentrations mélangés à 2000 µl d'un réactif composé de H₂SO₄ (0,6 M), de Na₂PO₄ (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est

mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 200 µl de méthanol mélangé avec 2000 µl du réactif mentionné ci-dessus.

Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche de l'extrait (mg AA/g EXS).

✓ *Dosage du pouvoir réducteur PR*

Le dosage de l'énergie antioxydant réduisant les ions ferreux est une technique pour l'interprétation de l'action des réducteurs (antioxydant) dans notre extrait méthanolique ou aqueux. Cette méthode est d'abord été développée par **Benzie et Strain** année **1996** pour la quantification de l'acide ascorbique dans le sérum ou le plasma.

Principe :

La méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (**Ou et al, 2001**)

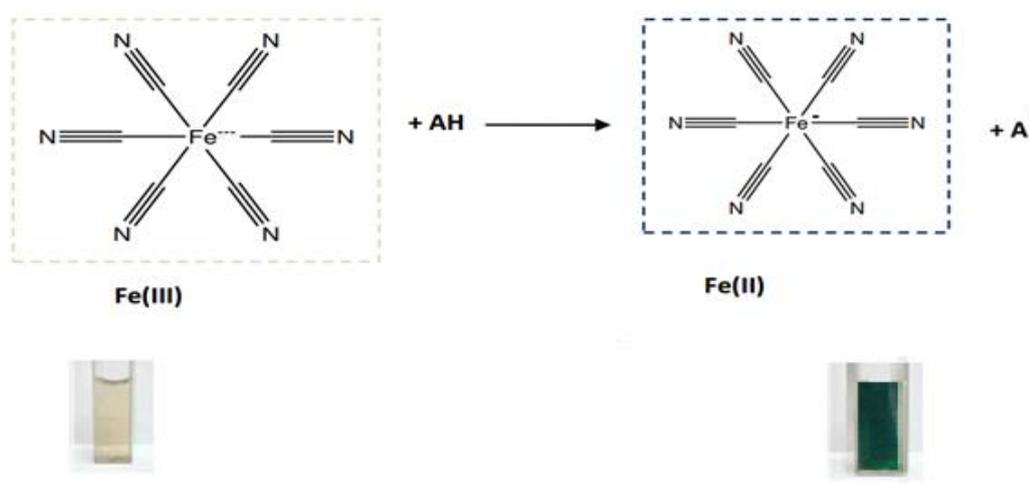


Figure 46: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test PR entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH).

Méthode de dosage

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par **Oyaizu, (1986)**. Dans un tube à essai en verre contenant 200 µl de solution d'échantillon à différentes concentrations, ont été ajoutés 500 µl de tampon phosphate (0,2M : pH 6,6) puis 500 µl de potassium hexacyanoferrate [$K_3Fe(CN)_6$] 1% dans l'eau distillée. L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 500 µl d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Un aliquote de 500 µL de surnageant est transféré dans un autre tube auquel ont été ajoutés 500 µl d'eau distillée et 100 µl de $FeCl_3$ 1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par méthanol.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ;

l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

3. Etude *in vivo* : l'effet hypoglycémique et anti-hyperglycémique des 02 extraits méthanolique et aqueux préparées à partir des feuilles de mûres

Cette étude est réalisée au niveau de l'Animalerie, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Chaabat Erssas.

3.1-Animaux

Des rats blancs (24 rats), mâles uniquement, pesant entre 140 et 170 g (au début de l'expérimentation), élevés au niveau de l'animalerie du département de biologie animale, faculté des sciences de la nature et de la vie, université de l'hadj lakhder de Batna. Sont utilisées pour évaluer l'effet de la plante sur la glycémie.

Ces animaux sont hébergés dans des cages munies d'un porte étiquette où est mentionné le Concentration utilisé et la nature de l'extrait dans chaque lot (formé de 4 rats). Ils sont accès libre à l'eau et à l'alimentation standard fourni par l'Office National des Animaux du Bétail d'Alger (ONAB), La température de l'animalerie est contrôlé $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

L'identification individuelle des expériences se fait à l'aide des marqueurs colorés utilisées au niveau des queues de ces rats.

3.2 -Préparation des extraits pour le gavage

Deux types d'extraits sont utilisé dans cette expérimentation : extrait méthanolique ou extrait aqueux.

✓ *Extrait méthanolique*

On ajoute 250mg de poudre pour la préparation de la concentration 250mg/8ml et 500mg pour la concentration 500mg/8ml. (Gbogbo et al, 2015)

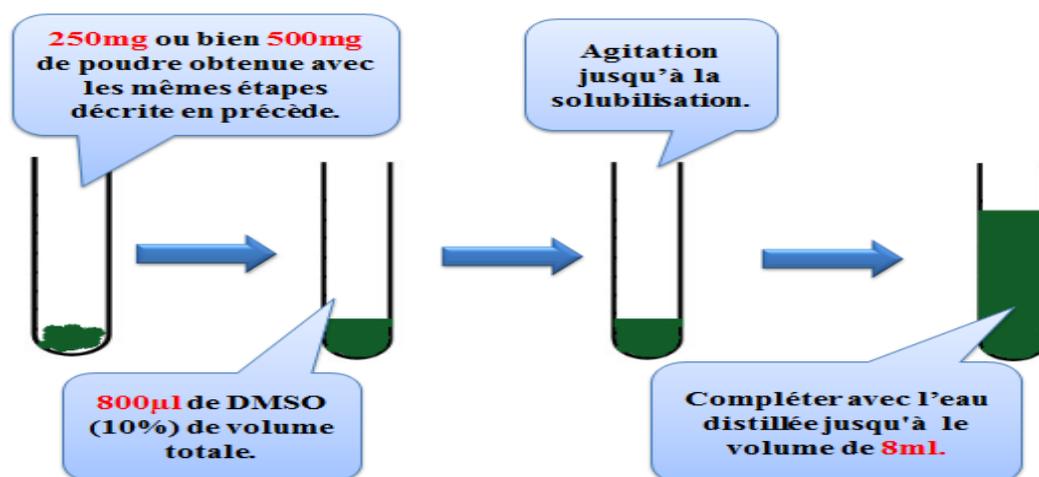


Figure 47 : étapes de préparation de l'extrait méthanolique.

La préparation est donnée aux animaux par gavage.

L'**extrait aqueux** : Mêmes procédés que pour l'extrait méthanolique.

3.3-Effets dose-réponse des deux extraits méthanolique et aqueux sur la glycémie des rats normoglycémiques :

24 rats sont utilisés, ils sont repartis en 6 lots de 4 rats.

Lot 1 (Témoin) : de l'eau distillée (8ml/Kg).

Lot 2 : rats recevant un volume par rapport au poids de leurs rats la dose de 250mg/kg de l'extrait méthanolique.

Lot 3 : rats recevant un volume par rapport au poids de leurs rats la dose de 500mg/kg de l'extrait méthanolique.

Lot 4 : rats recevant un volume par rapport au poids de leurs rats la dose de 250mg/kg de l'extrait aqueux.

Lot 5 : rats recevant un volume par rapport au poids de leurs rats la dose de 500mg/Kg de l'extrait aqueux.

Lot 6 : Témoins positifs Rats traités avec le metformine à la dose de 500mg/Kg.

La glycémie est d'abord déterminée juste avant les traitements (la glycémie initiale). Après le traitement des rats, la glycémie est mesurée toutes les 30 minutes, pendant 2h, et le pourcentage de variation de la glycémie par rapport à la glycémie initiale est calculé.

3.4-Etude des effets dose-réponse de l'extrait aqueux et méthanolique de la plante lors du test de tolérance au glucose (Mesure de la glycémie chez les rats post - traités) :

L'hyperglycémie est provoquée suite d'une administration par voie orale de glucose après 30 minutes que les rats reçoivent des extraits, ou la metformine, pour cette étude 28 rats sont repartis en 7 lots.

Lot 1(Témoin négatif) : rats recevant de l'eau distillée (8ml/Kg) uniquement.

Lot 2 : rats recevant un volume proportionnelle ou poids de la concentration de 250 mg/Kg de l'extrait méthanolique (8ml/Kg) et du glucose (4mg/kg).

Lot 3 : rats recevant un volume proportionnelle ou poids de la concentration de 500mg/Kg de l'extrait méthanolique (8ml/Kg) et 30 min après, du glucose (4mg/Kg).

Lot 4 : rats recevant un volume proportionnelle ou poids de la concentration de 250 mg/Kg de l'extrait aqueux (8ml/Kg) et du glucose (4mg/kg).

Lot 5 : rats recevant un volume proportionnelle ou poids de la concentration de 500mg/Kg de l'extrait aqueux (8ml/Kg) et du glucose (4mg/kg).

Lot 6 : rats recevant de l'eau distillée (8ml/kg) et puis 4mg/kg de glucose 30 minutes après.

Lot 7 : rats recevant le metformine à la dose de 500mg/kg, puis 4mg/kg de glucose 30 minutes après.

La glycémie des rats de chaque lot est mesurée juste avant l'administration de glucose ou de l'eau distillée puis, après le traitement, à des intervalles de 30 minutes, pendant 2 heures et 30 minutes.

Le pourcentage d'induction de l'hyperglycémie et le pourcentage de réduction de l'hyperglycémie provoquée sont ensuite calculés.

4-Méthode d'analyse statistique et de tracée des graphiques

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2010. Alors que l'analyse des données est faite grâce au logiciel XL stat pro, les résultats sont donnés sous forme de moyenne des trois essais (n=3), sauf pour les tests *in vivo* qui sont des moyennes des 4 essais (n=4). La différence entre deux valeurs est déterminée par le test Student-Newman-Keuls et est considérée comme significative pour $P < 0,05$.

Résultats et discussions

1- Détermination du rendement d'extraction et de la teneur en polyphénols

Notre étude est basé sur l'extraction par macération en utilisant deux types de solvants : solvant méthanologique et de l'eau distillée, de polarité différente respectives de 6,6 et 9,0 (Bourgou *et al*, 2016).

Le rendement est utile pour comparer la capacité des solvants à extraire les molécules suite à la formule de (Lahmar *et al*, 2017).

(Poids obtenu après évaporation du solvant d'extraction / Poids de l'échantillon initial) \times 100

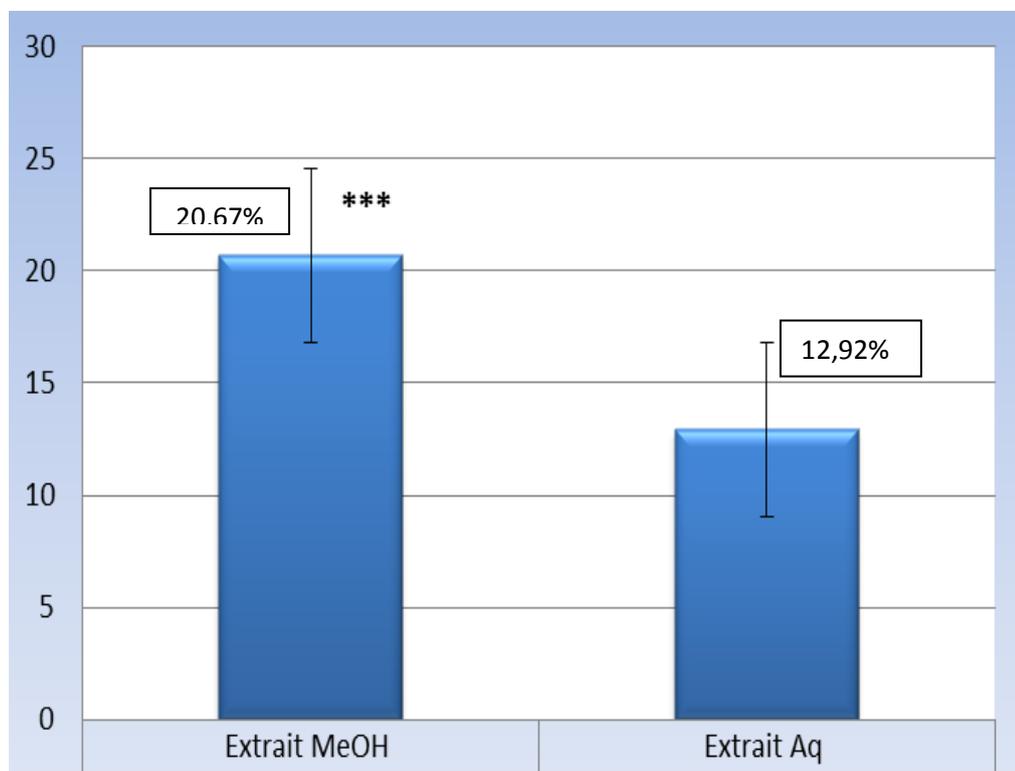


Figure 48 : Comparaison entre les rendements de l'extraction méthanologique et aqueux (Test T *** $P \leq 0.001$).

L'extraction avec du méthanol a donné un rendement plus élevé 20,67% vs 12,92% en milieu aqueux. Ces rendements sont largement supérieurs à ceux obtenus par Asnaashari *et al*, (2015) avec des rendements respectifs de 15,43% vs 11,87% avec les mêmes solvants. Ces différences s'expliquent par le contenu en polyphénols qui varie selon la localisation géographique (Les plantes de l'auteur sont récoltées en Iran).

La teneur en polyphénols est estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Nous avons utilisé l'acide gallique comme standard pour les polyphénols, en se basant sur la valeur d'absorbance de la solution des deux extraits méthanologique et aqueux. Le réactif de Folin-Ciocalteu donne une couleur bleu proportionnelle à la quantité des polyphénols. Les résultats sont comparées à une gamme étalon de l'acide gallique en utilisant l'équation de la régression linéaire du courbe ($y = 0,0034x - 0,0084$; $R^2 = 0,9987$). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait sec (mg EAG/g EXS).

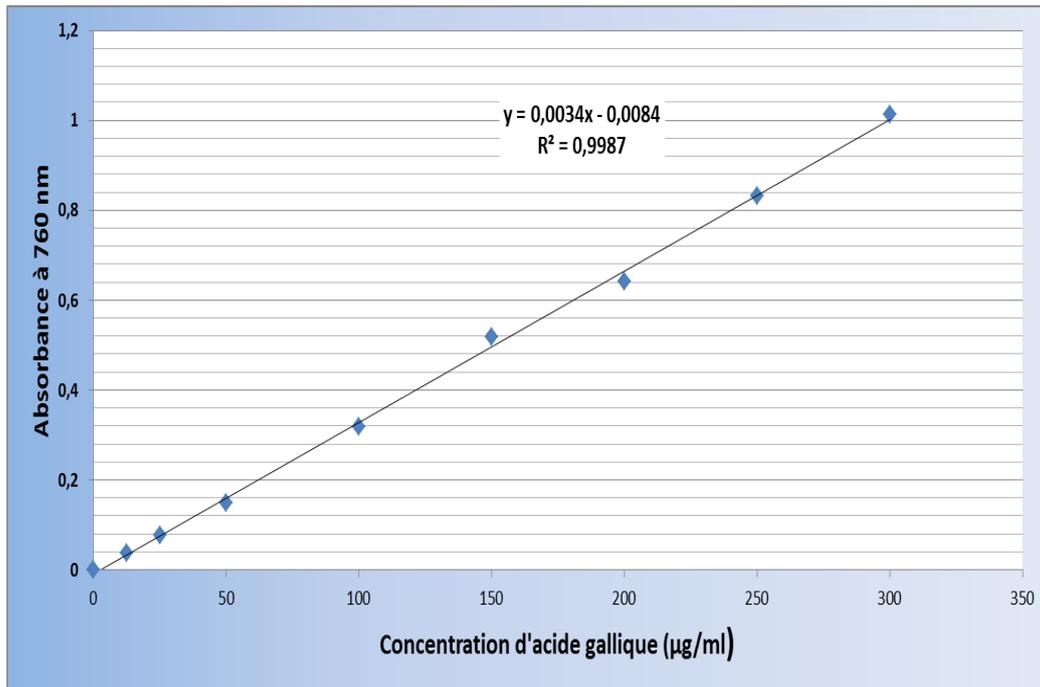


Figure 49: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Moyenne \pm SD de trois essais)

*** : différence hautement significative $P \leq 0.001$

La teneur en polyphénols dans l'extrait méthanolique est 3 fois supérieure à celle de l'extrait aqueux : $268.529 \pm 0,021$ mg EAG/g EXS vs $87,058 \pm 0,001$ mg EAG/g EXS de l'extrait aqueux, avec une différence hautement significative (Test T de Student : $P \leq 0.001$).

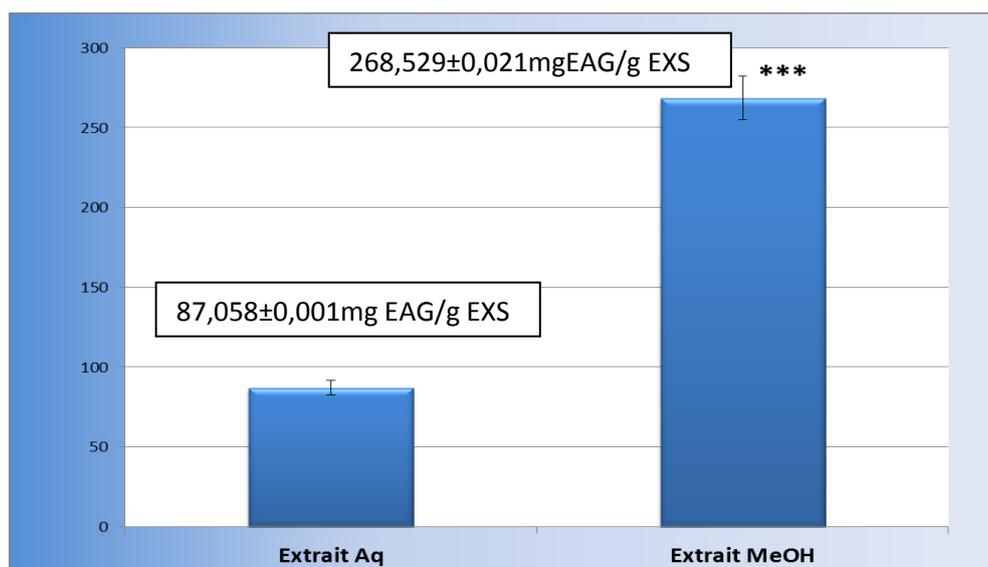


Figure 50 : Teneur en polyphénols totaux dans les deux extraits méthanolique et aqueux en équivalent d'acide gallique

La teneur polyphénolique dans l'extrait méthanolique est de $268,529 \pm 0,021$ mg EAG/g EXS presque 2 fois supérieure aux résultats d'**Asnaashari et al, (2015)** qui ont trouvés $108,64 \mu\text{g EAG/Exs}$. Par contre, les extractions en milieu aqueux, sont équivalentes : $87,058 \mu\text{g EAG/EXS}$ la nôtre vs $86,88 \mu\text{g EAG/EXS}$. La teneur en polyphénols dans le méthanol est importante qui constitue le meilleur solvant d'extraction dans cette étude et autres études (**Aitfella, 2010**).

Le meilleur solvant d'extraction dans cette étude est le méthanol. Puisque, la plupart des phénols simples présents dans les vacuoles peuvent facilement être extraits par les alcools. Ces composés sont abondants dans les feuilles en générale. Donc notre extrait est riche en acides phénoliques. Ainsi que les flavonoïdes polaires qui ne sont pas liés aux stérols, ou ceux qui sont présents dans les tissus externes foliaires peuvent se solubiliser et sortir dans le méthanol (**Aitfella, 2010**), l'équipe de (**Bourgou et al, 2016**) recommandent une mixture constituée par eau: alcool 30 : 70 (v : v), pour améliorer les résultats, concernant l'extraction des lignines, nécessite une dégradation oxydative préalable.

2- Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

D'après la bibliographie, les flavonoïdes renferment plus de molécules bioactives que les polyphénols (**Gomez et al, 2006**) et (**Tapas et al, 2008**). Aussi, nous sommes tentés d'extraire ce type de molécules à partir de feuilles de la plante *Rubus fruticosus* et également par l'utilisation des feuilles en médecine traditionnelle (diabète, hypertension).

Le représentant des flavonoïdes est la quercétine, elle est donc utilisée comme standard (contrôle positif) à des concentrations variant de 0 à $70 \mu\text{g/ml}$. Le courbe étalon donne l'équation $y = 0,0264x + 0,0293$; $R^2=0,9951$ (**Fig.51**)

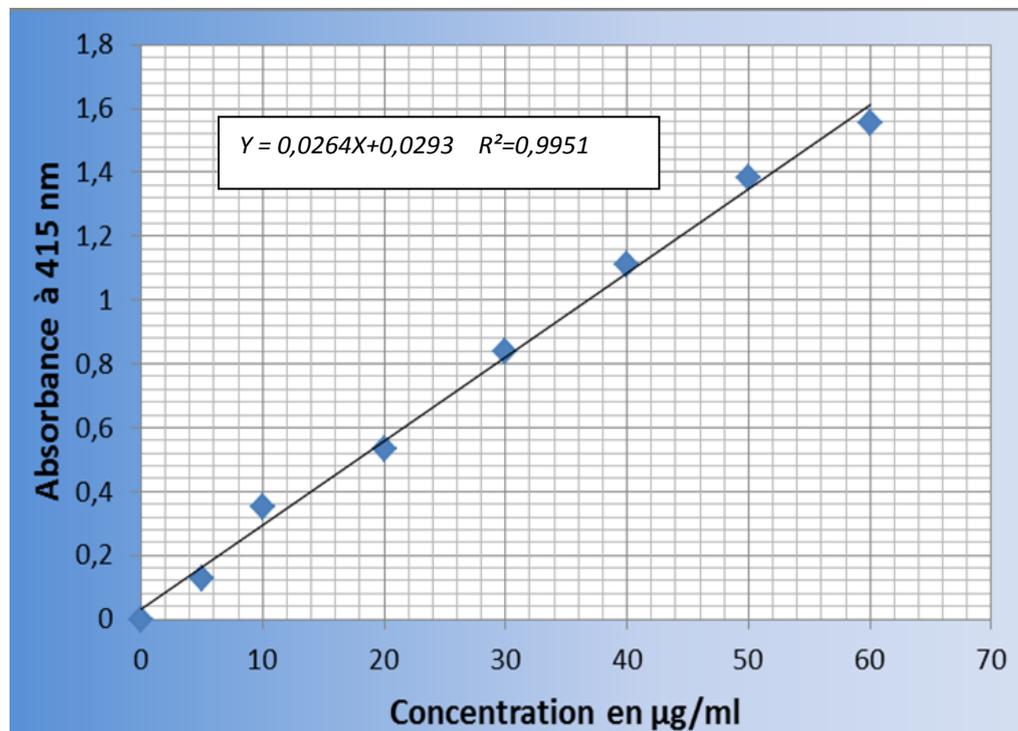


Figure 51: Courbe d'étalonnage de quercétine, Moyenne \pm SD (n = 3).

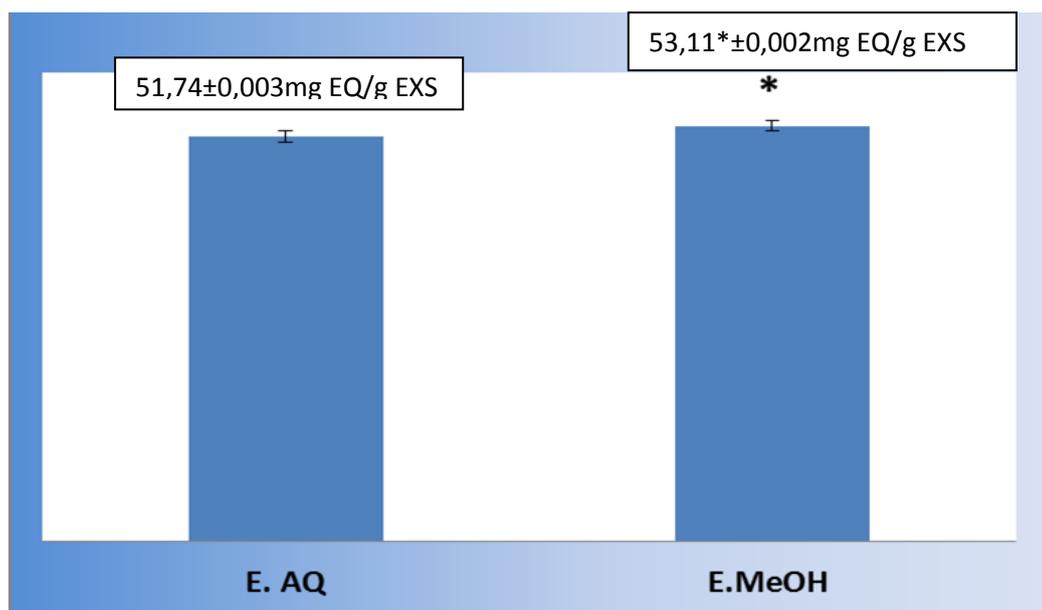


Figure 52 : Taux des flavonoïdes dans les deux extraits aqueux et méthanolique exprimé en équivalent de quercétine (mg/ml)

L'analyse du **de la Figure 52** révèlent que :

- ✓ L'extrait méthanolique contient une concentration en flavonoïdes de 53,11* \pm 0,002 mg EQ/g d'extrait sec contre 51,74 \pm 0,003 mg EQ/g d'extrait sec pour l'extrait aqueux, quantité statistiquement faible (P<0,05).

- ✓ Néanmoins les proportions sont relativement proches, ceci s'explique par le fait les hétérosides sont hydrosolubles et également solubles dans les alcools (**Grotenwold, 2006**).

3. Evaluation des activités antioxydants in vitro des polyphénols et des flavonoïdes

Nous avons testé le potentiel antioxydant des polyphénols et les flavonoïdes par 03 tests antioxydants différents pour infirmer ou confirmer nos résultats :

3.1. Le test de piégeage du radical DPPH

Les réactions d'oxydations sont nécessaires à la vie, mais parfois elles peuvent être destructrices. Mais les plantes et les animaux produisent des molécules antioxydantes endogènes : enzymes (GPX, SOD, Cypt 450), cortisol, système glutathion, cytokines anti-inflammatoires...) ou exogènes apportées par l'alimentation [polyphénols, caroténoïdes, vitamines D, A, C ou E, minéraux (Se, Mg,Cu, Zn ,Fe)] qui vont limiter les dommages causés à la cellule.

Le test in vitro utilise le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des molécules, en raison de sa stabilité en forme radicalaire libre et la simplicité de l'analyse (**Haddouchi et al, 2016**).

Ce radical possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote, la réduction de DPPH est détectable à l'œil nu, ainsi que par la méthode spectrophotométrie. La réduction de ce radical s'accompagne par le passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune (**Bentabet et al, 2014**).

Dans cette étude, la mesure de l'absorbance est utilisée pour calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée (décrite dans la partie Matériels et Méthodes).

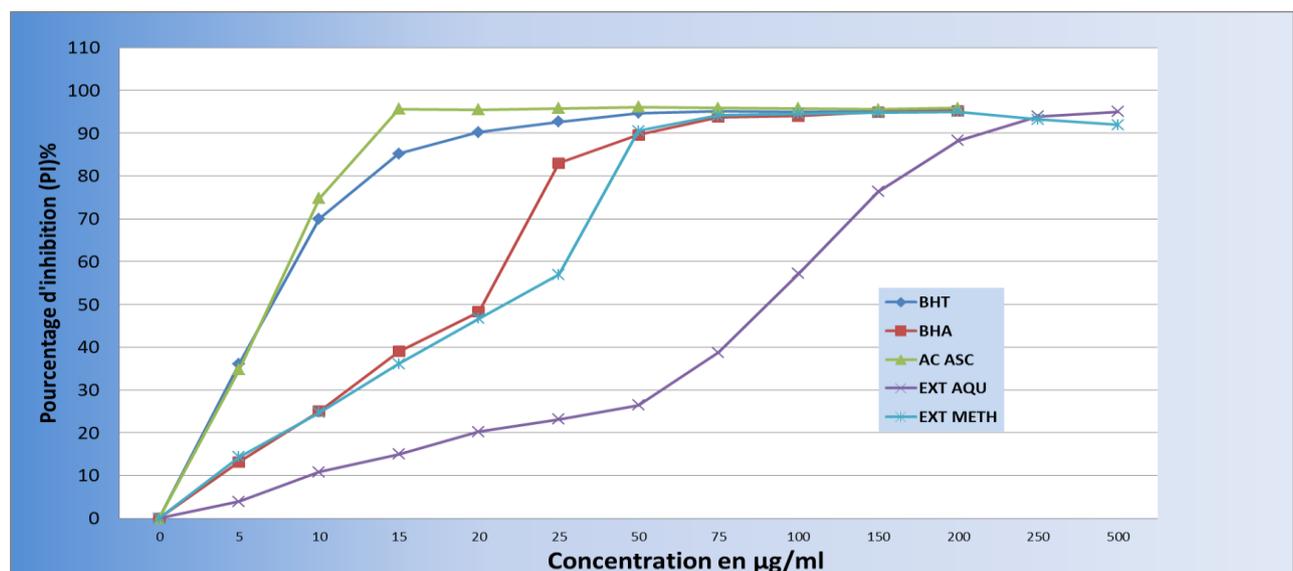


Figure 53: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH° (Chaque valeur représente la moyenne de 03 essais ± SD).

Pour évaluer l'effet antiradicalaire du DPPH, le calcul de % d'inhibition est reporté dans l'annexe qui permet le calcul de l'IC50.

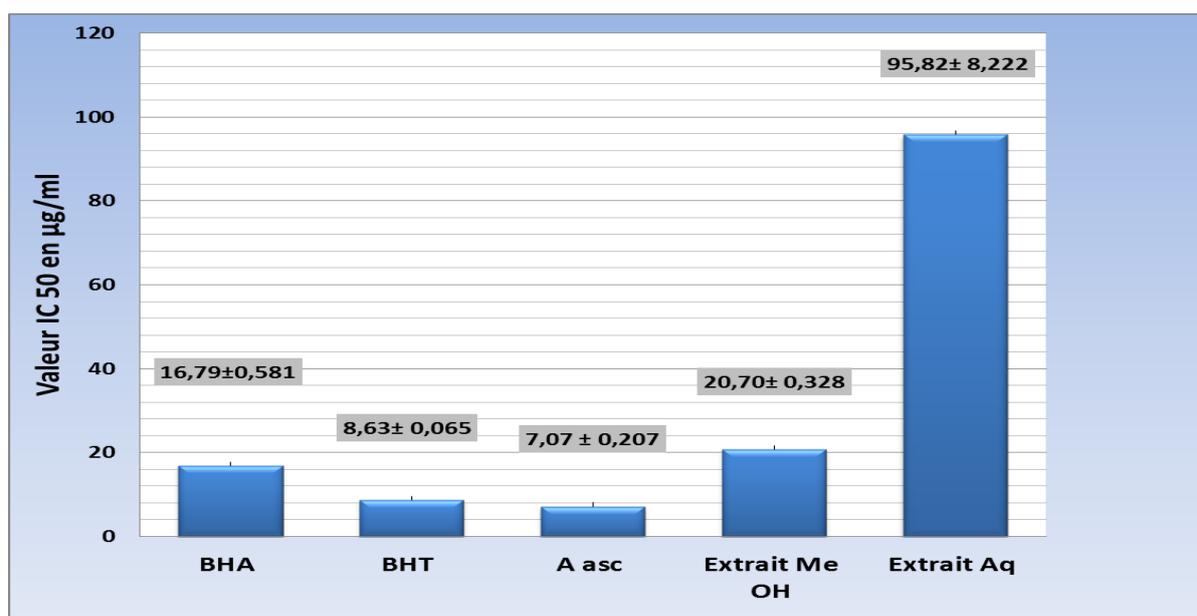


Figure 54 : Valeur de IC50 (en µg/ml) des antioxydants de références et des extraits testés.

D'après (Bettaieb *et al*, en 2017), plus la valeur de l'IC50 est faible plus l'efficacité de l'extrait est meilleure.

Parmi les standards testés, l'acide ascorbique, (Vitamine C, naturelle) possède l'IC50 la plus faible, $7,07 \pm 0,207$ µg/ml, suivi par BHT (standard synthétique), $8,63 \pm 0,065$ µg/ml. Ces IC50 reflètent l'efficacité anti-oxydante de ces molécules. La molécule synthétique, BHA vient en troisième position, avec une valeur de l'IC50 de $16,79 \pm 0,581$ µg/ml. Cette différence s'explique par la nature chimique des molécules. La différence d'efficacité entre la vitamine C et le BHA est hautement significative (test T, $P \leq 0,0001$).

Comparé à la vitamine C et le BHT, les deux extraits sont relativement faibles que les standards. Néanmoins, l'extrait méthanolique a une IC50 4 fois plus inférieure à celle du milieu aqueux. Le même extrait a une IC50 relativement proche de celle de BHA, malgré une différence statistiquement significative ($P \leq 0,05$).

Il existe d'ailleurs, une différence significative entre les extraits méthanolique et aqueux ; les IC50 sont de $20,70 \pm 0,328$ et de $95,82 \pm 8,222$ respectivement.

Comparé à l'étude d'Asnaashari *et al*, 2015, nos extraits ont des capacités antioxydantes largement supérieures :

- ✓ 20,70 µg/ml pour notre extrait méthanolique vs 65,043 µg/ml.
- ✓ 95,82 µg/ml pour extrait aqueux vs 120,064 µg/ml.

Ces différences sont dues à la teneur en flavonoïdes de nos extraits supérieure à celle de l'auteur.

3.2. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des deux extraits est exprimée en nombre d'équivalent d'acide ascorbique par g d'extrait sec (mg EAA/g EXS), à partir d'une courbe d'étalonnage définie par leur équation linéaire ($y=0,4026x - 0,4761$; $R^2=0,995$)

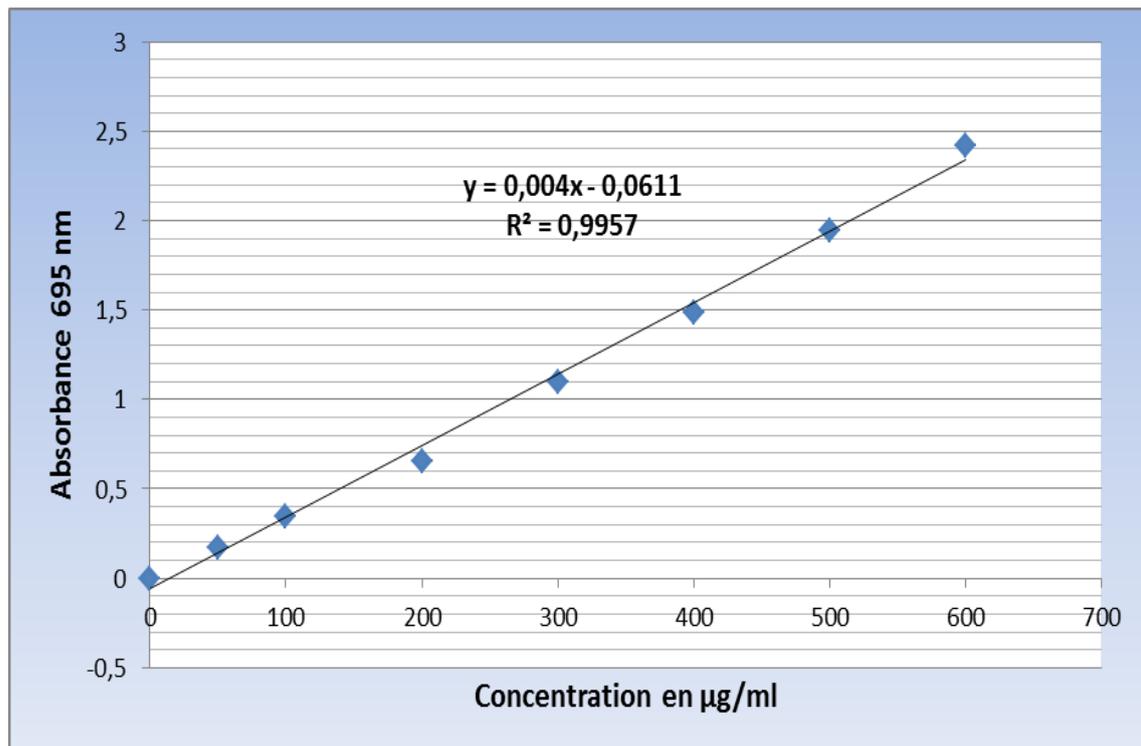


Figure 55 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique. (Moyenne \pm SD de trois essais)

Les capacités antioxydantes des deux extraits sont présentées dans la figure suivante :

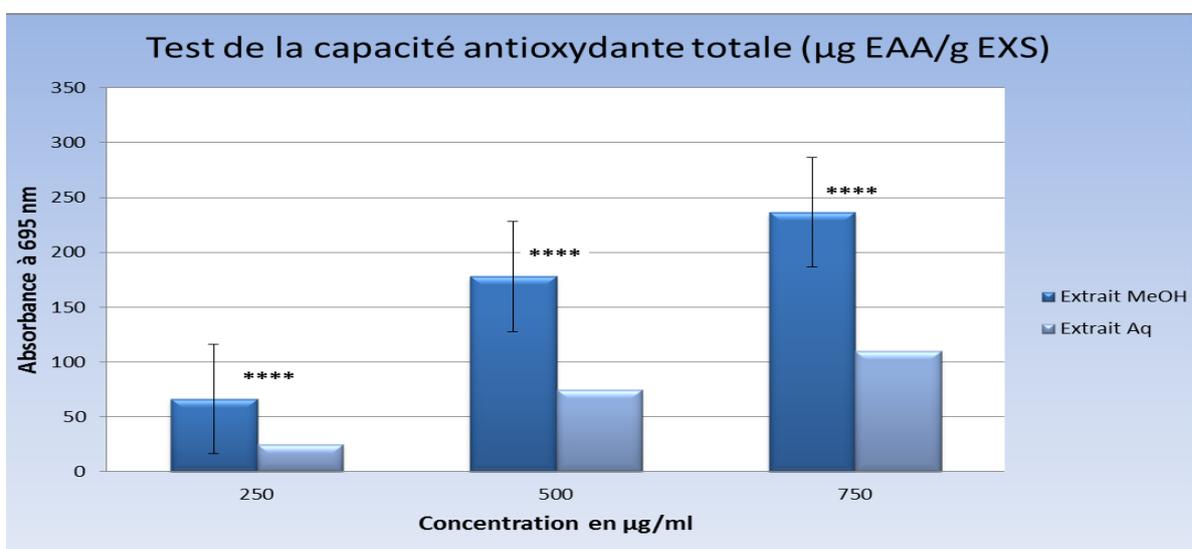


Figure 56: Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des deux extraits lors de développement de la concentration. (Moyenne \pm SD de trois essais).

****p<0,0001

La capacité anti-oxydante de nos extraits est dose dépendante. Cependant, l'extrait méthanolique se montre plus performant : à la dose maximale de 750 μ g/ml avec une capacité antioxydante de 236,5 \pm 1,145 μ g/ml, valeur hautement significative ($P \leq 0.001$) vs la capacité antioxydante de milieu aqueux 109,866 \pm 0,635 μ g/ml, la capacité antioxydante total de l'extrait MeOH est 2 fois supérieure que l'extrait aqueux. Ces résultats indiquent qu'il existe une différence hautement significative entre les deux extraits.

3.3. Le pouvoir réducteur(PR)

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Bougandoura et Bendimerad et al, 2012**).

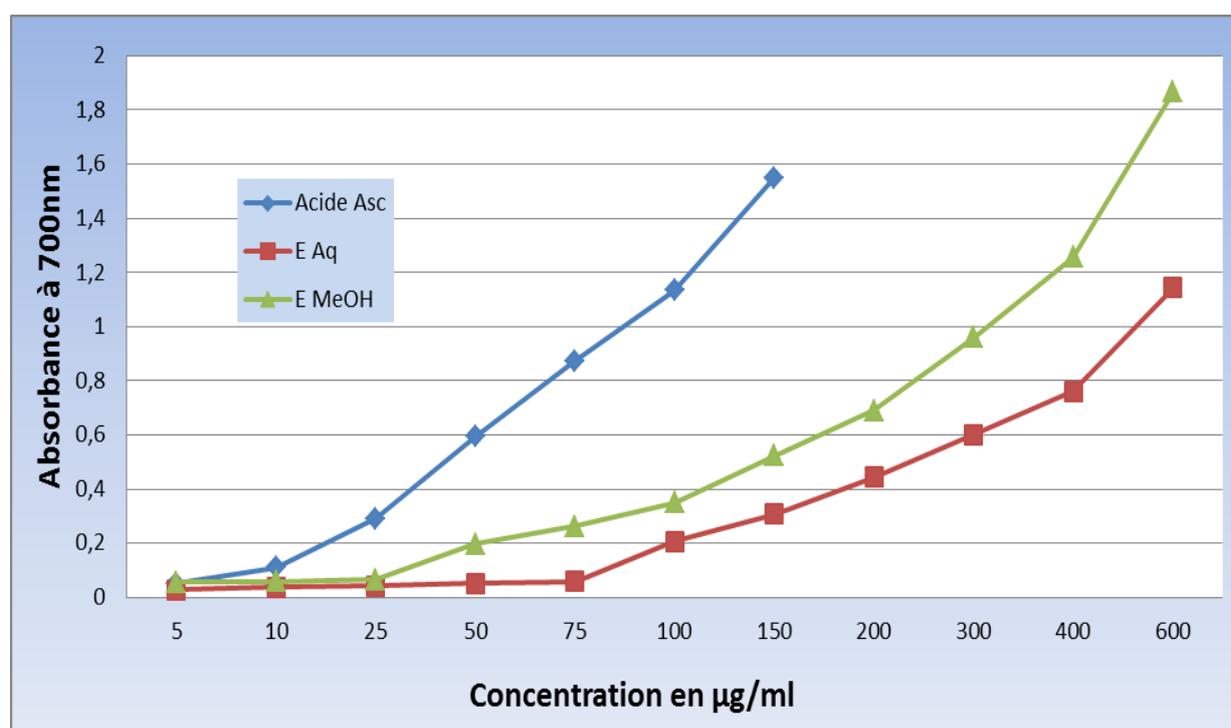


Figure 57: cinétique représente l'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits aqueux et méthanolique en utilisant la méthode PR (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

Les résultats obtenus dans la figure reflètent la capacité de l'extrait méthanolique et aqueux à réduire les ions Fe³⁺ par rapport à la molécule antioxydante (l'acide ascorbique ou vitamine C)

On remarque que le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique est largement supérieur (DO=1,86) par rapport à l'extrait aqueux (DO=1,14), mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

Le pouvoir réducteur de l'espèce *Rubus fruticosus* est probablement dû à la présence de groupement OH des composés phénoliques qui vont agir comme des donneurs d'électrons. **(Bougendoura et Bendimerad, 2012).**

2. Etude *in vivo*

2.1. Effet dose-réponse des deux extraits méthanolique et aqueux sur la glycémie des rats Wistar normoglycémiques.

Cet essai vise à vérifier l'activité hypoglycémiante de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de mûres sauvages, de déterminer la durée de l'action et le temps optimal d'action.

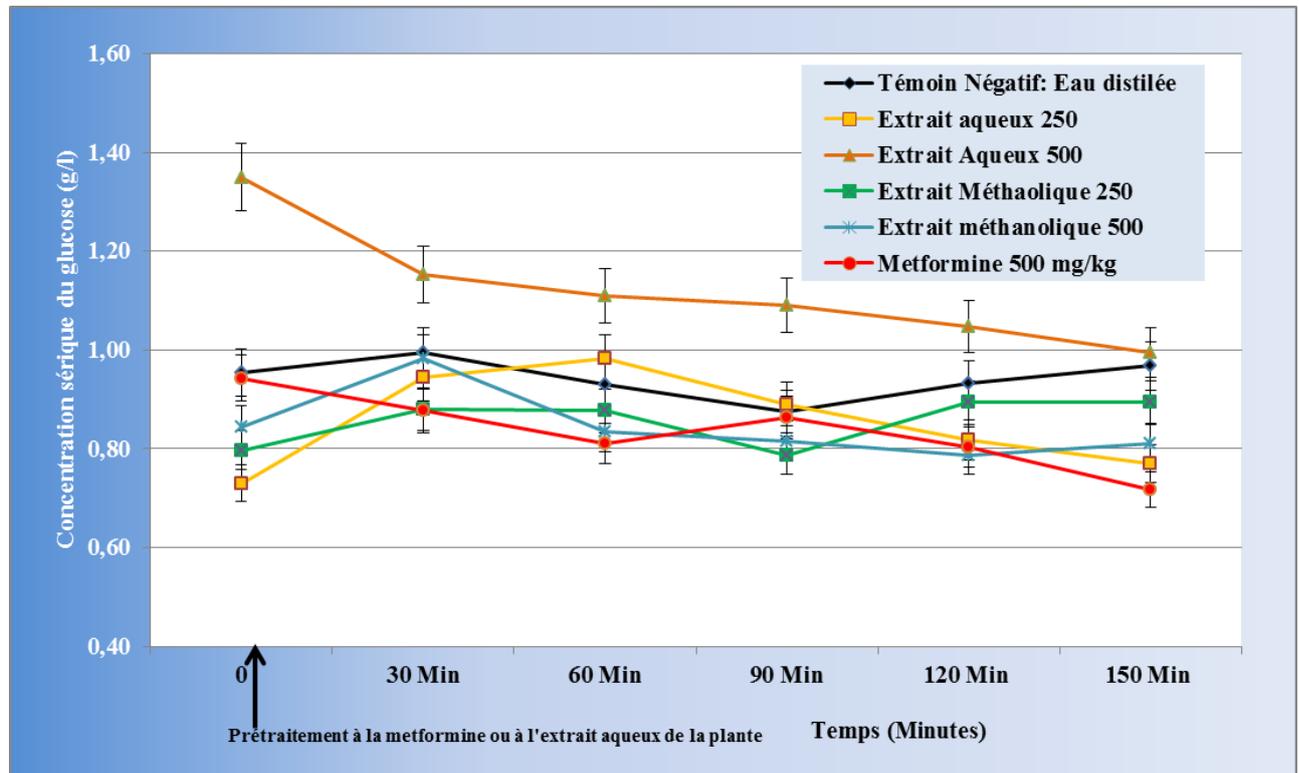


Figure 58: Effet dose-réponse de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de mûres on comparaison avec la metformine (Témoin positif) et de l'eau distillée (Témoin négatif).

La figure ci-dessus l'effet hypoglycémiant de nos extraits à différents concentrations par rapport à la metformine, un inhibiteur du transport du glucose au niveau intestinal, le GluT 2 (Dominik , 2017)

Les concentrations sériques du glucose sont reportées dans le tableau qui va suivre :

Tableau 9 : Evolution de la glycémie chez les rats normoglycémiques en fonction du temps et des concentrations des extraits (n=4)

Lot	Doses injectées	Glycémie basale au temps T0 (g/l)	Evolution de la glycémie ± écarte type Variation de la glycémie(%)				
			30	60	90	120	150
Témoin négatif	4ml/Kg eau distillée	0,95± 0,10	0,99±0,06 -4,17	0,93±0,10 3,13	0,87±0,09 8,33	0,93±0,005 3,22	0,96± 0,25 -1,04
Extrait aqueux 250	250 mg/kg	0,73±0,05	0,94±0,15 -30,14	0,98±0,18 -34,24	0,89± 0,08 -21,92	0,81±0,04 -12,92	0,77±0,08 -5,48
Extrait aqueux 500	500 mg/kg	1,40±0,10	1,15±0,02 +14,81	1,11±0,10 +17,78	1,09±0,10 +19,26	1,04±0,08 +22,22	0,99± 0,19 +25,93
Extrait méthanolique 250	250 mg/kg	0,80±0,04	0,88±0,1 -10	0,87± 0,11 -10	0,78± 0,05 +1,25	0,89± 0,02 -11,25	0,89± 0,10 -11,25
Extrait méthanolique 500	500 mg/kg	0,94± 0,03	0,98±0,04 -15,29	0,835±0,09 +1,18	0,815±0,09 +3,53	0,7875±0,04 +7,06	0,71±0,03 +4,71
Metformine	500mg/ Kg	0,94±0,11	0,87±0,07 +6,62	0,81±0,07 +13,83	0,86±0,02 +8,51	0,80±0,07 +14,89	0,71±0,10 +23,41

L'administration de l'eau distillée chez les rats témoins négatifs à la dose de 4 ml/kg n'a aucun effet sur la glycémie basale (0,96±0,11g/l à 0,97±0,25g/l), qui reste stable pendant toute la durée de l'expérience (150 min). Ces résultats sont confirmés par l'étude de **Gbogbo et al, 2015** où la glycémie demeure à la valeur de 0,98±0,09g/l (Glycémie initial) pendant l'expérience.

L'administration par voie orale des extraits aqueux et méthanolique à la dose de 250 mg/kg pendant 150 min, n'ont aucun effet signification sur la glycémie aussi.

Par contre, l'administration des mêmes extraits à la dose de 500 mg/Kg, ont un effet réducteur de la glycémie de 14 % pour l'extrait aqueux, mais n'a aucun effet pour l'extrait méthanolique pendant les premières 60 min jusqu'à une réduction respectives de 25,93% et de 4,71% après 150 min. L'extrait aqueux s'est montré plus hypoglycémiant et agit probablement sur le transporteur du glucose Glut 2 (**June, 2009**). D'autres études corroborent nos résultats et démontrent un effet antihyperglycémiant de l'extrait méthanolique des feuilles de *Gnetum buchholizianum*. (**Nadomou et al, 2014**)

L'effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* est 3 fois supérieur à celui des fruits de la même plante : 25,93 % vs 4,71%.

Concernant le témoin positif de l'expérience, le metformine, est à la dose de 500 mg/kg, il entraîne une réduction importante de la glycémie (23,41%). Mais par rapport à l'extrait aqueux est au même dose la réduction est plus importante que la metformine (25,93%).

Conclusion : l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* à la concentration de 500 mg/kg, s'est avéré parfaitement efficace dans la réduction de taux de glycémie sanguine à partir 60 min d'administration orale. Cet effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux est équivalent celui de la molécule de référence « metformine » à partir de 60 min d'administration orale avec des pourcentages de réduction respectifs de 25,93% et 23,41% à 150 min.

2.2. Etude des effets dose-réponse de l'extrait aqueux et méthanolique de la plante : test de tolérance au glucose

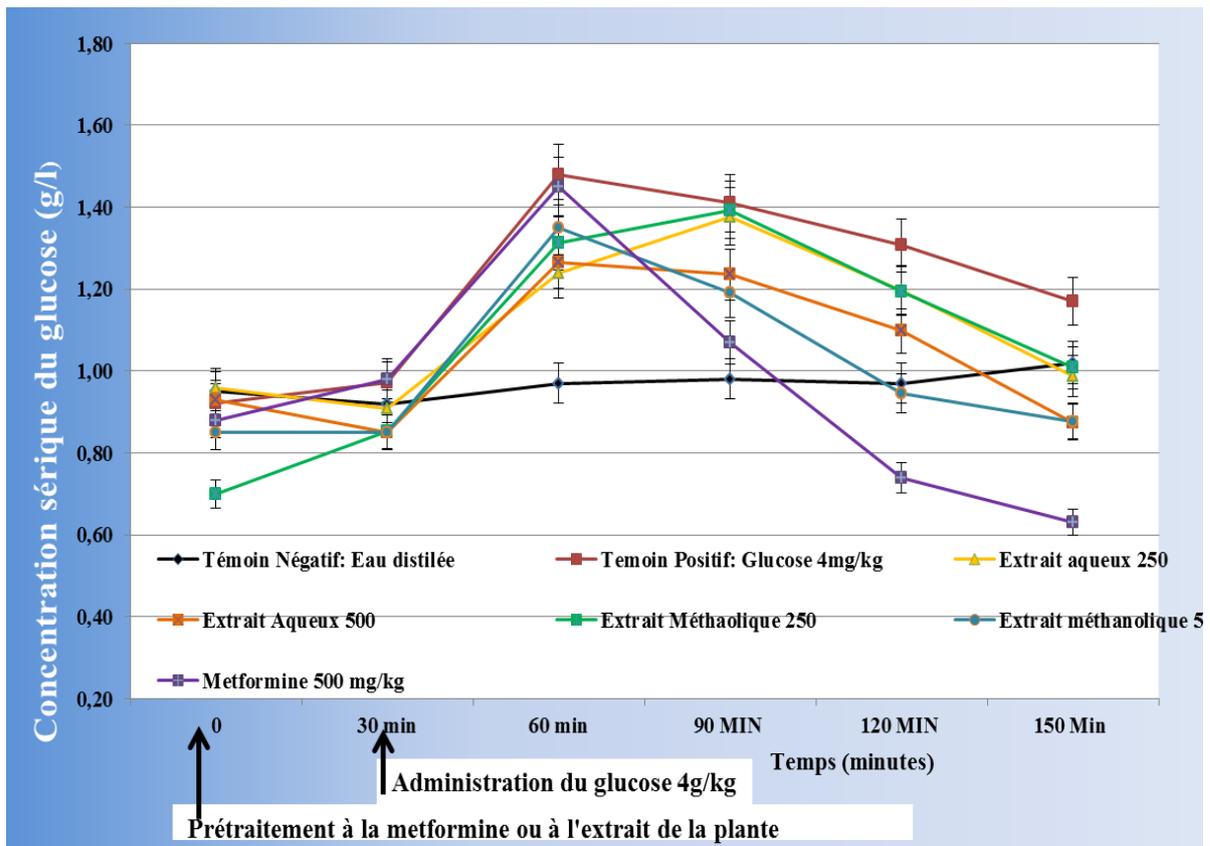


Figure 59: Cinétique de la glycémie chez des rats hyperglycémiques prétraités avec les deux extraits aqueux, méthanolique et la metformine.

La lecture de la figure 66 montre que l'hyperglycémie est provoquée par l'administration de glucose à la dose de 4g/Kg de poids corporel (par voie orale) à 60 min. Après ce temps, l'administration des extraits aqueux et méthanolique de 250 mg normalisent la glycémie après 150 min.

A la dose de 500 mg/kg, les extraits aqueux et méthanolique font descendre la glycémie à 0,85g/l au bout de 150 min, néanmoins la metformine se montre plus efficace la fait descendre plus bas à la concentration 0,65g/l de glucose sanguin.

Tableau 10 : Réduction de l'hyperglycémie induite par le glucose chez les rats post-traités avec les deux extraits des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* et la metformine.

	Glycémie basale	30	60	90	120	150
Témoin négatif : eau distillée	0,95± 0,05	0,92±0,03 +3,16	0,97±0,06 -2,10	0,98± 0,03 -3,15	0,97±0,21 -2,10	1,02± 0,27 -7,36
Témoin positif : Glucose 4mg/kg	0,92±0,08	0,97± 0,14 -5,43	1,48±0,20 -60,86	1,41±0,13 -53,26	1,31± 0,14 -42,39	1,17±0,20 -27,17
Extrait aqueux 250mg/Kg	0,96±0,05	0,91±0,06 +5,21	1,24± 0,18 -29,16	1,38±0,16 -43,75	1,20±0,04 -25	0,99± 0,16 -3,13
Extrait aqueux 500mg/kg	0,93±0,29	0,85±0,16 +8,61	1,27±0,25 -36,55	1,24±0,27 -33,33	1,10±0,19 -18,27	0,88± 0,26 + 5,38
Extrait méthanolique 250mg/Kg	0,70±0,06	0,85± 0,07 -21,42	1,31±0,12 -87,14	1,39±0,16 -98,57	1,20±0,25 -71,42	1,01± 0,18 -44,28
Extrait méthanolique 500mg/kg	0,85±0,14	0,85±0,04 0	1,35±0,24 -58,82	1,19±0,12 -40	0,95±0,28 -11,76	0,88±0,11 -3,52
Metformine 500mg/kg	0,88±0,14	0,98±0,17 -11,36	1,45±0,32 -64,77	1,07±0,39 -21,59	0,74±0,24 +15,91	0,63±0,19 +28,41

L'administration par voie orale de l'extrait aqueux à la dose de 250mg/Kg ne modifié pas l'hyperglycémie au niveau des 90 min avec un pic de 1,38±0,16g/l après 90 min de l'induction de l'hyperglycémie, qui correspond au pourcentage de réduction (-43,75). Après les 90 min on remarque une diminution de taux de glucose puis une normalisation de la glycémie à 0,99± 0,16g/l. Cette normalisation de la glycémie par l'extrait aqueux est prouvé par l'équipe de **Chabane et al, 2013** par un extrait aqueux d'*Ajuga iva L.* Cette efficacité de l'extrait aqueux correspond au mieux à la condition des ingestions des aliments chez l'homme.

A la dose de 500 mg/kg de l'extrait aqueux, l'effet hypoglycémiant est plus prononcé : il y a donc un effet dose –réponse. Nos résultats sont étayés par les travaux de **Keita et al, 1998** sur l'extrait aqueux de feuilles de *Scleocarya birrea* où la réduction de la glycémie est dose dépendante.

L'extrait méthanolique est à la dose de 250 mg/kg n'a pratiquement pas d'effet hypoglycémiant. Au contraire, on observe une légère augmentation de la glycémie (qui passe 0,70±0,07g/l 1,01±0,18 g/l) après 150 min,

L'extrait méthanolique est à la dose de 500mg/kg ne possède aucun effet modulateur du taux de glucose pendant toute la durée de l'expérience (150 min).

Les rats traités par la molécule de référence « **Metformine** » à la dose de **500 mg/kg**, voient leur glycémie se diminuer qui se normalise après 90 min. A 150 min la glycémie diminue et atteint la valeur de 0,63±0,19 g/l soit une réduction de 28,41%.

Conclusion : L'extrait aqueux des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* à la dose de 500 mg/kg entraine une réduction de l'hyperglycémie provoqué par le glucose (4 g/kg de poids corporel) chez le rat Wistar. Cet extrait possède des effets hypoglycémiant et anti-hyperglycémiant dont les performances sont relativement loin de l'effet de l'inhibiteur du transporteur intestinal du glucose Glut2 qui est la « metformine ». Cette efficacité de l'extrait aqueux correspond au mieux à la condition de l'ingestion des aliments chez l'homme.

Selon la bibliographie, le mécanisme exact de l'action des feuilles de mûres sauvages sur l'absorption intestinal du glucose n'est pas encore élucidé.

Conclusion

La phytothérapie a existé depuis l'antiquité. Les plantes, par leur métabolisme secondaire, synthétisent des métabolites de nature variée où plusieurs études scientifiques ont démontré leurs effets bénéfiques sur plusieurs pathologies (Katalinic et al, 2006, Umeno al, 2016). Plusieurs plantes ont été identifiées comme ayant un potentiel antioxydant (Lee et al, 2000, Yawadio. et al, 2008; Živković J. et al., 2010). Les phénols, en particulier les bioflavonoïdes, sont très intéressants par leur propriété antioxydante en raison de leur origine naturelle et de leur capacité d'agir comme piègeurs de radicaux libres (Hertog et al, 1993, Simonetti et al, 1997, Katalinic et al, 2006).

Le diabète est lié principalement au stress oxydant qui favorise le développement de la pathologie en perturbant l'insulino-sécrétion (Auberval, 2010). La nature de l'alimentation représente la cause principale de l'apparition du stress parce qu'elle fournit les antioxydants comme les vitamines E et C, les caroténoïdes, les polyphénols, et autres molécules.

L'étude phytochimique, des deux extraits méthanolique et aqueux des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* (mûres sauvages), montre que l'extrait méthanolique a une teneur hautement significative en polyphénols $268,529^{***} \pm 0,021$ mg EAG/g EXS et un taux significative en flavonoïdes $53,11^* \pm 0,002$ mg EAQ/g EXS, plus que l'extrait aqueux, $87,058 \pm 0,001$ mgEAG/g EXS en polyphénols et $51,74 \pm 0,003$ mg EAQ/g EXS en flavonoïdes.

Dans la présente étude, nous avons ciblé l'effet antioxydant (étude *in vitro*) et l'effet hypoglycémiant (étude *in vivo* sur des rats Albinos) des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de la plante *Rubus fruticosus*. L'étude *in vivo* est réalisée sur des rats *Albinos* où nous avons administré les extraits aqueux et méthanolique des feuilles *Rubus fruticosus* et mesuré leur capacité hypoglycémiant. Les résultats de test dose-effet montrent que l'extrait aqueux à la dose de 500 mg/kg possède un pouvoir réducteur hypoglycémiant de l'ordre de 25% (supérieur à l'extrait méthanolique) supérieur à celui de l'extrait méthanolique.

L'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits testés est déterminée par 3 tests : DPPH, CAT et FRAP. Ces 3 tests montrent que les deux extraits méthanolique et aqueux possèdent des activités antiradicalaire non équivalente où l'extrait méthanolique prédomine avec une $IC_{50} = 20,70 \pm 0,328$ μ g/ml (test DPPH) contre une IC_{50} de $95,82 \pm 8,222$ Le test de capacité antioxydante totale(CAT) est maximal dans la concentration de 750μ g/ml ($236,5 \pm 1,145$) pour l'extrait méthanolique, largement supérieur à celle de l'extrait aqueux ($109,866 \pm 0,635$) , expliquée par sa richesse en polyphénols (3 fois plus que l'extrait aqueux)..

Enfin, on peut conclure que les feuilles de mûres *Rubus fruticosus* possèdent des effets bénéfiques sur la santé humaine (capacités antioxydante et hypoglycémiant) et son intégration à l'alimentation des personnes diabétiques peuvent réduire le taux de glycémie et au même temps réduire le nombre d'injection d'insuline par jour.

Perspectives

La médecine traditionnelle en Algérie utilise les feuilles de mûres sauvages pour soigner les brûlures dans les premières semaines, aussi de diminuer la tension artérielle. Cependant, peu d'études expliquent ces propriétés. La perspective, il serait intéressant de :

- ✓ Améliorer l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes en salive artificielle d'un intérêt certain pour la santé humaine pour se rapprocher des conditions *in vivo*.
- ✓ Déterminer la composition des molécules bioactives responsables de la baisse de tension artérielle, probablement due, à l'existence de l'acide Gamma Amino Butyrique (GABA) qui contrôle l'équilibre de la tension artérielle, comme dans les feuilles de mûrier blanc (Gérard, 2013)
- ✓ Faire des études approfondies sur le mécanisme d'action des molécules bioactives des feuilles pour expliquer leur effet sur les brûlures.
- ✓ Déterminer le mécanisme hypoglycémiant : effet sur la sécrétion de l'insuline, effet sur le transporteur intestinal Glut2, effet sur les enzymes digestives (α -amylase, maltase...), effet sur la synthèse du glycogène...

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

Abbasi, A.,Juszczyk, D et al.(2017).Body mass index and incident type 1 and type 2 diabetes in children and young adults :arctrospective cohorr study.Page 524-537.

Andrierier, L.,Francois, J.(2014).Vitamine D :source métabolisme et mécanisme d'action.Ocl journal.Page 2.

Agbor, G.A.,Jeo, V.A.,Patreck, D.E.(2014).Folin reagents for polyphenolse assay.Page147-156.

Ashraful, A., Nusrat, S., Hemayet, H.,Murad, H.,Hasan, M.R.,Mahbubur, R.,Obayed, U.(2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: apotential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. Nutrition & metabolism .Page 1-13.

Arbenz, A.,Avérous, L.(2015).Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. Green chemistry .Page 26-46.

Augustin, S.,Gary, S.(2016). Dietary intake and bioavailability of polyphenols .nutrition.ReasertcheGat. Page 1-14.

AHARONI , A.,GALILI , G.(2011). Metabolic engineering of the plant primary, secondary metabolism interface. Current opinion in biotechnology.Vol.Page 239-244.

Bahri, L.,Sanhaji, L.Tayeb, Z et al.(2013).Vitamine D et immunité.SMR.Page 30-36.

Bang-An, L.,Fan,G.,Lu-Lu, Q.(2017).the association between vitamin D definciency and diabetic retino pathy in type 2 diabetes;Aneta-analysis of Observational Studies.Nutritions journal.

Bing H.,Xixia L.,Chunla, Z., Xiaoxiong, Z.(2017). Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols.Journal of food and drug analysis. Page 1-13.

Benmohammed, K.(2015).Définition étiopathogénie et classification du diabéte sucré.page 3.

Janelle, A.,Noble, A.,Henry, A.(2012).Qenetics of type 1 diabetes.Page 2.

Bihon, H.(2011).Alimentation et incidence du diabète de type 2:prevention de diabète de type 2.Page 30-36.

Bougandoura, N.,Bendimeraa, N.(2012).Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de satureja colamintha ssp nepta (L)bnq.nature et technologie.Page 14-19.

Casarin, E.,Dallacqua, S.,Smejkal, K., Šlapetová, T., Innocenti, G.,Carrara, M.(2014). Molecular mechanisms of antiproliferative effects induced by Schisandra-derived dibenzocyclooctadiene lignans deoxyschisandrin and gomisin N in human tumour cell lines. Fitoterapia .Page241–247.

Catalgol, B.,Batirel, S.,Taga, Y .Kartal, N.O.(2012). Resveratrol: french paradox revisited. Frontiers.pharmacology journal .Pages 1-18.

Catherine, B.,Zuana, O.D.,Ktarz, A.(2013).Interaction entre facteurs d'environnement et fonde génétique dans le diabete type 2.medicine et science.Page 791-799.

Cuvelier, C.,Dotreppe, O.,Istasse, L.(2003).Chimie :sources alimentaires et dosage de la vitamine E.Page 315-324.

Dellater, J.,Beanden, J.L.(2005). Reaction libres et strees oydant espece biologiques et pathologies. .Page 1-405.

Faner, A.(2003).La reactive oxydants.Mecanismes chimique.Page 108-115.

Feridoon, S.,Adriano, C.C.(2016).Tcophénols and tocotriols in common and Emerging Dietary sources:Occurrence,Applications and health benefit,moulecular sciences.Page 2.

Fen, T.,Yixi, X.,Hui,C.,Hua,Y.,Xiaoqing, C.,Jianbo, X.(2016). Fetal bovine serum influences the stability and bioactivity of resveratrol analogues: a polyphenol-protein interaction approach. Journal of Food Chemistry .Page 321–328.

Filippis, B.,Ammazzalorso, M.,Fantacuzzi, M.,giampietro, L.,Maccallin, R.(2017). Anticancer activity of stilbene-based derivatives, Journal of Chime Medicine.

Ganesan, K.,Xu, B.(2017). Acritical review on polyphenols and health benefits of black soybeans.nutrients.Pages 1-17.

Govindappa, M.(2016).A Review on role of plants extraction and its phytochemicals for the management of diabete.Diabetes cellulues metabolism.Page 1-18.

Grimaldi, A.(2000).Diabétologie.Page1-9.

Gulati, V., Harding, I.H.,Palombo, E.A.(2012). Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: Potential application in the management of hyperglycemia. BMC complementary and alternative Medicine.Page 1-9.

Kumarasny, Y.,Byres, M.,Corp, S.(2007).sercennig seed of some scottich plants plants for free radicalescavengin activity.Phytother.Page 615-621.

Hae, S.K., Michel, Q.J.,Jeong,K.(2014). New insights into the mechanisms polyphenols beyond antioxidant properties: lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate.Journal of Redox Biology .Page187-195.

Haeng, J.,Pincemail, J.O.,Chalier, C.,Chapplle, J.P.(2007).Le stress oxidant.page 628-638.

Hatahet, T.M.,Morille, A.Shamseddin, A.(2016).Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide.International journal of pharmaceutics.Page167–176.

Heleno, S.A.,Martins, A.,Queiroz, M,J.,Ferreira, I,C,F.(2014) . Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent comp. Journal of Food Chemistry. Page 501-513.

Hertog, G. L. M.,Hollman, C. H. P., Putte, V. B.(1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices.J. Agric. Food Chem., Page1242–1246.

Hosseini, R.,Moosavi, F. Rajaian, F.H.,Silva, T.,Magalhães, D., Saso, L., .Miri1, R., Borges, F.,Firuzi1, O.(2016). Discovery of neurotrophic agents based on hydroxycinnamic acid scaffold. Medicinal and natural products chemistry research center,page 1-39.

Hua, Z.,Rong, T.(2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. current opinion in food science. Pages 33-42.

Hui-Y, T.,Chi-Tang, H.,Yu-Kuo, C.(2017).Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene.Journal of food and drug a nalysis.Page 34-47.

Hurtado-Gaitán, E.,Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A.,Antonio Samper-Herrero.(2017). A focused multiple reaction monitoring (MRM) quantitative method for bioactive grapevine stilbenes by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple-quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ).

Jie Yu. Xiaojuan Bi. Bing YU. Daiwen Chen.(2016). Isoflavones: anti-inflammatory benefit and possible caveats. *Nutrientsjournal*.Page 1-16.

Joshua, R.W.,Dudareva, N.(2015). A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. *Journal of molecular plant*. Pages 83-87.

Katalinic, V.,Milos, M.,Kuliscic, T.,Jukic, M.(2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols .*Food chemistry* Page 550–557.

Katarzyna, M.B.(2017). Natural flavonoids: classification potential role and application of flavonoid analogues.*Biological research*.Page 108-123.

Keita, A.,Mariko, L.,Hkirara, T.K.(1998).Etude de l'activité hypoglycemiant des feuilles de sclerocaryBirrea(A.Rich) Hachst (Anacardiacak).*Pharm med*.Page 16-25.

Klongsiriwet, C., Quijada, J.,Williams, A.R.,Mueller-Harvey, L.,Williamson, E.M.,Hoste, H.(2015).Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance*.Page 127e134.

Kumar, G.,Baojun, X.(2017).A critical review on polyphenols and health benefitsof black soybeans. *J o u r n a l of nutrients*.Page 1-17.

Laport, D.C.(2013).Immunothérapie du diabète de type 1 :le point sur les essais clinique pues récents.*metabolismes hormones diabètes et nutrition*.Page 55_59.

Lavle, N., Shukla, P.P.(2016). Role of flavonoids and saponins in the treatment of diabetes mellitus.*J pharm. Sci bioscientificres*. Page 535-541.

Lee, K.G.,Mitchell, A.,Shibamoto, T .(2000). Antioxidative activities of aroma extracts isolated from natural plants.

Leyva-lopez, N.,Gutierrez-Grijalya, E.P.,Ambriz-perez, D.L.,Hredia, J.B.(2016). Flavonoids as cytokine modulators: A PossibleTherapy for inflammation-related diseases. international journal of molecular sciences.Pages 1-15.

Marchand, L.,Thivolét, C.(2016).Etiologié et physiologie du diabéte de type 1.ResearchGate.Page1.

Magnan, C.,Klorza, A.(2015).Production et secretion de l'insuline par la cellule β pancréatique.Elscience.Page 241-264.

Molyneux, P.(2004).The use of the stable free radical of Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)for restination antioxidant activity .songklankarin J.sec technol .Page 211-219.

Moonj, K.,Shibanats, T.(2009).Antioxydant assays for plant and food compount.agriculture and food

Mukhopadhyay, P.,Prajapati, A.K.(2015). Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers a review.Journal The Royal Society of Chemistry.

Nadomau, M.,Kamegne, D.P.,Ntahayong, M.(2014).Evaluation de l'activité antidiabétique des extraits de failles de gneteus africanum et gnetum bulcho zzianum(Gnétacées).sciences technologies et développement.Page 64.

Nivelle, L.,Hubert, J.,Courot,E.,Jeandet, P.,Nuzillard,J.M.,Renault, J.H., Clément,C.,Delmas, D.,Tarpin, M.(2017). Anti-cancer activity of resveratrol ,Journal of molecules.

Nouioua, W.(2012). Biodiversité et ressources phylogénétiques d'un écosystème forestier « paeoniamascula (l.) mill Magister en Biodiversité et gestion des écosystèmes, soutenu Université Ferhat Abbas , Sétif, Algérie.

Oliver, S. A. B.,Vittorio,O.C.,Cirilloe, G.,Cyrille, B.(2016).Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules. formal of the royal society of chemistry .

Oyazzu, M.(1986). Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine.Food and agriculture organization of united nation.Page 307-315.

Pescheux, J.,(2016).l'implication de la vitamine C dans la thérapeutique parodontale.page 18.

Philips, J.C.,Rademecker, R.P.(2012).Le diabète de type 1 :de la prédisposition génétique à un contexte enviremental hypothétique.Page 62.

Pincemail, J.,Heusele, C.,Bonté, F.,Limet, R.,Defraigne, J.O.(2001). Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. Act méd.Page 158-163.

Prieto, P.,Pireda, M.,Agusllon, M.(1999).Spectrophotometric quantitation of antioxidant determination of vitamine E and biochemi .Page 269-327.

Qardés-Albert, M.,Ronnefent-Rosselot, D.,Abedenzadh, Z.(2003).

Quettez, D.C.,Gresser, B.,Vasseur, J.,Dine, T.B.,et al.(2000).Phenolic compoundand antioxydant activites of fagopyrun esculentun moenck (huile sans flor) .Ethnophormul.Page 35-42.

Quilliot, D.,BIOhme.,P.,Ziegler,O.(2011).La stéato-hépatite non alcoolique :influence de la nutrition de la physiopathologie au traitement post cellulaire.page 35-46.

Reinisalo, M.,Kårlund, A.Koskela, A.Kaarniranta, K..Karjalainen, R.O.(2015). : Molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases. oxidative medicine and cellular longevity .1-24 .

Richarson, A.(1980).Taxonomy and distribution of Rubus fruticosus L.agg.Journal of Australien institue of agriculture science.Page 87.

Ropiak1, H.M.,Peter Lachmann, P.,Aina Ramsay, A.,Rebecca J. Green, R.J.,Mueller-Harvey, I.(2017). Identification of structural features of condensed tannins that affect protein aggregation. PLOS ONE journal.1-36.

Simonetti, P. ,Pietta, P. ,Testolin, G.(1997).Polyphenol content and total antioxidant potential of selected italian wines. J. agric. Food chem., Page1152–1155.

Umeno, A.,Horie, M.,Murotomi, K.,Nakajima, Y.,Yoshida, Y.(2016). Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. Molecules.Page 1-15.

Vios de signalisation de l'insuline :mimoire affrctés dans l-insuline résistance Capau.(2003).medicine science.Page 834-839.

Visnagri, A., Kandhare, A.D., Chakravarty, S., Ghosh, P., Bodhankar, S.L.(2014). Hesperidin, a flavanoglycone attenuates experimental diabetic neuropathy via modulation of cellular and biochemical marker to improve nerve functions. PharmBiol.Page 14–28.

Wang, C.C.,Li, H.B.,Cheng, K.(2006).Systementic survey of antioxidant activity of 30chinese medicinal plants using the free reducing antioxidant pevoir assay.Food chen.Page 97.

Molnar, p.,Benesit, T.,Gyarggé, H.(2014).

Westphal, A.,Bohm, V.J.(2015).Caretenoids.Page 2.

Xu-Jun, Z.,Zhao, Z.,Hua-Hong, X.,Ming-Le, W.,Wei-Dong, W.,Chen, X.,Xing-Hui, L.(2016). Isolation and dynamic expression of four genes involving in shikimic acid pathway in *Camellia sinensis* 'Baicha 1' during periodic albinism.journal of Mol Biol Rep.

Yawadio-Nsimba, R. ,Hiroe-Kikuzaki, H., Konishi, Y.(2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of chenopodium quinoa and amaranthus spp. Seeds. Food chemistry.Page 760–766.

Zia, M.,Hage, U.I.,Riaz, M.(2014).Rubus fruticosus L :constitents ,biological acivities and health relates uses.Molecules journal.

Živković, J.,Zeković, Z.,Mujić, I.,Vidović, S.,Cvetković, D.,ŽikaLepojević, Z.,Nikolić, G.G.,Trutić, N. (2010).Scavenging capacity of superoxide radical and screening of antimicrobial activity of castanea sativa mill extracts. Food Sci. Page 61–68.

Annexes

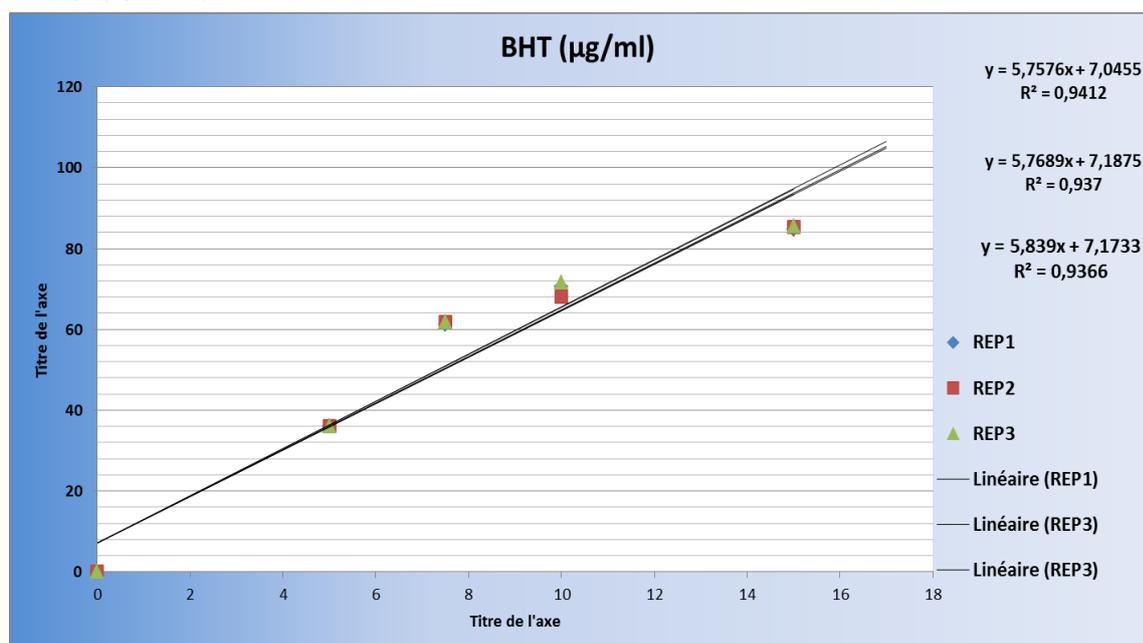
Annexe 1 : les valeurs d'absorbances de courbe d'étalonnage d'acide gallique (dosage des polyphénols)

[C] Acide gallique	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
12,5µg/ml	0,039	0,04	0,035
25 µg/ml	0,075	0,075	0,077
50 µg/ml	0,149	0,149	0,151
100 µg/ml	0,319	0,319	0,317
150 µg/ml	0,501	0,536	0,52
200 µg/ml	0,645	0,64	0,64
250 µg/ml	0,829	0,847	0,821
300 µg/ml	1,013	1,013	1,013
400 µg/ml	1,724	1,791	1,870

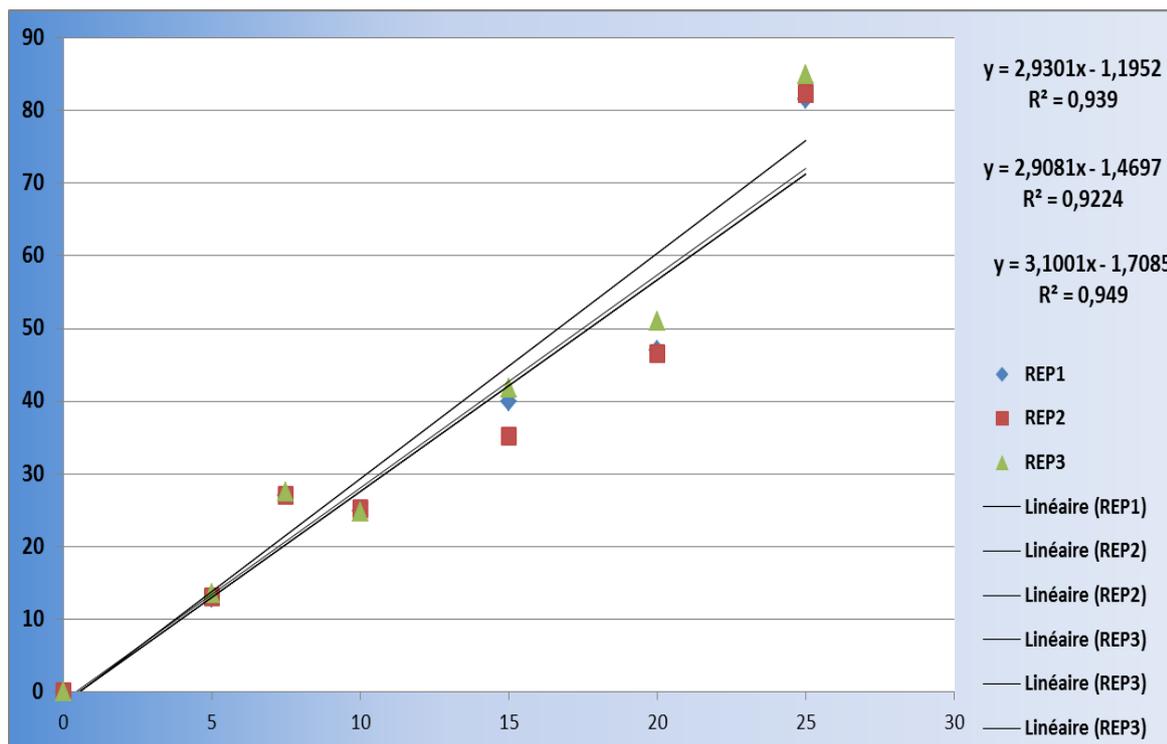
Annexe 2 : Les valeurs d'absorbances de courbe d'étalonnage de quercitine (dosage des flavonoïdes)

[C] de quercitine	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
5µg/ml	0,138	0,126	0,124
10 µg/ml	0,345	0,369	0,345
15 µg/ml	0,503	0,604	0,505
20 µg/ml	0,532	0,532	0,533
30 µg/ml	0,833	0,842	0,842
40 µg/ml	1,13	1,093	1,109
50 µg/ml	1,382	1,375	1,39
60 µg/ml	1,547	1,547	1,57

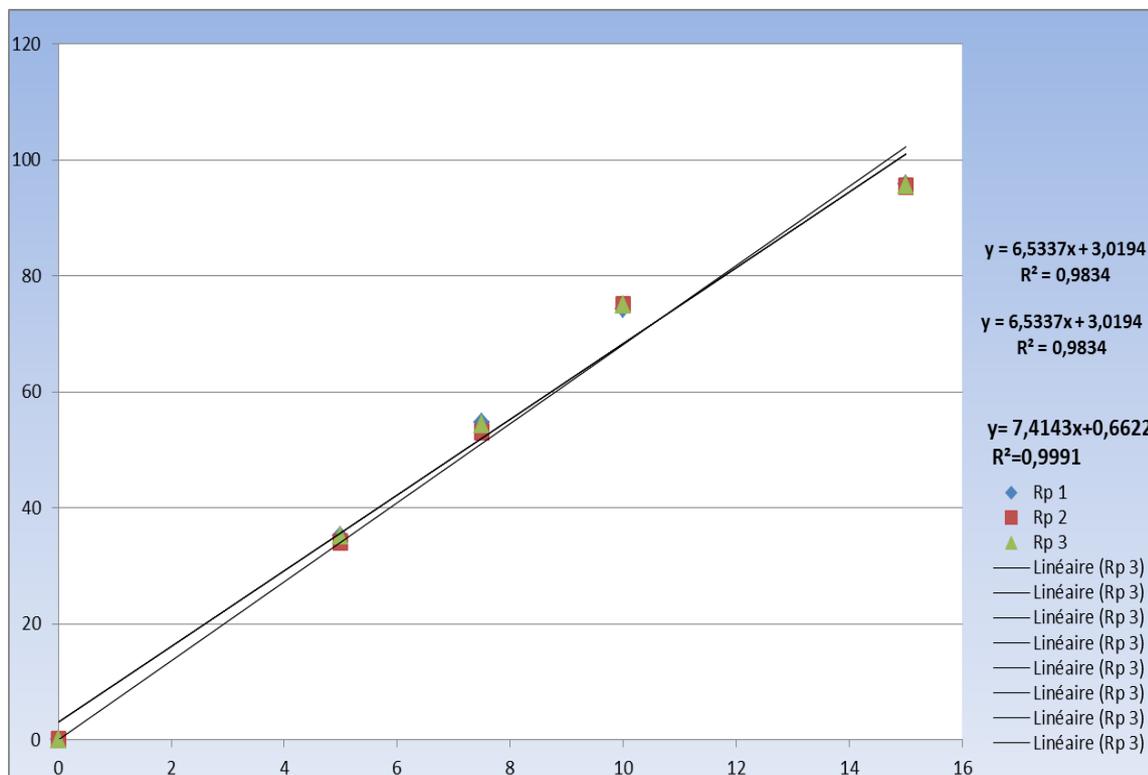
Annexe 3 : Test DPPH



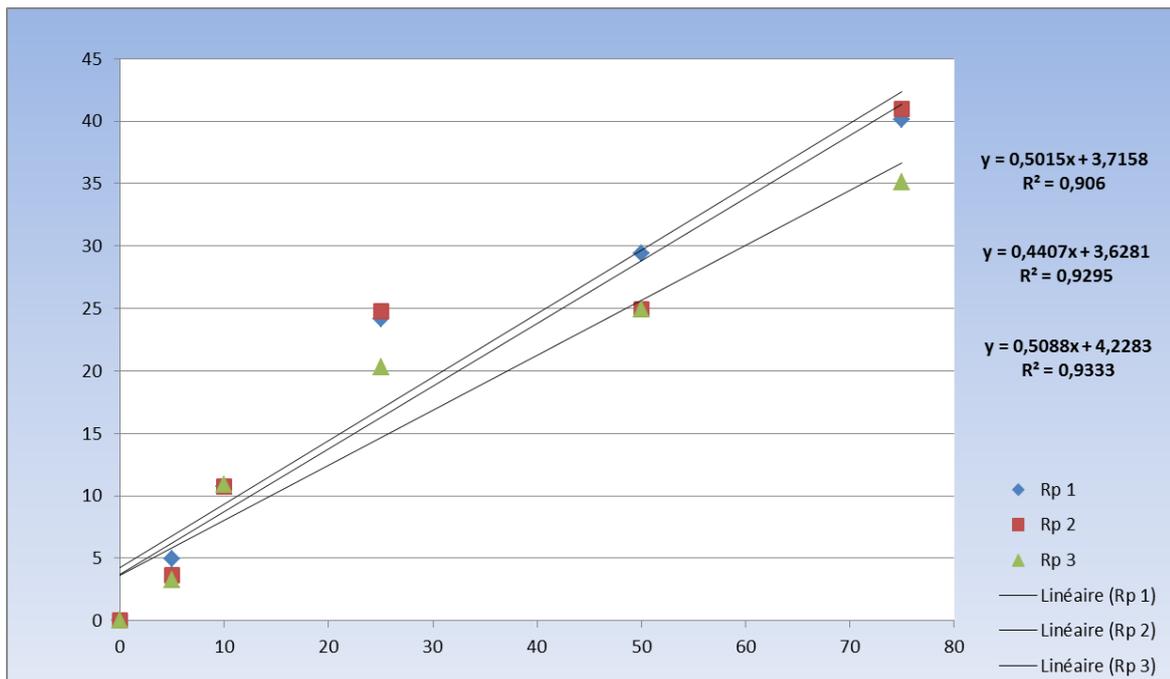
Standard BHA :



Standard : Acide ascorbique



Extrait aqueux :



Extrait méthanolique :



Annexe 4 : test CAT

[C] Acide Asc	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
50 µg/ml	0,175	0,158	0,174
100 µg/ml	0,343	0,343	0,357
200 µg/ml	0,648	0,648	0,656
300 µg/ml	1,089	1,119	1,091
400 µg/ml	1,49	1,46	1,497
500 µg/ml	1,98	1,935	1,918
600 µg/ml	2,403	2,389	2,457

Annexe 5 : test FRAP

[C] Acide Asc	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
5 µg/ml	0,05	0,051	0,055
10 µg/ml	0,104	0,116	0,113
25 µg/ml	0,284	0,295	0,293
50 µg/ml	0,591	0,589	0,605
75 µg/ml	0,871	0,891	0,858
100 µg/ml	1,106	1,329	1,16

Extrait méthanolique :

	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
5µg/ml	0,053	0,061	0,055
10 µg/ml	0,055	0,055	0,065
25 µg/ml	0,066	0,066	0,065
50 µg/ml	0,199	0,192	0,197
75 µg/ml	0,248	0,278	0,264
100 µg/ml	0,354	0,314	0,379
150 µg/ml	0,527	0,527	0,513
200 µg/ml	0,697	0,686	0,685
300 µg/ml	0,961	0,962	0,961
400 µg/ml	1,246	1,36	1,164
600 µg/ml	1,952	1,753	1,894

Extrait aqueux :

	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
5 µg/ml	0,027	0,03	0,027
10 µg/ml	0,037	0,038	0,037
25 µg/ml	0,038	0,049	0,039
50 µg/ml	0,05	0,051	0,051
75 µg/ml	0,059	0,056	0,057
100 µg/ml	0,213	0,213	0,192
150 µg/ml	0,308	0,307	0,306
200 µg/ml	0,443	0,442	0,444
300 µg/ml	0,604	0,596	0,605
400 µg/ml	0,765	0,765	0,758
600 µg/ml	1,194	1,190	1,092

Résumé : L'objectif de cette étude est la mise en évidence de l'activité hypoglycémiant (*in vivo*) et anti-oxydante (*in Vitro*) des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de la plante *Rubus fruticosus*, couramment utilisées en médecine traditionnelle comme agent antidiabétique ou antihypertensif.

Les polyphénols et les flavonoïdes de cette plante sont extraits dans du méthanol (1v :10v) ou dans de l'eau distillé (milieu aqueux, 1v :10v).

Les teneurs en polyphénols (estimée par le test de Folin Ciocalteu) et en flavonoïdes (par le test d'AlCl₃) sont différentes : **268,529 mg EAG/g EXS dans l'extrait méthanolique** contre **87,058 mg EAG/g EXS dans l'extrait aqueux**. Les polyphénols des feuilles de *Rubus fruticosus* sont donc mieux extraits par le méthanol que le milieu aqueux.

En ce qui concerne les teneurs en flavonoïdes, **l'extrait méthanolique contient 55,909 mg EQ/g vs 54,192µg EQ/g EXS dans l'extrait aqueux**. Les teneurs en flavonoïdes sont équivalentes dans les deux milieux d'extraction.

Le test de tolérance au glucose réalisé sur des rats de race Wistar pendant une durée de 150 min où les extraits (méthanolique ou aqueux) des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* à 250 mg/kg ou 500 mg/kg sont administrés par voie orale. Les résultats indiquent un effet dose dépendante de l'extrait aqueux à la dose de 500mg/kg. L'extrait possède donc un effet hypoglycémiant. Plusieurs mécanismes hypoglycémiant existent parmi eux la capacité anti-oxydante des polyphénols ou des flavonoïdes démontrées dans de nombreux travaux.

Trois tests pour évaluer l'activité anti-oxydante des extraits méthanolique ou aqueux des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* : le test de piégeage de radical libre (DPPH), le test pouvoir réducteur (PR) ou le test de la Capacité Antioxydante Totale (CAT). Les résultats sur l'activité antiradicalaire et/ou antioxydante montrent que ces polyphénols présentent dans les extraits ont une capacité de piéger le radical DPPH° avec des **IC50 de 20,70 et 95,82µg/ml pour l'extrait méthanolique et aqueux** respectivement. Ce pouvoir antioxydant est confirmé par le test « capacité antioxydante totale » et le test « pouvoir réducteur ». L'extrait aqueux est plus performant dans son pouvoir antioxydant.

Conclusion : Les polyphénols et les flavonoïdes des feuilles de la plante *Rubus fruticosus* ont des capacités anti-oxydante et hypoglycémiant (antidiabétique).

Mots clé : Feuilles de *Rubus fruticosus*, activité antioxydante (test DPPH, test FRAP et test CAT)
Test de tolérance au glucose.

Devant le jury :

Président: Mme ZAMA DJ.

Professeur, Université Frères Mentouri Constantine 1

Encadreur: Mme MERAIHI Z.

Professeur, Université Frères Mentouri Constantine 1

Co-encadreur: Mr BOULDJADJ R.

M.A.A., Université Frères Mentouri Constantine 1

Examineur: Mme DAKHMOUCHE SH.

M.C.B, ENS, Université Constantine 1