



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER
DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES
SPECIALITE : BIOCHIMIE

Intitulé :

**L'effet protecteur des lectines excraite à partir de
Punica granatum contre l'inflammation induit
par LPS chez le rat Albinos Wistar**

14/07/2021

Présenté et soutenu par : **KHODJA YOUSRA**
LECHEHEB ROUMAISSA

Jury d'évaluation :

Président du jury : NECIB.Y

(Pr - UFM Constantine)

Rapporteur : BAHLA

(MCB-UFM Constantine)

Examineur : Louaar.I

(MAA-UFM Constantine)

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

*Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant et
Miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage
la persistance et nous a permis d'exploiter les
Moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste
Travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite
Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre
Encadreur Dr BAHI Ahlem Maitre de conférences au département
De Biochimie et biologie cellulaire et moléculaire à la faculté des sciences
de la nature et de la vie de l'université des frères
Mentouri Constantine, qui nous a encadrées et dirigées ce
Travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité,
ses conseils, ces encouragements, sa gentillesse
Nous sommes très honoré de travailler avec elle
Nos remerciements vont aussi aux membres de notre jury de mémoire
:A notre président du jury Monsieur Necib. Y professeur au département
de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire
À L'Université des Frères Mentouri Constantine.
C'est un réel plaisir pour nous que vous avez accepté
de présider notre jury de mémoire.
A l'examinatrice Dr.Louaar Ibtissem
Maitre assistante à l'université des frère Mentouri,
nous somme fière que vous avez acceptez d'examiner
et de juger notre travail Sans oublier de remercier vivement les membres de l'équipe
laborantine.*

Dédicace

YOUSRA

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers

A ma tendre mère Nacira qui m'a toujours Inondé de sa tendresse,

qui m'a encouragé dans tout ce que j'ai

Entrepris et a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mon cher père Houcine qui m'a enseigné le sens du devoir et de

Responsabilité ,je ne pourrai lui compenser les sacrifices qu'il a consentis

pour moi et Ma très cher sœur Dhoha présents

Dans tous mes moments par son soutien moral.

A mes sœurs :Hadile ;Aridje

A mes frères :Anter,Seif,Abdou

A mes jolies copines : Mima, Maïssa

A tous les gens que j'aime

Dédicace

ROUMAÏSSA

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers

*A ma tendre mère Fatima qui m'a toujours Inondé de sa tendresse,
qui m'a encouragé dans tout ce que j'ai Entrepris et a fait de moi ce que
je suis aujourd'hui.*

*A mon cher père Omar qui m'a enseigné le sens du devoir et de
Responsabilité ,je ne pourrai lui compenser les sacrifices qu'il a consentis
pour moi*

A mon marie : Allawa

A ma fille : Sidra

A ma belle-sœur :Ibtihel

A mes frères :Mouad ;Sid ALI ;Faiz Ghoulem

A mes amies proche :Yousra ; Dhoha ; Naila

A tous les gens que j'aime

SOMMAIRE

I. Résumé

IV. Liste des abréviations

V. Liste des tableaux

VI. Liste des figures

VIII. Liste des photos

IX. Introduction générale

Etude bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines	1
2. Historique	4
3. La structure des lectines.....	9
3.1 Les lectines simples	9
3.2 Les lectines en mosaïques	10
3.3 Les assemblages macromoléculaires	10
4. Les sites de liaisons des lectines.....	11
5. La spécificité et l'affinité des lectines.....	12
6. La Classification des lectines	13
6.1 Chez les animaux	13
6.2 Chez les végétaux	14
7. Distribution des lectines dans le monde de vivant	15
7.1 Les lectines animales	15
7.2 Les lectines des plantes	17
7.3 Les lectines des microorganismes	18
8. Fonction biologique des lectines	19
8.1 Chez les plantes	19
8.2 Chez l'homme.....	19
9. Propriétés des lectines	20
9.1 L'interaction lectine–glucide	20

9.2	L'agglutination des cellules	20
9.3	L'activités mitogène	20
9.4	Effets mimétiques des hormones.....	20
9.5	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses.....	20
9.6	La propriété antivirale	21
9.7	La propriété antibactérienne.....	21
9.8	Autres propriétés.....	21
10.	L'intérêt des lectines	22
10.1	En biochimie et protéomique.....	22
10.2	Dans le domaine biomédical	22
10.3	Dans le domaine agronomique	23
11.	Le rôle des lectines dans l'immunité	23

Chapitre II : Les médicaments anti-inflammatoire

1.	Inflammation	24
1.1	Définition de l'inflammation	24
1.2	Définition de LPS	24
1.3	La Structure du LPS.....	25
1.4	La Physiopathologie du LPS	26
2.	Les anti-inflammatoires.....	26
2.1	Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	26
2.2	Anti-inflammatoire non stéroïdiens	27
2.3	Les Anti-inflammatoires d'origine végétale	30

Chapitre III: Le stress oxydant

Le stress oxydant

1.	Définition.....	33
2.	Les espèces réactives de l'oxygène	34
3.	Les cibles biologiques du stress oxydant.....	36
3.1	Les lipides	36
3.2	Les protéines	37
3.3	Les acides nucléiques	39
4.	Le stress oxydant et les pathologies.....	40
5.	Systèmes de défenses antioxydants.....	40

5.1	Les systèmes enzymatiques	41
5.2	Les systèmes antioxydants non enzymatiques	43

Chapitre VI: Généralités sur la plante

La grenade (*punica granatum*)

1.	Historique	50
2.	Production de grenade.....	50
2.1	Production de grenade dans le monde	50
2.2	La production de grenade en Algérie	50
3.	Description botanique.....	51
4.	Classification botanique	52

Matériels et méthodes

1.	Matériel végétale	53
2.	Les méthodes	53
2.1	La Préparation des plantes :.....	53
2.2	L'extraction des plantes	53
3.	Matériels et méthodes des tests biologiques	55
3.1	Matériel biologique et conditions d'élevage.....	55
3.2	Traitement des rats	56
3.3	Les Méthodes de dosage.....	57
4.	Analyse statistique :	59

Résultats et Discussion

1.	Influence du traitement sur les variations des paramètres biochimiques sériques	60
1.1	Résultats	60
1.2	Discussion	61
2.	Influence du traitement sur les variations de l'activité sérique de quelque marqueur enzymatique.....	62
2.1	Résultats	62
2.2	Discussion	62

3.	Influence du traitement sur la capacité antioxydant plasmatique	63
3.1	Résultats	63
3.2	Discussion	64
4.	Influence du traitement sur les variations des paramètres du stress oxydant.....	64
4.1	Résultats	64
4.2	Discussion	67
	Conclusion et perspective.....	71
	Références bibliographiques.....	72
	Annexes	

Résumé

La présente étude visait à évaluer l'effet protecteur de la lectine et du diclofénac contre le stress oxydatif induit par LPS. Pour cette raison, une étude phytochimique des tests antioxydants *in vitro* ont été réalisés sur la grenade « *Punica granatum* » pour estimer ses effets attendus. Les résultats ont montré la présence de composés phénoliques à une concentration très importante. L'évaluation du pouvoir piégeur de la grenade est plus active avec une $IC_{50} = 5,49 \pm 0,039$, et *in vivo*, sur des rats Albinos Wistar qui sont traités par LPS seul ou combiné avec la lectine et le diclofénac, pendant une période d'une semaine, le sang est prélevé ensuite les rats sont sacrifiés et les différents paramètres sont déterminés.

À partir de l'analyse de nos résultats, on observe des changements notables dans les paramètres biochimiques et immunologiques. Caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique, et l'activité enzymatique de AST, ALT, PAL et LDH. Ainsi le traitement des rats par LPS entraîne une diminution de la capacité anti-oxydante plasmatique caractérisée par la diminution de la concentration sérique de l'activité de DPPH. Nous avons également observé que les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel détoxifiant exprimé par la diminution des taux de glutathion érythrocytaire, hépatique et rénale, GPx, GST et catalase et une augmentation de la peroxydation lipidique exprimée par le taux élevé de MDA plasmatique, érythrocytaire, hépatique et rénale.

Mots clés : LPS, Lectine, Diclofénac, Stress oxydatif, *Punica granatum*, antioxydants

Abstract

The present study aimed to evaluate the protective effect of lectin and diclofenac against oxidative stress induced by LPS. For this reason, a phytochemical study of in vitro antioxidant tests were performed on pomegranate « *Punica granatum* » to estimate its expected effects. The results showed the presence of phenolic compounds at a very high concentration important. The evaluation of the trapping power of the grenade is more active with a $IC_{50} = 5.49 \pm 0.039$, and in vivo, in Albino Wistar rats that are treated with LPS alone or combined with lectin and diclofenac, for a period of one week, the blood is taken then the rats are sacrificed and the various parameters are determined. From the analysis of our results, we observe notable changes in the parameters biochemical, and immunological. Characterized above all by an increase significant serum urea, creatinine, uric acid, and activity enzymatic of AST, ALT, PAL and LDH. Thus, the treatment of rats with LPS leads to decrease in the plasma antioxidant capacity characterized by decrease in the serum concentration of DPPH levels.

We also observed that the results obtained demonstrate the detoxifying potential expressed by the decrease in the levels of erythrocyte, hepatic and renal glutathione, GPx, GST and catalase and an increase in lipid peroxidation expressed by the high level of plasma MDA, erythrocyte, hepatic and renal.

Key words: LPS, Lectin, Diclofenac, Oxidative stress, *Punica granatum*, antioxidants

والديكلوفيناك للليكتين الوقائي التأثير تقييم إلى الحالية الدراسة هدفت

في الأكسدة مضادات لاختبارات نباتية كيميائية دراسة إجراء تم ، السبب لهذا LPS عن الناجم التأكسدي الإجهاد ضد المتوقعة آثاره لتقدير الرمان على المختبر

جداً عالٍ بتركيز فينولية مركبات وجود النتائج أظهرت

a مع نشاطاً أكثر القنبلة محاصرة قوة تقييم يكون مهم

وحده LPS باستخدام علاجها يتم التي ويستار ألبينو فئران في ، الحي الجسم وفي ، $IC_{50} = 5.49 \pm 0.039$

واحد أسبوع لمدة وديكلوفيناك ليكتين مع أو

المختلفة المعايير تحديد ويتم بالجرذان التضحية يتم ثم الدم يؤخذ

المعلومات في ملحوظة تغييرات نلاحظ ، نتائجنا تحليل من

بالزيادة شيء كل قبل تتميز .والمناعية الحيوية الكيمياء

والنشاط ، البوليك وحمض ، والكرياتينين ، الدم في اليوريا

إلى يؤدي LPS باستخدام الفئران علاج فإن ، وبالتالي LDH و PAL و ALT و AST لـ إنزيمية

أن لاحظنا كما DPPH لمستويات الدم مصلى تركيز بانخفاض يتميز البلازما في الأكسدة مضادات قدرة في انخفاض والكبد الكبد الجلوتاثيون مستويات في الانخفاض خلال من السموم إزالة إمكانية توضح عليها الحصول تم التي النتائج ، MDA البلازما مستوى ارتفاع خلال من عنها المعبر الدهون بيروكسيد زيادة و catalase و GST و GPx و الكلوي ، الحمراء الدم كريات

والكلى الكبد

Liste des abréviations

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien

ALAT: Alanine amino-transferase

ASAT: Aspartate amino-transferase

CAT : Catalase

Cu+2 : Cation cuivreux

DIC : Diclofénac

DTNB : 5-5' dithionitrobenzoic acid

DICTi : Taux initial des diènes conjugués

DICTm : Taux maximal des diènes conjugués

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

GSH-Px : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathion S-transférase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

OH° : Radical hydroxyle

LEC : Lectine

LPS : Lipopolysaccharide

MDA: Malondialdehyde

RL : Radicaux libres

-SH : Groupement sulfhydryle

TCA : Trichloroacétique

µl : Microlitre

Liste des tableaux

Tableau 01 : les lectines et leurs applications	2
Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines.....	5
Tableau 03 : La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines.....	12
Tableau 04 : La classification scientifique d'Ephedra alata.....	28
Tableau 05 : Les différentes séléno-enzymes, leur localisation et leur rôle...47	
Tableau 06 : Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie...51	
Tableau 07 : Classification botanique du grenadier.....	52
Tableau 08 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment.....	55

Liste des figures

Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de Concanavalline A de canavaliensiformis en complexe avec le trimannosoide.....	09
Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique.....	10
Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia coli.....	11
Figure 04 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides....	12
Figure 05 : La classification structurale des lectines des plants.....	15
Figure 06 : Représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe Avec le SialylLewisX (PDB 1G1T)	16
Figure 07 : Tétramère de la protéine ConM de Canavaliamaritima complexée avec le Tréhalose (code PDB 2CY6).....	17
Figure 08 : La paroi des bactéries Gram négative	25
Figure 09 : Structure schématique de la molécule de lipopolysaccharide.....	26
Figure 10 : Mécanisme d'action des AINS.....	28
Figure 11 : Structure Chimique Formule du Clofenal ou Diclofenac.....	29
Figure 12 : stress oxydant.....	34
Figure 13 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	35
Figure 14 : Réactions de la peroxydation lipidique.....	37
Figure 15 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire.....	38
Figure 16 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires.....	39
Figure 17 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....	41
Figure 18 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique.....	42

Figure 19 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes...	54
Figure 20 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	56
Figure 21 : Variation de la concentration sérique de l'urée, créatinine, acide urique, chez le lot témoin et les lots traités par LPS ;Dic/LPS ;Lec(30mg/kg)/LPS ;Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement.....	60
Figure 22 : Variation de l'activité enzymatique de AST, ALT, chez le lot témoin et les lots traités par LPS ;Dic/LPS ;Lec(30mg/kg)/LPS ;Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement.....	62
Figure 23 : Variation de la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis DPPH chez le lot témoin et les lots traités par LPS ;Dic/LPS ;Lec(30mg/kg)/LPS ;Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement.....	64
Figure 24 : variation de taux de GSH hépatique et rénale et MDA hépatique et rénale, chez le lot témoin et les lots traités par LPS ;Dic/LPS ;Lec(30mg/kg)/LPS ;Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement	65
Figure 25 : variation de l'activité enzymatique de GPx, GST et catalase hépatique et rénale chez le lot témoin et les lots traités par le LPS ;Dic/LPS; Lec(30mg/kg)/LPS ; Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement.....	67

Liste des photos

Photo 01 : Ephedra alata.....31

Photo 02 : Grenade et ses nombreux grains.....52

Introduction Général

Les lectines constituent un groupe de protéines ou de glycoprotéines d'origine non-immunitaire, qui se lient de façon réversible aux hydrates de carbone et le plus souvent agglutinent les cellules ou précipitent les polysaccharides et des glycoconjugués. (**Goldstein et al, 1980**). Les lectines ont été redéfinies par **Peumans & Van Damme en 1995** tant que protéines possédant au moins un domaine non catalytique, qui se lie de façon réversible à un mono ou oligosaccharide spécifique. Toutefois, selon **Cummings (1997)**, des protéines à activité enzymatique liés à des hydrates de carbone ne peuvent être considérés comme des lectines. En conséquence de leurs propriétés chimiques, ils sont devenus un outil dans plusieurs domaines de la recherche biologique (immunologie, biologie cellulaire, structure de la membrane, recherche sur le cancer et le génie génétique). Les lectines sont présentées dans un large éventail d'organismes de la bactérie aux animaux, étant présentes dans toutes les classes et les familles, mais pas dans tous les genres et espèces (Lis et Sharon, 1994). Beaucoup de plantes à fleurs de groupes taxonomiques divers s'accumulent de grandes quantités de ce qu'on appelle VSP (végétatif stockage protéines) dans divers organes de stockage végétatif. Ces VSP jouent un rôle primordial dans l'accumulation d'azote, le stockage et la distribution dans les plantes bisannuelles et vivaces, et en conséquence, on pense à contribuer à la survie de la plante dans son environnement naturel (**Staswick, 1994**). En outre, certains VSP avec une activité enzymatique particulière ou autre activité biologique agit comme des protéines de défense contre les animaux herbivores spécifiques ou des invertébrés phytophages par exemple, et peut donc jouer un double rôle de stockage / défense (**Peumans et Van Damme, 1995 ; Yeh et al, 1997**).

Plusieurs arbres de légumineuses non seulement ont démontré l'apparition de VSP spécifique à écorce abondante, mais aussi conduit à l'identification de certains de ces VSP d'écorce.

La présente étude a été focalisée sur l'étude de l'effet protecteur des lectines extraites à partir de la plante *Punica granatum L* sur l'inflammation induite par LPS afin de voir s'il y a un bénéfice d'utiliser cet antioxydant raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

- Dosage de quelque paramètre biochimique

- Dosage de quelque paramètre de stress.

1. Définition des lectines

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon, 1998**). Cette classe des protéines est dénommée par Boyd en 1954, sous le nom «lectine» dérivée du mot latin «lectus» qui est le participe passé du verbe «légère», qui veut dire «sélectionner» ou «choisir» (**Liener et al., 1986**). Les lectines sont relativement petites, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD. Elles sont habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Ghopkins et Evrard, 2003**) Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses (**Liener et al., 1986**). Les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et de thymus. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés (principalement) par leur traitement thermique dont l'efficacité est fonction de la température et de la durée de traitement (**Meiteet al., 2006**). Bien qu'il existe des lectines thermorésistants (**Guillaume, 1993**). Quelques lectines importantes sont énumérées dans le **tableau 1**.

Tableau 01 : les lectines et leurs applications (Bothan et Weil, 2011)

Lectines	Exemple et commentaire
Lectine de légumes	ConcanavalineA, lectine de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces ou membranaires de cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricine
Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d'E.coli et toxine du choléra

Hémagglutinine de virus de la grippe	Responsable de l'attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectines animales se lient le B-galactose, elles ont des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice Extracellulaire

2. Historique

En 1888, P. H Stillmarka découvre la première lectine qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Doprat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes. **(Sharon and Lis, 2004)**... A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. Ensuite P. Ehrlichea découvre la même activité dans l'extrait du pois rouge (*Abrus precatorius*).

En 1919, James B. Sumner, de l'université Cornell (Ithaca, New York), isole à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) la première hémagglutinine pure, la concanavaline A **(Sumner, 1919)**. Il fallut patienter presque vingt ans et les travaux de Sumner et Howell en 1936 pour que la spécificité de ces protéines pour les sucres soit mise en évidence avec l'inhibition de l'agglutination de la concanavaline A par des saccharoses **(Sumner et Howell, 1936)**.

En 1954, Boyd & Shapleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné **(Boyd et Shapleigh, 1954)**. L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donné (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes.

Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines (Renato *et col.*, 1991)

Année	Auteur	Découvertes
1884	Warden & Waddel /Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d'Abrus Precatorius
1886	Dixson	Toxicité de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de Ricinus communis toxicité de la graine de Croton triglium
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d'Abrus Precatorius

1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'agglutination par la Chaleur
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavaleine A (Con A)
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes Sanguins
1947-9	Boyd & Reguera / Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes a Hémagglutinines

1949	Liener	Inactivation Thermique des hémagglutinines de Phaseolus vulgaris
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de Phaseolus vulgaris
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectines
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de Phaseolus vulgaris
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues

1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi&Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'Escherichia coli

3. La structure des lectines

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

3.1 Les lectines simples

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 40KDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (**Lenka, 2006**) (**figure 01**)

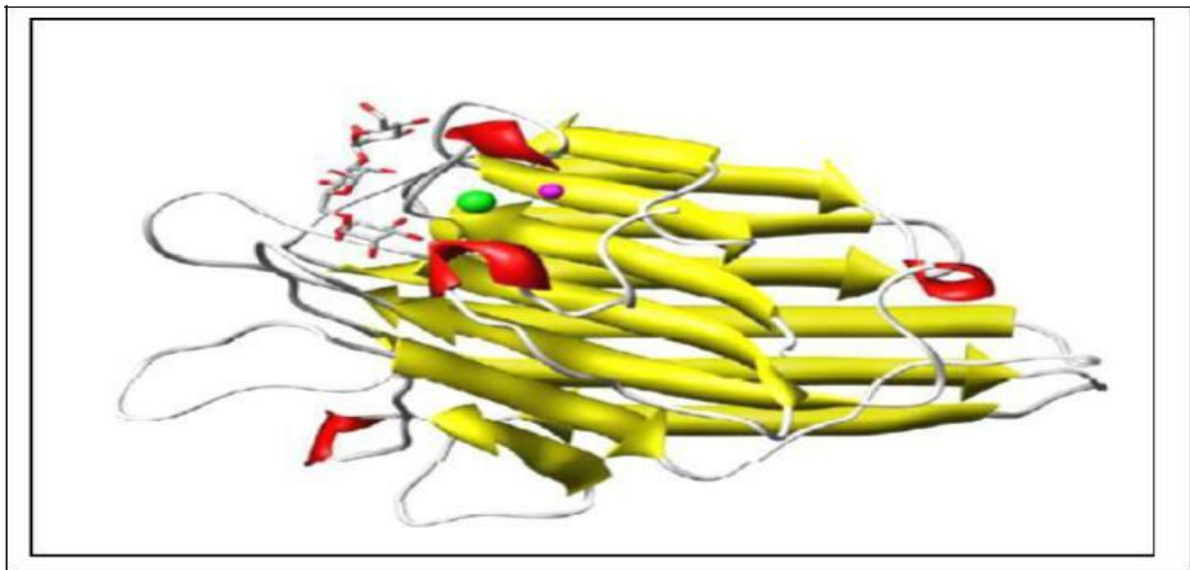


Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de canavaliaensiformis en complexe avec le tri mannoside (Lenka , 2006)

La protéine est représentée par un ruban rouge pour les hélices α , un ruban jaune pour les brins β et un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (Lenka,2006)

3.2 Les lectines en mosaïques

Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animale, virus) il s'agit de molécules complexe composée de plusieurs types de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al.*, 2006).

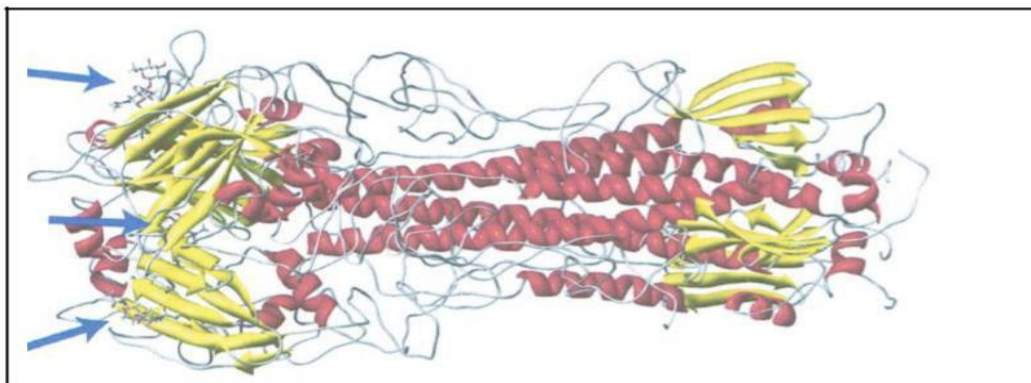


Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza

En complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

3.3 Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (Lenka, 2006) (Figure03).

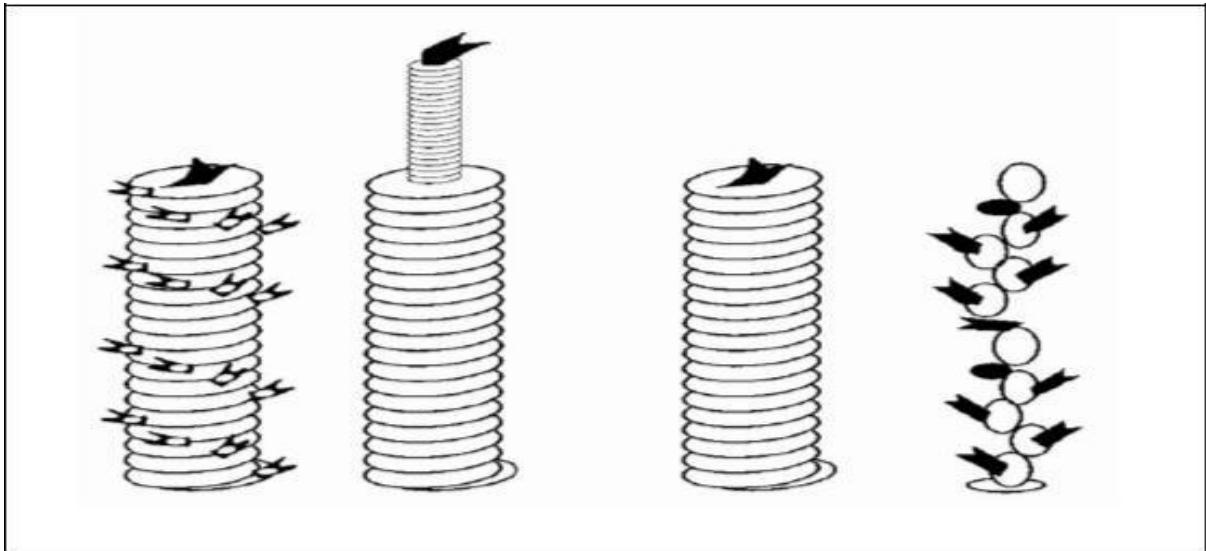


Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *d'Escherichiacoli*.

4. Les sites de liaisons des lectines

Le site de liaison d'une lectine est généralement constitué par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie pas beaucoup après la liaison du ligand. La lectine Interagit avec le ligand par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (Goldstein et Poretz, 1986). Les interactions de type salin ne sont généralement pas impliquées dans les interactions lectine-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide sialique (Pontet, 1996). Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone aux quels se lient (Gabius, 1985).

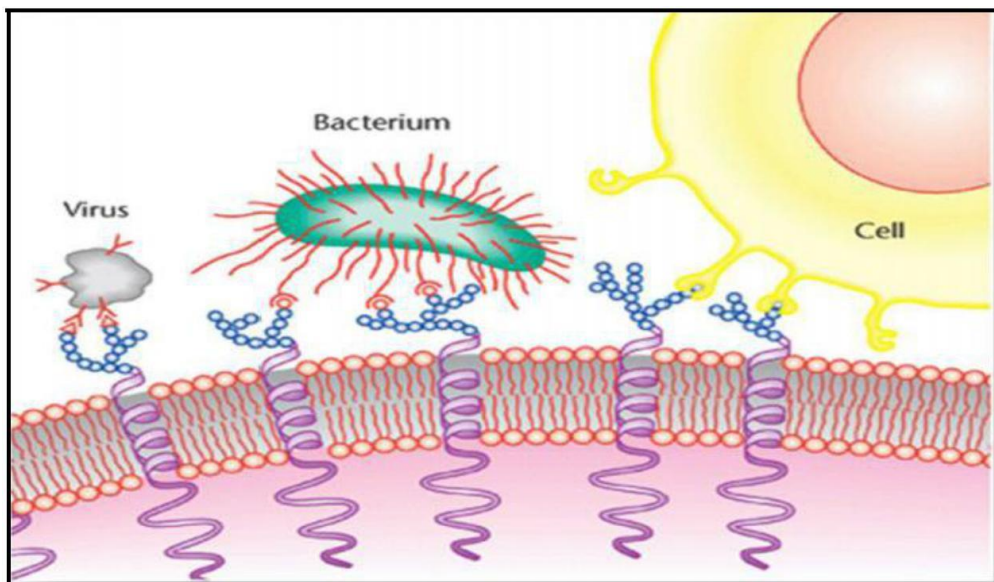


Figure 04 : Représentation schématisée d'exemples d'interaction lectines-glucides
(Sharonet Lis, 1993)

5. La spécificité et l'affinité des lectines

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (**Robert, 2008**). La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon, 2003**). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose (Gal)/N acetylgalactosamine (GalNAc), le N-acetylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acetylneuraminique, NeuAc) (**Lis and Sharon, 1998**). Cette reconnaissance est souvent désignée comme «la spécificité primaire» des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides. (**Dam and Brewer, 2002**)

Tableau 03 : La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines (**Renato et coll., 1991**)

Espèces	Spécificité
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adenia digitata</i>	Gal
<i>Aleuria aurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man >Glc

<i>Canavalia ensiformis</i>	Man >Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulex europaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordica charantia</i>	GalNAc
<i>Cytissuss essilifolia</i>	GlcNAc>Fuc>Gal
<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc

6. La Classification des lectines

6.1 Chez les animaux

a) Les lectines extracellulaires

Les lectines extracellulaires comprenant toutes les autres familles, comme les lectines de type C et R, ainsi que les galectines. Ces lectines sont généralement impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance des pathologies (**Chabrolet *al.*, 2012**).

b) Les lectines intracellulaires

Les lectines intracellulaires sont composées de quatre groupes ; les calnexines, les lectines de type M, P et L. ces lectines jouent des rôles essentiels dans le trafic intracellulaire, l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation (**Chabrolet al., 2012**).

6.2 Chez les végétaux

a) Les mérolectines

Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides, dit monovalentes (exemple : héveine, protéines d'orchidées), et ils sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, donc non agglutinantes (**PeumansetVan Damme, 1995**).

b) Les hololectines

Les hololectines sont des lectines di ou multivalentes c'est à dire ils contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi- identiques ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués et agglutiner les cellules. Elles présentent la majorité des lectines de plantes (exemple : ConBr la lectine de *Canavaliabrasiliensis*) (**Van Dammeet al., 1998**).

c) Les chimérollectines

Les chimérollectines sont des protéines de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique, car ils possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides, ainsi qu'un domaine avec une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison (**Van Dammeet al., 1998**). Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimérollectines se comportent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip ribosom inactivating proteine ; protéine inactivant les ribosomes comme la ricine) (**PeumansetVan Damme, 1995**).

d) Les superlectines

Les superlectines sont des oligomères poly-spécifiques constitués de plus de quatre monomères, elles sont considérées comme un groupe spécial de chimérollectines composé de deux domaines différents structurellement et fonctionnellement (**Van Dammeet al., 1998**).

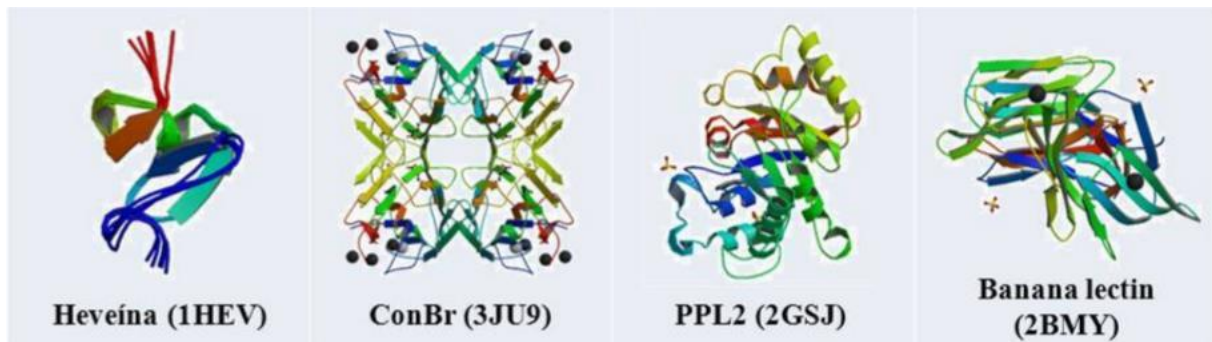


Figure 05 : La classification structurale des lectines des plants (Van Damme *et al.*, 1998).

7. Distribution des lectines dans le monde de vivant

Initialement décrites dans le règne végétal où elles sont particulièrement abondantes, notamment chez les légumineuses et les graminées, les molécules sont en fait des molécules universelles. Elles sont en effet largement répandues dans le monde vivant puisque l'on en rencontre même chez les virus et les bactéries. A titre d'exemple, le virus grippal présente des spicules d'hémagglutinine qui permettent son ancrage à la surface des cellules épithéliales de l'oropharynx. Des lectines sont également décrites chez les protozoaires tels que *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar*, on en rencontre même chez les animaux supérieurs, notamment chez l'homme où elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (BoucharaetTrouchin, 2003).

7.1 Les lectines animales

Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont les galectines, les lectines de type C et les sigles.

- Les structures de galectines sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le β -galactose et plus précisément pour le lactose (β Gal1-4Glc) et le Nacetyllactosamine (β Gal1-4GlcNAc) (Leffleret *al.*,2004).
- Les lectines du type C présentent un CRD (Carbohydrate Recognition Domain) bien conservé qui implique un atome de calcium dans l'interaction protéine-sucre (Drickamer,1993).

Les lectines de type-C sont soit en circulation dans le plasma, soit attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire. Un exemple de la structure 3-D d'une lectine du type C est la E-selectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somerset *al.*,2000) (Figure 06).

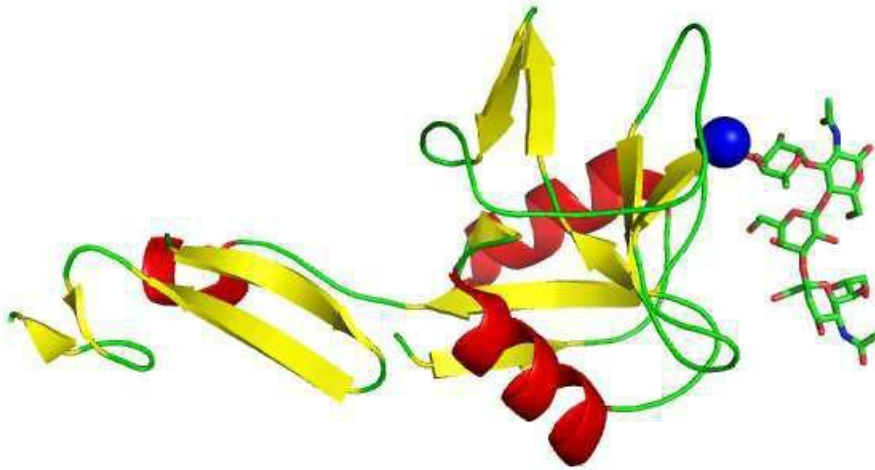


Figure 06 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somerset *al.*,2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

- Les *Sigles*, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent L'acide sialique (Crocker ,2002).
- Les autres classes de lectines animales comprennent les lectines du *type P* qui sont Formées par les lectines qui fixent le mannose-6-phosphate, comme la lectine bovine CDMPR (Robertset *al.*,1998). Les pentraxines qui sont une famille des lectines capables de se lier à des ligands de manière Ca²⁺ dépendante (Emsleyet *al.*,1994) La plupart des lectines des vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire (Aragao,2009).

Par exemple, dans le processus de fécondation, un glycoconjugué de la surface de l'ovule interagit avec une lectine (spermadhésine) du spermatozoïde (**Topfer-Petersenet al.,1998**)

7.2 Les lectines des plantes

Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanaviline A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (**Edelmanet al.,1972 ; Hardman and Ainsworth ,1972**)

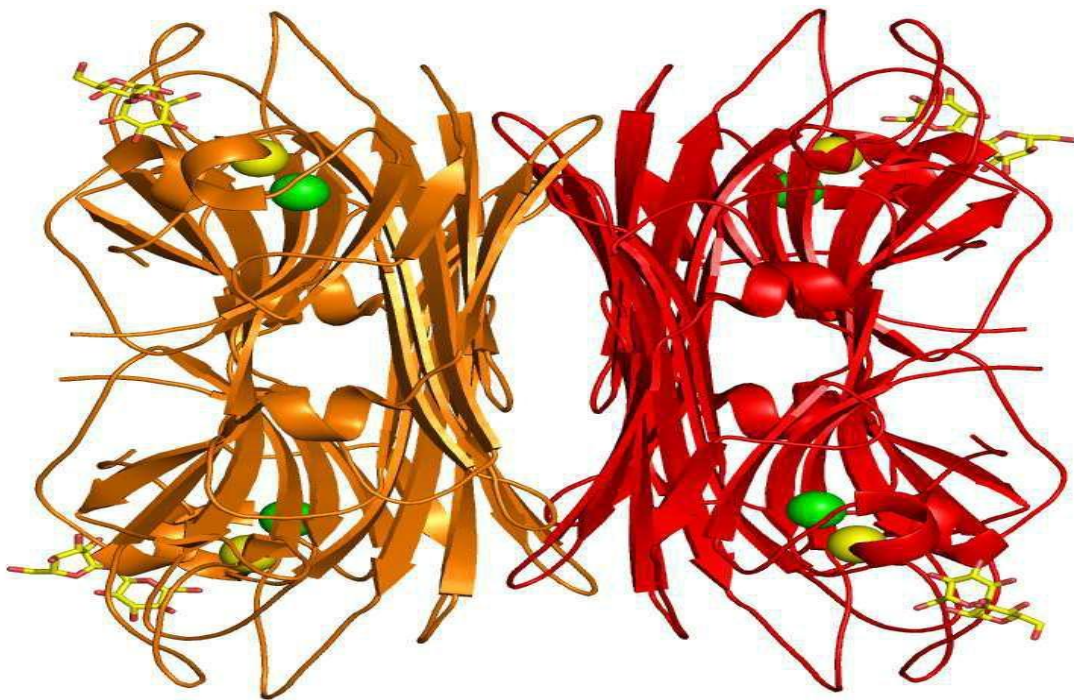


Figure 07 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec Letréhalose (code PDB 2CY6) (**Delatorre, et al.,2006**).

Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets

La famille des Monocotylédones présente des lectines spécifiques pour le mannose, la première structure 3-D a été la *Galanthus nivalis* agglutinine (GNA) (**Wright, C.S. and Hester ,1996**). La famille de Moraceae est formée par les lectines qui fixent le galactose telle que la jacaline isolée des graines de *Artocarpus integrifolia* (**Sankaranarayanan, et al.1996**).

La famille Amaranthaceae contient la lectine ACA de *Amaranthus caudatus* qui a été cristallisée -3GalNAc (Transueet *al.*, 1997).
avec le Gal \square 1

Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (Chrispeels and Raikhel, 1991 ; Rudiger and Gabius , 2001)

7.3 Les lectines des microorganismes

Les infections sont toujours initiées par l'attachement du microorganisme aux tissus de l'hôte. Ce phénomène implique la reconnaissance des cellules de l'hôte le microorganisme, et nécessite la présence à la surface des deux protagonistes de molécules complémentaires de type récepteur-ligand (BoucharaefTrouchin, 2003). Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (Imberty and Varrot, 2008 ;Sharon, 1996). L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue En complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (Weiset *al.*, 1990).

Les bactéries qui s'attachent aux surfaces s'agglutinent dans une matrice polymère hydrate qu'elles produisent, et donc forment un biofilm (Imberty, 2011). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriales (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles (Imberty *et al.*, 2005) *Entamoeba histolytica* est un parasite entérique qui peut tuer les cellules hôtes via un mécanisme dépendant du contact. Cet assassinat implique la protéine de surface amibienne dénommée le Gal / Gal Nac lectine se lie au galactose et au Nacétylgalactosamine permettant l'adhérence des amibes aux cellules hôtes (Boettner *et al.*, 2002).

Les lectines des champignons ont principalement des propriétés pharmacologiques intéressantes, par exemple la stimulation du système immunitaire contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (Sheet *al.*, 1998 ; Szeet *al.*, 2004).

8. Fonction biologique des lectines

8.1 Chez les plantes

Fonction dans l'élongation des parois cellulaires ; fonction de cofacteurs enzymatiques agissant avec des enzymes glycoprotéiques ; intervention dans le transport des glucides et dans leur mise en réserve dans les graines ; contrôle de la division cellulaire (mitogenicité) et de la germination ; intervention dans les processus de reconnaissance de cellule à cellule (**Etzler, 1986 ; Kaminski et coll., 1987**). D'autres études, suggèrent que les lectines favorisent l'invasion des plantes par des pathogènes en servant de récepteurs pour des phytotoxines, ou de molécules d'adhésion pour le pathogène. L'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogenèse (**Etzler, 1986**).

8.2 Chez l'homme

Les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Elles sont utilisées lors du test d'agglutination en pratique clinique pour distinguer les types du sang (A, B et O), exemple : la lectine de haricot de lima (*Phaseolus lunatus*) se lie à N-acétyl-D galactosamine et agglutine seulement des globules rouges de type A (**Gokeret al., 2008**). Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses présentent des propriétés anti-inflammatoires (**Alencaret al., 2005 ; Gomes et al., 2012**). Elles contrôlent les niveaux des protéines dans le sang (**Rydz et al., 2013**) car elles sont responsables au transport des protéines, peptides et les médicaments natifs (**Sutapa et Gopa, 2013**). Les lectines ont la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses, La récente découverte suggère que les cellules malignes sont plus facilement agglutinées par des lectines que les cellules normales. Ces agglutinations sélectives pourraient être utilisées dans le traitement du cancer (**Voet et Voet, 2005**).

9. Propriétés des lectines

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées :

9.1 L'interaction lectine–glucide

Les lectines sont toutes constituées d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique qui possède une plasticité et leur permet d'interagir plus spécifiquement avec certains glycoconjugués que d'autres (**Jainet *al.*, 2001**), ces glycannes interagissent par des liaisons non-covalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la lectine (**Jeyaprakash *et al.*, 2003**). La partie non glycanique des glycoconjugués peut également interagir avec les acides aminés avoisinant la cavité de reconnaissance (**Jeyaprakash *et al.*, 2003**).

9.2 L'agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans *et coll.*, 1995 ; Wang *et coll.*, 1998**).

9.3 L'activités mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Nachbar *et Oppenheim*, 1980 ; Falasca, 1989 ; Babosa, 2001**).

9.4 Effets mimétiques des hormones

Les lectines des graines d'haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), qui ont une haute réactivité avec les membranes cellulaires et leurs récepteurs peuvent mimer les effets des hormones. En effet, les lectines pures des graines de haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (**Greer *et coll.*, 1985**).

9.5 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses

Les travaux de **Valentier *et coll.* (2003)** suggèrent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme in vitro.

Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (**Poiroux, 2011**). Egalement ils inhibent leur migration (**Banwell, 1983**).

9.6 La propriété antivirale

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (**Wanget coll., 1998**). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolious* (**Lopez, 2003**).

9.7 La propriété antibactérienne

Les lectines sont des outils de régulation de la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (**TanneetNeyrolles, 2010**). Les lectines de type C résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (**Mukherjee et al., 2014**). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (**Zhanget al., 2012 ; Huang et al., 2014 ; Xu et al., 2014**)

9.8 Autres propriétés

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (**Nachbaret coll., 1980**), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes 1994**), les effets pros et anti inflammatoires (**Assreuy ,1997**), l'induction de l'apoptose (**Kulkarni, 1998**)

10.L'intérêt des lectines

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'évènements et fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis and Sharon ,1998**). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

10.1 En biochimie et protéomique

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps , cytokines , hormones , facteur de croissance , enzymes , récepteurs et même toxines et virus) pour les purifier (par affinité , une fois couplés à un support chromatographique) ;pour les détecter (une fois marqué par un fluorophore ou un une enzyme , immuno-blotting , immuno-précipitation ...) .Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique , peuvent ainsi être caractérisées quantitativement .(structure des complexe et interaction) . (**DOLE.A.et LINDEBERG. S. ,2005**)

10.2 Dans le domaine biomédical

a) Hématologie

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd and Sharpleigh, 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

b) Immunologie

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent et réutilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi, 2004**). Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques (**Jaffe, 1980**).

c) Biologie cellulaire

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, les structures, la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques (**Jaffe,1980**).

d) Cancérologie

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycannes présents sur les cellules (**Guillotetcoll., 2004**). **Kenoth et al (2001)** rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteurs pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

10.3 Dans le domaine agronomique

Les lectines peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans des cultures (**Murdocket coll., 2002**).

11. Le rôle des lectines dans l'immunité

Les lectines sont utilisées en immunologie par Paul Ehrlich au début des années 1890, comme antigène. Les changements morphologiques et biochimiques qui se produisent dans les lymphocytes stimulés par les lectines in vitro ressemblent à la plupart des réactions immunitaires provoqués par un antigène qui se déroulent in vivo (**Sharon, 1983**). Dans les cellules animales les lectines jouent un rôle dans la défense dans le cadre d'une réponse de l'immunité innée (**De Hoffet al., 2009**). Le système du complément, son activation peut être initiée par des complexes immuns (voie classique), par des oligosaccharides microbiens (voie des lectines) ou par divers composants de surface des pathogènes (voie alterne) (**Cavaillon, 2005**). La voie lectine est initiée par la fixation de diverses lectines, telles la MBL, sur des résidus glucidiques de membranes microbiennes, cette interaction permet de l'activation des protéases MASPS (MBL-Associated Serine Protéase) (**Ayméric et Lefranc, 2009**). La lectine liant le mannose (mannose binding lectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectine du complément qui joue un rôle dans l'immunité innée (**Rooset al., 2007**). Les invertébrés n'ont pas un système immunitaire adaptatif et les lectines jouent un rôle important dans leurs systèmes immunitaires innés en reconnaissant microbes ou agents pathogènes (**Kawsar et al., 2010**). La phagocytose se produit lorsque les microorganismes entrent en contact avec les membranes cellulaires des phagocytes. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytes grâce à l'existence de lectines de surface. Ces lectines reconnaissent des structures glucidiques présentes sur les glycoprotéines ou des glycolipides des membranes externes notamment bactériennes : récepteur de mannose – fucose, récepteur de galactose et récepteur de β -glucane (**Guénardet al., 2001**).

Chapitre II

Les médicaments anti-inflammatoire

1. Inflammation

1.1 Définition de l'inflammation

La réponse inflammatoire est une réponse adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé. Une régulation défectueuse peut engendrer des dommages irréversibles. Une réponse insuffisante conduit à une immunodéficience pouvant entraîner une infection secondaire ou même un cancer. Exacerbée, au contraire, elle augmente la morbidité et la mortalité dans des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le diabète. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme *via* la circulation sanguine. Elle peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès (**Nathan, 2002; Barton, 2008**). De nombreuses substances telles que LPS pouvant provoquer les réactions inflammatoires dans l'organisme.

1.2 Définition de LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est une endotoxine de nature glycolipidique représente la principale composante non protéique de la membrane externe des bactéries Gram négatif, il a les propriétés amphipathiques de phospholipides et remplit plusieurs fonctions. La plus haute importance est son rôle dans les zones semi-perméable, permettant seulement le passage de bas poids moléculaire et les molécules hydrophiles (**Trent *et al.*, 2010**).

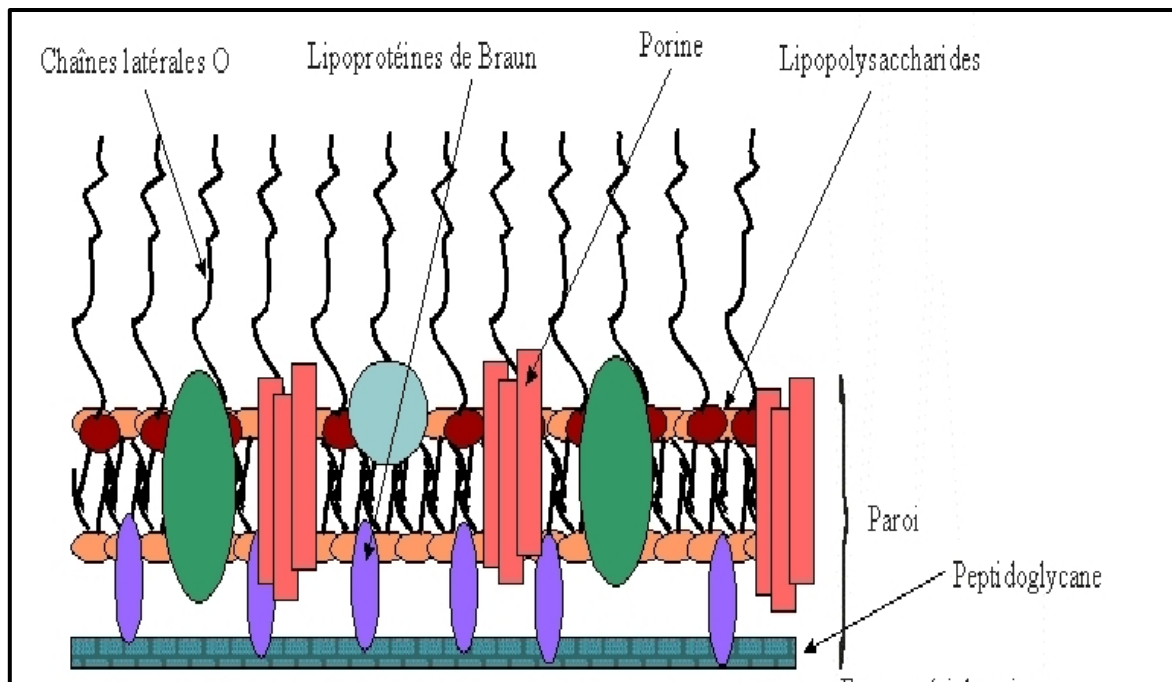


Figure 08 : la paroi des bactéries Gram négative

1.3 La Structure du LPS

Les LPS sont des complexes macromoléculaires organisés en trois domaines :

- **Le lipide A** : situé à la partie proximale du LPS et à l'intérieur de la bicouche lipidique, possède un caractère hydrophobe.
- **l'antigène O** : situé à la partie distale du LPS, de nature polysaccharidique, possède un caractère hydrophile.
- **le noyau** (ou « core ») de nature polysaccharidique : représente le pont entre les deux autres parties et est divisé à son tour en deux parties : le noyau interne plutôt hydrophobe et le noyau externe plutôt hydrophile (**Nikaido et Vaara, 1987**)

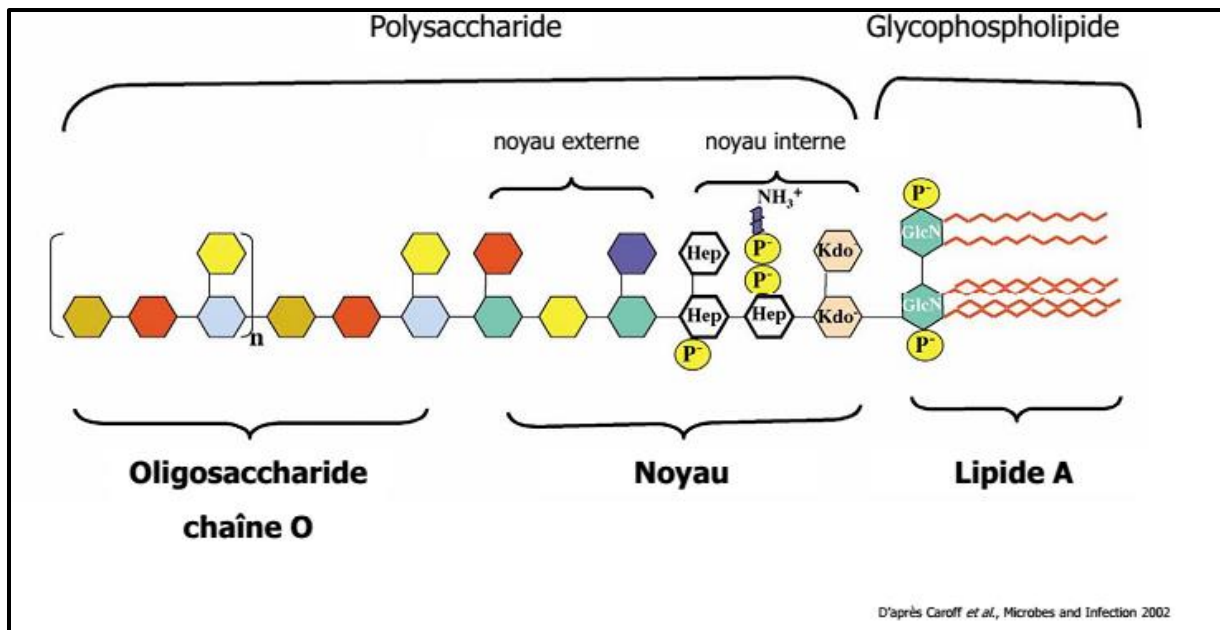


Figure 09 : structure schématique de la molécule de lipopolysaccharide

1.4 La Physiopathologie du LPS

Le LPS se lie au récepteur TLR4 et promeut la libération de cytokines pro-inflammatoires. Il induit chez l'homme des signes cliniques (hyperthermie, agrégation des hématies, choc septique – diminution de la pression artérielle). C'est la partie *lipide A* qui est considérée comme la plus toxique (action sur les granulocytes et les cellules épithéliales). Dans la recherche fondamentale, le LPS est beaucoup utilisé pour induire l'inflammation tel que l'induction de la cyclooxygénase 2 sur des cellules ou des organes en culture, généralement il est utilisé à une concentration de 0,1 mg·mL⁻¹.

2. Les anti-inflammatoires

2.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse. Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule. Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur

des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes. Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 (Barnes, 1998).

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la trans activation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire (Hanzen, 2003).

2.2 Anti-inflammatoire non stéroïdiens

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial. Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (figure 07). Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines (Nicolas *et al.*, 2001). Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier).

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères (**Blain *et al.*, 2000**).

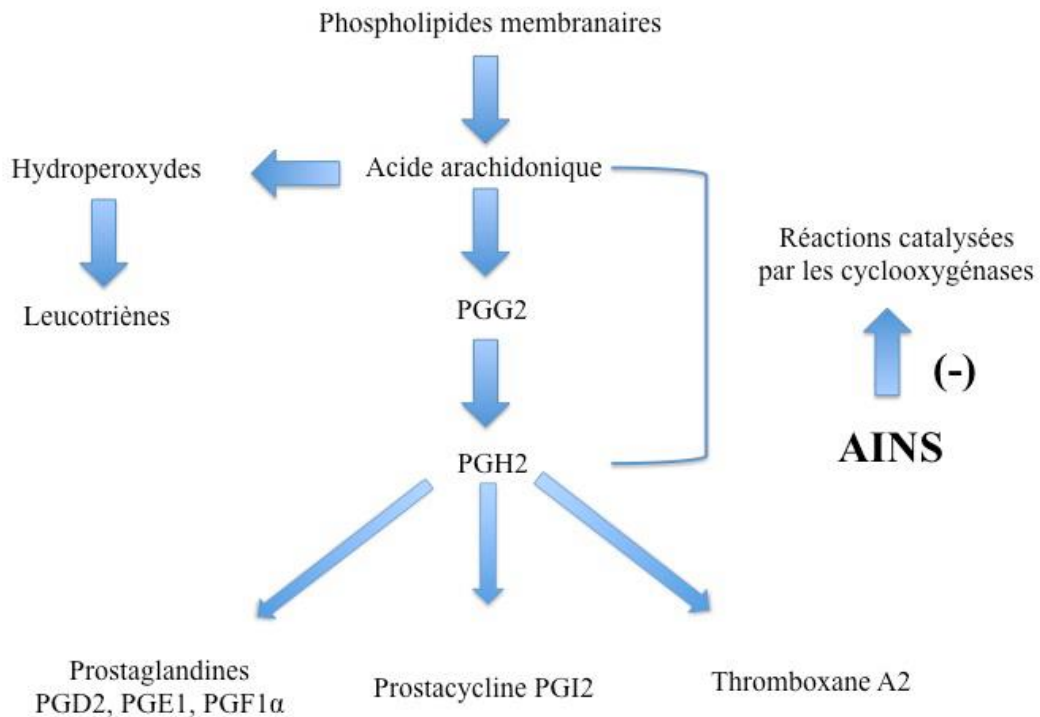


Figure 10 : Mécanisme d'action des AINS (Nicolas *et al.*, 2001).

- **Le choix d'un AINS : Le diclofénac**

1. **Les propriétés du diclofénac**

- Activité antalgique
- Antipyrétique
- Anti-inflammatoire
- Inhibition de courte durée des fonctions plaquettaires

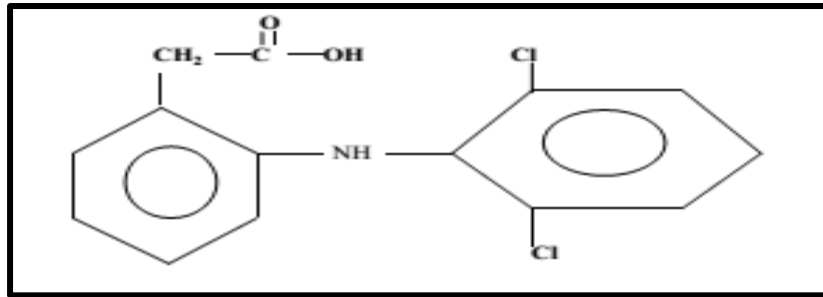


Figure 11 : Structure Chimique Formule du Clofenal ou Diclofenac (Schorderet, 1989).

2. La Pharmacocinétique du diclofénac

Les principales propriétés pharmacologiques du diclofénac sont :

- ***Absorption***

Le diclofénac comprimé est rapidement et totalement absorbé, les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes environ 2 heures après administration et se situent autour de 1.5 mg/l pour un comprimé à 50 mg et 0.8 mg/l pour un comprimé à 25 mg. L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps est approximativement le double de celle obtenue après une dose équivalente administrée par voie intraveineuse, ceci étant dû à un effet de premier passage, pour les suppositoires à 100 mg le pic de concentration est atteint au bout de 30 min

- ***Distribution***

La liaison aux protéines plasmatiques est de 99.7% de diclofénac et les concentrations de substance active sont élevées dans le liquide synovial que le plasma et restent pendant une période de 12 heures. Le diclofénac n'est pas détectable dans le lait maternel.

- ***Métabolisme et excrétion***

Le métabolisme du diclofénac comprend une conjugaison directe du médicament inchargé, ou une oxydation sur la position 3' ou 4' du noyau dichloro-phényl, ou alternativement en position 5 du noyau phényl rattaché au radical acide acétique. Un métabolite principal chez l'homme est le composé 4'-hydroxydiclofénac. La quantité

excrétée dans l'urine est d'environ 20 à 30 % de la dose. Trois autres métabolites constituent chacun 10 à 20 % de la dose excrétée dans l'urine et de faibles quantités de la dose excrétée dans la bile. Les conjugués du diclofénac se retrouvent dans la proportion de 5 à 10 % de la dose dans l'urine et moins de 5 % dans la bile. Environ 90 % d'une dose orale ou intraveineuse sont excrétés dans les premières 96 heures après l'administration .0.7 % de la dose sont excrétés dans l'urine sous forme de diclofénac inchargé et 5 à 10 % sous forme de diclofénac conjugué, 60 % de la dose sont excrétés sous forme de composés hydroxylés conjugués. La demi-vie d'élimination du médicament inchargé après administration orale se situe autour de 1 h 50 et sa clairance plasmatique est de 263 ml/min.

3. La Pharmacodynamie du diclofénac

Les effets du diclofénac reposent en grande partie sur l'inhibition des cyclooxygénases de types 1 et 2 (COX-1 et COX-2). Ces enzymes présentes partout dans l'organisme participent à la production des prostaglandines, qui sont d'importants médiateurs de la douleur, de la fièvre et des réactions d'adaptation et de protection de nombreux organes et tissus.

2.3 Les Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (**Barnes, 1998**).

Le choix d'un Anti-inflammatoires d'origine végétale : La plante Alenda (*Ephedra alata*)

1. La Description botanique d'*Ephedra alata*

La famille des *Ephedraceae* représentée par le seul genre *Ephedra* inclue environ 40 espèces dans le monde (**Evans, 2009**) . L'espèce *Ephedraalata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephedra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (**Al-Qarawi et al., 2011**). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Egypte et l'Arabie

(Ozenda, 1991). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert **(Ozenda, 1991).** Cette espèce, qui est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes, est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, à rameaux articulés et très ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre, portant au niveau des noeuds de petites feuilles opposées, alternant d'un noeud à l'autre. Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant **(Derbel et al., 2010).**



Photo 01: *Ephedra alata*

1.2.La Classification scientifique d’*Ephedra alata*

Tableau 04 : La classification scientifique d’*Ephedra alata*

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Gymnospermes
Classe	Gnetopsida
Ordre	Ephedrales
Famille	Ephedraceae
Genre	Ephedra
Espèce	<i>Ephedra alata</i>
Sous espèce	<i>Ephedra alata alenda</i>

1.3. Les Propriétés médicinales d'*Ephedra alata*

- ✚ En Egypte, *E.alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (**Nawwar et al., 1984**).
- ✚ En Arabie Saoudite, *Ephedra* est l'une des plantes de parcours les plus répandues. Elle a été utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par son arôme acceptable (**AL-Qarawi et al., 2012**).
- ✚ Au Maroc, *l'Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (**Ghourri et al., 2013**).
- ✚ En Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (**Ould El Hadj et al., 2003**).
- ✚ Les organes utilisés dans la médecine traditionnelle sont les tiges vertes séchées, qui sont usuellement bouillies dans de l'eau pendant environ trente minutes et administrées comme thé chaud (**Abourashed et al., 2003**).

1. Définition

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (**Durackova, 2008**).

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant » (**figure 12**). Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers » (**Baskin et al., 1994 ; Barouki , 2006 ; Jenkins et al., 2007**). Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus (**Kehrer , 1993 ; Barouki , 2006**). D'autres chercheurs ont dit que le stress oxydant désigne un état caractérisé par une augmentation de la génération des ROS (reactive oxygen species) en ajoutant que ce terme est synonyme du dommage (**Kehrer, 1993**). Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels (**Durackova, 2008**) et à des dégâts cellulaires irréversibles (**Pincemail et al., 1999 ; Abuja et al., 2001**)».

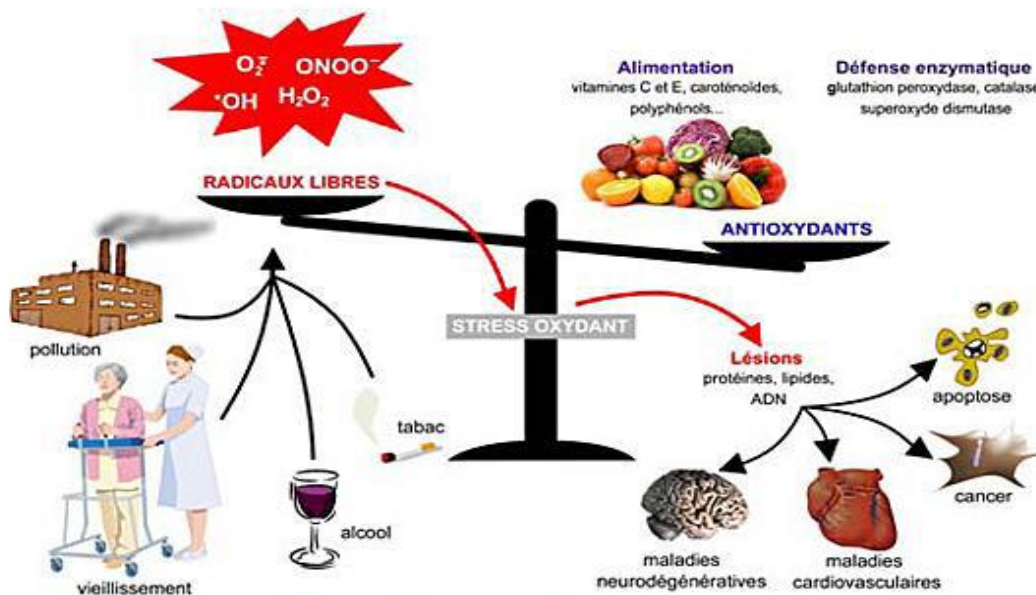


Figure 12 : Stress oxydant (Durackova, 2008)

2. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène représente, après l'azote, le deuxième élément le plus abondant dans l'atmosphère (21%). Il a été caractérisé en 1772-1774 par Lavoisier, un chimiste français. L'oxygène est un élément indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien

supérieure à celle de la molécule d'O₂. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O₂^{°-}) ou le radical hydroxyle (HO[°]) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂) (Simonian and Coyle, 1996 ; Garrel *et al.*, 2007). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H₂O₂ qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue. La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{°-}) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité (O₂^{°-}) permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques. Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO[°]) ou surtout le radical hydroxyle (HO[°]), sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition. Cependant, en présence du cuivre cuivreux ou du fer ferreux, le H₂O₂ peut se décomposer en HO[°] et HO[°] selon la réaction de Fenton. Le radical HO[°] a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation (figure 13) (Favier, 1997).

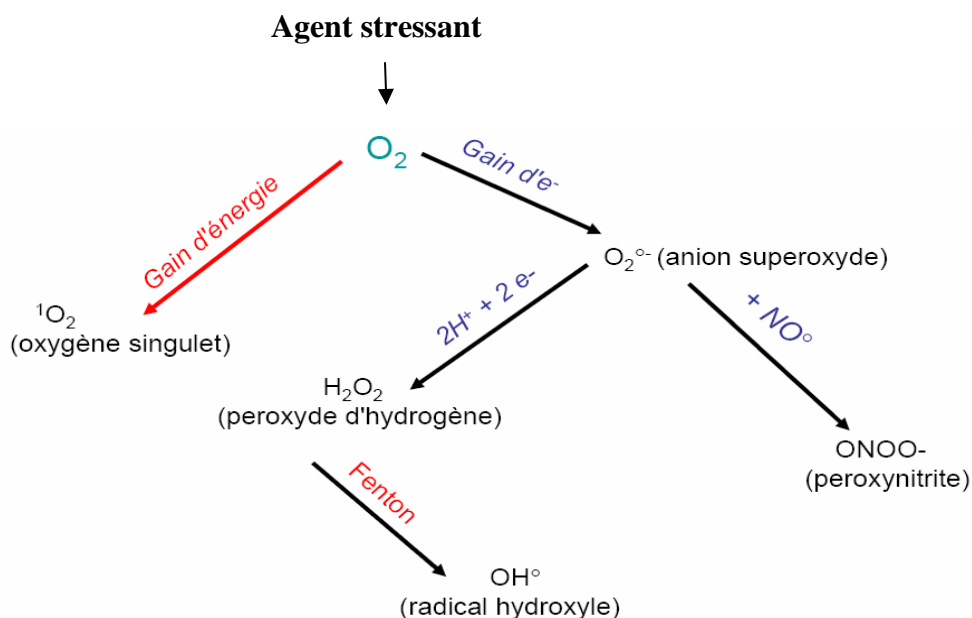


Figure 13 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (**Favier, 2003**).

3. Les cibles biologiques du stress oxydant

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile (**Pincemail, 2003**). La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme (Sies, 1991). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (**Gutteridge, 1992 ; Curtin et al., 2002**).

3.1 Les lipides

Les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives surtout le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$), entraînant l'arrachement d'un hydrogène de l'acide gras (LH), ceci aboutit à la formation d'un radical diène conjugué, qui après addition avec l'oxygène moléculaire donne le radical peroxyde (LOO°). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et former un hydroperoxyde (LOOH), c'est la phase « Propagation » de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés « phase de Terminaison » par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes (**Esterbauer et al., 1992 ; Beaudoux et al., 2003 ; Favier, 2003**) (**figure 14**). Ou, continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très

réactifs, pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonéal (4-HNE), qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, ces deux derniers produits (MDA, 4-HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule (Marnett, 1999).

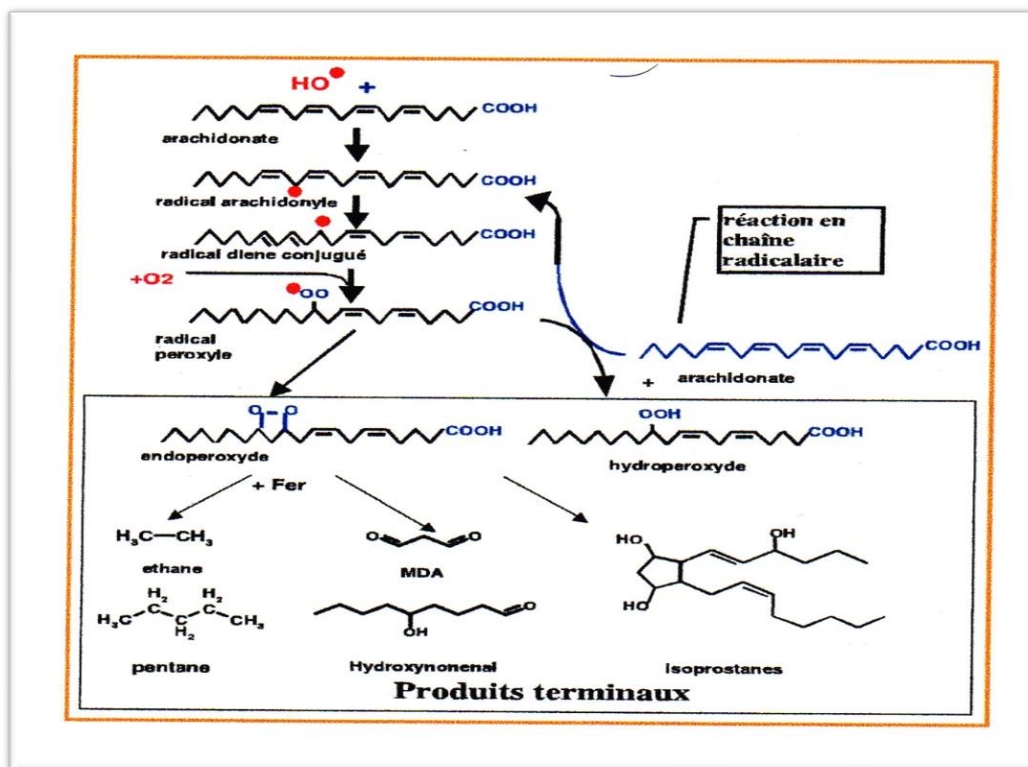


Figure 14 : Réactions de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

3.2 Les protéines

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible des réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications, ces modifications provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans les protéines. Ces réactions d'oxydations, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu²⁺ et le Fe²⁺ (Levine, 2002). Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories : D'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique. Et d'autre

part, les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidiques comme le 4-HNE. Ces changements sont-elles qui conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique, ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002) (figure 14). Les protéines comportant un pont sulfhydrique sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, c'est le cas de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH) (Sen, 2001). Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées et participent à la restauration de la fonction de ces protéines (Welch, 1992). Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide, et la synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig and Nosek, 1997).

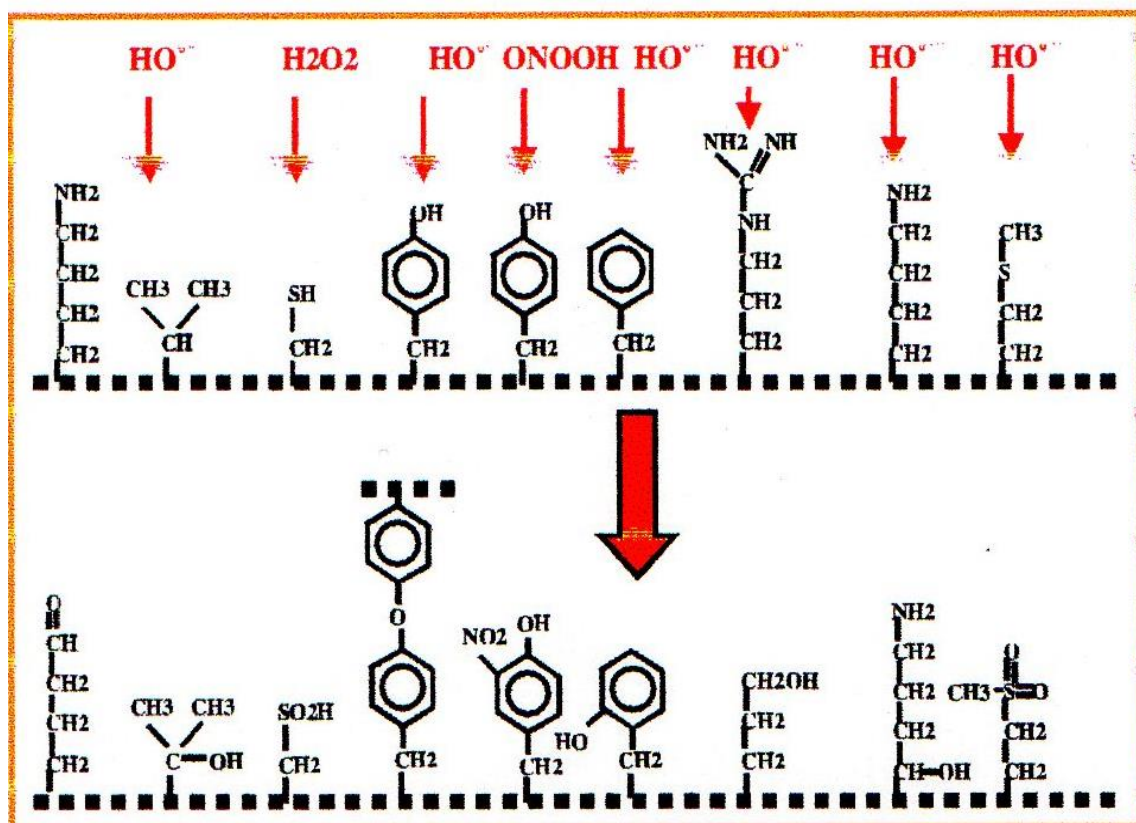


Figure 15 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

3.3 Les acides nucléiques

L'ADN nucléaire et ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS, du fait sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale (Stevnsner, 2002).

Les réactions d'oxydation de l'ADN créant un grand nombre de dommages de l'ADN, et on peut noter quatre classes principales des dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG (qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN), les pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéines (figure 16) (Hayakawa *et al.*, 1991). Les bases puriques sont plus sensibles aux ROS (surtout l' $^{\circ}\text{OH}$ et le peroxy-nitrite), en particulier la guanine (base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas), qui est facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces systèmes sont défectueux, La 8-OHdG s'accumulera au sein de l'ADN (Cadet, 1999). Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999 ; Nair *et al.*, 1999).

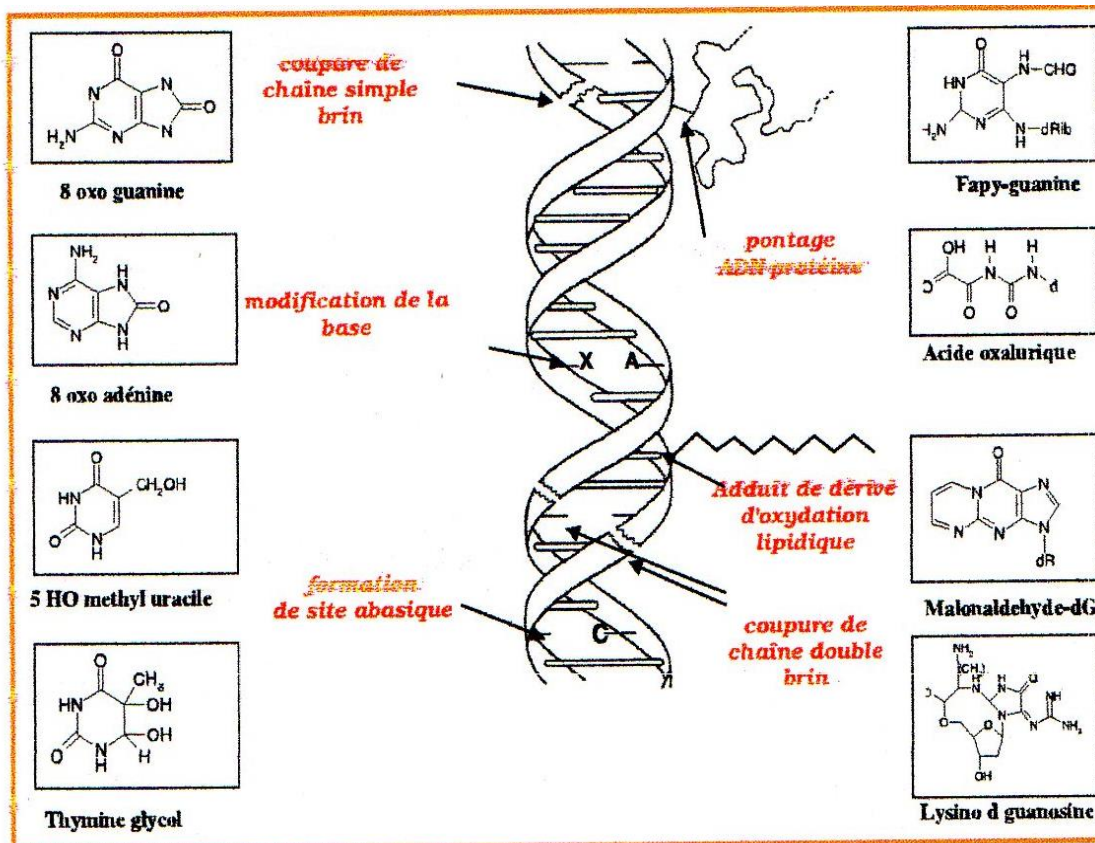


Figure 16 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (**Favier, 2003**)

4. Le stress oxydant et les pathologies

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (**Bonnefont- Rousselot et al., 2001 ; Sohal et al., 2002 ; Delattre et al., 2005**).

Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme : le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré. Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer (**Montagnier et al., 1998**).

Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'antioxydant peut retarder, prévenir l'apparition de telles maladies. De même, des études (**Holzenberger et al., 2003 ; Delattre et al., 2005**) ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses antioxydantes, d'une augmentation de la production des ROS, et d'une diminution des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Une étude épidémiologique (**Bonnefont-Rousselot, 2001**) a montré très clairement que la consommation régulière des antioxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition d'un stress oxydant et ces maladies.

5. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (**figure 16**). La nature des systèmes antioxydants diffère

selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (**Goudable et Favier, 1997**).

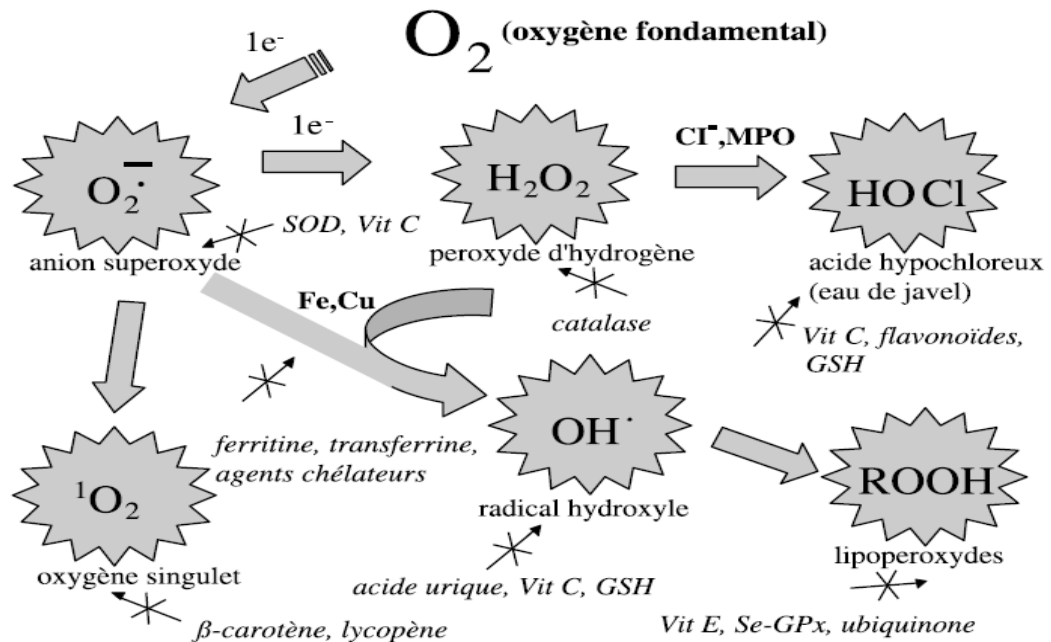


Figure 17 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes (**Milbury et Richer et al., 2008**).

5.1 Les systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, (I) la superoxyde dismutase (SOD), (II) la catalase (CAT) et (III) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du O₂^{-•} et du H₂O₂, conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

a) La Superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (**Zelko et al., 2002**).

b) La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

c) Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :

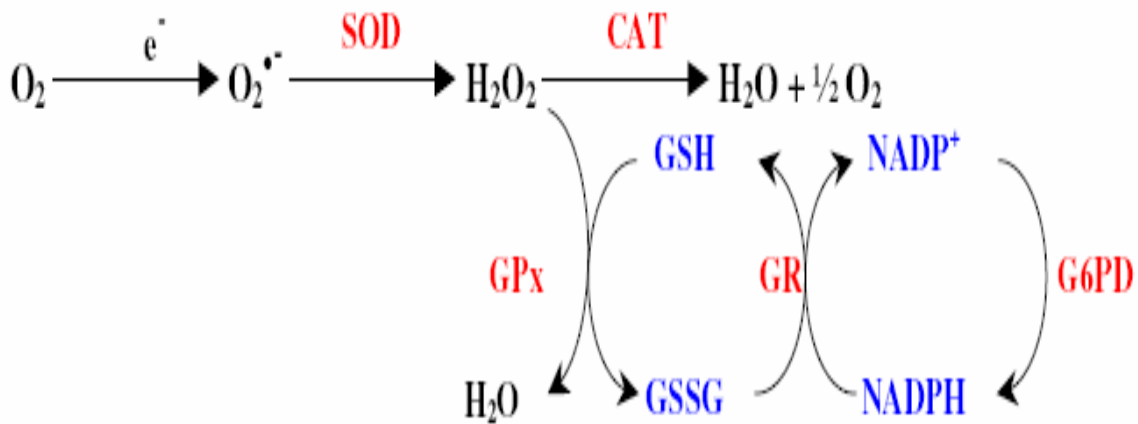


Figure 18 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (Piquet et herbuterne, 2007).

5.2 Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le Cytochrome C et les vitamines E et C (**Favier, 2003**).

5.2.1. Le Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamine E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Packer et al., 1997 ;Power and Lennon, 1999**). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (**Ji et al., 1992**).

5.2.2. La Vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂ (**Singh et al., 2005**).

5.2.3. La Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL

produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Singh et al., 2005**)

5.2.4. Les métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines sont des protéines intracellulaires de faible poids moléculaire (6000-7000 Da) (**Kagi, 1993**). Ils possèdent une composition spéciale d'acides aminés. En effet, elles ne possèdent pas d'acides aminés aromatiques dont le tiers des résidus sont des cystéines servant comme ligand aux métaux. La synthèse des MTs est induite par des facteurs divers, tels que les métaux, les glucocorticoïdes et les radiations ionisantes (**Cherian, 1995**). Les MTs sont supposées jouer des rôles physiologiques multiples, incluant la détoxification des métaux potentiellement toxiques (Pb, Cd, Ni...), la régulation des métaux essentiels à l'état de trace, tels que le zinc, le cuivre et le chrome et la participation dans les systèmes cellulaires de défense antioxydante (**Diana, 1999**). A cause de leur teneur élevée en groupements sulfhydryques, les MT peuvent réagir avec les radicaux libres ERO et les électrophiles (**Lazo et Pitt, 1995**).

5.2.5. Le Sélénium

Le sélénium est un antioxydant. Ce terme caractérise un ensemble de substances ou de composés, de nature diverse, dont la caractéristique commune est d'être capable de s'opposer ou de contrôler l'accumulation au niveau cellulaire de radicaux libres. Cette propriété leur permet d'agir en tant que moyen de défense contre les dérivés actifs de l'oxygène. Ils s'opposent aux mécanismes d'oxydation de certaines molécules. Certains micronutriments, comme les vitamines (E, C, bêta-carotène) et oligo-éléments (zinc, sélénium) ont une activité antioxydante et sont donc susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de protection contre la production de métabolites de l'oxygène actif. Le sélénium intervient dans l'activité du système enzymatique protecteur, la glutathion peroxydase qui accélère la transformation des radicaux libres et des peroxydes lipidiques en métabolites non-toxiques (**Galan et al., 1997**)

5.2.5.1. Les Principales formes chimiques du sélénium

Le sélénium est présent dans la nature et les organismes animaux et végétaux sous des formes organiques et inorganiques. Les formes organiques sont la sélénométhionine et la sélénocystéine ; les formes inorganiques sont les sélénite, séléniure, sélénate et l'élément sélénium .alors que la forme dominante dans la nourriture quotidienne et les fourage est la sélénométhionine, associée à des quantités plus négligeables de sélénocystéine et sélénite, les formes usuelles de complémentation orale sont le sélénite de sodium, le sélénate de sodium, le sélénate de potassium et le sélénate de baryum (**Graham, 1991**).

5.2.5.2.Les sources alimentaires du sélénium

Le sélénium est essentiellement apporté par les poissons (30 à40µg pour 100g), les coquillages et les crustacés (30à50µg pour 100g). les viandes (5à20µg pour 100g). Les œufs (20µg pour 100g) sont également une excellente source de sélénium. En revanche, les fruits et les légumes des sources très pauvres (**Whitin et al., 2002**).

5.2.5.3.Le métabolisme du sélénium

Le sélénium est un micronutriment essentiel pour la majorité des espèces animales y compris l'homme. Il est nécessaire à de nombreuses enzymes en particulier l'hème oxydase et la glutathion peroxydase, impliquées dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif (**Lanchli, 1993**).

- **L'absorption du sélénium**

L'absorption du sélénium se fait principalement dans le duodénum chez les ruminants par un transport actif, grâce à une pompe à sodium. Différents éléments peuvent influencer son absorption : le soufre, le plomb et l'arsenic diminuent le taux d'absorption du sélénium ; il en est de même pour le Fe^{3+} qui précipite avec le Se pour former un complexe non assimilable par les entérocytes. Les formes inorganiques comme le sélénite de sodium et le sélénate de sodium sont absorbés respectivement à 62% et 94% chez les monogastriques. Toutefois, les sélénates ont une excrétion urinaire 6 fois plus élevée et qui se produit 3h plus tôt que celle des sélénites (Thomson et Robinson, 1986). Les formes organiques telles que la sélénométhionine et la sélénocystéine sont respectivement absorbées à 81% et 86% et excrétées à 13,9% et 5,8% chez le rat (Lebreton et al, 1998). Chez l'homme, la

sélénométhionine est mieux absorbée que les composés 34 minéraux (80% contre 50%) et elle entraîne une augmentation du taux de Se sanguin supérieure à celle observée avec des quantités équivalentes de sélénite (**Dubois et Belleville, 1988**).

- **Le Transport du sélénium**

Les formes solubles du sélénium sont redistribuées dans tout l'organisme à partir du duodénum (**Graham, 1991**). Chez le rat, une protéine plasmatique contenant de la sélénocystéine a été identifiée comme étant une protéine « transport » de sélénium : la sélénoprotéine P. Sa concentration varie directement avec la concentration alimentaire en sélénium lorsque celle-ci est supérieure à 0,1 mg/kg d'aliment. D'après Underwood et Suttle (**2004**) suggère que cette protéine joue un rôle antioxydant.

Les formes organiques traverseraient mieux les membranes érythrocytaires que les formes ioniques. Le sélénium se lie aux globulines, albumines et autres protéines non spécifiques (**Lebreton et al., 1998**). Les mécanismes de transfert du sélénium à l'intérieur des cellules sont encore peu expliqués. D'après Graham (**1991**), le transfert placentaire du sélénium est corrélé positivement au statut sélénié de la mère. La concentration hépatique est plus élevée chez le fœtus que chez la mère tout au long de la gestation (**Hidiroglou et al. (1994)**).

- **La Distribution du sélénium**

Le sélénium est ensuite distribué dans les tissus cibles (rein, foie, muscles, os, rate, pancréas, Poumons) selon des mécanismes encore inconnus.

- **L'élimination du sélénium**

La voie urinaire est la voie d'excrétion majoritaire. D'après **Lebreton et al. (1998)**, elle représente 60% de l'excrétion lors d'apport satisfaisant en sélénium. La sécrétion biliaire en sélénium peut atteindre 28% des apports. Bien que la majorité soit réabsorbée, le reste contribue significativement aux pertes fécales endogènes. D'après **Lebreton et al. (1998)**, 35% environ de l'excrétion a lieu via la bile. La plus grande partie en est réabsorbée. Par ailleurs, le sélénium injecté par voie parentérale s'accumulerait principalement dans le foie et serait excrété de manière importante par la bile. Ainsi la quantité de sélénium excrétée par voie fécale est corrélée à la quantité de sélénium ingérée (**Underwood et Suttle, 2004**).

5.2.5.4. Les formes actives du sélénium

Le sélénium n'est pas actif en tant qu'élément simple mais au sein du site actif de certaines enzymes. Il y est toujours incorporé à partir de la sélénocystéine, via un transfert spécifique d'ARN dont le mécanisme n'a pas encore été étudié. L'enzyme la plus connue, que nous étudierons en premier lieu, est la glutathion peroxydase, découverte en **1957 par Gordon C. Mills (Vichtel, 1998)**.

- **La glutathion peroxydase**

Quatre sont répertoriées : la glutathion peroxydase cellulaire (GPX1), la glutathion peroxydase plasmatique (GPX2), la glutathion peroxydase capable de neutraliser les hydroperoxydes phospholipidiques (GPX3) et la glutathion peroxydase présente au niveau gastro-intestinal (GPX4). Une cinquième a récemment été découverte. Chaque glutathion peroxydase utilise le glutathion comme substrat au cours des réactions dans lesquelles elles interviennent, d'où leur nom. Leur rôle est de catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en molécules inertes ou de réduire des hydroperoxydes phospholipidiques membranaires. Le tableau suivant représente les différentes sélénos-enzymes, leur localisation et leur rôle (**Underwood et Suttle, 2004**).

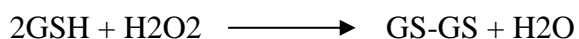
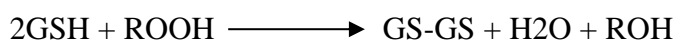
Tableau 05 : Récapitule les différentes sélénos-enzymes, leur localisation et leur rôle, s'ils sont connus (**Underwood et Suttle, 2004**)

Nomenclature	Sélénoprotéine	Principales localisations	Fonction
GPX1	GSH peroxydase cytosolique (GPX)	Cytosol, érythrocytes	Stockage, antioxydant
GPX2	GPX plasmatique	Plasma, reins, poumons	Antioxydant extracellulaire
GPX3	GPX phospholipidique	Membranes intracellulaires	Antioxydant intracellulaire
GPX4	GPX gastro-intestinal	Muqueuses intestinal	Antioxydant des muqueuses

5.2.5.5. Le rôle biologique du sélénium

La glutathion peroxydase est une métallo-enzyme de 84000 Daltons, constituée de 4 sous unités identiques de 21000 Daltons. Chaque sous-unité possède un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine. Cette dernière est un analogue de la cystéine dans laquelle l'atome de soufre a été remplacé par un atome de sélénium.

La GPx, localisée dans les mitochondries et le cytoplasme, catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes lipidiques :



La glutathion peroxydase constitue le système enzymatique anti-oxydant principal, elle protège ainsi les cellules des mammifères contre le stress oxydatif.

Le sélénium joue un rôle fondamental en tant que cofacteur biologique de la glutathion peroxydase dans la lutte contre les radicaux libres. Le glutathion est capable de piéger et de neutraliser la plupart des radicaux libres et leurs effets toxiques. Chez l'homme, le sélénium sous forme de sélénocystéine constitue le site actif de la glutathion peroxydase cette enzyme localisée à la fois dans le cytosol et les radicaux libres en présence de glutathion réduit (**Wichtel, 1998**).

- **Le Rôle du sélénium dans la réponse immunitaire**

Le sélénium se conduit comme un modulateur de la production de médiateurs de l'inflammation. Lors de carences, la production de prostacycline antiagrégante et vasodilatatrice est diminuée au profit du thromboxane A₂ proagrégant et vasoconstricteur. La complémentation en sélénium inverse cette tendance (**Lebton et al, 1998**).

Lors de carences en vitamine E et sélénium, une supplémentation en ces deux éléments (l'un et/ou l'autre) induit une potentialisation de la réponse en anticorps. D'autre part, le sélénium

intervient sur l'immunité en stimulant la migration des cellules phagocytaires, la phagocytose et la réactivité des lymphocytes (**Finch et al, 1996**).

- **Autres rôles du sélénium**

Le sélénium est capable de former des complexes avec certains métaux comme l'argent, le mercure, le cadmium etc. ces complexes jouent un rôle dans la détoxification de ces métaux mais ils rendent le sélénium moins disponible.

Le sélénium est également un oligoélément indispensable pour la croissance de certaines cellules in vitro (**Dubois et Belleville, 1988**).

5.2.5.6. Le stress oxydant et le sélénium

Le sélénium joue un rôle fondamental dans le système de protection cellulaire. En effet, le statut en sélénium est corrélé à la capacité antioxydante tissulaire (**Brigelius-flohe et coll., 2003**). Le sélénium est capable de moduler à la fois la teneur des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase ou la thioredoxine réductase ainsi que leur activité respective. Par ce biais, il est impliqué dans les défenses cellulaires endogènes contre les divers hydroperoxydes produits dans certaines situations physiologiques ou physiopathologiques (**Papp et coll, 2007**).

Chapitre 4

La grenade (*punica granatum*)

1. Historique

Le grenadier (*Punica granatum L.*) est un des fruits comestibles les plus anciens, il a été utilisé intensivement dans la médecine populaire de nombreuses cultures (LI et al., 2006).

La grenade est le fruit du grenadier (*Punica granatum L.*). Ce petit arbre buissonnant est originaire de bassin méditerranéen, d'Asie Occidentale et du Moyen-Orient, où il est cultivé depuis 5000 à 6000 ans. Son nom est dérivé du latin « granatum » qui signifie « fruit à grain » (QA INTERNATIONAL COLLECTIF, 1996). Ces arbres fruitiers sont aujourd'hui cultivés un peu partout dans le monde, sous les climats chauds et secs (CALIN et al., 2005).

2. Production de grenade

2.1 Production de grenade dans le monde

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 ha, dont plus de 76% sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA). Cependant, l'Espagne, l'Égypte, et Israël ont une superficie comprise entre 16 000 et 2 400 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés (Quiroz, 2009). D'autres pays pratiquent également cette culture notamment Afghanistan, Pakistan, Arménie, Géorgie, Tadjikistan, Jordanie, Italie, Tunisie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre et Grèce (Melgarejo et al., 2012).

2.2 La production de grenade en Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petites jardins en Kabylie, on ne connaît que leur

appellation locale (Lahlou, Elmouze...). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat (tableau 01) (INRAA,2006)

Tableau 06 : Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie. (INRAA,2006)

Variétés de grenadier commercialisées en Algérie		
Messaad	Corda travita	Doux de Kolea
Gajin	Sefri	zemdautomne
Spanish duoy	Chelfi	Moller huesso
Mellisse	Sulfani	
Espagne rouge	Papers shell	

3. Description botanique

La grenade est le fruit d'un arbuste appelé grenadier, de nom latin *Punicagranatum* L. appartenant à la famille des punicacées (*Espiard, 2002*). La grenade est le fruit du grenadier qui est un petit arbre ou un grand arbuste (2 à 7 m de hauteur). Le tronc est recouvert d'une mince écorce grise ; se ramifie irrégulièrement en branche plus ou moins épineuses et hérissées, portant des feuilles caduques et lancéolées en spires (**Boullard, 1997 ; Iserin, 2001**). Ses feuilles sont simples, lancéolées et peuvent mesurer de 3 à 8 cm de long. Ses fleurs de couleur rouge orangées sont très ornementales. Son fruit, la grenade, est une baie qui possède une peau lisse dont la couleur varie du jaune doré au rouge. La taille de la grenade est comparable à celle d'une pomme. Cette baie renferme de nombreuses petites graines rouges contenues dans des loges, séparées par des membranes au gout amer. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit (**Wald, 2009**). Le poids des grenades varie généralement selon l'origine et le cultivar entre 163 et 216g. De point de vue botanique, le fruit de grenadier se compose de 3 parties : l'épiderme (écorce), les arilles et les pépins. La proportion de l'épiderme qui est la partie extérieure du fruit représente 28 à 32% du poids total du fruit, alors que le taux en graines varie de 55 à 60% du poids total du fruit (**Oukabil et al., 2004**).



Photo 02 : Grenade et ses nombreuses graines (Wald, 2009).

4. Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum* L. a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Cette classification encore adoptée est décrite dans le tableau 02. (Spichiger et al.,2009).


Tableau 07 : Classification botanique du grenadier (Spichiger et al.,2009)

Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Punicaceae (Lythraceae)</i>
Genre	<i>Punica granatum</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i>

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel végétale

Notre étude a été réalisée sur une plantes médicinales :

 *Punica granatum*

2. Les méthodes

2.1 La Préparation des plantes :

- ✓ **Lavage** : les racines ont été bien rincées avec l'eau et débrassé de toute impureté.
- ✓ **Séchage** : les racines des plantes ont été séchées à température ambiante pendant 7 jours.
- ✓ **Broyage** : les racines ont été coupées, puis ils sont broyés dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre.

2.2 L'extraction des plantes

2.2.1 Le principe

C'est une opération visant à récupérer des substances hydrosolubles à partir de la poudre de plantes à l'aide d'une solution Tampon.

2.2.2 La Technique d'extraction

9g des poudres obtenues à partir des 2 plantes ont été mises dans des flacons contenant chacune 30ml solution tampon (0.01M pH=7.4) (**annexe 1**) pendant 24h. Après la centrifugation de la suspension à 6000tr/min pendant 30min, le surnageant est récupéré et conservé pour la réalisation des tests souhaités.

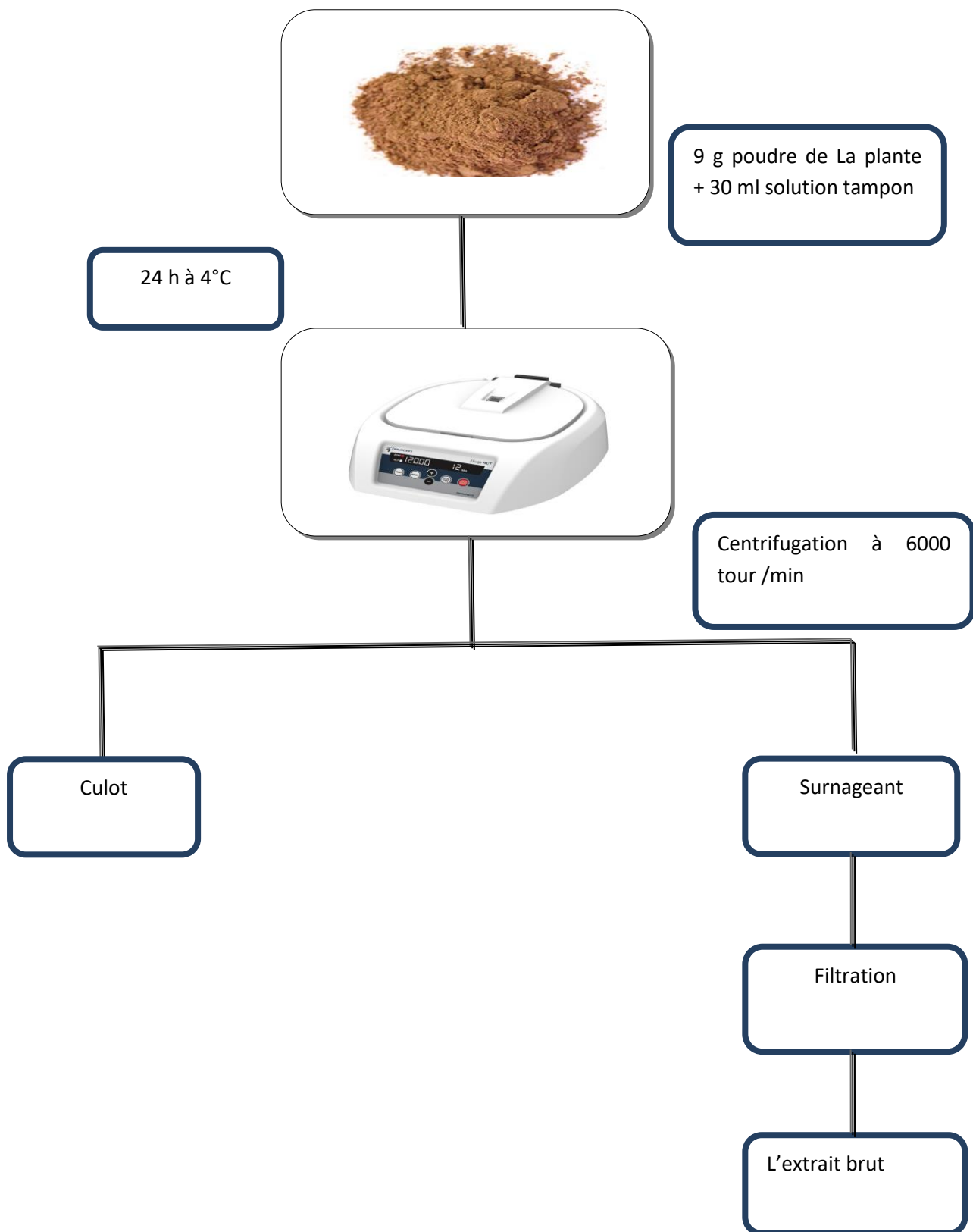


Figure 19 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes.

Ensuite l'extrait brute a été lyophilisée et conserves pour faire l'étude in vivo.

3. Matériels et méthodes des tests biologiques

L'objectif de cette partie a été focalisé sur l'étude de l'effet protecteur des lectines extraite a partir une plante médicinale sur l'inflammation induite par LPS afin de voir s'il ya un bénéfice d'utiliser cet antioxydant.

3.1 Matériel biologique et conditions d'élevage

Nous avons utilisé 40 rats blancs *Rattus* de la souche *Wistar*, provenant de l'animalerie de l'université frère mentouri Constantin 1, d'un poids vif moyen de 220 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle. Les rats sont élevés dans des cages en plastique qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le tableau 08.

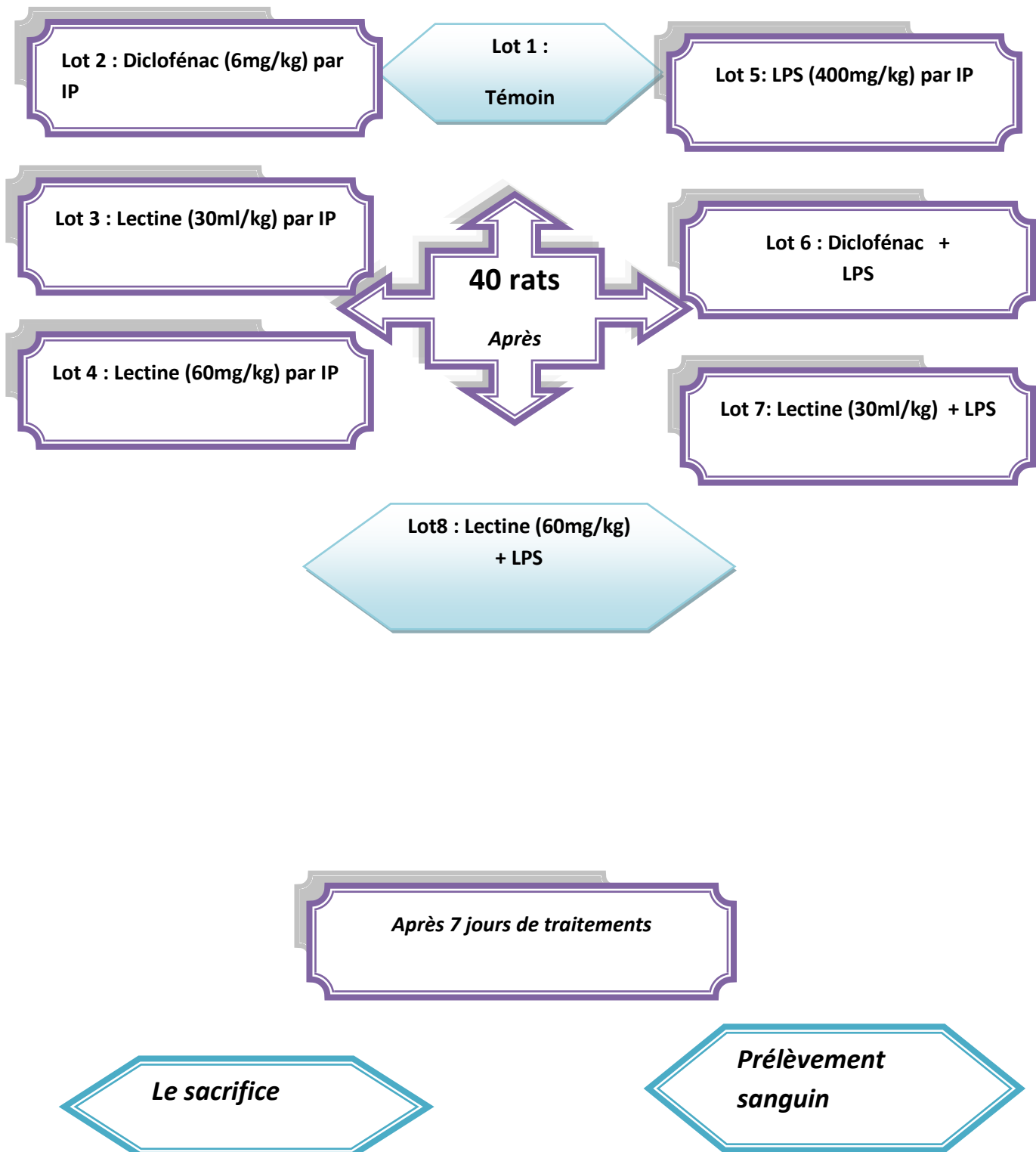
Tableau 08 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upreti *et al*, 1989).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
<i>Mais</i>	420	42
<i>Soja</i>	260	26
<i>saccharose</i>	210	21
<i>Huile</i>	20	2
<i>Son</i>	60	6
<i>VMV</i>	30	3

3.2 Traitement des rats

Le figure 20 illustre les différentes étapes du protocole expérimental :

Protocole de travail



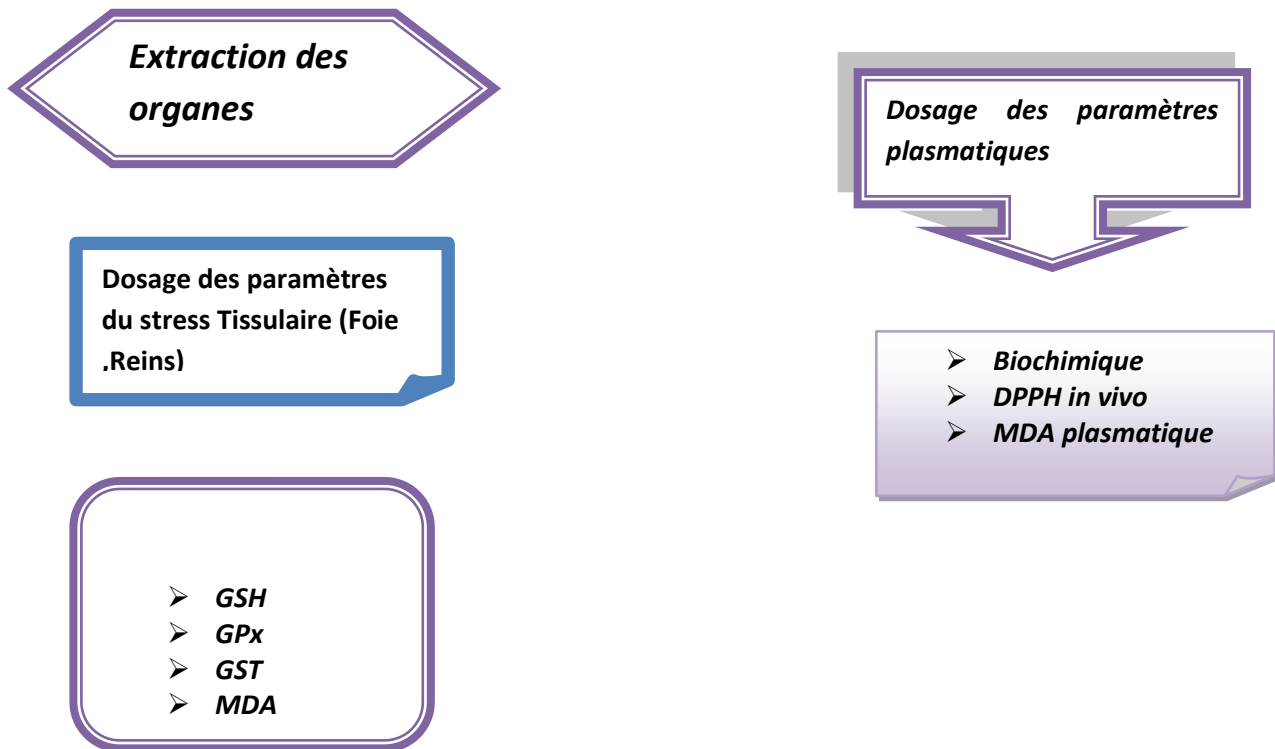


Figure 20 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

3.3 Les Méthodes de dosage

3.3.1. Dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques ont été accompli au sein d'un laboratoire d'analyse médicale à Annaba à l'aide d'un automate analyseur sanguin automatisé.

3.3.2. Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique

Le dosage des TBARs permet d'estimer le niveau de la peroxydation lipidique. Le principe de ce dosage repose sur la liaison en milieu acide (PH=2à3) et chaud du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un pigment rosé, le complexe MDA-(TBA)₂ qui absorbe à une longueur d'onde 532nm (**Richard *et al.*, 1992**) (**Annexe 02**).

3.3.3. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique

- Dosage de radical DPPH in vivo

La capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Hasani et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications, en se basant sur le même principe que celui du test de DPPH effectué précédemment *in vitro* (**Annexe 02**).

3.3.4. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire

➤ Préparation de l'homogénat

0.5g de foie et des reins des différents groupes étudiés, à été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le tampon phosphate (0.1M, PH =7.8). On a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (5000 tours/min, 4°C, 15min). Puis le surnageant obtenu est aliquote dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

- **Dosage du glutathion**

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de Wekbeker & Cory (1988) (**Annexe 02**).

- **Dosage de Malondialdéhyde (MDA)**

Le MDA put etre détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique(TBA). La détection du MDAissue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3ou4 double liaison peroxydées, contitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'ésterbauer *et al* (1992) (**Annexe 02**).

- **Dosage de la glutathion peroxydase (GSH-Px)**

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH- Px) a été mesurée par la méthode de Flohe and Gunzler (1984) (**Annexe 02**).

- **Dosage de la glutathion-S-transferase (GSTs)**

La mesure de l'activité des GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraine la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340nm de l'ongeur d'onde, La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de Habig *et al* (1974) (**Annexe 02**).

- **Dosage de la catalase**

L'activité catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode de Aebi (1984) à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde (H₂O₂) (**Annexe 02**).

- **Dosage des protéines tissulaire**

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu (l'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines) (**Annexe 02**).

4. Analyse statistique :

Les résultats sont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type (X±SEM). La comparaison entre les différents groupes est effectuée par le test t de student.

a1 : Différence significative comparant au témoin (P≤ 0,05).

a2 : Différence hautement significative comparant au témoin (P≤ 0,01).

a3 : Différence très hautement significative comparant au témoin (P≤ 0,001).

b1 : Différence significative comparant au lot traité par LPS (P≤ 0,05).

b2 : Différence hautement significative comparant au lot traité par LPS (P≤0,01).

b3 : Différence très hautement significative comparant au lot traité par LPS (P≤0,001).

P : seuil de signification.

Résultat et Discussion

1. Influence du traitement sur les variations des paramètres biochimiques sériques

1.1 Résultats

L'analyse de la concentration sérique de l'urée révèle l'existence d'une augmentation très hautement significative (LPS, DIC/LPS) et non significative (Lec (30mg/kg)/LPS , Lec (60mg /kg/LPS) par rapport le lot témoin. cependant, on constate une diminution très hautement significative chez les lots traités par Dic/LPS, Lec (30mg/kg)/LPS et Lec (60mg /kg/LPS par rapport le lot traité par LPS seul.

Les résultats montrent aussi que la concentration sérique d'acide urique a augmenté de façons très hautement significative (Dic/LPS, LEC (30mg/kg)/LPS) et non significative (lec (60mg /kg/LPS) en comparaison au lot témoin. Par contre, on observe une diminution très hautement significative chez les lots traités par Dic/LPS, Lec (30mg/kg)/LPS et Lec (60mg /kg/LPS par rapport le lot traité par LPS seul.

L'évolution de la créatinine sérique fait apparaître une augmentation très hautement significative , significative et non significative chez les lots traités par DIC/LPS, Lec(30mg/kg)/LPS et Lec (60mg /kg/LPS respectivement par rapport le lot témoin. Par contre, on constate une diminution très hautement significative (Lec(30mg/kg)/LPS et Lec (60mg /kg/LPS) et significative (Dic/LPS) par rapport le lot traités par LPS seul (**Fig.20**).

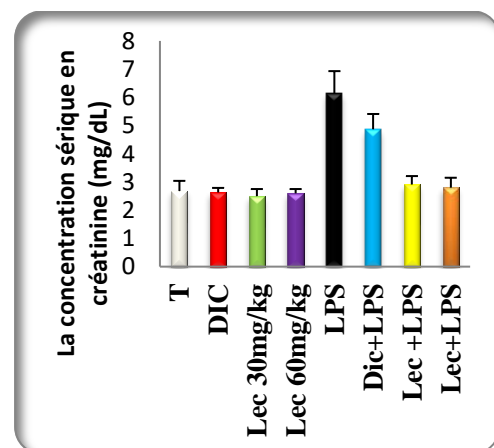
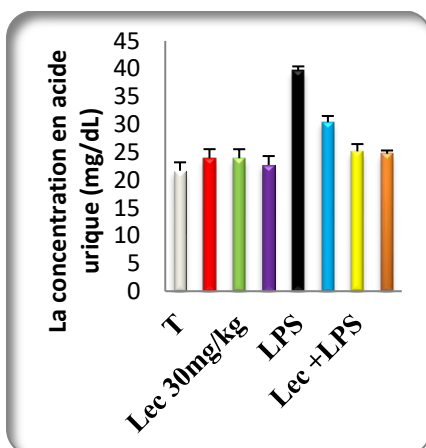


Figure 21 : Variation de la concentration sérique de l'urée, créatinine, acide urique, chez le lot témoin et les lots traités par LPS ;Dic/LPS ;Lec(30mg/kg)/LPS ;Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement

1.2 Discussion

Dans nos conditions expérimentales, l'administration intrapéritonéale de 400µg/kg de poids corporel de LPS pendant 7 jours chez les rates *Wistar*, a perturbé les paramètres biochimiques, en effet, nous avons remarqué l'augmentation de la concentration sérique de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique chez les rates traitées au LPS par rapport aux témoins (**Joshi *et al.*,2010**). L'augmentation des taux sériques en de l'urée et de la créatinine chez les rats contaminés est considérée comme un biomarqueur de la dysfonction rénale et les dommages rénaux provoqué par cette substance (**Peixoto *et al.*, 2007 ; Ekor *et al.*,2010**). Urée et la créatinine ce sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (**Cempel et Janicka, 2002**).

De plus, L'augmentation de la concentration sériques de l'acide urique dans notre étude peut expliquer par la dégradation intense du matériel génétique (ADN et ARN) (**Liao and Freedman, 1998; Waisberg *et al.*, 2003**) .Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres, dont il augmente la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique qui prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à méditer des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant (**Becker *et al.*, 1993**).

Toutefois chez les rats traitées au LPS associé au Diclofénac on note une diminution de la concentration d'urée, créatinine et l'acide urique, ceci est la cause de l'effet du médicament qui protège le rein contre l'effet néfaste de LPS ou il augmente les processus de défense cellulaire vis-à-vis les effets cytotoxiques du stress oxydant induit par LPS et réduise la production des radicaux libres (**Deepmala *et al.*, 2013**).

La diminution de la concentration plasmatique de urée, créatinine et acide urique après la supplémentation de Lectine avec LPS peut être expliquer par l'améliorations du fonctionnement rénale. Une réduction de ces paramètres conduit à penser soit à l'amélioration des changements rénaux chez les rats traités par LPS, soit à la diminution du catabolisme des paramètres rénaux par le biais des flavonoïdes .

2. Influence du traitement sur les variations de l'activité sérique de quelque marqueur enzymatique

2.1 Résultats

Les résultats illustrés dans la **figure 22**, montrent une augmentation statistiquement non significative dans l'activité enzymatique de AST et LDH chez le lot traité par LPS et les trois lots de combinaison par rapport au témoin. Aussi on note une diminution non significative chez les lots traités par Dic/LPS, Lec (30mg/kg)/LPS et Lec (60mg /kg/LPS par rapport le lot traité par LPS seul.

L'activité enzymatique de ALT et PAL a montré une élévation très hautement significative (LPS, Dic/LPS) et non significative (Lec (30mg/kg)/LPS et Lec (60mg /kg/LPS) par rapport le lot témoin. On revanche, l'administration de lectine et le diclofénac, pourrait réduire d'une façon très hautement significative les niveaux de cette activité enzymatique par rapport le lot traité par LPS seul.

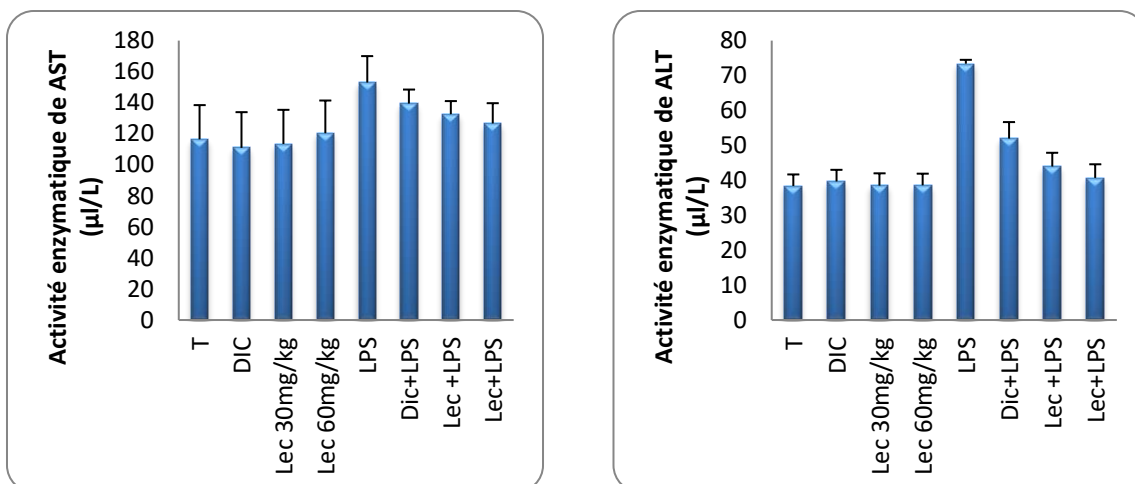


Figure 22 : Variation de l'activité enzymatique de AST, ALT, chez le lot témoin et les lots traités par LPS ;Dic/LPS ;Lec(30mg/kg)/LPS ;Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement

2.2 Discussion

Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité des transaminases (AST et ALT) et PAL dans le sérum des rattes traitées au LPS. L'augmentation de ces enzymes indique une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma dû à l'altération de la perméabilité membranaire causé par LPS, ces résultats sont en accord avec les travaux de Deepmala (2013).

L'administration de Diclofénac a atténué l'hépatotoxicité induit par LPS, comme il est montré par les revenus des activités d'ASAT, ALAT et PAL à leurs niveaux normaux proches chez les rattes témoins .l'effet précité indique clairement que diclofénac peut offrir la protection en se stabilisant la membrane cellulaire dans les désordres hépatiques induit par le LPS.

Le traitement par les lectines de la plante à améliorer l'activité des enzymes transaminases (AST, ALT et PAL) chez les rats traités au LPS, cette résultats peut être expliquer par la présence des antioxydants dans la plante qui probablement stabiliser la membrane cellulaire hépatique et protéger les hépatocytes contre les effets toxiques de LPS qui peut diminuer la fuite des enzymes vers le plasma. Il a été noté que lectine de la plante entraine une diminution significative des taux plasmatique des paramètres hépatique et possède un effet préventif contre les dommages hépatique. Ces résultats en accord avec les travaux de **necib et al (2013)**.

3. Influence du traitement sur la capacité antioxydant plasmatique

3.1 Résultats

Les résultats illustre dans (**Fig.22**) présentent une diminution très hautement significative, hautement significative, significative et non significative de DPPH chez les lots traités par Dic/LPS, Lec (30mg/kg)/LPS et Lec (60mg /kg/LPS respectivement par rapport le témoin. En revanche, on constate une augmentation très hautement significative chez tous les lots de traitement par rapport le lot traité par LPS seul.

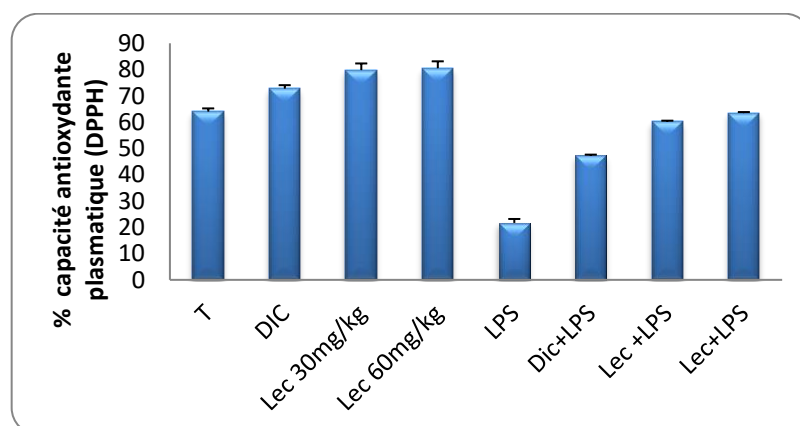


Figure 23 : Variation de la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis DPPH chez le lot témoin et les lots traités par LPS ; Dic/LPS ; Lec(30mg/kg) /LPS ; Lec(60mg/kg) /LPS après 7 jours de traitement

3.2 Discussion

Les résultats obtenus montrent que la capacité du plasma à absorber les radicaux libres, représentant le pouvoir antioxydant total (DPPH) est significativement abaissée chez les rats traités par LPD comparées aux rats témoins. Le DPPH est un test qui consiste à évaluer la capacité que possède le plasma à inhiber la production d'espèces oxygénées réactives générées par un système *in vitro*. Le plasma renferme de nombreuses substances antioxydantes dont certaines sont connues (glutathion réduit, protéines à groupements thiols, acide urique, bilirubine.....), alors que d'autres ne sont pas clairement identifiées (**Halliwell et Gutteridge, 2007**). Plusieurs méthodes ont été développées pour LPS le pouvoir anti-oxydant total du plasma dû à l'ensemble de ces substances (**Prior et CAO, 1999**). La réduction de celui-ci est associée à une profusion des hydro peroxydes plasmatiques chez les rats traités par LPS, marquant l'existence d'un stress oxydatif évident.

4. Influence du traitement sur les variations des paramètres du stress oxydant

4.1 Résultats

Notons aussi, une diminution non significative de la concentration rénale et hépatique du GSH chez tous les lots de traitement par rapport le témoin, et une augmentation non significative chez tout le lot de traitement par rapport le lot traité par LPS seul.

Cependant, on note une diminution très hautement significative de l'activité enzymatique du GPx rénale et hépatique chez les lots de traitement par rapport le témoin. En revanche, on note une augmentation significative de cette activité en comparant au lot traité par LPS seul.

D'autre part, nous enregistrons une augmentation hautement significative de la concentration plasmatique rénale et hépatique de MDA chez les lots traités par rapport le témoin. En revanche, on constate une diminution significative de cette concentration en comparant au lot traité par LPS seul.

De plus, on note une diminution très hautement significative dans l'activité enzymatique de GST et catalase rénale et hépatique par rapport le témoin. Par contre, on note une augmentation hautement significative dans cette activité comparant au lot traité par LPS seul.

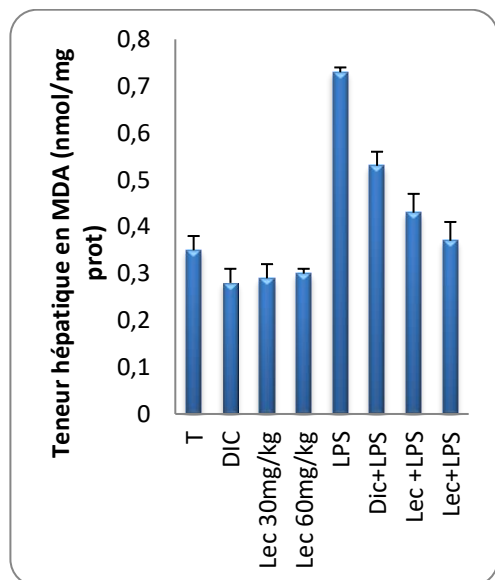
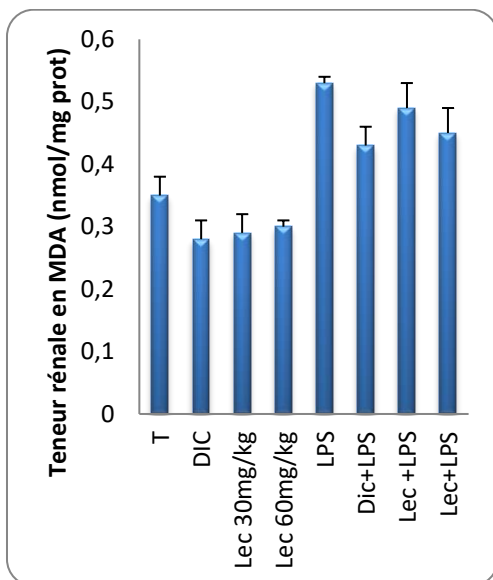
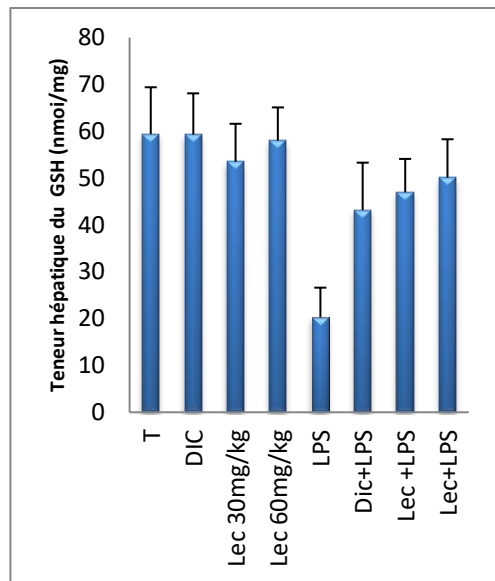
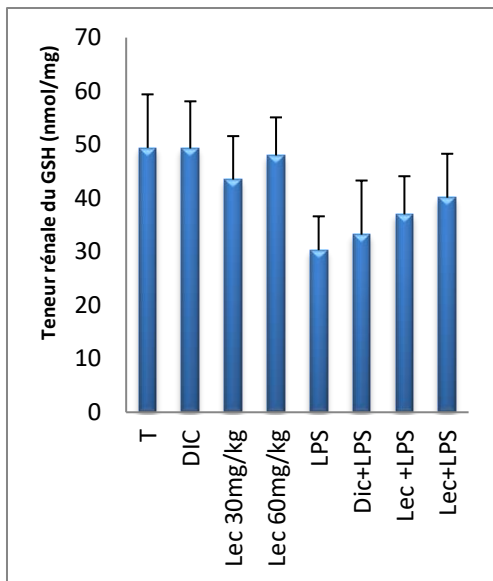
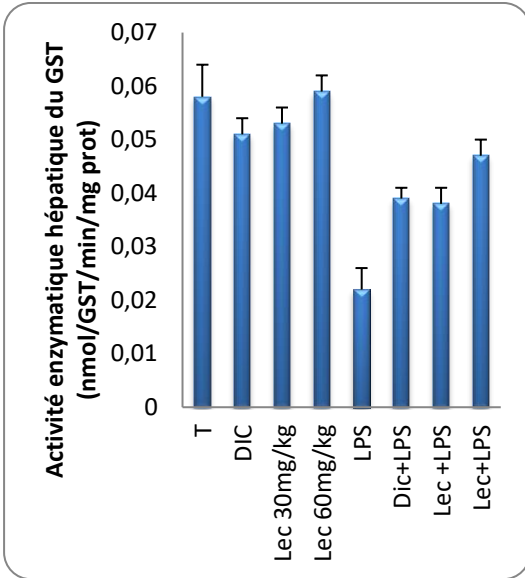
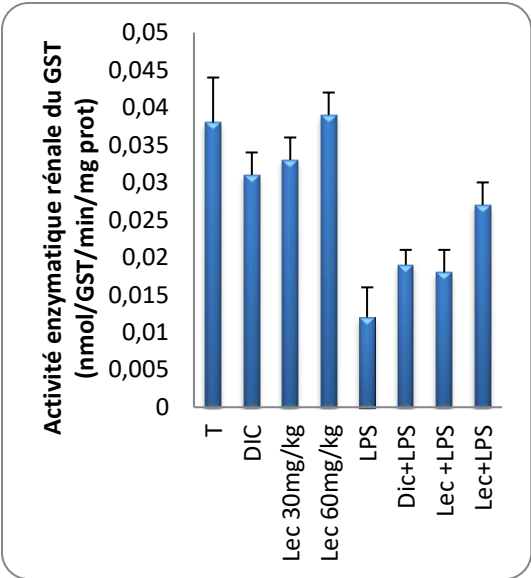
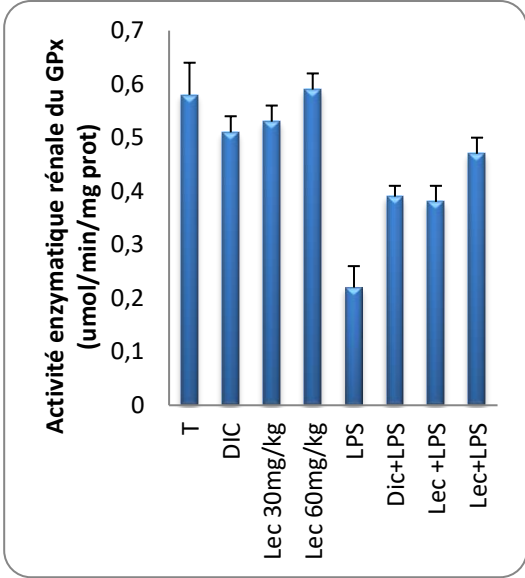
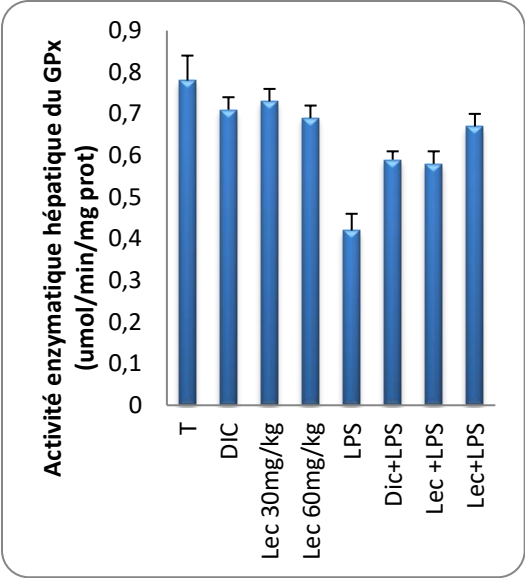


Figure 24 : variation de taux de GSH hépatique et rénale, et MDA hépatique et rénale, chez le lot témoin et les lots traités par LPS ;Dic/LPS ;Lec(30mg/kg)/LPS ;Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement



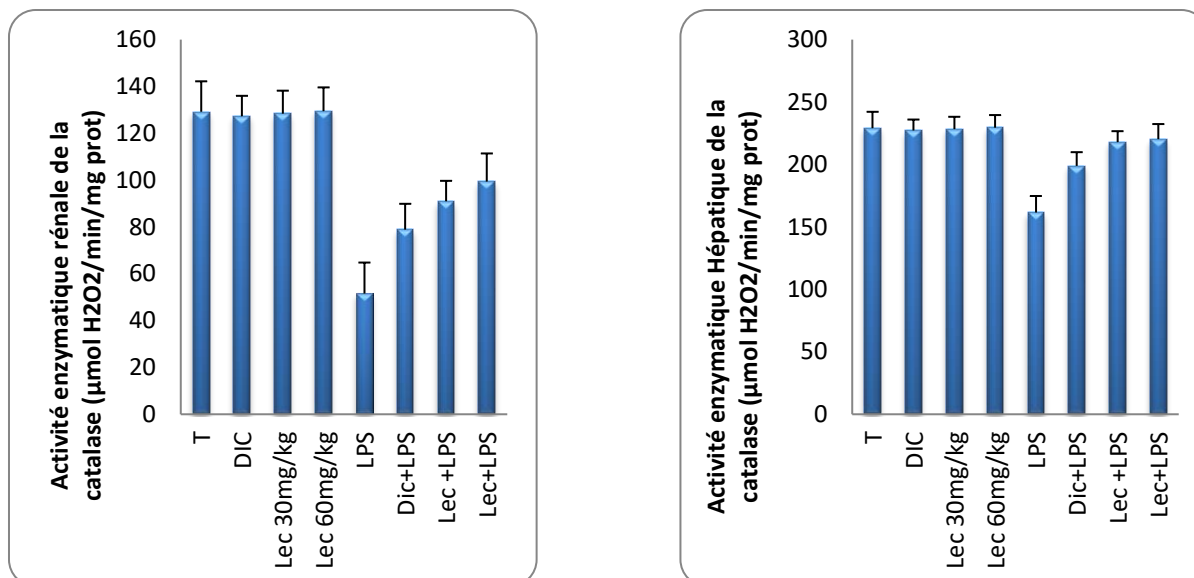


Figure 25: variation de l'activité enzymatique de GPx, GST et catalase hépatique et rénale chez le lot témoin et les lots traités par le LPS ;Dic/LPS; Lec(30mg/kg)/LPS ; Lec(60mg/kg)/LPS après 7 jours de traitement

4.2 Discussion

Nos résultats confortent ces travaux puisque nous avons mis en évidence une diminution de GSH rénale et hépatique et les enzymes antioxydants (GPx, GST et catalase) dans les reins et les foies et augmentation dans le taux de la peroxydation lipidique exprimé par MDA plasmatique rénale et hépatique chez les rats traités par LPS pendant 7 jours comparants aux témoin. Face au dommage oxydatif causé par les radicaux libres oxygénés, et à l'effet toxique provoqué par les métabolites actifs des xénobiotiques, la cellule vivante peut se défendre grâce à plusieurs systèmes de détoxification dont le plus important est celui du glutathion (**Kaplowitz et al., 1985**). D'après les résultats obtenus, le traitement des rats par LPS (400µg/Kg de poids corporel) pendant 7 jours a provoqué une diminution de la teneur rénale en glutathion (**Deepmala et al., 2013**). L'un des effets maléfiques d'action du LPS dans le corps est d'induire la formation des espèces oxygénées réactives (ROS) ainsi que l'augmentation de la peroxydation lipidique dans les cellules (**Das et al., 2001**). Les radicaux libres et les produits intermédiaires de la peroxydation lipidique sont capables d'endommager l'intégrité et changer la fonction des biomembranes qui peut mener au développement de beaucoup de processus pathologiques (**Das et al., 2006**). Le GSH est un tripeptide qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant (**Masella et al., 2005**). La déplétion

du taux de glutathion dans cette étude s'explique par sa participation dans les mécanismes de détoxification de ce xénobiotique là que forme un complexe avec LPS dans le rein qui est ensuite excrété (**Meistre et Anderson, 1983**) et l'inhibition de la peroxydation lipidique par la disparition des radicaux libres (**Li et al., 1999 ; Satsangi et Dua, 2001**).

LPS peut contribuer à l'oxydation de glutathion ou lie à son groupement sulfhydryle ; donc il abaisse le taux du glutathion dans les cellules rénales (**Wang M et al, 2008**). En outre.

LPS se lie exclusivement au Pol (-SH) du GSH chargé à son inactivation (**Anderson, 1989**) ce qui favorise la peroxydation lipidiques et l'apparition des radicaux libres, qui augmente la susceptibilité des lésion tissulaires importantes dans les différents tissus (**Pari et parath, 2008**).

Les cellules possède d'autres système de défense antioxydant incluent des enzymes

Comme les GPx, GST et catalase. Nos résultats montrent une diminution claire de l'activité de ces enzymes dans les reins chez les rats traités par LPS en comparant aux témoins.

A défaut de cette réaction H_2O_2 va réagir avec les ions fer et générer des réactifs hautement toxiques pour les acides nucléiques des cellules (formation du radical libre le plus puissant, OH°). ce dernier doit être détoxifié par la glutathion peroxydase, qui peut réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en présence du glutathion et permettre également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne en réduisant les peroxydes instables en acides gras hydroxylés. le catalase est un composant majeur dans le système enzymatique d'antioxydant fondamental qui catalyse la décomposition de H_2O_2 à H_2O et O_2 et partager cette fonction avec le glutathion peroxydase (**Valko et al, 2006**). Les niveaux de ces antioxydants peuvent fournir une indication claire sur l'ampleur de dégât cytotoxique qui se produit dans plusieurs tissus (**Sies, 1993**). D'autre part, la diminution des activités des enzymes antioxydants peut être du au direct action du LPS de ce lier au site actif des enzymes ou cotisation à leur usage augmenté d'ébouer des radicaux libres induit par LPS donc causer l'inhibition irrévocable dans leur activité (**Misura et al, 1990 ; Whanger, 1973**). D'autre part, LPS a été rapporté pour déclencher la production d'oxyde nitrique (**Gupta et al, 2000 ;Joshi et al, 2004**). Qui est connu pour empêcher l'activité des enzymes antioxydants en liant a son groupe prosthétique. Ces effets mènent probablement à l'accumulation de H_2O_2 qui réagit avec du O_2 et produire de l' OH^- , un initiateur de la peroxydation de lipide (**Chakrabarti et Bai, 1999 ; Salnikow et al, 2002 ; Huang et al, 2001 ; Chen et al, 2003**). La diminution de l'activité de GST chez les rats traités par LPS comparants aux témoins, cette

diminution peut être expliquée par sa participation dans les réactions inflammatoires dérivant du métabolisme LPS avec le GSH pour former les acides mercapturiques non toxiques excrétés dans les urines.

L'augmentation observée du taux de glutathion rénal et hépatique, l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GST et catalase) dans les reins et les foies suivant l'administration de diclofénac par rapport au lot témoin, pourrait être due à sa propriété d'induire des métallothionéines (protéine riche SH) qui jouent un rôle de charognard des radicaux libres (**viarengo et al, 2000 ; yoshida et al, 2005**). Ou son action indirecte à réduire les niveaux des espèces réactives d'oxygène, qui est due la plupart du temps de sa haute affinité pour le médicament (**Klassen et al, 1999 ; Templeton et cherian, 1999**), par conséquent résulte en un stress oxydant réduit (**Sidhu, 2004 ; Pari et Pasath, 2008**). Xia et al (**2003**) démontrent que diclofénac agit comme ligand dans la plupart des enzymes antioxydantes, surtout GPx et Thioredoxine. L'effet protecteur du médicament contre l'inflammation induite par LPS peut être due à la formation d'un complexe dic/LPS au niveau du plasma qui est excrétable (**Perottoni et al, 2004 b**).

L'augmentation de taux de glutathion et des enzymes antioxydantes après le traitement par les lectines peut être due aux fortes teneurs de lectines en composés antioxydants qui inhibent la production des radicaux libres. Une étude récente démontre que les saponines des plantes inhibent la dégradation du lipide par les radicaux libres, et ont une action antiradicalaire contre les radicaux OH (**Alaoui et al, 1998b**). D'autre explication peut être due à l'action des certains constituants actifs de cette plante qui jouent un rôle antioxydant et provoquent le scavenging des radicaux libres par le système enzymatique. Les antioxydants de la plante capable d'éliminer ou d'inhiber l'oxydation des lipides et autres molécules cibles à l'action du LPS par l'inhibition de l'initiation ou la propagation de réaction des chaînes oxydatives. Le rôle protecteur de la plante contre le stress oxydatif induit par LPS probablement dû par sa richesse en grande quantité des antioxydants, particulièrement : les AGPI et insaturés, les polyphénols, les tocophérols, stérols et b-carotène (ref). L'effet antioxydant de la plante peut être réalisé par plusieurs mécanismes parmi ces mécanismes on peut citer l'effet scavenger de radical pyroxyde qui est responsable sur la chaîne de la peroxydation lipidique. D'autres mécanismes que la lectine de cette plante capable de chélater le Cu^{+2} libre et donc réduire la liaison de Cu^{+2} à apolipoprotéines et empêchant par la suite la modification des résidus de protéines.

Dans la présente étude le taux rénal plasmatique et hépatique de MDA chez les rats traités par LPS est significativement augmenté par rapport aux rats témoins. La concentration

élevée de MDA est un indice qui suggère qu'il y a une forte peroxydation lipidique au niveau du sérum, des reins suite à l'injection de LPS, cette augmentation de la concentration du MDA , peut être due à la diminution des antioxydants enzymatique et non enzymatique , comme l'acide ascorbique et le tocophérol qui jouent un rôle coopératif très importants dans l'inhibition du phénomène de la lipide peroxydation et la formation de ses produits dangereux au niveau cellulaire (**Vertuani et al, 2004**),

Conclusion et perspectives

En conclusion, nos résultats montrent dans un premier temps que l'administration de LPS à 400 mg/kg de poids corporel par injection intrapéritonéale chez les rats adultes pendant 7 jours, a provoqué des perturbations du système enzymatique de détoxification. L'apparition d'atteintes tissulaires causées au niveau métabolique, associée à une perturbation des paramètres biochimiques et immunologiques. Dans un second temps, nos résultats montrent que l'addition de lectine (60 ml/kg) et du Diclofénac (6 mg/kg) avec LPS à améliorer la plus parts des paramètres étudiés.

- ❖ L'étude phytochimique montre :
 - Le lectine possède un pouvoir anti-radicalaire plus élevé par rapport la diclofénac.
- ❖ L'étude des paramètres biochimiques montrent :
 - Une augmentation de la concentration sérique en urée, créatinine, et l'acide urique, chez les rats traités par LPS par rapport aux témoins.
 - Une augmentation de l'activité sérique des enzymes transaminases (AST, ALT), phosphatase alcaline et LDH chez les rats traités par LPS par rapport aux témoins, ce qui confirme l'effet hépatotoxique du LPS.
- ❖ L'étude de la capacité anti-oxydante plasmatique montre
 - Une diminution de la concentration sérique du DPPH
- ❖ L'étude des paramètres du stress érythrocytaire et tissulaire montre :
 - Une diminution du taux de glutathion érythrocytaire, hépatique et rénal chez les rats traités par LPS par rapport aux témoins.
 - Une augmentation de taux de MDA plasmatique, érythrocytaire, hépatique et rénal chez les rats traités par LPS par rapport aux témoins.
 - Une diminution dans l'activité enzymatique de GPx, GST et catalase érythrocytaire, hépatique et rénal chez les rats traités par LPS par rapport aux témoins

Ces perturbations enregistrées avec LPS sont améliorées par l'addition de Lectine et le Diclofénac ce qui peut témoigner de l'effet antioxydant et protecteur de ces deux antioxydants contre l'effet oxydatif du LPS.

Références

- Abuja PM, Albertini R. (2001).** Methods for monitoring oxidative stress, lipid Peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.* 306, 1-17.
- Alencar NM, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragao KS, Assreuy AM, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005).** Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol.*(57) , 919-922
- Aragao K.S. (2009).** études structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de *Disctyostelium discoideum*. *Biomolécules*. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France. Pp:17-27.
- Assreury.A.M.S (1997)** Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation* 6, 201-210.
- Assreuy .A.M, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005).** Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol.*(57) , 919-922.
- Ayméric J-L, Lefranc G. (2009).** *Immunologie Humaine*. De Boeck & Laccier S.A. Paris. 24.
- Agrwal R, Behari JR. (2007).** Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats. 79,306-10.
- Amara S, Abdelmelek G, Guiraud P, Douki T, Ravanat JL, Favier A, Sakly M, Ben Rhoumak K .(2008) .** Preventive effect of zinc against cadmium induced oxidative stress in the rat testis. 54, 129-134.
- Asada K, Takahashi M, Nagate M. (1974).** Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric Biol Chem.* 38, 471–3. Association Française de Normalisation (AFNOR) Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérivés, 3ème édition, 1984.
- Atikah FD, Siddik N, Sembiring TB, Ariani A. (2009).** The effect of dietary intervention and physical activities on the lipid profile of obese children. *Pediatr Indones.* 2, 108–111.
- Augusti PR, Conterato GMM, Somacal R, Spohr Torres JV, Charao MF, Moro AM, Rocha MP, Garcia SC, Emanuelli T .(2008).** Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Food and Chem Toxicol.* 46, 212-219.

- Babosa T. (2001).** In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinaesubtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95 (5), 673-678.
- Banwell.J.G. (1983).** Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean : a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenrology.* 84, 506-515.
- Barbagallo M, Dominguez L, Galioto A, Ferlisi A, Cani C, Malfa L. (2003).** Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects.*24, 39-52.
- Barbara JA, Van ostade X & Lopez A. (1996).** Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha):the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol.* 74, 434-443.
- Barnes P J. (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clin Sci.* 94. 557-572.
- Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences n°3, 22,* 266-72.
- Barr RD, Woodger BA, Rees PH. (1973).** Levels of mercury in urine correlated with the use of skin lightening creams. *Am J Clin Pathol.* 59, 36–40.
- Barreto M. (2005).** Lipid extraction and cholesterol quantification. *J Chem Educ.*82, 103-104.
- Baskin SI, Salem H. (1994).** Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. Academic press Inc.363, pp 25-62.
- Beaudeau JL, Delattre J, Peynet J. (2003).** Lipoprotéines et athérosclérose : mécanismes moléculaires et cellulaires. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-Sciences Flammarion,Paris. pp 91-107.
- Beck PA. (2005).** Effects of Feeding Supplemental Organic or Inorganic Selenium to Cow-Calf Pairs on Selenium Status and Immune Responses of Weaned Beef Calves.*Prof Anim Sci.* 21, 114-120.
- Becker BF. (1993).** Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Boil Med.*14, 615-13.
- Bellahcen S, Mekhfi H, Ziyyat A, Legssyer A, Hakkou A, Aziz M and Bnouham M.(2012).** Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. *Phytother Res.* 26, 180-185.
- Bennani A, Drissi F, Giton L, Kheuang J, Fiet AA. (2007).** Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil an human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev.* 31, 64–69.

- Benabid.A et Fennana.M.(1994).** Connaissance sur la végétation du Maroc: phytothérapie, phytosociologie et série de végétation, Lazaroa. 21-97
- Benoit M, Desnues B & Mege JL. (2008).** Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 181, 3733-3739.
- Bensefat-Colas L, Andujan P, Descathar A. (2011).** Intoxication au mercure. *Rev Med Inter.* 32(7), 416-42.
- Boullard B. (1997).** Dictionnaire plantes et champignons. Edition ESTEM, Paris, p : 380. ISBN: 2-909455-99-8.
- Benzaria A, Meskini N, Dubois M, Croset M, Nemoz G, Lagarde M and Prigent AF.(2006).** Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nut.* 22, 628-637.
- Berrada Y, Settaf A, Baddouri K, Cherrah A, Hassar M. (2000).** Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan. *Argania sideroxylon. Therapie.* 55, 375–378
- Berrougui H, Ettaib A, Herrera Gonzalez MD, Alvarez de Sotomayor M, Bennani Kabchi N, Hmamouchi M. (2003).** Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in *Meriones shawi* rats. *J Ethnopharmacol.* 89, 15–8..
- Biozzy G, Benacerra FB, Halperm BN. (1970).** Effect de la vaccination par plasmodium berghi irradié sur l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial au cours de l'infection du rat par plasmodium bulleti de l'organisme mondiale de la santé. 42(1),163-168.
- Blain J, Netter J. (2000).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Méd Interne.* 21, 978-88.
- Boyd .W.C, Shapleigh E. (1945)** .Specific precipitation activity of plantagglutinins (lectins).*Science* 119 .4193 **Sumner J. B. (1919)** The globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. *J.Biol. Chem.* 37, 137-142.
- Brooker M. I. H. & Kleinig D.A. (2006).**Field guide to Eucaliptus.Vol.1.South-eastern Australiathirdedition.Bloomings. Melbourne.
- Brooker.C. (2001)** .Le corps humain: étude, structure et fonction, le rôle infirmerdans la pratique clinique. 2ème édition .DE BOECK .196.
- Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J.(2001).** Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. *Ann Biol Clin.*59(4), 453-459.
- Bradford MA. (1976).** Rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.

Brigelius-Flohe R, Banning A, Schnurr K. (2003). Enzymes in endothelial cell function. *Ant Red Signal.* 5, 205-15.

Cabrera-Vique C, Marfil R, Gimenez R and Martinez-Augustin O. (2012). Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil--an edible oil with potential as a functional food. *Nutr Rev.* 70, 266-279.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sanvaigo. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat.* 424, 9-21.

Cempel M, Janicka k. (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Boil trace Elem. Res.* 90, 215-226.

Chakrabarti SK, Bai CJ. (1999). Role of oxidative stress in nickel chloride induced cell injury in rat renal cortical slices. *Bioch Pharm.* 58(9), 1501-1510.

Charles N S, Peter A W and Derek W G. (2010). Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press, 2-3.

Calin, S.A., et Carboneli, B.A.A. 2005. La grenade cultivées en Espagne Punicalagine antioxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum, université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.

Charrouf Z, Guillaume D. (1998). Ethnocomomical, ethnomédical, and phytochemical study of (*Argania spinosa* (L) Skeels). *J of ethnopharmacol.* 67, 7-14.

Chen D, Diao L and Eulenstein O. (2003). Flipping: A supertree construction method. In Janowitz, M., Lapoint, F.J., McMorris, F.R., Roberts, F.S., eds. *Bioconsensus*. Vol. 61 of DIMACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science. American Mathematical Society. p. 135-60

Cherian MG, Hursh JB, Clarkson TW, Allen J. (1978). Radioactive mercury distribution in biological fluids and excretion in human subjects after inhalation of mercury vapor. *Arch Environ Health.* 33, 109-14.

Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, Khalil A and Adlouni A. (2005). Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovas.* 15 (5), 352-360.

Chimi H. (2005). Conservation comparés de l'huile d'argan et de l'huile d'olive. *Cahiers Agr.* 14(5), 467-471.

Curtin J F, Donovan M, Cotter TG. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J of Imm Methods.* 265, 49-72.

Crocker P.R. (2002) .Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins incell-cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 609-615.

Das KK, Dasgupta S. (2000). Effect of nickel on testicular nucleic acid concentrations of rats on protein restriction. *Biol Trace Elem Res.* 73(2), 175-180.

Das KK, Das SN. (2004). Studies on the role of ascorbic acid on nickel induced hepatic nucleic acid concentration in rat. *Basic Clin Physiol Pharmacol.* 15, 185-195.

De Bont B, Lauwerys R, Govaerts H, Moulin D. (1986).Yellow mercuric oxide ointment and mercury intoxication. *Eur J Pediatr.* 145, 217–8.

De Hoff P.L, Brill LM, Hirsch AM. (2009) .Plant lectins : the ties that bind inroot symbiosis and plant defense. *Mol. Genet. Genomies* 282 , 1-5.

Deeksha M, Sangha K, Khurana D S, Kaur G, Bala M, Singh B. (2015) .Screening for Lectin Quantification in BrassicaSpp and VegetableCrops.*Journal of Environmental and AppliedBioresearch.* 3(1) , 20-24.

Delatorre P et al. (2006). Crystal structure of a lectin from Canavaliamaritima(ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J Struct Biol.* 154, 280-286.

Deepmala J, Deepak M, Srivastav S, Sangeeta S, Kumar SA, Kumar SS. (2013).Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protects acute mercury induced oxidative injury in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 27(3), 249-56.

Delattre J. (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris – new york. p :620.

Derouiche A, Cherki M, Drissi A, Bamou Y, El Messal M, Idrissi-Oudghiri A. (2005).Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab.* 49, 196–201.

Diana XD. (1988). Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic response in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water . *Toxicol Environ Health.* 24(3), 357-72.

Dinarello CA. (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J.* 8, 1314-1325.

Dinarello CA. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 87, 2095-2147.

Dinarello CA. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 20,S1-13.

Dubey C, Bellon B, Bruet P. (1991). TH1 and TH2 dependent cytokines in experimental autoimmunity and immune reactions induced by chemicals. *Eur Cytokine Netw.* 2, 147-52.

Dubois F, Belleville F. (1988). Sélénium : rôle physiologique et intérêt en pathologie humaine. *Path Biol.* 36, 1017-1025.

Dubois S, Breton M, Linder J, Fanni M. (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol.* 109, 710-732.

Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M. (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine.* Gvozdzakova A (ed) pp 19-43.

Edelman .G.M, Cunningham B.A, Reeke G.N, Becker J.W, Waxdal M.J and Wang J.L.(1972). The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA.* 69, 2580-2584.

Emsley.J, White H.E, O'Hara B.P, Oliva G, Srinivasan N, Tickle I.J, Blundell T.L, Pepys M.B and Wood S.P. (1994). Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature.* 367, 338-345.

Ekor M, Adesanoye OA, Farombi EO. (2010). N-acetylcysteine pretreatment ameliorates mercuric chloride-induced oxidative renal damage in rats. 39, 153-60.

Emberger L . (1960), Les végétaux vasculaires. Masson Paris, Tome II, 1540 p.

Essig DA and Nosek TM. (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. *Can J Appl Physiol.* 22, 409-428.

Espiard E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. TEC&DOCLavoisier, Paris, France, 181-182.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med.* 13, 341 - 349.

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rothene D. (1989) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 6, 67-75.

Faraji H, Lindsay RC. (2004). Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsion. *J Agric Food Chem.* 52, 7164-71.

Faure PLJ. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. . *Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* 237-248.

- Favier A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. L'act Chim. 108-115.
- Favier A. (1997).** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Ann Biol Clin. 55 (1), 9 - 16.
- Favier A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'act Chim. 108 - 115.
- Finch JM, Turner RJ. (1996).** Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. Res Vet Science. 60, 97-106.
- Flohe L, Gunzler WA. (1984).** Analysis of glutathione peroxidase, Methods Enzymol. 105,114–121.for Cadmium. Atlanta, GA; 1999 (accès 6 juin 2008).
- Foster JR. (2001).** The functions of cytokines and their uses in toxicology. Int J Exp Pathol.82, 171-192.
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. (1995).** consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to lipid peroxidation. Am J clin nutr. 61, 5549-54.
- Gabius. H.J, Springer W.R and Barondes S.H. (1985).** Receptor for the cellbinding site of discoidinI.Cell.(42),449-456.Ghopkins W, Evrard C-M. (2003). Physiologie Végétale. DE BOECK.1èreédition , 104-105.
- Goldstein I. J, Poretz R.D. (1986).**Isolation physico-chimical, characterizationand carbohydrate-binding specificity of lectins In Liener I. The lectin: properties, function and applications in biologie and médecine. ELSEVIER. INC, 49-50.
- Goldstein I.J , Hughes R.C , Monsigny M , Ozawa T & Sharon N.(1980).** What should be called a lectin? Nature.285, 60.
- Gomes B .S, Siqueira A. B .S, Maria R. C. C , Teisceira V G E H, Anuda F V S,Naximmento K.S.D, De Lima A.N, Souza-Motta M, Porto A L F. (2012).** Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. Braz. J. Microbiol 43(2) ,770-778.
- Guillot .J, Guerry M, Kanska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M and Penault-LlorcaF. (2004).** Modification des glycoconjugués au cours duprocessus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. Bull Cancer. 91, 141-158.
- Gutteridge J. (1992).** Invited review free radicals in disease processes: a compilation ofcause and consequence. Free Rad Res Comm. 19, 598-620.
- Galan P, Preziosi P, Triol I. (1997).** Antioxydant et prevention cahiers de nutrition et de déitétique. 359-370.

Garg M C, Chaudhary D P, Bansal D D. (2005). Effect of vitamin E supplementation on diabetes induced oxidative stress in experimental diabetes in rats. *Ind J of Exp Biol.* 43,177-180.

Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory K H. (2007). Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂α-induced luteal cell death in vivo. *Free Rad Res.* 41, 251-9.

Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot JM. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J of Agr and Food Chem.* 53, 1370-1373.

Gerster H. (1993). Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Inter J for Vit and Nut Res.* 63, 93-121.

Gharby S, Harhar H, Kartah B, EL-Monfalouti H, Haddad A, Charrouf Z. (2011). Analyse chimique et sensorielle de l'huile d'argan. *Tech de Lab.* 6, 22.

Gonzalez G. (1997). Ibn al-Baytār et ses apports à la botanique et à la pharmacologie dans le *Kitāb al-Ġāmī. Médiévales,* 23-39.

Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3, 23-35.

Graham TW. (1991). Trace element deficiencies in cattle. *Vet Clin North Am.* 7, 153-197.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA & Koopmans SJ. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 6, 1045-1056.

Gupta S, Ahmad N, Husain MM, Srivastava RC. (2000). Involvement of nitric oxide in nickel-induced hyperglycemia in rats. *Nit Ox.* 4, 129-138.

Gurer H, Ozunes H, Neal R, Spitz DR, Ercal N. (1998). Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. *Toxicol.* 120,181–189.

Gutteridge J. (1992). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm.* 19, 598-620.

Habig WH, Pabst Jakoby WB. (1974). Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J Biol chem.* 249, 7130-9.

Hidiroglou M, Batra TR, Roy GI. (1994). Changes in plasma α-tocopherol and selenium of gestating cows fed hay or silage. *J Dairy Sci.* 77, 190-195.

Haimeur A, Messaouri H, Ulmann L, Mimouni V, Masrar A, Chraïbi A, Tremblin G and Meskini N. (2013). Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco). *Lipid in Health and Dis.* 12, 107.

Halliwell B et Gutteridge, JMC. (2007). Free radicals in biology and medicine oxford university press. 20-31.

Haufroid V, Hoet P, Lauwerys R, Lison D. (2007). Mercure. In : Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle. Paris : Elsevier Masson. p. 309-63

Hilali M. (2001). Contribution à la valorisation de l'arganier : étude des caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'argan en fonction de son mode d'extraction et étude comparative des fruits de l'arganier en fonction de leurs formes et leurs régions DES, Faculté des sciences, université mohammed V, Maroc. 96P.

Hilali M, Charrouf Z, Soulhi A A, Hachimi L, and Guillaume D. (2005). Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. J Agric Food Chem . 53, 2081-2087.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le bouc Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nat. 421(6919), 182-187.

Horiguchi H, Sato M, Konno N, Fukushima M. (1996). Long term cadmium exposure induces anaemia in rats through hypoinduction of erythropoietin in the kidney. Arch Toxicol. 71, 11-19.

Houlot R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine 19-21,225-227.

Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC, Epstein CJ.(2001). Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. Free Radic Biol Med. 31, 1101-1110.

Huang T, Kuersten S, Deshpande AM, Spieth J, MacMorris M, Blumenthal T. (2001). Intercistronic region required for polycistronic pre-mRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. Mol Cell Biol. 21, 1111–1120.

Hughes MF, Pickering IJ, Prince RC, Younis HS, Winzerling JJ. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanism of action. Chem Res Toxicol. 15, 1466–1471.I

Ilback NG, Sundberg J, Oskarsson A. (1991). Methyl mercury exposure via placenta and milk impairs natural killer (NK) cell function in newborn rats . Toxicol lett. 58, 149-58.

INERIS (Institut National d'Environnement industriel et de risques). (2010). Données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Mercure et ses dérivés, France.

Imberty A and Varrot A. (2008). Microbial recognition of human cell surfaceglycoconjugates. Curr. Opin. Struct. Biol.18, 567-576.

INRAA,2006. deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétique pour l'alimentation et l'agriculture

Jagota SK, Dani HM. (1982) A new colorimetric technique for estimation of vitamine C using folin phenol reagent. *Anal Biochem.* 127(1), 178-182.

Jenkins AJ, Hill MA, Rowley KG. (2007). Diabetes and Oxidant Stress. *Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective.* Holtzman J.L (ed) pp123-160.

Jaffe W.G. (1980). hemagglutinins (Lectins) . In *toxic constituents of plantfoodstuffs.* New – York. Academic Press. pp 502.

Jeyaprakash A A, Katiyar S, Swaminathan C P, Sekar K, Surolia A. (2003). Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol.*332,217-228.

Joshi D, Mittal D, Shrivastav S, Shukla S, Srivastav AK. (2011). Combined effect of N acetyl cysteine, zinc, and selenium against chronic dimethylmercury-induced oxidative stress: a biochemical and histopathological approach. 61, 558-67.

Joshi D, Mittal D K, Shukla S, Srivastava A K, Srivastava S K. (2014). N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: A histopathological approach. *J of Trace Elem in Med and Biol.* 28, 218–226.

Ji LL, Fu R, Mitchell EW. (1992) Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol.* 73, 1854-1859.

Kagi JHR. (1993). Evolution , structure and chemical activity of class 1 metallothioneins: an overview, in: Suzuki, KT, Imura, N, Kimura, M. (Eds), *Metallothionein III: Biological roles and medical implications,* Birkhauser verlag, Berlin.29-56.

Kaplowitz NT, Okhtens M. (1985). The regulation of the hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 25, 715-744.

Karleskind A. (1992). *Manuel des corps gras* tome II, Ed. Tec et Doc. Paris, P1-1565.

Karmakar R, Bhattacharya R, Chatterjee M. (2000) Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmiuminduced hepatotoxicity in mice. *Biomet.* 13, 231-239.

Kawsar S A, Aftabuddin S, Yasuimitsu H, Ozeki Y. (2010). The cytotoxicactivity of two Dgalactose binding lectins purified from marine invertebrates. *Arch. Biol. Sci. Belgarde* 62(4),1027-1034.

Kazantzis GD, NanosGG. (2003). Effect of harvest time and storage conditions on almond kernel oil and sugar composition. *J Sci Food Agric.* 83, 354-359.

Kehrer JP. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Review in Toxicol.* 23 (1), 21-48.

Kerper LE, Mokrzan EM, Clarkson TW, Ballatori N. (1996). Methylmercury efflux from brain capillary endothelial cells is modulated by intracellular glutathione but not ATP. *Toxicol Appl Pharmacol.* 141, 526–31.

Khallouki F, Younos C, Soulimani R. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, Squalene, Sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev.* 12(1), 67-75.

Khallouki, B. Spiegelhalder. (2005) Secondary metabolites of argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. *J. Biotechnol.* 4, 381-388.

Kim SH, Johnson VJ, Sharma RP. (2003). Oral exposure to inorganic mercury alters Tlymphocyte phenotypes and cytokine expression in BALB/c mice. *Arch Toxicol.* 77, 613-20.

Kim SH, Johnson VJ, Sharma RP. (2002). Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-KappaB and P38 MAPK signaling pathways. *Nitric Oxide.* 7, 67-74.

Klaassen C D, Liu J, Choudhuri S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual review of pharmacology and Toxicol.* 39, 267-94.

Koshino T, Arai Y, Miyamoto Y, Sano Y, Itami M. (1996). Airway basophil and mast cell density in patients with bronchial asthma: relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Asthma.* 33, 89-95.

Kostic MM, Ognjanovic B, Dimitrijevic S, Zikic RV, Stajnosic GL, Zivkovic RV. (1993) Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur J Haematol.* 51, 86-92.

Kumar V, Abul K A, Nelson F and Richard M. (2007). *Robbins Basic Pathology*, 8th Edition, 20-60.

Kulkarni.G.V. (1998). Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A induced apoptosis in human fibroblast. *Experimental cell. Research.* 245, 170-178.

Kweon MH, Hwang HJ, Sung HC. (2001). Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*phyllostachys edulis*). *J agric food chem.* 49, 4646-55.

L

- Lauwerys RR, Haufroid V, Hoet P, Lison D. (2007) . Mercure. In: Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle. Paris: Elsevier Masson. 309–63.
- Lazo JS, Pitt BR. (1995). Metalllothionein and cell, death by anticancer drug. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 655-677.
- Lebreton P, Salat O, Nicot JM. (1998). Un point sur le selenium. *Bulletin des GTV 5B.* 35-47.
- Lenka S, Imberty A, Jaroslave K. (2006).modélisation moléculaire deslectines et des glycosyltransferases. *Biologie cellulaire. Université de Grenoble I. France.* pp 56- 58.
- Liener I, Sharon N, Goldstein J. (1986). *The lectins Properties. Functions andApplications in biologieand medicine.* Academic Press INC. London LID. pp 13-24.
- Lis H , Sharon N. (1998). Lectins: carbohydrate- specific proteins that mediatecellular recognition. *Chem. Rev* 98, 673-674.
- Lopez S. (2003). Anti-humainimmunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity oflectins from Narcissus species. *Planta medica.*69 (2), 109-112 .
- Lee KJ and Dabrowski K. (2003). Interaction of vitamin C and E in yellow perch (*Perca flavescens*) nutrition and reproduction. *Br J Nutr.* Vol. 89, 589-596. activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Mol.* 13, 581-594.
- Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2001) *Stress oxydant et pathologies humaines.* La Presse méd. 30, 1076-1081.
- Levine RL. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32, 790-796.
- Liao VH, Freedman JH. (1998). Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J Biol Chem.* 273, 31962-31970.
- Li Y, Huang TT, Carson EJ. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 11, 376-381.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chem.* 102, 771-776.

M

- Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF & Konttinen YT. (2003). Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 60, 2334-2346.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends*

Immunol. 25, 677-686.

Marfil R, Cabrera-Vique C, Gimenez R, Bouzas PR, Martinez O and Sanchez JA. (2008). Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: influence of the extraction method. *J Agric Food Chem.* 56, 7279-7284.

Marnett LJ. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by Malondialdehyde. *Mutat Res.* 424, 83-95.

Marsella BA, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannimi C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *Nutr Biochem.* 16, 577-586.

Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis J M. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie.* 88, 1807-14.

Masella R, Giovannini C, Vari R, Di benedetto R, Coni E, Volpe R. (2002). effect of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients lipids. 36, 1195-202.

Matthäus B and Spener F. (2008). What we know and what we should know about virgin oils a general introduction. *Eur J of Lipid Sci and Tech.* 110, 597–601.

Martínez-Cayueta, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Bioch.* 77, 147-161.

Mekhfi H, Belmekki F, Ziyat A, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M. (2012). Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study. *Nut.* 1-5.

Melgarejo. P., Valero, D. (2012). International Symposium on the Pomegranat .Edition Zaragoza, Ciheam, Spain.337p.

Milbury P E. et Richer A C. (2008). Understanding the Antioxidant Controversy; Ed: PRAEGER; p: 81-100.

Milton- Prabua S, Shagirthab K, Renugadevia,J. (2011). Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomed & Prev Nut.* 1, 1–7.

Modi M, Kaul RK, Gurusamy M, Kannan GM, Flora SJS. (2006). Coadministration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *J of Trace Elem in Med and Biol.* 20, 197–204.

Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-378.

Mordret F. (1971). Thèse d'Université, Eude DE l'Insaponifiable de l'Huile de Tournesol, Paris.

N

- Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat.* 424, 59-69.
- Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature.* 420, 846-852.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S. (2013a). Argan oil (*Argania Spinosa .L*) provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in rat albinos wistar. *Int J of basic and App sci.* 2(1), 73-80.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S, Abdennour C, Boulakoud MS. (2013i). Hepatoprotective role of sodium selenite against oxidative damage induced by mercuric chloride in rat albinos wistar. *J of stress physiol and biochem.* 9(4), 230-240.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S. (2013c). Protective role of sodium selenite on mercuric chloride induced oxidative and renal stress in rats. *J of stress physiol and biochem.* 9(2), 160-172.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S, cherif A, Boulakoud MS. (2013f). Effect of olive oil (*olea europea .L*) on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Am J of Biochem and Biotech.* 9 (4), 144-148.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S. (2013h). Immunomodulatory Effect of Argan oil (*Argania spinosa. L*) After Exposure to Mercuric Chloride in Mice. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 23(1), 191-193.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S, Abdennour C and Boulakoud MS. (2013d). Immunomodulatory activity of Argan oil (*Argania Spinosa.L*). *Am J of Immuno.* 9 (3), 85-87.
- Nicolas JF, Florence C and Jean T. (2001). Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. John Libbey Eurotext. 2001, 55-58.
- Nogueira CW, Soares FA, Naximento PC, Muller DA, Rocha JBT. (2003a). 2,3-Dimercaptopropane -1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and dehydratase. *Toxicol.* 184, 85-95.
- Nourshargh S, Fritz K, and Elisabetta D. (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J of Leuk Biol.* 80, 714-718.
- O
- Oukabli A. (2004). Le Grenadier : Des Variétés Performantes pour la Culture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. MADRPM/DERD, 123 : 1-4.
- Oukabli A., Bellaji M., Chahbar A., Elkacemi A., Lahlou M. et Allabou M. (2004). Comportement de clones locaux et de variétés étrangères de grenadier (*Punica*

granatum L.) conduits dans la région de Meknès. *Al Awama* 3: 111.

Olivieri G, Brack C, Muller-Spahn F, Stahelin HB, Herrmann M, Renard P (2000). Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 74 (1), 231-6.

P

Packer T, Ritschler HJ, Wessel K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-378.

Paglia DE, Valentine WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxide. *J Lab Clin Med.* 70(1), 158-169.

Peumans.W.J , Vandamme.J.M. (1995).lectine as plant defense proteins.*Plant Physiol.*109,347-352.

PharmacolToxicol. 35, 655-677.

Pierre.M,lys.M,Secrets des plantes pour se soigner naturellement Relié – 14 mars 2007, 978-2844165862.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *VaissCoeur Poumons.* 4(5), 359-370.

Paolisso G, Sgambato S, Pezza G, Passariello N, Varricchio M, D'Onof F. (1989).

Improved insulin response and action by chronic magnesium administration in aged NIDDM subjects. *Diabet Care.* 12, 265–269.

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Ant Red Signal.* 9(7), 775-806.

Pari L, Parasath A. (2008). Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Biochem Biotech.* 173, 77-8.

Peixoto NC, Pereira ME. (2007). Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. 66, 441-6.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M and Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 133, 2812-2819

Perottoni J, Rodrigues OED, Paixao MW, Zeni G, Labato LP, Braga AL, Rocha JBT, Emanuelli T. (2004b). Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food*

Chem Toxicol. 42, 17-28.

Perrin JL. (1992). Manuel des Corps Gras, tome 2. Ed. Tekhnique et documentation Lavoisier, Paris.

Petrovic S, Ozretic B, Krajnovic-Ozretic M, Bobinac D. (2001). Lysosomal membranestabilityandmetallothioneinsindigestiveglandofmussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) asbiomarkersinafieldstudy. *Mar Pollut Bull.* 42, 1373–1378.

Picot A, Proust N. (1998). Mercury And Its Compounds: from speciation to toxicity. *Act Chim.* 4, 16-24.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaiss Coeur Poumons.* 4(5), 359-370.

Piquet M A. et Hébuterne X. (2007). Nutrition en pathologie digestive ; Ed : DOIN ; p: 16-20.

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D & Gras G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 142, 481-489.

Powers SK , Lennon SL. (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 58, 1025-1033.

Prakash D, Upadhyay G, Brahma N, Singh HB. (2007). Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry.* 104, 783-790.

Prior RL, Cao G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparaison of dfferent analytical methods. *Free radic Biol Med.* 27, (11-12): 1173-1181.

Puntarulo S. (2005). Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med.* 26, 299-312.

Q

Quezel P, Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'algérie et régions désertiques méridionales Tome 2. Centre national de la recherche, Paris, 565P .

R

Radi N. (2003). L'arganier: arbre du sud-ouest marocain, en péril, à protéger, thèse Univ. Grenoble 3 novembre

Rao MV, Purohit A, Patel T (2010). Melatonin protection on mercury-intoxicated brain toxicity in the rat. 33, 209-16

Rahmani M. (2005). Composition chimique de l'huile d'argan vierge. *Cahiers Agr.* 14(5), 461-465.

Robert K, Marry .M.D,PhD. (2008). Les glycoprotéines in *Biochimie deHarper.* DEBOECK ,527.

Roberts.D.L, Weix.D.J , Dahms.N.M and Kim.J.J.(1998). Molecular basis oflysosomal

enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate

receptor. *Cell*. 93, 639-648.

Rajagopal K, Sasikala K. (2008). Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rats. *Singapore Med J*. 49 (2), 137 - 142.

Ramadan MF, Kroh LW, Mörsel JT. (2003) Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seeds oils and oil fractions. *J of Agr and food chem*. 51, 6961-6969.

Rana SV, Rekha S, Seema V. (1996). Protective effects of few antioxidants on liver function in rats treated with cadmium and mercury. *Ind J of Exp Biol*. 34, 177-179.

Rayssiguer Y, Noe L, Etienne J. (1991). Effect of magnesium deficiency on post-heparin lipase activity and tissue lipoprotein lipase in the rat. *Lipid*. 26, 182-186.

Richard M J, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A and Favier A. (1992).

"Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid." *Clin Chem*. 38(5), 704-9.

Ruminy P, Gangneux C, Claeysens S, Scotte M, Daveau M & Salier JP. (2001). Gene transcription in hepatocytes during the acute phase of a systemic inflammation: from transcription factors to target genes. *Inflamm Res*. 50, 383-390.

Russo-Marie F, Peltier A, Polla B. (1998). *L'Inflammation*. John Libbey Eurotext, Paris.

Russell DG. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis?. *Nat Rev Microbiol*. 5, 39-47.

Rutkowski M, K Grzegorzcyk. (2007). Modifications of spectrophotometric methods for antioxidative vitamins determination convenient in analytic practice. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 6(3), 17-28.

S

Sankaranarayanan R , Sekar K , Banerjee R , Sharma V , Surolia Aand Vijayan M.

(1996). A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a prism

fold. *Nature Struct. Biol*. 3, 596-603.

Sharon N and Halima, Lis. (2003). *Lectins*. Kluwer Academic Publishers.

Sharon N, Lis H. (1993). *Carbohydrate in cell recognition*.

Scientific American. 268(1), 82-89.

Sharon N, Lis H. (2004). History of lectin : from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14. 53R-62R . 11. (Sharon. N., Lis. H. History of lectins: from

hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 2004. 14, 53-62.

Sharon N. (1983). Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Advances in immunology* 34. 213-291.

Sharon N. (1996). Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv.Exp. Med.Biol.*408, 1-8.

Sumner J B, Howell SF. (1936). Identification of hémagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32(2), 227-237.

Sumner J B. (1919). The globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. *J.Biol. Chem.* 37,137-142.

Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C, Levy E, Bachelard H, Amarouch H, Marette A. (2009). Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Meta: Clin and Exp.* 58, 909-919.

Samane S, Noel J, Charrouf Z, Amarouch H and Haddad PS. (2006). Insulinsensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 3, 317-327.

Sanchez-Moreno C. (2002) Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int J of Food Sci and Tech.* 8, 121-137.

Santarelli L, Bracci M, Mocchegiani E. (2006). In vitro and in vivo effects of mercuric chloride on thymic endocrine activity, NK and NKT cell cytotoxicity, cytokine profiles (IL1- IFN- γ , IL6): role of the nitric oxide-L-arginine pathway. *Int immunopharmacol.* 376-389.

Sarkhail P, Rahmanipour S, Fadyevatan S, Mohammadirad A, Dehghan G, Amin G, Shafiee A, Abdollahi M. (2007). Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacol Res.* 56, 261 - 266.

Satsangi K, Dua KK. (2000). Protective effect of few dietary nutrients against aluminium toxicity in mice. In international conference on probing in biological systems. Mumbai India Abste. N71, P.186.

Sedlak J, Lindsay RH. (1968). Estimation of total protein bound and non protein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25, 192-205.

Sen CK. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med Sci Sports Exer.* 33 (3), 368-370.

Shimizu M, Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Miyamoto Y. (2000). Regulation of

intestinal glucose transport by tea catechins. *Biofactors*. 13, 61 - 65.

Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK. (2004b). role of zinc in regulating the levels of hepatic elements following nickel toxicity in rats. *Biol Trace Elem Res*. 102, 161-172.

Sies H. (1993). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Amer J of Med*. 91, 31S-38S.

Simons JE, Yang RSH and Berman E. (1995). Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organic metals: advantages and disadvantages of the use of realworld complex mixtures. *Environ Health perspect*. 103, 67-71.

Simonian N A, Coyle JT. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann review of Pharmacol and Toxicol*. 36, 83-106.

Singh U, Devaraj S and Jialal I. (2005). Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut*. 25, 151-175.

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med*. 33 (5), 575-586.

Song Y, Manson JE, Buring JE, Liu S. (2004). Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women *Diabetes Care*. 27, 59-65.

Sola R, Motta C, Maille M. (1993). Dietary monounsaturated fatty acids enhance cholesterol efflux from human fibroblasts, relation to fluidity, phospholipid fatty acid composition, overall composition, and size of HDL3. *Arterioscler thromb*. 13, 958-66.

Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendu Biol*. 327, 649-662.

Sour S, Belarbi M, Khaldi D, Benmansour N, Sari N, Nani A, Chemat F, Visioli F. (2012). Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *Brit J of Nut*. 107, 1800–1805.

Stevnsner T, Tharslund T, De souza-pinto NC, Bohr VA. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol*. 37, 1189-1196.

Stout RD & Suttles J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 76, 509-513.

Sundberg J, Ersson B, Lönnerdal B, Oskarsson A. (1991). Protein binding of mercury in milk and plasma from mice and man--a comparison between methylmercury and inorganic mercury. *Toxicol*. 137, 169-84.

Spichiger R.-E., Savolainen V. V., Fig M. et Jeanmonod D. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions

Spallholz JE, Boylan LM, Larsen HS. (1990). Advances in understanding selenium role in

the immune system. *Ann NY Acad Sci.* 587, 123-139.

T

Tastekin D, Atasever M, Adigüzel G, Keles M , Tastekin A (2006). Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 235-238.

Testud F. (2005). Mercure. In: *Pathologie toxique professionnelle et environnementale*. Paris: ESKA. 239–51.

Thevenod F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.* 93, 87-93.

Thomson G, Robinson M. (1986). University and fecal excretion and absorption of large supplement of selenium superiority of selenate over selenite. *J Clin Nut.* 44, 659-663.

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG & Tak PP. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 117, 244-279.

Tracey KJ & Cerami A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol.* 9, 317-343.

U

Upreti KK, Das M, Kuman A, Singh GB, Khanna SK. (1989). Biochemical toxicology of argemone oil. IV: Short-term oral feeding response in rats. *Toxicol.* 58, 285-9.

Underwood EJ, Suttle NF. (2004). *The mineral nutrition of livestock*. 3rd éd. Cambridge: CABI publishing. 614.

V

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemicobiol inter.* 160, 1-40.

Vane J R. (1971). Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirinlike Drugs. *Nat New Biol.* 231, 232-235.

Vandamme E J, Peumans W J , Barre A, Rougé P.(1998). Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences.*17(6) , 575-692.

Voet D, Voet .J .G. (2005). *Biochimie*. 2ème édition. DE BOECK ,378.

Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. (2004). The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* Vol 10, 1677-1694.

Viala A. (1998). *Element de toxicology*. Paris; Edition Médicale International.

Viala A, Botta A. (2005). Toxicologie. 2^{ème} Edition, Paris.

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbari R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar Environ Res.* 44, 69-84.

Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panifili I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol.* 46, 407-417.

W

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol.* 192, 95-117

Wald E. (2009). Le Grenadier (*Punicagranatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré 1.

Weckbeker G, Cory JG. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Let.* 40, 257-264.

Weill B, Batteux F and Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.

Welch WJ. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 72, 1063-1081.

Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ. (2002). Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281, 20-28.

X

Xia L, Nordman T, Olsson JM, Damdimopoulos A, Bjorkhembergman L, Nalvarte T, Eriksson LC, Armer ESJ, Spyron G, Bjornstedt M. (2003). The mammalian selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *J Biol Chem.* 278, 2141-2146.

Y

Yonda S, Suzuki KT. (1997). Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 143, 274-280.

Yousfi M, Bombarda B, Hamia C, Djeridane A, Stocker P, Gaydou E. (2009). Fatty acid, Triglyceride and Tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania Spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterr J Nutr Metab.* 2, 197-203.

Youshida M, Saegusa Y, Fukuda A, Akama Y, Owada S. (2005). Measurement of radical

scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicol.* 213, 74-80.

Yue KD, McLennan S, McGill E, Fisher E, Hefferman C C and Turtle JR. (1990).

Abnormalities of ascorbic acid metabolism and diabetic control : differences between diabetic patients and diabetic rats. *Diabetics Res Clin Pract.* 9(3), 239-44.

ANNEXE

Annexe 01 : Préparation du Tampon, Monosacharides, Métaux et Nacl.

- Préparation de la solution tampon phosphate di-sodique PBS (0,1M ; pH7,2)

Pour 5 litres

Produit chimique	Quantité
Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	0,435 g
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	5 g
CLORURE DE SODIUM (Na Cl)	45 g
Eau distillée	5 L

Annexe 02 : Méthode de dosage des tests biologiques

- Dosage des paramètres immunologiques :

1.1. Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique :

Le dosage est basé sur les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 100µl de plasma
- ✚ Ajouter 750µl d'une solution contenant du TBA (0.55mM) et de l'acide perchlorique 7%
- ✚ Mélanger et ensuite placé pendant une heure au bain marie à 95°C.
- ✚ Ajouter 2ml de butanol pendant 2minutes sous agitation
- ✚ Centrifuger à 3500rpm pendant 10min à 4°C.
- ✚ Lire l'absorbance à une longueur d'onde 532nm
- ✚ La concentration de MDA peut être calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de 1.1.3.3tétraethoxypropane.

1.2. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique :

- Dosage de radical DPPH in vivo

Brièvement, un volume de 50 µL de plasma est additionné à 950 µl de la solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 ml de méthanol). Après 30 min

d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation (Janaszewska et Bartosz, 2002), l'absorbance à 517 est mesurée. Le pouvoir antioxydant plasmatique est ensuite calculé.

1.3. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire et érythrocytaires :

- **Dosage du glutathion**

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-marcapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque par les groupements (-SH) du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- ✚ Prélever 0.8 ml de l'homogénat
- ✚ 0.2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- ✚ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace
- ✚ Centrifuger a 1000 tours /min pendant 5min
- ✚ Prélever 0.5ml du surnageant
- ✚ Ajouter 1 ml du tampon Tris-NaCl, pH 7.4
- ✚ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M

Laisser pendant 5min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif

La concentration du GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg protéine}}$$

DO : La densité optique.

1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8ml homogénat, 0.2ml SSA).

1.525 : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml tris + 0.025 ml DNTB).

13100 : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412 nm).

0.8 : Volume de l'homogénat après déprotéinisation.

0.5 : Volume de surnageant trouvé dans 1.525 ml.

- **Dosage de Malondialdéhyde (MDA) :**

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant)
- Ajouter 150µl de la solution tampon phosphate (0.1M, PH=7.8)
- Ajouter 375µl de la solution TCA-BHT(TCA20%,BHT1%)
- Vortexer et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10min
- Prélever 400µl du surnageant
- Ajouter 80µl du HCl 0.6M
- Ajouter 320µl de la solution tris-TBA(tris 26mM, TBA 120mM)

Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes. La densité optique a été enregistrée à $\lambda=530\text{nm}$. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO=E.C.L$)

$$[\text{MDA}] (\text{nmol/mgprotein}) = \frac{DO \times 10^6}{\epsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

C: Concentration en mmol/mg de protéine

DO : densité optique lue à 530 nm

ϵ : coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

X : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)

Fd : facteur de dilution $Fd=0.2083$.

- **Dosage de la glutathion peroxydase (GSH-Px)**

Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSHPx selon la réaction suivante :



Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✚ Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- ✚ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- ✚ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✚ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min
- ✚ Ajouter 0.2ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.

- ✚ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- ✚ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✚ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✚ Prélever 0.48 ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- ✚ Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM)
- ✚ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GSH-Px } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = \frac{DO_{\text{échantil}} \times DO_{\text{étalon}} \times 5}{DO_{\text{étalon}} \times \text{mgprot}} \times 0.04$$

DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.

DO étalon : Densité optique de l'étalon.

- 0.04 : Concentration de substrat (GSH).

- **Dosage de la glutathion-S-transferase (GSTs)**

Celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH+CDNB) à une température de 37°C et à un PH de 6.5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1minute durant 5minutes à une longueur d'onde de 340nm.

Les réactifs utilisés	Essai (µl)	Blanc (µl)
Tampon phosphate (0.1M, PH6.5)	850	830
CDNB (0.02M)	50	50
GSH (0.1M)	100	100
Homogénat	-	20

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$GST \text{ (nmolGST/min/mg protein)} = \frac{DO_{\text{échant}} / \text{min} - DO_{\text{blanc}} / \text{min}}{9.6 \times \text{mgprot}}$$

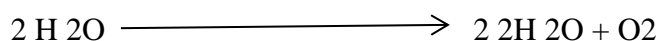
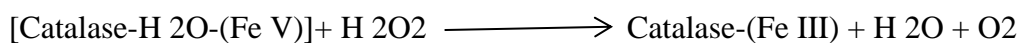
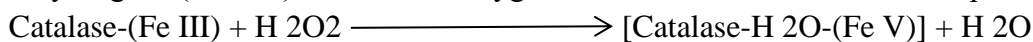
DO : densité optique de l'échantillon /min

DO/min blanc : densité optique du blanc/min

9.6 : coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en Mm.Cm

- **Dosage de la catalase**

Les catalase sont présentés dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les dérivés actifs de l'oxygène et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. La réaction se fait en deux étapes :



($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7.4, 200 μl de H_2O_2 (500mM) sur 20 μl du S9, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats ont été exprimés en μmol d' H_2O_2 par mg de protéines.

Le tableau ci-dessous représente les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase.

Les réactifs utilisés	Essai (μl)	Blanc (μl)
Tampon phosphate (100Mm, PH7.5)	790	800
H2O2 (500Mm)	200	200
Sg (1 à1.5 mg prt/ml)	10	0

S9 : la quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1.5 mg/ml soit une quantité de 10 à 20 μl de S9.

La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

L'activité CAT est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité de la catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg prot}) = \frac{\Delta DO}{\epsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

ϵ : Coefficient d'extinction (= 0.043 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

L : La longueur de la cuve utilisée (1 cm).

X : La quantité des protéines mg/ml.

Fd : 0.02 (facteur de dilution pour le H_2O_2 dans le tampon).

λ : 240 nm.

Annexe 03 : Préparation des solutions

1. Dosage du glutathion

✚ Solution d'EDTA (0.02M)

➤ EDTA.....7.4448 g

➤ Eau distillée.....qsp 1000 ml

✚ Solution de SAA (0.25%)

- SAA.....0.25g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

- ✚ Tampon Tris+ EDTA (0.4 M Tris + 0.02 M , PH=9.6)
- Tris.....63.04g
- EDTA.....7.4448 g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

- ✚ Solution de DTNB (0.01M)
- DTNB.....3.96g
- Méthanol absolu.....qsp 1000ml

2. Dosage du MDA

- ✚ Solution TCA-BHT (TCA20%+BHT1%)
- TCA.....20g
- BHT.....1g
- Eau distillée.....qsp 100 ml

- ✚ Solution HCL (0.6M)
- HCL.....51.56ml
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

- ✚ Solution Tris-TBA(26m M Tris+120m M TBA)
- Tris.....3.149g
- TBA.....17.299g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

3. Dosage du glutathion peroxydase (GPx)

- ✚ Solution de GSH (0.1 m M)
- GSH.....30.73g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

- ✚ Solution TCA (1%)

- TCA.....1g
- Eau distillée.....qsp 100ml

✚ Solution DTNB (1 m M)

- DTNB.....3.96mg
- Méthanol absolu.....qsp 1000 ml

4. Dosage du Glutathion –S-Transferase (GST)

✚ Solution CDNB (0.02M)

- CDNB.....4.04g
- Ethanol absoluqsp 1000 ml

✚ Solution GSH (0.1 M)

- GSH.....3.06g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

5. Dosage de la catalase

✚ Solution H2O2 (500mM)

- H2O2.....17ml
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

Année universitaire : 2020/2021	Présenté par : KHODJA YOUSRA / LECHEHEB ROUMMAISSA
Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master Option : Biochimie	
Intitulé : L'effet protecteur des lectines extraite à partir de <i>Punica granatum</i> contre l'inflammation induit par LPS chez le rat Albinos Wistar	
<p>Résumé</p> <p>La présente étude visait à évaluer l'effet protecteur du lectine et diclofénac contre le stress oxydatif induit par LPS. Pour cette raison, une étude phytochimique des testes antioxydant in vitro ont été réalisés sur la grenade « <i>Punica granatum</i> » pour estimer ses effets attendus. Les résultats ont montré la présence des composés phénoliques à une concentration très importante. L'évaluation du pouvoir piègeur de la grenade est plus actif avec une $IC_{50} = 5,49 \pm 0,039$, et in vivo, sur des rats Albinos Wistar qui sont traités par LPS seul ou combiné avec le lectine et le diclofénac, pendant une période de une semaines, le sang est prélevé ensuite les rats sont sacrifiés et les différents paramètres sont déterminés. A partir de l'analyse de nos résultats, on observe des changements notables dans les paramètres biochimiques et immunologiques. Caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique de l'urée, créatinine, acide urique, et l'activité enzymatique de AST, ALT, PAL et LDH. Ainsi le traitement des rats par LPS entraine une diminution dans la capacité anti-oxydante plasmatique caractérisé par diminution dans la concentration sérique de taux de DPPH. Nous avons également observé que les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel détoxifiant exprimé par la diminution des taux de glutathion érythrocytaire, hépatique et rénale, GPx, GST et catalase et une augmentation dans la peroxydation lipidique exprimé par le taux élevé de MDA plasmatique, érythrocytaire, hépatique et rénale.</p>	
Mots clés : LPS, Lectine, Diclofénac, Stress oxydatif, <i>Punica granatum</i> , antioxydants	
Laboratoire de recherche : BIOCHIME.	
<p>Jury d'évaluation :</p> <p>Président du jury : NECIB Y (Pr - UFM Constantine), Rapporteur : BAHY A (MCB - UFM Constantine), Examinateur : Louaar I (MAA - UFM Constantine).</p> <p style="text-align: right;">Date de soutenance : 14/07/2021</p>	