

Activités des substances biochimiques

Cours pour Master 2 biochimie appliquée

Introduction

Les métabolites secondaires représentent toute substance présentes chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante par opposition aux métabolites primaires et dont la nature et la teneur peuvent être modifiées par des facteurs abiotiques, facteurs environnementaux spatiaux (exposition, altitude, climat, ...) ou temporels (saison, âge, ...). Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent des dizaines de milliers de molécules différentes classées en familles chimiques telles que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes etc.

Ces composés exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. Ils assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température, etc.), l'attraction des pollinisateurs et participent aux réponses allélopathiques. Par la suite encore, le rôle de métabolites secondaires dans la croissance et le développement est apparu de plus en plus évident (par exemple certains flavonoïdes régulent le transport de l'auxine, une phytohormone qui induit la croissance racinaire).

Les produits naturels ont été utilisés en alimentation et en pharmacologie depuis longtemps. Au fur et à mesure des développements industriels, il y a eu tendance à s'orienter vers les substances chimiques de synthèse. Cependant, il s'est avéré que ces derniers ne sont pas si bénéfiques pour la santé et l'environnement. Actuellement, on cherche à retourner aux produits naturels dans plusieurs domaines industriels (pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique, etc).

1. Activité anti-enzymatique

L'enzyme est toute molécule qui peut augmenter la vitesse d'une réaction. Cette enzyme peut être inhibée par un inhibiteur qui peut, soit empêcher le substrat de se fixer au site actif de l'enzyme ou bien provoquer une déformation du site actif.

1.1. Méthodes de mesure de l'activité enzymatique

Elles consistent à mesurer la variation de la quantité de substrat ou de produit sur une période de temps. Les quantités de substrats ou de produits sont généralement mesurées par spectrophotométrie et comptage de radioactivité, ou, plus rarement par HPLC. Il existe deux approches de base pour mesurer les activités enzymatiques : méthodes à temps fixe et les cinétiques.

1.1.1. Dosage par cinétique

Cette approche consiste à suivre en continu la quantité du composé voulu. à toute fins pratiques, seules les méthodes spectrométriques (colorimétrie, spectrophotométrie, fluorométrie, etc.), potentiométriques (pH, électrode à O₂, etc.) et manométriques (production ou consommation de gaz comme O₂ ou CO₂) sont employées. En effet elles peuvent fournir des valeurs en continu. Il est essentiel, pour les méthodes spectrométriques qu'un des substrats ou produits de la réaction aient des propriétés spectrales (visibles, UV ou IR) utilisables. La méthode typique consiste donc à mélanger les réactifs et la préparation enzymatique dans une cuvette de spectrophotomètre, puis à suivre la variation temporelle du paramètre mesuré (absorption, O₂, etc.) qui s'ensuit.

1.1.2. Dosage à temps fixe

L'autre approche souvent utilisée est celle à temps fixe. Elle consiste essentiellement à mélanger les composantes de la réaction et à incuber durant un certain temps. à la fin de l'incubation (généralement de 30 min à 2 hr), on prélève des échantillons. On y mesurera alors la quantité du substrat ou du produit voulu. On pourra alors calculer la variation de sa concentration en la comparant à celle mesurée au début de la réaction (t₀), puis, sachant la durée de l'incubation, déterminer la vitesse de la réaction. Le dosage du composé peut se faire par des méthodes spectroscopiques, radio-isotopiques ou autres.

1.2. Modes d'action des inhibiteurs enzymatiques

L'inhibition des enzymes peut être réversible ou irréversible. Dans l'inhibition réversible, il y a une liaison non covalente ou covalente (non stable) de l'inhibiteur à l'enzyme par exemple ; l'inhibition compétitive (la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme empêche la liaison du substrat),

l'inhibition incompétitive et l'inhibition non-compétitive (**Figure 01**). Comme elle peut être irréversible ; par liaison covalente stable de l'inhibiteur à l'enzyme.

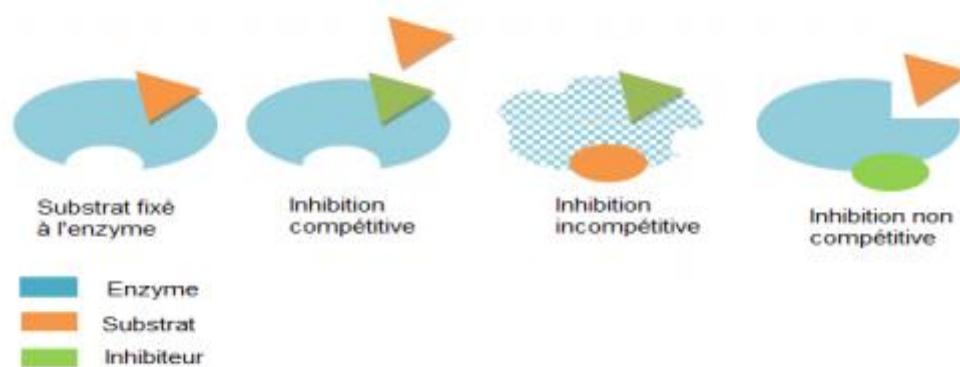


Figure 01. Les différents types de l'inhibition réversible

1.3. Inhibition par les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires interagissent avec l'enzyme cible et l'inhibent. L'inhibition réussie de l'enzyme arrête son fonctionnement normal. Donc, le processus de découverte d'un anti-enzymatique (ex. anti β -lactamase) s'active à partir de la sélection de l'enzyme cible.

De nombreuses enzymes sont inhibées par les flavonoïdes comme la **morine** est abondant dans (du mûrier blanc), la **myricétine** (des raisins) et la **rutine** (du thé).

L'inhibition des β -lactamases est utilisée en pharmacologie afin d'accroître le spectre d'activité des antibiotiques de la classe des β -lactamines. Ce mécanisme est utilisé dans le traitement de certaines infections bactériennes. L'ajout d'un inhibiteur de β -lactamase à un antibiotique de la classe des β -lactamines a alors pour conséquence pour ce dernier de résister à son inactivation par les enzymes bactériennes, ce qui lui permet d'exercer son action antibactérienne, ex. le **kaempférol** et la **quercétine**.

L'action des polyphénols est due d'une part au groupe hydroxyle des polyphénols qui se lie aux protéines empêchant l'action enzymatique. Des tanins condensés inhibent *in vitro* un certain nombre d'enzymes digestives comprenant la trypsine, l' α -amylase et la lipase.

2. Activité antioxydante

2.1. Stress oxydant

C'est un déséquilibre entre la formation des radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser, cela survient s'il y a ;

- Un déficit nutritionnel en antioxydants.
- Une surproduction endogène d'agents pro-oxydants.
- Une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (médicaments, radiations ionisantes, tabac...etc.).

2.2. Mécanisme de l'oxydation

Un radical libre est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules une grande instabilité (**Figure 02**). Pour rechercher la stabilité, les radicaux libres ont tendance à voler un électron de n'importe quelle molécule qui les entoure. Les antioxydants sont des molécules qui fournissent au radical libre l'électron manquant. On appelle antioxydant n'importe quelle substance qui prévient ou ralentit le processus d'oxydation.

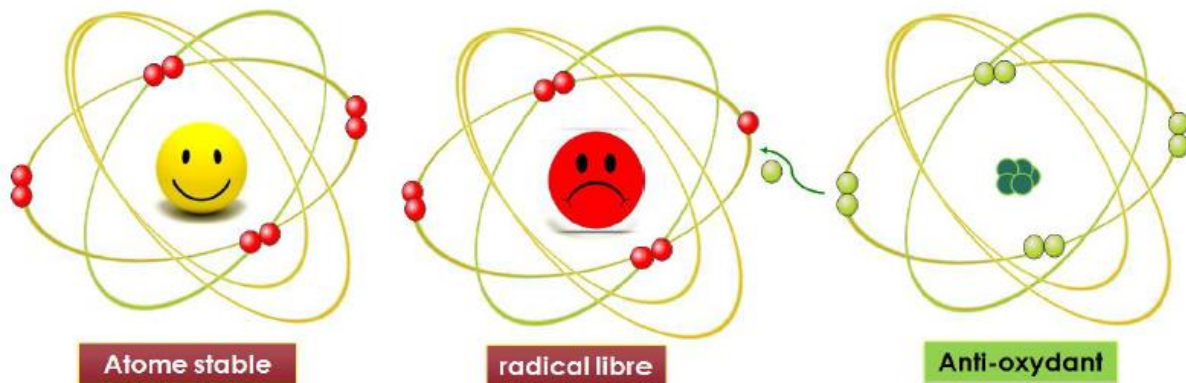


Figure 02. Passage de l'état stable au radical libre et sa stabilisation de nouveau par l'anti-oxydant.

2.3. Sources des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent avoir des sources endogènes ou exogènes (**Figure 03**).

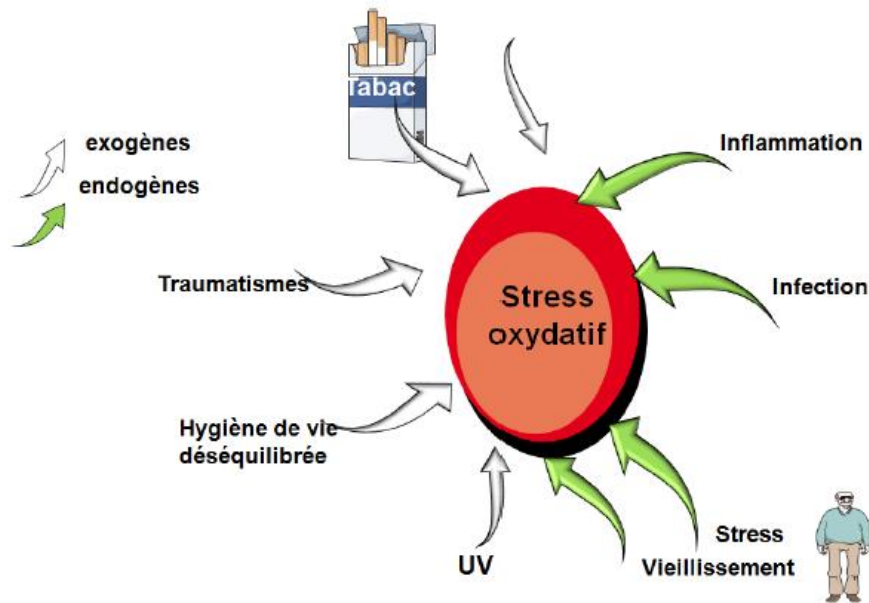


Figure 03. Sources des radicaux libres

2.4. Défense contre le stress oxydant

C'est n'importe quelle substance qui, lorsqu'elle est présente à une concentration faible par rapport à un substrat oxydable, retarde de façon significative ou empêche l'oxydation du dit substrat.

- **Mécanisme enzymatique**

- Superoxyde dismutase (SOD): $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
- Catalase : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
- Glutathion peroxydase : $2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2 \text{H}_2\text{O}$

- **Mécanisme non enzymatique**

- **Endogène** : Composés de faibles poids moléculaires (glutathion, acide urique, bilirubine) et protéines chélatrices de métaux (ferritine, albumine).
- **Exogène** : Composés apportés par l'alimentation (vitamine C et E, **caroténoïdes**, **polyphénols**, **flavonoïdes**).

- **Mécanismes d'action des antioxydants**

- En inhibant la formation des radicaux libres.
- En fixant directement l'oxygène.
- En chélatant les métaux catalyseurs d'oxydation.

2.5. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est évaluée soit par le dosage des produits formés par des techniques photométriques plus ou moins directes, soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres.

Plusieurs tests existent dont : test de DPPH, FRAP, ABTS, β -Carotène, Chélation du feretc.

2.5.1. Test de DPPH

L'activité anti-radicalaire des métabolites secondaires vis-à-vis du radical DPPH est évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune.

2.5.2. Test de blanchissement du β -carotène

Dans le test de blanchissement du β - carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylène de l'acide linoléique. Puis le radical libre va oxyder le β -carotène hautement insaturé. La présence des antioxydants permet de minimiser l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes qui sont neutralisés.

2.5.3. Chélation du fer

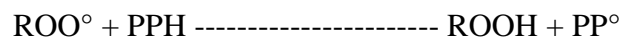
Le pouvoir chélateur du fer est une méthode utilisée pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait donné. En effet, la ferrozine forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel un complexe ferrozine- Fe^{2+} de couleur violette intense. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à chélater cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

2.5.4. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits est mesuré par la réduction directe de $\text{Fe}^{3+} (\text{CN}^-)_6$ en une forme ferreuse $\text{Fe}^{2+} (\text{CN}^-)_6$ qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6]^3$ ayant une forte absorption à 700 nm. La couleur jaune du milieu réactionnel change en vert dont l'intensité est en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié.

2.6. Antioxydants d'origine végétale

Les polyphénols (PP) interviennent lors de l'oxydation des lipides en donnant un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon les réactions :



La **rutine**, le **kaempférol**, la **quercétine**, l'**acide cinnamique**, l'**acide caféique**, l'**acide férulique**, l'**acide gallique** et le **resveratrol**, réduisent l'absorbance des UVB et piègent les radicaux libres.

3. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. Elle est caractérisée par ; la rougeur, la douleur, la chaleur et l'œdème.

3.1. Origines

- **Infection** : contamination par des micro-organismes.
- **Agents physiques** : traumatisme, chaleur, froid, radiations.
- **Agents chimiques** : caustiques, toxines, venins.
- **Corps étrangers** : exogènes ou endogènes.
- **Défaut de vascularisation** : réaction inflammatoire par ischémie.
- Anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité.

3.2. Médiateurs de l'inflammation

- Protéines y compris des protéases.
- Lipides : les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques de l'inflammation

- Radicaux libres.
- Interleukines
- Cyclo-oxygénases

3.3. Métabolites secondaires anti-inflammatoires

Les polyphénols limitent la production d'espèces oxydantes (médiateurs de l'inflammation) et diminuent l'oxydation des macromolécules intervenant dans la restauration de l'inflammation. Le **resvératrol** réduit l'œdème en agissant sur la synthèse des prostaglandines.

3.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

3.4.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

Pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits, l'œdème de l'oreille est induit par le xylène. Quatre groupes de souris sont utilisés dans ce test. Les souris des groupes traités reçoivent 300, 150 et 50 mg/Kg de l'extrait et de l'indométacine (anti-inflammatoire de référence) respectivement par voie orale une heure avant l'induction de l'œdème. Alors que les souris du groupe témoin reçoivent 0,2 ml d'une solution de NaCl 0.9 %. L'œdème de l'oreille est induit par l'application topique de 30 µl de xylène sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris des quatre groupes à l'aide d'une micropipette. L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation par un pied à coulisse digital. La différence de l'épaisseur avant et après l'application du xylène est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$$

3.4.2. Poche d'air

L'induction de la poche d'air est réalisée chez des souris par l'injection de 3 et 1.5 ml d'air stérile lors de la première et la troisième journée de l'expérience, respectivement. Lors de la 7ème journée, les souris reçoivent directement dans la poche d'air 1 ml de NaCl stérile (0.9%), l'extrait (1 mg/ml) et l'indométacine 0.1 mg/ml une heure avant l'induction de l'inflammation aigue par l'injection directe dans la poche d'air de la λ -carrageenan (1%). Tous les produits chimiques et les extraits de plante sont préparés dans le NaCl 0.9% stérile. Quatre heures après l'induction de l'inflammation, les souris sont sacrifiées puis fixées sur une table

chirurgicale et une incision dans la peau du dos a été faite pour percer la poche d'air. La cavité est ensuite lavée avec 1 ml de NaCl stérile contenant de l'héparine (20 UI/ml) et le nombre de leucocytes ayant migrés vers la poche d'air est calculé à l'aide d'une cellule Thoma sous microscope optique.

3.4.3. La stabilité membranaire

La capacité des extraits à protéger la membrane des érythrocytes humains contre l'hémolyse induite par le milieu hypotonique est évaluée dans ce test. Brièvement, 100 µl d'une suspension érythrocytaire diluée à 2 % dans un milieu isotonique (tampon phosphate 10 mM, pH=7.4, 154 mM NaCl) sont ajoutés à 1 ml de chaque extrait (1 mg/ml) dissous dans un milieu hypotonique (10 mM tampon phosphate, pH=7.4, 50 mM NaCl). L'aspirine (0.1 mg/ml) est utilisée comme référence. Le contrôle considéré comme 100% d'hémolyse contient la suspension érythrocytaire avec le milieu hypotonique seul. Après incubation pendant 10 min à température ambiante, une centrifugation est effectuée à 3000 rpm à 4°C pendant 10 min. L'absorbance du surnageant récupéré est détectée à 450 nm. Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est calculé selon la formule suivante: **% inhibition = (A Témoin – A Traité / A Témoin) x 100.**

3.4.4. Inhibition de la dénaturation des protéines

Le principe de cette technique est basé sur la capacité des extraits à empêcher la dénaturation thermique de l'albumine humaine sérique. La dénaturation de l'albumine sous l'effet de la chaleur aboutit à l'expression d'antigènes associés à une hypersensibilité de Type III, réaction impliquée dans des maladies telles que les maladies sériques, la glomérulonéphrite etc.

4. Activité antibactérienne

Les microorganismes présentent l'une des sources principales de pathologies humaines. Ce problème est contourné par les agents antimicrobiens qui peuvent être microbiocides ou bien microbiostatiques.

4.1. Antimicrobiens

Ils sont classés selon leurs natures et leurs modes d'action en :

- **Agents physiques** : rayonnements électromagnétiques (UV, X ou gamma), chaleur et ultrasons.
- **Moyens mécaniques** : filtration et centrifugation.
- **Agents chimiques** : des oxydants (l'eau oxygénée, le chlore et ses dérivés), des halogénés (fluor, brome, iode), des métaux lourds (sels de mercure, composés organiques du mercure, sels d'argent), savons et détergents, colorants et conservateurs alimentaires (sel, sucre, l'acide salicylique, l'acide citrique, épices), des gaz (formol, oxyde d'éthylène et l'ozone).
- **Chimiothérapeutiques** : ce sont les antibiotiques qui doivent agir sur les germes à faibles doses et ne doivent pas être toxiques pour l'organisme traité.

4.2. Mécanismes d'action des antibactériens

Les agents antibactériens agissent de différentes façons, entre autres, sur la paroi et la synthèse protéique (**Figure 04**).

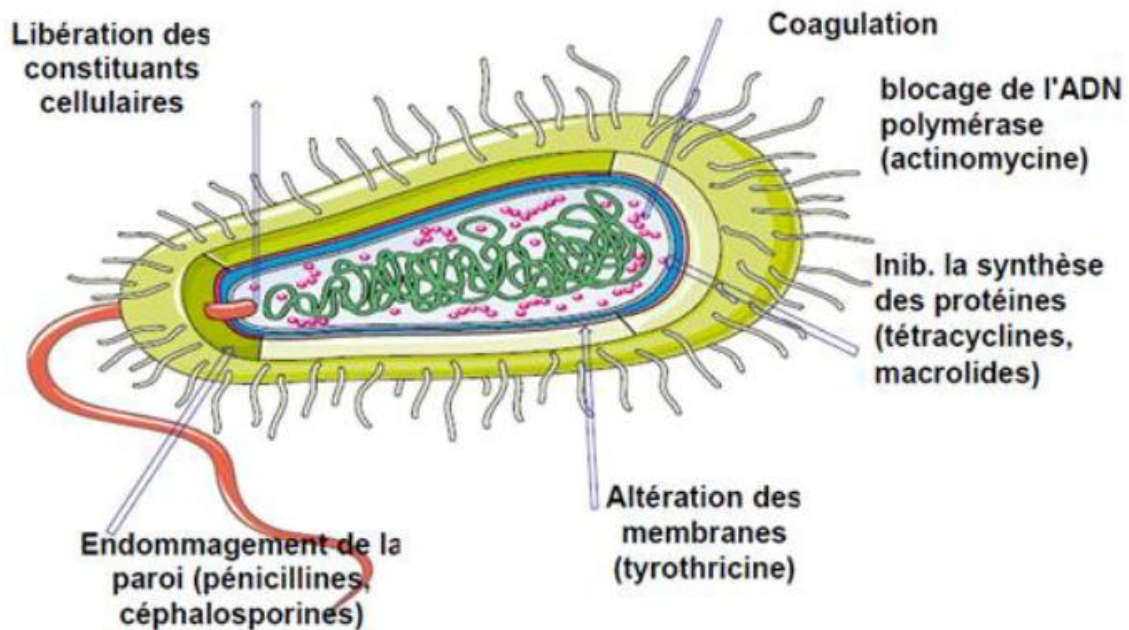


Figure 04. Mécanismes d'action des antibactériens

4.3. Problème de résistance aux antibiotiques

Les microorganismes ont développé beaucoup de mécanismes de résistances aux antibiotiques (**Figure 05**).

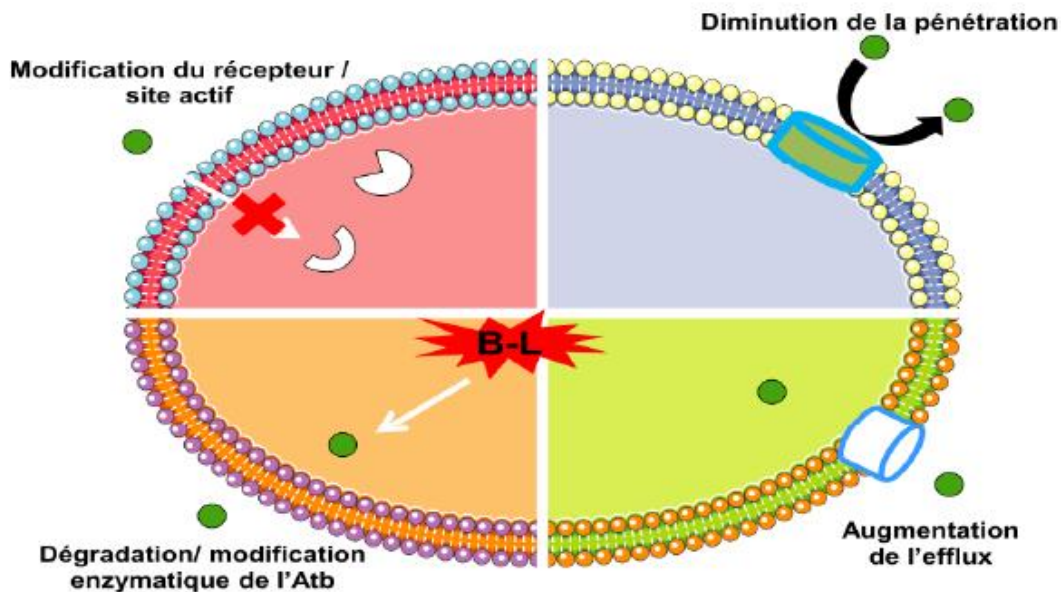


Figure 05. Mécanismes d'action des antibactériens

4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

4.4.1. Méthode de diffusion

C'est un criblage préalable qui vise à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne sans pour autant la quantifier. Le test est réalisé par la méthode de diffusion sur gélose, qui est la même que la technique de l'antibiogramme en remplaçant les disques d'antibiotiques par des disques de papier imprégnés par la substance ou l'extrait à tester. Après l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque. Une souche est dite :

- Sensible si la zone d'inhibition est supérieure ou égale à 15mm.
- Limitée si la zone d'inhibition est inférieure à 15mm.
- Résistante si la zone d'inhibition est nulle.

4.4.2. Détermination des CMI

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne. Son évaluation se fait par la méthode de dilution. Cette technique consiste à inoculer (par un inoculum standardisé) un milieu mélangé à une

concentration précise en extrait. Après incubation, l'observation de la gamme permet de déterminer les CMI.

5. Activité anticoagulante

La coagulation est la succession de réactions qui aboutissent à la formation du réseau de fibrine qui enserre l'amas de plaquettes fixées sur la brèche vasculaire.

- **L'anticoagulant** : c'est un composé chimique qui arrête la coagulation naturelle du sang c'est à dire fluidifie le sang et le rend moins coagulable.
- **L'antiagrégant** : c'est un composé chimique qui empêche les plaquettes de s'agglutiner.
- **Les anticoagulants et leurs mécanismes d'action**

1. Les héparines : inhibent des facteurs de coagulation.

2. Les antivitamines K : inhibent le recyclage de la vitamine K, ce qui conduit à la perte de l'activité enzymatique des enzymes vitamine K dépendants et par conséquent le ralentissent de la vitesse de la coagulation.

3. Les fibrinolytiques : activent la transformation du plasminogène en plasmine qui exerce une action protéolytique sur la fibrine des caillots et aussi sur le fibrinogène (Facteur I) circulant pour prévenir le caillot sanguin.

5.1. Evaluation de l'activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des extraits peut être évaluée *in vitro* vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de deux tests chronométrique globaux, le test de temps de céphalin-kaolin et le test de temps de Quick.

Pour cela, nous avons préparé au préalable un pool de plasmas constitué d'un mélange de plasma de 10 volontaires sains non traités dont les TCK les TQ sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique contenant une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2% à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir

un plasma pauvre en plaquettes. Le mélange de ces plasmas est conservé à basse température (-10°C) jusqu'à son utilisation.

5.1.1. Temps de céphaline-kaolin (TCK)

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes en présence de céphaline, de kaolin et de calcium. 100 µl du plasma est mélangé avec différents volumes des solutions d'extraits (10, 20, 30 µl) préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 100 µl céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est réincubé durant exactement 3 min sous agitation à 37°C. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre par ajout de 100 µl de chlorure de calcium (0,025M) préchauffé. En parallèle, un contrôle positif de l'héparine (0,01 mg/ml) et un test contrôle négatif (NaCl à 0,9%) sont réalisés dans les mêmes conditions. Un allongement du TCK en présence des polyphénols par rapport au contrôle indique un effet anticoagulant au niveau de cette voie.

5.1.2. Temps de Quick ou taux de prothrombine (TP)

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes en présence de thromboplastine calcique. 100 µl de plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37°C est mélangé avec différents volumes des extraits (10, 20, 30 µl), préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 200 µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) est additionné au mélange et le temps de coagulation est alors enregistré à l'aide d'un coagulomètre. En parallèle, un contrôle positif de l'héparine (0,01 mg/ml) et un test contrôle négatif (solution de NaCl à 0,9%) sont réalisés dans les mêmes conditions. Tout allongement de ce temps en présence des polyphénols par rapport au contrôle reflète une activité anticoagulante au niveau de cette voie.

6. Activité antihyperglycémiant

6.1. La glycémie

C'est la présence physiologique de glucose dans le sang, elle est quantifiée en mmol /litre de sang, en mg /dl de sang ou, plus couramment, en g/l de sang. Son taux normal est entre 0.70 et 1.10 g/l. Sa régulation est assurée soit par des hormones (Insuline, glucagon) ou bien par des organes (Foie, reins, pancréas).

6.2. Le diabète

Le diabète sucré se définit selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme un état d'hyperglycémie chronique relevant de facteurs génétiques et d'environnement agissant souvent conjointement. Il existe 04 types de diabète : Diabète de **type 1**, diabète de **type 2**, **gestationnel** et **secondaire**.

6.3. Evaluation de l'activité antihyperglycémiant

Dans le but d'étudier l'étiologie de diabète et en raison de la gravité de ses nombreuses répercussions métaboliques et dégénératives, ainsi pour tester des substances et des principes actifs pouvant avoir un effet sur ce désordre ; les études visant la mise au point des modèles adéquats de diabète chez l'animal. Ces modèles expérimentaux représentent autant de voies d'accès dans la compréhension de la genèse et des complications de cette pathologie. L'installation du diabète chez les modèles animaux se fait soit spontanément soit par induction chimique, chirurgicale, endocrine ou par génie génétique.

6.3.1. Diabète induit par des substances chimiques

Plusieurs substances chimiques sont utilisées pour induire un diabète chez les animaux. Ce sont entre autres : L'alloxane, la streptozotocine, le cyclophosphamide et la pentamidine.

- **l'alloxane** dont la toxicité est due à la production de radicaux libres de l'oxygène.

- **la streptozotocine**, à forte dose, elle détruit les cellules B; à faible dose et répétée, elle induit une insulite suivie de la destruction des cellules B par un mécanisme immunitaire dépendant des cellules T.

6.3.2. Modèles animaux de diabète spontané

Chez le rat BB (rat Wistar Bio Breeding) et la souris NOD (Non Obese Diabetic Mice), l'étiologie est auto-immune et ces deux modèles présentent la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine diabétique de type 1. La plupart de ces modèles sont étudiés pour leur spontanéité à développer un diabète non insulino-dépendant. L'expression phénotypique du syndrome dépend de la souche et des facteurs environnementaux, notamment diététiques. Ces animaux sont génétiquement sélectionnés.

6.3.3. Modèles animaux de diabète induit par inoculation de virus

Certaines infections virales peuvent engendrer un diabète aussi bien chez l'homme que chez l'animal. L'exemple le plus connu est l'infection de la souris par le virus EMC (Encephalomyocarditis). Ce virus entraîne un diabète en pénétrant dans la cellule B. L'ADN viral s'intégrant au génome de la cellule B hôte provoque une altération des fonctions de ces cellules et notamment de la synthèse et de la sécrétion d'insuline.

6.3.4. Modèles animaux de diabète induit par pancréatectomie

La méthode de pancréatectomie chirurgicale induite chez le rat permet de réaliser une ablation de 90% du pancréas endocrine. Les animaux pancréatectomisés maintiennent un poids normal. La glycémie à jeun reste d'abord normale mais, 6 à 7 semaines après pancréatectomie, elle s'élève légèrement et il apparaît, chez ces animaux, une intolérance au glucose.

6.3.5. Les animaux transgéniques

Les techniques de génie génétique ont permis d'obtenir des animaux permettant l'étude du diabète. Le modèle le plus utilisé est le rat Zucker. Il présente une obésité, une insulino-résistance, une hyperinsulinémie, une hyperlipidémie mais une glycémie normale. Son pancréas est hypertrophique, hyperplasique et hypersécrétoire.

6.3.6. Modèles animaux de diabète induit par le régime alimentaire

Ils ont permis de mettre en évidence le rôle de la consommation hypercalorique et de l'âge associés à un manque d'activité physique.

7. Activité antipyrétique

7.1. La fièvre

La fièvre est une réaction non-spécifique de défense de l'organisme développée en réponse à l'action de différents agents déclencheurs appelés des pyrogènes exogènes. Le rôle de la fièvre est celui de signal d'alarme. Les pyrogènes exogènes sont représentés par des agents pathogènes infectieux (bactéries, virus, fungi), certaines hormones (la progestérone) et des médicaments (les vaccins et l'interféron recombinant).

7.2. Traitement de la fièvre

Les médicaments "antipyrétiques" désignent les traitements utilisés dans le cas des fièvres d'origines diverses. Théoriquement les mesures thérapeutiques pourraient s'attaquer à tout niveau dans la « cascade de la fièvre ». Cependant, les agents ayant leur place dans la pharmacothérapie sont principalement le paracétamol et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). La dénomination « anti-inflammatoires non stéroïdiens » regroupe un groupe chimiquement hétérogène qui réunit des substances ayant en commun un effet anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique.

7.3. Test d'évaluation des antipyrétiques

L'induction de la fièvre chez l'animal par injection de substances pyrogènes est le principe fondamental de l'évaluation préclinique de l'action antipyrétique des médicaments.

Après la prise de température rectale, les souris ont reçu, par voie sous-cutanée dans la région dorsolatérale, une suspension aqueuse de levure (20 %) en raison de 1 ml pour 100 g de poids corporel. Ensuite, les animaux ont été mis à jeun. 17 heures après, la température rectale a été prise de nouveau chez chaque souris, et des lots de six souris ont été constitués avec des souris présentant une augmentation de température supérieure ou égale à 1.5 °C. Les lots ont été rendus homogènes quant au niveau de l'hyperthermie. Les différents lots ont reçu par voie orale soit l'eau distillée, soit les extraits (200 et 400 mg/kg) et la substance de référence (paracétamol, 100 mg/kg). Une heure après l'administration des extraits, la prise de température a été faite toutes les heures pendant cinq heures.

Le pourcentage de diminution de la température est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de diminution} : (T_{\text{finale}} - T_{\text{initiale}}) / T_{\text{initiale}} \times 100$$

8. Activité analgésique

8.1. La douleur

L'Association Internationale d'Etude de la Douleur décrit la douleur de la manière suivante : « une expérience sensorielle ou émotionnelle déplaisante liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'un tel dommage. »

8.2. Traitement de la douleur

D'une façon générale pour lutter contre la douleur, on a recouru à des analgésiques ou antalgiques. Ce sont des substances qui abolissent ou atténuent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations.

8.3. Méthodes d'étude de l'activité analgésique

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité analgésique de produits chimiques de synthèse ou des préparations traditionnelles à base de plantes. Ces méthodes sont réparties en deux groupes selon qu'elles soient d'orientation ou d'identification.

8.3.1. Méthodes d'orientation

Le test utilisé est le « Writhing » test ou test de contorsions abdominales chez les souris. C'est un test peu prédictif mais très sensible qui est réservé au criblage « Screening » initial pour ne pas ignorer une substance potentiellement analgésique.

L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 1,2% chez le rat provoque un syndrome douloureux qui se traduit par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et des torsions de la musculature dorso-abdominale (spasmes), qui peuvent être réduites par un produit antispasmodique.

8.3.2. Méthodes d'identification

Les tests utilisés sont plus prédictifs et permettent l'évaluation de l'activité analgésique périphérique ou centrale :

- ✓ Quand la recherche de l'activité analgésique est périphérique, les tests les plus utilisés sont :
 - **Le test d'irritation de la patte du rat au formaldéhyde :**

L'injection d'une substance étrangère de référence, le formaldéhyde, sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure d'un rat entraîne l'apparition d'un syndrome douloureux. Les animaux sont placés dans une enceinte qui permet d'observer la patte traitée. Le temps (en secondes) passé à lécher et à mordre la patte injectée (temps de réaction indicative de la douleur) a été enregistré pour chaque animal dans les deux phases. L'administration préventive par voie intrapéritonéale d'un produit analgésique central ou périphérique réduit

de façon significative l'apparition du syndrome douloureux. Les analgésiques centraux inhibent les deux phases de façon égale, alors que Les analgésiques périphériques inhibent uniquement la seconde phase.

- **Le test de Randall et Selitto :**

Ce test est basé sur la détermination du seuil à la douleur induite par l'application d'une pression uniformément croissante (stimulateur mécanique) sur la patte d'un rongeur, puis l'évaluation du comportement de l'animal qui fige retire son membre et émet des cris.

✓ Quand la recherche de l'activité analgésique est centrale, on utilise :

- **Le test d'Amour et Smith :**

La queue de l'animal est immergée dans de l'eau chaude. Alternativement, une petite région de la queue est chauffée par un rayon calorique, on mesure le temps que met l'animal pour retirer sa queue. C'est une méthode simple qui mesure un réflexe nociceptif spinal. Plusieurs facteurs font varier la réponse de l'animal : température ambiante, température de la peau, variation du flot sanguin.

9. Activité cicatrisante

9.1. La peau

La peau est définie comme étant l'organe de revêtement extérieur du corps de l'homme et des animaux. Elle est constituée de trois tissus superposés : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Ses annexes, localisées dans le derme, sont représentées par les phanères (poils et ongles), les glandes sébacées et les sudoripares. Le derme contient aussi des récepteurs sensoriels à la pression et à la température, associé à un réseau microcirculatoire et de fibres nerveuses.

La peau possède de nombreuses fonctions impliquées principalement dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme, et notamment dans la thermorégulation, la défense contre les agressions extérieures et les agents exogènes. Elle joue également un rôle dans les fonctions sensorielles et métaboliques tel que la synthèse de vitamine D.

9.2. Les brûlures

Une brûlure est une détérioration des tissus de la peau associée à une destruction des cellules ; elle est occasionnée par une chaleur intense, un courant électrique, les rayonnements ionisants (coups de soleil) ou certaines substances chimiques (comme les acides). Les brûlures sont classées selon leur profondeur en :

- **Brûlures du premier degré** : Seul l'épiderme est touché. Des rougeurs et un œdème apparaissent.
- **Brûlures du deuxième degré** : Endommagent l'épiderme et la couche superficielle du derme. La peau est rouge et sensible, et des cloques apparaissent.
- **Brûlures du troisième degré** : Touchent toute l'épaisseur de la peau. Elles sont aussi nommées brûlures profondes. La région brûlée prend une coloration blême (grisâtre) ou noire. Les terminaisons nerveuses ayant été détruites. La **figure 06** illustre les différentes classes des brûlures.

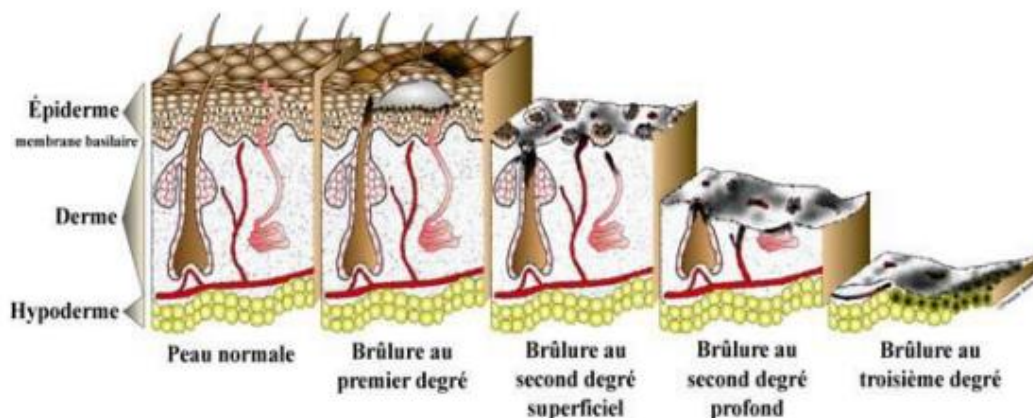


Figure 05 : Classification des brûlures cutanées selon la profondeur

9.3. La cicatrisation

La cicatrisation cutanée est un phénomène biologique très complexe, dynamique, qui se met en place après une blessure de manière à rétablir le plus rapidement possible l'intégrité et l'homéostasie de la peau. La fermeture correcte d'une lésion est possible grâce à la coopération entre de nombreux médiateurs solubles (facteurs de croissance et cytokines), la mise en jeu de différents types cellulaires (cellules inflammatoires, endothéliales, sanguines, épithéliales et immunitaires) et les interactions avec la matrice extracellulaire.

9.4. Evaluation de l'activité cicatrisante

9.4.1. Essais sur les plaies de brûlures thermiques

❖ Brûlures effectuées par un métal chauffé dans l'eau bouillante

Au jour zéro, les lapins ont été anesthésiés après une tranquillisation par voie intramusculaire. Les poils du dos de l'animal ont été rasés avec un rasoir électrique. Ensuite, quatre brûlures ont été faites de part et d'autre de la colonne dorsolombaire de chaque lapin. Une masselotte de 200 g ayant 3 cm de diamètre a été maintenue pendant 3 minutes à l'eau bouillante (100°C) et immédiatement séchée et déposée sur la peau du lapin pendant 15 secondes sans exercer aucune force. Après refroidissement de la pièce métallique ont été réalisées les autres brûlures de la même façon. Immédiatement après la réalisation des brûlures, les substances testées ont été appliquées sur les plaies.

Tous les produits ont été appliqués par voie topique une fois par jour jusqu'à ce que l'épithélialisation complète ait eu lieu. La taille des plaies a été tracée sur un papier transparent chaque trois jours, puis la surface de la plaie a été évaluée. Cette dernière a ensuite été employée pour calculer le pourcentage de contraction de la plaie, en prenant la taille initiale de la plaie, comme 100%, en utilisant l'équation suivante :

$$\% = (\text{Taille de la plaie initiale} - \text{taille de la plaie du jour spécifique} / \text{Taille de la plaie initiale}) \times 100$$

❖ Brûlures effectuées par la plaque chauffante

Les lapins utilisés pour ce test sont anesthésiés après une tranquillisation par voie intramusculaire sur le lieu de l'expérimentation. Le dos de l'animal a été rasé et épilé. Ensuite, une brûlure a été faite en mettant une plaque métallique chauffée à 170°C sur la zone préparée

pendant 10s. Après, 250 mg des extraits d'essai a été appliqués par voie topique à la zone brûlée une fois par jour. La zone brûlée a été mesurée immédiatement après la brûlure et chaque 3 jour jusqu'à ce que l'épithélialisation complète ait eu lieu à l'aide d'un pied à coulisse. Le degré de cicatrisation de la plaie a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Degré de cicatrisation de la plaie (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{Zone de la plaie sur la correspondante jour (cm}^2\text{) Surface /Plaie au jour zéro (cm}^2\text{)}}{\text{Surface /Plaie au jour zéro (cm}^2\text{)}} \right) \times 100$$

9.4.2. Essais sur les plaies de brûlures thermiques

Les propriétés cicatrisantes des extraits sont testées sur des plaies d'excision sur le dos des lapins. Ces derniers sont anesthésiés après une tranquillisation par voie intramusculaire sur le lieu de l'excision. Un lambeau de peau d'environ 17 mm est excisé. Les applications sont faites à raison d'une fois par jour pendant neuf jours. Les plaies ne sont pas protégées par un pansement. Les diamètres des plaies d'excision des différents lots sont mesurés tous les trois jours pendant neuf jours. Les mesures relevées sont mentionnées jusqu'au neuvième jour, ensuite les moyennes des surfaces et les écart types sont calculés.

10. Activités biologiques des anticorps et complément

Les anticorps (immunoglobulines) sont les agents solubles de l'immunité humorale spécifique d'antigène. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B : les plasmocytes.

10.1. Fonctions des anticorps

- Réactions de neutralisation des toxines bactériennes
- Inhibition de l'adhésion bactérienne aux surfaces cellulaires
- Blocage de l'infectiosité des virus : Liaison à l'antigène
- Interactions entre anticorps et cellules dans la réponse humorale
- Activation du complément
- Activation de cellules immunocompétentes

10.2. Système du Complément

Le système du Complément est un des mécanismes de défense contre les infections des plus anciens dans l'évolution. Il intervient non seulement dans la destruction des agents

infectieux et dans l'élimination des complexes immuns, mais aussi dans le contrôle des réponses inflammatoires et la modulation des réponses immunes spécifiques.

La lyse de cellules ou de bactéries par des anticorps nécessite une action « complémentaire » du sérum. Cette activité du sérum est due à un groupe de protéases appelées composantes du complément.

10.3. Rôle des produits naturels issus des plantes sur le système immunitaire

En agissant comme des antimicrobiens, des antioxydants, des anti-inflammatoires, des anti-coagulants...etc., les substances naturelles issues des plantes renforcent le système immunitaire. Cela veut dire l'augmentation de performances générales de l'organisme. C'est un rôle indirect.

Le **D-limonène** possède des propriétés immunomodulatrices, il augmente la production totale d'anticorps, la densité en nombre et en qualité cellulaire de la moelle osseuse chez la souris, et augmente le taux de l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires chez les rats.