



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la vie**

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Intitulé :

L'hépatoprotecteur des lectines extraite à partir
d'une plante « punica granatum » contre
l'inflammation induit par LPS chez les rats

Présenté et soutenu par:

FELLAHI Meriem

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : NECIB Y. (Pr.UFM Constantine).

Rapporteur : BAH I Ahlem. (MCB.UFM Constantine).

Examineur : DJEMAI ZOUGHLACHE S . (MAA UFM Constantine).

Année universitaire 2020-2021

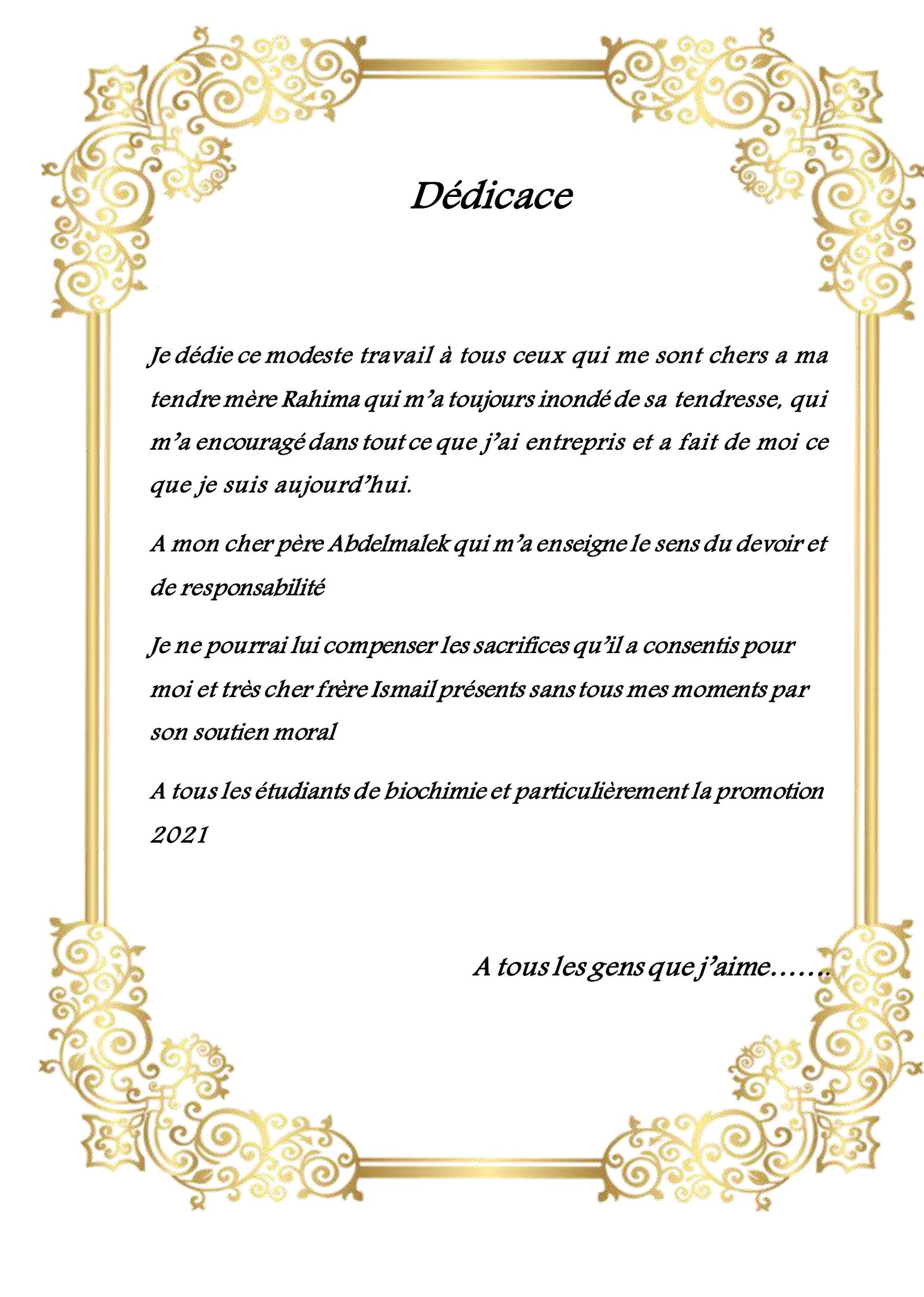
Remerciement

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais dans premier temps remercier , ma directrice de mémoire Madame Bahi Ahlem, pour sa patience , sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je remercie également toute l'équipe pédagogique de l'université frères mentouri Constantine et les intervenants professionnels responsables de ma formation , pour avoir assuré la partie pratique de celle-ci.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers à ma tendre mère Rahima 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 Abdelmalek 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 très cher frère Ismail présents sans tous mes moments par son soutien moral

A tous les étudiants de biochimie et particulièrement la promotion 2021

A tous les gens que j'aime.....

Résumé

Les lectines forment une famille de protéines et de glycoprotéines hétérogène qui reconnaissent certaines structures oligosaccharides. Le but de ce travail est de étudier l'hépatoprotecteur des lectines extraites à partir d'une plante *punica granatum* L contre l'inflammation induit par LPS.

On a traité des rats par LPS seul ou combiné avec dichlofénac et lectine (30mg/Kg) et lectines (60mg/kg), pendant une période de sept jours, 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, immunologiques. Caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique de l'urée, créatinine, acide urique, l'activité enzymatique de AST, ALT, PA L, et LDH. Ainsi le traitement des rats par LPS entraîne une diminution dans la capacité anti-oxydante plasmatique caractérisée par diminution dans le taux DPPH. Nous avons également observé que les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel détoxifiant exprimé par la diminution des taux de glutathion hépatique et rénale, GPx, GST et catalase et une augmentation dans la peroxydation lipidique exprimée par le taux élevé de MDA plasmatique, hépatique et rénale.

Les lectines extraites à partir de la plante *punica granatum* modifient les effets toxiques du LPS et montrent que cet antioxydant est efficace contre le stress oxydant induit par LPS.

Mots clés : lectines, rats, *punica granatum*, l'hépatoprotecteur.

ملخص

تشكل الليكتينات عائلة غير متجانسة من البروتينات والبروتينات السكرية التي تتعرف على بعض هياكل قليل السكريد. الهدف من هذا العمل هو دراسة الحماية الكبدية لليكتين المستخلص من نبات *Punica granatum L* ضد الالتهاب الناجم عن LPS.

عولجت الجرذان بـ LPS وحده أو مع ديكلوفيناك وليكتين (30 مجم / كجم) وليكتين (60 مجم / كجم) ، لمدة سبعة أيام ، ثم يتم أخذ الدم ، ثم يتم التضحية بالفئران ويتم تحديد المعلمات المختلفة عازم. من تحليل نتائجنا ، نلاحظ تغيرات ملحوظة في المعلمات البيوكيميائية والمناعية. تتميز بشكل رئيسي بزيادة معنوية في تركيز مصل الدم من اليوريا والكرياتينين وحمض البوليك

النشاط الأنزيمي لـ AST و ALT و PA L و LDH. وبالتالي ، فإن علاج الفئران باستخدام LPS يؤدي إلى انخفاض في قدرة مضادات الأكسدة في البلازما التي تتميز بانخفاض مستوى DPPH. لاحظنا أيضًا أن النتائج التي تم الحصول عليها توضح إمكانات إزالة السموم التي تم التعبير عنها من خلال الانخفاض في مستويات الجلوتاثيون الكبدية والكلوي ، و GPx ، و GST ، والكتلاز وزيادة في بيروكسيد الدهون المعبر عنها بمستوى عالٍ من البلازما والكبد و MDA الكلوي.

عدلت Lectins المستخرجة من نبات *Punica granatum* التأثيرات السامة لـ LPS وأظهرت أن مضادات الأكسدة هذه فعالة ضد الإجهاد التأكسدي الناجم عن LPS

الكلمات المفتاحية: لكتين ، جرذان ، بانیکا جراناتوم ، وافي كبد.

Abstract

Lectins are a heterogeneous family of proteins and glycoproteins that recognize certain oligosaccharide structures. The aim of this work is to study the hepato-protective of lectins extracted from a punica granatum L plant against inflammation induced by LPS.

Rats were treated with LPS alone or combined with dichlofenac and lectin (30 mg / kg) and lectins (60 mg / kg), for a period of seven days, the blood is then taken, the rats are then sacrificed and the various parameters are determined. From the analysis of our results, we observe notable changes in the biochemical and immunological parameters. Characterized especially by a significant increase in the serum concentration of urea, creatinine, uric acid,

the enzymatic activity of AST, ALT, PA L, and LDH. Thus, the treatment of rats with LPS leads to a decrease in the plasma antioxidant capacity characterized by a decrease in the DPPH level. We also observed that the results obtained demonstrate the detoxifying potential expressed by the decrease in hepatic and renal glutathione, GPx, GST and catalase levels and an increase in lipid peroxidation expressed by the high level of plasma, hepatic and MDA. renal.

Les lectines extraites a partir de la plante punica granatum modifié les effet toxiques du LPS et montré que cette antioxydant sont efficace contre le stress oxydant induit par LPS

Mots clés : lectines , rats ,punica granatum, l'hépatoprotecteur.

Sommaire



Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction.....01

Section I : Etude Bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les lectines

1- Définition des lectines	02
2- Historique	04
3- La structure des lectines	06
3-1 -Les lectines simple	06
3-2- les lectines en mosaïques.....	07
3-3- Les assemblages macromoléculaires.....	08
4- Les sites de liaisons des lectines	09
5-spécificité et l'affinité des lectines	09
6- La Classification des lectines	11
6-1- Chez les animaux.....	11
a) Les lectines extracellulaires.....	11
b) Les lectines intracellulaires.....	11
6-2- Chez les végétaux	11
a) Les mérolectines	11
b) Les hololectines.....	11
c) Les chimérolectines.....	12
d) Les superlectines.....	12
7- Distribution des lectines dans le monde de vivant	12
7-1- Les lectines animales.....	13
7-2- Les lectines des plantes.....	14
7-3- Les lectines des microorganismes.....	15
8-Fonction biologique des lectines	17
8-1-Chez les plantes	17
8-2- Chez l'homme.....	17
9-Propriétés des lectine	18
9-1- L'interaction lectine–glucide	18
9-2- L'agglutination des cellules	18
9-3- L'activités mitogène	18
9-4- Effets mimétiques des hormones.....	18
9-5- Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses.....	19
9-6- La propriété antivirales	19
9-7- La propriété antibactérienne	19
9-8- Autres propriétés.....	19
10- L'intérêt des lectines	20
10-1- En biochimie et protéomique.....	20
10-2-Dans le domaine biomédical	20

Sommaire

a) Hématologie	20
b) Immunologie	20
c) Biologie cellulaire	21
d) Cancérologie	21
10-3-Dans le domaine agronomique	21
11-Le rôle des lectines dans l'immunité.....	21

Chapitre II : Le stress oxydant

1. Définition	25
2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	26
3. Les cibles biologiques du stress oxydant.....	27
3.1. Les lipides.....	27
3.2. Les protéines.....	28
3.3. Les acides nucléiques.....	29
4. Le stress oxydant et les pathologies.....	32
5. Systèmes de défenses antioxydants.....	32
5.1. Les systèmes enzymatiques.....	34
5.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	34

Chapitre III : les médicaments anti inflammatoire

1. Définition de l'inflammation.....	38
1.2 Définition de LPS.....	38
1.3 La structure de LPS.....	38
1.4 La physiopathologie de LPS.....	40
2. Les anti-inflammatoire.....	40
2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	40
2.2. Anti-inflammatoire non stéroïdiens.....	42
2.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	44

Section II : Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques.....	51
1.1. La Préparation des plantes	51
1.2. L'extraction des plantes	51
2. Matériels et méthodes des tests biologiques.....	53
2.1. Matériel biologique et conditions d'élevage	53
2.2. Traitement des rats	54
2.3. Les Méthodes de dosage	55
3. Analyse statistique.....	58
Les résultats d'étude et la discussion.....	60
Conclusion et perspectives.....	70

Sommaire

Références bibliographiques

Annexes



Liste des abréviations

Liste des abréviations

AINS : Anti-inflamatoire nonstéroïdien
AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien
ACA : *Amaranthuscaudatus*
CAT : Catalase
CDMPR : la lectine bovine
Con A : Concavaline A lectine
ConBr : la lectine de *Canavaliabrasilensis*
ConM : *Canavaliamaritima*
CRD : *Carbohydrate Recognition Domain*
ERO : espèces réactives de l'oxygène
Fuc : le Fucose
Gal : le Galactose
GalNAc : N acetylgalactosamine
GlcNAc : le N-acetylglucosamine
GSH-Px : Glutathion peroxydase
GST : Glutathion S-transférase
GNA : *Galanthus nivalis* agglutinine
Glu : glucose
GR : La glutathion réductase
4-HNE : 4-hydroxynonéanal
HSP : Heat Shock Protein
LTLs : lectines humain de type L
Man : Mannose
MBL : mannose binding lectin
MDA : le malondialdéhyde



Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 01 : : les lectines et leurs applications	03
Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines	05
Tableau 03 : La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines	10
Tableau 04 : La classification structurale des lectines des plants	12
Tableau 05 : Récapitule les différentes séléno-enzymes, leur localisation et leur rôle, s'ils sont connus (Underwood et Suttle, 2004).....	36
Tableau n°06 : Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie.....	45
Tableau n°07 : Classification botanique du grenadier (Spichiger et al.,2009.....	47
Tableau 8 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upreti <i>et al</i> , 1989).....	54



Liste des figures

Liste des figures

Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de <i>canavaliensiformis</i> en complexe avec le trimannosoïde	07
Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique	08
Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d' <i>Escherichia coli</i>	08
Figure 04 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides	09
Figure 05 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T)	13
Figure 06 : Tétramère de la protéine ConM de <i>Canavaliamaritima</i> complexée avec le tréhalose	14
Figure 07 : Stress oxydant (Durackova, 2008).....	25
Figure 08 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).....	27
Figure 09 : Réactions de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).....	29
Figure 10 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).....	30
Figure 11 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Favier, 2003)....	31
Figure 12 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer <i>et al.</i> , 2008).....	33
Figure 13 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (Piquet et herbuterne, 2007).....	34
Figure 14 : la paroi des bactéries Gram négative	39
Figure 15 : structure schématique de la molécule de lipopolysaccharide.....	40
Figure 16 : Mécanisme d'action des AINS (Nicolas <i>et al.</i> , 2001).....	42
Figure 17 : Structure Chimique Formule du Clofenal ou Diclofenac (Schorderet, 1989).....	43
Figure n° 18 : Grenade et ses nombreuses graines (Wald, 2009).....	47
Figure 19 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes.....	52
Figure 20 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	55
Figure 21 : Variation de l'activité enzymatique de AST et ALT chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement.	60
Figure 22 : Variation de la capacité antioxydant plasmatique DPPH chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement.....	61
Figure 23 : Variation de taux GSH, MDA, GPX,GST hépatique chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement..	63

Liste des figures

Figure 24 : variation de la concentration sérique créatinine, acide urique chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement.....67

Figure 25 : Variation de taux de GSH, MDA, GPx,GST rénale chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement..70



Introduction

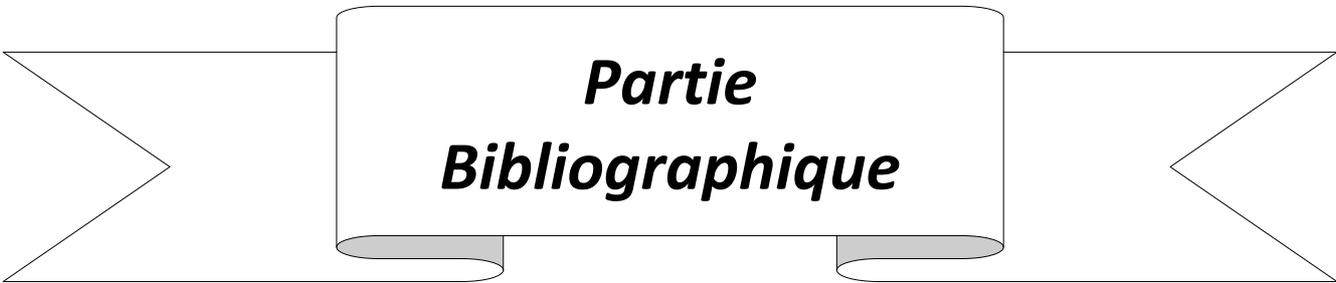
Introduction

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 présentes 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 agissent 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 anti-oxydant raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

- Dosage de quelque paramètre biochimique
- Dosage de quelque paramètre de stress.



***Partie
Bibliographique***

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 reconnaissance 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 thermorésistantes (**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	Concanavalline A, 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 qu'il décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (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 concanavaleine 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 concanavaleine 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 tiglium
1890	Erllich	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 Concanavaline 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 <i>Phaseolus vulgaris</i>
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
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 <i>Phaseolus vulgaris</i>
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' <i>Escherichia coli</i>

3. La structure des lectines

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

3.1 Les lectines simple

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**)

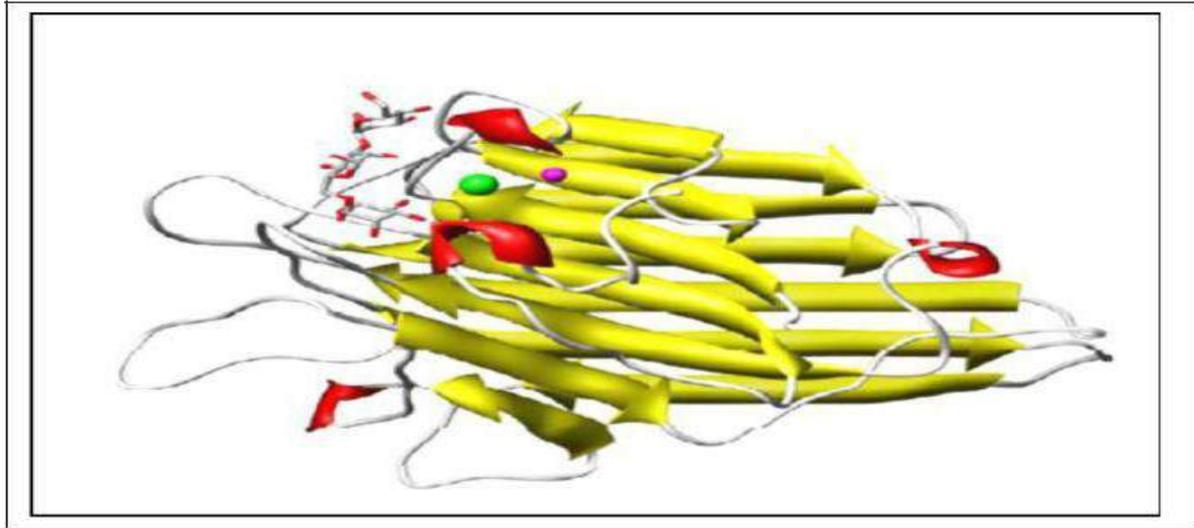


Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A *decanavaliaensisiformis* en complexe avec le tri mannoside(Lenka , 2006).

La protéine est représenté 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 type de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (Lenkaet al., 2006).

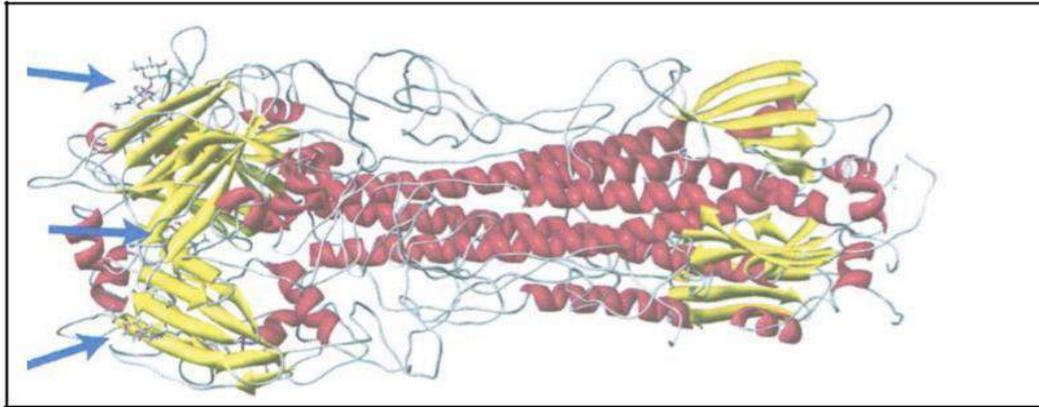


Figure 02: Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

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 100 nm 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) (Figure 03).

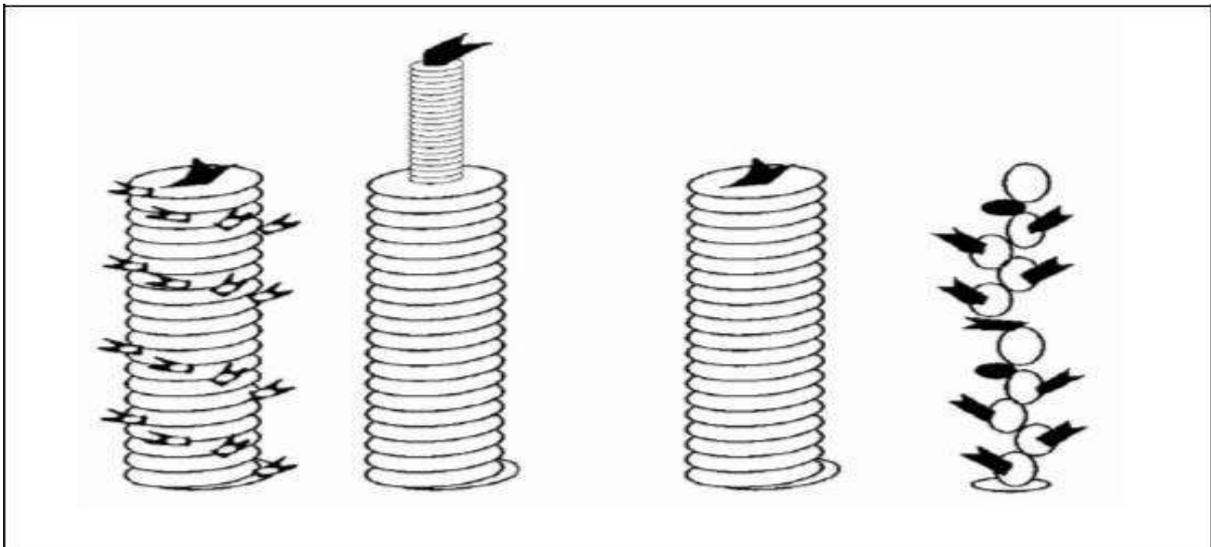


Figure 03: Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichiacoli*.

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 auxquels se lieent (**Gabius, 1985**).

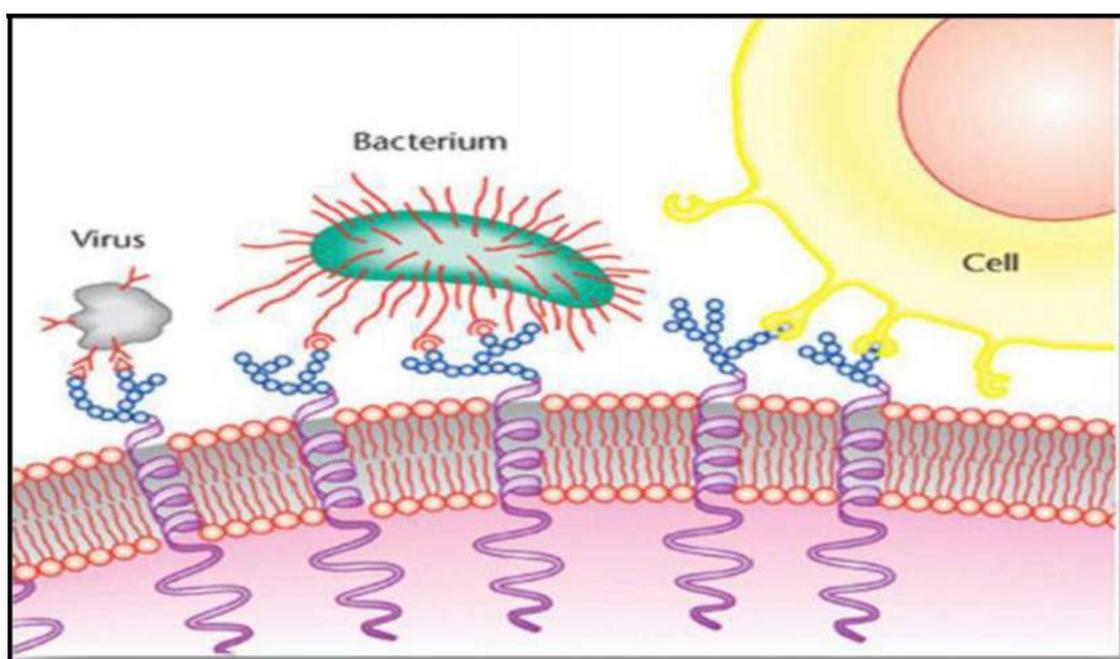


Figure 04 : Représentation schématisée d'exemples d'interaction lectines-glucides (**Sharon et Lis, 1993**)

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

Chapitre I : Généralités sur les lectines

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>Cytissus 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 essentielles 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 (**Peumans et Van 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 *Canavaliabraziliensis*) (**Van Damme *et al.*, 1998**).

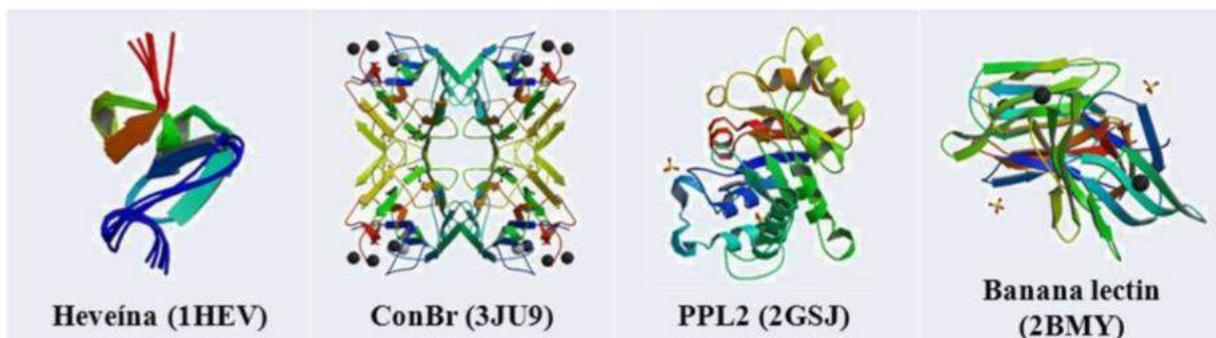
c) Les chimérolectines

Les chimérolectines 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 Damme *et al.*, 1998). Selon le nombre de liaisons aux glucides, les chimérolectines se comportent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip ribosome inactivating protein ; protéine inactivant les ribosomes comme la ricine) (Peumans *et* Van 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 chimérolectines composé de deux domaines différents structuralement et fonctionnellement (Van Damme *et al.*, 1998).

Tableau 04 : 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 (**Bouchara et Trouchin, 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) (**Leffler et 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-se lectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somerset et al., 2000**) (**Figure 05**).

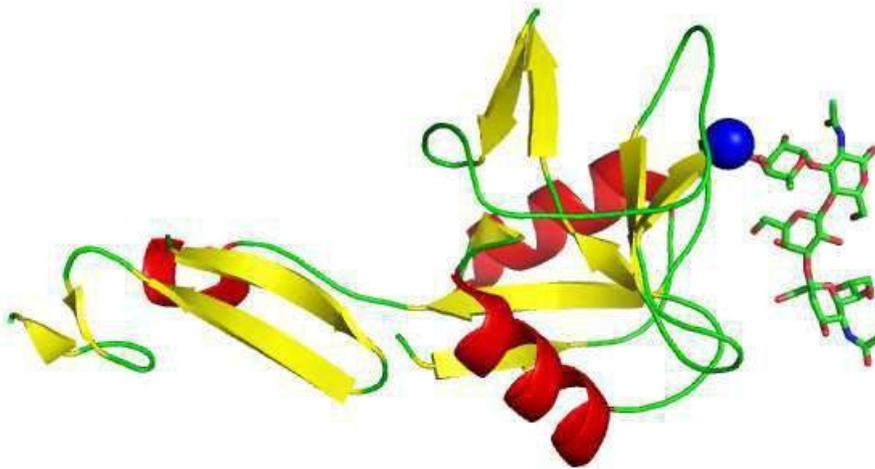


Figure 05 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somerset et al., 2000**). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

- 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 Ca^{2+} 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 concanavaleine 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**)

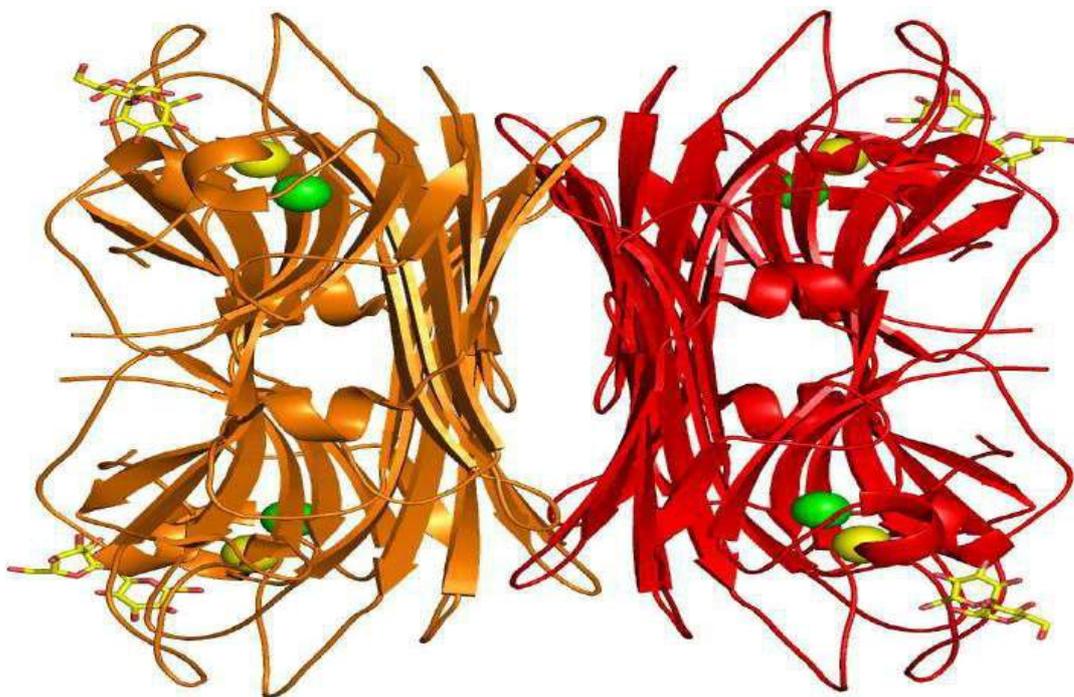


Figure 06 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec letréhalose (code PDB 2CY6) (**Delatorre, et al.,2006**). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets

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 ⁶⁻³GalNAc (**Transue et al., 1997**).

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 (**Bouchara et Trouchin, 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. Cette 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 a 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 a sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (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 *etal.*, 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 (Sutapaet 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 glycanes 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 (**Nachbare *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 (**Greeret 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 antivirales

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* (**Mukherjeeet 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 (**Nachbarett coll., 1980**), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (Gomes 1994), les effets pro 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 être 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 telles que le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (**Guillot et coll., 2004**). Kenoth et al (2001) rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteurs pour diriger des 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 (**Murdock et coll., 2002**).

11. Le rôle des lectines dans l'immunité

Chapitre I : Généralités sur les lectines

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) (**Cavillon, 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 : Le stress oxydant

II. Le stress oxydant

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 06). 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)».

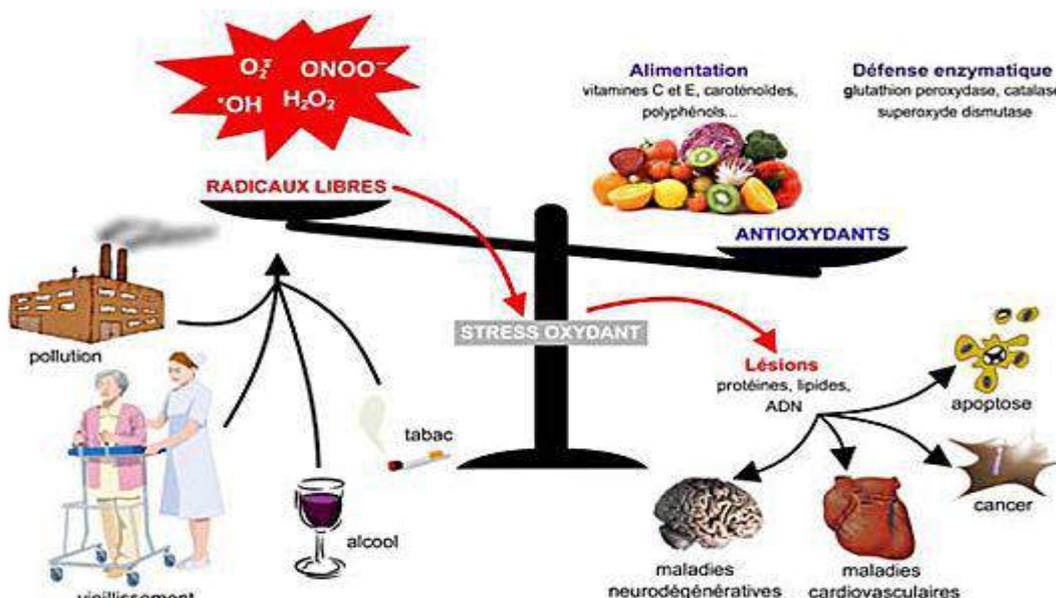


Figure 07 : Stress oxydant (Durackova, 2008)

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 07) (Favier, 1997).

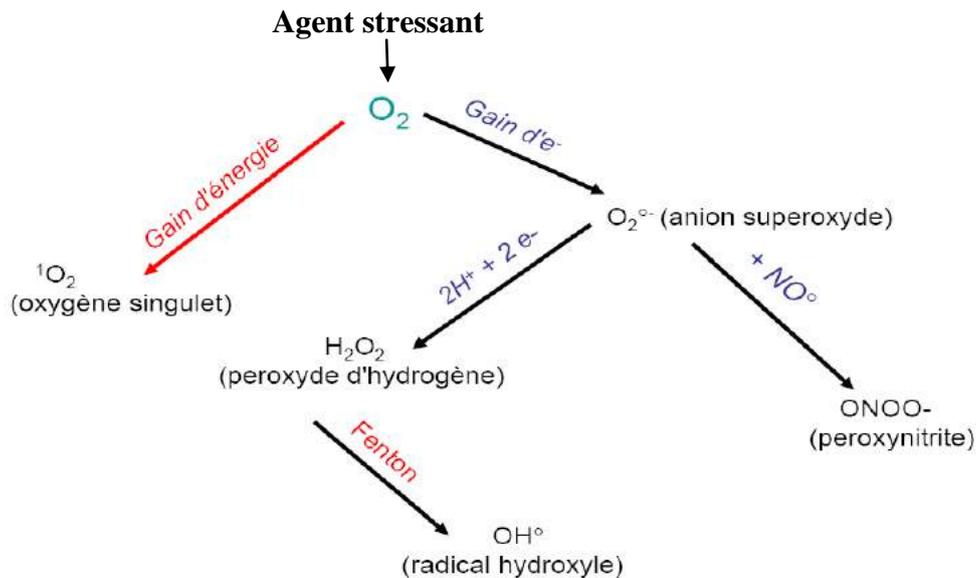


Figure 08 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003)

L'oxygène singulet (1O_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).

Chapitre II : Le stress oxydant

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 du 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 lipidiques des membranes (Esterbauer *et al.*, 1992 ; Beaudeux *et al.*, 2003 ; Favier, 2003) (figure 08). 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).

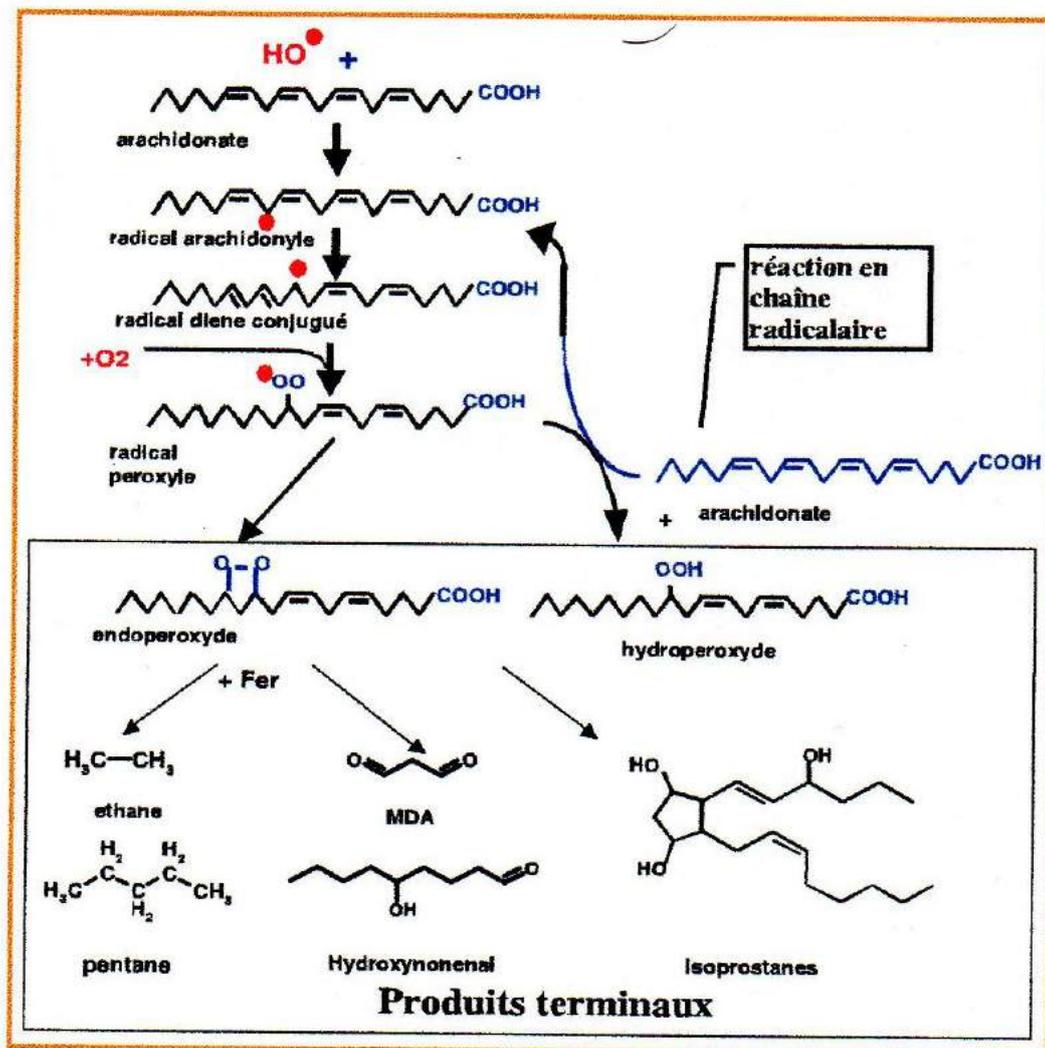


Figure09 : Réactions de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

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 Cu^{2+} et le Fe^{2+} (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 09). Les protéines comportant un pont sulfhydrique sont les plus sensibles aux attaques

Chapitre II : Le stress oxydant

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).

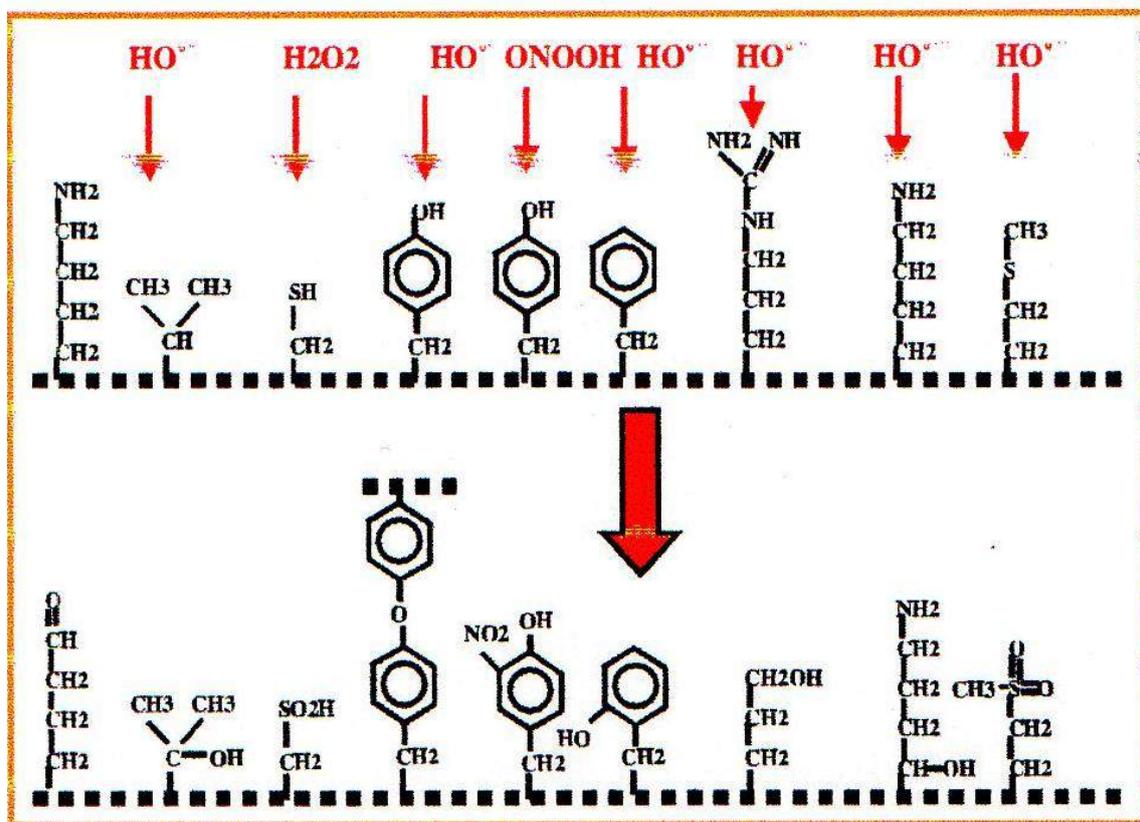


Figure 10 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

3.3. Les acide 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).

Chapitre II : Le stress oxydant

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 10) (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).

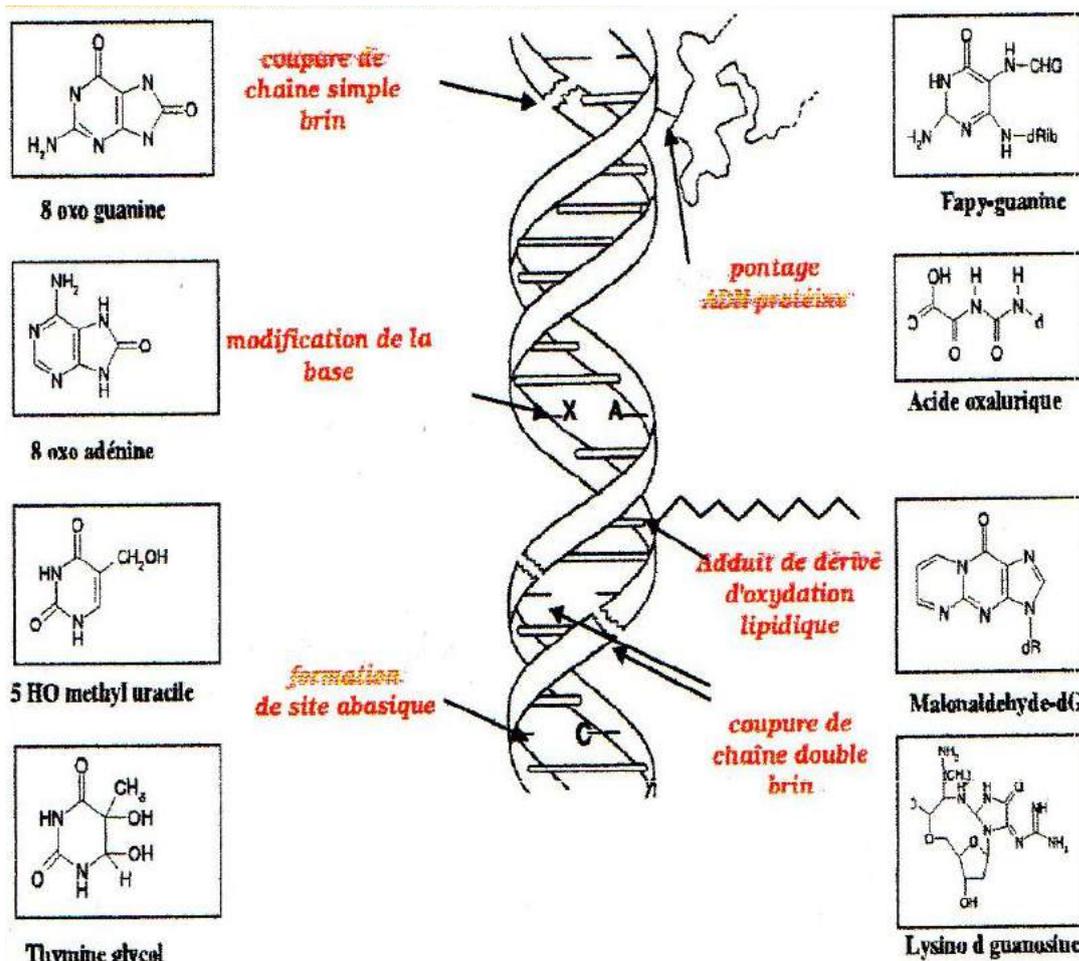


Figure 11 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Favier, 2003)

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 (Bonnetfont- 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 (Bonnetfont-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 11). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou

Chapitre II : Le stress oxydant

extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

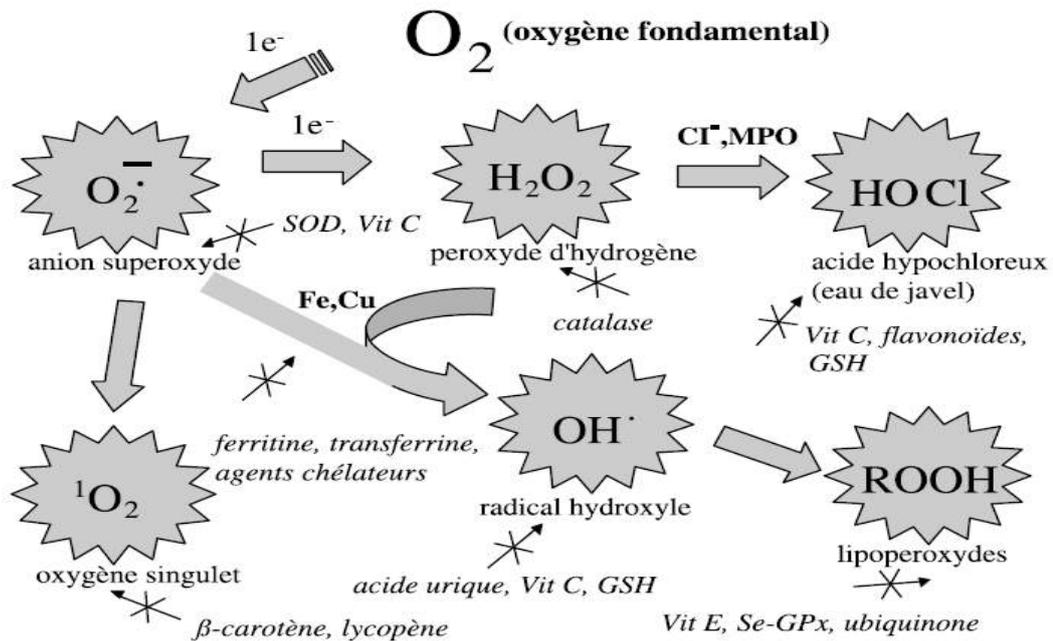


Figure 12 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer *et al.*, 2008).

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 $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , 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).

Chapitre II : Le stress oxydant

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 :

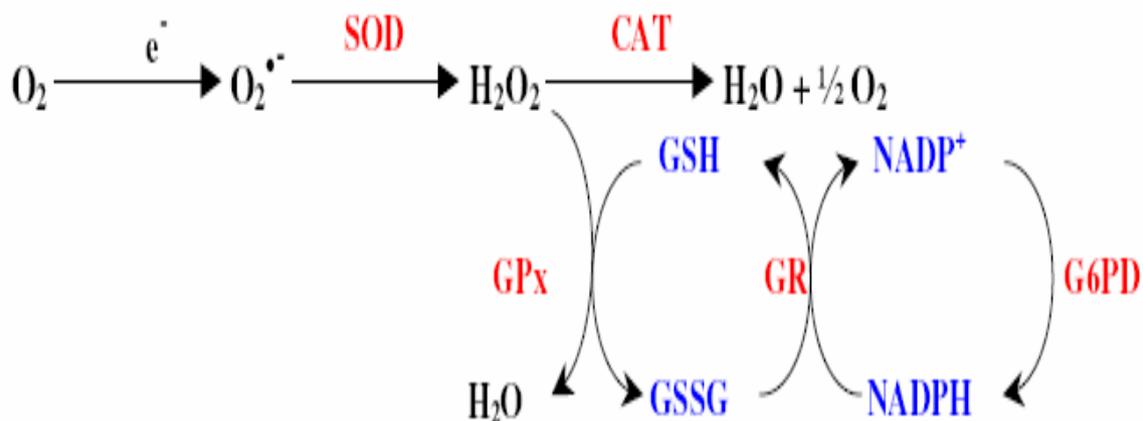


Figure 13 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (Piquet et herbuterne, 2007).

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).

Chapitre II : Le stress oxydant

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 vitamines 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 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 gastrointestinal	Muqueuses intestinal	Antioxydant des muqueuses

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 un 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).

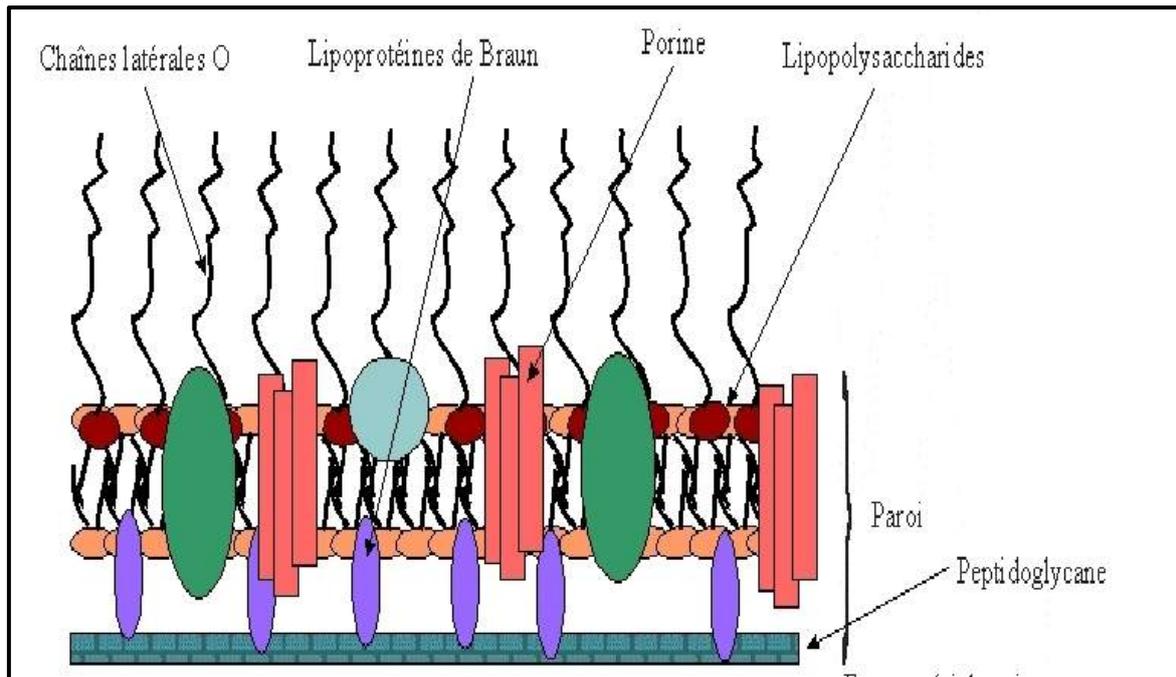


Figure14 : la paroi des bactéries Gram négative

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**)

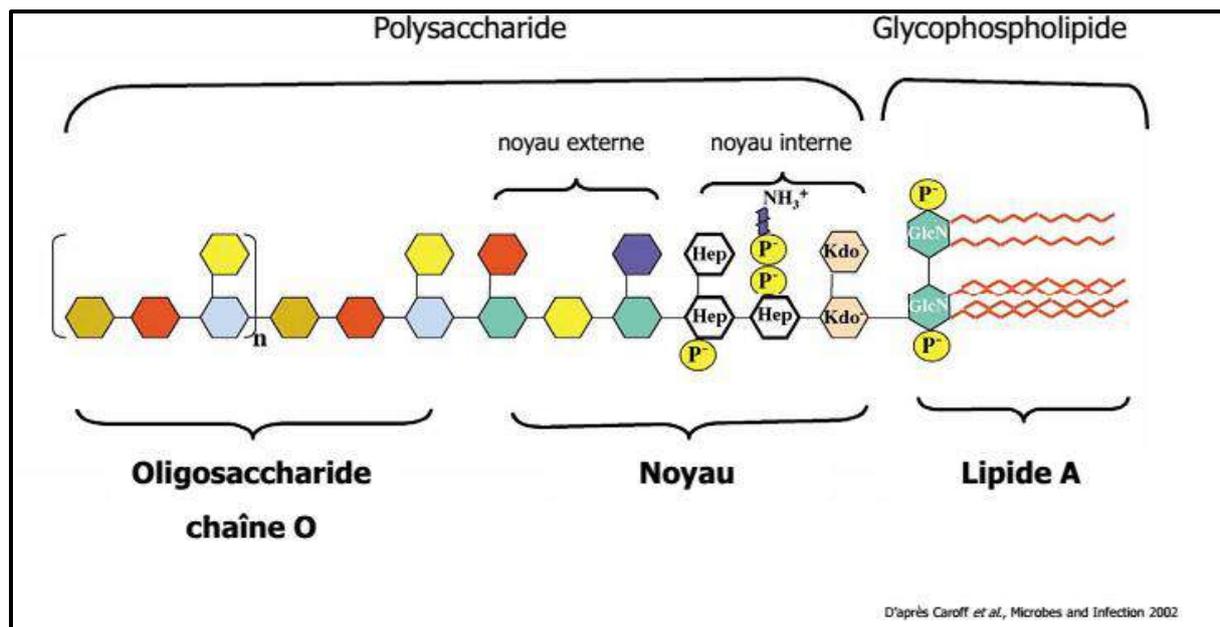


Figure15 : structure schématique de la molécule de lipopolysaccharide

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 $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

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).

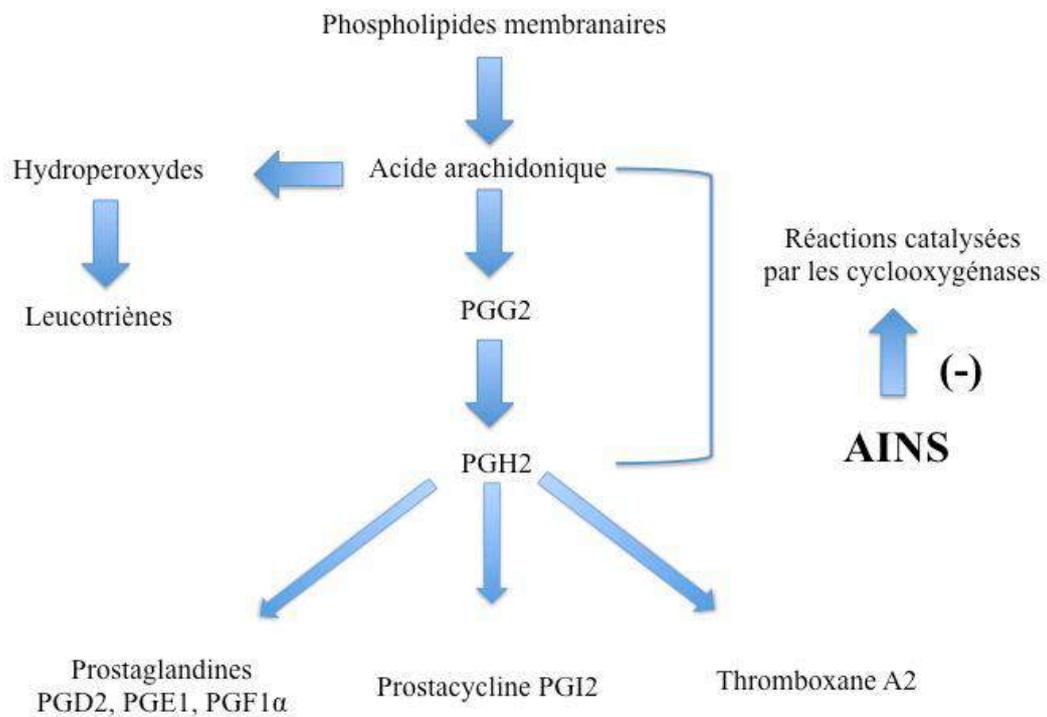


Figure 16: Mécanisme d'action des AINS (Nicolas *et al.*, 2001).

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

1. **Les propriétés du diclofénac**

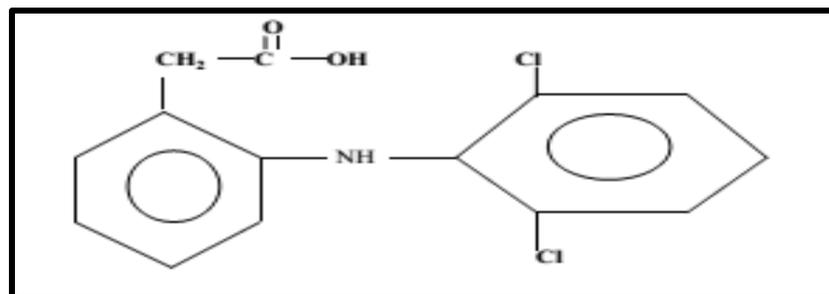


Figure17 : Structure Chimique Formule du Clofenal ou Diclofenac (Schorderet, 1989).

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 la grenade (*punica granatum*)

La grenade (*punica granatum*)

1. Origine géographique

La grenade (*Punica granatum* L.), en latins pomus et granatus, ce qui signifie une tête de série ou de pomme granulaire, originaire de l'Iran à l'Himalaya dans le nord de l'Inde, où elle a été cultivée depuis des milliers d'années. Il y a plus de 1000 cultivars de *Punica granatum*, qui sont passés de l'Iran, à l'est en Chine et en Inde et à l'ouest par la région Méditerranéenne, sur le

sud-ouest américain, la Californie et le Mexique (*Levin, 1994 ; Lansky et Newman, 2007*).

La grenade est globalement cultivée dans de nombreuses régions géographiques, en répondant aux besoins nutritionnels et médicinales des populations des différents pays comme l'Iran, l'Inde, l'Egypte, la Chine, Israël, la Tunisie, la Syrie, le Liban, la Turquie, la Grèce, l'Italie,

la France, l'Espagne, le Chili, le Portugal, les Etats-Unis, Oman et plus récemment en Afrique du

sud (*Al-Said et al., 2009;Holland et al.,2009 ; Fawoleet al.,2011*).

Son nom est dérivé du latin "*granatum*" qui signifie "fruit à grain". La grenade est mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit

est connu et consommé depuis des millénaires (*Calin Sanchez et al., 2012*).

2. Production de grenade

2.1 Production de grenade dans le monde

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000Ha, 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'État (tableau 01) (INRAA, 2006)

Tableau n°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 goût 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**).



Figure n°18 :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 n°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>

5 Activité et intérêt de *punica granatum*

5.1 Activité antioxydantes

Des études *in vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux (**Basu et al.,2009**). Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (**Seeram et al., 2004**).

5.2 Activité anti-inflammatoires

Des études *in vivo* ont démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénase, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l'inflammation),a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. La lipooxygénase, qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de75% par le même extrait (**Schubert, 1999**).

5.3 Activité anticancéreuse

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur (**Albrecht, 2004**). Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose (**Malik,2005**).

5.4 Activité antidiabétique

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL cholestérol en améliorant les ratios total/HDL et LDL/HDL cholestérol. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques (**Esmailzadeh et al., 2006**) sans affecter les paramètres diabétiques (**Rosenblat et al ., 2006**).

5.5 Activité antiulcéreuse

L'écorce de grenade séchée en poudre présente un efficace traitement contre l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac (**Championnière, 1850**). L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500mg/kg d'extrait hydro alcoolique de grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d'inhibition est respectivement de 22,37% et 74,21% pour les ulcères induits à l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol (**Ajaikumar KB et al., 2005**).



Matériels et méthode

MATÉRIELS ET MÉTHODE

1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques

Notre étude a été réalisée sur une plantes médicinales :

 *Punica granatum*

Les méthodes

1.1 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.

1.2. L'extraction des plantes

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.

La Technique d'extraction

9g des poudres obtenues à partir de la 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.

Matériels et méthode

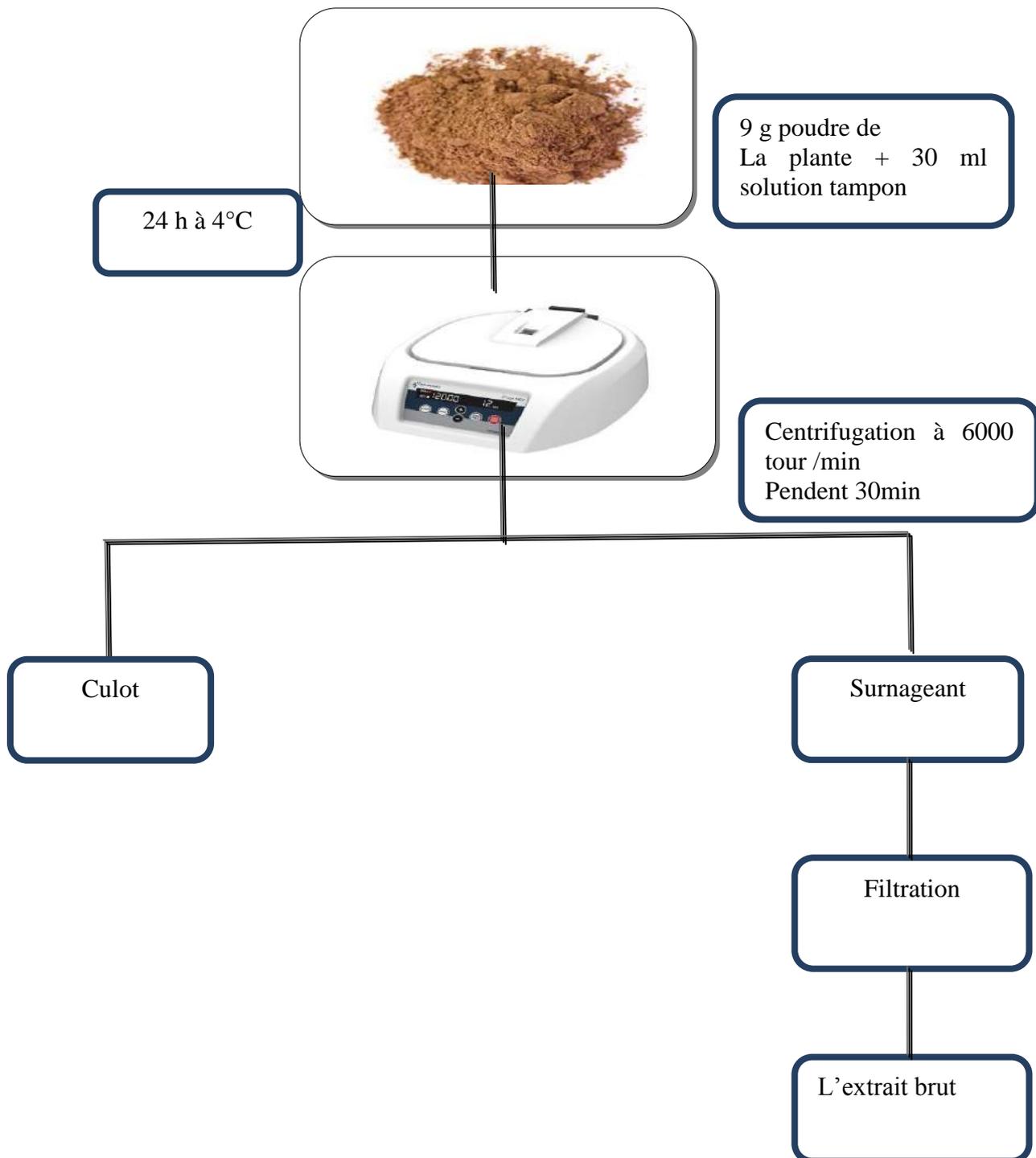


Figure19 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes.

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

2. 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.

2.1. Matériel biologique et conditions d'élevage

Nous avons utilisé 40 rats blancs *Rattus* de la souche *Wistar*, **provenant de l'animalerie de l'université frere mentouri constantint 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 8**.

Tableau 8: 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>	<i>420</i>	<i>42</i>
<i>Soja</i>	<i>260</i>	<i>26</i>
<i>saccharose</i>	<i>210</i>	<i>21</i>
<i>Huile</i>	<i>20</i>	<i>2</i>
<i>Son</i>	<i>60</i>	<i>6</i>
<i>VMV</i>	<i>30</i>	<i>3</i>

2.2. Traitement des rats

La figure 20 illustrent les différentes étapes du protocole expérimental :

Matériels et méthode

Protocole de travail

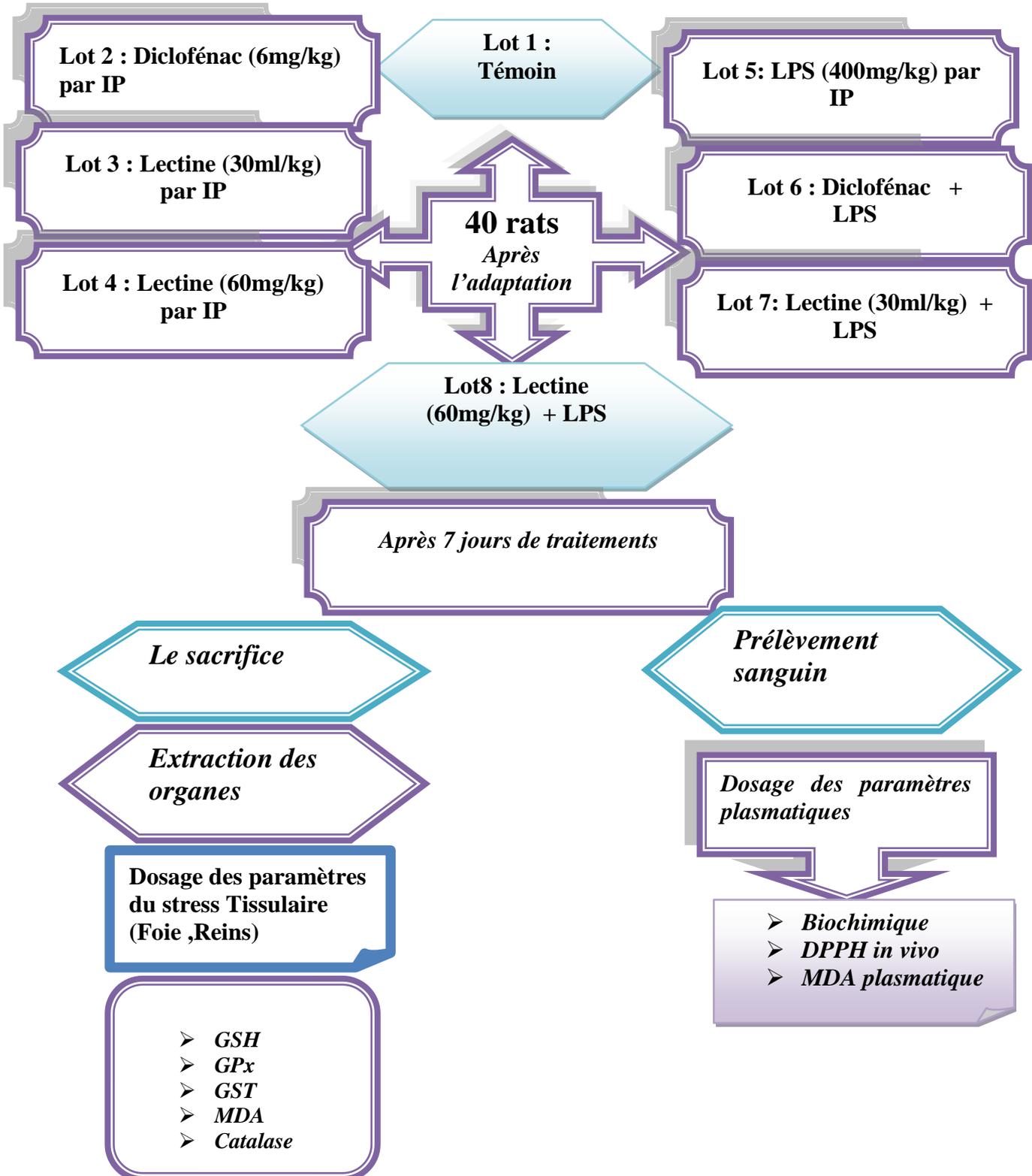


Figure 20 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2.3. Les Méthodes de dosage

2.3.1. 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.

2.3.4. 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) .

2.3.5. 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).

2.3.6 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

Matériels et méthode

obtenu est aliquoté 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 peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 double liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation *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 de la 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 entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340nm de longueur 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 (H_2O_2) (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).

3. Analyse statistique

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

a₁ : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$).

a₂ : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).

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

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

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

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

P : seuil de signification.



Résultats et Discussion

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

1.1. Résultats

Les résultats illustrés dans la figure 21, 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.

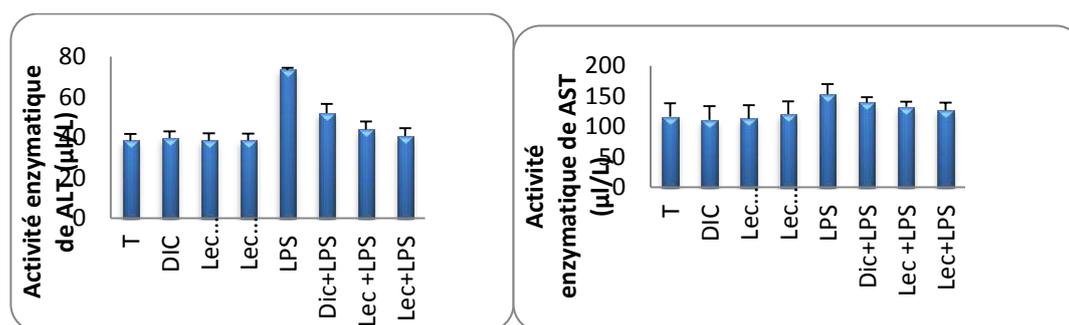


Figure 21 :Variation de l'activité enzymatique de AST et ALT chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement.

1.2. 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).

Résultats et Discussion

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 rats 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 améliorée 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 entraîne 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 \(2013\)](#).

2. Influence du traitement sur la capacité antioxydant plasmatique

2.1. Résultats

Les résultats illustre dans (Fig22) 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.

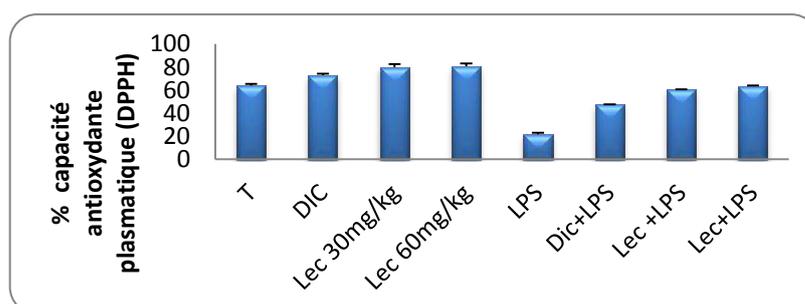


Figure 22 : Variation de la capacité antioxydant plasmatique DPPH chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement.

2.2. Discussion

Résultats et 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 LPS 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 du à l'ensemble de ces substances (Prior et CAO, 1999). La réduction de celui-ci est associée à une profusion des hydroperoxydes plasmatiques chez les rats traités par LPS, marquant l'existence d'un stress oxydatif évident.

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

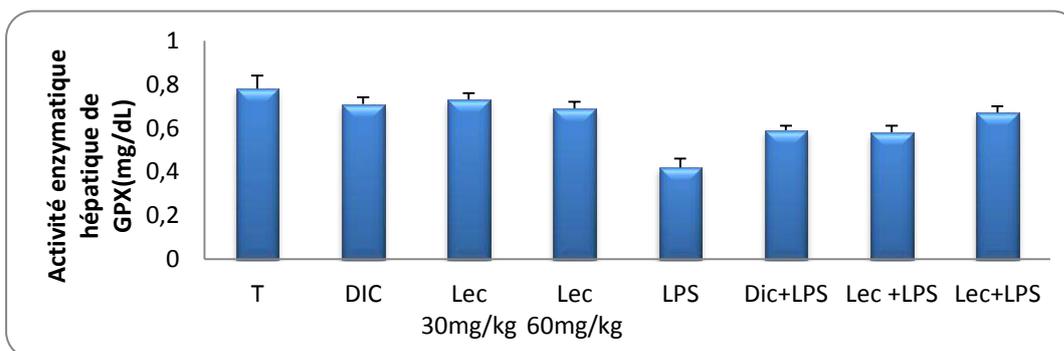
3.1. Résultats

Notons aussi, une diminution non significative de la concentration hépatique du GSH chez tout 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 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 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 hépatique par rapport le témoin. Par contre, on note une augmentation hautement significative dans cette activité comparant au lot traité par LPS seul. (fig 23)



Résultats et Discussion

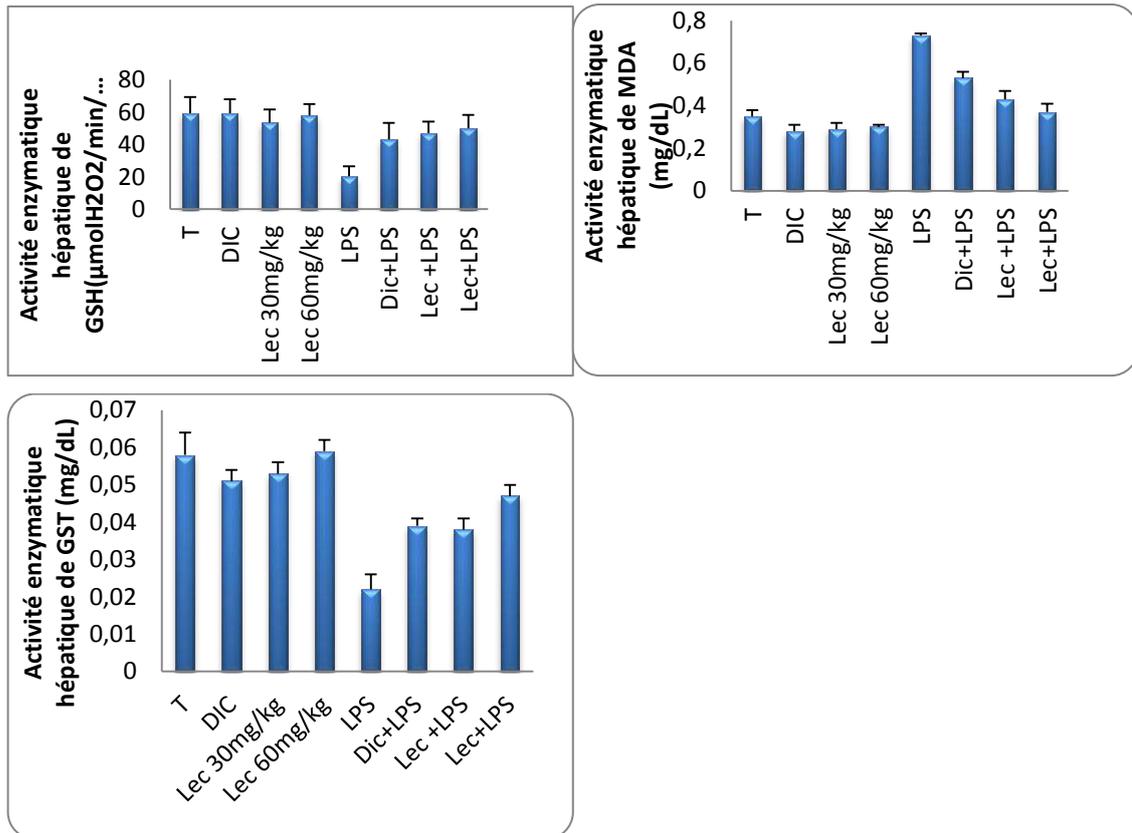


Figure 23 :Variation de taux GSH, MDA, GPX,GST hépatique chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement

3.2. Discussion

Nos résultats confortent ces travaux puisque nous avons mis en évidence une diminution de GSH hépatique et les enzymes antioxydantes (GPx, GST et catalase) dans le foie et augmentation dans le taux de la peroxydation lipidique exprimé par MDA plasmatique 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 hépatique en glutathion (Deepmala *et al.*,2013). L'un des effets malfaisants d'action du LPS

Résultats et Discussion

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 tri peptide 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 foie 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 hépatique (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 le foie 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 nucleique des cellules (formation du radical libre le plus puissant, OH^\bullet). 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 niveau 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

Résultats et Discussion

et al, 2004). Qui est connu pour empêcher l'activité des enzymes antioxydantes en liant à son groupe prosthétique. Ces effets mènent probablement à l'accumulation de H₂O₂ qui réagit avec du O₂ et produit 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 comparés 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 du glutathion rénal et l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GST et catalase) dans le foie suivant l'administration du diclofénac par rapport au témoin, pourrait être à cause de sa propriété pour induire des métallothionéines (protéine riche SH) qui joue un rôle d'un chaperon 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 Chérian, 1991), par conséquent résulte en stress oxydant réduit (Sidhu, 2004 ; Pari et Pasath, 2008). Xia et al (2003) démontrent que le 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 du glutathion et des enzymes antioxydantes après le traitement par les lectines peut être due à la forte teneur 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 scavenger 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 du par sa richesse en grande quantité des antioxydants, particulièrement : les AGPI et insaturés, les polyphénols, les tocophérols, stérols et β-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 peroxy qui est responsable sur la chaîne de la

Résultats et Discussion

peroxydation lipidique. D'autre mécanisme 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 hépatique et plasmatique 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 et de foie 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),

Résultats et discussion

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

4.1. 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 apparaitre 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. 24).

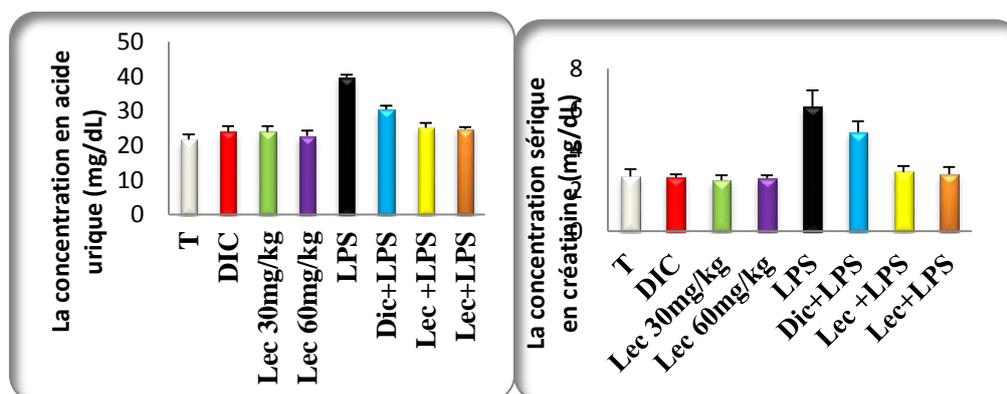


Figure 24 : variation de la concentration sérique créatinine, acide urique chez le lot témoin et les lots traités par (Dic,lect30mg/Kg,lec60mg/kg,LPS,Dic+LPS,lec+LPS,lec+LPS) après 7jours de traitement.

Résultats et discussion

4.2. 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 rats traités 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 traités 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 supplimentation de Lectine avec LPS peut être expliquer par l'amélioration 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 flavonoides .

5. Influence du traitement sur la capacité antioxydant plasmatique

5.1 Résultats

Les résultats illustre dans (Fig 22) présentent une diminution très hautement significative, hautement significative, significative et non significative de DPPH chez les lots

Résultats et discussion

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

5.2. 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 du à l'ensemble de ces substances (Prior et CAO, 1999). La réduction de celui-ci est associée à une profusion des hydroperoxydes plasmatiques chez les rats traités par LPS, marquant l'existence d'un stress oxydatif évident.

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

6.1. Résultats

Noton aussi, une diminution non significative de la concentration rénale du GSH chez tout 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 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 concetration plasmatique et rénale de MDA chez les lots traités par rapport le témoin. En revanche, en 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 etcatalase rénale par rapport le témoin. Par contre, on note une augmentation hautement significative dans cette activité comparant au lot traité par LPS seul.(fig 25)

Résultats et discussion

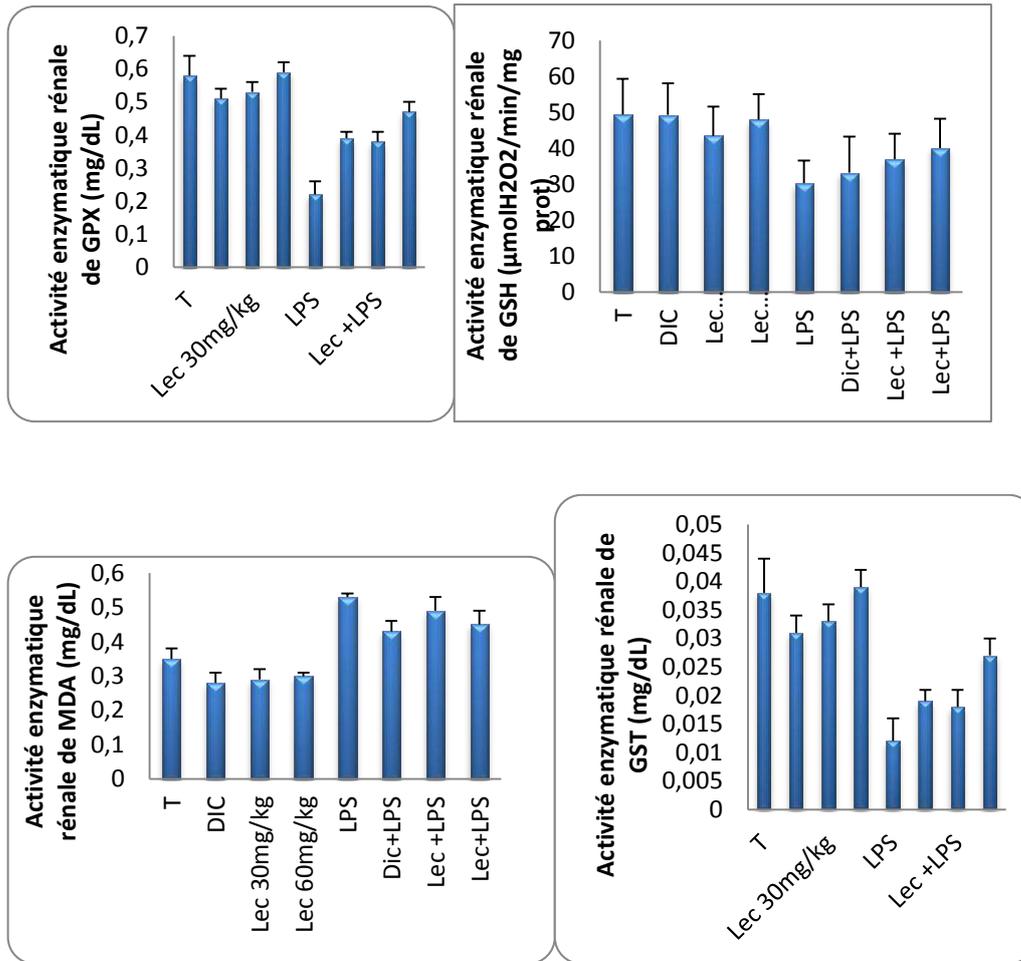


Figure 25 : Variation de taux de GSH, MDA, GPx, GST rénale chez le lot témoin et les lots traités par (Dic, lect30mg/Kg, lect60mg/kg, LPS, Dic+LPS, lec+LPS, lec+LPS) après 7 jours de traitement.

6.2. Discussion

Nos résultats confortent ces travaux puisque nous avons mis en évidence une diminution de GSH rénale et les enzymes antioxydantes (GPx, GST et catalase) dans les reins et

Résultats et discussion

augmentation dans le taux de la peroxydation lipidique exprimé par MDA plasmatique et rénale chez les rats traités par LPS pendant 7 jours comparants aux témoins.

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 (400 µg/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 malveillants 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 lipidique et l'apparition des radicaux libres, qui augmente la susceptibilité des lésions tissulaires importantes dans les différents tissus (Pari et Parath, 2008).

Les cellules possèdent d'autres systèmes de défense antioxydante incluant 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.

À défaut de cette réaction H_2O_2 va réagir avec les ions fer et générer des radicaux hautement toxiques pour les acides nucléiques des cellules (formation du radical libre le plus puissant, OH^\bullet). 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. La catalase est un composant majeur dans le système enzymatique

Résultats et discussion

d'antioxydant fondamental qui catalyse la décomposition de H₂O₂ à H₂O et O₂ et partager cette fonction avec le glutathion peroxydase (Valko et al, 2006). Les niveau 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 antioxydantes en liant a son groupe prosthétique. Ces effets mènent probablement à l'accumulation de H₂O₂ qui réagit avec du O₂ 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 expliquer par son participation dans les réactions inflammatoire dérivant du métabolisme LPS avec le GSH pour former les acides mercapturiques non toxiques excrétés dans les urines.

L'augmentation observée du taux du glutathion rénale l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GST et catalase) dans les reins suivant l'administration du diclofénac par apport le lot témoin, pourrait être à cause de sa propriété pour induire des metallothionenes (protéine riche SH) qui joue un rôle d'un charginard des radicaux libres (viarengo et al, 2000 ; yoshida et al, 2005). Ou son action indirect à réduire les niveaux des espèces réactives d'oxygène, qui est due la plupart du temps de sa haute affinité pour médicament (Klassen et al, 1999 ; Templeton et cherian, 1999), par conséquent résulter en stress oxydant réduit (Sidhu, 2004 ; Pari et Pasath, 2008). Xia et al (2003) démontrent que diclofénac entraîne comme ligand dans la plupart des enzymes antioxydant, surtout GPx et Thioredoxine. L'effet protecteur de médicament contre l'inflammation induit 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'augmentaion de taux du glutathion et les enzymzes antioxydantes après le traitement par les lectines peut être due à la forte teneurs de lectines en composé antioxydants qui inhibent la production des radicaux libres. Une étude récente démontre que les saponines des plantes inhibent la dégradatin du lipide par les radicaux libres, et ont une action antiradicalaire contre les radicaux OH (Alaoui et al, 1998b). d'autre explication peut être du a l'action des certains constituants active de cette plante qui joue un rôle antioxydant et

Résultats et discussion

provoque de scavenger des radicaux libres par le système enzymatique. Les antioxydants de la plante capable d'éliminé ou d'inhiber l'oxydation des lipides et autres molécules cibles a l'action du LPS par l'inhibition de l'initiation ou la propagation de reaction des chaines oxidatives. Le role protecteur de la plante contre le stress oxydatif induit par LPS probablement du par son richesse en grand quantité des antioxydants, particuliaement : les AGPI et insaturé, les polyphénols, les tocophérols, stérols et b-carotène (ref). l'effet antioxydant de la plante peut etre réalisé par plusieurs mechanisme parmi ces mechanisme on peut citer l'effet scavenger de radical peroxy qui est responsable sur la chaine de la peroxydation lipidique. D'aure mechanisme que lectine de cette plante capable de chelater le Cu^{+2} libre et donc réduire la liaison de Cu^{+2} à apolipoprotéines et empachant par la suite la modification des résidus de protéines.

Dans la présente étude le taux rénale et plasmatique de MDA chez les rats traités par LPS est significativement augmenté par apport aux rats témoins. La concentration élevée de MDA est un indice qui suggère qu'il ya une forte peroxydation lipidique au niveau du sérum, des reins suite à l'injection de LPS, cette augmentation de la concentration du MDA , peut etre due à la diminution des antioxydants enzymatique et non enzymatique , comme l'acide ascorbique et le tocophérol qui jouent un role 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),



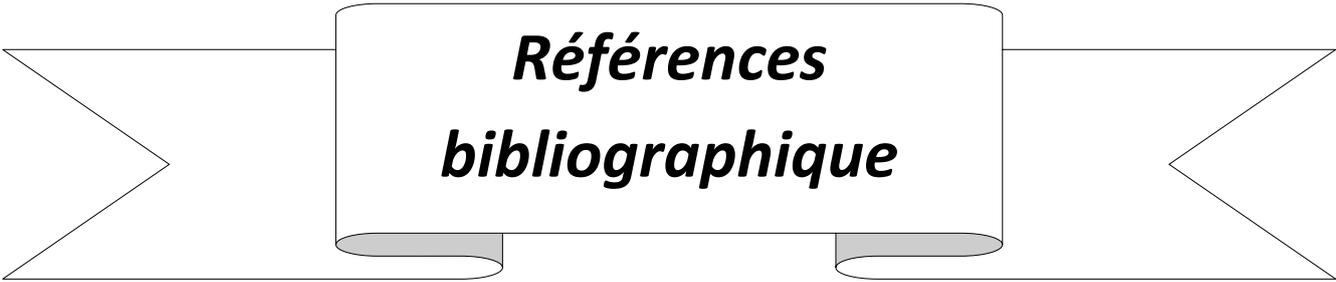
***Conclusion et
perspectives***

Conclusion et perspectives

En conclusion, nos résultats montrent dans un premier temps que l'administration de LPS à 0.25mg/kg de poids corporel par injection Intra péritonéale chez les rats adultes pendant 7 jours, a provoqué des perturbations du système enzymatiques. L'apparition d'atteintes tissulaire causées au niveau métabolique, associée à une perturbation des paramètres biochimiques et immunologiques.

- ✚ L'étude des paramètres biochimiques montrent :
 - Une augmentation de la concentration sérique urée, créatinine, l'acide urique,
 - Une augmentation de l'activité sérique des enzymes transaminases (AST, ALT), LDH chez les rats traités par LPS par rapport aux témoins, ce qui confirme l'effet hépatotoxique.
- ✚ L'étude de la capacité anti-oxydante plasmatique montre
Une diminution de la concentration sérique de DPPH
- ✚ L'étude des paramètres du stress érythrocytaire et tissulaire montre :
 - Une diminution du taux de glutathion, hépatique et rénal chez les rats traité par LPS par rapport aux témoins.
 - Une augmentation de taux de MDA plasmatique, hépatique et rénal chez les rats traités par LPS par rapport aux témoins
 - Une diminution dans l'activité enzymatique de ,GPx, GST et catalase ,hépatique et rénal chez les rats traités par LPS par rapport au témoins.

Ces perturbations enregistrées avec LPS sont améliorées par l'addition des lectines ce qui peut témoigner de l'effet antioxydant et protecteur de ce antioxydant contre l'effet oxydatif du LPS.



***Références
bibliographiques***

Références bibliographique

- Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM et Patel A.2004.** Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food*. 2004 Fall;7(3):274-83.
- Al-Said F.A., Opara U.L. Al-Yahyai R.A. (2009).** Physico-chemical and textural quality attributes of pomagranate cultivars (*Punicagranatum L.*) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering* 90: 129-134
- ALENCAR. N. M., CAVALCANTE. C. F., VASCONCELOS. M. P., LEITE. K. B., Assreuy J (1997).** Role of nitric oxide and superoxide in *G. lamblia* killing. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30(1): 93-99
- Ajaikumar KB Et al.2005.** The inhibition of astric mucosal injury by *Punica granatum L.* (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol.* 4;96(1-2):171-6.
- Championnière Just Lucas.1850.** *Journal de médecine et de chirurgie pratique: à l'usage des mediciens praticiens.* Imprimerie de Crapelet (EDS), Paris, 21p.
- ARAGAO. K. S.** études structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de *Disctyostelium discoideum*. *Biomolécules.* Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France, **2009.** Pp:17-27.
- Abuja PM, Albertini R. (2001).** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins.*Clinica Chimica Acta.* 306, 1-17.
- 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.
- Basu A, Penugonda K.2009.** Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev.*67(1):49-56.
- Boullard B. (1997).** Dictionnaire plantes et champignons. Edition ESTEM, Paris, p : 380. ISBN : 2-909455-99-8.
- Bothan M. B, Weil K. R. (2011)** Biochimie de harper. 4ème édition. DE BOECK : 510.
- Bouchara J-P, Trouchin G. (2003)** Lectines fongiques et adhérence In *Les Mycoses.* Paris: 167.
- Boyd, W.C. and ShaopleiGgh, E, (1954).** Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins) : 119, 419.
- BANWELL. J. G.** Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenrology*, **1983.** 84: 506-515.
- BOYD. W. C., SHAPLEIGH. E.** Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, **1954.** 119 : 419.
- Baskin SI, Salem H. (1994).** Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. *Academic press Inc.* 363, pp 25-62.
- Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences n°3, 22,* 266-72.

Références bibliographique

(2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. *Ann Biol Clin.* 59(4), 453-459.

Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Beaudoux JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J. Barnes P J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clin Sci.* 94. 557-572.

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

Calin Sanchez A. et Carboneli Banaching A.A. (2012). La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les L'aliment fonctionnel du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, p.77.

CHABROL. E., FIESCHI. F., GIRARD. E. caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectines de type C des cellules de langerhans : la langérine. Chimie et sciences du vivant. Université de Grenoble, 2012. Pp: 63-64.

Chrispeels, MJ and Raikhel, NV (1991). Lectins, Lectin genes and their role in plant defense. *Plant cell.* (3): 1-9.

CROCKER. P. R. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. 12: 609-615

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.

Dam TK and Brewer CF. (2002) Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.* (102): 387-429

Drickamer.K. (1993) Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 393-400.

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

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

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

Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, pepys MB, Wood SP. *Nature.* 1994 Jan 27;367(6461):338-45

Edelman G.M, Cunningham B.A, Reeke G.N, Becker J.W, Waxdal M.J and Wang J.L.

Etzler, M.E. (1986) Distribution and function of plant lectins. In Liener, I.E., Sharon, N.,

Références bibliographique

and Goldstein, I.J. (Eds.), *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, Orlando, FL, pp. 371–435.

Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. 2006.

Cholesterollowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J Vitam Nutr Res*. 2006 May;76(3):147-51.

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.

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.

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.

Goldstein I. J, Poretz R. D. (1986) Isolation physico-chemical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins In Liener I. *The lectin: properties, function and applications in biologie and médecine*. ELSEVIER. INC: 49-50.

Gabius H.J, Springer W.R and Barondes S.H. (1985). Receptor for the cell binding site of discoidin I. *Cell*, (42): 449-456.

Goker-Alpan O, Lopez G, Vithayathil J, Davis J, Hallett M, Sidransky E. The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Arch Neurol* 2008;**65**:1353-7

Greer, S. (1985). Cancer: Psychiatric aspects. In: K. Granville-Grossman, K. (Ed.), *Recent advances in Clinical Psychiatry*. Vol. 5, Edinburgh. Churchill 'Livingstone, Chapter 5, 87-104.

GUILLOT. J., GUERRY. M., KONSKA. G., CALDEFIE-CHEZET. F., DE LATOUR. M., PENAULT-LLORCA. F. Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*, **2004**. 91: 141-158

Guénard H et al. (2001). *Physiologie humaine*. 3ème édition. PARDEL : 497

Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory K H. (2007). Oxidative stressinducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo. *Free Rad Res*. 41, 251-9.

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

HIRABAYASHI. J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan

Références bibliographique

profiling. *Glycoconj. J.*, **2004**. 21: 35-40.

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.

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

Imberty A, Varrot A (2008) Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 18: 567–576.

Imberty A, Mitchell E.P, Wimmerová M. (2005). Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr.Opin.Struct. Biol* (15): 525-534.

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.

JAIN. D., KAUR. K. J., SALUNKE. D. M. Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophys J*, **2001**. 80: 2912-2921.

JEYAPRAKASH. A. A., KATIYAR. S., SWAMINATHAN. C. P., SEKAR. K., SUROLIA. A. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol*, **2003**, 332: 217-228.

JAFFE W.G. hemagglutinins (Lectins). In toxic constituents of plant foodstuffs. New – York, Academic Press, **1980**. p: 502.

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

Kamsar,f.,Nakajima,T.,Park,J.H.,S.S.: desing and implementation of aframework for building smart object systems.*J. super comtus* .54(1) , 4-28 (2010)

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

Levin G. M. (1994).Pomegranete(*Punicagranatum*) plant genetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 97:31-37

Lis H., Sharon N. (1998) Lectins: carbohydrate- specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev* **98**: 673-674.

Liener, I. E.; Sharon, N. and Goldstein, I.J., (1986). *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.* Academic Press, Orlando, FL. pp: 600.

LENKA. S., IMBERTY. A., JAROSLAVE. K. modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. *Biologie cellulaire.* Université de Grenoble I. France, **2006**. Pp 56-58.

Références bibliographique

LEFFLER. H., CARLSSON. S., HEDLUND. M., QIAN. Y., POIRIER. F. Introduction

Lopez P, et al. (2003) A novel germ line-specific gene of the phosphatidylinositol-like protein (PhLP) family. A meiotic function conserved from yeast to mice. *J Biol Chem* 278(3):1751-7

Levine RL. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32, 790-796.

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.

Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H.2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;102(41):14813-8.

Meite A., Kauame K.G., Kati-Coulibaly S. (2006) Substances antinutritionnelles. *Méd.Nut* 42(4): 179-187.

MURDOCK. L. L., SHADE. R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectectes. *J. Agric. Food. Chem.* 2002. 50 (22): 6605-661.

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

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

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

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

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

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

NACHBAR. M.S., OPPENHEIM. J. D. Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1980. 33: 2238 -2345.

Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature.* 420, 846-852.

Nicolas JF, Florence C and Jean T. (2001). Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. *John Libbey Eurotext.* 2001, 55-58.

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.

Pontet M. (1996) Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines animales: les galectines. *Immunoanal.Biol. Spéc* 11: 297-305

Références bibliographique

- Peumans W.J., Van Damme J.M.** (1995)-lectine as plant defense proteins. *PlantPhysiol.*, 109,347-352.
- 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.
- Packer T, Ritschler HJ, Wessel K.** (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-378
- Quiroz, I.** (2009). Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente: Antecedentes de Mercado. *Fundacion Chile.*72p. 117
- RENATO DE A, MOREIRA** (1991).Plant lectins, chemical and biological aspects.Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86, Suppl. II, 211-218.
- Robert, 2008** les glycoprotéine in biochimie de harper DEBOECK , 527
- Roberts, J. R. & Hedges, J. R.** (1998). *Clinical Procedures in Emergency Medicine* (3rd ed.). Philadelphia: Saunders.
- RYDZ. N., SWYSTUN. L. L., NOTLEY. C., PATERSON. A. D., RICHES. J. J., SPONAGLE. K., BOONYAWAT. B., MONTGOMERY. R. R., JAMES. P. D., LILLICRAP. D.** The c-type lectin receptor clec4m binds, internalizes, and clears von willebrand factor and contributes to the variation in plasma von willebrand factor levels. *Blood*, 2013. 121: 5228–5237.
- Roos, A.P.W., Schrooten, C., Mullaart, E., Calus, M.P.L., Veerkamp, R.F.** Breeding value estimation for fat percentage using dense markers on *Bos taurus* autosome 14. *J. Dairy Sci.* 2007;90:4821–4829.
- Rosenblat M, Hayek T, Aviram M.**2006. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis.* 2006 Aug;187(2):363-71.
- Schubert SY, Lansky EP, Neeman I.** 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*;66(1):11-7.
- Seeram NP, Lee R, Heber D.**2004. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta*;348(1-2):63-8.
- 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
- sharon N.** (1983) Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Advances in immunology* 34: 213-291.
- Sharon N., Lis H.** (2004) History of lectin : from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.*14, 53R-62R : 11
- Sumner JB,** 1919 The globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis.* *J Biol Chem*

Références bibliographique

37:137-142 21.

Sumner JB and SF Howell , 1936 The isolation of a fourth crystallizable Jack Bean globulin through the digestion of canavalin with trypsin. *J Biol Chem* 113: 007-61

Sharon, and halima lis 2003 lectine kluwer académi publishers

Sharon N., Lis H.(1993)Carbohydrate in cell recognition. *Scientific American*.**268(1)**:82-89.

Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. & Vijayan, M. (1996). *Nature Struct. Biol.* 3, 596-603.

SUTAPA. B. M., GOPA. R. P. exploring plant lectines in diagnostic. Pophylaxis and therapie. *Journal of medicinal plants research*, **2013**. 7(47): 3444-3451

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

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

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.

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

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

TOPFER- PETERSEN. E., ROMERO. E., VARELA. P. F., EKHLASI-HUNDRIESER. m., DOSTALOVA. Z., SANZ. L., CALVETE. J. J. Spermadhesins: a new protein family. (1972) The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* (69): 2580-2584.

Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, H., Goldstein, I. J. & Saper, M. A. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat Struct Biol* 4, 779-783.

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

Van Damme EJ, Peumans WJ, 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: 575-692.
to galectins. *Glycoconj. J.* **2004**. 19: 433-440.

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

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

Références bibliographique

Henri Poincaré 1.

WANG. H., NG. T. G. Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*, **1998**. 253: 143-146.

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

Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol & Med.* 33, 337-349.

Annexe

Annexe 1: préparation du tampon

Préparation de la solution tampon phosphate di-sodique PBS(0.1M;pH7,2)

Pour 5 litres

Produit chimique	Quantité
Di sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	0,435g
Mono sodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	5 g
Chlorure de sodium (Na Cl)	45g
Eau distillée	5L

Annexe 2 : Méthodes de dosage des tests biologiques

1. Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique

Le dosage est basé sur les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 100µl de plasma
- ✚ Ajouter 750 µl 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 1.1.3.3tétrathoxypropane

2. Dosage de radical DPPH in vivo

Brièvement, un volume de 50µl de plasma est additionné à 950µl 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.

3. 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 0,8ml de l'homogénat
- ✚ 0,2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- ✚ Agiter et laisser pendant 15minutes dans un bain de glace
- ✚ Centrifuger a 1000 tours/ min pendant 5min

Annexe

- ✚ Prélever 0.5ml du surnageant
- ✚ 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 412nm contre le blanc réactif

La concentration du GSH est obtenue par la formule suivant :

$$\text{GSH}(\text{nmol/mg protéine}) = \text{DO} * 1 * 1,525 / (13100 * 0.8 * 0.5 * \text{mg protéine})$$

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 (0.5ml surnageant + 1ml tris + 0.025ml DNTB).

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

0.8 : Volume de l'homogénat après déprotéinisation.

0.5 : Volume de surnageant trouvé dans 1.525ml

4. 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 530nm.

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- ✚ Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant)
- ✚ Ajouter 150 µl 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 10 min
- ✚ Prélever 400µl du surnageant
- ✚ Ajouter 80µl du Hcl 0.6M
- ✚ Ajouter 320µl de la solution tris-TBA(tris 26mM, TBA120mM)

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.

Annexe

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

$$(MDA)(nmol/mg\ proteine)=DO*10^6 / \epsilon * L * \chi * Fd$$

C : Concentration en nmol/mg de protéine

DO : densité optique lue à 530nm

ϵ : coefficient d'extinction molaire du MDA=1.56.10⁵M⁻¹cm⁻¹

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

Fd : facteur de dilution Fd=0.2083.

5. Dosage de 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 GSH-Px selon la réaction suivante :



Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes:

- ✚ Prélever 0.2ml de l'homogénat (surnageant).
- ✚ Ajouter 0.4 ml de GSH(0.1mM).
- ✚ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl150 mM pH7.4).
- ✚ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5min.
- ✚ Ajouter 0.2 ml de H₂O₂(1.3mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✚ Ajouter 1ml 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 0.48ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 2.2ml de la solution tampon TBS.
- ✚ Ajouter 0.32ml de DTNB(1.0mM)
- ✚ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412nm.

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

$$\text{GSH.Px}(\mu\text{mol GSH/mg prote\u00e9ine}) = \text{DO \u00e9chanti} * \text{DO \u00e9talon} * 5 / (\text{DO \u00e9talon} * \text{mgprot}) * 0.04$$

DO \u00e9chantillon : Densit\u00e9 optique de l'\u00e9chantillon.

DO \u00e9talon : Densit\u00e9 optique de l'\u00e9talon.

Annexe

0.04 : Concentration du substrat (GSH).

6. Dosage de la glutathion-S-transférase (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 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340nm.

Les réactifs utilisés	Essai (ul)	Blanc (ul)
Tampon phosphate (0.1M,PH6.5)	830	850
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 :

$$\text{GST}(\text{nmolGST}/\text{min}/\text{mg protéine}) = (\text{DO éch}/\text{min} - \text{Do blanc}/\text{min}) / 9.6 * \text{mgprotéine}$$

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

Annexe

7. Dosage de la catalase

Les catalases 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 dis mutation 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 H₂O₂ (500mM) sur 20 μl du S9, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats ont été exprimés en μmol d' H₂O₂ 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 utilisé	Essai (μl)	Blanc (μl)
Tampon phosphate (100Mm,PH7.5)	790	800
H ₂ O ₂ (500Mm)	200	200
Sg (1à 2.5mg prt/ml)	10	0

S9 : la quantité du surnagent doit être déterminé 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 suivant :

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

ϵ : Coefficient d'extinction (= 0.043 mM⁻¹·cm⁻¹).

Annexe

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

X : La quantité des protéines mg/ml.

Fd : 0.02 (facteur de dilution pour le H₂O₂ dans le tampon).

λ : 240 nm.

8. Dosage des protéines tissulaire et érythrocytaires

Mode opératoire

✚ Prélever 0.1ml de l'homogénat.

✚ Ajouter 5ml du réactif coloré (BBC).

✚ Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de la couleur.

✚ Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595 nm contre le blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0 -1mg/ml de sérum albumine de bovin).

L'hépatoprotecteur des lectines extraite à partir d'une plante « *punica granatum* » contre l'inflammation induit par LPS chez les rats

Spécialité : Biochimie appliqué

Résumé:

Les lectines forment une famille de protéines et de glycoprotéines hétérogène qui reconnaissent certaines structures oligosaccharides. Le but de ce travail est de étudier l'hépatoprotecteur des lectine extraites a partir d' une plante *punica granatum* L contre l'inflammation induit par LPS.

On a traités des rats par LPS seul ou combiné avec dichlofénacé et lectine (30mg/Kg) et lectines (60mg/kg), pendant une période de sept jours ,le sang est prélevé ensuite les rats sont sacrifiés et les différents paramètre sont déterminés. A partir de l'analyse de nos résultats, on observe des changements notables dans les paramètres biochimiques, immunologiques. Caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique du urée ,créatinine, acide urique , l'activité enzymatique de AST,ALT, PA L ,et LDH. Ainsi le traitement des rats par LPS entraine une diminution dans la capacité anti-oxydante plasmatique caractérisé par diminution dans le taux DPPH. Nous avons également observé que les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel détoxifiant exprimé par la diminution des taux de glutathion hépatique et rénale,GPx, GST et catalase et une augmentation dans la peroxydation lipidique exprimé par le taux élevé de MDA plasmatique, hépatique et rénale.

Les lectines extraites a partire de la plante *punica granatum* modifié les effet toxiques du LPS et montré que cette antioxydant sont efficace contre le stress oxydant induit par LPS

Mots clés : lectines , rats ,*punica granatum*, l'hépatoprotecteur

Jury d'évaluation :

Président du jury : NECIB Y. (Pr.UFM Constantine)

Rapporteur : BAHY A. (MCB.UFM constantine)

Examineur : DJEMAI ZOUGHLACHE S. (MAA UFM Constantine)

Date de soutenance : 11/07/2021

