

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES ET DE L'INGENIERIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



570 147

no/201

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Option: Biologie moléculaire des procaryotes

Thème : Contribution à l'étude de l'effet de
la vitamine C sur le Diabète

Présenté par : Menai Sihem & Vakou Sabine

Membres de jury :

Président : Benouareth D. E.

Pr. Université de Guelma

Examineur : Boussadia M. I

M.A. Université de Guelma

Encadreur : Hamdiken M.

M.A Université de Guelma

Juin 2010

Remerciements

Avant tous, nos plus sincères remerciements à notre Dieu qui ne cesse de faire ses merveilles dans notre vie, en nous donnant la force et le courage pour réaliser ce travail.

Ce travail a été effectué au laboratoire de biochimie de l'université 08 Mai 1945.

Nos sincères remerciements et nos respects vont à notre encadreur M^{lle} *HAMDIKEN MALIKA*, qui nous a donné l'opportunité de réaliser ce travail. Nous la remercions chaleureusement pour sa patience et sa confiance qu'elle nous a toujours accordée durant ces mois. Nous la remercions également pour sa disponibilité sans faille, ses précieux conseils scientifiques et ses encouragements qui nous ont indiscutablement permis d'évoluer.

Nous tenons à remercier Monsieur *BENOUARETH D.E*, professeur à l'université de Guelma, au département de Biologie, responsable de notre parcours (BMP) qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de notre travail. Qu'il trouve ici l'expression de nos plus profonds respects et toute notre gratitude.

Nos remerciements vont à M^{lle} *BOUSSADIA MERJEM I*, maître assistant à l'université 08 mai 1945 de Guelma pour nous avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce mémoire, tout l'honneur lui revient.

Tous nos remerciements sont à Monsieur *ABDELNOUR*, chef de service du laboratoire d'analyses de polyclinique d'Héliopolis Guelma, à Monsieur *KHAILA.F*, chef du service de laboratoire d'analyse de l'hôpital Ain Larbi

Guelma, grâce à leurs soutiens, nous avons pu approfondir les analyses biochimiques.

Nos remerciements vont également à Monsieur KECHRID ZINE, pour sa gentillesse et pour son aide précieuse durant notre travail.

Nos remerciements vont à Monsieur LAOUAR, professeur à l'hôpital Ibn Roched Annaba et Mlle BOUSSADIA SANA, pour leur compréhension, et leur aide précieuse, Tout l'honneur leur en revient.

Nous tenons à remercier également Monsieur KACHI, Chef du département de biologie université de Guelma, pour son aide formelle et ses conseils précieux. Nous lui exprimons notre profonde gratitude.

Un grand merci à tous ceux qui nous ont soutenus de près ou de loin pour l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

Je voudrais tout d'abord, remercier Dieu de m'avoir donné le courage pour accomplir ce modeste travail, que je dédie :

▸ mon très cher père « Abde el Ghani » et ma très chère mère « Fatima el Zahra » pour l'affection, la patience, l'encouragement, qu'ils m'ont donné pendant toute ma vie, et toutes les épreuves difficiles traversées.

▸ mes adorables frères : Amine, Hakim, Yassine et sa femme : Naima.

▸ mes agréables sœurs : Khadidja, Assia, Amina, Sara, Mouna.

▸ mes tantes et mes oncles (paternel et maternel)

▸ mes cousins : Abde el latif, Mohamed, Abdalah.

▸ mes cousines : Hadjer, Dallel, Ahlem, Safia, Meriem, Fatima.

*▸ mes chères amies : Souad, Hiba, Hafida, Mouna, Amira, Nadia.
ma partenaire dans ce travail, Sabine.*

▸ tous les étudiants de 2^{ème} année master BMP.

▸ tous ceux qui m'aime.

▸ tous ceux que j'aime.

Dédicace

Je voudrais tout d'abord, remercier Dieu de m'avoir donné le courage pour accomplir ce modeste travail, que je dédie :

A mon très cher père « Vakou sigui André » et mes très chères mères « Nou N'guetta Virginie et Koné Douin Véronique » pour l'affection, la patience, l'encouragement, qu'ils m'ont donné pendant toute ma vie, et toutes les épreuves difficiles traversées.

A mon adorable frère : Gaétan

A mes agréables sœurs : Jacqueline, Rita.

A mes tantes et mes oncles (paternel et maternel)

A mes cousins : Ahmed, Vakou.

A mes cousines : Nicole, Marina.

A mes chères amies : Christelle Djédjé, Essi Ana, Mireille, Stephanie, Estelle, Fatim.

A ma partenaire dans ce travail, Sihem.

A tous les étudiants de 2^{ème} année master BMP.

A tous ceux qui m'aime.

A tous ceux que j'aime.

SABINE

Résumé

Dans notre présente étude, nous avons essayé d'étudier l'effet de la vitamine C sur les complications du diabète expérimental induit par l'alloxane chez les lapins de souche *cuniculus lepus*. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur 8 lapins répartis en deux lots de quatre lapins chacun dont les deux lots sont rendus diabétiques par l'injection intraveineuse d'alloxane (100mg/1Kg de poids). La vitamine C est administrée chaque jour par voie orale avec une dose de 100mg/kg de poids pendant 21 jours. Des lapins recevant de l'eau distillée sont utilisés comme témoins et diabétiques non traités. Après trois semaines du traitement, les lapins sont sacrifiés et les différents paramètres sont déterminés.

A partir de l'analyse des résultats, on a observé que le traitement des lapins diabétiques par la vitamine C a montré un effet positif sur le métabolisme glucidique, lipidique et protéique traduisant par une diminution du glucose, du cholestérol, des triglycérides, de l'urée, de la créatinine, de l'activité des transaminases (TGO, TGP) et de la phosphatase alcaline (PAL) avec une augmentation des protéines totales. De plus la vitamine C a renforcé, la capacité de détoxification hépatique liée au glutathion.

L'histologie du pancréas a montré un remarquable effet cytoprotecteur de la vitamine C contre les nécroses induites par l'alloxane au niveau des îlots de Langerhans en préservant la capacité de la sécrétion d'insuline.

Comme conclusion, nous pouvons dire que la vitamine C est doué d'une activité antidiabétique et antioxydante remarquables. De ce fait il peut constituer une solution pour les futures études sur le diabète sucré et ses complications.

Mots clés: Vitamine C, alloxane, diabète expérimental, lapins.

Summary

In our present study, we tried to study the effect of vitamin C on experimental diabetes in *Lepus cuniculus* rabbits. It is an experimental study led to the laboratory on 8 rabbits divided into two groups with four rabbits. The two groups were injected intravenously with alloxane (100mg/1Kg of weight). The first group receiving a daily orally dose of vitamin C (100mg/kg) and the second group receiving distilled water and are used as controls. After three weeks of the treatment, the rabbits are sacrificed and the various parameters are determined.

The results which have been obtained indicated that the treatment of diabetic rabbits by the vitamin C showed a positive effect on the glucidic, lipidic and proteinic metabolism translating by a reduction in glucose, cholesterol, triglycerides, urea, creatinin, activity of transaminases (TCO, TGP) and alkaline phosphatase (PAL) with an increase in total proteins. Moreover the vitamin C reinforced, the capacity of hepatic detoxification related to the glutathion.

The histology of the pancreas showed a remarkable cytoprotector effect of the vitamin C against necrosis induced by the alloxane on the islets of Langerhans led to preserving the capacity of the insulin secretion.

In conclusion, we can say that the vitamin C is endowed with an antidiabetic and antioxydant activity remarkable. This fact it can constitute a solution for the future studies on the sweetened diabetes and its complications.

Keywords: Vitamin C, alloxan, experimental diabetes, rabbits.

المخلص

من خلال الدراسة الحالية حاولنا معرفة تأثير الفيتامين س على مضاعفات مرض السكري التجريبي عند أرانب من سلالة *Lepus cuniculus*.

أجريت الدراسة على ثمانية أرانب مقسمة إلى مجموعتين كل واحدة تحتوي على أربعة أرانب كلها مصابة بالسكري بفعل حقن الألوكسان عن طريق الوريد بجرعة 100مغ لكل 1 كغ، ثم تمت المعالجة لإحدى المجموعتين بالفيتامين س عن طريق الفم بجرعة 100 مغ لكل 1كغ يوميا لمدة 21 يوما بينما الأخرى تلقت الماء المقطر و تركت غير معالجة كشاهدة بعد ثلاثة أسابيع تم ذبح و تشريح الأرانب لتقدير مختلف المعايير. بعد تحليل النتائج لاحظنا بان معالجة الأرانب المصابة بمرض السكري لها تأثير ايجابي على مثابوليزم السكريات، الليبيدات و البروتينات وقد ترجمت بانخفاض نسبة الجلوكوز، الكوليسترول، ثلاثي الغليسريد، اليوريا الكرياتينين و نشاط ناقلات الأمين (TGO, TGP) , الفوسفاتاز القلوي و ارتفاع في نسبة البروتينات المصلية. بالإضافة إلى ذلك فان الفتامين س قد عزز قدرة الكبد على إزالة الجذور الحرة. الدراسة التشريحية للبنكرياس بينت تأثير الفيتامين س على حماية الخلايا β لجزر لانجرهانس ضد الفعل التخريبي لللالوكسان و بالتالي زيادة القدرة على افراز الانسولين.

كخلاصة يمكن القول بان للفيتامين س تأثير مضاد للسكري ومضادة للأكسدة لذا قد يكون حلا للدراسات المستقبلية لمرض السكري ومضاعفاته.

الكلمات المفاتيح: فيتامين س، الألوكسان، السكري التجريبي، الأرانب.

Liste des figures

N°	Titre des figures	Page
01	Mécanisme de l'alloxane induisant la génération des radicaux superoxydes dans la cellule <i>beta</i> du pancréas.	08
02	Déséquilibre du statut antioxydant en faveur du stress.	10
03	Formule semi-développée de l'acide ascorbique.	13
04	Transformation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique par une oxydation.	13
05	Synthèse de la vitamine C.	17
06	Effet de la vitamine C sur les radicaux libres.	25
07	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	28
08	Courbe d'étalonnage de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT/TGO).	41
09	Courbe d'étalonnage de l'Alanine Aminotransférase (ALAT/GTP).	41
10	Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin.	46
11	Gain de poids corporel, concentration sérique du glucose (mg/dl), du cholestérol (mg/dl) et des triglycérides (mg/dl) chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	51
12	Concentration sérique de l'urée (mg/dl), de la créatinine (mg/dl), de l'acide urique (mg/dl) chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	53
13	Activité enzymatique de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT/TGO), de l'Alanine Aminotransférase (ALAT/GTP) et l'activité de la phosphatase alcaline, chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	55
14	Concentration sérique des protéines totales et du glutathion hépatique chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	57
15	Photos des coupes histologiques du pancréas endocrine des lapins diabétiques non traités (DNT) et ceux traités à la vitamine C (DT).	59

Liste des tableaux

N°	Titre des tableaux	Page
01	Quantité de vitamine C en mg selon les aliments.	15
02	Besoins quotidiens en vitamine C.	16
03	Gain de poids corporel, la concentration sérique du glucose (mg/dl), du cholestérol (mg / dl) et des triglycérides (mg/dl) chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	49
04	Concentration sérique de l'urée (mg/dl), de la créatinine (mg/dl), de l'acide urique (mg/dl) chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	52
05	Activité enzymatique de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT/IGU), de l'Alanine Aminotransférase (ALAT/TGP), et l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL), chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	54
06	Concentration sérique des protéines totales (g/dl) et du glutathion hépatique (nmol/mg prot) chez les lapins diabétiques non traités (1) et ceux traités à la vitamine C (2).	56

Table des Matières

Résumé

Partie théorique :

Introduction

Chapitre I : Diabète

1. Historique.....	1
2. Définition.....	1
3. Classification	2
3-1 Diabète de type I (DID).....	2
3-2 Diabète de type II (DNID).....	3
3-3 Diabète gestationnel	3
4. Physiopathologie.....	3
4-1 Diabète de type I.....	3
4-2 Diabète de type II.....	4
5. Facteurs déclenchant le diabète.....	5
5-1 L'hérédité.....	5
5-2 L'obésité.....	5
5-3 Le stress.....	5
5-4 L'âge.....	5
5-5 Les facteurs alimentaires.....	5
5-6 Infection virale.....	5
6. Diabète expérimental.....	6
6-1 Diabète induit par les substances chimiques.....	6
6-2 Diabète induit par pancréatectomie.....	9
6-3 Diabète induit par inoculation de virus.....	9
6-4 Diabète induit par modification génétique.....	9
7. L'augmentation du stress oxydant et la production accrue des radicaux	

libres au cours du diabète.....	10
---------------------------------	----

Chapitre II : Vitamine C

1. Historique.....	12
2. Structure chimique de la vitamine C.....	12
3. Propriétés physico-chimique de la vitamine C.....	14
4. Sources naturelles de la vitamine C.....	14
5. Besoins quotidiens de la vitamine C.....	16
6. Synthèse de la vitamine C.....	17
7. Mode d'action de la vitamine C.....	19
8. Fonctions de la vitamine C.....	20
9. Hypervitaminose C et hypovitaminose C.....	22
10. Propriété antioxydante de la vitamine C.....	24

Partie pratique :

Matériels et méthodes :

1. Matériel biologique et condition d'élevages.....	26
2. Traitement des animaux	27
3. Prélèvement sanguin	27
4. Prélèvement des organes.....	27
5. Dosage des paramètres biochimiques.....	29
5-1 Dosage du glucose.....	29
5-2 Dosage des triglycérides.....	30
5-3 Dosage du cholestérol.....	32
5-4 Dosage des protéines dans le sérum.....	33
5-5 Dosage de l'urée.....	34
5-6 Dosage de la créatinine.....	36

5-7 Dosage de l'acide urique.....	37
5-7 Dosage de l'activité d'Aspartate aminotransférase ASAT (TGO) et d'Alanine aminotransférase ALAT (GPT).....	39
5-9 Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL).....	42
5-10 Dosage du glutathion hépatique(GSH).....	43
5-11 Dosage des protéines hépatiques.....	45
6. Etude histologique.....	46
6-1 Déshydratation.....	46
6-2 Inclusion.....	47
6-3 Coloration.....	47
7. Exploitation statistique des résultats.....	48
Les résultats.....	49
Discussion.....	60
Conclusion générale	
Références bibliographiques	

Produced with ScanTopDF

***PARTIE
THÉORIQUE***

Produced with Scantopdf

Introduction

Parmi les pathologies affectant la population mondiale, on cite le plus souvent l'hypertension artérielle, le sida, les différents cancers (pancréas, sein...). De grands efforts ont été consentis, à juste titre, pour le dépistage, le traitement ou la prévention de ces fléaux. Mais on oublie souvent le diabète dont les pertes humaines et économiques sont équivalentes ou dépassent celui des pathologies citées précédemment.

Le diabète est une affection chronique qui demeure incurable encore aujourd'hui. Il touche une partie active de la population et engendre de multiples problèmes médicaux, économiques et sociaux. Le diabète est lié généralement au stress oxydant, celui-ci est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. Le stress oxydatif n'est autre que le déséquilibre entre les antioxydants et les radicaux libres.

Les radicaux libres sont impliqués dans l'oxydation de plusieurs substances dans l'organisme et particulièrement toxique pour l'intégrité cellulaire, pour se protéger contre cet effet toxique de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de régler la production des radicaux libres, ces systèmes sont composés d'antioxydants enzymatiques (GPx, catalase, SOD ...) ou non enzymatiques comme le GSH, vitamines A, C, E et des oligo-éléments (Sélénium, Zinc, Cuivre,..).

Au cours du diabète, l'hyperglycémie peut induire une production accrue de radicaux libres selon plusieurs mécanismes telle que l'auto-oxydation du glucose, donc cet effet est potentialisé par la réduction de défense antioxydante qui conduira à l'apparition d'un stress oxydant dans les tissus, une telle altération a été rapporté dans plusieurs études in vitro pour tester l'effet thérapeutique des antioxydants qui peut agir dans la prévention de cette maladie dégénérative.

De nombreuses études, ont montré que la vitamine C est un puissant antioxydant permettant de lutter efficacement contre les radicaux libres en excès dans notre organisme et donc de lutter contre les complications du diabète (Robert et Cathcart 1991).

À cet effet, et dans le cadre de notre étude, nous avons étudié l'effet de cette vitamine sur le développement du diabète, par l'évaluation de quelques paramètres physiologiques, biochimiques et histologiques.

La première partie de ce travail s'attache à donner quelques rappels bibliographiques sur le diabète et la vitamine C.

La seconde partie présente les résultats de l'effet de la vitamine C sur le diabète induit chez des lapins en évaluant certains aspects, tels que :

- Le poids corporel
- Le dosage des paramètres biochimiques
- Appréciation des capacités de détoxification à travers le dosage du GSH hépatique
- Etude histologique du pancréas endocrine

Et enfin on discute les résultats obtenus dans cette étude.

CHAPITRE 1

LE DIABÈTE SUCRÉ

Chapitre I : Diabète sucré

1-Historique :

Le diabète est une maladie connue chez les arabes au Xe siècle, Al - Razi (Rhazés) puis ibno sina (Avicenne) décrivent la maladie de façon remarquable et énoncent les premières règles diététiques (Gribe et Merzougui, 2009).

De 1886 à 1892, Von Mering et Minkowski créent le diabète par pancréatectomie. En 1893, Languess attribue aux îlots de langerhans (pancréas endocrine) le pouvoir de sécréter la substance qui manque dans le diabète (Djemili et Nahal, 2009).

Après le développement du concept d'hormones par Ernest Starlig, en 1904, des chercheurs en Allemagne, en Roumanie et ailleurs, concentrèrent leur attention sur l'extraction de l'insuline du pancréas. Frederik Banting et Charles Best, en 1922, injectèrent un extrait pancréatique « insuline » qu'ils venaient de découvrir à un jeune garçon de quatorze ans souffrant de diabète. Ce fut un véritable succès, qui valut le prix Nobel aux deux inventeurs et qui suscita immédiatement une importante demande dans le traitement du diabète jusqu'alors mortel (Djemili et Nahal, 2009). Plus tard, l'insuline est modifiée et d'autres corps hypoglycémisants sont découverts (Sulfamides) (Benlamari et al., 2001).

2 -Définition :

Le diabète sucré n'est pas une maladie homogène. Il s'agit en fait d'un ensemble hétérogène de désordres métaboliques (Portha, 2003) caractérisé par la présence d'une hyperglycémie chronique accompagnée d'une perturbation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique résultant d'un défaut de sécrétion ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (Chevenne et Porquet, 2003 ; Cheng et Fantus, 2005).

En termes plus médicaux et officiels, le diabète est défini par une glycémie supérieure à 1.26g/l (7mmol/l) après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises.

Il est aussi défini par la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associée à une glycémie (sur plasma veineux) supérieure ou égale à 2g/l (11.1mmol/l) (Rodier, 2001).

3 - Classification :

L'ancienne classification des diabètes insulino-dépendant et non insulino-dépendant était fondée sur leur traitement plutôt que sur leur mécanisme causal (Rodier, 2001).

Depuis 1997, une nouvelle classification du diabète sucré a été proposée par Kaneko (American Diabète Association) et adoptée chez l'homme par L'OMS (Hannen, 1996 ; Hannen, 2001), cette classification a été établie d'après une approche pathogénique plutôt que thérapeutique (Spinass et Lehmann, 2001).

On distingue :

3-1 Diabète de type I (DID) :

Le diabète de type I (précédemment insulino-dépendant) est une maladie auto-immune (Rodier, 2001) qui résulte de la destruction progressive des cellules β du pancréas, insulino-sécrétrices, des îlots de Langerhans par des lymphocytes T qui infiltrent les îlots et par des auto-anticorps (Humbel, 2002 ; Oksman et Humbel, 2004). Ce processus a pour conséquence une insulino-pénie progressive qui se manifeste, lorsque plus des 2 / 3 des cellules β sont détruites, par une hyperglycémie permanente et des signes cliniques (Rodier, 2001).

L'origine auto-immune du diabète de type 1 (juvénile) est précisée en 1974 par Gian Franco Bottazzo et Deborah Doniach dans le laboratoire d'Yvan Roitt à Londres. Ces chercheurs montrent par immunofluorescence que les immunoglobulines des malades se fixent sélectivement sur les îlots de Langerhans du pancréas. En 1990, le premier antigène cible est identifié par Steinunn Baekkeskov, la glutamate-décarboxylase (GAD) par la suite, d'autres cibles antigéniques seront identifiées (Humbel, 2002). C'est une maladie qui survient le plus souvent chez des sujets jeunes et qui représente 10 à 15% du diabète.

3-2 Diabète de type II (DNID) :

Le diabète de type 2 (anciennement non insulino-dépendant ou diabète de l'adulte) est un désordre métabolique qui résulte des interactions complexes des facteurs multiples (héréditaires et acquis) et est caractérisé par 2 défauts principaux: d'un défaut de sécrétion de l'insuline et d'un défaut d'action de l'insuline (insulinorésistance) dans divers tissus (muscle, foie et tissus adipeux) (Portha, 2003). Le diabète de type 2 comprend des formes qui vont d'une insulinorésistance prédominante associée à une carence relative en insuline, jusqu'à une insulino-pénie prédominante associée à une insulinorésistance modérée (Chevenne et Porquet, 2003 ; Cheng et Fantus, 2005).

Le diabète de type 2 représente 80 à 90% de l'ensemble des diabètes sucrés. Sa pathogénie est encore plus mal connue que celle du diabète de type 1.

3-3 Diabète gestationnel :

Le diabète gestationnel est décrit comme étant une intolérance au glucose qui se manifeste à des degrés divers au début de la grossesse ou dès que la grossesse est confirmée. Le diabète gestationnel se retrouve dans 3% à 5% des grossesses par rapport à l'ensemble de la population (Rodier, 2001 ; Verma et al., 2002).

Il peut augmenter les risques pour la mère et le fœtus (risque de malformations). Pour 90% des femmes, il disparaîtra après la naissance mais reste un facteur de risque de diabète de type 2 ultérieur. Il peut aussi s'agir d'un diabète de type 1 révélé par la grossesse, ou d'un diabète de type méconnu avant la grossesse (Verma et al., 2002).

4 Physiopathologie :

4-1 Diabète de type 1 :

Le diabète de type 1 est la conséquence de la destruction auto-immune progressive des cellules bêta des îlots de Langerhans (Grimaldi et al., 2003).

La destruction des cellules β est essentiellement due à une infiltration des îlots par les lymphocytes T ($CD4^+$ et surtout $CD8^+$).

Cette inflammation est souvent fugace et est appelée «insulite». Les marqueurs de l'insulite pancréatique sont en effet essentiellement des anticorps bien qu'ils n'aient pas de rôle pathogène propre, ils sont au nombre de quatre :

- ✓ Les anticorps anti-îlots (Islet cell antibody, ICA) présents chez 50 à 80% des patients au début du diabète.
- ✓ Les anticorps anti-GAD (Glutamic Acid Décarboxylase), présents chez 80% des patients ayant un diabète de type 1.
- ✓ Les auto-anticorps anti-insuline, retrouvés surtout chez l'enfant.
- ✓ Les anticorps anti-IA₂ dirigés contre une tyrosine phosphatase membranaire, présentes chez 50 à 75% des patients ayant un diabète de type 1.

L'insulite pré diabétique survient sur un terrain génétique prédisposé (Rodier, 2001).

1.2 Diabète de type 2 :

Il correspond à l'ancienne terminologie de diabète (DNID) et associe :

- ✓ Une insulino-résistance dominante avec insulinopénie relative.
- ✓ Une diminution prédominante de l'insulinosécrétion associée ou non à l'insulino-résistance.

Ces deux anomalies sont d'apparition précoce dans ce type de diabète. La première phase de la maladie consiste en une mauvaise efficacité de l'insuline sur la pénétration intracellulaire du glucose, le glucose s'accumule alors dans le secteur extracellulaire, entraînant une production très augmentée d'insuline en réponse à l'hyperglycémie. L'hyperinsulinisme induit ne permet cependant pas d'abaisser le seuil glycémique et conduit à une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline. Les besoins chroniques accrus en insuline finissent par épuiser les cellules β et conduisent à leur destruction progressive, entraînant finalement une insulinopénie (Weger et Bogardus, 1999).

5- Facteurs déclenchants le diabète :

5-1 L'hérédité :

Les différents types de diabète peuvent être induits par des facteurs héréditaires donc la génétique a une action sur la présentation du diabète (Bakour et Sioune, 2008).

5-2 L'obésité :

Elle est définie par un excès de la masse adipeuse qui représente le facteur de résistance de l'action d'insuline le plus fréquent (Bakour et Sioune, 2008).

5-3 Le stress :

Le stress peut déclencher un diabète chez certaines personnes prédisposées génétiquement, il entraîne : La stimulation du système nerveux sympathique qui entraîne une augmentation de l'activité de l'hypophyse qui a un effet anti-insuline périphérique. Ainsi l'effet du stress sur la glycémie peut varier d'une personne à l'autre. Le stress peut avoir un effet hyperglycémiant, hypoglycémiant ou dans certains cas ne pas affecter la glycémie (Gribe et Merzougui, 2009).

5-4 L'âge :

Plus l'âge est avancé, plus le risque d'apparition du diabète est important dans la population, la sécrétion de l'insuline par le pancréas s'use chez certaines personnes (Gribe et Merzougui, 2009).

5-5 Les facteurs alimentaires :

Le diabète peut résulter d'une suralimentation et surtout d'un déséquilibre alimentaire. Les modifications des habitudes alimentaires, l'augmentation des apports caloriques, l'accroissement de la consommation de graisse saturée et de sucres simples ainsi qu'une carence alimentaire favorisent l'apparition du diabète (Gribe et Merzougui, 2009).

5-6 Infection virale:

Le virus *Coxsackie β* est impliqué dans le déclenchement du DID et les virus des oreillons et de la rubéole dans l'infection congénitale qui attaque la cellule Bêta du pancréas (Gribe et Merzougui, 2009).

6- Diabète expérimental:

Afin d'étudier l'étiologie de ce diabète et en raison de la gravité de ses nombreuses répercussions métaboliques et dégénératives, l'utilisation des modèles expérimentaux représente autant de voies d'accès dans la compréhension de la genèse et des complications de cette pathologie (Popov et al., 2005). Durant ces dernières années, les études entreprises visant à la mise au point de modèles adéquats de diabète chez l'animal, notamment dans le cas de diabète non insulino-dépendant, ont abouti à différents types de modèles obtenus essentiellement chez le rat. L'exploitation de ces modèles de diabète apporte des confirmations en faveur de l'idée selon laquelle les anomalies d'insulino-sécrétion et de la sensibilité à l'insuline seraient secondaires à une réduction plus ou moins marquée de la population de cellules bêta (Patankar et al., 1993 ; Boisson et al., 1995).

Les modèles spontanés sont rares chez l'animal et le type de diabète n'est pas forcément semblable à celui trouvé chez l'homme, certaines souches d'animaux diabétiques principalement des rongeurs ont cependant été créés à des fins médicales.

Les modèles induits sont obtenus par administration d'un agent toxique sur le pancréas endocrine ou par pancréatectomie, leur utilisation est séduisante car il est théoriquement possible d'induire un diabète chez n'importe quel modèle quelle que soit sa taille.

6-1 Diabète induit par les substances chimiques :

L'induction du diabète expérimental chez les animaux par les substances chimiques qui détruisent sélectivement les cellules bêta pancréatiques est très commode et leur utilisation est simple. Les substances les plus habituelles utilisées pour induire le diabète chez l'animal sont l'alloxane et la streptozotocine (Trombetta et al., 2006).

❖ La Streptozotocine :

La streptozotocine (STZ, 2 deoxy-2(3-méthyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) est un antibiotique anti-tumoral de synthèse utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse. Ce médicament toxique pour le pancréas endocrine, est indiqué dans le traitement des adénocarcinomes métastatiques des îlots de Langerhans. Comme les autres agents alkylants, la streptozotocine inhibe l'initiation de la synthèse de l'ADN et elle est faiblement active sur les synthèses de protéines et de l'ARN. Le mécanisme de l'action diabétogène est encore complètement inconnu (Vidal, 2003).

L'administration de STZ à faible dose et pendant Cinq jours consécutifs provoque chez la souris non prédisposée, une destruction des cellules bêta à l'origine d'une insulite et d'un diabète avec une incidence inférieure à 100%. Des anticorps anti-cellules β peuvent être mis en évidence. L'administration unique d'une dose plus importante induit une destruction des cellules pancréatiques et un diabète de type 1 dans 100% des cas (Sénécat, 1996).

❖ la cyclophosphamide :

La cyclophosphamide est un agent alkylant comme la STZ, il agit en réalisant des liaisons covalentes avec l'ADN provoquant une inhibition de la transcription et de la réplication de la macromolécule et aboutissant à la destruction cellulaire (Vidal, 2003).

L'injection de forte dose de cyclophosphamide déclenche l'apparition d'un diabète chez la souris pré diabétique.

Enfin il été montré que la cyclophosphamide peut abroger des mécanismes régulateurs qui préviennent l'activation des cellules T diabétogènes (Yasumami et Bach, 1988 ; Charlton et Bacelj, 1989).

❖ l'alloxane :

L'alloxane (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine, 5,6-dioxyuracil) est un agent exerçant une activité cytotoxique sur les cellules β (Lenzen et Panen, 1988). Comme le produit de sa réduction nommé acide dialurique. L'alloxane établit un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes. Associé à de fortes

doses de calcium cytosolique, il provoque la destruction des cellules β (Szkudelski, 2001).

Cette molécule est utilisée dans plusieurs espèces afin d'induire un diabète (rat, lapin, chien...) et son utilisation peut être couplée à la STZ, dont l'action est également cytotoxique (Anderson et Stitt, 1999; skudelsk, 2001).

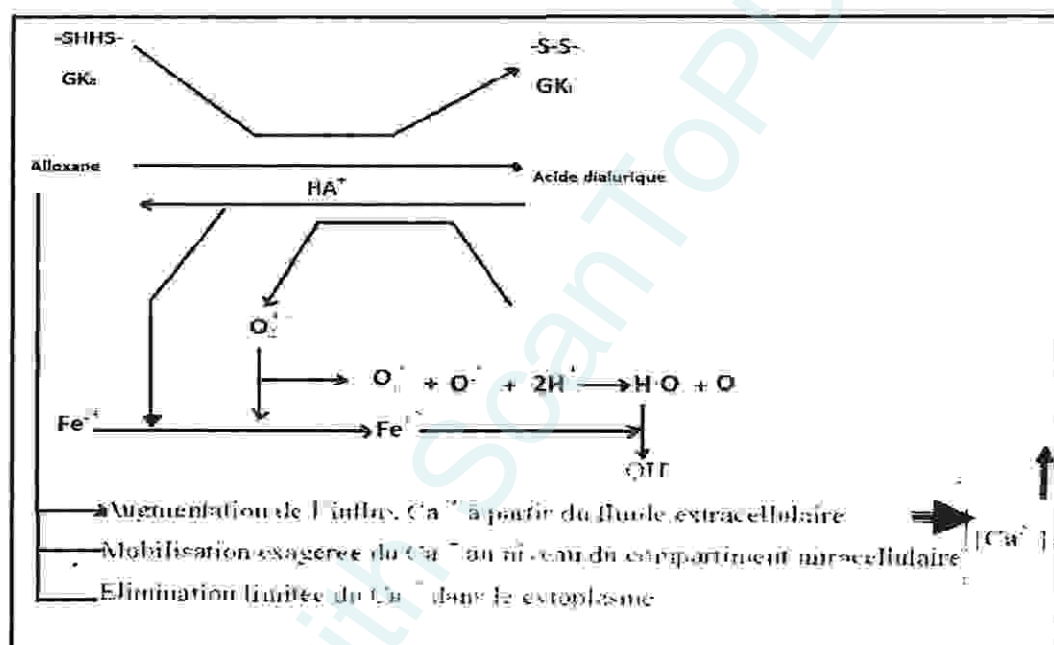


Figure 01 : Le mécanisme d'action de l'alloxane induisant la génération des radicaux superoxydes dans la cellule β du pancréas (Szkudelski, 2001).

GK_a : glucokinase active.

GK_i : glucokinase inactive

HA^\bullet : radicaux d'alloxane

$[Ca^{2+}]_i$: concentration du Ca^{2+} intracellulaire

6-2 Diabète induit par pancréatectomie (chirurgicalement) :

Les modèles animaux induits chirurgicalement et qui sont les plus utilisés dans la recherche sur le diabète humain sont les grands mammifères. Le métabolisme glucidique est en effet assez proche de celui de l'homme. Leur forme autorisant certaines interventions irréalisables chez les rongeurs de laboratoire et leur durée de vie supérieure à celle d'un rongeur, permet de suivre à plus long terme les effets d'un traitement (Oser et Falko, 1984).

L'induction chirurgicale d'un diabète permet de travailler sur l'autogreffe d'îlots, contrairement à la chimio induction qui détruit le pancréas sans que l'isolement des îlots ne soit possible, il s'agit du seul modèle réalisable pour étudier l'autogreffe.

Exemple : le porc possède un grand avantage anatomique : la morphologie de son pancréas permet la réalisation aisée d'une pancréatectomie totale ou partielle (Stump et Smindli, 1988 ; Morel et Kanfman, 1991).

6-3 Diabète induit par inoculation de virus:

Certaines infections virales peuvent engendrer un diabète assez bien chez l'homme que chez l'animal. L'exemple le plus connu est l'infection de la souris par le virus EMC (Encéphalo-Myo-Carditis). Ce virus entraîne un diabète en pénétrant dans la cellule β ; l'ADN viral s'intégrant au génome de la cellule β hôte provoque une altération des fonctions de ces cellules et notamment de la synthèse et de la sécrétion d'insuline (Thérapeutique perspective, 1998).

6-4 Diabète induit par modification génétique :

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 hyper insulinémie, une hyperlipidémie mais une glycémie normale. Son pancréas est hypertrophique, hyperplasique et hypersécrétoire (Vercher, 1996).

On peut également inactiver certains gènes codant pour des molécules intervenant dans le métabolisme insulinique et observer les résultats obtenus concernant :

- ✓ La réduction de l'activité de la glucokinase dans la cellule β .
- ✓ La suppression du transporteur de glucose (Knock ou GLUT₄ mice).
- ✓ L'expression de l'insuline humaine.

Tous ces modèles expérimentaux de diabète démontrent bien que cette maladie possède des traits pathologiques complexes et diverses.

Cependant chaque modèle permet d'étudier un aspect particulier, que ce soit au niveau cellulaire, moléculaire, biochimique ou génétique, en référence à ce

qui est observé chez l'être humain. La mise au point de ces modèles a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie et de l'évolution naturelle du diabète, dans le but de trouver une thérapie antidiabétique.

7- L'augmentation du stress oxydant et la production accrue des radicaux libres au cours du diabète :

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres et les peroxydes, et leur élimination par des systèmes de défenses antioxydantes.

Système

Prooxydant:

Radicaux libres

Peroxydes

,hydroperoxydes

lipidiques

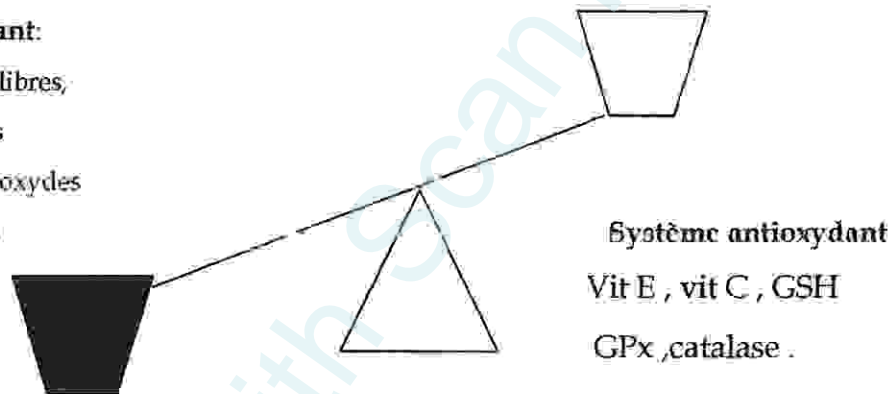


Figure 02 : Déséquilibre du statut antioxydant en faveur d'un stress.

Les radicaux libres non détoxifiés peuvent attaquer différentes cibles comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et engendrer de nombreux dommages cellulaires.

Dans le diabète il a été observé à la fois une diminution des défenses antioxydantes et une augmentation de production de radicaux libres, conduisant à une augmentation des marqueurs du stress oxydant, comme les marqueurs de peroxydation lipidique par exemple.

L'hyperglycémie peut induire une production accrue de radicaux libres selon plusieurs mécanismes.

L'auto-oxydation du glucose a été décrite par Wolff et Dean (1987), il s'agit d'une réaction catalysée par les métaux de transition et au cours de laquelle sont produits des anions superoxydes (O_2^-).

Le glucose dans sa forme ouverte est en effet capable de s'enoliser et de réduire des métaux de transition. Le radical énediol formé peut être ensuite oxydé en dicarbonyle et induire la formation d'anions superoxydes, précurseurs du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($HO\cdot$) très réactif.

L'hyperglycémie induit également une augmentation du rapport $NADH/NAD^+$, notamment par l'activation de la voie des polyols. Or le $NADH$ est cofacteur de différentes enzymes catalysant des réactions génératrices de radicaux libres, c'est le cas par exemple de la prostaglandine hydroperoxydase ou encore de la $NADH$ oxydase (Kukreja et al., 1986 ; Ellis et al., 1998).

Des ROS (dérivés actifs d'oxygène) sont également libérés suite aux réactions de glycation de protéines, lipides ou acides nucléiques.

L'effet de la production accrue de ROS est potentialisé par la réduction de défenses antioxydantes. Une diminution des défenses antioxydantes enzymatiques (GPx (glutathion peroxydase), catalase, SOD (superoxyde dismutase)) ou non enzymatiques comme le GSH, la vitamine E, la vitamine C, peut conduire à l'apparition d'un stress oxydant dans les tissus. Une telle altération a été rapportée au cours du diabète et dans plusieurs études, in vitro, en présence du glucose (Ceriello et al., 1993).

L'augmentation du stress oxydant au cours du diabète a donc été principalement démontrée par une augmentation des dommages causés par les radicaux libres sur les protéines et les lipides (Gallou et al., 1994 ; Griesmacher et al., 1995 ; Nourozadeh et al., 1995 ; Jain et al., 1998 ; Hartnet et al., 2000).

CHAPITRE 2

LA VITAMINE *C*

Chapitre II : Vitamine C

1-Historique :

Le scorbut est une maladie qui, au cours de l'histoire a causé plus de souffrances. Elle a ainsi raccourci la durée de vie de l'homme. (Stone, 1972).

En 1912, une hypothèse a été émise (Funk, 1912) sur le fait que le scorbut était une maladie de carence due à un manque, dans l'alimentation, d'une substance inconnue soluble dans l'eau, appelée vitamine C. Cette hypothèse fut confirmée en 1932 par l'un des pionniers de la recherche, Szent-Györgyi, qui en collaboration avec d'autres chercheurs, donna la preuve que cette vitamine C possède un effet antiscorbutique ; ils l'appellent donc vitamine antiscorbutique.

Il reçut à cet effet en 1937 le prix Nobel pour ses travaux. (Svirbely et Szent-gyorgyi, 1932). En outre ils l'ont trouvé identique avec les cristaux qu'ils avaient obtenus du jus de citron.

En 1959, Burns démontra que la lésion biochimique de base dans les mammifères sensibles au scorbut est due à leur incapacité à produire les actifs enzymes, dont la L-oxydase gulonolactone qui est impliqué dans la conversion de la glycémie en acide ascorbique dans le foie. Cette synthèse implique plusieurs enzymes, l'homme ne possédant pas la totalité de ces enzymes dans le foie, cela bloque complètement la production hépatique de l'acide ascorbique (Burns, 1959).

2-Structure chimique de la vitamine C :

La vitamine C, de formule chimique ($C_6H_8O_6$), de masse molaire (176,13 g/mol) a une structure apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone. Il existe plusieurs stéréo-isomères de configuration de la vitamine C et seul l'acide l-ascorbique est actif (Claude, 2003).

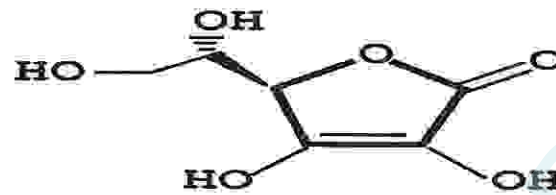


Figure 03 : Formule semi-développée de l'acide ascorbique (Damien et al., 2002)

La vitamine C, ou acide ascorbique, peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. Sa caractéristique essentielle est d'exister sous trois degrés d'oxydoréduction différents : la forme réduite ou acide ascorbique, la forme semi-réduite ou mono-oxydée, appelée acide mono-déhydro-ascorbique et la forme oxydée ou acide déhydro-ascorbique.

L'acide mono-déhydro-ascorbique est un radical anion relativement inerte, ne réagissant pas avec l'oxygène car il est stabilisé par résonance (effet mésomère) et formation d'une liaison hydrogène intra-moléculaire.

L'agent oxydant habituel est l'oxygène dont l'activité est catalysée par des traces de métaux comme le cuivre et le fer (Allain, 2008).

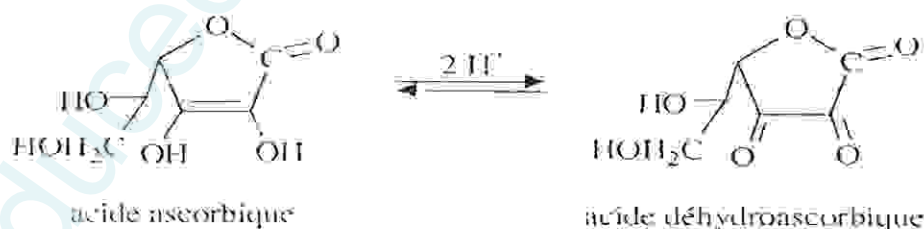


Figure 04: Transformation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique par une oxydation (Manfred et Nicole, 1998)

3- Propriétés physico-chimiques :

➤ Solubilité :

L'acide ascorbique se présente sous l'aspect d'une poudre cristalline blanche, inodore, de saveur acide très légèrement jaunâtre. Cet acide est très facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther ou le chloroforme. La vitamine C est donc une vitamine hydrosoluble.

➤ Stabilité :

Cette vitamine est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Par contre, en solution aqueuse, elle s'altère très rapidement au contact du dioxygène de l'air : le dioxygène est un oxydant alors que la vitamine C est un réducteur d'où réaction d'oxydoréduction. Cette oxydation est accélérée par la chaleur (vitamine thermosensible), la présence d'alcalins et d'ions métalliques. Ainsi, un stockage prolongé des aliments et une cuisson excessive, détruisent cette vitamine. Par exemple, la pomme de terre conservée à température ambiante et à l'air libre perd environ 15% de sa teneur en vitamine C chaque mois et la cuisson entraîne une perte supplémentaire de 30 à 50% (Claude, 2003).

➤ Spectre d'absorption :

L'acide ascorbique en solution fortement acide présente un maximum d'absorption en lumière UV à environ 245 nm, qui se déplacent à 265 nm en pH neutre et à environ 300 nm à pH 14 (Claude, 2003).

4- Sources naturelles de la vitamine C :

La vitamine C est retrouvée en abondance dans les végétaux à chlorophylle et caroténoïdes (légumes, salades et fruits frais). Le tableau 01 représente les sources naturelles de vitamine C.

Tableau 01 : Les sources naturelles de la vitamine C (Santé Canada, 2001)

Aliments	Portions	Vitamine C(mg)
Acérola	100 g	1745 mg
Piment rouge	100g	370 mg
Papaye	½ papaye	94 mg
Pamplemousse	½ fruit	39 mg
Orange	1 fruit moyen	70 mg
Mangue	1 fruit moyen	57 mg
Kiwi	1 fruit moyen	71 mg
Poivron vert cru ou cuit	125 ml (1/2tasse)	51- 60 mg

5- Besoins quotidiens de la vitamine C :

Les besoins nutritionnels en vitamine C sont établis comme suit :

Tableau02 : Les besoins quotidiens de la vitamine C (Dietary Reference, 2000)

	L'âge	Hommes (mg/jour)	Femmes (mg/jour)
Les nourrissons	0 - 6 mois	40 mg	40 mg
	6 - 12 mois	50 mg	50 mg
	1 - 3 ans	15 mg	15 mg
Les enfants	4 - 9 ans	25 mg	25 mg
	10 - 12 ans	45 mg	45 mg
	14 - 18 ans	75 mg	65 mg
Les adolescents	14 - 18 ans	75 mg	65 mg
Les adultes	19 ans et plus	90 mg	75 mg
Les enceintes	18 ans et moins	80 mg	-
	19 ans et plus	85 mg	-
Les allaitantes	18 ans et moins	115 mg	-
	19 ans et plus	120 mg	-

6- Synthèse de la vitamine C :

L'acide ascorbique n'est pas une vitamine exogène pour toutes les espèces animales. Pratiquement celles-ci sont capables de fabriquer la vitamine C dont leur métabolisme a besoin, en quantités variables suivant les nécessités du moment. Un accident survenu au cours de l'évolution, a rendu quelques rares espèces dont l'homme, dépendantes d'un apport extérieur de cette substance vitale en les privant de l'une des 2 enzymes nécessaires à son élaboration (la L-oxydase gulonolactone) et doivent quotidiennement consommer les fruits et les légumes nécessaires à cet apport vital en vitamine C qu'ils ne sont plus en mesure de fabriquer biologiquement (Stone, 1972). Les étapes de la synthèse de la vitamine C sont résumées dans la figure ci-dessous :

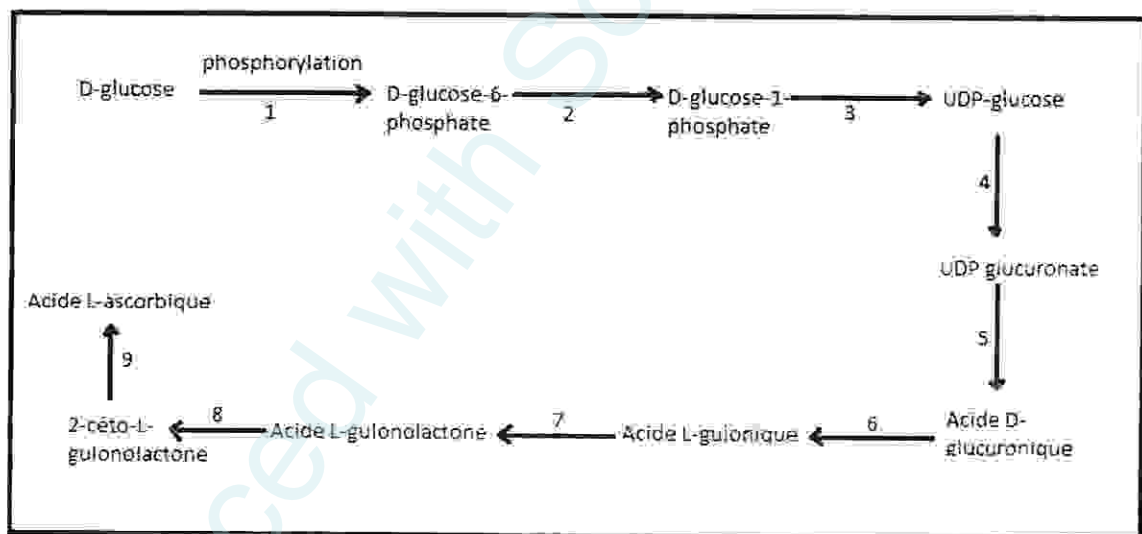


Figure 05 : La synthèse de la vitamine C (Stone, 1972)

1-La phosphorylation du D-glucose en D-glucose-6-phosphate par l'hexokinase.

2-Transformation du D-glucose-6-phosphate en D-glucose-1-phosphate par l'action de l'enzyme phosphoglucomutase.

3-Transformation du D-glucose-1-phosphate en UDP glucose en présence de L'UTP (Uridine Tri Phosphate).

L'UDP-glucose-pyrophosphorylase est une enzyme du foie et du muscle qui active le glucose-1-phosphate en transférant une molécule d'acide uridylique provenant de l'UTP. Le produit activé est appelé UDP-glucose qui est le carrefour métabolique d'où part la synthèse de la vitamine C, dite voie du glucuronate.

4-Transformation de l'UDP-glucose en UDP-glucuronate grâce à l'enzyme 6-déshydrogénase qui oxyde la fonction alcool primaire en acide carboxylique. Cette enzyme-clé de la synthèse du glucuronate et de ses dérivés est nécessaire à la production de plusieurs dérivés essentiels et aux voies de détoxification hépatique.

5-Transformation de l'UDP D-glucuronate en acide D-glucuronate par une hydrolyse enzymatique catalysée par l'UDP-glucuronate hydrolase.

6-Transformation de l'acide D-glucuronate en acide L-gulonique, la réaction est catalysée par une glucuronate réductase.

7-Transformation de l'acide L-gulonique en L-gulonolactone par une aldololactone par estérification interne.

8-L'acide L-gulonolactone est transformé en 2 céto-L-gulonolactone par déshydrogénation grâce à une L-gulonolactone déshydrogénase. Cette enzyme est absente chez les espèces qui ne peuvent synthétiser la vitamine C, la réaction est alors bloquée.

9-L'énolisation du 2 céto-L-gulonolactone en acide L-ascorbique (vitamine C).

7- Mode d'action de la vitamine C :

La vitamine C est absorbée essentiellement au niveau du jéjunum proximal et de l'iléon grâce à un système de transport actif dépendant du sodium. Pour les doses habituelles de vitamine C ingérée avec la nourriture, on considère que 80% de vitamine C est absorbée. Dans le sang, le transport s'effectue sous forme libre (75%) ou liée aux protéines plasmatiques (environ 25%) (Florian et al., 2005). C'est un piègeur des espèces oxygénées actives, ceci en protégeant divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation. Elle peut toutefois se transformer en un pro-oxydant puissant, capable d'initier des processus de peroxydation lipidique si, en faible quantité, elle se trouve en présence d'une concentration élevée en fer. La tolérance intestinale désigne la quantité de vitamine C qui peut être absorbée par l'intestin dans un temps donné. Lorsque cette quantité est atteinte, la vitamine C non absorbée est éliminée dans les selles. Durant son trajet, elle attire de l'eau dans l'intestin ce qui produit une diarrhée passagère. Ceci est une des raisons pour lesquelles on ne peut pas s'intoxiquer avec de la vitamine C. La vitamine C est un cofacteur enzymatique impliqué dans un certain nombre de réactions physiologiques (hydroxylation). Sous forme oxydée, elle traverse la barrière hémato-encéphalique pour accéder au cerveau et à plusieurs organes à forte concentrations de vitamine C. Il s'agit d'un antioxydant, molécule capable de contrer l'action néfaste d'oxydants comme les radicaux libres (Albert et al., 1979). La variabilité de la tolérance intestinale suggère un besoin accru de l'organisme en vitamine C dans les périodes de stress ou de maladies, comme on l'observe chez les animaux qui synthétisent la vitamine C.

8- Fonctions de la vitamine C :

Les fonctions de la vitamine C sur notre organisme sont multiples :

➤ Fonctions biochimiques :

La vitamine C permet la formation et la restauration des muqueuses et du tissu conjonctif par le collagène sur lequel se déposent les minéraux et en particulier le calcium, ce qui va former les os, les dents, les cartilages.

Dans plusieurs cas, il a été démontré que la collagénose aigue se rattache à un scorbut subclinique c'est-à-dire une insuffisance en vitamine C expliquant la porosité et la fragilité des vaisseaux, le fait que les sels minéraux se retirent des os et des dents, que l'anémie progresse et que les blessures se refusent à guérir. C'est le collagène qui cimente les cellules osseuses et procure aux os à la fois leur résistance et leur flexibilité, et c'est également lui qui donne à l'épiderme sa douceur au toucher, sa souplesse et sa fermeté. L'état du collagène entretient ainsi un rapport étroit avec le phénomène du vieillissement (Pauling et Pauling, 1975).

➤ Fonctions enzymatiques :

La vitamine C agit comme un donneur d'électrons pour 11 enzymes (Levine, 1986). Trois de ces enzymes se trouvent dans les champignons mais pas chez les humains ou d'autres mammifères (Stubbe, 1985) et sont impliqués dans les voies de réutilisation des pyrimidines. Les huit autres enzymes se trouvent chez l'homme et participent à l'hydroxylation du collagène (Wondrack, 1978) ainsi que dans la biosynthèse de la carnitine (Englard et Seifter, 1986).

➤ Fonctions cérébrales :

La vitamine C permet la synthèse de certaines amines cérébrales (dopamine, noradrénaline, adrénaline), médiateurs d'importance capitale dans la transmission de l'influx nerveux entre les neurones. Ainsi, la vitamine C s'est elle révélée être un composant majeur des thérapies ortho moléculaires des troubles mentaux (Hasanein et Shahidi, 2010).

➤ **Fonctions immunitaires :**

Les globules blancs, gardiens de l'immunité, contiennent près de 60 fois plus de vitamine C que le plasma sanguin. Les réserves sont vite épuisées en cas de maladies, infections, ou choc traumatique. Différents travaux ont démontré que des concentrations élevées en vitamine C permettaient une meilleure mobilisation des globules blancs et des neutrophiles, leur permettant ainsi de s'attaquer beaucoup plus facilement aux bactéries. La vitamine C est également indispensable à la synthèse d'anticorps et elle possède donc un effet antiviral à fortes doses ; elle favorise la synthèse et l'activité de l'interféron qui empêche la pénétration du virus dans la cellule (Bourne, 1949).

➤ **Cancer :**

De nombreuses études épidémiologiques établissent une corrélation entre une forte consommation d'aliments riches en vitamine C et un faible taux de cancer et de maladies cardio-vasculaires. Concernant le cancer de l'estomac, la vitamine C inhiberait l'action néfaste sur la muqueuse d'une bactérie nommée *Helicobacter Piloni*. Bien après Linus Pauling dont c'était l'une des pistes importantes, l'Institut National de la Santé de Washington, en 1990, a montré que la vitamine C joue un rôle actif et important dans la prévention du cancer et qu'une teneur faible en vitamine C (hypovitaminose) double le risque statistique de cancer. Par ailleurs, la vitamine C atténue les conséquences des effets secondaires de la chimiothérapie et de la radiothérapie, tout en participant elle-même à la destruction des cellules malignes et en empêchant leur multiplication. La vitamine C combattrait directement certaines cellules cancéreuses sans nuire aux tissus sains (Cameron et Pauling, 1977).

➤ **La prévention de la cataracte :**

Environ 20 millions de personnes dans le monde souffrent de cataracte c'est-à-dire d'une opacification du cristallin de l'œil qui conduit à terme, à la cécité. Le cristallin de l'œil, de par sa fonction, est la cible, entre autres, des rayonnements ultraviolets. Ce rayonnement, très énergétique, provoque la production de radicaux libres. Ceux-ci attaquent les protéines produisant ainsi leur oxydation. Leur élimination devient plus difficile avec l'âge, elles s'accumulent et s'agrègent, précipitent, formant un voile insoluble qui empêche la lumière de passer. La vitamine C antioxydante agirait en inhibant l'action des radicaux libres (réaction de réduction de ces derniers) et protégerait ainsi les protéines du cristallin. Les risques de développer une cataracte sont quatre fois supérieurs chez les personnes ayant un faible apport en vitamine C comparativement aux personnes ayant les apports vitaminiques les plus élevés (Claude, 2003).

9- Hypervitaminose C et Hypovitaminose C :

L'apport journalier recommandé pour la vitamine c est de 60 mg /jour. Une carence ou un excès en vitamine C est associé à des troubles métaboliques qui peuvent s'aggraver dans certains cas.

Hypervitaminose C :

Chez un individu sain, il ne semble pas que la vitamine C prise à des méga doses c'est-à-dire plusieurs grammes / jour, puisse présenter une toxicité sérieuse (Pauling, 1970). Cependant, chez des individus susceptibles, ces méga doses peuvent engendrer un certain nombre d'effets indésirables qui se traduisent principalement par une toxicité rénale (calculs, acidification de l'urine), cette toxicité potentielle se produit au niveau intestinal. Des apports de 2 à 3 g/jour de vitamine C peuvent produire une diarrhée chez certaines personnes (Kubler et Gehler, 1970) .

L'oxalate est un produit final du catabolisme de l'ascorbate et joue un rôle important dans la formation de calculs rénaux si les apports en vitamine C dépassent 1g, en particulier chez les sujets présentant des quantités élevées de calcium dans l'urine (Schmidt et al., 1981).

L'excès en vitamine C peut déclencher une hémolyse chez certaines personnes, surtout ceux qui ont une déficience en déshydrogénase glucose-6-phosphate (glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency) (Mehta et al., 1990) ; également une absorption diminuée de la vitamine B12, pouvant produire des symptômes d'anémie mégaloblastique, l'apparition de diarrhée et de vomissements occasionnels (Herbert et Jacob, 1974).

Hypovitaminose C :

Les études ont indiqué que la quantité de vitamine C nécessaire pour prévenir ou guérir les premiers signes de carence est comprise entre 6,5 et 10 mg/jour. Les signes cliniques du scorbut apparaissent chez les hommes à des concentrations inférieures à 10 mg/jour (Krebs et al., 1948) ou lorsque le contenu de tout le corps est en dessous de 300 mg (Baker et al., 1969).

Aujourd'hui, la carence grave en vitamine C n'existe plus. Toutefois, des situations de carence modérée sont fréquemment observées. Elles se manifestent par une perte d'appétit, un relatif amaigrissement, une fatigue chronique et une sensibilité accrue aux refroidissements.

Le scorbut est une maladie anciennement connue qui se manifeste par :

- L'asthénie, œdèmes aux bras et jambes, hémorragies, saignement du nez et des gencives, ecchymoses sous cutanées, déchaussement des gencives, mort par épuisement.

Les hypovitaminoses plus discrètes sont très répandues et se manifestent par :

- l'asthénie, l'amaigrissement, des céphalées, des douleurs osseuses, une moindre résistance aux infections et des troubles hémorragiques.

Une carence grave se traduit de plus par l'apparition d'hématomes et d'hémorragies. Elle entraîne une fragilité des capillaires sanguins ayant pour conséquence des saignements de nez par rupture des vaisseaux, des hémorragies rétiniennes chez les diabétiques, des dégénérescences tissulaires plus importantes chez les personnes âgées: arthrose, ostéoporose, des lésions oculaires (de la macula ou cataracte) (Robert et Cathcart 1991).

10- Propriété antioxydante de la vitamine C :

Les radicaux libres sont des atomes ou des groupes d'atomes possédant un ou plusieurs électrons non liant. Ils sont produits naturellement par notre organisme et entrent, par exemple, dans les processus de production d'énergie. Ils interviennent également dans les mécanismes immunitaires en permettant de lutter contre l'invasion par des bactéries ou des virus. Mais, sous certaines conditions, ils peuvent être produits en excès et se mettent à dégrader les parois des cellules, les protéines et même l'ADN. On parle alors de « stress oxydatif ». L'antidote contre les radicaux libres, ce sont les antioxydants : Ce sont des composés capables de lutter efficacement contre les radicaux libres en excès dans notre organisme, les rendant ainsi inoffensifs. On distingue plusieurs types d'antioxydants, tels que des enzymes antioxydantes : superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase (Fendri et al., 2006), des antioxydants d'origine alimentaire : ce sont les vitamines (Anne-Marie Roussel, 2009) ; des oligo-éléments (zinc, sélénium, calcium ...).

Parmi ceux-ci, l'acide ascorbique qui est une vitamine (vitamine C) qui a la propriété d'être fortement réductrice agit sur l'oxygène par oxydoréduction grâce à sa fonction énediol et se transforme en acide déhydroascorbique qui a la même activité biologique que l'acide ascorbique. Dans cette fonction, la vitamine C donne des électrons à haute énergie pour neutraliser les radicaux libres et dans ce processus, il devient le DHA (déshydroascorbate) (Robert et Cathcart, 1991). Du fait de son pouvoir antioxydant, la vitamine C joue un rôle préventif contre les maladies cardio-vasculaires et certains cancers (Pauling et Cameron, 1977).

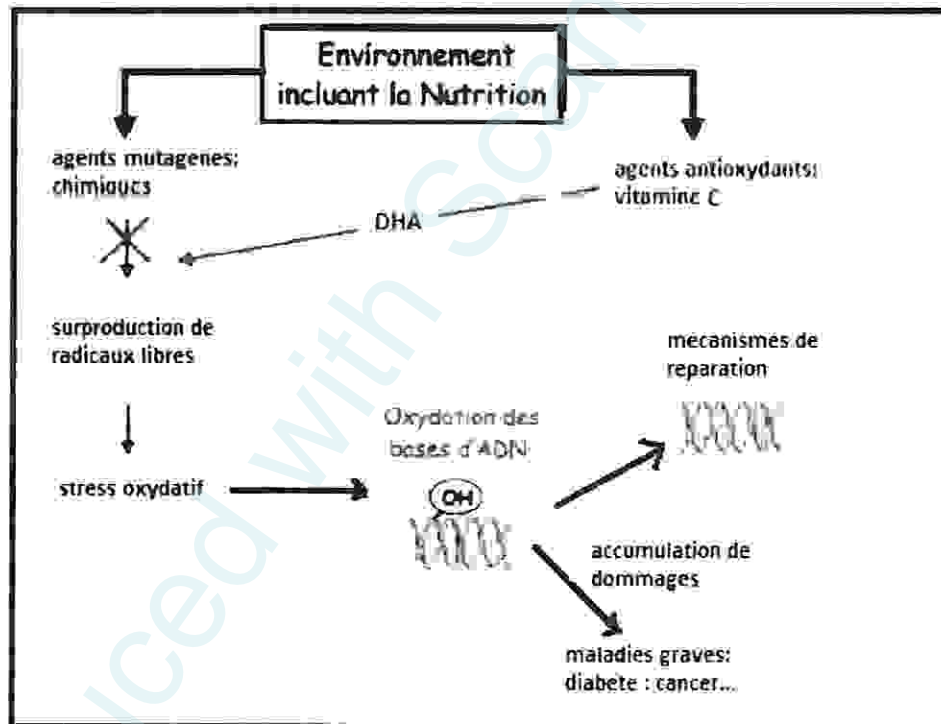


Figure 06 : Effet de la vitamine C sur les radicaux libres (Gorin et al. , 2003)

***PARTIE
PRACTIQUE***

***MATÉRIELS &
MÉTHODES***

Produced by Scantopdf

Matériel et méthodes :

1 - Matériel biologique et conditions d'élevages

Notre étude a été réalisée sur un échantillon de 08 lapins males de population locale, de souche *Cuniculus lepus* provenant de la région de Guelma durant le mois d'Avril, âgés de 6-7 mois, d'un poids vif moyen de 1500 g, les animaux sont élevés dans des cages en plastique de 90x60x25 cm de dimension, tapissées de carton changé quotidiennement, ces cages sont nettoyées par l'utilisation de détergents comme l'eau de javel pour éviter les infections. Signalons que l'élevage des lapins a été effectué au niveau de l'animalerie du département de biologie (Université de Guelma). Ces lapins sont acclimatés aux conditions de notre animalerie pendant 3 semaines à une température ambiante et une photopériode naturelle. La nourriture a été bien équilibrée et variée, elle contient tous les éléments nécessaires pour la croissance naturelle des animaux. Le régime alimentaire contient des aliments secs composé de maïs et d'orge qui sont riche en protéines, fibres, et en glucides. Ce régime a été fournit à partir de 18 h jusqu'à midi du lendemain, tandis que la période de l'après midi présente un régime alimentaire riche en vitamines et en eau basée sur les légumes variés comme la salade, la carotte et de l'eau potable. Après la période d'adaptation, une seule dose d'alloxane est injectée aux lapins par voie intraveineuse (100mg/1Kg de poids) (Gumieniczek et al., 2002). 72 h après l'injection, on dose le glucose et quand on est sur que le diabète est induit, on répartit les lapins en 02 groupes.

2- Traitement des animaux :

Les 08 lapins sont répartis en deux lots égaux (4 lapins /lot).

-1^{er} lot de 04 lapins diabétiques non traités.

-2^{eme} lot de 04 lapins diabétiques traités à la vitamine C.

Le traitement par la vitamine C a été effectué par voie orale, chaque jour avec une dose de 100mg/kg de poids pendant 21 jours (Agaoglu et al., 2002).

Les animaux sont pesés 3 fois par semaine.

3- Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins se font par sacrifice à la fin du traitement. Les échantillons sanguins sont recueillis dans des tubes secs, puis centrifugés à 3000tr/minute pendant 15 minutes. Le sérum est séparé en deux ou trois fractions dans des tubes Eppendorf, puis mis à (-20°C) jusqu'au moment du dosage.

4 - Prélèvement des organes:

Après décapitation et dissection des lapins, le pancréas est prélevé et mis dans du bouin alcoolique pour l'étude histologique, en outre un morceau du foie est maintenu au congélateur à -20°C pour le dosage du glutathion (GSH)

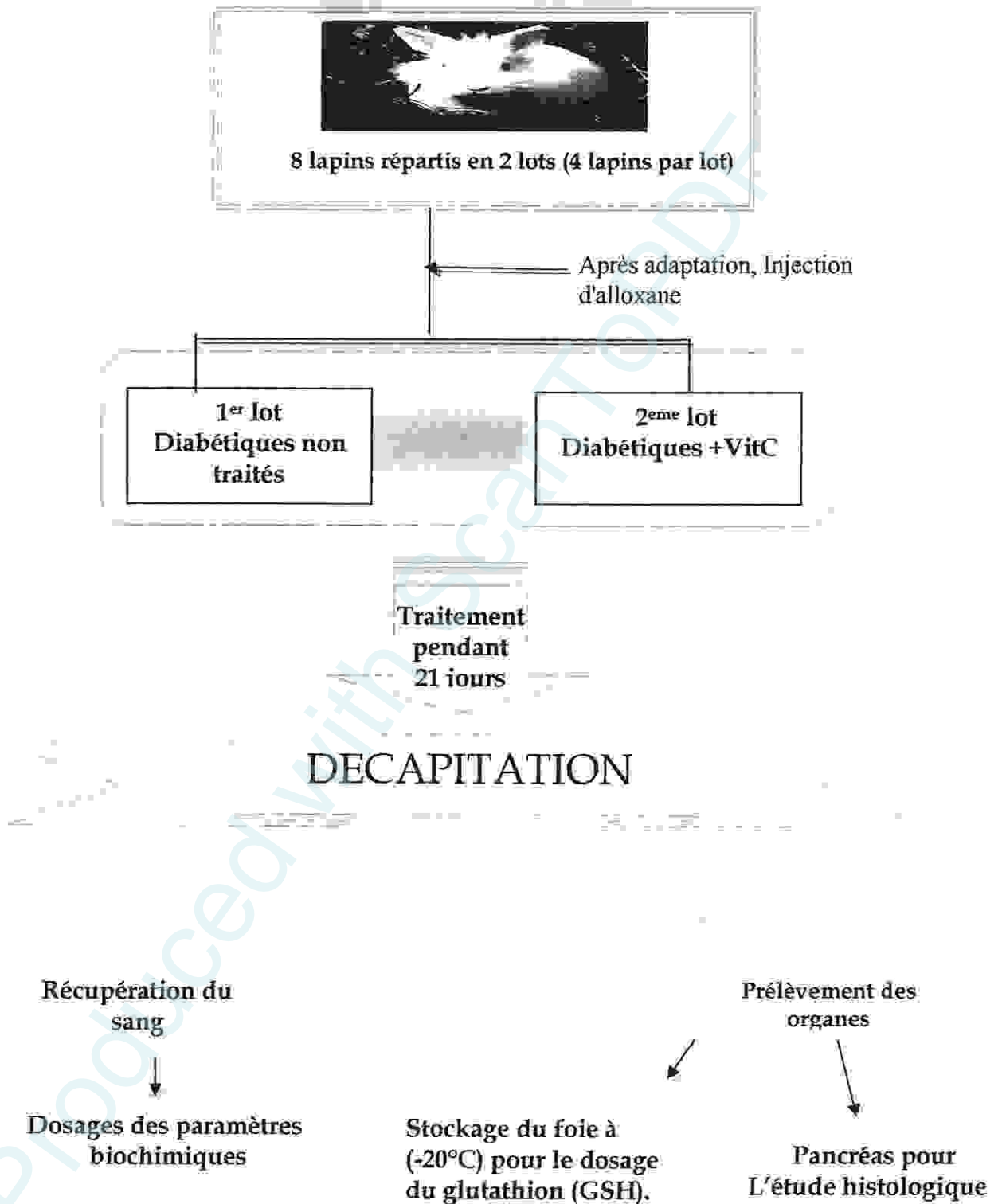


Figure 07 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

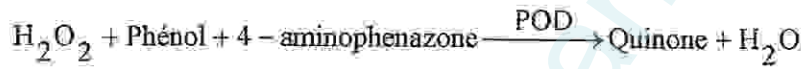
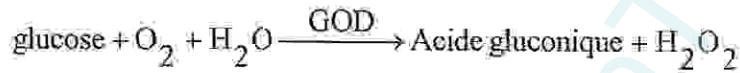
5- Dosage des paramètres biochimiques :

Les paramètres biochimiques sont dosés au niveau de la polyclinique d'Héliopolis et l'hôpital de Ain larbi, selon les fiches techniques suivantes :

5-1 Dosage du glucose : (Kaplan, 1984) selon la fiche technique Spinréact.

❖ Principe :

Le glucose est mesuré après une oxydation enzymatique en présence du glucose oxydase et la peroxydase, selon les réactions suivantes :



❖ Echantillon : sérum.

❖ Les réactifs utilisés:

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R ₁)	-Tris pH = 7.4	92 mmol /l
(Tampon)	-Phénol	0.3 mmol/l
Réactif (R ₂)	- Glucose oxydase (GOD)	15000 U/l
(Enzymes)	- Peroxidase (POD)	1000 U/l
	- 4- aminophenazone (4-AP)	2.6 mmol/l
Étalon	-Solution de Glucose	100 mg/dl

❖ Préparation de réactif de travail (RT):

- ✓ Dissoudre le contenu de réactif (R₂) dans la fiole de réactif (R₁).
- ✓ Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète .Ce réactif de travail est stable un mois à 2-8 °C, ou 7 jours à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT	1 ml	1 ml	1 ml
Etalon	-----	10 µl	-----
Echantillon	-----	-----	10 µl

✓ Agiter bien et incuber pendant 10 min à 37 °C ou 15 -20 min à 25 °C.

✓ Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et de standard à 505 nm contre le blanc, la couleur est stable pendant 30 min.

❖ Calcul:

La concentration du glucose dans l'échantillon est calculée par la formule suivante:

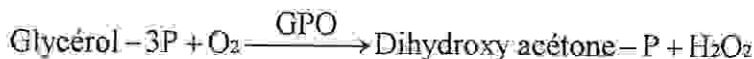
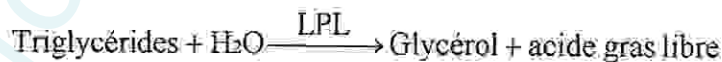
$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ étalon}} \times 100$$

La concentration d'étalon = 100 mg/dl.

5-2 -Dosage des triglycérides : (Buccolo et al., 1973) selon la fiche technique Spinréact

❖ Principe :

Les triglycérides sont enzymatiquement hydrolysés en glycérol et en acides gras libres par la lipoprotéine-lipase (LPL). Le glycérol sous l'effet du glycérol kinase forme le glycérol -3- phosphate (GTP) qui est oxydé en H₂O₂. Ce dernier forme avec le 4-aminophénol et le p-chlorophénol en présence de peroxydase un complexe rouge, selon les quatre réactions suivantes:



L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans les échantillons.

❖ Echantillon : Sérum.

❖ Les réactifs utilisés :

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R ₁)	- GOOD pH=7.5	50 mmol /l
Tampon	-P-Chlorophenol	2 mmol /l
	- Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/l
	-Glycérol kinase (GK)	500 U/l
Réactif (R ₂)	-Glycérol-3-oxidase (GPO)	2500 U/l
(enzymes)	-Peroxidase (POD)	440 U/l
	-1-Aminophénazone (1 AP)	0.1 mmol/l
	-ATP	0.1 mmol /l
Etalon	-Triglycéride aqueux primaire standardisé	200 mg/dl

❖ Préparation de réactif de travail (RT):

✓ Dissoudre le contenu de réactif (R₂) dans la fiole de réactif (R₁).

✓ Mélanger bien et doucement la solution jusqu'à ce qu'elle devienne homogène.

Ce réactif (RT) est stable pendant 6 semaines à 2-8 °C ou une semaine à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (RT)	1ml	1ml	1ml
Etalon	-----	10 µl	-----
Echantillon	-----	-----	10 µl

- ✓ Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37°C ou 10 min à 15-25°C.
- ✓ Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc.
- ❖ Calcul:

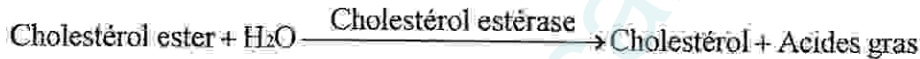
$$\text{Triglycérides (mg / dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 200$$

La concentration d'étalon = 200mg/dl.

5-3 - dosage du cholestérol :(Naito, 1984) selon la fiche technique Spinréact.

❖ Principe:

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon la réaction suivante :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

❖ Echantillon : Sérum.

❖ Les réactifs utilisés :

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R1)	-Pipes pH=6.9	90 mmol /l
Tampon	-Phénol	26 mmol /l
Réactif (R2)	- Cholestérol estérase.	300 U/l
(enzymes)	-Cholestérol oxydase.	300 U/l
	-Peroxydase.	1250 U/l
	-4-Aminophénasone (4-AP)	0.4 mmol/l
Etalon	-Cholestérol aqueux primaire standardisé.	200 mg/dl

❖ Préparation de réactif de travail (RT):

- ✓ Dissoudre le contenu de réactif (R₂) dans la fiole de réactif (R₁).
- ✓ Mélanger bien et doucement la solution jusqu'à ce qu'elle devient homogène.

Ce réactif (RT) est stable pendant 4 mois à 2-8 °C ou 40 jours à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (RT)	1ml	1ml	1ml
Etalon	-----	10 µl	-----
Echantillon	-----	-----	10 µl

- ✓ Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à 15-25°C.
 - ✓ Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc.
- La couleur est stable pendant 2 heures.

❖ Calcul:

$$\text{Cholestérol (mg / dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 200$$

La concentration d'étalon = 200mg/dl.

5-4-Dosage des protéines dans le sérum :(Burtis et al., 1999) selon la fiche technique Spinréact:

❖ Principe :

Les protéines du sérum forment dans un milieu alcalin avec les ions de cuivre, un complexe coloré en bleu violet.

L'intensité de la couleur violette est proportionnelle à la quantité des protéines présentées dans l'échantillon.



❖ **Echantillon :** Sérum.

❖ **Les réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R)	-Sodium Potassium Tartrate.	15 mmol /l
	-Sodium iodique.	100 mmol /l
	-Potassium iodique.	5 mmol/l
	- Sulfate de cuivre	19 mmol/l
Etalon	- Sérum Bovin Albumine	7 g/dl

❖ **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (R)	1ml	1ml	1ml
Etalon	-----	25 µl	-----
Echantillon	-----	-----	25 µl

✓ Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à 15-25°C.

✓ Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 540 nm contre le blanc.

La couleur est stable pendant 30 min.

❖ **Calcul:**

$$Pr \text{ otéines (g / dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 7$$

La concentration d'étalon = 7 g/dl.

5-5 -Dosage de l'urée : (Kaplan, 1984) selon la fiche technique Spinréact

❖ **Principe:**

L'urée est hydrolysée enzymatiquement en ammonium (NH₃) et dioxyde de carbone (CO₂) selon la réaction suivante :



Les ions ammoniums formés réagissent avec α -cétoglutarate dans une réaction catalysée par glutamate déhydrogénase (GLDH) avec oxydation simultanée de NADH à NAD.



La baisse dans la concentration de NADH, est proportionnelle à la quantité d'urée présentée dans l'échantillon.

❖ **Echantillon :** Sérum

❖ **Les réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R ₁)	-Tris pH=7.8	80 mmol /l
Tampon	- α -cétoglutarate .	6 mmol /l
	- Uréase.	3750 U/l
Réactif (R ₂) (enzymes)	-Glutamate déhydrogénase (GLDH).	6000 U/l
	-NADH	0.32 U/l
Etalon	- Urée aqueux primaire standardisé.	50 mg/dl

❖ **Préparation de réactif de travail (RT):**

- ✓ Dissoudre le contenu de réactif (R₂) dans la fiole de réactif (R₁) .
- ✓ Mélanger bien et doucement la solution jusqu'à la dissolution complète.

Ce réactif (RT) est stable pendant 6 semaines à 2-8 °C ou 7 jours à 15-25 °C

❖ **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (RT)	1ml	1ml	1ml
Etalon	-----	10 μ l	-----
Echantillon	-----	-----	10 μ l

- ✓ Mélanger et lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 340 nm contre le blanc après 30 s (A₁) et après 90 s (A₂).
- ✓ Calculer: $\Delta A = A_1 - A_2$

❖ **Calcul:**

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{(\Delta A) \text{ Echantillon}}{(\Delta A) \text{ Etalon}} \times 50$$

La concentration d'étalon = 50 mg/dl.

5-6-Dosage de la créatinine : (Murray, 1984), selon la fiche technique Spinréact

❖ **Principe:**

La créatinine forme dans un milieu alcalin avec l'acide picrique, un complexe rouge.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon.

❖ **Echantillon :** Sérum.

❖ **Les réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R ₁)	- Acide picrique.	17.5 mmol/l
Réactif (R ₂)	- Hydroxyde de sodium.	0.29 mmol/l
Etalon	- Créatinine (solution).	2 mg/dl

❖ **Préparation de réactif de travail (RT):**

- ✓ Mélanger bien un volume de (R₁) avec le même volume de (R₂).
- Ce réactif (RT) est stable pendant 10 jours à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire :

	Blanc	Étalon	Echantillon
Réactif (RT)	1ml	1ml	1ml
Étalon	-----	100 µl	-----
Echantillon	-----	-----	100 µl

✓ Mélanger et lire l'absorbance (A) de l'échantillon, de l'étalon et de blanc à 492 nm contre l'eau distillé après 30 s (A₁) et après 90 s (A₂).

✓ Calculer: $\Delta A = A_2 - A_1$

❖ Calcul :

$$\text{Créatinine (mg / dl)} = \frac{\Delta A \text{ Echantillon} - \Delta A \text{ Blanc}}{\Delta A \text{ Etalon} - \Delta A \text{ Blanc}} \times 2$$

La concentration d'étalon = 2 mg/dl.

5-7- Dosage de l'acide urique : (Schultz, 1984) selon la fiche technique Spinréact

❖ Principe:

L'acide urique est oxydé par uricase à allantoïne et eau oxygénée (2H₂O₂) qui sous l'influence de peroxydase (POD), 4-Aminophenase (4-AP) et le 2-4 Dichlorophenol sulfonaté (DCPS) forme un complexe rouge (quinoneimine).



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon.

- ❖ Echantillon : Sérum.
- ❖ Les réactifs utilisés :

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R ₁)	- Phosphate pH = 7.4	50 mmol/l
(Tampon)	-2-4 Dichlorophenol sulfonate (DCPS)	4 mmol/l
Réactif (R ₂)	- Uricase.	60 U/l
(Enzymes)	- Peroxydase (POD).	660 U/l
	- Ascorbate oxydase.	200 U/l
	- 4-Aminophenasone (4-AP)	1 mmol/l
Etalon	- Acide urique aqueux primaire standardisé.	6 mg/dl

❖ Préparation de réactif de travail (RT):

- ✓ Dissoudre le contenu de réactif (R₂) dans la fiole de réactif (R₁).
- ✓ Mélanger bien et doucement la solution jusqu'à ce qu'elle devient homogène.

Ce réactif (RT) est stable pendant un mois à 2-8 °C ou 10 jours à 15-25 °C

❖ Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (RT)	1ml	1ml	1ml
Etalon	-----	25 µl	-----
Echantillon	-----	-----	25 µl

- ✓ Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à 15-25°C.
 - ✓ Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 520 nm contre le blanc.
- La couleur est stable pendant 30 min.

❖ Calcul:

$$\text{Acide urique (mg / dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 6$$

Concentration de l'étalon = 6 mg/dl.

5-8-Dosage de l'activité d'Aspartate aminotransférase ASAT (TGO) et d'Alanine aminotransférase ALAT (GPT): (Murray, 1984), selon la fiche technique Spinréact.

❖ Principe:

Les transaminases TGO et TGP présentes dans le sérum catalysent le transfert du groupement amine du glutamate vers l'oxaloacétate et le pyruvate dans des réactions réversibles. L'activité de ces enzymes est proportionnelle à la quantité du pyruvate ou l'oxaloacétate formée après une réaction avec 2,4 - Dinitrophénylhydrazine (DNPH) dans un milieu alcalin.

❖ Echantillon : Sérum.

❖ Les réactifs utilisés :

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R _{1a}) (Substrat TGO)	-DL-Aspartate. -α-cétoglutarate.	100 mmol/l 2 mmol/l
Réactif (R _{1b}) (Substrat TGP)	-DL-Alanine. -α-cétoglutarate.	200 mmol/l 2 mmol/l
Réactif (R ₂)	-2,4-Dintrophénylhydrazine (DNPH).	1 mmol/l
Etalon	-Etalon de pyruvique.	1.2 mmol/l
NaOH	- Hydroxyde de sodium.	0.4 N

❖ Mode opératoire :

	Blanc	Etalon
Réactif (R _{1a}) GOT	0.5 ml	-----
Réactif (R _{1b}) GPT	-----	0.5 ml

✓ Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37°C, ensuite ajouter:

Echantillon	100 µl	100 µl
-------------	--------	--------

✓ Mélanger et retourner les tubes au bain marié.

Réactif (R ₂)	0.5 ml	0.5 ml
---------------------------	--------	--------

✓ Mélanger et incuber les tubes pendant 20 min à 15-25°C.

NaOH 0.4N	5 ml	5 ml
-----------	------	------

✓ Mélanger et incuber pendant 5 min à 15-25°C.

✓ Lire l'absorbance (A) de l'échantillon à 505 nm contre l'eau distillée. La couleur est stable pendant une heure.

❖ Calcul:

Les absorbances (A) obtenues sont rapportées sur la courbe d'étalonnage.

❖ Courbe d'étalonnage :

Tube	1	2	3	4	5	6
Eau distillée	0.2 ml	0.2 ml	0.2ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2ml
R _{1a} ou R _{1b}	1 ml	0.9 ml	0.8ml	0.7 ml	0.6 ml	0.5ml
Etalon	0.0 ml	0.1 ml	0.2ml	0.3 ml	0.4 ml	0.5ml
DNFH	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

✓ Mélanger et incuber les tubes pendant 20 min à 15-25°C.

NaOH 0.4N	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
-----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

7- Exploration statistique des résultats :

- les calculs statistiques ont été effectués à l'aide d'un logiciel d'analyse et de traitement statistique des données (**Origine 6.0**).
- Les résultats sont représentés sous la forme (moyenne \pm écart type moyen) et les différences ont été considérées significatives à $P < 0.05$.
- Nous avons déterminé, grâce aux statistiques élémentaires; les paramètres statistiques de base pondérale, biochimiques et hépatiques, pour chaque lot expérimental. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA).
- A l'aide du test du **Student**, nous avons comparé les moyennes deux à deux pour chaque variable (paramètre étudié).

- ✓ Mélanger et incuber pendant 20 min.
- ✓ Lire l'absorbance (A) à 505 nm contre l'eau distillée.

TGO U/l	00	11	27	46	72	104
TGP U/l	00	12	24	40	62	-----

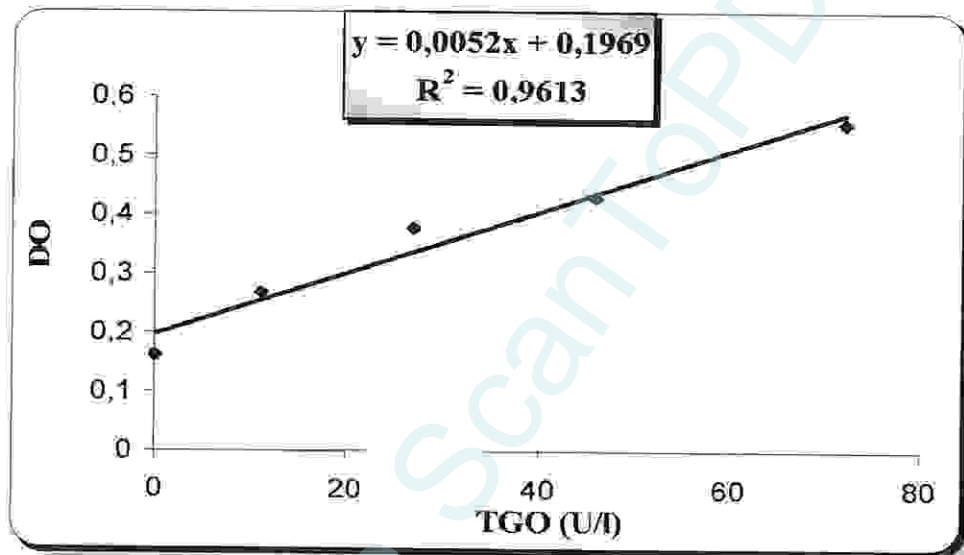


Figure 08: La courbe d'étalonnage de l'Aspartate Aminotransferase (ASAT/TGO)

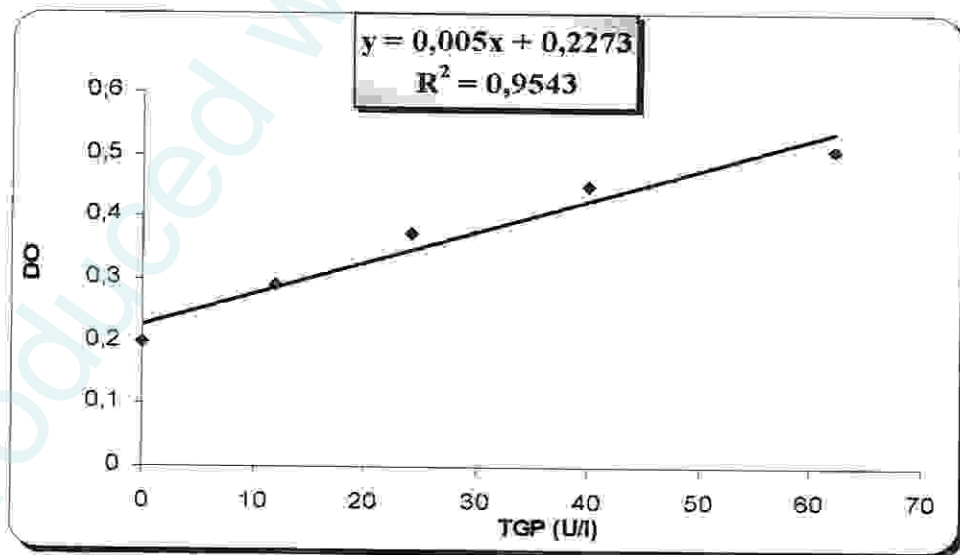


Figure 09: La courbe d'étalonnage de l'Alanine Aminotransferase (ALAT/GPT)

5-9- Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) : (Rosalki et al., 1993) selon la fiche technique Spinréact

❖ **Principe:**

Le substrat p-nitrophényl phosphate est hydrolysé par la phosphatase alcaline de l'échantillon, en présence d'ions magnésiums, pour donner du p-nitrophénol, dont la couleur jaune est lue à 405 nm.

L'intensité de la couleur développée est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.



❖ **Echantillon : Sérum.**

❖ **Les réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R ₁)	-Diéthanoline (DEA).	1 mmol /l
(Tampon)	- Magnésium chlorure.	0.5 mmol /l
Réactif (R ₂) (Substrat)	-P-nitrophényl-phosphate.	10 mmol/l

❖ **Préparation de réactif de travail (RT):**

✓ Dissoudre une tablette de R₂ dans le flacon de R₁.

✓ Mélanger bien et doucement la solution jusqu'à la dissolution complète.

Ce réactif (RT) est stable pendant 21 jours à 2-8 °C ou 5 jours à 15-25 °C

❖ **Mode opératoire :**

Réactif (RT)	1.2 ml
Echantillon	20 µl

✓ Mélanger, et incuber pendant une minute à 37°C.

✓ Lire l'absorbance (A) de l'échantillon à 405 nm contre l'eau distillée après 1min (A₁), 2min (A₂), et 3 min (A₃).

- ✓ Calculer la différence entre les trois lectures: ΔA .
- ✓ Calculer la moyenne des différences: $\Delta A/\text{min}$.
- ❖ **Calcul :**

$$L'activité\ de\ la\ phosphatase\ alcaline\ (U/l) = \Delta A/\text{min} \times 3300$$

5-10 Dosage du glutathion hépatique (GSH) :

Le dosage de glutathion a été réalisé au niveau de laboratoire de biochimie de l'université de Guelma selon le protocole de Weakberker et al., (1988).

❖ Principe:

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

Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalysilique 0.25 %) afin de protéger les groupements (-SH) du glutathion.

- ❖ **Echantillon :** le foie.
- ❖ **Les réactifs utilisés et leurs préparations:**

- **Tampon (Tris-EDTA):pH=9.6**

Dissoudre 19.382 g de Tris (0.4M) et 2.976 g d'EDTA (0.02M) dans 400ml d'eau distillée.

- **Solution de l'Acide sulfosalysilique 0.25 % :**

Dissoudre 0.063 g de la poudre dans 25 ml d'eau distillée.

- **Solution de DTNB (0.01 M):**

Dissoudre 0.0594 g de la poudre dans 15 ml de méthanol absolu 99%.

- **Solution d'EDTA (0.02M):**

Dissoudre 2.976g de la poudre dans 400 ml d'eau distillée.

❖ **Protocole expérimental :**

Les échantillons (100 mg de foie de chaque animal) sont mis individuellement en présence de 6 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0.02M.

Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'ultrason pendant 35 secondes.

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat
- ✓ Ajouter 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0.25%.
- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ✓ Centrifuger à 1000 tours /min pendant 5 minutes.
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris, pH = 9.6.
- ✓ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB).
- ✓ Laisser pendant 5 minutes dans la température ambiante pour la stabilisation de la couleur.
- ✓ Lire l'absorbance optique à 412 nm contre un blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat.

❖ **Calcul:**

$$GSH \text{ (nM/mg prot)} = \frac{Do \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg Pr t}}$$

DO: densité optique.

1: le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml SSA).

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

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

0.8 : le volume du surnageant trouvé dans 1 ml.

0.5 : le volume du surnageant trouvé dans 1.525 ml.

5-11-Dosage des protéines hépatiques : (Bradford, 1976)

❖ **Principe:**

Les protéines réagissent avec un réactif coloré contenant de l'acide orthophosphorique de l'éthanol aussi que le bleu de coomassie (BBC) .Ce réactif réagit avec le groupement (-NH₂) des protéines .L'intensité de la couleur reflète la concentration des protéines se fait selon la méthode de Bradford (1976).

❖ **Echantillon :** le foie.

❖ **Les réactifs utilisés:**

- Le bleu de coomassie G 250 (BBC).
- L'acide orthophosphorique.
- Sérum albumine de bovin (SAB).

❖ **Préparation de réactif de Bradford :**

- ✓ Dissoudre 100 mg de poudre de bleu de coomassie dans 50 ml d'éthanol (95%).
- ✓ Agiter le mélange pendant 2 heures avec un agitateur.
- ✓ Ajouter 100 ml de l'acide orthophosphorique (H₃PO₄) 85%.
- ✓ Compléter le volume jusqu'à 1 litre avec l'eau distillée.
- ✓ Filtrer la solution obtenue avec un papier filtre.

Ce réactif est stable pendant 2 semaines à 4°C.

❖ **Mode opératoire :**

- ✓ Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 5 ml de réactif de Bradford.
- ✓ Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- ✓ Mesurer l'absorbance optique à 595 nm contre un 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 -1 mg/ml de sérum albumine de bovin).

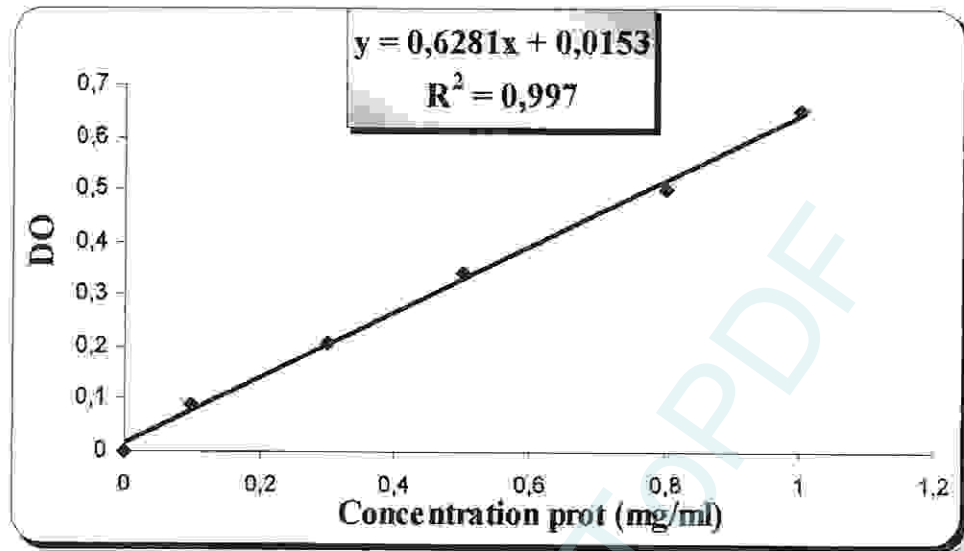


Figure 10: Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin

6- Etude histologique :

Les coupes histologiques du pancréas ont été réalisées suivant la technique classique de Houlot, 1984.

Pour chaque lapin, on prélève un fragment du pancréas de 0,5 cm³, ces fragments sont mis directement dans du Bouin alcoolique, fixateur couramment utilisé (26 ml Formol, 7 ml acide acétique et 45 ml acide picrique de 95%). Puis ces morceaux sont retirés et coupés à l'aide du couteau tranchant afin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1-2 cm² et une épaisseur proche de 1,5 mm. Les pièces obtenues sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

6-1 Déshydratation :

Les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus, cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100%).

6-2 Inclusion :

Les pièces anatomiques sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide, puis on procède à l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 μm en moyenne) sont possibles grâce à un microtome. Ces coupes sériées sont reliées entre elles sous forme de rubans ; lesquels sont par la suite étalés sur des lames porte-objets, dépliés et fixés sur les lames par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

6-3 Coloration :

Selon la technique à l'hémalum-éosine, la coloration suit les étapes suivantes-

- 1- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau de robinet puis rincer à l'eau distillé.
- 2- Immerger dans un bain d'hématoxyline de Harris (15 min) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- 3- Différencier les coupes dans l'alcool acide (100 ml éthanol à 70% + 50 ml HCl) puis les rincer à l'eau de robinet.
- 4- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale (100 ml d'eau distillé + 2 ml d'ammoniaque).
- 5- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 min) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
- 6- Déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau de robinet.
- 7- Enfin, passer à l'observation au microscope photonique, lequel est équipé d'un appareil photographique.

7- Exploration statistique des résultats :

- les calculs statistiques ont été effectués à l'aide d'un logiciel d'analyse et de traitement statistique des données (**Origine 6.0**).
- Les résultats sont représentés sous la forme (moyenne \pm écart type moyen) et les différences ont été considérées significatives à $P < 0.05$.
- Nous avons déterminé, grâce aux statistiques élémentaires; les paramètres statistiques de base pondérale, biochimiques et hépatiques, pour chaque lot expérimental. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA).
- A l'aide du test du **Student**, nous avons comparé les moyennes deux à deux pour chaque variable (paramètre étudié).

***RÉSULTATS &
INTERPRÉTATION***

Les résultats :

Tableau 03 : Représente le gain de poids corporel (g), la concentration sérique du glucose (mg/dl), du cholestérol (mg/dl) et des triglycérides chez les lapins diabétiques non traités(1), et ceux traités à la vitamine C (2).

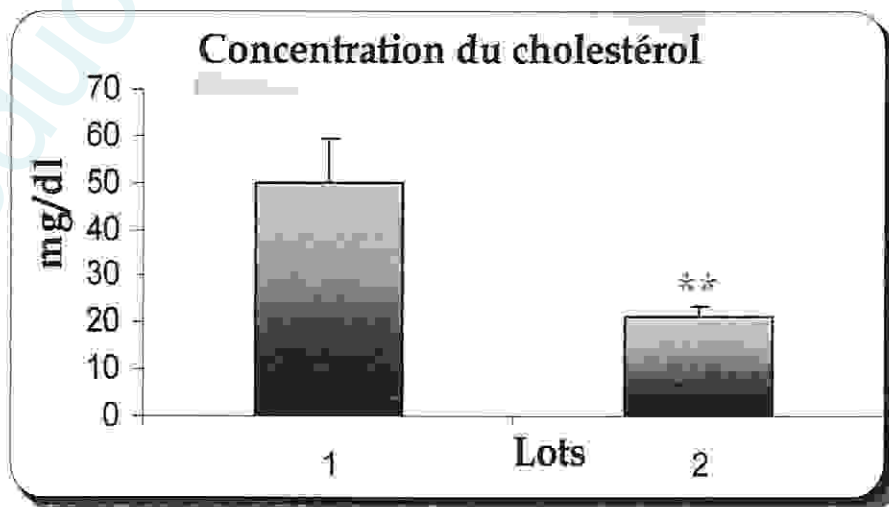
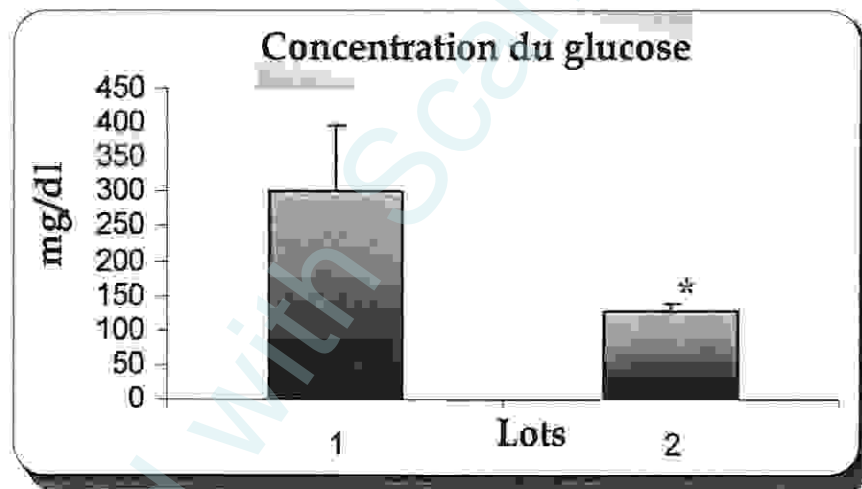
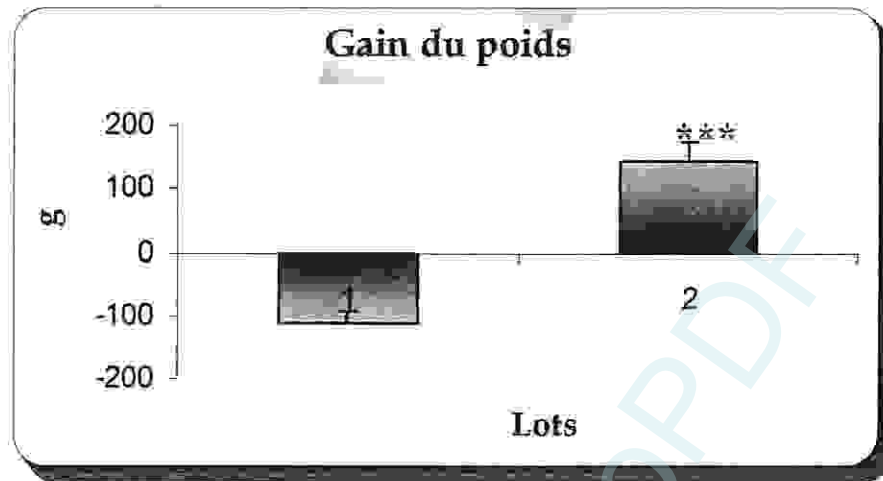
	Lapins diabétiques non traités (n = 4)	Lapins diabétiques + vitamine C (n= 4)
	M ± SE	M ± SE
Gain de poids	-113,25±21,75	143,25***±28,375
Glucose	300,5±97,75	126,25*±10,875
Cholestérol	50±0,5	21,5**±2
Triglycérides	74±10,5	38**±3

* : une différence significative, $p < 0,05$.

** : une différence hautement significative, $p < 0,01$.

*** : une différence très hautement significative, $p < 0,001$.

n : nombre des échantillons.



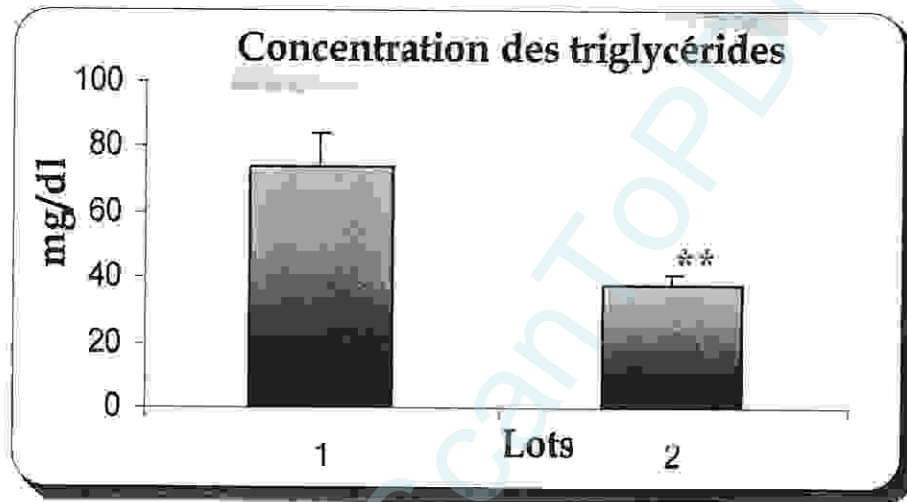


Figure 11: Représente le gain de poids corporel, la concentration sérique du glucose (mg/dl), du cholestérol (mg/dl) et des triglycérides chez les lapins diabétiques non traités(1), et ceux traités à la vitamine C (2).

D'après les résultats obtenus dans le tableau 03 et la figure 11, nous constatons une augmentation très hautement significative du gain de poids corporel ($p < 0.001$) chez les lapins traités à la vitamine C par rapport aux non traités. Par contre, nos résultats illustrent qu'il existe une diminution significative de la concentration sérique du glucose ($p < 0.05$), une diminution hautement significative du cholestérol et des triglycérides ($p < 0.01$) chez les lapins diabétiques traités à la vitamine C par rapport aux non traités.

Tableau 04 : Représente la concentration sérique de l'urée (mg/dl), de la créatinine (mg/dl), de l'acide urique (mg/dl), chez les lapins diabétiques non traités et ceux traités à la vitamine C.

	Lapins diabétiques non traités (n = 4)	Lapins diabétiques +vitamine C (n= 4)
	M ± SEM	M ± SEM
Urée	15,25 ± 0,875	6,5***± 0,25
Créatinine	1,25 ± 0.075	1,048* ± 0,076
Acide urique	10,25 ±0.237	0,45* ± 0.05

* : une différence significative, $p < 0,05$.

** : une différence hautement significative, $p < 0,01$.

*** : une différence très hautement significative, $p < 0,001$.

n : nombre des échantillons.

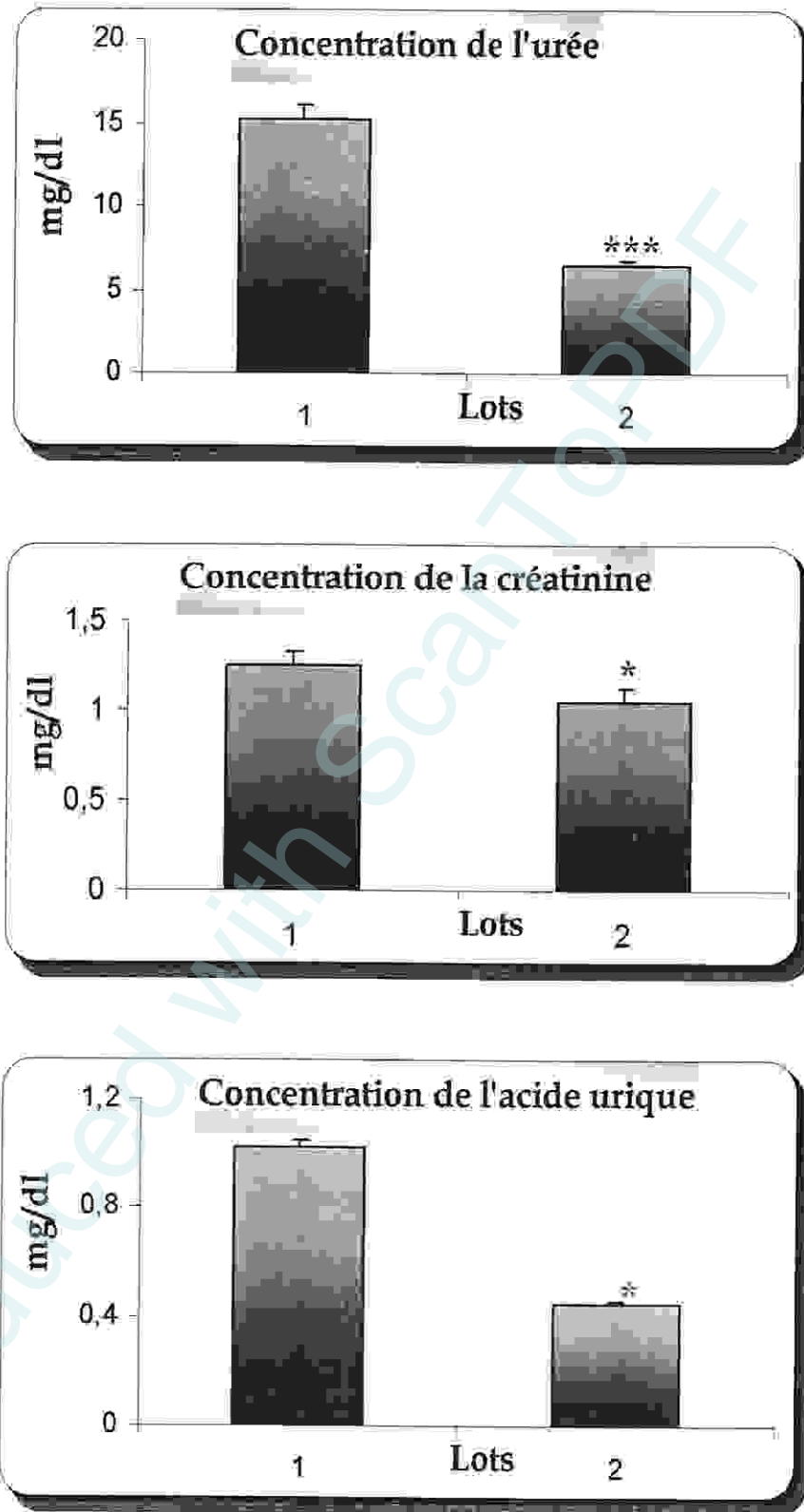


Figure 12 : Représente la concentration sérique de l'urée, de la créatinine de l'acide urique chez les lapins diabétiques non traités et ceux traités à la vitamine C (2).

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative de la concentration sérique de l'urée ($p < 0.001$), une diminution significative de la créatinine et de l'acide urique ($p < 0.05$), chez les lapins diabétiques traités à la vitamine C par rapport aux non traités.

Tableau 05 : Représente l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO) (U/l), de l'alanine aminotransférase (ALAT/TGP) (U/l) et l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) (U/l), chez les lapins diabétiques non traités, et ceux traités à la vitamine C.

	Lapins diabétiques non traités (n = 4) M ± SEM	Lapins diabétiques +vitamine C (n = 4) M ± SEM
TGO	84,5 ± 2,75	37 ** ± 13,5
TGP	36 ± 1	17,5** ± 7
PAL	247,5 ± 13	201,75** ± 14,25

* : une différence significative, $p < 0,05$.

** : une différence hautement significative, $p < 0,01$

*** : une différence très hautement significative, $p < 0,001$

n : nombre des échantillons

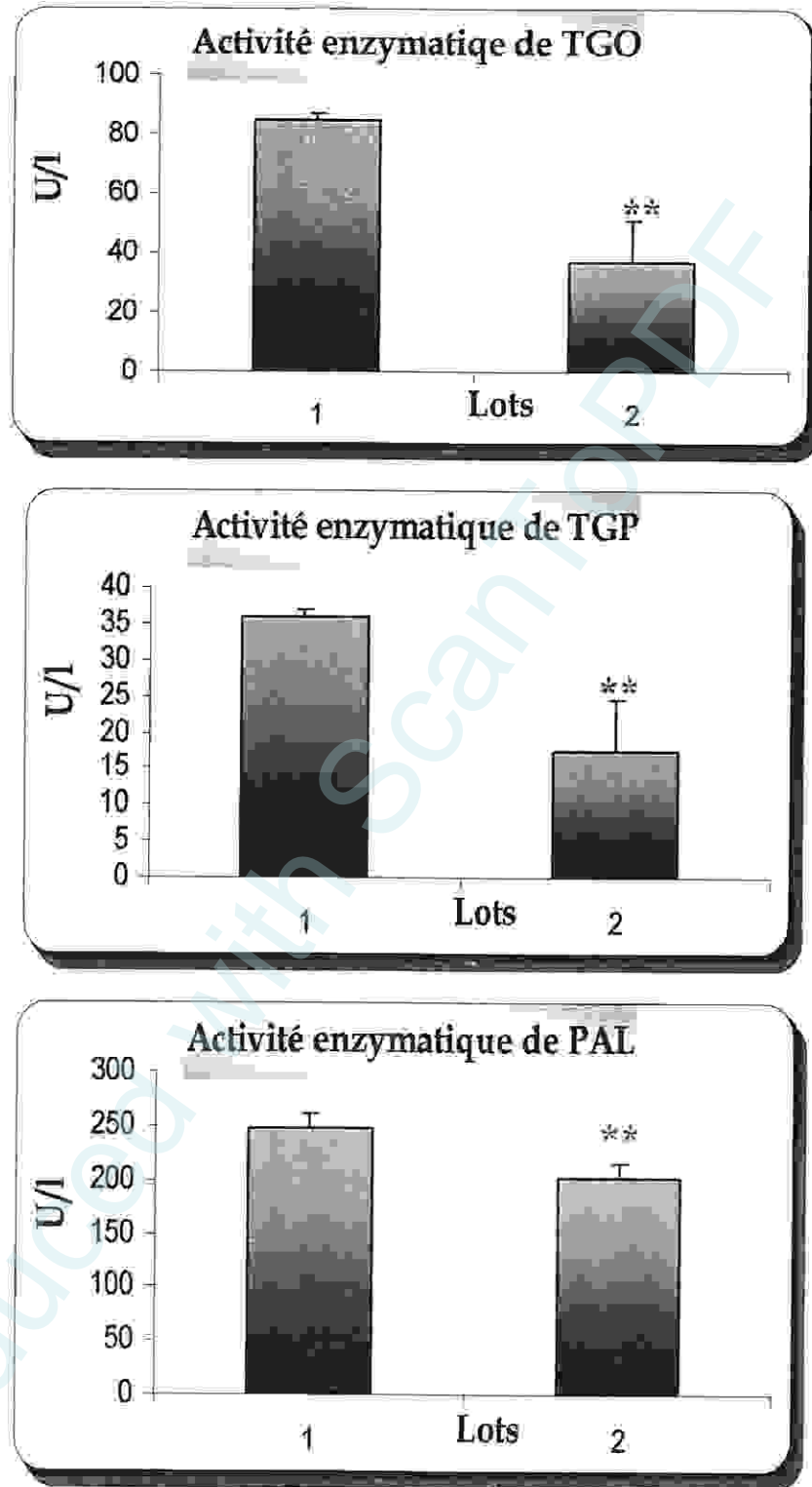


Figure 13 : Représente l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO), de l'alanine aminotransférase (ALAT/TGP) et de la phosphatase alcaline (ALP) chez les lapins diabétiques non traités et ceux traités à la vitamine C.

D'après le tableau 05 et les figures 13, on constate une diminution hautement significative de l'activité enzymatique des enzymes sériques ; L'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO), l'alanine aminotransférase (ALAT/TGP) et de la phosphatase alcaline ($p < 0,01$) chez les lapins diabétiques traités à la vitamine C par rapport aux non traités.

Tableau 06 : Représente la concentration sérique des protéines totales (g/dl) et du glutathion hépatique (nmol/mg prot) chez les lapins diabétiques non traités et ceux traités à la vitamine C.

	Lapins diabétiques non traités (n = 4)	Lapins diabétiques +vitamine C (n= 4)
	M ± SE	M ± SE
Protéines totales	18,5 ± 0.5	23* ± 2,375
Glutathion hépatique	131,8925±3,98 25	162,615*±12, 73

* : une différence significative, $p < 0,05$

*ⁿ : une différence hautement significative, $p < 0,01$

*ⁿⁿ : une différence très hautement significative, $p < 0,001$

n : nombre des échantillons.

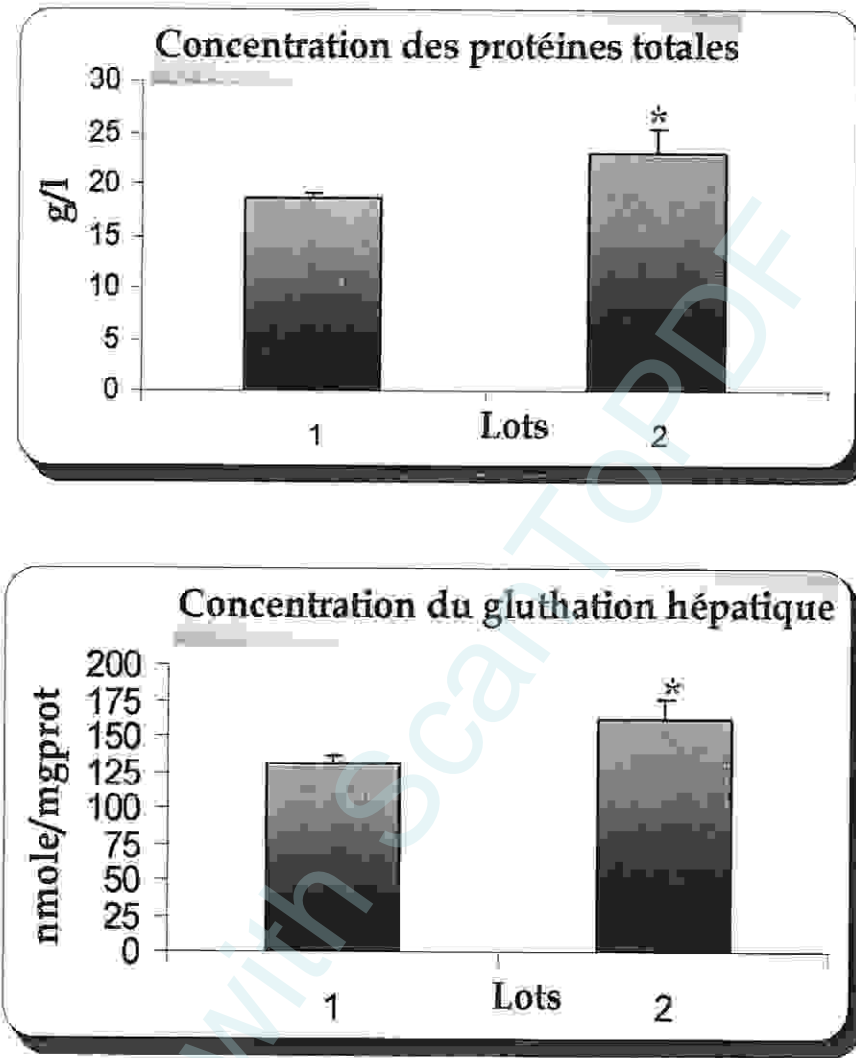


Figure 14 : Représente la concentration sérique des protéines totales et du glutathion hépatique chez les lapins diabétiques non traités et ceux traités à la vitamine C.

Les résultats illustrés dans le tableau 06 et la figure 14, montrent que la concentration sérique des protéines totales et du glutathion hépatique présente une augmentation significative chez les lapins diabétiques traités à la vitamine C par rapport aux non traités.

- L'effet du traitement sur l'histologie du pancréas :

L'étude histologique du pancréas coloré à l'hémalum-éosine des lapins diabétiques traités à la vitamine C (T) montre la présence de quelques îlots de Langerhans (Gr.100x), alors que la vue détaillée (Gr.400x) montrant la forme bien limitée et la taille d'un îlot. En revanche, les coupes du pancréas des lapins diabétiques non traités (DNT) présentent des îlots de Langerhans en voie de dégénérescence(Gr.400x).

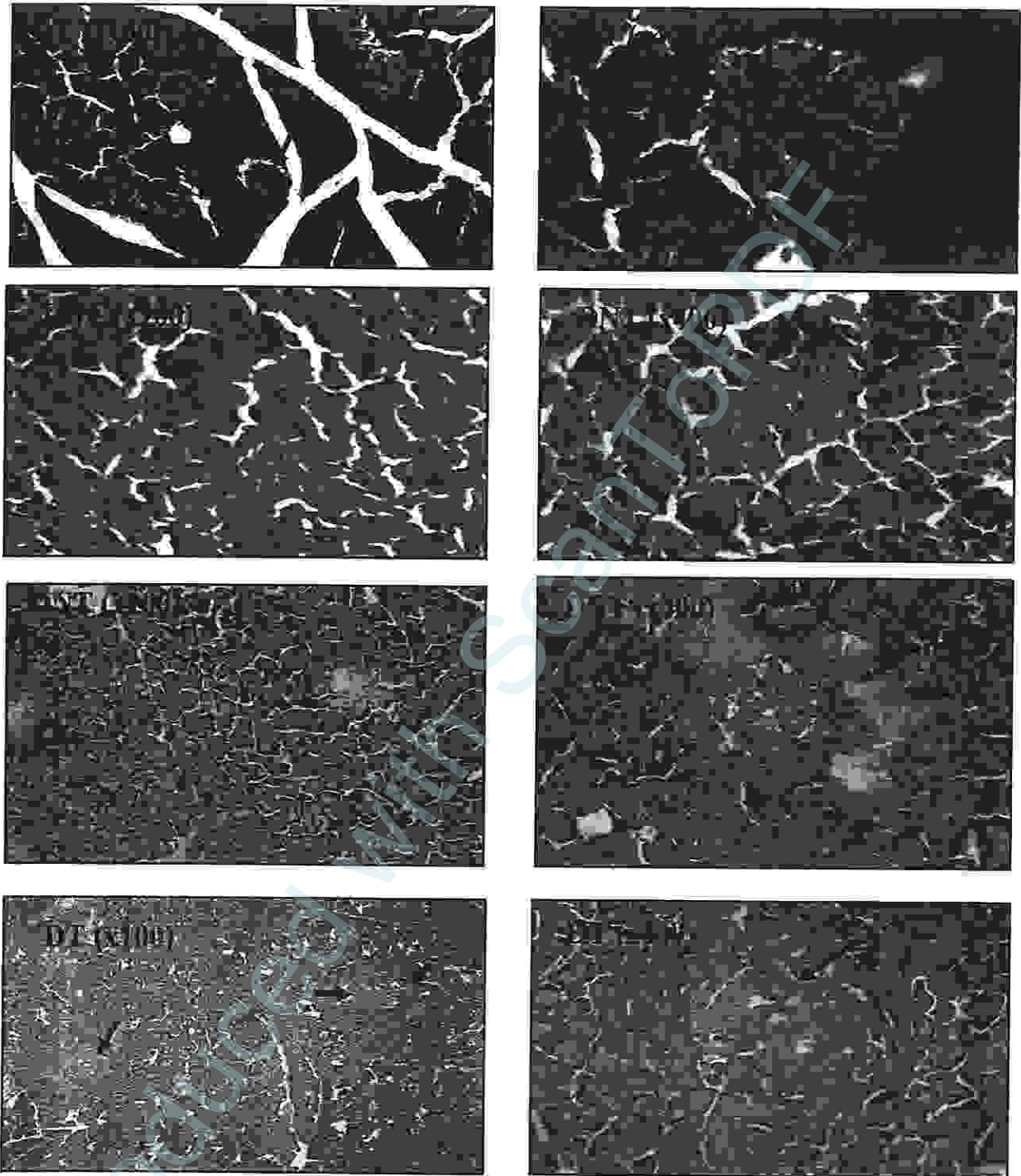


Figure 15 : Photos des coupes histologiques du pancréas endocrine des lapins diabétiques non traités et ceux traités à la vitamine C (Coloration , hémalun-éosine).

IN : îlots de langerhans nécrotique (en voie de dégenérescence)
 → : îlots de Langerhans.

***DISCUSSION
&
CONCLUSION***

Produced with Scantopdf

Discussion :

La vitamine C intervient dans plusieurs fonctions indispensables à notre organisme. A cet effet, elle présente plusieurs propriétés dont : un cofacteur enzymatique impliqué dans un certain nombre de réactions physiologiques (hydroxylation). Elle est requise dans la synthèse du collagène et des globules rouges et contribue au système immunitaire. Elle joue également un rôle dans le métabolisme du fer en tant que promoteur de son absorption. Sous sa forme oxydée, elle traverse la barrière hémato-encéphalique pour accéder au cerveau et à plusieurs organes. Il s'agit d'un antioxydant, molécule capable de contrer l'action néfaste d'oxydants comme les radicaux libres (Irwin, 2003).

De ce fait plusieurs travaux ont été réalisés pour évaluer l'effet antioxydant de la vitamine C sur différentes pathologies telles que le diabète d'où l'importance de notre étude.

Cette étude nous a permis de tester l'efficacité de la vitamine C, au niveau de l'aspect physiologique, biochimique et histologique, sur le diabète induit chez les lapins de souche *Cuniculus lepus*.

La voie d'administration choisie est la voie orale parce que c'est une voie d'administration physiologique, elle offre certains critères d'efficacité et de commodité. De plus, elle ne nécessite aucun matériel particulier. Du point de vue pharmacologique, la voie orale est la plus couramment utilisée (70 à 80% des médicaments sont administrés par voie orale). Cette voie est généralement bien acceptée par les patients.

Plusieurs techniques sont couramment utilisées afin de produire, chez l'animal, un état comparable au diabète sucré, en vue de mieux le comprendre ou de trouver de nouvelle thérapie. Le diabète sucré peut être induit chez une variété

large d'espèces animales par différentes techniques dont l'injection de l'alloxane qui est abondamment utilisée (Szkudelski et al., 2001). Cet agent diabétogène entraîne un effet cytotoxique sélectif des cellules β des îlots de Langerhans par le biais de la génération des radicaux superoxydes (Lenzen et al., 1988). L'alloxane provoque une altération du métabolisme glucidique, lipidique et protéique due à la défaillance en insuline (Liu et al., 2007). De plus, l'injection de l'alloxane est à l'origine d'une chute de poids comme a été vu dans nos résultats (Chaudhry et al., 2007 ; Gokce et Haznedaroglu, 2008). Une seule dose d'alloxane est injectée aux lapins par voie intraveineuse (100mg/Kg de poids) (Gumieniczek et al., 2002).

Dans nos conditions expérimentales, On a enregistré un déficit pondéral chez les lapins diabétiques non traités. Cet effet peut être dû au manque d'insuline qui conduit à la dégradation des protéines structurales qui sont connues par leur contribution au poids corporel (Rajkumar et Govindarajulu, 1991; Vats et al., 2004). Tandis que, l'administration orale de vitamine C a induit une augmentation remarquable du gain de poids chez le lot traité par la dose 100mg/kg. Cela peut s'expliquer par l'effet de la vitamine C ralentissant le développement du diabète et la dégradation des protéines structurales (Bulduk et al., 2006).

Après le traitement des lapins diabétiques par la vitamine C pendant trois semaines et après leur sacrifice; l'analyse des résultats a montré une diminution significative de la concentration sérique du glucose par rapport aux lapins diabétiques non traités. L'effet antihyperglycémique de la vitamine C est confirmé dans les travaux de Jacqueline et al., (1996), qui ont justifié la diminution de taux du glucose sérique chez les lapins diabétiques traités par la vitamine C par l'action de celle-ci sur les dommages des cellules β principalement liés aux lésions toxiques provoqués par l'agent diabétogène. Ces dommages peuvent être réparés par le traitement à la vitamine C.

Ce qui confirme vraiment cette hypothèse c'est la constatation au niveau des coupes histologiques du pancréas endocrine conduisant à la libération de l'insuline. Nous concluons donc que l'acide ascorbique présente une forte activité hypoglycémiant chez les diabétiques grâce à sa fonction cytoprotectrice vis-à-vis des cellules β des îlots de Langerhans.

De nombreuses recherches ont démontré que les diabétiques présentent en général une hyperglycémie chronique accompagnée d'une élévation du profil lipidique, (Chevenne et Porquet, 2003 ; Cheng et Fantus, 2005), due à la dégradation intense des composés lipidiques des tissus adipeux pour assurer l'énergie nécessaire aux fonctions vitales de l'organisme. D'autre part, l'hyperglycémie provoque un désordre métabolique traduit par des changements de la voie normale du glucose, où une partie du glucose est transformée en acides gras et glycérol et puis la synthèse des triglycérides et cholestérol (Patricia et al., 1995 ; Marc et al., 2006). L'administration orale de vitamine C a diminué considérablement le taux sérique du cholestérol et des triglycérides chez les lapins diabétiques. On peut expliquer cette diminution du cholestérol par le rôle de la vitamine C comme un cofacteur enzymatique de 7-alpha-hydroxylase permettant la conversion du cholestérol en acides biliaires qui est la principale voie utilisée par l'organisme pour se débarrasser du cholestérol en excès (Lewin, 1976; Marc et al., 2006). Plusieurs travaux ont montré aussi que la vitamine C entraîne une réduction des niveaux de triglycérides plasmatiques chez les diabétiques (Jacqueline et al., 1996).

L'une des caractéristiques observée chez les diabétiques est la diminution des protéines dans le sang, à ce titre, les travaux d'Asayama et al., (1993) ont montré que la diminution des protéines chez les animaux diabétiques est due à la diminution de la synthèse protéique dans le foie. Par ailleurs, chez les diabétiques non traités, on observe une augmentation particulière de la teneur plasmatique en

acide urique, en créatinine et en urée considérant comme marqueurs significatifs du dysfonctionnement rénal (Almadal et Vilstrup, 1988). Ceci est expliqué par le fait que les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. De plus, la glycation des protéines dans le diabète peut entraîner une atrophie musculaire et augmente la libération de la purine ; la principale source de l'acide urique (Anwar et Meki, 2003), aussi l'augmentation de l'acide urique, peut être expliquée par la dégradation des acides nucléiques en acide urique (Colev et al., 1994 ; Patricia et al., 1995). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration sérique de la créatinine, d'acide urique et d'urée causée par le diabète a été déclinée après l'administration de la vitamine C à raison de 100 mg/kg. Inversement la protéinémie est élevée notamment chez les lapins traités. Ceci est en accord avec les résultats précédents qui ont montré que la vitamine C joue un rôle positif dans l'amélioration de la concentration du glucose et la régulation de la sécrétion d'insuline. Alors, dans ce cas la dégradation des protéines diminue, et leur synthèse augmente et par conséquent la concentration de l'urée, d'acide urique et de la créatinine diminue.

En ce qui concerne les paramètres enzymatiques, nous avons remarqué une diminution hautement significative de l'activité des transaminases (TGO et TGP) dans le sérum des lapins diabétiques traités par la vitamine C. Cette diminution est expliquée par l'effet de la vitamine C sur la production d'insuline par les îlots de Langerhans, et la régulation de la concentration sérique du glucose (Del Pino-Montes et al., 2004; Luong et al., 2005; Mathieu, 2005) . Ce qui induit une diminution de la dégradation des protéines et l'accumulation des acides aminés dans le sang, et par conséquent l'activité enzymatique des transaminases diminue. Par contre chez les lapins non traités, il ya un niveau élevé des activités enzymatiques transaminases (TGO, TGP). Ceci peut s'expliquer par l'accumulation des acides aminés comme l'alanine, le glutamate dans le sérum

provenant de la dégradation des composés protéiques du corps. De ce fait, ces acides aminés peuvent se transformer sous l'action des transaminases sériques en composés carboxyliques tel que α céto glutamate et l'acide pyruvique puis en glucose. Ce qui implique alors une forte activité enzymatique de TGO et TGP. Ceci peut être expliqué aussi par l'effet hépatotoxique de l'alloxane.

Nos résultats ont montré également une diminution hautement significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les lapins diabétiques traités. Une explication possible de l'action de la vitamine C sur l'activité de la PAL ainsi que celle des transaminases, dans le sérum est que le traitement par la vitamine C peut inhiber le dommage du foie induit par l'alloxane.

Par contre, l'augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline chez les lapins diabétiques confirme l'atteinte du tissu hépatique. Cette augmentation peut être due principalement à la fuite de ces enzymes du cytosol du foie dans la circulation sanguine (Navarro, 1993). Cependant, l'administration de la vitamine C pendant 21 jours consécutifs pourrait restaurer les activités de ces enzymes à leurs niveaux normaux.

Il n'est pas douteux que l'organisme humain s'efforce de maintenir l'homéostasie en inhibant l'effet nuisible d'origine endogène et/ou exogène des radicaux libres, le système de défense endogène lié au glutathion est considéré comme un moyen très efficace pour combattre les dommages et les dysfonctionnements causés (Soon et Tan, 2002). Nos résultats révèlent une augmentation significative de la teneur hépatique en glutathion chez les lapins diabétiques traités par la vitamine C qui est un puissant antioxydant qui va agir sur le stress oxydatif augmentant ainsi l'activité du glutathion. La vitamine C va

maintenir voire améliorer le niveau du GSH hépatique qui est bénéfique pour réduire les radicaux libres générés au cours du diabète (Lapolla et Fedele, 1993).

Cependant, chez les lapins non traités, on note une baisse de la teneur hépatique en glutathion après l'injection de l'alloxane (Bulduk et al., 2006). Il a été suggéré que la baisse du taux du GSH hépatique pourrait être le résultat de la diminution de sa synthèse et/ou sa dégradation massive par le stress oxydatif chez le diabétique (Loven et al., 1986).

En ce qui concerne l'histologie; le pancréas des lapins rendus diabétiques présente des îlots nécrotiques avec une destruction des populations cellulaires, notamment les cellules β (Hamden et al., 2008). Ceci est dû, mentionné précédemment, à l'effet cytotoxique de l'alloxane qui se comporte comme un agent relatif d'inhibition enzymatique ayant des conséquences négatives sur la sécrétion exocrine pancréatique, procès accompagné par un diabète typique dû à la défecion apparue de la sécrétion insulinique (Hincü et al., 2006). En revanche, l'histologie pancréatique des lapins traités à la vitamine C démontre une nette amélioration des cellules. Cette conclusion trouve son utilité dans une étude où ils ont visualisé l'efficacité de la vitamine C sur la protection des tissus endommagés du pancréas (Khaled et al., 2008).

Conclusion

Notre étude s'est basé sur l'effet de la vitamine C sur les complications du diabète et suite à cela, nous avons constaté que :

- L'injection intraveineuse de l'alloxane chez les lapins de souche *cuniculus lepus* a induit des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique et protéinique, procès accompagné par un déficit pondéral remarquable.
- Le diabète alloxanique a provoqué également des altérations histologiques du pancréas révélées par la dégénérescence des îlots de Langerhans et la mort cellulaire par nécrose dus à la surproduction de radicaux libres générés. Ceci est combiné à une déplétion du système de détoxification du glutathion.
- L'administration orale régulière de la vitamine C à raison de 100 mg/kg aux lapins diabétiques pendant 21 jours a maintenu voire amélioré la croissance pondérale. Elle a ainsi montré un effet anti-hyperglycémiant.
- En ce qui concerne les paramètres : cholestérolémie et triglycéridémie, le traitement par la vitamine C a rétabli les valeurs aux normes et réduit en parallèle les troubles du bilan rénal (urée, acide urique).
- Pour l'activité enzymatique, la vitamine C utilisé a restauré l'activité des transaminases (TGO et TGP) et de la phosphatase alcaline (PAL), par contre elle augmente l'activité des protéines.
- La vitamine C a montré un remarquable effet cytoprotecteur du pancréas

contre les radicaux superoxydes générés par l'alloxane en préservant la capacité de synthèse de l'insuline. De plus elle a renforcé, la capacité de détoxification hépatique liée au glutathion.

Enfin nous pouvons confirmer que la vitamine C est douée d'une activité antidiabétique et antioxydante remarquables. De ce fait, elle peut constituer une solution pour les futures études sur le diabète sucré et ses complications.

Perspectives :

¶ Vu l'importance de ces résultats, il serait avantageux de poursuivre la recherche, en prenant en considération les recommandations suivantes :

- Travailler sur d'autres dérivés de la vitamine C, en utilisant des différentes doses.
- Développer la recherche afin de bien connaître le mécanisme réel de l'activité antioxydante de la vitamine C.
- Élargir le domaine de recherche sur la vitamine C afin de l'utiliser dans l'avenir comme un remède efficace et non comme un simple moyen de prévention.

Références bibliographiques

- Agaoglu, Z.T., Atasoy, N., Dede, S., Gunduz, S and Mert, N. (2002). Serum trace elements status of rabbits supplemented with *Nagela Sativa*, vitamine C and vitamine E and selenium agents damage by N-Methyl-N'-nitrosoguanidine. *Humana press jric.* 89: 65-71.
- Albert, S., Petr, S., Herbert, L and Cortez, F. (1979). *From Nutrition today.* 7: 15-17.
- Allain, P. (2008). *Les médicaments 3 ème édition.* CDM Editions. 20-35.
- Almadal, T.P and Vilstrup, H. (1988). Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea-N synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologica* ; 31: 114-118.
- Anderson, H.R and Stitt, A.W. (1993). Inducation of alloxan streptozotocin diabetes in dogs a revised experimental technique. *Lab -anim.* 27: 281-285.
- Anwar, M.M and Meki, A.R. (2003). Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. Molecular and Integrative Physiology* ; 135: 347-539.
- Asayama, K., Uchida, N., Nakane, T., Hayashibe, H et al. (1993). Antioxidant in the serum of children insulin dependent diabetes mellitus. *Free. Radic. Biol. Med.* 15: 597-602.
- Augusti, K.T and Sheela, C.G. (1996). Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* ; 52: 115-120.
- Baker, E.M. (1969). Metabolism of ascorbic acid in experimental huma scurvy. *Clinical Nitrition.* 22 : 549-558.

- Bakour, F and Siouane, Z. (2007). L'apport du dosage de Hb gluquée dans le diagnostic de diabète insulino-dépendant. *Mémoire licence biochimie, université Badji Mokhtar, Annaba.* p : 39.
- Benlamari, S., Bensalem, W and Boukhemara, H. (2001). Etude de la distribution de Zn entre l'albumine et α 2- globuline chez les diabétiques - insulino-dépendants. *Mémoire Licence biochimie université Badji Mokhtar, Annaba.* p : 47.
- Benghida, S., Benssalia, Z and Boukhedenaan, M. (2007). Les maladies mitochondriales et diabète sucrée. *Mémoire d'ingénieur de génie biologie université 08 Mai 45 Guelma.* p : 50.
- Boisson-Vidal, C., Haroun, F and Ellovali, M. (1995). Biological activity of polysaccharide. From nat algae. *Drugs of future.* 20: 1237-1249.
- Bourne, C. (1949). Vitamin C and immunity. *Brit.J.Nutr.* 2: 341.
- Buccolo, G et al. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin. Chem.* 19(5): 476-482.
- Bulduk, E., Gonul, B and Ozer, C. (2006). Effect of vitamin C on muscle glycogen and oxidative events in experimental diabetes. *Molecular and cellular biochemistry* 292: 131-137.
- Burns, J. (1956). Biosynthesis of L-ascorbic acid. Basic defect in scurvy. *Amer.J.Med.* 26: 740-748.
- Burtis, A et al. (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed Philadelphia: W.B.Saunders: 2213-2214.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochim.* 72: 248-254.
- Camerone and Pauling, (1977). Vitamin and cancer. *Environ studies.* 10: 305.

- Charlton, B and Bacel, J.A. (1989). Cyclophosphamide induced diabetes in NOD/VEHL mice. Evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes. *Mellitus diabetes*. **38**: 441-447.
- Chaudhry, J., Ghosh, N.N., Roy, K and Chandra, R. (2007). Antihyperglycemic effect of a new thiazolidinedione analogue and its role in ameliorating oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Life Sciences* ; **80**: 1135-1142.
- Cheng, A and Fantus, L.G. (2005). Oral anti hyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian medical association journal*. **172** (2): 213-226.
- Chevenne, D and Porquet, D. (2003). Diabète sucré dans biochimie pathologies : Aspect moléculaire et cellulaire. *Édition Flammarion Médecine-science France*. p : 117-192.
- Claude, B. (2003). Les vitamines dans les industries agro-alimentaires. Collection sciences et technique agro-alimentaires. *Édition Lavoisier -tec et Doc*. p : 712.
- Ceriello, A., Taboga, C., Giacomella, R and Bartoli, E. (1997). Fibrinogen plasma levels as a marker of thrombin activation in diabetes. *diabetes*. **43**(3): 430-432.
- Colev, V., Badescu, M., Paduraru, I et al. (1994). The zinc metabolic disorder in experimental diabetes mellitus. *Rom. Intern. Med.* **32**: 71-75.
- Damien, E. (2002). Présentation et dosage de l'acide ascorbique. *Icafoe-louvain-lanouve*.
- Delatter, J., Durand, J and Jardillier, J.C. (2003). Biochimie pathologique : Aspect moléculaire et cellulaire. p : 177.
- Del Pino-Montes, T., Benito, G.E., Fernandez-Salazar, R et al. (2004). Calcitriol improves streptozotocin-induced diabetes and recovers bone mineral density in diabetic rats. *Calcified Tissue International*. **75**: 526-532.
- Denke, M.A., Fox, M.M and Schulte, M.C. (1993). Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *Nutr.* **123**: 1047-1053.
- Dietary References intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium and carotenoids. (2000). *fund nutrition Board. Institute of medicine*.

- Djemil, I.K. and Nahal, G. (2009). Contribution à l'étude du diabète de type 1 chez les femmes en grossesses. *Mémoire d'ingénieur de génie biologique. Université 08 Mai 45 Guelma*. p : 3-6.
- Diane, C. (2009). Recherches stop diabetes damages with Vitamin C. *endojournals*. 1: 762.
- Dmoszynska, A., Walter-Cronek, A and Ledwozyw, A. (1991). Lipid peroxidation products and changes in phospholipids composition induced by indobafen in diabetic platelets thrombi. *RES*. 75(5): 483-490.
- Eidi, A., Eidi, M and Esmaeli, E. (2005). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum*) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I and Abou El-Naga, N.I. (2004). Biochemical study on the hypoglycaemic effects of onion and garlic in alloxan- induced diabetic rats.
- England, S and Seifters, S. (1986). The biochemical function of ascorbic acid, *Annual review of nutrition*. 6: 365-406.
- Ellips, E.A., Grani, M.B., Murray, F.T., Wachowski, M.B., Guberski, D.L., Kubilis, P.S and Luffy, G.A. (1998). Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/ WOR diabetic rat. *Free radic. Biol. Med* .24 (2): 111-120.
- Florian S, H., G and, I., Isbell, M., Nadine, S and Brigit, M.(2005). *Edition flammarion*. 19: 125-126.
- Funk, C. (1912). The etiology of deficity diseases. *J. State Med* .20: 341-368.
- Ginter, E (1975). The roll of ascorbic acid in cholesterol catabolism antherogenesis. *Slovak Academy of sei Bratislava*. 258: 483.
- Gribe, A and Merzougui, I. (2009). Etude de l'effet antidiabétique de l'extrait aqueux de la graine de *Lipinus albus*. *Mémoire de master biochimie Université Badji Mokhtar, Annaba*. p: 2-5.
- Gallou, G., Ruelland, A., Champion, D., Maugendre, D., Le moulec, N and Cloarc, L.(1994). Increased in thiobarbituric acid-reactive substances and vascular complication in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab* .20(3): 258-264.

- Gokce, G and Haznedaroglu, M Z. (2008). Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of *Posidonia oceanica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*; **115**: 122-130.
- Gorinn-Gotrauy A., Paoloni-Giacobino Y., Dupertuis G. Benais-Pont C.Pichard, Cancer et statut vitaminique: Quelles relations ? , *revue médicale suisse* n°541 publiée le 19/11/2003.
- Griesmacher, A., Knoebl, P., Andri, R.E and Schernihaner, G. (1995). Enhanced serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances diabetes mellitus. *Am.J.Med.* **98**(5): 469-475.
- Grundy, S.M and Denke, M.A. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *Lipid. Res.* **31**: 1149-1172.
- Hamden ,k.,Ali Boujbiha,M.,Masmoudi ,H., Makni Ayadi ,E.,Jamoussi,K and Elfaki, A. (2008) :combined vitamins (C and E) and insulin improve oxidative stress and pancreatic and hepatic injury in alloxan diabetic rat *Biomedicine&Pharmacotherapy.* **6**: 95-99.
- Hartnett, M.E., Startton, N.D and Armestron, R.D. (2000).serum markers of oxidative stress and severity of adivit retinopathy. *Diabetes care.* **23** (2): 234-240.
- Hasanein, P., and Shahidi, S. (2010). Effect of combined treatment with vitamins C and E on passive avoidance learning and memory in diabetic rats. *Neurobiology of learning and memory.***10**:1016.
- Hennen, G. (1996). Biochimie humaine. Introduction biochimique à la médecine interne. *Edition Bock university.* **02**: 457-475.
- Hennen, G. (2001). Endocrinologie. *Edition Bock university.* **03**: 127-132.
- Henquin, J.E. (2001). Le traitement pharmacologique diabète de type 2. Mode d'action des médicaments d'aujourd'hui et demain. *Louvain Medical.* **124**: 39-46.
- Herbert, V., Jacob, E (1974). Destruction of vitamin B 12 by ascorbic acid .*Jama.* **230**: 241-242.
- Hincu, M., Pantea, S., Anca, M., Coman, E.M et Mehedinti, T. (2006). L'effet de l'alloxane sur l'histologie du tissu pancréatique. *Fascicula XVII, Anul VI.*
- Houlot, R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Ed Maloine;* 19-21 and 225-227.

- Humbel, R.L. (2002). Maladies autoimmunes des glandes endocrines. *Geai l'info* 5: 21-23.
- Irwin stone (1972). The Natural History of Ascorbic Acid in the Evolution of the Mammals and Primates and Its Significance for Present Day Man, From *Orthomolecular Psychiatry*, 1972, Volume 1, Numbers 2 & 3, pp. 82-89.
- Jacqueline, C., Jacquie, S., Costas, L., Peter, R and Christopher, R. (1996) .effect of vitamin C supplementation on hepatic cytochrome P450 mixed-function oxidase activity in streptozotocin-diabetic rats. *Toxicology letters* 89: 249-256.
- Jean, C and Henri, C. (1977). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Collection technique et documentation edition Lavoisier*. P: 381.
- Jain, R.C and Vyas, C.R. (1975).Garlic in alloxan-induced diabetic rabbits. *American Journal of Clinical Nutrition*; 28:684-685.
- Jain, S.K., Stephan, K and Smith, T. (1998). Relation of blood thromboxane B2 with lipid hydrogenoxide and diabetic patients. *Diabetes care*. 21(9): 1511-1515.
- Kaplan, L.A. (1984). Glucose. *Clin. Chem.* 1032-1036.
- Kaplan, L.A et al. (1984). Lipids. *Clin. Chem.* 918-919.
- Khaled Hamden et al. (2008). Combined vitamins (C et E) and insulin improve oxidative stress and pancreatic and hepatic injury in alloxan diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63. 95-99.
- Krebs, N.A., Peters, R.A and Coward, K.H.(1948). Vitamin C requirement of human adults, experimental study of vitamin C deprivation in man. *lancet*.254: 853-858.
- Kubler, W and Gehler, J. (1970). On the kinetics of the intestinal absorption of ascorbic acid, a contribution to the calculation of an absorption process that is not proportionl to the dose. *International journal of vitamin and nutrition recherche*. 40: 442-453.
- Kukeja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L and Ellis, E.F. (1986). PGH synthetase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NANH or NADPH .*Circ.Res.*59 (6): 612-619.

- Kumar, G.R and Reddy, K.P. (1999). Reduced nociceptive responses in mice with alloxan induced hyperglycemia after garlic (*Allium sativum*) treatment. *Indian Journal of Experimental Biology*; 37:662-666.
- Lapolla, A and Fedele, D. (1993). Oxidative stress and diabetes: role in the development of chronic complications. *Minerva Endocrinol*; 18:99-103.
- Lenzen, S and Panen, V. (1988). Alloxan, history and mechanism of action. *Diabetologia*. 31: 337-342.
- Levine, M. (2001). Concept in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New England journal of medicine*. 314: 892-898.
- Lewin S. (1976). Vitamin C : Its Molecular Biology and Medical Potential. *Academic Press*. 29: 645-649.
- Liu, Z., Li, J., Zeng, Z., Liu, M and Wang, M. (2007). The antidiabetic effects of Cysteinyl Metformin, a newly synthesized agent, in alloxan- and streptozocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*.
- Loven, D., Schedl, H., Wilson, H., Daabees, T.T., Stegink, L.D., Diekus, M and Oberley, L. (1986). Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin induced diabetes. *Diabetes*; 35:503-507.
- Luong, K., Nguven, L and Nguven, D. (2005). The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. *Diabetes-Metab. Res. Rev.* 21: 338-346.
- Mandfred, S and Nicole, M. (1998). Additive alimentaire technologique. *Collection agro-alimentaire edition Dunod*. p: 217.
- Marc, P., McRae, M., Dc., Cns., Dacbn. (2006). The efficacy of vitamin C supplementation on reducing total serum cholesterol in human subjects: A review and analysis of 51 experimental trials. *Journal of chiropractic medicine*.5:2-12.
- Mark, A., Fernandez, L., Boyd, L and O'Dell. (1983). Effect of zinc deficiency on plasma glutathione in the rat. *Biology and Medecine*.173: 564-567.
- Mathieu, C., Gysemans, C., Giulietti, A and Bouillon, R. (2005). Vitamin and diabetes. *Diabetologia*. 48: 1247-1257.

- Morel, P and Kanfman, D.B. (1998). Total pancreatectomy for islet transplantation. *technical alternatives transplantation*. 52: 11-15.
- Murray, R.L. (1984). Creatinine. *Clin. Chem.* 418: 1261-1266.
- Murray, R. (1984). Aspartate aminotransferase. *Clin. Chem.* 120: 1112-1116.
- Naïto, H.K. (1984). Cholesterol. *Clin. chem.* 437:1194-11206.
- Navarro, C.M., Montilla, P.M., Martin, A., Jimenez, J and Utrilla, P.M (1993). Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus. *Plan. Medicine*; 59:312-314.
- Nourooz -Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Mc carthy, S., Betteridge, D.j and Wolff, S.p. (1990). Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in DDM. *Diabet.*, 44: p 1054-1058.
- Oksman, F and Hmbel, R.L. (2004). Marqueurs immunologiques du diabète insulino-dépendant. *3eme colloque GEAI. Supplement au revue française des laboratoires*. 361: 16-20.
- Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D.D., Ergun, F and Yesilada, E. (2006). In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* ; 108:280-286.
- Oser, k and Falko, J.M. (1984). Diabetogenic effect of pentamidine in vitro and in vivo studies in patient with malignant insulinoma. *Am.J.Med.* 77: p 41-46.
- Patan kar, M., Oehninger, S., Barnett, T., Williams, R.L and Clark, G.F. (1993) revised structure for funcoidan may explain some of its biological activities *J.Biol.Chem.* 268: 21770-21776.
- Patricia, I.O., Wtherine, L.O., Cesar, C.F and Carl, L.K. (1995). Zinc deficiency causes oxidative damage to protein, lipids and DNA in rats testes. *Nutr.* 125: 823-829.

- Pauling, I and Pauling, p. (1975). For the best of health - how much vitamin C do you need? *Chemistry W.H.freeman and company S.F* ; **12(3)**: 1-5.
- Popov, S.V., Popova, G.y., Ovodova, R.G and Ovodov, Y.S. (2005). Anti-inflammatory activity of the pectic polysaccharide from comarum. *Palustre.Fitoteropi*. **76(3)**: 281-287.
- Portha, B. (2003). Anomalies programmes de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type2 : le paradigme du rat GK. *Medecine sciences*. **19**: 847-853.
- Rajkumar, L and Govindarajulu, P. (1991). Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian J Exp Biol*; **29**:1081-3.
- Reid, I.R. (2004). Effect of calcium supplementation on circulating lipids : potential pharmacoeconomic implications. *Drugs Aging*. **21**: 7 17.
- Robert, F. (1991). Cathcart unique function for ascorbate. *Annual review of nutrition*.**4** : 221-224.
- Rodier, M. (2001). Le diabète de type 1. *Medecine Nucléaire-Imagerie fonctionnelles et métabolique*.**25** (2): 12-14.
- Rodier, M. (2001).Définition et classification du diabète. *Medecine Nucléaire-Imagerie fonctionnelles et métabolique*. **25**: 91-93.
- Rosalki, S et al. (1993). *Clin. Chem*. **39(4)**: 648-652.
- Santé Canada, fichier canadien sur les éléments nutritifs. (2005). Université de l'agriculture des Etats-Unis (USDA), *national nutrient Database for standard references*.
- Schultz, A. (1984). Uric acid. *Clin. Chem*. **148**:1261-1266.
- Sénécat, O. (1996). Le diabète autoimmune (type 1), essais de modulation du diabète chez la Souris non obese diabétique. (NOD) pendant la période néonatale. *The Med V et Nantes*. **22**: 45-47.

- Soon, Y.Y and Tan, B.K.H. (2002). Evaluation of the hypoglycaemic and antioxidant activities of *Morinda officinalis* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Medical Journal*; 43:77-85.
- Spina, G.A and Lehmann, R. (2001). Diabète sucrée diagnostic, classification et pathogénèse. *Forum Med Suisse*. 20: 519-525.
- Stubbe, J.A (1985). Identification of two alpha keto glutarate dependant dioxygenases in extracts of *rhodotorula glutinis* catalyzing deoxyuridine hydroxylation. *Journal of Biological chemistry*. 260: 9972-9975.
- Svirbely, J.V and Szent-Gyorgyi, A. (1932). Hexuronic acid as anti-scorbic. *Factor Nature*. 129: 690.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *PhysioRes* 50:537-546.
- Therapeutic perspectives. (1998). *Acta Diabetol*. 35: 117-129.
- Trombetta, D., Pugllia, C., Perri, Licata, A and Bonima, F.P. (2006). Effect of polysaccharides from *opuntia ficus in dca* (L) cladodes on the healing of dermal wounds in the rats. *Phytomedicine*. 13: 352-358.
- Vadde, R and Rama, J. (2008). Oxidative stress in non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patient. *Acta Diabetol*; 45:41-46.
- Vaskonen, T. (2003). Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *Nutr. Biochem*. 14: 492-506.
- Vats, V., Yadav, S.P and Grover, J.K. (2004). Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J. Ethnopharmacol*; 90:155-160.
- Venkateswaran, S and Pari, L. (2002). Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*; 11:206-209.
- Verchere, C.D. (1996). Consequences of human rapp expretion in transgenic mice. *Lesson from animal diabetes*. VI: 1237-1294.

- Vidal-Boisson, C.B., Haroun, F and Ellouali, M. (1995). Biological activities of polysaccharides from marine algae. *Drugs of the future*.20: 1237-1249.
- Weakberker, G and Cory, J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro. *Cancerletters*. 40: 275-264.
- Weyer, C and Boyarduc, C. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2. *diabetes mellitus*.J.clin. Inverts. 104: 787-794.
- Wolff, S.P and Dean, R.T. (1987). Glucose autoxidation and protein modification, the potential and glucation theory. *Prog. Clin.Biol. Res.* 304: 259-275.
- Wondrack, L.M., Hsu, C.A and Abbott, M.T. (1978). Thymine 7-hydroxylase and pyrimidine deoxyribonucleoside hydroxylase activities in rhodotorula glutinis. *Journal of Biological chemistry*. 253: 6511-6515.
- Yasumami, R and Bach, J.F. (1988). Anti suppressor effect of cyclophosphamid in the development of spontaneous diabetes in mice. *Eru. Immunol.* 18: 481-484.

Produced with Scantopdf