

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE, USTHB / ALGER

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

Présentée pour l'obtention du **diplôme de DOCTORAT 3^{ème} CYCLE**

En sciences biologiques

Spécialité : Nutrition et Diététique dans les Pathologies Humaines

Par : **BOUAZZA Asma**

SUJET

**EFFETS ANTIOXYDANTS DES VINAIGRES DE FRUITS CHEZ LE RAT
WISTAR RENDU DYSLIPIDEMIQUE**

Soutenue publiquement le 03/12/2015, devant le jury composé de :

M^r KOCEIR Elhadj-Ahmed, Professeur, FSB, USTHB.....Président
M^r BITAM Arezki, MCA, ENSA (ex INA), ElHarrach.....Directeur de thèse
M^{me} BARKA Zohra, Professeur, FSB, USTHB.....Examinatrice
M^{me} BELKEBIR Aicha, Professeur, FSB, USTHB.....Examinatrice
M^r BEAUDEUX Jean Louis, Professeur, Université Paris Descartes, France.....Examinateur
M^r BAALIOUAMER Aoumer, Professeur, Faculté de chimie, USTHB.....Examinateur

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE, USTHB / ALGER

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

Présentée pour l'obtention du **diplôme de DOCTORAT 3^{ème} CYCLE**

En sciences biologiques

Spécialité : **Nutrition et Diététique dans les Pathologies Humaines**

Par : **BOUAZZA Asma**

SUJET

**EFFETS ANTIOXYDANTS DES VINAIGRES DE FRUITS CHEZ LE RAT
WISTAR RENDU DYSLIPIDEMIQUE**

Soutenue publiquement le 03/12/2015, devant le jury composé de :

M^r KOCEIR Elhadj-Ahmed, Professeur, FSB, USTHB.....Président
M^r BITAM Arezki, MCA, ENSA (ex INA), ElHarrach.....Directeur de thèse
M^{me} BARKA Zohra, Professeur, FSB, USTHB.....Examinatrice
M^{me} BELKEBIR Aicha, Professeur, FSB, USTHB.....Examinatrice
M^r BEAUDEUX Jean Louis, Professeur, Université Paris Descartes, France.....Examinateur
M^r BAALIOUAMER Aoumer, Professeur, Faculté de chimie, USTHB.....Examinateur

REMERCIEMENTS

*Je remercie tout d'abord **ALLAH**, le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.*

*Ce travail a été effectué sous la direction scientifique du **Docteur Arezki BITAM**, Maître de Conférences A, spécialiste en Nutrition humaine à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie – ELHARRACH, Alger. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et mes sincères remerciements pour son encadrement indéfectible et de sa présence au quotidien pour que cette thèse soit réalisée dans les meilleures conditions possibles.*

Aux membres du jury

*Ce travail a été effectué au laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, équipe Bioénergétique et Métabolisme Intermédiaire (BMI), dirigée par le **Professeur Elhadj-Ahmed KOCEIR**, responsable de notre formation doctorale en Nutrition et Diététique dans les Pathologies Humaines à la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari BOUMEDIENE d'Alger. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude d'avoir voulu présider le jury de cette thèse et de l'aide qu'il m'a fournie durant tout le long de ma recherche notamment par son savoir-faire, son dévouement et sa générosité.*

*Au **Pr. Jean-Louis BEAUDEUX**, Professeur de Pharmacie et biochimiste de renom à l'Université Paris Descartes. Il est le responsable de l'unité pédagogique de Biochimie, EA 4466. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et qu'il me soit permis de le remercier d'avoir bien voulu faire le déplacement pour examiner cette thèse. Vous êtes toujours le bienvenu en Algérie. Ce travail de thèse sera probablement l'occasion de renouer une forte collaboration scientifique fructueuse entre nos deux universités, dans le domaine des polyphénols, dont vous êtes expert, particulièrement pour vos travaux sur le Resveratrol.*

*Au **Pr. Zohra BARKA**, je tiens à exprimer mes remerciements d'avoir bien voulu examiner cette thèse. Son apport scientifique dans le domaine de l'histologie et de la cytologie fonctionnelle nous sera d'un grand intérêt et bénéfique pour la suite de nos travaux.*

Au **Pr. Aicha BELKEBIR**, Professeur en Physiologie végétale et spécialiste des flavonoïdes. Je la remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

Au **Pr. Aoumer BAALIOUAMER**, Professeur en Chimie Organique et spécialiste de la chimie des biomolécules contenus dans les polyphénols de diverses plantes médicinales. Je le remercie profondément d'avoir bien voulu accepter d'examiner ce travail dès lors qu'on l'a sollicité, malgré ses lourdes taches de responsabilité de laboratoire qu'il dirige.

Aux personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse,

Au **Pr. Lyece YARGUI**, Professeur de médecine, biochimiste clinicien à l'Université Alger 1 et chef de service de laboratoire central de biochimie du CHU Mustapha BACHA d'Alger. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et mes remerciements pour l'aide qu'il m'a apportée pour l'ensemble des analyses biochimiques au sein de son laboratoire. Sans cette aide, ce travail n'aurait pas pu être réalisé dans sa totalité.

Au **Pr. AMIR ZIANE CHERIF**, Professeur de médecine à l'Université Alger 1, spécialiste d'Anatomopathologie et chef de service du laboratoire d'Anatomopathologie au CHU Mustapha BACHA d'Alger. Je la remercie vivement, ainsi que son équipe pour l'aide qu'ils m'ont fournie lors du traitement des lames d'histologie et l'interprétation des observations des biopsies.

Je remercie Monsieur **AMIALI Malek**, MCA à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie –ELHARRACH, Alger. Qui a participé notamment par ses conseils pour la rédaction de l'article.

J'exprime mes plus vifs remerciements à **Mr BALI Noureddine**, vice doyen de la faculté d'informatique et d'électronique à l'USTHB –Alger, pour son aide et les nombreux services qu'il m'a rendue durant la réalisation de ma thèse.

Je voudrais remercier **Mr HABA Hicham**, pour sa contribution et son aide concernant la réalisation de l'HPLC au niveau du laboratoire de contrôle de qualité de la société pharmaceutique EL-HIKMA, dont il est responsable.

Je remercie mon collègue **BOUNIHI Abdenour**, doctorant de promo, avec lequel j'ai eu le plaisir de collaborer afin de réaliser ce travail.

Je n'oublie pas de remercier vivement nos collègues de l'équipe de Bioénergétique et Métabolisme Intermédiaire, en l'occurrence : Mr **BELARBI Chmesdin**, Pr **OMARI Naima**, Pr **AOUICHAT Souhila**, Dr **BOUDERBA Saida**, Mme **MEBARKI Fériel** et Mr **ZELMAT Abdelmadjid** qui n'ont pas manqué à nous inculquer leurs connaissances, aides et conseils.

Je voudrais remercier mes amies et mes amis doctorants de notre équipe et de l'équipe Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire avec qui j'ai passé de meilleurs moments: **MAOUCHE N.**, **BENHAMACHA M.**, **AYADI K.**, **GHENNAI A.**, **GOUAREF I.**, **L'HADJ I.**, **HALZOUNE H.**, **SAIAH W.**, **SAIDI H.**, **GUEZIL A.**, **BOUMEZREG K.** et **OULD AMARA L.** et aussi pour leurs soutiens moraux à qui je souhaite réussite et succès.

Enfin, je remercie ceux et celles qui m'ont aidée d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans mon travail que je ne peux citer par omission

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents qui ont été les premiers à m'encourager pour aller si loin dans mes études. Ils m'ont appris le goût du travail et de l'ambition. Je vous dédie ce travail car je sais que vous êtes fiers de moi. Je vous remercie du fond du cœur.

Mes frères Mohammed et Djilali.

Mes sœurs Souhila et Ghizlene.

Mes neveux Mohammed Yasser et Mohammed Amine

Ma nièce Khadidja

Mon oncle maternel AMARA Djilali et ses enfants : Said, Khadidja, Souma, Maamar,

Mohamed, Abd Errahim.

Mr DJORDEM Fayçal et son épouse

La mémoire de mes grands parents

Toute ma famille

Ce travail a fait l'objet de publication et de communications suivantes :

Publication :

Asma BOUAZZA, Arezki BITAM, Malek AMIALI, Abdenour BOUNIHI, Lyece YARGUI, Elhadj Ahmed KOCEIR. Effects of fruit vinegars on liver damage and oxidative stress in high-fat-fed rats. *Pharmaceutical biology journal* 2015; 53(4): 1-6.

Communications orales:

1) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Les effets métaboliques et antioxydants du vinaigre de pomme (*Malus Pumila*) chez le rat Wistar rendu dyslipidémique. **First international congress of biotoxicology and bioactivity, Oran.** 26-27 Novembre 2014.

2) A. BOUNIHI, A. BITAM, **A. BOUAZZA**, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Fruit vinegars mitigate cardiac injury via antinflammatory and anti-adiposity actions in high fat diet-induced obese rats. **The First International Congress of Nutrition & Food Science “from Bench to Bedside”, Tlemcen.** 20 - 22 Novembre 2015.

Communications affichées:

1) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Effets métaboliques des flavonoïdes de vinaigre de grenade chez le rat wistar rendu dyslipidémique. **2^{ème} Congrès International de la Société Algérienne de la Nutrition**, Oran, 05 – 06 Décembre 2012.

2) A. BOUNIHI, A. BITAM, **A. BOUAZZA**, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Effets métabolique et inflammatoire des polyphenols de vinaigre dans les dyslipidémies. **2^{ème} Congrès International de la Société Algérienne de la Nutrition**, Oran, 05 – 06 Décembre 2012.

3) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Effets métaboliques et antioxydants des vinaigres chez le rat wistar rendu dyslipidémique. **39^{ème} Anniversaire de la création de l'USTHB, Alger**, 21-25 Avril 2013.

4) A. BOUNIHI, A. BITAM, **A. BOUAZZA**, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Polyphénols et la dyslipidémie: Effets métabolique et anti-inflammatoire des polyphenols des vinaigres de figue de barbarie et de grenade chez le rat wistar rendu dyslipidémique. **39^{ème} Anniversaire de la création de l'USTHB, Alger**, 21-25 Avril 2013.

5) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, L. YARGUI, C. BELARBI, N.A. KHAN, E.A. KOCEIR. Effects of pomegranate and prickly pear vinegar polyphenols on metabolic and oxidative stress markers on high fat diet inducing dyslipidemia in Wistar rat. **9^{ème} Congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Thérapeutique. Poitiers, France**, 22 – 24 Avril 2014.

6) A. BOUNIHI, A. BITAM, **A. BOUAZZA**, L. YARGUI, C. BELARBI, N.A. KHAN, E.A. KOCEIR. Effects of apple and prickly pear vinegar polyphenols on metabolic and inflammatory markers in Wistar rats under high fat diet. **9^{ème} Congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Thérapeutique. Poitiers, France**, 22 – 24 Avril 2014.

7) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Effets métaboliques et antioxydants des vinaigres chez le rat wistar rendu dyslipidémique. **Les journées du BPO 2014, Alger**, 26-27 Février 2014.

8) A. BOUNIHI, A. Bitam, **A. BOUAZZA**, C. Belarbi, L. Yargui, EA. Kocair. Polyphénols et la dyslipidémie: Effets métabolique et anti-inflammatoire des polyphenols des vinaigres de figue de barbarie et de grenade chez le rat wistar rendu dyslipidémique. **Les journées du BPO 2014, Alger**, 26-27 Février 2014.

9) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR. Comparaison de l'effet antioxydant de trois types du vinaigres de fruits à polyphénols. **40^{ème} Anniversaire de la création de l'USTHB, Alger**, 21-25 Avril 2014.

10) A. BOUNIHI, A. BITAM, **A. BOUAZZA**, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR.
Polyphénols et la dyslipidémie: Effets métabolique et anti-inflammatoire des polyphenols des vinaigres de figue de barbarie et de grenade chez le rat wistar rendu dyslipidémique.
40^{ème} Anniversaire de la création de l'USTHB, Alger, 21-25 Avril 2014.

11) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR.
Pouvoir antioxydant du vinaigres de grenades (*Punica granatum l.*) et de figue de barbarie (*Malus domestica*) chez le rat wistar rendu dyslipidemique.**The second international conference on natural health, Mostaganem, 26-28 Octobre 2014.**

12) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR.
Relationship between serum lipid profile and trace elements in hyperlipidemic wistar rats.**1^{er} Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative, Strasbourg, France, 4-6 mai 2015.**

13) **BOUAZZA A**, ALLEM R, BITAM A, DJILALI-SAIËAH FZ, BOUNIHI A, KOCEIR EA.
Etude de la prévalence de diabète type ii dans la région de Chlef. **5^{ème} congrès de biologie médicale et médecine de laboratoire, Alger, 18 et 19 Mai 2015.**

14) **A. BOUAZZA**, A. BITAM, A. BOUNIHI, C. BELARBI, L. YARGUI, EA. KOCEIR.
hepatoprotective effect of pomegranate vinegar against high fat diet induced acute hepatotoxicity in dyslipidemic wistar rats. **The First International Congress of Nutrition & Food Science “from Bench to Bedside”, Tlemcen. 20 - 22 Novembre 2015.**

Résumé

Les lipides sont indispensables à l'organisme. Néanmoins, leur excès provoque la dyslipidémie qui fait partie des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Ces dernières sont une des premières causes de décès dans le monde et particulièrement en Algérie. La dyslipidémie est caractérisée par des troubles métaboliques associés au stress oxydant, un facteur de risque qui peut être géré par les antioxydants naturels. Les vinaigres sont l'un des plusieurs condiments traditionnels utilisés pour le traitement de plusieurs pathologies notamment la dyslipidémie.

Dans cette étude, nous avons testé l'effet de trois vinaigres préparés à base de trois fruits: grenade [*Punica granatum* L. (Punicaceae)], figue de barbarie [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae)], et pomme [*Malus domestica* Borkh. (Rosaceae)] Contre la dyslipidémie et le stress oxydant qui en résulte. Pour cette raison, un screening de composés phytochimiques a été réalisé. Les résultats ont montré la présence de différents composés : les acides phénoliques, les acides organiques et les flavonoïdes. Une activité antioxydante élevée est également retrouvée.

La dyslipidémie est induite par un régime hypergras (126,5 cal/jour) et les vinaigres sont administrés de façon quotidienne par gavage intra-gastrique à la dose de 7ml/kg/jour pendant sept mois. A la fin de l'expérimentation, des bilans biochimiques et les paramètres du stress oxydant ont été mesurés. En outre, l'étude histologique a été réalisée au niveau hépatique. Les résultats ont montré que le régime hypergras a augmenté significativement ($p \leq 0,05$) le profil lipidique et les TBARS au niveau sérique et hépatique tandis que les enzymes antioxydantes ont été significativement ($p \leq 0,05$) diminuées par rapport au groupe contrôle. L'administration des vinaigres prouve un effet bénéfique en diminuant le profil lipidique et en améliorant l'activité antioxydante. Le vinaigre de grenade a marqué l'effet le plus efficace.

Ces résultats suggèrent les effets antihyperlipidémique et antioxydants des vinaigres de fruit qui peuvent atténuer le stress oxydant et retarder le développement des maladies cardiovasculaires.

Mots clés : Les vinaigres de fruit, stress oxydant, dyslipidémie, rat wistar.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I. La physiopathologie des lipides et des lipoprotéines	5
1. Les lipides.....	5
2. Métabolisme des lipides.....	5
3. Les lipoprotéines.....	8
4. Métabolisme des lipoprotéines.....	9
5. Régulation hormonale.....	11
5.1. Signalisation de l'insuline.....	11
5.2. L'insuline et l'homéostasie lipidique.....	12
5.3. L'insuline et l'homéostasie des lipoprotéines.....	13
6. L'insulinorésistance.....	15
6.1. Mécanisme de l'insulinorésistance.....	15
6.2. Rôle des acides gras dans l'insulinorésistance.....	15
6.3. Conséquence de l'insulinorésistance.....	16
6.4. L'insulinorésistance et la dyslipidémie.....	16
6.5. L'insulinorésistance et la stéatose hépatique.....	18
7. La physiopathologie de la dyslipidémie.....	19
8. La dyslipidémie et la lipotoxicité.....	20
9. Traitement des dyslipidémies.....	21
9.1. Les statines (Inhibiteur de l'HMG-CoA réductase).....	21
9.2. Les fibrates.....	22
II. Le stress oxydant.....	24
1. Définition.....	24
2. Le système prooxydant.....	25
3. L'origine du stress oxydant.....	26
4. Mécanisme de production des ERO.....	27

5. Les dommages liés au stress oxydant.....	28
5.1. Peroxydation lipidique.....	28
5.2. Oxydation des lipoprotéines.....	29
6. Les pathologies liées au stress oxydant.....	30
7. Le stress oxydant et l'insulinorésistance.....	30
8. Le stress oxydant et la lipotoxicité.....	31
9. Le stress oxydant et la dyslipidémie.....	32
10. Source des radicaux libres dans la dyslipidémie.....	32
III. Les antioxydants.....	33
1. Les antioxydants à poids moléculaire élevé (H.M.W).....	33
1.1. Les antioxydants enzymatiques.....	33
1.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	34
2. Les antioxydants à faible poids moléculaire (L.M.W).....	35
3. Les antioxydants naturels.....	35
IV. L'importance des vinaigres	37
1. Les vertus des vinaigres.....	37
1.1. Effet antioxydant.....	37
1.2. Effet antidiabétique.....	38
1.3. Effet contre les maladies cardiovasculaires.....	38
V. Etude des fruits sélectionnés dans cette étude.....	39
1. La grenade.....	39
1.1. Présentation et taxonomie.....	39
1.2. Usage thérapeutique.....	39
2. La figue de barbarie.....	40
2.1. Présentation et taxonomie.....	40
2.2. Usage thérapeutique.....	40
3. La pomme.....	40
3.1. Présentation et taxonomie.....	40
3.2. Usage thérapeutique.....	41

MATERIELS ET METHODES

I. La méthode de production des viniagres.....	43
II. Screening phytochimique.....	44
1. Tests qualitatifs	44

2. Tests quantitatifs.....	46
2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	46
2.2. Dosage des flavonoïdes.....	47
3. Etude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	47
3.1. Le pouvoir du piégeage du radical DPPH.....	47
3.2. Le pouvoir réducteur.....	49
4. Détermination du pH.....	49
5. Détermination de l'acidité totale.....	50
6. Identification des acides organiques et phénoliques par HPLC.....	51
II. Expérimentation animale.....	53
1. Les animaux.....	53
2. Les régimes alimentaires	54
3. Les techniques de mesure et de dosage.....	55
4. Dosage des paramètres biochimiques.....	56
5. Paramètres du stress oxydant.....	61
6. Dosage des oligoéléments.....	65
7. Statut martial.....	67
8. Dosage des protéines.....	68
9. Etude histologique.....	69
III. Analyses statistiques.....	70

RESULTATS

I. Screening phytochimique.....	71
1. Les tests qualitatifs.....	71
2. Les tests quantitatifs.....	72
2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	72
2.2. Dosage des flavonoïdes.....	73
3. Mesure de pH et de l'acidité titrable.....	74
4. Identification des acides organiques par l'HPLC.....	74
5. Identification des acides phénoliques par l'HPLC	75
6. Evaluation de l'activité biologique des vinaigres.....	75
6.1. Activité de piégeage du radical DPPH.....	75
6.2. Le pouvoir réducteur.....	77
II. Expérimentation animale	78

1. Evolution pondérale.....	78
1.1. Influence des vinaigres de fruits sur la croissance pondérale.....	78
1.2. Influence des vinaigres sur les indices organo-somatiques.....	79
2. Effets des vinaigres sur les paramètres biochimiques.....	80
2.1.Effet des vinaigres sur la glycémie.....	80
2.2. Effet des vinaigres sur l'insulinémie et l'insulinorésistance.....	81
2.3. Effet des vinaigres sur le profile lipidique au niveau sérique.....	81
2.4. Effet des vinaigres sur le profile lipidique au niveau hépatique.....	83
2.5. Evaluation du risque cardiovasculaire.....	85
2.6. Effet des vinaigres sur la fonction hépatique.....	85
2.7. Effet des vinaigres sur le bilan rénal.....	86
3. L'analyse des paramètres du stress oxydant.....	87
3.1. Effet des vinaigres sur l'activité des enzymes antioxydantes et le TAS.....	87
3.2. Effet des vinaigres sur la peroxydation lipidique.....	89
3.3. Effet des vinaigres sur les oligoéléments.....	90
3.4. Effet des vinaigres sur le statut martial.....	91
4. Analyse des coupes histologiques	91
DISCUSSION.....	98
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121
ANNEXES.....	144

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCA 1:ATP binding cassette transporteur A1

AChE :Acétylcholinestérase

ADN : Adénine désoxyribonucléique

AG : Acide gras

AGL : Acides gras libres

AGMI: Acide gras mono-insaturé

AGNE : Acide gras non estérifié

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGS : Acide gras saturé

Pal :Phosphatase alcaline

ALT :Alanine amino transférase

ANT :Adenine Nucleotide Translocator

Apo : Apolipoprotéine

APS/Cb1:Adapter protein containing SH2 domain/Casitas B lineage lymphoma

ARF-1:ADP ribosylation factor-1

AST:Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine tri phosphate

B/E rec. : Récepteur B/E (LDL récepteur) ;

BHT :Butyl hydroxy toluène

BSA : Bovin serum albumine

C3 : Carbone 3

Cal : Calorie

CEPT :Cholesteryl Ester Transfer Protein

CPT : Carnitine palmitotransférase

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

DPPH :1,1-diphényl-2-pyridyl-hydrazyl

DPPH-H : 2,2 diphényl -1- picryl hydrazine

EAG : Equivalent acide gallique

EQ : Equivalent quercétine

ERN : Espèce réactive de l'azote

ERO :Espèces réactives à l'oxygène

FNK-B :Facteur nucléaire kappa B

FADH :Flavine adénine dinucléotide

FAT : Fatty acid translocase

Fe³⁺ :Fer ferrique

FRAP : Ferric reducing ability power

Gab-1:GRB2-associated binding protein 1

GLUT4 :Glucose transporter type 4

O₂ : Oxygène

O₂^{•-} :L'ion superoxyde

Grb 2:Growth factor receptor-bound protein 2

GRx : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathion-S- transférase

H.M.W: High molecular weight

H₂O :Eau

H₂O₂ :Peroxyde d'hydrogène

HDL-c :High density lipoprotein-cholesterol

HFD : High fat diet

HL : Hépatique lipase ;

HMG-CoA :

HO[•]: Hydroxyde d'oxygène

HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance

HPLC: High performance liquid chromatography

HTA : Hypertension artérielle

I% : Pourcentage d'inhibition

IDL :Intermediate Density Lipoprotein,

IPPP : Isopentényl pyrophosphate

IR : Insulin receptor

IRS :Insulin receptor substrat

L.M.W : Low molecular weight

LCAT:Lecithin Cholesterol Acyl Transferase

LC-CoA :Acyl-CoA à chaîne longue

LDL-c :Low Density Lipoprotein-cholesterol

LOO[•] : Le radical peroxyde

LOOH : Radical hydroperoxyde

LPL : Lipoprotéine lipase ;

LRP :LDL-Receptor Related Protein

LTB₄ : Lymphocyte TB₄

MAPK :MAP kinase

MCV : Maladies cardiovasculaires

MDA : Malondialdéhyde

Mtor :*Mammalian target of rapamycin*

MTP : Microsomal transfer protein

NADPH :Nicotinamide di nucléotide phosphate

NASH : Non-alcoolic steato hepatic

NFκB :Nuclear factor-kappa B

NO : Monoxyde d'azote

O₂¹ : Oxygène singulet
°OH : Le radical hydroxyle
-OH : Groupe hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORAC : Oxygen radical absorbance capacity
PDK1:3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
pH :Potentiel hydrogène
PI3K :Phosphoinositide 3-kinase
PIK3:phosphoinositide kinase-3
PKB/Akt :hosphoinositide-3-kinase–protein kinase B/Akt
PKC:Protein kinase C
PLTP :Phospholipid Transfer Protein
PPAR : Peroxysome proliferator activated receptor
RH :Hydroxyl radical
RO° : Radical alkoxye
ROO° : Radical peroxyes
ROS : Reactive oxygen species
RXR : Retinoïd X receptor
SAA : Spectrophotométrie d'absorption atomique
SH :Sulfanyl
SHDM : Hépatosidérose dysmétabolique
SR-B1:Scavenger Receptor class B type1
TAS : Total antioxidant status
TBA : Acide thiobarbiturique
TBARS :Thio Barbiturique Acid Reactive Substances
TCA : Acide trichloracétique
TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity,
TfR : Transferrin receptor
TG : Triglycerides
Trx-S₂ :Thioredoxines-oxydées
Tyr :Tyrosine
UV : Ultraviolet
VLDL : Very low density lipoprotein
4-HNE : Trans-4-hydroxy-2-nonéna

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	25
Tableau II: Les antioxydants enzymatiques et leurs caractéristiques	34
Tableau III: Principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques.....	34
Tableau IV: Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires.....	35
Tableau V: Quelques activités biologiques des polyphénols.....	36
Tableau VI : Les acides organiques dans les différents types de vinaigres.....	37
Tableau VII : Les composés phénoliques dans différents types du vinaigre.....	38
Tableau VIII: Conditions chromatographiques des acides organiques.....	51
Tableau IX : Conditions chromatographiques des acides phénoliques.....	52
Tableau X : Différents gradients de la phase mobile.....	52
Tableau XI : La composition des régimes alimentaires des différents lots expérimentaux (%).....	54
Tableau XII: Solutions étalon de dosage du cuivre par SAA.....	66
Tableau XIII : Composition phytochimique des 3 vinaigres de fruits.....	72
Tableau XIV: Teneurs en polyphénols totaux des 3 vinaigres.....	73
Tableau XV: Teneurs en flavonoïdes des 3 vinaigres.....	73
Tableau XVI: Les valeurs du pH et du pourcentage de l'acidité titrable.....	74
Table XVII : Identification des acides organiques par l'HPLC.....	74
Tableau XVIII: Identification des acides phénoliques dans les vinaigres.....	75
Tableau XIX : IC 50 de trois vinaigres de fruits, du BHT et de la vitamine C.....	76
Tableau XX: Estimation du risque cardiovasculaire des différents groupes après 28 semaines d'expérimentation.....	85
Tableau XXI : Effet des vinaigres de fruit sur le statut martial.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La bêta oxydation des lipides	6
Figure 2 : La synthèse du cholestérol	8
Figure 3 : La structure des lipoprotéines.....	9
Figure 4 : Métabolisme des lipoprotéines	10
Figure 5 : Les principales voies de signalisation de l'insuline	12
Figure 6 : Les principaux sites d'action de l'insuline dans le métabolisme des lipoprotéines.....	14
Figure 7 : Les acides gras et la voie de signalisation de l'insuline	16
Figure 8 : Relation entre l'insulinorésistance et la dyslipidémie.....	17
Figure 9 : Etapes métaboliques conduisant à la formation de la stéatose hépatique.....	18
Figure 10 : Effets de la lipotoxicité au cours de la dyslipidémie	21
Figure 11: Mécanisme d'action des statines	22
Figure 12: Déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les ROS <i>in vivo</i>	24
Figure 13: La chaîne respiratoire mitochondriale	26
Figure 14: Mécanisme de production des ROS	27
Figure 15: Réaction de la peroxydation lipidique	29
Figure 16 : Les différentes classes des composés phénoliques.....	36
Figure 17: Méthode générale de la production des vinaigres	44
Figure 18: Réaction du radical DPPH° avec un antioxydant AH.....	48
Figure 19: Le principe de la méthode immuno-enzymatique ELISA	57
Figure 20: Principe du dosage du malondialdéhyde.....	64
Figure 21 : Le principe de dosage des oligoéléments.....	65
Figure 22 : le principe de dosage de la méthode immunoturbidimétrie.....	67
Figure 23: Activité de piégeage du radical libre par les vinaigres, du BHT, et de la vitamine C.....	76
Figure 24: Pouvoir réducteur des différents vinaigres, BHT, et de la vitamine C.....	77
Figure 25: Evolution du poids corporel des rats contrôles, dyslipidémiques, et traités durant 28 semaines de traitement.	78
Figure 26 : Les variations des indices organo-somatiques chez les rats contrôle, dyslipidémique et traités pendant 07 mois.....	79

Figure 27 : la glycémie des différents lots contrôle et expérimentaux durant 28 semaines.....	80
Figure 28 : Variations de l'insulinémie et de l'insulinorésistance chez les rats contrôles, dyslipidémiques et traités pendant 07 mois.....	81
Figure 29 : Variations du bilan lipidique au niveau sérique chez les rats contrôles, dyslipidémiques et traités pendant 07 mois.....	82
Figure 30 : Les variations du bilan lipidique au niveau hépatique chez les rats contrôle, dyslipidémique et traités pendant 7 mois.....	84
Figure 31 : Evaluation de la fonction hépatique des différents groupes après 28 semaines d'expérimentation.....	86
Figure 32 : Bilan rénal des rats contrôles, dyslipidémiques, et traités durant 28 semaines d'expérimentation.....	87
Figure 33 : Effet des vinaigres de fruit sur l'activité des enzymes antioxydantes et le statut antioxydant total.....	88
Figure 34 : Les taux plasmatiques des oligoéléments chez les différents groupes.....	89
Figure 35 : Dosage du MDA au niveau sérique et hépatique au niveau des différents lots expérimentaux.....	90
Figure 36 : Etude histologique du parenchyme hépatique chez le groupe contrôle (A, B : Scale bar : 5 μ m et C : Scale bar : 0,02 μ m).....	93
Figure 37 : Etude histologique du parenchyme hépatique chez le groupe dyslipidémique (A : Scale bar : 20 μ m, B : Scale bar : 50 μ m et C, D, E : Scale bar : 0,1 μ m).....	95
Figure 38 : Etude histologique du parenchyme hépatique chez les groupes traités (A, B, C, D et F : Scale bar : 5 μ m et E : Scale bar : 20 μ m).....	97
Figure 39 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	144
Figure 40 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	144
Figure 41 : Chromatogramme de l'acide acétique (standard).....	145
Figure 42 : Chromatogramme de l'acide ascorbique (standard).....	145
Figure 43 : Chromatogramme de l'acide citrique (standard).....	145
Figure 46 : Chromatogramme de l'acide formique (standard).....	146
Figure 47 : Chromatogramme de l'acide malique (standard).....	146
Figure 48 : Chromatogramme de l'acide oxalique (standard).....	146
Figure 49 : Chromatogramme de vinaigre de grenade.....	147
Figure 50 : Chromatogramme de vinaigre de figue de barbarie.....	147

Figure 51 : Chromatogramme de vinaigre de pomme.....	147
Figure 52 : Chromatogramme de l'acide gallique (standard).....	148
Figure 53 : Chromatogramme de l'acide caffeique (standard).....	148
Figure 54 : Chromatogramme de l'acide benzoique (standard).....	148
Figure 55 : Chromatogramme de l'acide salicylique (standard).....	149
Figure 56 : Chromatogramme de vanilline (standard).....	149
Figure 57 : Chromatogramme de vinaigre de grenade.....	149
Figure 58 : Chromatogramme de vinaigre de figue de barbarie.....	150
Figure 59 : Chromatogramme de vinaigre de pomme.....	150
Figure 60 : Courbe d'étalonnage du MDA.....	151
Figure 61 : Courbe d'étalonnage du BSA.....	151

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont actuellement la première cause de mortalité dans le monde (Nehlig, 2012). Elles sont considérées par l'OMS comme une épidémie et dont la prévalence a augmenté de façon très importante au cours de ces dernières années (Aouba et *al.*, 2011). Dix-sept millions de décès sont recensés, soit 29% de la mortalité mondiale (OMS, 2007). Il est prévu que d'ici 2030, ces pathologies atteindront près de 23,6 millions de personnes (OMS, 2011). En Algérie, les affections cardiovasculaires occupent une place prépondérante dans la morbi-mortalité avec un chiffre de 25 milles de personnes par an (Berrouiguet et *al.*, 2009).

Les MCV sont provoquées par le processus athéroscléreux, lui-même causé par les facteurs de risque. Selon l'OMS, ils sont regroupés en deux catégories : facteurs de risque « non modifiables » qui incluent l'âge, le sexe et l'hérédité qui demeurent incontrôlables et ceux qui sont « modifiables » engendrés par le déséquilibre alimentaire, la sédentarité, l'obésité, le tabagisme, la consommation de l'alcool et la dyslipidémie (Capewell et *al.*, 2010).

Plusieurs travaux scientifiques révèlent l'existence d'une corrélation positive entre la dyslipidémie et le risque cardiovasculaire. La relation entre le cholestérol total (CT) et le risque coronaire est linéaire et sans seuil. Quel que soit le sexe, une baisse de 1 mmole/L de CT amoindrit de moitié la mortalité coronaire des sujets de 40 à 49 ans, d'un tiers ceux de 50 à 69 ans et d'un sixième ceux de plus de 70 ans (Lewington et *al.*, 2007). Cependant, il a été établi que l'augmentation du High density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) de 0,3 mmole/L diminue d'un tiers la mortalité par cardiopathie ischémique (Lewington et *al.*, 2007).

Chez le modèle animal, de nombreuses études expérimentales déduisent que la dyslipidémie peut être induite par l'administration d'un régime hypergras (Subramanian et *al.*, 2008). En effet, chez les rongeurs (rat et lapin), le régime hypergras provoque de nombreuses altérations métaboliques : une insulino-résistance, une hypercholestérolémie et/ou une hypertriglycéridémie, une réponse inflammatoire (Dornas et *al.*, 2010) et un stress oxydant (Milagro et *al.*, 2006). Ce dernier est caractérisé par un déséquilibre provoqué essentiellement par une production exagérée des espèces réactives à l'oxygène (ERO) (Berger, 2006). Ces espèces jouent un rôle important dans la genèse des complications vasculaires, particulièrement les effets des radicaux libres au niveau cérébral (Bourre, 1988).

De plus, il a été mentionné chez le lapin, que la prise d'un régime riche en cholestérol provoque une forte production des ERO. Ces dernières contribuent aux

dysfonctionnements endothéliaux, à la réduction de la protection antioxydante et à la diminution du monoxyde d'azote (Müller et *al.*, 2004). D'une part, une étude sur des sujets hypercholestérolémiques montre que l'excès du cholestérol est lié à une élévation précoce de la production des ERO, au niveau des érythrocytes et du foie et à l'augmentation des marqueurs du stress oxydatif d'autre part (Nasar et *al.*, 2009).

On constate de nos jours une utilisation abusive des traitements hypolipémiants (statines et fibrates). Cette pratique est largement contestée de par ses effets secondaires par l'ensemble du personnel de la santé. Est apparue alors, la notion de produits de remplacements communément appelés : nutraceutiques. Partant de cet état de fait, nous avons proposé une nouvelle alternative qui consiste à administrer des vinaigres de 3 fruits qui sont la grenade [*Punica granatum* L. (Punicaceae)], la figue de barbarie [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae)] et la pomme [*Malus domestica* Borkh. (Rosaceae)] connues par leur richesse en composés phytochimiques bioactifs, tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes (Ozgen et *al.*, 2008 ; Saenz et *al.*, 2009; Shahidi, 2009) chez le rat wistar rendu dyslipidémique.

Le but de ce travail est d'évaluer l'effet antioxydant de 3 vinaigres de fruits notamment de grenades, de figues de barbarie et de pommes afin de prévenir les troubles du métabolisme lipidique sur le foie provoqués par un régime hypergras, selon les objectifs suivants:

- Etude phytochimique des vinaigres des 3 fruits (Grenade, Figue de barbarie et Pomme).
- Etude *in vitro*, de l'activité antioxydante (le pouvoir du piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur) des 3 vinaigres étudiés.
- Etude des effets antihyperlipidémiques et antioxydants sur un modèle animal (rat wistar) rendu dyslipidémique.
- Evaluation des différents paramètres biochimiques (profil lipidique, hépatique et rénal) ainsi que les paramètres du stress oxydant (Activité des enzymes antioxydantes, statut oligominéral et la peroxydation lipidique) au niveau sérique et tissulaire.
- Une étude histologique du foie pour observer l'effet existant entre la relation dyslipidémie – stress oxydant d'une part et d'autre part, le rôle des vinaigres comme source d'antioxydants contre les dommages hépatiques.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Physiopathologie des lipides et des lipoprotéines

1. Les lipides

Les lipides font partie des composants des membranes cellulaires et des organites intracellulaires. Ils participent à la messagerie cellulaire, à la synthèse des hormones stéroïdiennes et ils sont pourvoyeurs d'énergie (Moussard, 2002).

Les lipides étant hydrophobes ou amphiphiles, leur transport, qu'il soit intra ou extracellulaire, s'effectue sous la forme de complexes macromoléculaires appelés lipoprotéines. Ces dernières s'assemblent autour des protéines (apoprotéines).

2. Métabolisme des lipides

○ Synthèse des acides gras

La biosynthèse des acides gras s'effectue principalement dans les hépatocytes et dans les adipocytes. Cette synthèse permet à l'organisme de transformer les excédents nutritionnels en formes de stockage énergétique. Les enzymes qui permettent la synthèse d'acides gras sont l'acétyl~CoA carboxylase et le complexe de l'acide gras synthase (AGS).

L'insuline et le citrate stimulent l'acétyl~CoA carboxylase tandis que le glucagon, l'adrénaline et les acyls~CoA l'inactivent (Luc et Lecerf, 2002 ; Grimaldi, 2004).

○ Interconversion des acides gras

L'interconversion des acides gras permet d'introduire des modifications dans leur structure. Elle peut allonger la chaîne aliphatique et augmenter le nombre d'insaturations. Cette interconversion permet de synthétiser des AGPI à partir des acides gras indispensables apportés par l'alimentation (Luc et Lecerf, 2002 ; Grimaldi, 2004).

○ Bêta-oxydation ou hélice de Lynen

La bêta-oxydation a pour but de fournir à l'organisme l'énergie sous forme d'ATP. Elle se déroule dans la mitochondrie. Les acides gras sont activés par l'acyl~CoA synthétase en acyl~CoA. Puis, ils vont subir l'action de la carnitine acyl transférase I qui ajoute une molécule de carnitine à l'acyl~CoA pour faciliter son transport à travers la membrane externe de la mitochondrie grâce à une translocase. Cette dernière atteint la membrane interne mitochondriale. Une fois dans la mitochondrie, l'acyl-carnitine est transformé en carnitine et

acyl~CoA grâce à la carnitine acyl transférase II (Luc et Lecerf, 2002 ; Grimaldi, 2004) (Figure 1).

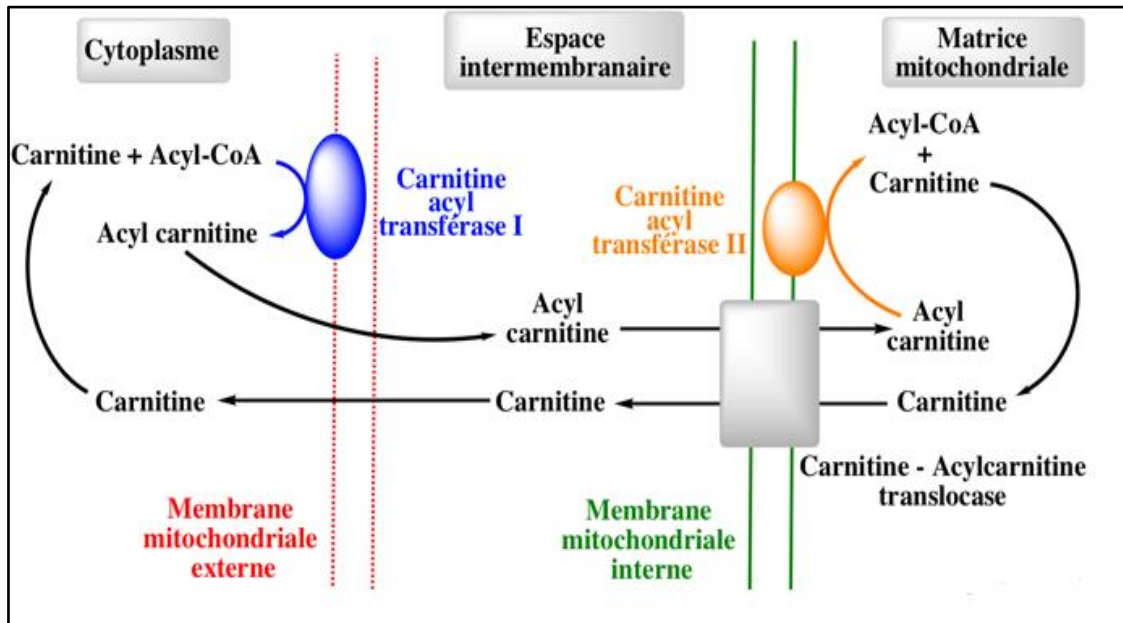


Figure 1: La bêta oxydation des lipides (Nieman et *al.*, 2013)

A partir de l'acyl~CoA présent dans la mitochondrie que peut commencer la bêta-oxydation ou hélice de Lynen qui s'effectue en quatre étapes :

- La première étape est une déshydrogénation sous l'action de l'acyl~CoA déshydrogénase.
- La seconde est une hydratation sous l'action de l'énoyl~CoA hydratase,
- Suivie d'une troisième étape qui consiste en une déshydrogénation sous l'action de la β -hydroxyacyl~CoA déshydrogénase.
- Enfin, la quatrième étape, l'action de la β -cétolthiolase entraîne un clivage de la molécule aboutissant à la libération d'un acyl~CoA et d'un acétyl~CoA. A chaque tour d'hélice de lynen, l'acyl~CoA se raccourcit de deux carbones. En période postprandiale, cette séquence de dégradation est inhibée au profit de la synthèse, tandis qu'en période de jeûne, elle est activée (Luc et Lecerf, 2002 ; Grimaldi, 2004).

○ Synthèse du cholestérol et de ses dérivés isoprénoïdes

Le cholestérol est un précurseur des hormones stéroïdiennes (le cortisol, l'aldostérone, l'œstrogène, la progestérone et la testostérone) et de la vitamine D3. Lorsqu'une cellule a besoin de cholestérol, notamment pour son rôle structural, elle le récupère en captant les lipoprotéines plasmiques mais si ce mécanisme devient insuffisant, la

synthèse endocellulaire au niveau hépatique du cholestérol s'active. La plupart des cellules sont capables de capter, stocker et libérer le cholestérol. Au niveau cellulaire, la synthèse s'effectue dans le cytoplasme avec un passage par le réticulum endoplasmique lisse (Luc et Lecerf, 2002 ; Grimaldi, 2004).

Deux molécules d'acétyl~CoA se condensent pour former l'acétoacétyl~CoA. Sous l'action de l'HMG-CoA synthase, une molécule d'acétyl~CoA s'ajoute à l'acétoacétyl~CoA pour former l'HMG-CoA. Ce dernier est réduit en mévalonate sous l'action de l'HMG-CoA réductase. Cette étape est importante dans la régulation du taux de cholestérol intracellulaire (Luc et Lecerf, 2002 ; Grimaldi, 2004).

Lorsque le taux de cholestérol est suffisant, il y a une inhibition de l'HMG-CoA réductase. En revanche, quand le taux est insuffisant, l'HMG-CoA réductase est activée ainsi que l'expression de son gène. Puis, le mévalonate est transformé en isopentényl pyrophosphate (IPP) ainsi qu'en diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP). L'isopentényl-isomérase permet un état d'équilibre entre ces 2 composés.

La prényl transférase permet la polymérisation du DMAPP et de l'IPP pour dans un premier temps aboutir au géranyl-pyrophosphate puis dans un second additionner une nouvelle molécule d'IPP au farnésyl pyrophosphate. La squalène synthase permet la dimérisation de 2 farnésyl-pyrophosphate en squalène qui est ensuite cyclisé en lanostérol seules une vingtaine de réactions permettent d'aboutir à la synthèse du cholestérol (Luc et Lecerf, 2002 ; Grimaldi, 2004) (Figure 2).

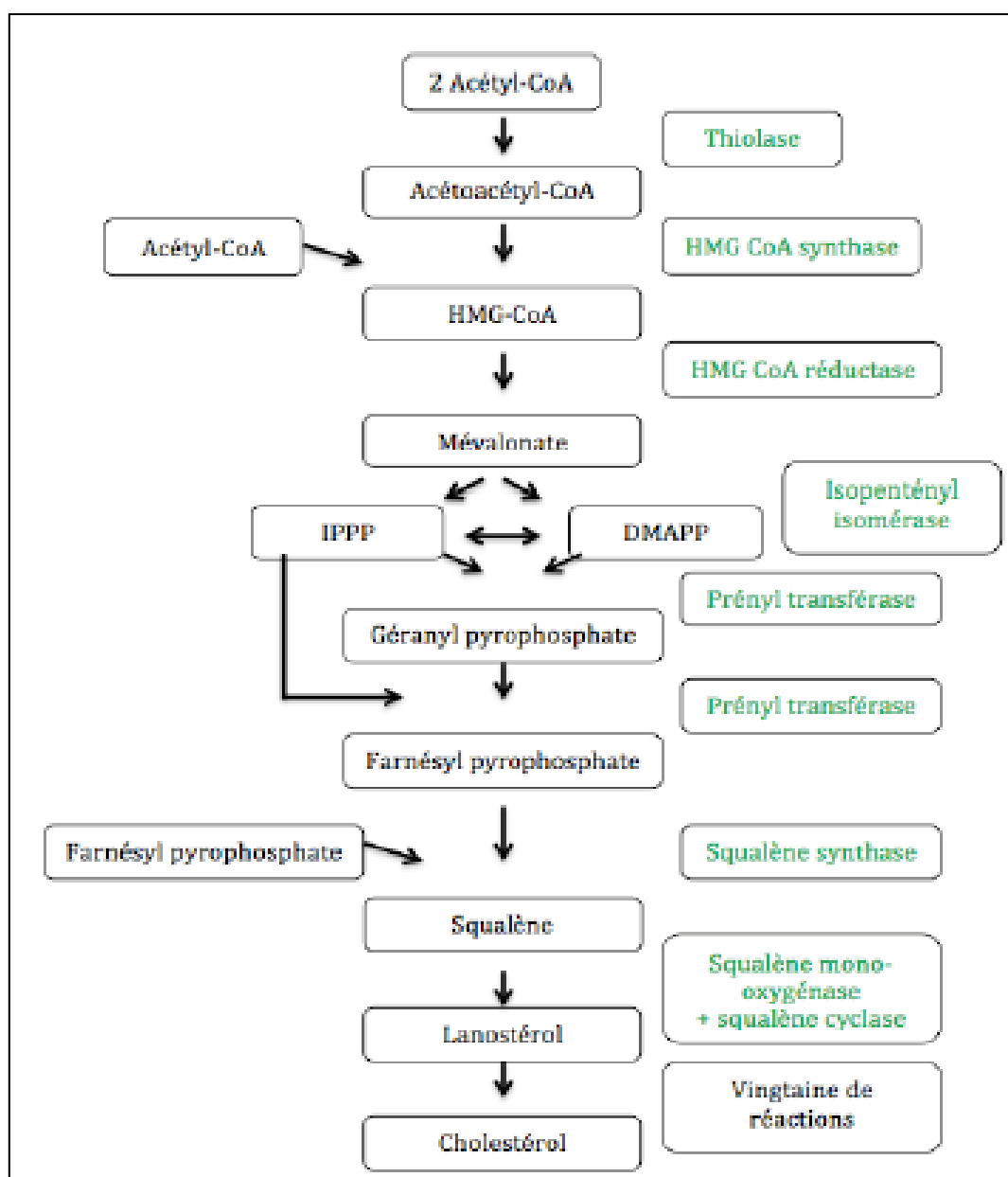


Figure 2: Synthèse du cholestérol (Grimaldi, 2004)

3. Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des complexes macro-moléculaires qui transportent les lipides insolubles (le cholestérol et les triglycérides) dans le plasma (Luc, 2002). Ces molécules possèdent un cœur hydrophobe, composé d'esters de cholestérol et de triglycérides et une surface constituée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 3).

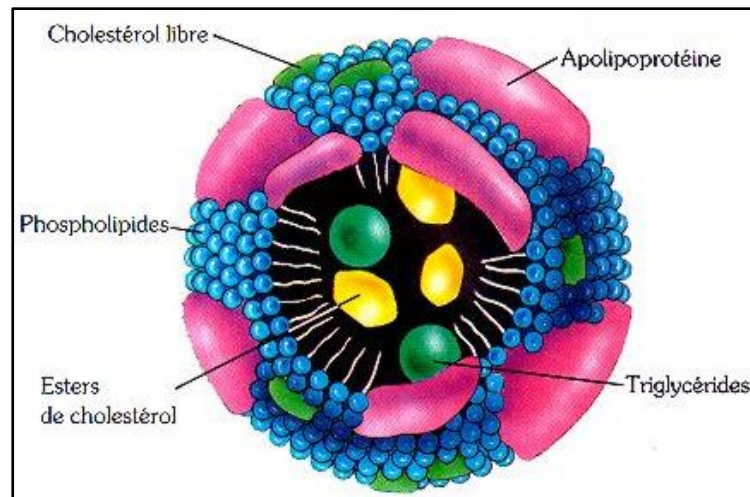


Figure 3: La structure des lipoprotéines (Luc, 2002)

4. Métabolisme des lipoprotéines

La formation des chylomicrons a lieu dans l'entérocyte, au sein de laquelle l'association des composants lipidiques (triglycérides, esters de cholestérol et phospholipides) à l'apoB48 est réalisée par la MTP (Microsomal transfer protein). Les chylomicrons sont sécrétés dans la lymphe d'où ils rejoignent la circulation sanguine.

Dans le plasma, les triglycérides des chylomicrons sont rapidement hydrolysés sous l'effet de la lipoprotéine lipase donnant naissance à des particules résiduelles appauvries en triglycérides appelées chylomicrons remnants. Ces derniers sont captés par le foie principalement à l'aide du récepteur LRP. D'un autre côté, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés sous l'action de la lipoprotéine lipase.

Au cours de cette hydrolyse progressive des triglycérides, une partie de la surface des VLDL (comprenant des phospholipides et des apolipoprotéines C et E) est transférée aux HDL. Cette cascade métabolique donne naissance aux IDL. Ces dernières vont être soit captées par le foie par l'intermédiaire des récepteurs B/E, voire des récepteurs LRP, soit subir la poursuite de l'hydrolyse des triglycérides aboutissant ainsi à la formation des LDL. Chaque particule LDL comprend une molécule d'apolipoprotéine B-100, qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme des LDL.

En effet, la clairance des LDL se fait après leur fixation par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine B-100, sur des récepteurs B/E spécifiques localisés sur les hépatocytes (70%) et sur les autres cellules de l'organisme (30%). Les HDL vont capter du cholestérol

libre au niveau des différentes cellules de l'organisme. Le transfert du cholestérol intracellulaire vers les particules HDL fait intervenir un transporteur spécifique ABCA 1 (Oram et *al.*, 2001).

Les particules HDL en se chargeant en cholestérol vont ainsi progressivement augmenter de taille donnant naissance aux HDL₃, puis au HDL₂ (HDL de grande taille). Au sein des HDL, la LCAT transforme le cholestérol libre en cholestérol estérifié qui migre au centre de la lipoprotéine. Les HDL₂ chargées en cholestérol estérifié vont être captées au niveau du foie par l'intermédiaire d'un récepteur SR-B1 (Jian et *al.*, 1998).

Le métabolisme des lipoprotéines est sous l'influence de protéines de transfert des lipides. Parmi celles-ci, la CEPT et la PLTP jouent un rôle important.

La CEPT facilite le transfert des triglycérides des VLDL vers les LDL et HDL, et celui du cholestérol estérifié des HDL et LDL vers les VLDL. La PLTP favorise les transferts de phospholipides, du cholestérol libre et d' α -tocophérol entre les lipoprotéines. La PLTP intervient également dans la détermination de la taille des particules HDL (Figure 4).

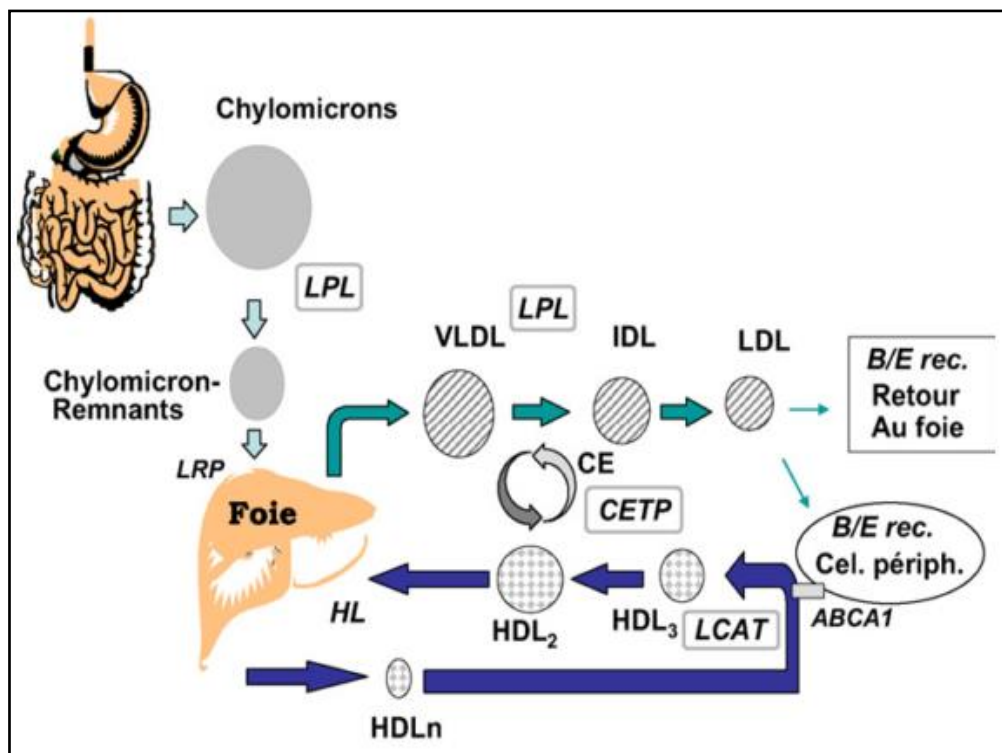


Figure 4: Métabolisme des lipoprotéines (Vergès, 2007).

5. Régulation hormonale

5.1. Signalisation de l'insuline

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β pancréatiques en période post prandiale (Koda et *al.*, 1992; Fineman et *al.*, 2002), jouant un rôle anabolique essentiel dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques, en augmentant l'entrée de glucose et des acides gras dans les cellules, en favorisant la glycogénogenèse et la lipogenèse et en diminuant la glycogénolyse, néoglucogenèse et la lipolyse. L'ensemble de ces effets résulte de la liaison de l'insuline à son récepteur membranaire spécifique présent sur la surface des cellules au niveau du foie, du tissu adipeux et des muscles squelettiques.

L'insuline libérée permet d'augmenter le captage du glucose par les adipocytes et les cellules musculaires. Ce phénomène est régulé par des mécanismes d'exocytose et d'endocytose des récepteurs GLUT4 insulino-dépendant. Dans le foie et le muscle, le glucose est stocké sous forme de glycogène par le processus de la glycogénogenèse et il est utilisé dans la glycolyse par les myocytes pour produire de l'énergie. De plus, au niveau du tissu adipeux, elle induit un stockage des acides gras en favorisant la lipogenèse.

La liaison de l'insuline à son récepteur IR induit son autophosphorylation sur plusieurs résidus Tyr de ses sous unité β . Plusieurs protéines dont Shc, Gab-1, le complexe APS/Cbl et les protéines IRS, se fixent sur ces résidus phosphorylés afin d'être eux-mêmes phosphorylés par le récepteur insulinique activé. Shc recrute Grb 2 et sa protéine associée Sos, ce qui active la protéine Ras associée à Raf1 pour activer les cascades de phosphorylation par la MAP kinase (MAPK). Cette cascade régule l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la différenciation.

La cascade PI3K conduit à des modifications de l'état de phosphorylation de plusieurs enzymes dont Akt et mTOR, permettant de stimuler la synthèse de glycogène et de protéines. La cascade PI3K, *via* PDK1, participe également au contrôle de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 vers la surface de la cellule et donc à l'augmentation de la vitesse d'entrée du glucose dans la cellule (Figure 5).

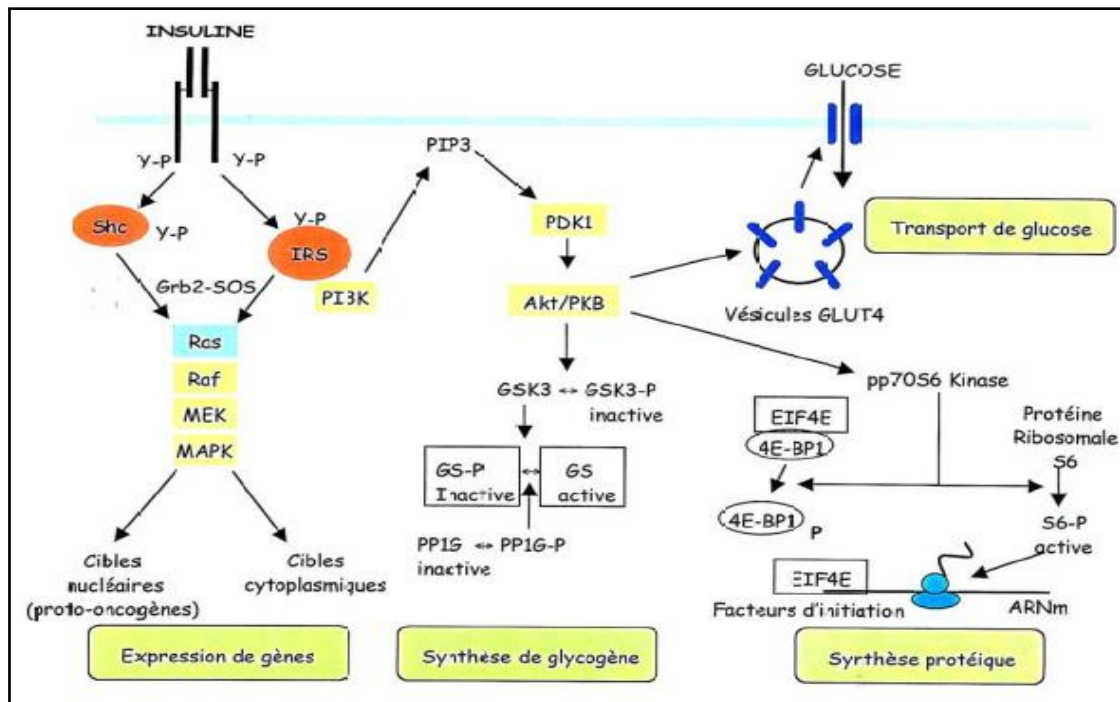


Figure 5: Principales voies de signalisation de l'insuline (Combettes-Souverain et Issad, 1998).

5.2. L'insuline et l'homéostasie lipidique

L'insuline joue un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie lipidique. Ses effets liporégulateurs s'exercent essentiellement sur le tissu adipeux et le foie.

○ Le tissu adipeux

Une des fonctions du tissu adipeux est de stocker les acides gras et le glucose sous la forme de TG. Dix pour cent en moyenne du glucose sanguin sont captés par les adipocytes et convertis en acides gras. L'activation de la lipogenèse et l'inhibition de la lipolyse des triglycérides sont contrôlées par l'insuline.

○ Le foie

Le foie joue un rôle primordial dans l'homéostasie énergétique. Il est le principal organe responsable de la production endogène de glucose par la néoglucogenèse et la glycogénolyse. Les voies métaboliques y sont très fortement régulées par le couple hormonal d'action antagoniste, l'insuline et le glucagon. L'insuline active la glycolyse et la lipogenèse. Le glucagon favorise la néoglucogenèse, la glycogénolyse et la β - oxydation.

Le fonctionnement harmonieux de la synthèse et de la dégradation des acides gras hépatiques suppose l'existence de régulateurs nutritionnels (acides gras et glucose),

hormonaux (insuline, glucagon, leptine et Adiponectine), transcriptionnels, enzymatiques et allostériques capables d'activer la synthèse et d'inhiber la dégradation en période post-prandiale et l'inverse en période de jeûne.

Le foie est responsable de la majorité (85%) de la production endogène de glucose par néoglucogenèse et glycogénolyse. Le glucose en grande proportion absorbé par l'intestin, est capturé par les hépatocytes où il est converti en glycogène.

Lorsque le foie est saturé en glycogène (environ 5 % de sa masse), le glucose additionnel pris par le foie est dirigé vers les voies de synthèse d'acides gras qui seront estérifiés en TG pour être ensuite exportés aux tissus adipeux sous forme de VLDL. L'action de l'insuline sur le foie active la glycogenèse, la glycolyse et la lipogenèse en stimulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans ces voies (Gonzalez – Baro et *al.*, 2007).

5.3. L'insuline et le métabolisme des lipoprotéines

L'insuline joue un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines comme il est indiqué dans la figure 6.

○ Le tissu adipeux

L'insuline inhibe la lipase hormonosensible. Elle a un effet antilipolytique favorisant le stockage des triglycérides dans l'adipocyte et réduit le déversement d'acides gras libres dans la circulation.

○ Le foie

L'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de VLDL a été clairement mis en évidence *in vivo*. Ce qui a été observé chez des sujets sains évaluant ainsi le VLDL-triglycérides à -67 % et l'apoB des VLDL à -52 % (Malmstrom et *al.*, 1998 ; Lewis et *al.*, 2002).

L'insuline, par son action stimulatrice de la lipoprotéine lipase, favorise le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons, chylomicron-remnants, VLDL et IDL) (Taskinen et *al.*, 1992).

Il a été observé que l'insuline augmente l'ARN messager de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux, témoignant l'effet positif sur sa synthèse (Fried et *al.*, 1993).

En outre, l'insuline favorise le catabolisme des LDL. Il a été prouvé que l'insuline augmente l'activité des récepteurs des LDL (Chait et *al.*, 1979 ; Mazzone et *al.*, 1984). Elle intervient dans le métabolisme des HDL. Elle active la LCAT, responsable de l'estérification du cholestérol au sein des particules HDL, participant ainsi à la métamorphose des HDL₂ et des HDL₃. Elle apparaît moduler l'activité de la lipase hépatique, enzyme clé dans le catabolisme des HDL.

L'insuline semble intervenir dans l'activité des protéines de transfert des lipides. Des études *in vivo*, réalisées chez des sujets sains et des patients diabétiques de type 2, confirment l'effet inhibiteur de l'insuline sur la PLTP (Riemens et *al.*, 1999) et réduit l'activité plasmatique de la CETP. Mais cette action passerait essentiellement par la réduction des acides gras libres plutôt que par un effet direct de l'insuline sur la CETP (Arii et *al.*, 1997).

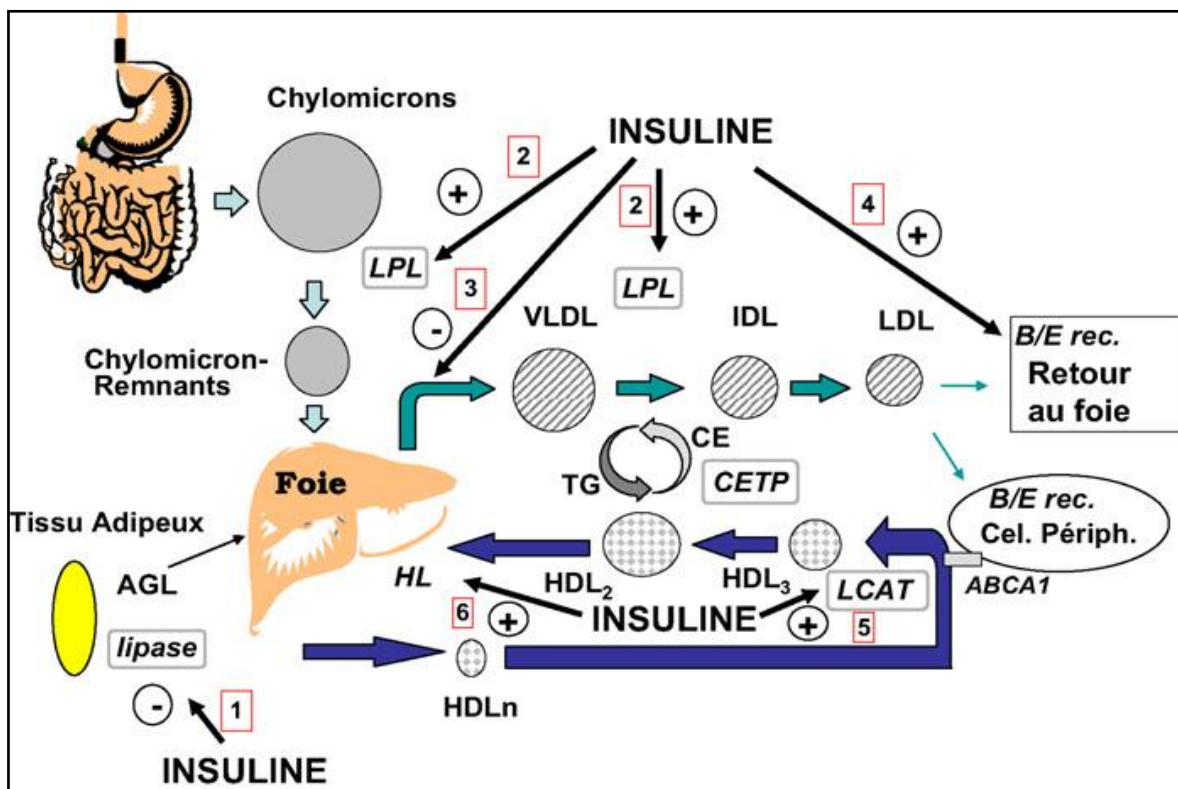


Figure 6: Principaux sites d'action de l'insuline dans le métabolisme des lipoprotéines (Vergès, 2007).

6. L'insulinorésistance

6.1. Mécanisme de l'insulinorésistance

L'insulinorésistance fait intervenir de hautes concentrations en acides gras qui sont libérés par le tissu adipeux dans la circulation sanguine. Ces acides gras sont ensuite oxydés dans les tissus périphériques en acétyl~CoA, en diacylglycérol et en céramides. Entraînant l'augmentation d'une isoforme d'une protéine kinase C. Cette kinase phosphoryle l'IRS-1 sur les acides aminés sérines et thréonine inhibant ainsi la phosphorylation de la tyrosine qui est requise pour libérer l'insuline. La translocation des vésicules renfermant le transporteur GLUT 4 est inhibée, le glucose circulant ne peut donc pas entrer dans les cellules (Shulman, 2000).

6.2. Rôle des acides gras dans l'insulinorésistance

Le tissu adipeux atteint est incapable de stocker l'excès de l'apport calorique. Ce tissu « résiste » au signal insulinique de la lipogenèse. De plus, l'effet anti-lipolytique de l'insuline est bloqué, ce qui se traduit par une augmentation des AGL circulants (Verges, 2005).

En effet, le tissu adipeux viscéral est spontanément plus résistant à l'action de l'insuline que le tissu adipeux sous – cutané et donc moins sensible à l'action anti – lipolytique de l'insuline. La production d'AGL à partir du tissu viscéral est par conséquent plus prononcée qu'à partir des autres dépôts adipeux (Zierath et *al.*, 1998).

Les AGL en excès sont alors stockés dans d'autres sites où leur dépôt est considéré comme « ectopique ». Ces sites sont le muscle ou le foie mais également le tissu adipeux péri – viscéral.

Les mécanismes nouvellement décrits sont fondés sur le fait qu'il existe une accumulation intramusculaire importante de métabolites des AGL : acyl~CoA, céramides, diacylglycerol (Krebs et Roden, 2005). Ces derniers activent toute une série de protéines de type sérine/thréonine kinases ou PKC (Schinner et *al.*, 2005) ; et ils favorisent également la phosphorylation des IRS-1 et IRS-2 aux résidus sérines/thréonines, ce qui inhibe la voie physiologique de la phosphorylation des tyrosines causant ainsi une diminution de la réponse à l'insuline (Figure 7).

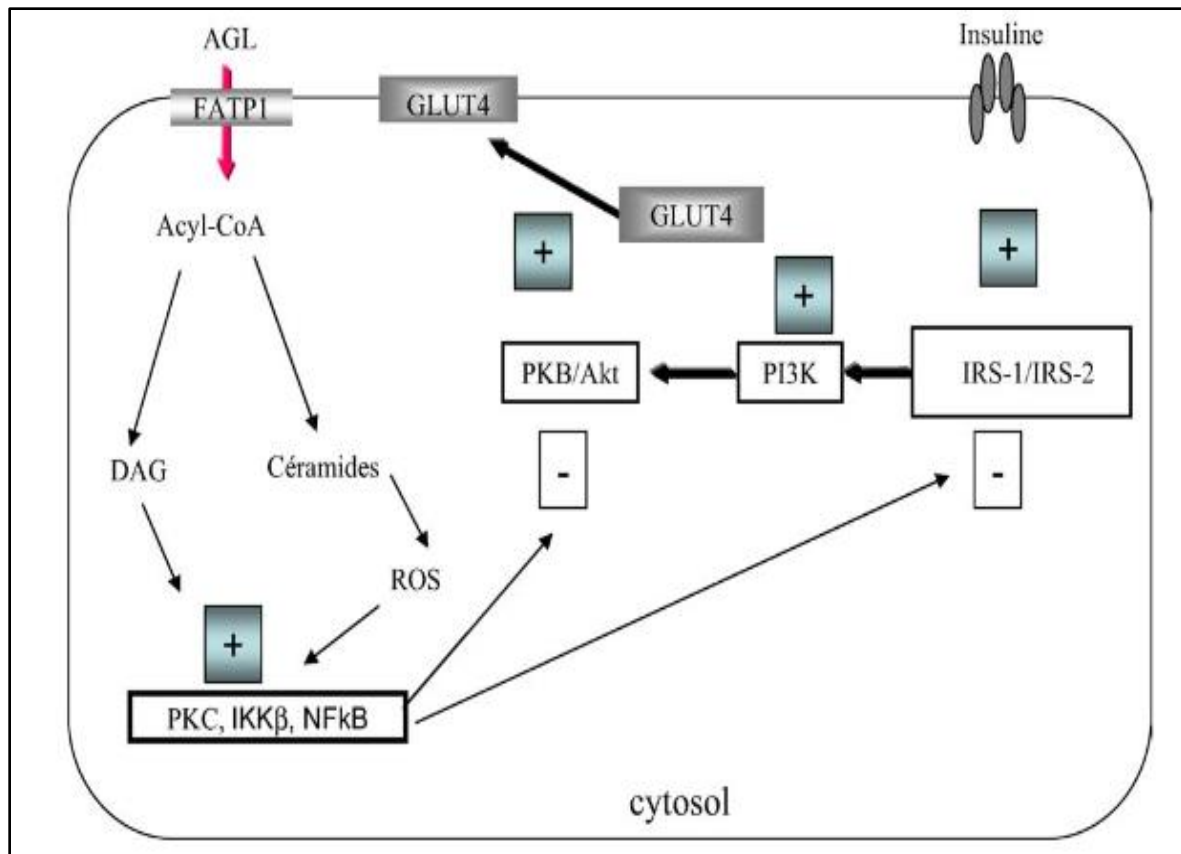


Figure 7: Acides gras et la voie de signalisation de l'insuline (Magnan, 2006)

6.3. Conséquences de l'insulinorésistance

L'insulinorésistance se manifeste par l'incapacité de l'insuline à inhiber la néoglucogenèse au niveau hépatique. Cette incapacité est provoquée par le flux portal des acides gras libres provenant de l'alimentation ou d'une lipolyse accrue de la part du tissu adipeux qui présente aussi une perte progressive de l'insulinosensibilité. Au niveau musculaire, il existe une véritable compétition entre les acides gras libres et le glucose pour être oxydés : les acides gras libres sont oxydés en priorité, entraînant une production accrue d'acetyl-CoA qui inhibe en retour les enzymes de la glycolyse. Par ailleurs, le fonctionnement du pancréas serait également altéré par l'excès d'AG. L'ensemble de ces phénomènes compense l'IR dans le premier stade du diabète de type II.

6.4. L'insulinorésistance et la dyslipidémie

Au cours de l'insulinorésistance, deux événements contribuent au développement de la dyslipidémie : l'élévation de l'afflux des AGNE au niveau hépatique associée à l'assemblage et à la sécrétion des VLDL.

Au niveau hépatique, l'insulinorésistance augmente la biodisponibilité d'apoB et assemble la sécrétion des lipoprotéines. L'élévation de la production hépatique des VLDL est l'événement clé dans le développement de la dyslipidémie.

A l'inverse, le tissu adipeux sous-cutané est métaboliquement moins actif (lipolyse moins prononcée) que le tissu adipeux viscéral en raison de sa plus faible densité en récepteur β -adrénergiques et sa plus forte densité en récepteur α -adrénergique (Carlson et *al.*, 1969) (Figure 8).

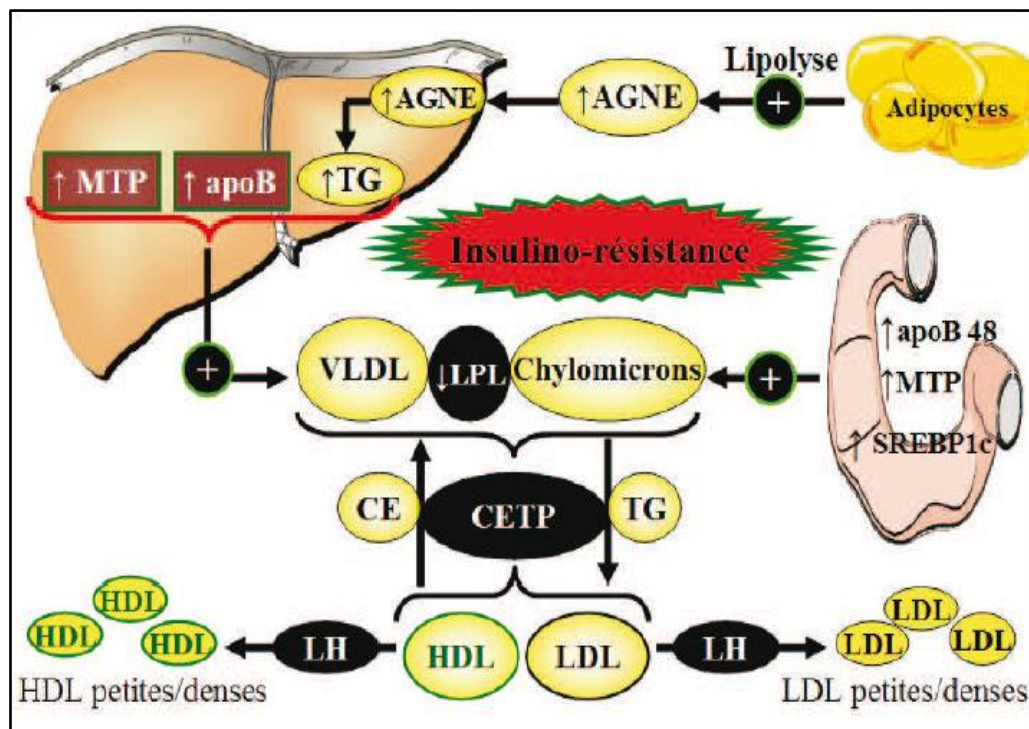


Figure 8: Relation entre l'insulinorésistance et la dyslipidémie (Hawkins et *al.*, 1997)

6.5. L'insulinorésistance et la stéatose hépatique

L'hypertriglycéridémie résulte d'une synthèse hépatique accrue et d'une clairance ralentie des triglycérides qui peut se majorer plus en période post prandiale. La baisse de l'activité de la lipoprotéine lipase épuratrice des triglycérides est observée dans les états d'insulinorésistance.

L'épuration ralentie s'associe à une production hépatique accrue sous l'influence d'un flux élevé d'acides gras libres en provenant du tissu adipeux périviscéral drainé par la veine porte d'où résulte le mécanisme de la stéatose hépatique.

La baisse du HDL-c et l'augmentation des particules LDL petites et denses sont aussi secondaires au flux élevé d'AGL et à l'intense activité de la triglycéride-lipase hépatique (Vague, 2001). Ces dernières peuvent alors s'infiltrer de manière diffuse dans le foie en formant des gouttelettes lipidiques ou excrétées dans le sang sous forme de lipoprotéines de très faible densité ou VLDL.

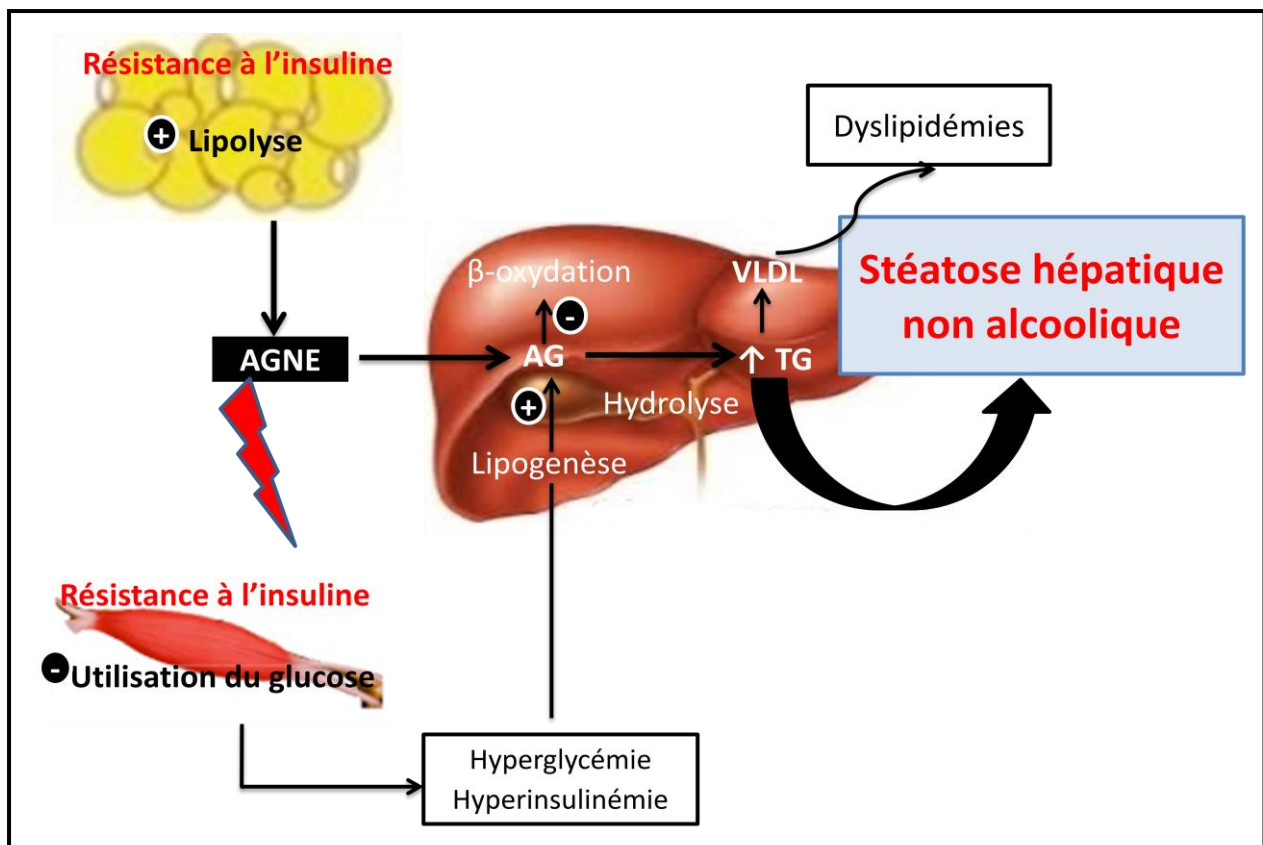


Figure 9: Etapes métaboliques conduisant à la formation de la stéatose hépatique (Robichon et al., 2008).

7. Physiopathologie de la dyslipidémie

7.1. Le cholestérol

Selon l'étude de Framingham (Dawber et *al.*, 1962) il existe une relation entre l'élévation du taux de cholestérol et l'augmentation du risque cardio-vasculaire. L'athérosclérose n'est pas uniquement le dépôt de lipides au niveau de l'intima, il s'agit d'un processus dynamique faisant intervenir de nombreux acteurs (Tedgui et Chapman, 2004).

Les lipides tout comme les microthrombis, l'HTA et les substances toxiques comme le tabac initient ce processus. En effet, ces agressions de l'intima déclenchent la phase d'initiation suivie d'une phase de progression qui aboutit à la formation d'une plaque d'athérome. Cette plaque peut devenir stable ou évoluer vers la rupture provoquant le plus souvent une ischémie (Tedgui et Chapman, 2004).

○ L'initiation

Elle fait suite à une accumulation de lipides, si elle est associée à un autre facteur de risque comme le tabac ou l'HTA. Elle s'effectue principalement là où les contraintes de pression sont les plus fortes, c'est-à-dire à la jonction des grosses artères et au niveau des courbures (Tedgui et Chapman, 2004).

Les LDL en excès dans le torrent circulatoire, stagnent puis subissent des modifications oxydatives. Elles ne sont alors plus reconnues par leurs récepteurs. Au niveau vasculaire, il y a infiltration et rétention des lipoprotéines athérogènes puis une réaction inflammatoire se met en route avec le recrutement des macrophages qui captent les LDL oxydés par leurs récepteurs *scavenger* ou éboueurs. Ces macrophages gonflés par l'excès de cholestérol deviennent des cellules spumeuses. C'est l'accumulation de ces cellules qui est responsable de l'apparition des premières stries lipidiques (Tedgui et Chapman, 2004).

✓ La progression

Elle résulte de la mort des cellules spumeuses par apoptose. Cette mort entraîne une accumulation de débris cellulaires et lipidiques. Le cholestérol présent va donc s'accumuler. C'est à partir de ce stade que les symptômes peuvent commencer (Tedgui et Chapman, 2004).

✓ Remodelage vasculaire et formation de la chape fibro-musculaire

Les conséquences de la plaque ne sont pas dues à sa taille mais plutôt à sa stabilité et donc à son stade d'évolution. La taille de la plaque évolue quand 40% de l'intima sont altérés. La croissance se fait alors vers la lumière de l'artère. Les plaques stables sont riches en

cellules musculaires lisses et en collagènes. Ces éléments proviennent principalement de la média. Les plaques sont constituées d'une chape fibro-musculaire, organisée en unités lamellaires. Ce tissu, de type cicatriciel, remplace la media originelle atrophiée par les métalloprotéases sécrétées par les macrophages (Tedgui et Chapman, 2004).

✓ Rupture de la plaque

Jusqu'au stade V les plaques sont normalement stables, c'est au stade ultime VI qu'il y a risque de rupture. Il y a 2 processus : la rupture de la plaque fibreuse ou l'érosion de l'endothélium (Tedgui et Chapman, 2004).

7.2. Les triglycérides

La relation entre les triglycérides et les maladies cardiovasculaires reste toujours un sujet de controverse. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence la corrélation entre une augmentation des concentrations sériques de triglycérides et le risque coronarien. Cependant, il s'agit d'un facteur de risque parmi les autres, il est donc difficile de trouver une étude fiable qui isole ce risque des autres. Il apparaît cependant selon certaines études que ce risque serait plus élevé chez la femme que chez l'homme (Grimaldi, 2004; Sarwar et *al.*, 2007).

Le risque principal d'un excès de TG est la pancréatite. Un risque de pancréatite aiguë apparaît avec un taux de TG > 10 g/L. La physiopathologie de cette pancréatite est cependant, mal définie (Grimaldi, 2004; Bec-Roche, 2008).

8. La dyslipidémie et la lipotoxicité

Les acides gras et le glucose constituent les principales sources d'énergie utilisées par le muscle squelettique. L'hypothèse selon laquelle une importante oxydation des AG inhiberait la glycolyse et l'oxydation du glucose a d'abord été formulée par Rodbell en 1964 sous le terme de «cycle glucose-acide gras».

Les travaux de Rodbell, (1964) ont pu mettre en évidence que lorsque l'organisme était exposé à de fortes concentrations de lipides (AG et cétones) comme c'est le cas dans les situations d'obésité, l'oxydation des AG se faisait en priorité. Par conséquent, le métabolisme glucidique était ralenti voir inhibé.

Au niveau moléculaire, ces études ont montré que les lipides pouvaient inhiber l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme, diminuer le contenu en TG du pancréas et simultanément restaurer une sécrétion glucidique comme l'hexokinase, la

phosphofructokinase et la pyruvate déshydrogénase mais pouvaient également induire l'expression de différents isoformes des PKC l'insulinorésistance.

Physiologiquement, ces acides gras libres sont la principale source d'énergie chez les sujets à jeun. Avec l'obésité, le flux circulant excède les besoins des différents tissus. L'importance du rôle des acides gras dans la résistance à l'insuline explique en grande partie la relation entre l'obésité abdominale et le risque de diabète (Figure 10).

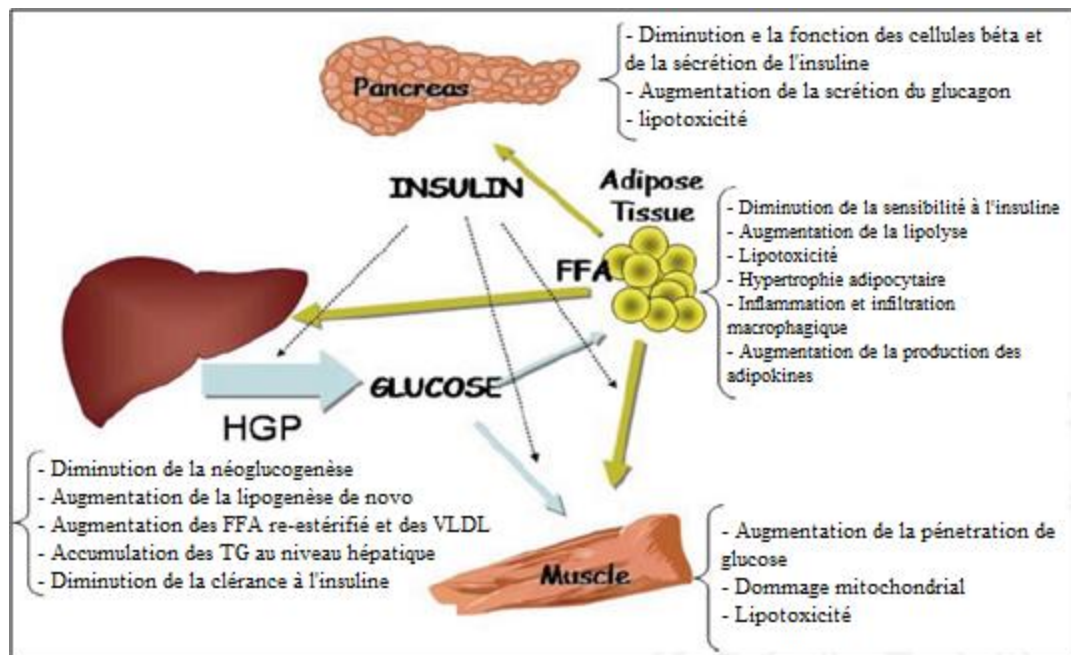


Figure 10: Effets de la lipotoxicité au cours de la dyslipidémie (Rodbell, 1964)

9. Traitement de la dyslipidémie

9.1. Les statines (Inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase)

Les statines inhibent la HMG-CoA réductase, enzyme assurant la transformation intracellulaire du HMG-CoA en mévalonate (Allain, 2000). Le schéma du mécanisme d'action est représenté dans la Figure 11.

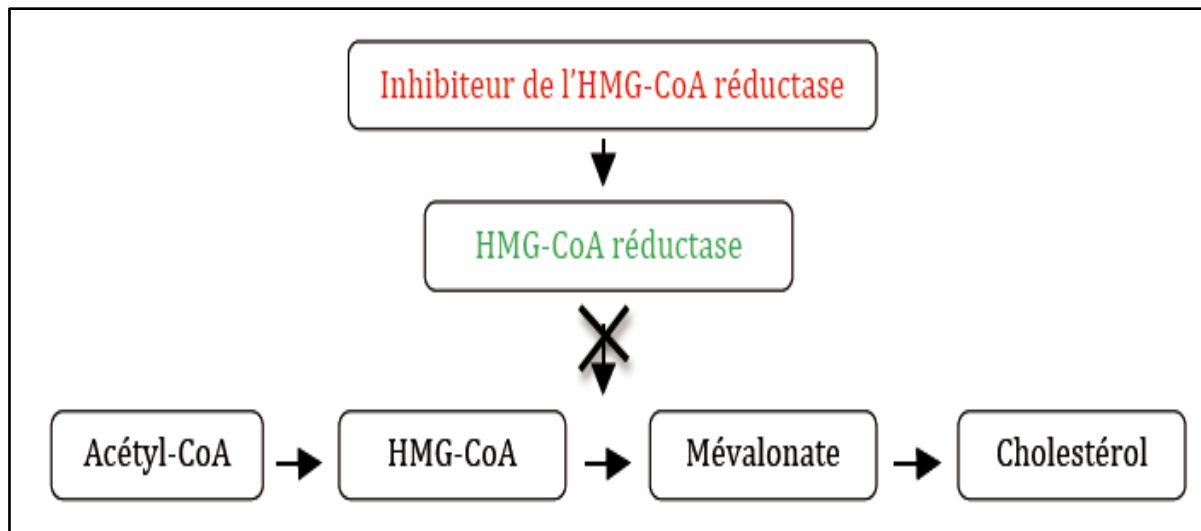


Figure 11: Mécanisme d'action des statines (Allain, 2000)

Cette inhibition entraîne une augmentation des récepteurs à LDL hépatiques, confirmée par l'augmentation de l'ARN messager correspondant. Elle induit en conséquence une captation majorée des LDL dont la concentration plasmatique s'abaisse. L'augmentation des récepteurs LDL hépatiques entraîne également une diminution, à un degré moindre, des IDL et des VLDL.

Par ce mécanisme, les inhibiteurs de la HMG-CoA reductase entraînent un abaissement dose-dépendant du cholestérol de type LDL allant de 20 à 50%. Il y a également une diminution des triglycérides, mais de moindre importance, de 15 à 30%, et une augmentation légère des HDL de 5 à 12% (Dievart, 2005).

En plus de leur effet direct sur les taux de lipoprotéines circulantes, les inhibiteurs de la HMG-CoA reductase semblent avoir des effets pléiotropes, leur permettant de diminuer le taux d'évènements ischémiques (Calop et *al.*, 2008).

9.2. Les fibrates

Le mécanisme d'action des fibrates s'effectue dans le noyau des cellules. Les fibrates sont des ligands des PPAR appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription activés par des ligands qui peuvent être également activés par les acides gras. Il existe trois isoformes de récepteurs PPAR : les PPAR α , les PPAR β - δ et les PPAR γ . Ils possèdent tous comme ligand les acides gras. Leurs localisations tissulaires sont différentes. Les PPAR α sont principalement retrouvés dans le foie, les muscles squelettiques

et le cœur. Ils jouent un rôle dans la régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines et dans la régulation de la réponse inflammatoire (Luc, 2002).

Les fibrates agissent principalement sur les PPAR α , certains d'entre eux activeraient également les PPAR γ . La stimulation de ces récepteurs entraîne le développement des peroxysomes au sein de la cellule. Le taux d'acides gras présents dans les cellules dépend de différents paramètres. Il s'agit notamment de transporteurs comme la FATP (fatty acid transport protein) et la FAT (fatty acid translocase). Les fibrates augmentent l'expression des gènes aboutissant à la formation de ces 2 transporteurs. C'est ainsi que les fibrates augmentent la concentration des acides gras dans les cellules hépatiques. Les fibrates en se fixant au PPAR α induisent une réponse au niveau nucléaire (Michalik et *al.*, 2006).

Ils agissent au niveau transcriptionnel de deux façons. Il y a un phénomène de transactivation *via* la dimérisation des PPAR α aux récepteurs RXR ainsi qu'un phénomène de trans-répression n'impliquant que le récepteur PPAR α . La transactivation induira le métabolisme des lipides tandis que la trans-répression induira des propriétés anti-inflammatoires. Les PPAR α modulent l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides gras. Ils augmentent l'expression de l'acétyl~CoA synthétase et l'estérification des AG en Acyl~CoA (Luc, 2002 ; Michalik et *al.*, 2006).

Les AG estérifiés restent au sein de la cellule. Les PPAR α en augmentant l'expression des gènes CPT-I et II, permettent la pénétration des AG dans les mitochondries. La dégradation oxydative des AG est donc augmentée, ce qui diminue la quantité d'acides gras libres et la synthèse de VLDL. Le catabolisme intravasculaire des triglycérides est élevé par les fibrates (Luc, 2002 ; Michalik et *al.*, 2006).

Les fibrates ont également un effet sur la voie inverse du cholestérol produisant ainsi des apolipoprotéines AI et AII ce qui a pour effet la production d'HDL (Luc, 2002 ; Michalik et *al.*, 2006).

Ils diminuent l'expression de la LPL et de la LCAT. De plus les fibrates élèvent la taille des HDL. Le retour du cholestérol des tissus vers le foie est facilité (Luc, 2002 ; Michalik et *al.*, 2006).

Les fibrates réduisent la réponse inflammatoire en agissant sur les récepteurs PPAR α . Les LTB₄ s'auto-dégradent en activant les récepteurs PPAR α . Il y aurait une diminution de la CRP. Tout comme les statines, les fibrates auraient un rôle sur les plaques d'athérome. Ce

rôle serait la réduction de la progression de la plaque. Les fibrates abaissent le taux de triglycérides et améliorent celui de l'HDL-c (Luc, 2002 ; Michalik et *al.*, 2006).

II. Le stress oxydatif

1. Définition

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules et même des organes (Durackova et *al.*, 2008) (Figure 12).

Les effets des radicaux libres sont proportionnels à l'intensité et à la durée de leur production :

- ✓ Une production transitoire et modérée de ces molécules correspond à un mécanisme de défense de la cellule lui permettant de détruire des cellules cancéreuses ou des microorganismes pathogènes (Morel et Barouki, 1999).
- ✓ Lorsque cette production est récurrente ou chronique mais reste modérée dans son intensité, la balance entre production de radicaux libres et systèmes de détoxification de la cellule est perturbée de manière continue (Baskin et *al.*, 1994 ; Barouki, 2006 ; Jenkins et *al.*, 2007 ; Jones, 2006). On parle alors de stress oxydatif (figure n° 19).
- ✓ Si la production de radicaux libres est suffisamment importante pour altérer de manière irréversible des processus cellulaires vitaux, elle déclenche l'apoptose. Quand les radicaux libres sont générés en quantités massives, ils entraînent la nécrose cellulaire (Morel et Barouki, 1999).

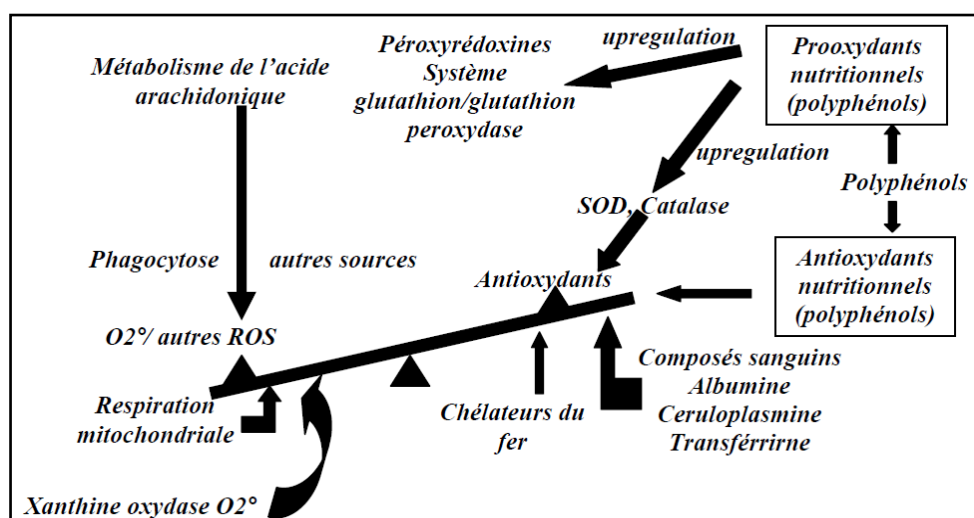


Figure 12: Déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les ROS in vivo (Halliwell, 2009).

2. Le système prooxydant

Le système prooxydant est constitué par les oxydants radicalaires connus sous le nom les radicaux libres capables d'exister avec un radical non apparié et les oxydants non radicalaires ayant une configuration électronique stable (Halliwell et Gutteridge, 1996). Ces deux classes d'oxydants sont regroupées sous la catégorie des ERO et des ERN (Tableau I).

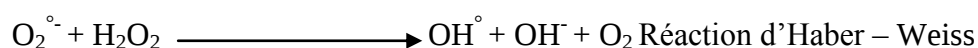
Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules, porteurs d'un ou de plusieurs électrons non appariés (Halliwell, 2006) sur leur orbitale externe (Bell et al., 2007). La présence d'un électron célibataire rend ces molécules plus réactives puisque ces dernières vont interagir avec les différentes molécules présentes à proximité de leur site de formation (lipides, protéines et acides nucléiques) induisant des réactions en chaîne (Bertrand, 2008).

Tableau I: Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Radicaux libres		Espèces non – radicalaires	
ERO	ERN	ERO	ERN
$O_2^{\bullet -}$: anion superoxyde $H_2O^{\bullet}$: radical hydroperoxyde $OH^{\bullet}$: hydroxyl $RO^{\bullet}$: radical alkoxy $ROO^{\bullet}$: radical alkoperoxy $ROOH^{\bullet}$: radical hydroxyperoxy	$NO^{\bullet}$: monoxide d'azote $NO_2^{\bullet}$: dioxyde d'azote $NO_3^{\bullet}$: nitrate	$ONOO^{\bullet -}$: anion peroxydinitrite $OONOO^{\bullet -}$: anion peroxydinitrate H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène O_2 : oxygène singulet O_3 : ozone $HOCl$: acide hypochloreux $ROOH$: peroxyde organique	$ONOO^{\bullet -}$: anion peroxydinitrite $OONOO^{\bullet -}$: anion peroxydinitrate $ONOOH$: acide peroxydinitreux $ROONO$: alkyl peroxydinitrate HNO_2 : acide nitreux NO^+ : cation nitrosyl $NO^{\bullet -}$: anion nitrosyl

Source: (Delattre, 2005)

L'appellation ERO inclut les radicaux libres de l'oxygène dont le précurseur est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), à l'origine du radical hydroxyl ($OH^{\bullet}$) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux ($HOCl$) qui peuvent devenir toxiques via d'autres réactions chimiques (Delattre et al., 2005). Le radical $OH^{\bullet}$ est formé principalement au cours de la réaction de Fenton et du cycle de Haber – Weiss :



Le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) est extrêmement réactif et implique des effets délétères vis-à-vis des molécules avoisinantes. Il est parmi les radicaux libres les plus toxiques. Le radical hydroxyle serait d'ailleurs le principal initiateur du processus de peroxydation lipidique au niveau des acides gras polyinsaturés et des lipoprotéines.

3. L'origine du stress oxydatif

Le métabolisme de l'oxygène est effectué principalement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 13) et il aboutit à la formation de deux molécules d'eau avec une considérable production d'énergie sous forme d'ATP (Balaban *et al.*, 2005).

Cette chaîne respiratoire est formée de 4 complexes (I à IV) permettant le transport des électrons et le pompage des protons à l'intérieur de la mitochondrie. Environ 0,4 à 4% de l'oxygène ne sont pas entièrement transformés dans la mitochondrie et donnent naissance aux espèces réactives de l'oxygène (EROs), comprenant le H_2O_2 , $\text{l'O}_2^\bullet$ et $\text{l'OH}^\bullet$. Ainsi, la phosphorylation oxydative du NADH ou du FADH, nécessaire pour générer le gradient de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale, entraîne la production d'EROs. Au long des différents sites de la chaîne des cytochromes constitutifs de la chaîne respiratoire, les électrons dérivés du NADH ou du FADH peuvent directement réagir avec l'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons pour générer les radicaux libres.

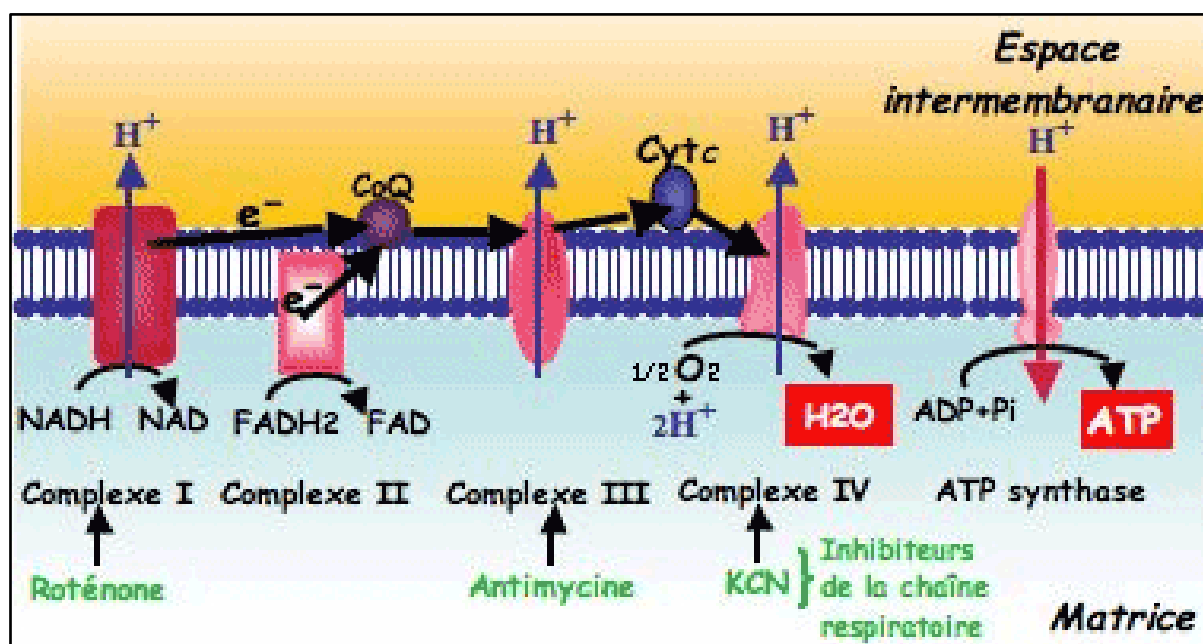


Figure 13: La chaîne respiratoire mitochondriale (Cadenas et Davies, 2000).

4. Mécanisme de production des ERO

La principale source de la production des ERO est la chaîne respiratoire mitochondriale (Pal Yu, 1994; Pattwell et Jackson, 2004 ; Andreyev et *al.*, 2005) dont le taux est estimé à 90% selon Rolfe et Brown, (1997). A laquelle, s'ajoutent les petites molécules auto-oxydées, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique lisse, les peroxysomes et la biosynthèse des prostaglandines de différentes hormones (Sahnoun et *al.*, 1998).

L'oxygène est indispensable aux organismes aérobies, il participe à la synthèse d'ATP pendant la respiration. Durant ce processus, 2 à 5 % des électrons ne sont pas réduits en eau par réduction tétravalente, ils fuient en différents niveaux de la chaîne (CoQ) (Figure 14).

L'anion superoxyde est le premier radical libre formé. En présence d'ions H^+ , il subit une réaction de dissimilation aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier, en présence de fer ferreux (Fe^{2+}), se décompose et aboutit à la formation du radical hydroxyle $^{\circ}OH$, le plus réactif et le plus toxique qui crée de nouveaux radicaux par arrachement d'un atome d'hydrogène ou par le transfert de son électron célibataire. En présence des AGPI, peut générer des radicaux alkoxydes (RO°) ou peroxydes (ROO°).

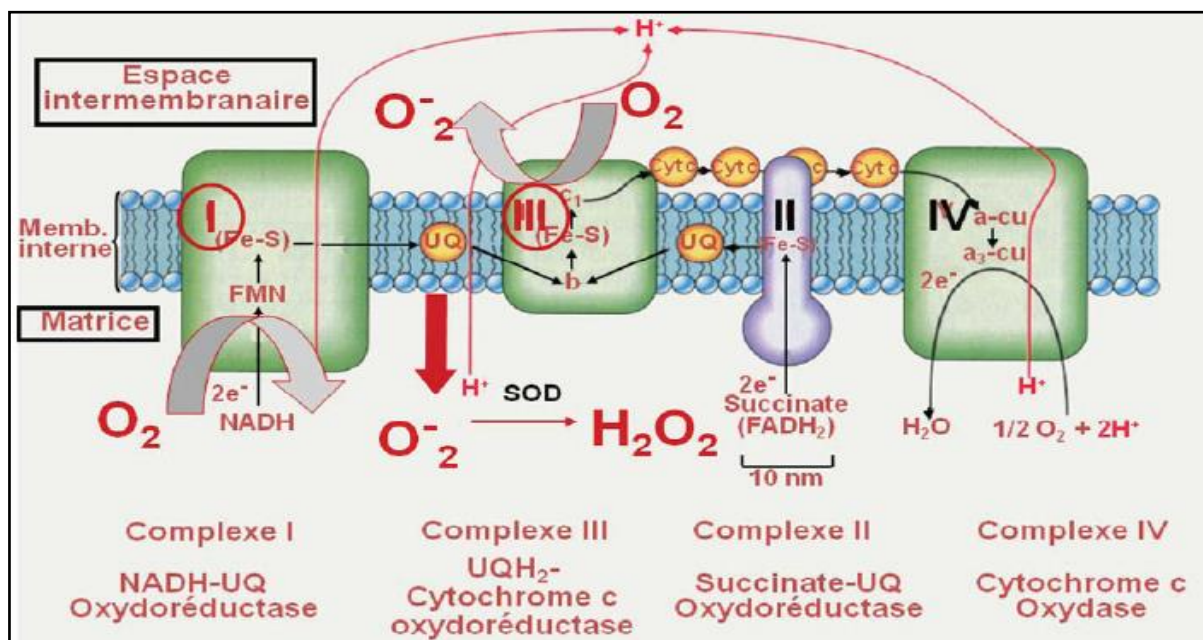


Figure 14: Mécanisme de production des ROS (Turrens, 1997).

5. Les dommages liés au stress oxydant

Toutes les macromolécules cellulaires (lipides, protéines et acides nucléiques) sont des cibles potentielles des ERO (Barouki, 2006 ; Valko *et al.*, 2007). Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, dans ce travail nous nous sommes intéressés par la peroxydation lipidique et l'oxydation des lipoprotéines.

5.1. Peroxydation lipidique

Le stress oxydant attaque tous les constituants cellulaires et les lipides sont les plus touchés. La peroxydation lipidique concerne les acides gras polyinsaturés ou estérifiés des membranes cellulaires, tels que les esters de cholestérol, les phospholipides et les triglycérides. Ce phénomène de peroxydation lipidique peut se produire dans des conditions physiologiques et il se trouve exacerbé dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives (hydroxyles, alcoxyles, peroxydes, oxygène singulier et peroxydinitrite) entraînant l'arrachement d'un hydrogène du PUFA (LH). Ceci aboutit à la formation d'un radical pentadiényle qui après addition avec O_2 donne le $LOO^\bullet$. Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre PUFA et former un $LOOH$, c'est la phase de propagation. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques.

La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut être prévenue par la vitamine E (α -tocophérol) intercalée dans la bicouche lipidique des membranes qui joue le rôle de donneur d'hydrogène. La vitamine E transforme les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et met fin à la réaction en chaîne de peroxydation des PUFAs. Cette dernière étape est alors désignée comme phase de terminaison (Figure 15).

Les LPO sont susceptibles de se décomposer en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Les plus réactifs vis à vis des bases de l'ADN sont représentés par le malondialdéhyde (MDA) et le 4-HNE. Ces derniers peuvent former des adduits avec l'ADN. Ils réagissent d'autre part avec des antioxydants comme le GSH conduisant à une diminution de la concentration de ce dernier, se traduisant par une diminution des défenses cellulaires.

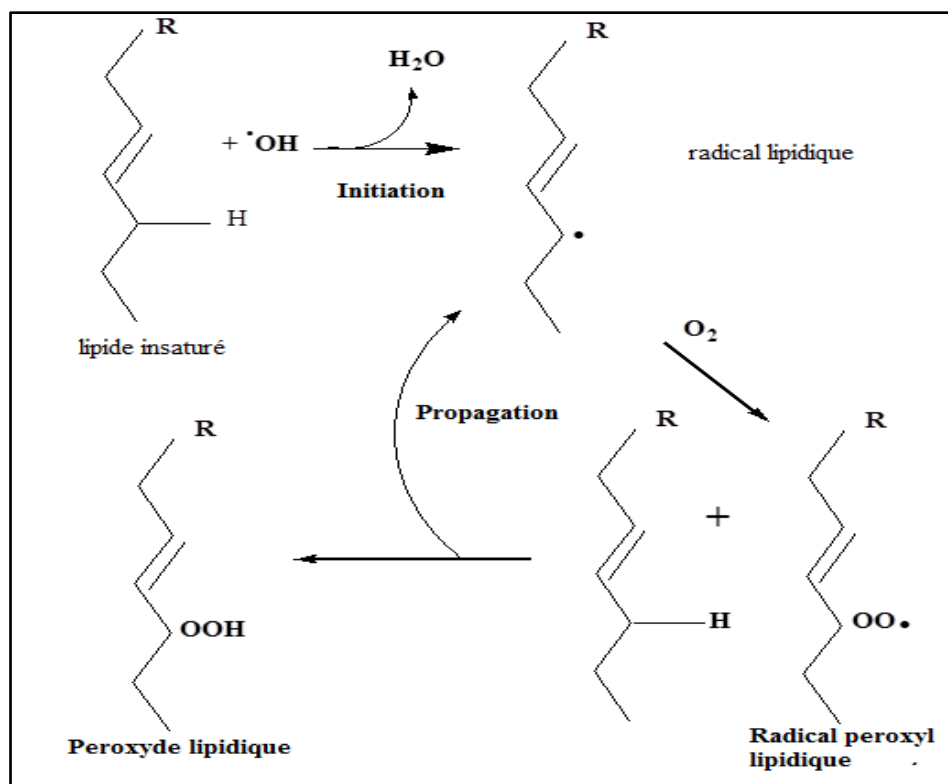


Figure 15: Réaction de la peroxydation lipidique (Tim, 2009)

5.2. Oxydation des lipoprotéines

Le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des lipoprotéines de faibles densités (LDL) riches en acides gras polyinsaturés. La peroxydation induite des LDL par les ERO provoque *in situ* la formation des aldéhydes (MDA et HNE) qui peuvent à leur tour oxyder les LDL.

- ✓ Dans le premier cas, ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels, elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses dans l'espace interstitiel. Ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose (Estarbaner, 1992).
- ✓ Dans le second cas, l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et perturbe le fonctionnement des récepteurs et des transporteurs se trouvant à leur surface (Favier, 2003).

6. Les pathologies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à l'évolution des complications. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu.

La plupart des maladies causées par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux libres (Ferrari, 2001). Le stress oxydant joue également un rôle dans l'apparition des facteurs athérogènes: augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs prooxydants (cytokine, superoxyde, NO...etc) (Montagnier et *al.*, 1998).

De nombreuses affections humaines ou animales incluent un stress oxydant, local ou général, dans leur pathogenèse au même titre que l'inflammation à laquelle il est souvent associé. Dans plusieurs maladies graves, le stress oxydant est le facteur déclenchant originel.

7. Le stress oxydant et l'insulinorésistance

De plus en plus de données expérimentales et cliniques démontrent que le stress oxydant, joue un rôle dans la physiopathologie des étapes précoces de l'insulinorésistance (Ceriello, 2003).

En effet, lors de l'insulinorésistance, une augmentation de la concentration en AGL s'accompagne d'une élévation de la fourniture en électrons à la chaîne respiratoire, cette dernière est responsable de l'augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène en activant leurs voies métaboliques génératrices, ce qui en retour aggrave à la fois l'action et la sécrétion de l'insuline.

Une inhibition par H_2O_2 de la transduction du signal de l'insuline passant par un blocage de l'activation de son récepteur, ou de IRS ou du PI3-K a été décrite dans des études animales (Evans et *al.*, 2005). Par ailleurs, dans des modèles expérimentaux d'insulinorésistance au niveau hépatique et périphérique, des modifications du statut redox

sont observées (Kawasaki et *al.*, 2005) accompagnées d'une perte importante de réactivité de la voie de signalisation de l'insuline (Bezerra et *al.*, 2000).

8. Le stress oxydant et la lipotoxicité

La lipotoxicité se définit par les effets toxiques des acides gras sur la survie des cellules β pancréatiques (Lee et *al.*, 2013). L'accumulation intracellulaire des lipides sous forme de vésicules constituées par les TG est considérée comme la première étape du développement d'une NASH. Des données récentes montrent que la formation de gouttelettes lipidiques au niveau hépatocytaire peut représenter une réponse protectrice pour limiter les effets toxiques des AGL (Choi et Diehl, 2008).

L'accumulation des TG n'est probablement pas complètement bénigne : les TG peuvent altérer le flux sanguin hépatique par compression des sinusoides au cours de la nécrose hépatocytaire (Wanless et Shiota, 2004). L'accumulation de vésicules lipidiques a été associée à une augmentation des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique lisse, qui peut induire une mort cellulaire par apoptose (Puri et *al.*, 2008).

Selon ce modèle pathogène de NASH, des métabolites lipotoxiques des acides gras sont générés en parallèle à la formation des gouttelettes de triglycérides, donnant lieu au phénotype reconnu de NASH, dans lequel la stéatose et les lésions cellulaires coexistent. L'accumulation de triglycérides pouvant être protectrice, elle ne serait plus considérée comme nécessaire pour le développement de la NASH (Neuschwander-Tetri, 2010).

Les anomalies métaboliques prédisposant aux lésions lipotoxiques comprennent une augmentation du stockage ou une élimination des acides gras.

Les mécanismes toxiques peuvent comprendre une augmentation de l'oxydation des acides gras et du stress oxydant, une altération de la composition en acides gras et en phospholipides des membranes cellulaires, du contenu cellulaire de cholestérol, une perturbation de la signalisation des céramides et même une toxicité directe des AGL (Malhi et Gores, 2008).

9. Stress oxydant et la dyslipidémie

Le stress oxydant a été impliqué dans la pathogénie des maladies cardiovasculaires et l'apparition de l'athérosclérose, le cancer et d'autres maladies chroniques et joue un rôle important dans le processus de vieillissement (Stocker et Keaney, 2004 ; Madamanchi et *al.*, 2005 ; Grassi et *al.*, 2009). Il provoque la vasodilatation des vaisseaux en altérant l'endothélium (Kearney et *al.*, 2005 ; Higashi et *al.*, 2009).

Plusieurs études ont montré qu'un régime riche en lipides conduit à des états hyperlipidiques, en augmentant la génération des radicaux libres (Zhang et *al.*, 2005) et l'oxydation des protéines dans le cerveau. Il a été rapporté que l'hypercholestérolémie augmente le niveau des ERO (Aytan et *al.*, 2008). Des expériences réalisées chez des lapins nourris au régime hypercholestérolémique ont montré une augmentation de plusieurs marqueurs de stress oxydatif (Aytan et *al.*, 2008).

Les désordres de la glycorégulation sont reconnus par leur origine dans les défauts de la liporégulation (Smith et *al.*, 2002; Klein et *al.*, 2004).

Il a été suggéré que l'hypertriglycéridémie et l'hyperglycémie sont responsables de la production des ERO, qui vont conduire à l'activation du facteur nucléaire kappa B (Nitenberg, 2006). Ce facteur de transcription contribue à l'immunité, l'inflammation, la régulation de la prolifération cellulaire, la croissance et l'apoptose en contrôlant l'expression de nombreux gènes (Baldwin, 1996). Tous ces mécanismes peuvent participer à la progression de l'athérosclérose (Nitenberg, 2006).

10. Source des radicaux libres dans les dyslipidémies

Selon des pronostiques les trois enzymes suivantes NADPH oxydase, la xanthine oxydase et oxydenitrique synthase sont la source potentielle des radicaux libres dans les dyslipidémies. Leur augmentation dans l'activité vasculaire a été démontrée dans l'athérosclérose expérimentale et clinique. Des études récentes suggèrent que la production des ERO intracellulaire peut également être dérivée de la mitochondrie.

La production des radicaux superoxydes mitochondrial se fait principalement en deux points distincts de la chaîne de transport des électrons au complexe I (NADH déshydrogénase) et au complexe III (ubiquinone cytochrome c réductase) qui peuvent jouer un rôle dans l'athérosclérose et l'hyperglycémie.

III. Les antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré par des systèmes antioxydants (Halliwell, 2006). Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires.

Les systèmes antioxydants sont deux types, soit des molécules qui captent rapidement les ERO (antioxydants proprement dits), soit des systèmes enzymatiques catalysant la conversion des molécules prooxydantes (Salvayre et Salvayre, 2005). Selon leurs structures variées et la taille de leurs molécules antioxydantes, ils sont classés en :

1. Antioxydants à poids moléculaire élevé (H.M.W)

Ce sont des antioxydants endogènes, classés à leur tour en deux catégories : des antioxydants enzymatiques et des antioxydants non enzymatiques (Pincemail et *al.*, 2002).

1.1. Les antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydants (Tableau II) ont une signification négligeable dans l'espace extracellulaire alors qu'ils jouent un rôle très significatif dans l'espace intracellulaire (Durackova, 2008). On note principalement:

- ✓ Les enzymes responsables de la dismutation de l'ion superoxyde sont les superoxydes dismutases,
- ✓ Les enzymes agissant sur les peroxydes sont la catalase et les glutathion peroxydases,
- ✓ Les enzymes intervenant dans la protection des protéines à fonction thiol est la thiorédoxine (Goudable et Favier, 1997).

Tableau II: Les antioxydants enzymatiques et leurs caractéristiques

Antioxydants enzymatiques	Caractéristiques et réaction catalysée
<u>Superoxyde dismutase SOD:</u> - Cu. Zn SOD1 - Mn SOD2 - Cu. Zn SOD3	Appartient à la famille des metalloenzymes, possède trois isoenzymes: SOD1, SOD2 intracellulaires et SOD 3 extracellulaire. Catalyse la dismutation de l'ion superoxyde. $2\text{H}^+ + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
<u>La catalase</u>	C'est une enzyme héminique capable de transférer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
<u>Les glutathions peroxydases:</u> - GPx sélénium indépendant (GST): - GPx sélénium-dépendant	- La GST catalyse les réactions de détoxification des xénobiotiques. - Présente sous forme de 5 isoenzymes tétramériques, agissant sur les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques par l'intermédiaire de GSH.
<u>La thiorédoxine TRX</u>	- Sélénoprotéine, à activité oxydoréductase, protectrice des protéines à fonction thiol: $\text{Trx-S}_2 + \text{NADPH.H}^+ \xrightarrow{\text{TrxR}} \text{Trx-(SH)}_2 + \text{NADP}^+$ $\text{Protéine-S}_2 + \text{Trx-(SH)}_2 \longrightarrow \text{Protéine-SH}_2 + \text{Trx-S}$

Source : Beaudoux et *al.*, 2000

1.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques présents dans l'organisme humain comprennent la transferrine, l'apotransferrine, la ceruloplasmine et l'albumine (Tableau III).

Tableau III: Principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques

Antioxydants non enzymatiques	Rôle antioxydant
La transferrine	Capte les ions Fe^{3+} et bloque les réactions de la peroxydation lipidique.
L'apotransferrine	Capte les ions Fe^{3+} et inhibe la formation du radical HO° et les réactions de la peroxydation lipidique.
La ceruloplasmine	Capte les ions Cu^{2+} et prévient leur effet prooxydant.
L'albumine	Intégration des ions Cu^{2+} à l'hème en évitant les dommages oxydatifs des autres molécules de la matrice extracellulaire.

Source : Beaudoux et *al.*, 2000; Durackova et *al.*, 2008

2. Antioxydants à faible poids moléculaires (L.M.W)

Nous évoquons dans cette partie les propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires (micronutriments et dérivés métaboliques) (Tableau IV). Cependant, nous devons garder à l'esprit que ces composés ont d'autres rôles biochimiques qui s'étendent bien au-delà de leurs propriétés antioxydantes.

Tableau IV: Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires

Antioxydants	Activités antioxydantes
La vitamine E	Prévention de l'oxydation des LDL, l'athérosclérose (Nicolosis, 1999) et d'autres maladies cardiovasculaires (Thomas et <i>al.</i> , 1999 ; Vivekananthan, 2003).
La vitamine C	recyclage de la vitamine E et le glutathion (Baskin et Salem, 1994).
L'acide lipoïque	Inhibiteur de la glycooxydation (Cilard et Cilard, 2006), prévention de la lipodystrophie et la neuropathie mendiées par les ROS (Schmitt et <i>al.</i> , 2006).
L'acide urique	Piégeur puissant des radicaux: $O_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}OH$, $RO_2^{\cdot}$ (Durackova, 2008).
Le sélénium	Nécessaire à l'activité de nombreuses sélénoenzymes antioxydantes : GPx, TRX...etc (Baskin et Salem, 1994).
Co enzyme Q	Piégeur puissant des radicaux superoxyde et inhibiteur de la peroxydation lipidique (Kehrer, 1993). $GSH + R^{\cdot} \longrightarrow GS^{\cdot} + RH$
Le glutathion	Participant à l'activité des enzymes antioxydantes. Capture des espèces radicalaires (Durackova, 2008; Beaudeux, 2005).
Le zinc	La prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. Le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes (Baskin et Salem, 1994).
La bilirubine	Protection des acides gras libres et de l'albumine contre l'attaque radicalaire. (Beaudeux, 2005).
β-carotènes	Contrôlent efficacement la génération de radicaux libres notamment en captant l'oxygène singulet (Beaudeux, 2005): $O_2^1 + \beta\text{-carotènes} \longrightarrow \beta\text{-carotènes} + O_2$

3. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels extraits de plantes, utilisés tels quels ou après modifications chimiques, imitant les enzymes, chélatant le fer ou piégeant les radicaux, appartiennent à de nombreuses familles chimiques tels que les glucosides or, ceux des composés phénoliques ont donné le plus de molécules en regroupant un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique ainsi que d'autres constituants (Salunkhe, 1990) qui leur confèrent la propriété antioxydante (Ursini et *al.*, 1999). Les polyphénols naturels sont les acides phénoliques et les composés hautement polymérisés comme les tanins (Figure 16).

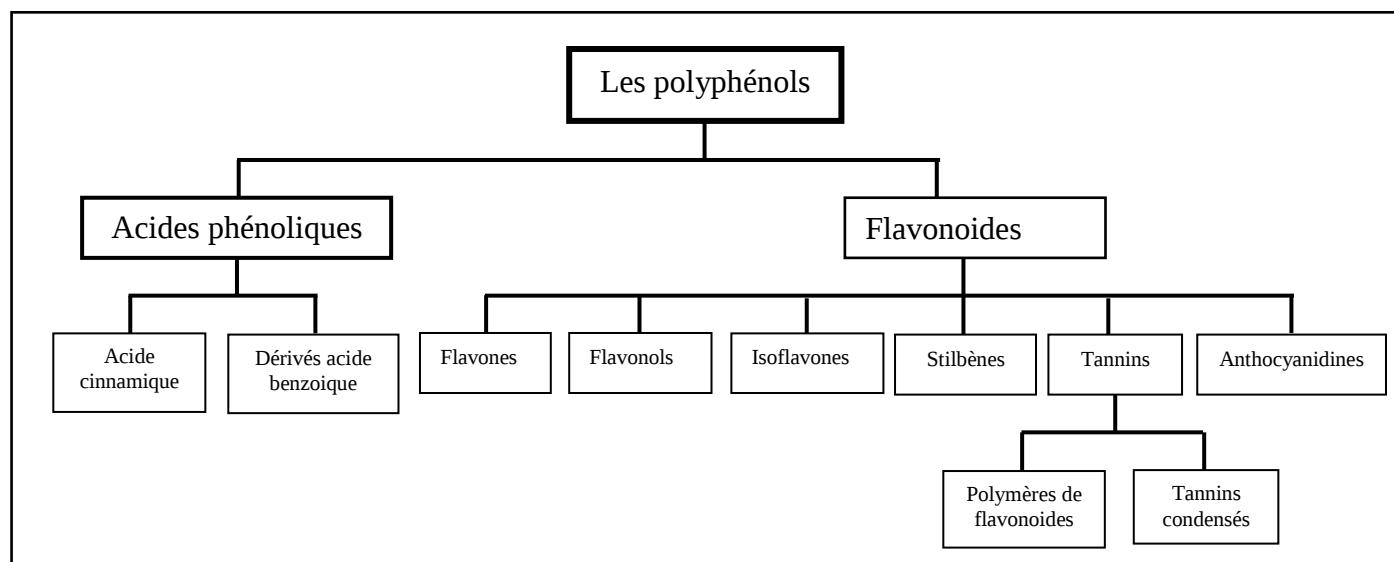


Figure 16: Les différentes classes des composés phénoliques (Macheix et *al.*, 2005)

En plus de leur activité antioxydante, ils sont doués de plusieurs autres activités biologiques importantes (Tableau V).

Tableau V: Quelques activités biologiques des polyphénols

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes	Didry et <i>al.</i> , 1982 Raeven et <i>al.</i> , 1988 Hayase et Kato., 1984
Coumarines	Protectrices vasculaires et anticœdémateuses	Mabry et Ulubelen, 1980
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes	Stavric et Matula., 1992 Das et <i>al.</i> , 1994 Bidet et <i>al.</i> , 1987 Bruneton, 1993 Aruoma et <i>al.</i> , 1995 Meddleton et Kardasnam., 1993.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux	Bruneton., 1993
Proanthocyanidines	Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	Bahorun, 1997 De Oliveira et <i>al.</i> , 1972 Brownlee et <i>al.</i> , 1992 Kreofsky et <i>al.</i> , 1992
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes Antimicrobiennes	Okuda et <i>al.</i> , 1983 Okamura et <i>al.</i> , 1993 Milal et <i>al.</i> , 1996.

IV. Importance des vinaigres

Il existe une variété de vinaigres naturels retrouvés dans le monde entier. Plusieurs études ont été réalisées sur les effets thérapeutiques des vinaigres et les composants bioactifs inhérents y compris l'acide acétique, l'acide gallique, la catéchine, l'epigallocatechin, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique et l'acide férulique et leurs effets antioxydant, antidiabétique, antimicrobien, anti-tumoral et anti-obésité.

Les bactéries acétiques produisent divers acides organiques notamment acétique qui est le plus prédominant, tartarique, lactique, malique, citrique (Sengun et Karabiyikli, 2011). Les acides organiques contenus dans les différents types de vinaigres sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI: Les acides organiques dans les différents types de vinaigres

Vinaigres	Acides organiques	Références
Vinaigre d'alcool	Acide acétique	Saiz-Abjo et <i>al.</i> , 2005
Vinaigre de pomme	Acide acétique, citrique, formique, lactique, malique, succinique.	Caligiani et <i>al.</i> , 2007 ; Budak, 2010
Vinaigre de malt	Acide acétique, citrique, lactique, et succinique.	Saiz-Abajo et <i>al.</i> , 2005
Vinaigre de prune	Acide acétique, tartarique, et lactique.	Liu et He, 2009
Vinaigre de xérès	Acide acétique, tartarique, lactique, malique, et citrique.	Morales et <i>al.</i> , 1998
Vinaigre de tomate	Acide acétique, citrique, formique, lactique, malique, et succinique.	Caligiani et <i>al.</i> , 2007
Vinaigre balsamique	Acide malique, tartarique, citrique, et succinique.	Cocchi et <i>al.</i> , 2006
Vinaigre du vin blanc	Acide acétique, citrique, formique, lactique, malique, succinique, et tartarique.	Caligiani et <i>al.</i> , 2007 ; Budak et <i>al.</i> , 2014

1. Vertus des vinaigres

1.1. Effets antioxydants

Les vinaigres ont un pouvoir antioxydant très élevé grâce à leurs richesses en substances bioactives tels que les polyphénols, le tableau VII montre les composés phénoliques contenus dans les différents types de ce produit.

Tableau VII : Les composés phénoliques dans différents types du vinaigre

Types des vinaigres	Composés phénoliques	Indice des polyphénols totaux (mg/ L GAE)	Références
Vinaigre de pomme	Acide gallique, catechine, epicatechine, acide chlorogénique, acide cafféique, and acide p-coumarique.	400 à 1000	Budak et <i>al.</i> , 2011
Vinaigre de raisin	Acide gallique, catechine, epicatechine, acide chlorogénique et acide cafféique.	2000 à 3000	Budak et Guzel-Seydim, 2014
Vinaigre de xérès	Acide gallique, acide protocatechique, tyrosol, acide 4-hydroxybenzoïque, catechine, vanilline, acide cis-p-coumarique.	200 à 1000	Alonso et <i>al.</i> , 2004
Vinaigre balsamique	Acide 4-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide protocatechique, acide syringique, acide isoferulique, acide p-coumarique, acide gallique, acide ferulique et acide cafféique.		Plessi et <i>al.</i> , 2006

1.2. Effets antidiabétiques

Johnston et *al.*, (2004) ont rapporté que le vinaigre améliore la sensibilité à l'insuline dans 19% des personnes atteintes de diabète de type 2 et 34% des personnes ayant un prédiabète.

Des études récentes chez l'humain et l'animal ont montré que le vinaigre peut être utilisé pour le traitement du diabète (Salbe et *al.*, 2009). Chez le rat, il a été rapporté que le vinaigre diminue la glycémie par rapport à un régime alimentaire normal après l'ingestion d'une charge d'amidon co-administrée à une solution d'acide acétique à 2% (Ebihara et Nakajima, 1988).

1.3. Effets contre les maladies cardiovasculaires

Des enquêtes montrent que les aliments riches en polyphénols ont un effet protecteur en réduisant la mortalité par les maladies cardio-vasculaires (Giugliano, 2000). L'acide chlorogénique est un acide présent dans les vinaigres de cidre peut inhiber l'oxydation des LDL-c (Laranjinha et *al.*, 1994).

Fushimi et *al.*, (2006) ont rapporté que 0,3% d'acide acétique réduit le taux de cholestérol et des triglycérides sériques (TG) chez les rats nourris avec un régime riche en gras. *In vivo*, l'acide acétique renforcé l'homéostasie lipidique (Yamashita et *al.*, 2007). De plus, les travaux de Budak et *al.*, (2011) ont déterminé l'effet hypocholestérolémiant des vinaigres de pommes chez des rats nourris par un régime hypergras avec des aliments riches en cholestérol.

V. Etude des fruits sélectionnés dans cette étude

1. La grenade

1.1. Présentation et taxonomie

C'est une espèce originaire d'Asie occidentale (Turquie, Iran, Irak, Azerbaïdjan, Afghanistan, Pakistan, Arménie), et probablement de la péninsule Arabique, ainsi que le nord de l'Afrique. Elle est cultivée dans tous les continents à climat tempéré chaud : bassin méditerranéen, Proche-Orient, Chine, Sud-Est des États-Unis, Chili, Argentine. La ville de Grenade en Espagne doit son nom au grenadier. Nous présentons ci-dessous sa classification selon APG III.

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : Punica

Espèce : *Punica granatum*L.

1.2. Usage thérapeutique

Les principaux effets du jus de grenade est de diminuer la pression artérielle systolique, provoquant ainsi un effet globalement positif sur la progression de l'athérosclérose et le développement potentiel des maladies coronariennes. D'autres études sur les rats ont montré l'effet antioxydant de grenade, il protège la muqueuse gastrique contre la toxicité de l'éthanol et l'aspirine (Khennouf et *al.*, 1998; Ajaikumar et *al.*, 2005). Il réduit la peroxydation lipidique, en améliorant l'activité des enzymes antioxydantes glutathion

(GSH), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GRx) et la glutathion -S- transférase (GST).

2. La figue de barbarie

2.1. Présentation et taxonomie

C'est une espèce originaire du Mexique, qui s'est naturalisée dans d'autres continents, notamment le pourtour africain. Il produit un fruit comestible appelé figue de Barbarie. Nous décrivons ci-dessous sa classification selon APG III.

Règne: Plantae

Sous-règne: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe: Caryophyllidae

Ordre: Caryophyllales

Famille: Cactaceae

Genre: *Opuntia*

Espèce: *Opuntia ficus-indica*

2.2. Usage thérapeutique

Elle est utilisée comme remède en raison de ses propriétés bénéfiques multiples: hypocholestérolémiant, anti-inflammatoire, antioxydant (Feugang et al., 2006) et dans le traitement du diabète de type II (Reynoso-Camacho et al., 2008); grâce à son contenu en composés bioactifs tels que isorhamnétine (Arcoleo et al., 1961), flavonols, dihydroflavonols et flavonones (Galati et al., 2003; Kuti, 2004; Tesoriere et al., 2005). Ils ont trouvé que l'effet de l'extrait de fruit est mieux que l'extrait de tige (Choi et al., 2002).

3. La pomme

3.1. Présentation et taxonomie

C'est une espèce d'arbres fruitiers appartenant à la famille des *Rosaceae*, largement cultivé. Il en existe environ 20 000 variétés (sous-espèces et cultivars) dont la moitié d'origine américaine, environ 2 000 anglaises et 2 000 chinoises. Nous décrivons ci-dessous sa classification selon APG III.

Règne: Plantae

Sous-règne: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe: Rosidae

Ordre: Rosales

Famille: Rosaceae

Sous-famille: Maloideae

Genre: Malus

Espèce: *Malus domestica* Borkh

3.3. Usage thérapeutique

La pomme est l'un des principaux contributeurs de composés phytochimiques nutritionnels dans l'alimentation humaine (Wolfe et *al.*, 2003; Colin-Henrion et *al.*, 2009). En général, les propriétés biologiques de pommes sont attribuées aux flavonoïdes et leurs effets anti-cancéreux, antioxydants et antibactériens (Hertog et *al.*, 1993; Karaman et *al.*, 2010). Les pommes contiennent un large éventail de composés phénoliques tels que les flavonols (quercétine et kaempférol), les glycosides de flavonol, flavonones, chalcones (naringénine et eriodictyol) et les catéchines (épicatéchine) (Lachman et *al.*, 2000a).

Le constituant antioxydant le plus significatif de pommes est l'acide ascorbique (Lachman et *al.*, 2000b). Récemment, il a été découvert dans une étude réalisée sur des souris que les polyphénols de pommes ont un effet hépato-protéctif (Yang et *al.*, 2010). Leurs polysaccharides assurent un rôle dans le piégeage des radicaux libres et la protection contre les dommages oxydatifs (Colin-Henrion et *al.*, 2009) et contre la peroxydation lipidique (Wolfe et *al.*, 2003).

MATERIEL

ET

METHODES

MATERIEL ET METHODES

- Ce travail a été effectué au laboratoire de biologie et physiologie des organismes (LBPO), équipe de recherche Bioénergétique et Métabolisme Intermédiaire (BMI) dirigée par le Professeur KOCEIR Elhadj Ahmed, et à l'animalerie de la faculté des sciences biologiques, Université des sciences et de la technologie HOUARI BOUMEDIENE – Alger. Durant la période allant de Mai 2012 à Décembre 2014.
- Les vinaigres sont obtenus chez l'Office National Algérien de Commercialisation des Produits Vitivinicoles (ONCV), il s'agit de :
 - Vinaigre de grenade [*Punica granatum* L. (Punicaceae)]
 - Vinaigre de figue de barbarie [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae)]
 - Vinaigre de pomme [*Malus domestica* Borkh. (Rosaceae)]

I. La méthode de production des vinaigres

Le vinaigre est produit à partir d'une double fermentation d'un extrait de fruits; sous l'action sélective de certains micro-organismes tels que les levures et les bactéries. La fabrication du vinaigre comprend, après extraction du jus de fruits (moût), deux étapes principales:

- ✓ La fermentation alcoolique qui se déroule en anaérobiose sous l'action des levures *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces ellipsoideus*, laquelle transforme les sucres fermentescibles des fruits en alcool éthylique;
- ✓ La fermentation acétique qui se déroule à l'air libre sous l'action de la bactérie acétique (*Mycoderma aceti*), laquelle transforme l'alcool éthylique obtenu à la phase précédente en acide acétique. La figure 17 illustre la méthode générale de cette fabrication.

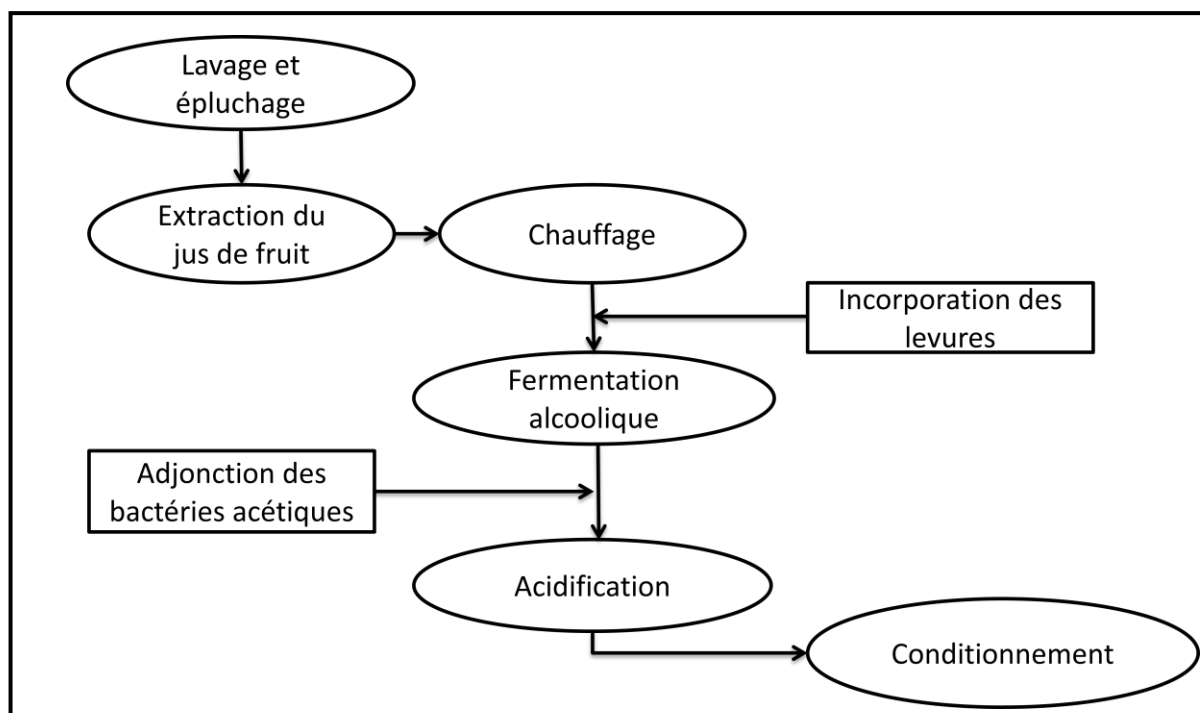


Figure 17 : Méthode générale de la production des vinaigres (Budak et *al.*, 2014)

II. Screening phytochimique

L'étude phytochimique regroupe des tests qualitatif et quantitatif qui permettent de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans les trois vinaigres étudiés.

1. Tests qualitatifs

Ils ont porté sur la mise en évidence des principaux groupes chimiques (tannins, flavonoïdes, saponosides, triterpènes, composés réducteurs, quinones et les anthocyanes) en utilisant des réactions décrites par Trease et Evans (1989) et Harborne (1998).

✓ Les composés polyphénoliques

○ Mise en évidence des tannins

Dans un tube à essai, 5 mL du vinaigre de chaque fruits ont été introduits et ajouter 2 à 3 gouttes de FeCl_3 à 5%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes).

- **Mise en évidence des flavonoïdes**

A 5 mL du vinaigre de fruits, ajouter quelques gouttes d'HCl concentré et quantité de tournures de magnésium. La présence des flavones aglycones est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.

- ✓ **Mise en évidence des alcaloïdes**

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et de Wagner (Annexe 1).

1 mL de chaque vinaigre est mis dans 3 tubes à essai. Dans le premier, on met 5 gouttes de réactifs de Mayer; dans le deuxième, on ajoute 5 gouttes de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc et brun, révèle la présence des alcaloïdes.

- ✓ **Les saponosides**

Dans un tube à essai, on mélange 5 mL de vinaigre de fruit avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante, après 15 min, confirme la présence des saponosides.

- ✓ **Les triterpènes hétérosides**

On mélange dans un tube à essai contenant 5 mL de vinaigre de fruits avec 2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marron de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques.

- ✓ **Les composés réducteurs**

2 mL du vinaigre de fruits sont mis avec 2 mL de liqueur de Fehling (Annexe 1) dans un tube à essai, le tout est incubé dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

✓ Les quinones

1,5 mL du vinaigre de fruit est versé dans 3 tubes à essai, dans lequel on y ajoute quelques gouttes de solution de soude à 4%. Après agitation, l'apparition d'une teinte rouge à violette indique la présence des quinones.

✓ Les anthocyanes

Quelques gouttes d'ammoniaque (dilué au demi) sont ajoutées à 5 mL du vinaigre. La réaction donne une coloration bleue en présence d'anthocyanes.

2. Les tests quantitatifs

2.1. Dosage des polyphénols totaux

○ Principe

La teneur en polyphénols totaux des vinaigres est déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec l'acide gallique, permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans le vinaigre. Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par millilitre du vinaigre.

○ Mode opératoire

Les polyphénols totaux ont été dosés selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Lee et *al.*, (2005).

- Dans un tube à essai, 25 μ L de vinaigre est complété à 4 mL par l'eau distillée. Ensuite, 250 μ L de réactif Folin-Ciocalteu sont rajoutés.
- Juste après un moment (3 min), 750 μ L de carbonate de sodium à 20% sont additionnés.
- Les tubes à essai sont maintenus dans un bain-marie à 40°C pendant 40 min, l'absorbance est mesurée à 685 nm.

- Un blanc est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant le vinaigre par l'eau distillée.
- Les polyphénols totaux sont quantifiés à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue par la mesure des absorbances des concentrations connues de solutions étalons de l'acide gallique (10-100 µg/mL).

Les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique par rapport à 100 mL du vinaigre (mg EAG/100 mL du vinaigre).

2.1. Dosage des flavonoïdes

○ Principe

Le dosage des flavonoïdes a été déterminé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) de Lee et *al.*, (2005).

○ Mode opératoire

- Dans un tube à essai, 1ml de vinaigre a été ajouté à 1 mL de la solution d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 2% (20 g/L).
- Après 30 min d'incubation, l'absorbance est lue à 510 nm contre le blanc (L'eau distillée).
- Les flavonoïdes sont quantifiés à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue par la mesure des absorbances des concentrations connues de solutions étalons de la quercétine (1-20 µg/mL).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par 100 millilitre du vinaigre (mg EQ/100 mL du vinaigre).

3. Etude *in vitro* du pouvoir antioxydant

3.1. Le pouvoir de piégeage du radical DPPH

○ Principe

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques du vinaigre est évaluée en mesurant leurs capacités de piégeage le radical libre DPPH. Ce composé chimique possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et restent dans leur forme monomère

relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH° (Figure 18).

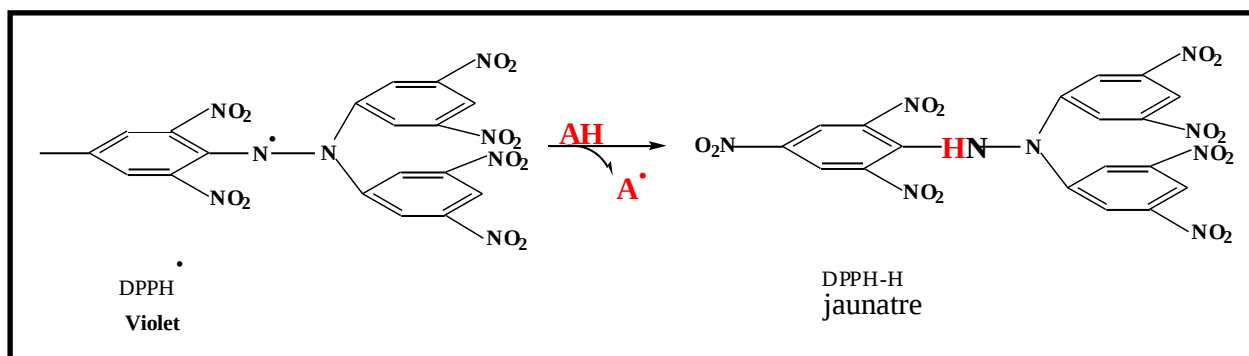


Figure 18: Réaction du radical DPPH° avec un antioxydant AH.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm (Popovici et *al.*, 2009). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl- 1- picryl hydrazyle) de couleur violette se réduit en DPPH-H de couleur jaune (Maataoui et *al.* , 2006).

○ Mode opératoire

Dans notre étude, le test utilisant le DPPH• est basé sur la méthode décrite par Burits et Bucar, (2000) and Şahin et *al.*, (2005).

- 25 µL de chacune des dilutions du vinaigre testé et 0.975 mL de la solution de DPPH (0.0024 g/100 mL) sont ajoutés dans une cuvette après incubation à l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 517 nm.
- Le dosage est répété 3 fois pour chaque concentration de l'échantillon testé. Le BHT et l'acide ascorbique à différentes concentrations sont utilisés comme standards.

L'activité antiradicalaire (AA) est estimée selon la formule suivante :

$$I\% = \left(\frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{ech.}}}{A_{\text{blanc}}} \right) * 100$$

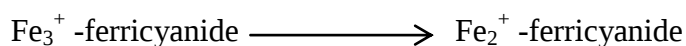
A_{éch.}: Absorbance de l'échantillon testé

A_{blanc}: Représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant addition de l'échantillon ou du standard.

3.2. Pouvoir réducteur

○ Principe

Le pouvoir réducteur des vinaigres a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986), dont le principe de ce test est basé sur la réaction suivante :



○ Mode opératoire

- 0.125 mL du vinaigre sont mixés avec 2.5 mL de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 mL de hexacyanoferrate de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à 1 %.
- Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 mL de l'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés.
- Prélever 2.5 mL de la solution et ajouter 2.5 mL de l' H_2O distillée et 0.5 mL de Chlorure de fer (FeCl_3) à 0.1 %.
- L'absorbance est mesurée à 700 nm. Le dosage est répété 3 fois pour chaque concentration de l'échantillon testé.
- Le BHT et l'acide ascorbique à différentes concentrations sont utilisés comme standards.

L'absorbance élevée indique un pouvoir réducteur élevé. La concentration en vinaigre fournissant 0.5 d'absorbance à 700 nm (Ferreira et *al.*, 2007).

4. Détermination du pH

○ Principe

Détermination en unité pH de la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution du vinaigre. La lecture est faite directement par le pH mètre (HANNA instruments, HI 2211 pH/ORP meter).

○ Mode opératoire

- Rincer les électrodes de pH mètre avec de l'eau distillée;
- Calibrer le pH mètre avec les étalons (pH 4,7 et 14);

- Rincer à nouveau avec de l'eau distillée;
- Plonger les électrodes dans la solution;
- Rincer à nouveau les électrodes, les mettre dans une solution de KOH.

5. Détermination de l'acidité titrable

Principe

Il consiste à déterminer la concentration d'une solution acide (acide éthanóïque ou acide acétique, contenu dans le vinaigre), sur la base du résultat d'un titrage acide-base (Aguiar et *al.*, 2005). L'agent titrant est une solution d'hydroxyde de sodium, de concentration connue en présence de phénolphtaléine comme indicateur de couleur.

○ Mode opératoire

- Prélever 10 mL de vinaigre, les introduit dans une fiole jaugée de 100 mL et effectuer la mise au trait par addition d'eau distillée.
- Prélever 20 mL de cette nouvelle solution, et la verser dans un Erlenmeyer de 250 mL. Ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine.
- Cependant, remplir une burette de Mohr avec une solution d'hydroxyde de sodium 0.09 M.
- Le titrage est terminé lorsque l'indicateur change de couleur (point d'équivalence).
- Le test est répété trois fois.

○ Expression des résultats

- Calculer la concentration de la solution diluée (vinaigre titré): $Ca = \frac{Ca \cdot Vb}{Va}$

Dont :

C_b : concentration d'hydroxyde de sodium = $9.43 \cdot 10^{-2}$ mol. L⁻¹

V_b : volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé.

V_a : volume en millilitres de la prise d'essai.

Le titre en degrés correspondant à la masse d'acide acétique /100 g = $\frac{Ca \cdot 10 \cdot 100 \cdot Mm}{\rho}$

Dont :

C_a : concentration de la solution diluée en mol/L.

10 : facteur de dilution du vinaigre avant d'être titré.

100 : degrés dans 100 g de vinaigre.

ρ : masse volumique du vinaigre, en gramme par litre.

6. Identification des acides organiques et des acides phénoliques dans les vinaigres par HPLC

Parmi les différentes méthodes chromatographiques existantes, HPLC est la méthode la plus utilisée pour la séparation des acides organiques et des acides phénoliques dans les vinaigres.

Matériel chromatographique utilisé est constitué par :

- ✓ Une pompe LC-20 AD.
- ✓ Un dégazeur DGU- 20 A5.
- ✓ Un détecteur SPD – 20A couplé à un ordinateur digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence LC Real Time Analysis.

Nous avons utilisé pour l'identification des acides organiques dans les vinaigres la méthode validée par Wodecki, 1991 dont les conditions chromatographiques sont présentées dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Conditions chromatographiques des acides organiques

Conditions chromatographiques	
Colonne	Hypersil BDS- C18, 4.0×250
Phase mobile	Acide phosphorique (0.1%)
Longueur d'onde	210 nm
Débit	1 mL/min
Température de la colonne	55°C
Volume injecté	35 µL

○ Préparation des solutions

✓ Préparation des vinaigres

1 ml de chaque vinaigre est dilué dans 10 mL d'eau distillée.

✓ Préparation des solutions standards

Dans des fioles de 200 mL, nous avons dissout 10.3, 11, 10.3, 11.5, 32.91 et 28.06 mg d'acide oxalique, d'acide malique, d'acide ascorbique, d'acide citrique, d'acide acétique et d'acide formique; respectivement. Les solutions obtenues sont filtrées à travers des filtres millipore de porosité 0.25 µm.

Pour l'identification des acides phénoliques, nous avons utilisé la méthode validée par Garcõaa Parrilla et *al.*, 1999, dont les conditions chromatographiques sont présentées dans le tableau IX.

Tableau IX : Conditions chromatographiques des acides phénoliques

Conditions chromatographiques	
Colonne	Hypersil BDS- C18, 4.0×250 mm
Phase mobile	acide acétique, eau et acetonitrile
Longueur d'onde	280 nm
Débit	0.5 mL/min
Température de la colonne	35 °C
Volume injecté	100

○ Phase mobile

La phase mobile est constituée de trois solutions:

- ✓ A : Acide acétique et l'eau dont les proportions (1 :99).
- ✓ B : Acide acétique et l'eau dont les proportions (6 :94).
- ✓ C : Acide acétique, l'eau, et acetonitrile dont les proportions (5 :65 :30).

Tableau X : Différents gradients de la phase mobile

Temps (minutes)	A (%)	B (%)	C (%)
00	95	5	---
20	90	10	---
50	70	30	---
55	50	50	---
60	---	100	---
100	---	50	50
110	---	---	100
120	---	---	---

- **Préparation des solutions**

- ✓ **Préparation des vinaigres**

1 ml de chaque vinaigre est dilué dans 10 mL d'eau distillée.

- ✓ **Préparation des solutions standards**

Dans des fioles de 200 ml, nous avons dissout 11.20, 10.27, 11.06, 10.54, et 11.60 mg d'acide gallique, cafféique, vanilline, benzoïque, et salicylique; respectivement. Les solutions obtenues sont filtrées à travers des filtres millipore de porosité 0.25 µm.

- **Expression des résultats**

Les concentrations des acides organiques et des acides phénoliques sont calculées à partir des chromatogrammes obtenus (Annexe 3 et 4), selon la formule suivante :

$$C_e = \frac{C_s * S_s}{S_e}$$

Dont :

C_e : Concentration de l'échantillon (mg/mL);

C_s : Concentration des standards (mg/mL);

S_e : Surface du pic de l'échantillon;

S_s : Surface du pic des standards.

II. Expérimentation animale

Elle a été effectuée au niveau de l'animalerie de la faculté des sciences biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie – Houari Boumediene, Alger. Cette partie est consacrée à tester l'effet préventif de 3 types du vinaigres de fruits (grenade, figue de barbarieet pomme) sélectionnés sur un modèle de rat rendu dyslipidémique.

1. Les animaux

L'étude a été réalisée sur 50 rats wistar (*Rattus norvigicus*), provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie (Centre d'élevage, annexe de kouba) – Alger.

Afin d'éviter la variabilité intersexe, nous avons utilisé que des mâles. A leur arrivée, les rats pesaient entre 120 - 170 g. Les conseils généraux pour l'utilisation des animaux de

laboratoire sont suivis par le comité de protection des animaux de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique agréé le 22 Aout 1998, sous le numéro d'éthique : 98-11.

Les animaux sont maintenus à une température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) avec une humidité relative $\approx 50\%$, le cycle jour-nuit est de 12 heures (une lampe minuterie) avec accès libre en eau et en nourriture. La litière est changée chaque 2 jour. Avant l'expérimentation, ils ont été soumis à une période d'adaptation (15 jours). Après cette période, les rats sont répartis d'une manière aléatoire en cinq groupes de 10; à raison d'un rat par cage.

Lot 1: Contrôle (C) : Les rats sont mis sous un régime standard (46.5 cal/jour);

Lot2: Dyslipidémique (HFD) : Les rats sont mis sous un régime hypergras (126.5 cal/jour);

Lot3: Traité (G) : Les rats sont mis sous un régime hypergras (126.5 cal/jour) et traité par le vinaigre de grenade (7 mL/kg/jour);

Lot4: Traité (FB) : Les rats sont mis sous un régime hypergras (126.5 cal/jour) et traité par vinaigre de figue de barbarie (7 mL/kg/jour);

Lot5: Traité (P) : Les rats sont mis sous un régime hypergras (126.5 cal/jour) et traité par le vinaigre de pomme (7 mL/kg/jour).

2. Les régimes alimentaires

Le régime standard est un aliment complet donné sous forme de bouchons, fourni par une station privée la production locale de Bouzareah et le régime hypergras est représenté par un jaune d'œuf bouilli ($\sim 20 \text{ g} = 80 \text{ Cal/jour}$) en plus de 15g d'aliment standard (46,5 Cal) soit une diète journalière de 126,5 Cal durant 7 mois. Le tableau XI résume la composition des régimes alimentaires des différents lots des rats expérimentaux (%).

Tableau XI : La composition des régimes alimentaires des différents lots expérimentaux (%)

Composants (%)	Lot 1 (n=10) Contrôle	Lot 2 (n=10) Dyslipidémique	Lot 3 (n=10) traité par le VG (7mL/kg/jour)	Lot 4 (n=10) traité par le VFB (7mL/kg/jour)	Lot 3 (n=10) traité par le VP (7mL/kg/jour)
Eau	16.07	40-46	40-46	40-46	40-46
Lipides	09	30-34	30-34	30-34	30-34
Protéines	23.03	13.5-17.5	13.5-17.5	13.5-17.5	13.5-17.5
Carbohydres	48	0.15-0.25	0.15-0.25	0.15-0.25	0.15-0.25
Minéraux et vitamines	0.3	16-20	16-20	16-20	16-20
Cal/jour	46.5	126.5	126.5	126.5	126.5

3. Les techniques de mesures et de dosages

Durant l'expérimentation et pour les différents groupes, l'évolution du poids est mesurée chaque semaine dès le premier jour jusqu'au sacrifice.

Afin de procéder aux différents dosages métaboliques, des prélèvements sanguins ont été effectués à jeun à partir des ponctions au niveau du sinus rétro – orbital de l'œil; à l'aide de pipettes pasteurs courtes préalablement héparinées ou contenant de l'EDTA (selon le paramètre étudié). Le sang récupéré est centrifugé à 3000 trs/min pendant 20 min. les érythrocytes sont lavés 4 fois par le NaCl à 0.9 % et centrifugés pendant 10 min à 3000 trs/min après chaque lavage (dosage de la SOD). Le plasma et les érythrocytes sont lavés et sont stockés à – 20°C pour le dosage des paramètres biochimiques.

A la fin de l'expérimentation (7 mois), les animaux sont mis à jeun pendant une nuit puis sacrifiés. Tous les organes (foie, reins, cœur, rate et pancréas) sont rapidement prélevés et pesés.

L'indice organo-somatique (IOS) est calculé selon la formule suivante :

$$IOS = \left(\frac{\text{poids de l'organe}}{\text{poids de l'animal}} \right) * 100$$

Si IOS est élevé par rapport à celui du lot contrôle, cela montré qu'il existe une hypertrophie de l'organe en question.

La moitié du foie est plongé dans de l'azote liquide et stocké à – 80 °C pour le dosage du MDA, un morceau de foie est utilisé pour le dosage du profil lipidique et le reste est fixé dans le liquide de bouin pour l'étude histologique.

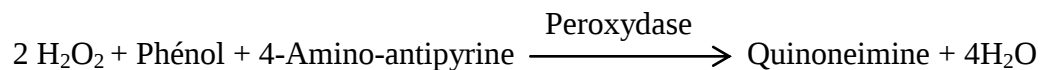
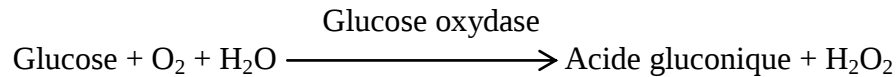
3.1. Les paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques plasmatiques et tissulaire (profil lipidique, hépatique et rénal) et fer sérique a été réalisé sur l'automate Roche Hitachi 911 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ). Tous les réactifs sont de marque Roche Diagnostics (Gmbh, Allemagne).

➤ Dosage de la glycémie

✓ Principe

La détermination enzymatique du glucose s'est effectuée selon les réactions suivantes :



➤ Dosage de l'insuline

✓ Principe

Le dosage de l'insuline s'effectue selon une technique immuno-enzymatique (Figure 19) (EIA kit, DRG International, Inc., USA). Elle est basée sur la technique sandwich dans laquelle deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre des déterminants antigéniques distincts sur la molécule de l'insuline. Au cours de l'incubation, l'échantillon réagit avec l'anticorps anti-insuline conjugué à la peroxydase et des anticorps anti-insuline fixés sur les puits. La plaque est ensuite lavée avec le tampon de lavage. Le réactif 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine est ajouté aux puits. La réaction est arrêtée par l'addition de l'acide sulfurique en induisant la formation d'un composé coloré. L'intensité de cette coloration est déterminée par spectrophotométrie à $\lambda = 450 \text{ nm}$.

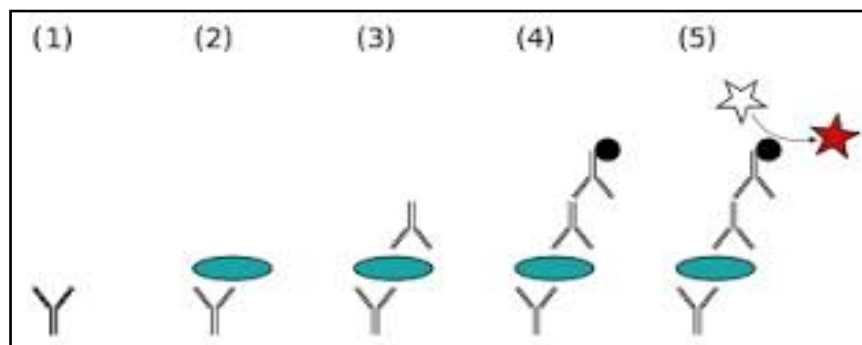


Figure 19 : Le principe de la méthode immuno-enzymatique ELISA

(1) La plaque est recouverte avec un anticorps de capture ; (2) l'échantillon est ajouté, et tout antigène présent se lie à l'anticorps de capture ; (3) l'anticorps de détection est ajouté, et se lie à l'antigène ; (4) L'anticorps secondaire lié à l'enzyme est ajouté, et se lie à l'anticorps de détection ; (5) Le substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme détectable (colorée).

- L'insulinorésistance a été évaluée par le calcul de l'indice de homeostasis model assessment (HOMA) en tenant compte des valeurs de la glycémie et du taux de l'insuline selon la formule suivante (Cacho et *al.*, 2008).

$$HOMA - IR = \frac{Insuline \left(\frac{\mu UI}{L} \right) * Glycémie \left(\frac{mg}{dl} \right)}{2430}$$

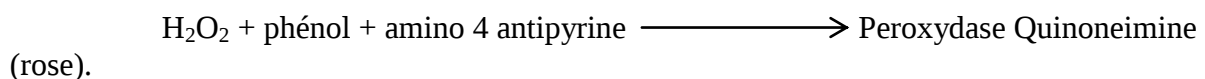
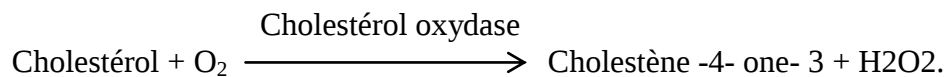
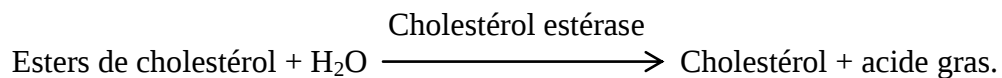
➤ Dosage du profil lipidique

○ Cholestérol total

Dans notre étude, le cholestérol a été déterminé suivant une méthode enzymatique colorimétrique.

✓ Principe

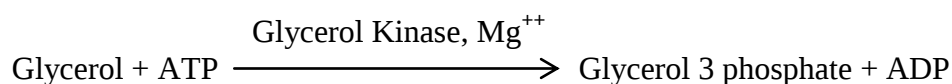
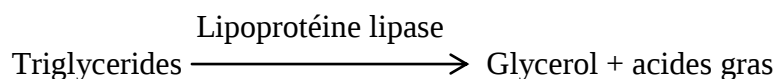
Après hydrolyse enzymatique puis oxydation, l'indicateur quinoneimine formé à partir du peroxyde d'hydrogène et d'amino 4 antipyrine en présence du phénol et de peroxydase permet la quantification du cholestérol selon la réaction suivante :

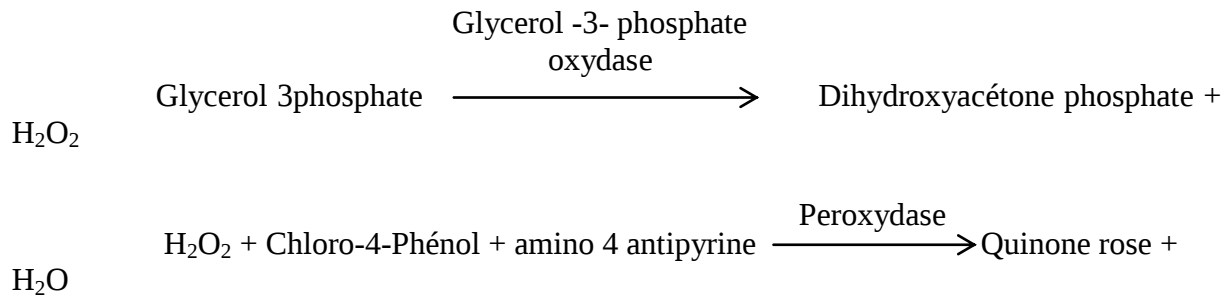


○ Dosage des triglycérides

✓ Principe

Le dosage des triglycérides a été effectué suivant une méthode enzymatique colorimétrique quantifiant le glycérol libéré après action de la lipase selon les réactions suivantes :





○ Dosage du HDL-c

✓ Principe

Le dosage du HDL-c s'effectue après précipitation grâce au réactif phosphotungstique associé au chlorure de magnésium (ref.T01-2801-56, 6×5ml) qui consiste à précipiter les LDL et les VLDL. Le HDL cholestérol est alors dosé dans le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total.

○ Evaluation du LDL-c et VLDL-c

La formule de Friedewald (1972) permet de calculer le LDL-C à condition que les TG soient inférieurs à 3,5 g/L (4 mmol/L) et VLDL-c.

$$\begin{aligned}
 VLDL - c &= \frac{TG}{5} \\
 LDL - c &= CT - (HDL - c + VLDL - c)
 \end{aligned}$$

○ Evaluation du risque cardiovasculaire

Le risque cardiovasculaire a été évalué, en utilisant les formules suivantes :

- Indice cardiaque (CI) ou Ratio du risque cardiaque (CRR) (Kang et *al.*, 2004; Ikewuchi et Ikewuchi, 2009) :

$$CI = \frac{\text{Cholesterol total}}{HDL - c}$$

- Indice d'athérogénicité (AI) (Ikewuchi et Ikewuchi, 2009) :

$$AI = \frac{\text{Cholesterol total} - HDL - c}{HDL - c}$$

- Indice d'artère coronaire (CAI) (Kayamori et Igarashi, 1994) :

$$CAI = \frac{LDL - c}{HDL - c}$$

➤ Détermination des lipides totaux

Pour la quantification des lipides totaux, des portions de foie pré-pesées sont immergées dans le mélange d'extraction (chloroforme/méthanol: 2V/ 1V) selon la méthode de Folch et *al.*, (1957).

Après homogénéisation, filtration, lavage et centrifugation, les lipides sont récupérés par élimination de la phase hydrosoluble. Dans des flacons en verre pré-pesés sont mis à évaporation à sec dans l'étuve. Les lipides totaux sont appréciés par la différence de pesée de la tare.

➤ Détermination des lipides hépatiques

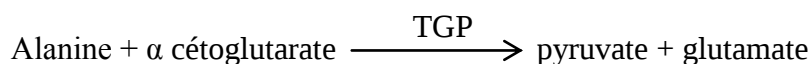
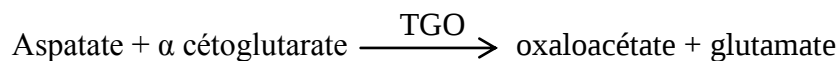
Un fragment de foie (100 mg/ mL) est homogénéisé dans 50 mM tampon phosphate (pH 7.4). L'homogénat est centrifugé à 10.000 trs/min pendant 15 min à 4° C. Sur le surnageant, le cholestérol total, triglycéride et HDL-c ont été analysés par les méthodes colorimétriques enzymatiques décrites précédemment.

➤ Dosage de la fonction hépatique

○ Dosage de TGO et TGP sérique

✓ Principe

Les transaminases sont déterminées par une méthode colorimétrique, selon les réactions suivantes :



Le pyruvate et l'oxaloacétate formés réagissent avec 2,4 DNPH pour former leur dérivé 2,4 dinitrophénylhydrazones, qui donne en milieu alcalin une coloration lisible à 505 nm et proportionnelle à l'activité TGO et TGP dans le milieu réactionnel.

○ **Phosphatase alcaline (Alk-p)**

✓ **Principe**

Détermination cinétique de l'activité phosphatase alcaline est réalisée, selon la réaction suivante :



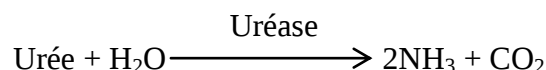
En milieu alcalin, les phosphatases alcalines catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p- nitrophénol et phosphate. La vitesse d'apparition du p-nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité Alk-p dans l'échantillon.

➤ **Le Bilan rénal**

○ **Dosage de l'urée**

✓ **Principe**

L'urée est dosée en cinétique par une méthode enzymatique (Berthelot, 1998) selon la réaction suivante :



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

➤ **Dosage de la créatinine**

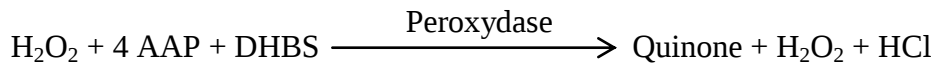
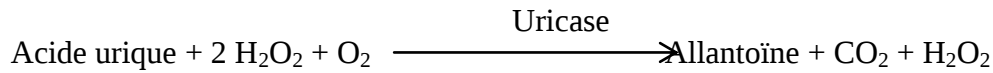
✓ **Principe**

La créatinine est dosée selon une méthode cinétique colorimétrique, elle forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine.

➤ Dosage de l'acide urique

✓ Principe

L'acide urique est dosé par une méthode enzymatique colorimétrique (Schultz, 1984), selon les réactions suivantes :



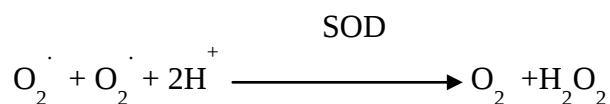
3.2. Paramètres du stress oxydant

La concentration de la superoxyde dismutase (SOD) (McCord et *al.*, 1969), de la glutathion peroxydase (GPx) (Paglia et Valentine, 1967), la glutathion réductase (Goldberg et Spooner, 1983) et le statut antioxydant total (TAS) (Miller et *al.*, 1983) a été évaluée par spectrophotométrie UV/visibles (réactifs Randox).

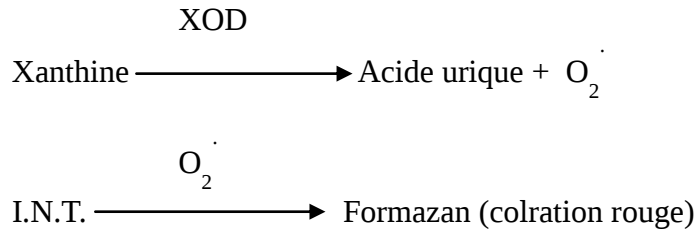
➤ La superoxyde dismutase (SOD)

✓ Principe

Le rôle de la SOD est d'accélérer la dismutation du radical superoxyde toxique ($\text{O}_2^\cdot$), produit durant les processus énergétiques oxydatifs, en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène moléculaire.



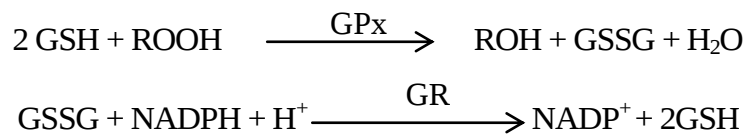
La méthode du dosage de la SOD utilise la xanthine et la xanthine oxydase (XOD) pour générer les radicaux superoxydes qui réagissent avec 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) pour former une structure de couleur rouge qui est le formazan. L'activité de la SOD est mesurée par le degré de l'inhibition de la réaction.



➤ Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

✓ Principe

Le dosage de la GPx est basé sur une méthode colorimétrique enzymatique décrite par Paglia et Valentine, (1967). La GPx catalyse l'oxydation du glutathion (GSH) par Cumene hydroperoxyde. Dans la présence du glutathion reductase et NADPH, glutathion oxydé (GSSG) est convertie immédiatement en glutathion réduit et NADPH est oxydé en NADP⁺. Selon les réactions suivantes:



➤ Dosage de la glutathion réductase (GRx)

✓ Principe

La glutathion reductase catalyse la réduction du glutathion (GSSG) en présence de NADPH, qui va s'oxyder en NADP⁺. Selon la réaction suivante:



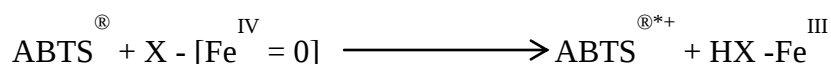
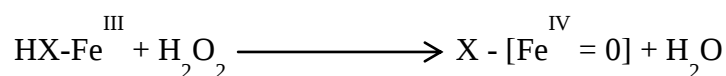
➤ Le Statut Total des Antioxydants (TAS)

✓ Principe

Le dosage du TAS est basé sur une méthode colorimétrique enzymatique décrite par Miller et *al.*, (1993). Le TAS est déterminé selon les réactions suivantes :

ABTS® (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) est incubé avec la peroxydase (metmyoglobin) et l'H₂O₂ pour produire le cation radical ABTS®^{*±}. Cette réaction conduit à l'apparition d'une couleur finale stable bleue-verte, qui est mesurée à 600

nm. Les antioxydants contenus dans l'échantillon provoquent la suppression de la couleur finale, à un degré proportionnel à leur concentration.



Dont :

$\text{HX-Fe}^{\text{III}}$: Metmyoglobine.

$\text{X - [Fe}^{\text{IV}} = \text{O}]$: Ferrylmyoglobine.

➤ Dosage des lipides peroxydés par la méthode TBARS au niveau sérique et hépatique

✓ Préparation de l'homogénat hépatique

200 mg de foie sont additionnés à 1 ml du tampon (50 mM NaCl, 20 mM NaH_2PO_4 , 2 H_2O , 20 mM Na_2HPO_4 , 12 H_2O , pH 4) en présence de l'acide perchlorique (5 μl). Puis, broyer. L'homogénat est centrifugé à 10.000 trs/min pendant 15 min à 4° C. Le surnageant est utilisé pour le dosage du MDA.

✓ Principe

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit de peroxydation lipidique, au cours de laquelle sont formées d'autres entités radicalaires connues sous le nom TBARS (Figure 20).

En milieu acide et chaud (pH 2 à 3, 95 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose qui peut être mesuré par spectrophotométrie. La quantité de lipides peroxydés d'un échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe étalon de MDA. Cette technique permet de mesurer la peroxydation lipidique de façon globale.

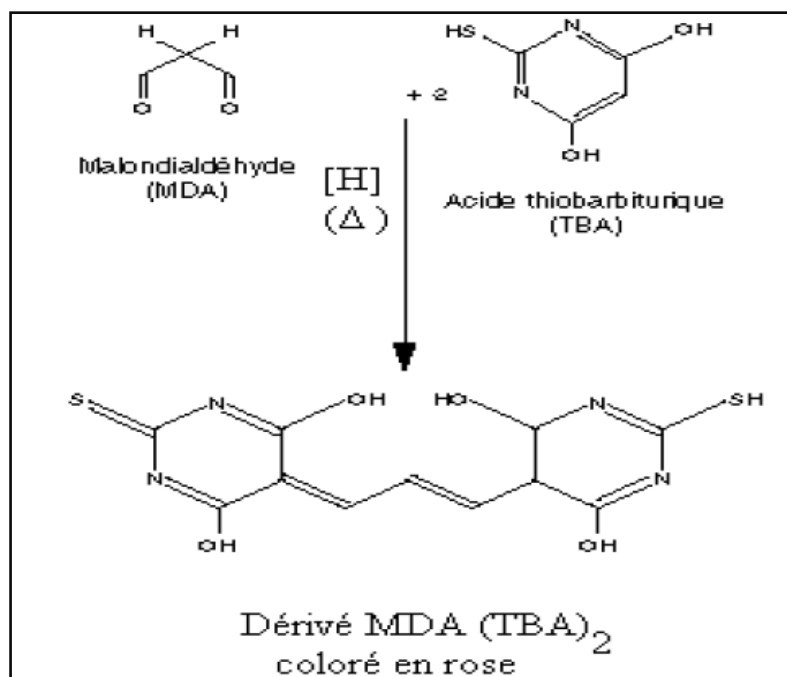


Figure 20 : Principe du dosage du malondialdéhyde

✓ Mode opératoire

Le dosage du MDA dans le plasma et dans l'homogénat de foie est réalisé selon la méthode de Quintanilha et *al.*, (1982).

Les échantillons sont incubés en présence d'un mélange de TBA à 0.37 %, TCA à 15 % et HCl à 0.25 N à 80°C pendant 30 mn. Les fonctions aldéhydes du MDA, libérées par l'hydrolyse acide à chaud, réagissent avec le TBA pour obtenir un complexe de couleur rose (MDA-TBA). Après refroidissement et centrifugation, la quantification du complexe est effectuée par spectrophotométrie à 540 nm.

La concentration de MDA est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec 1, 1, 3,3 tétraétoxypropane (0 à 10 μ M) qui est donné après son hydrolyse en solution (figure 60, Annexe 5). Les résultats du dosage sont exprimés en nmol/gramme de foie et nmol/gramme de protéines.

➤ Dosage des oligoéléments

Le dosage des oligoéléments ou minéraux de traces a été réalisé sur un automate de type *PERKIN ELMER 300* au four à graphite (Perkin Elmer Analyst 800®) sur sang total préalablement minéralisé à l'acide nitrique 69%, selon la méthode décrite par Arnaud et *al.*, (1986).

L'analyseur mesure la concentration des oligoéléments par la méthode de spectrophotométrie SAA. Ce dernier se base sur l'absorption de radiations atomiques en phase vapeur (Figure 21). En utilisant un spectrophotomètre d'AA qui passe par les étapes suivantes :

- Source lumineuse (lampe à cathode creuse) qui émet une lumière continue (sélectivement des raies) correspondant à l'élément à doser.
- Atomiseur (source de vapeur atomique) qui peut être une flamme (cuivre) ou un four en graphite « électrothermique » (manganèse). Au cours de l'atomisation l'échantillon à analyser est nébulisé dans la partie réductrice d'une flamme large. Les molécules organiques sont détruites et les éléments minéraux sont en partie réduits à l'état d'atomes. Ces éléments excités absorbent les photons de la raie de résonance spécifique choisie.
- Monochromateur (fixé sur λ) qui amplifie le signal d'absorption en éliminant le signal électrique dû aux radiations émises par la flamme.
- Détecteur atomique.

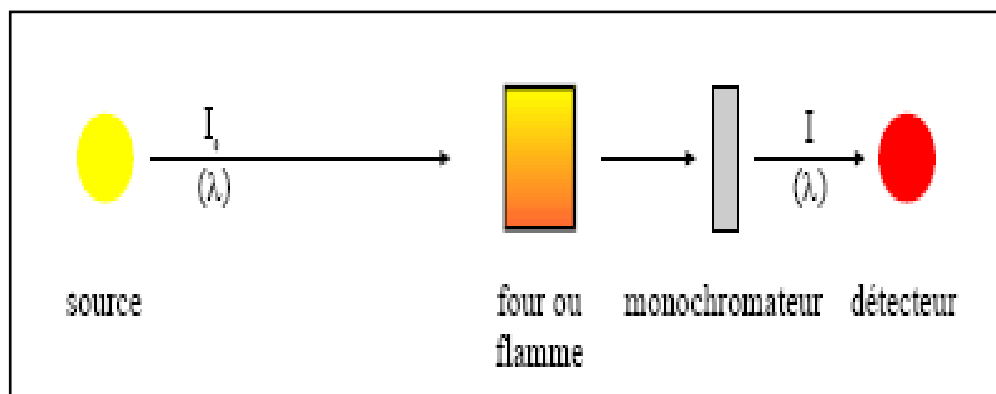


Figure 21 : Le principe de dosage des oligoéléments

○ Cuivre (Cu)

✓ Principe

Le cuivre est dosé par la SAA-flamme. Les échantillons passent directement dans la flamme à travers le nébuliseur après les avoir dilués à un demi. L'analyseur type *PERKIN ELMER 300* utilise une lampe à cuivre de type HCL (*Hollow Cathode Lamp*), une fente de 0.7 nm, une longueur d'onde de 324.8 nm ainsi qu'un mode de lecture type absorbance. Une gamme étalon est préparée manuellement avant leur aspiration par le nébuliseur (Tableau XII).

Tableau XII : Solutions étalon di dosage du cuivre par SAA

Standard	blanc	0.3 (mg/L)	0.4 (mg/L)	0.5 (mg/L)	0.6 (mg/L)	0.7 (mg/L)
Solution de cuivre à 100 (mg/L)	0	300	400	500	600	700
Eau désionisée+glycéron à 10%	100	99.70	99.60	99.50	99.40	99.30

○ **Manganèse (Mn)**

✓ **Principe**

Le manganèse est dosé par la SAA-four. Les échantillons sont injectés dans le four d'atomisation suite à une minéralisation. L'analyseur type *PERKIN ELMER 800* utilise une lampe à cathode de Manganèse avec une fente de 2 nm, une longueur d'onde de 313.9 nm ainsi qu'un mode de lecture type absorbance. L'analyseur établit les concentrations plasmatiques du manganèse à partir de 5 µl du modificateur de matrice de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ [0.008 mg de Ni+0.012 mg de $(NO_3)_2$] et 20 µL à chaque point de la gamme étalon (4, 10, 20 ppm).

○ **Chrome (Cr)**

✓ **Principe**

Le chrome est dosé par la SAA-four. Les échantillons sont injectés dans le four d'atomisation suite à une minéralisation. L'analyseur type *PERKIN ELMER 800* utilise une lampe à cathode de chrome avec une fente de 2 nm, une longueur d'onde de 196 nm ainsi qu'un mode de lecture type absorbance. L'analyseur établie les concentrations plasmatiques du chrome à partir de 5 µl du modificateur de matrice de nitrate de Magnésium $Mg(NO_3)_2$ [0.008 mg de Ni+0.012 mg de $(NO_3)_2$] et 20 µl à chaque point de la gamme étalon (2, 5, 10 ppm). L'analyseur type *PERKIN ELMER 800* établie automatiquement les concentrations du chrome des échantillons et donne les résultats lus sur écran et qui sont exprimés en (µg/mL).

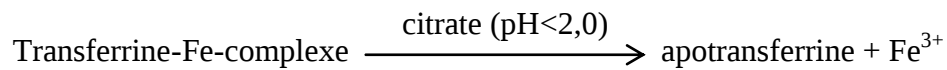
3.3. Statut martial

Il est important d'évaluer le statut martial dans le stress oxydant car ce dernier peut résulter d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (la ferritine et la transferrine) (Atta et El-Kady, 2010).

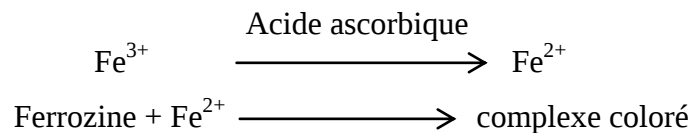
○ Dosage du Fer sérique

✓ Principe

Le fer sérique a été mesuré par colorimétrie à la ferrozine (automate Roche Hitachi).
A pH 4.8 le fer ferrique (Fe^{3+}) est libéré instantanément de la transferrine. Selon la réaction suivante :



Après, l'acide ascorbique réduit le Fe^{3+} en fer ferreux (Fe^{2+}). La ferrozine forme avec le fer ferreux, un complexe coloré, mesurable à 570 nm.



○ Dosage de la ferritine

✓ Principe

La ferritine a été évaluée par immunoturbidimétrie, selon la réaction suivante (Figure 22) :

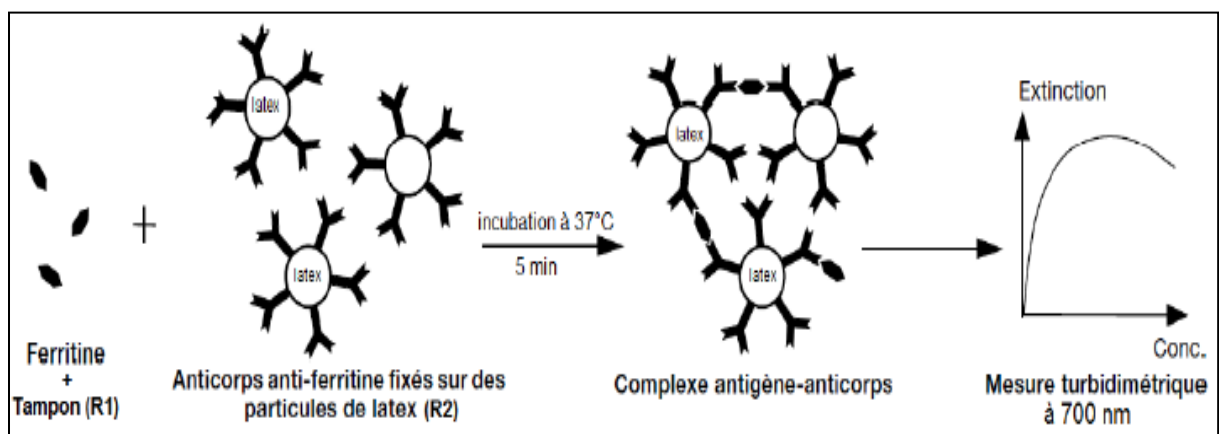
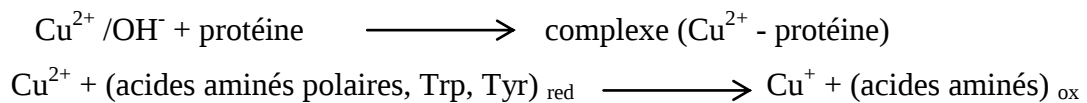


Figure 22 : le principe de dosage de la méthode immunoturbidimétrie

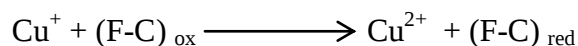
3.4. Dosage des protéines

Les protéines totales sont dosées par la méthode de Lowry et *al.*, 1951. Cette technique couple les réactions impliquées dans la méthode de Biuret avec une 2^{ème} réaction redox (couleur).

- Complexation d'ions Cu^{2+} avec les atomes d'azote des liens peptidiques de la protéine dans des conditions de pH alcalin. Le Cu^{2+} est ainsi réduit au Cu^+ :



- Les ions Cu^+ et les radicaux du Trp, Tyr et Cys réduisent le complexe acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique (couleur jaune) contenu dans le réactif Folin-Ciocalteu ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{Na}_2\text{WO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$), produisant ainsi une couleur bleue.



La concentration des protéines est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec BSA (0 à 10 μM) (Figure 59, Annexe 5).

4. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au service d'anatomopathologie au niveau de l'hôpital Mustapha Pacha, Alger. La technique utilisée est celle décrite par Martoja et Martoja, (1967), qui comporte les étapes suivantes :

✓ Fixation

Elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après décapitation des rats et prélèvement des organes. Des fragments de foie ont été mis dans le fixateur (réactif du Bouin), il permet de durcir l'échantillon sans l'abimer. Après 07 jours de fixation, les pièces sont retirées du Bouin

puis rincées à l'eau courante (48 heures). Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées.

✓ **Déshydratation**

Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation. On assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 90 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence.

Le xylène s'évapore à partir des pièces anatomiques préalablement mises dans l'étuve à 60°C, pendant 12 heures.

✓ **Inclusion et réalisation des blocs**

Elle ne peut être satisfaisante que si l'échantillon est complètement déshydraté et ne contient plus de solvant intermédiaire (alcool). Les pièces sont plongées (2 heures) dans des bains de paraffine liquide fondue à 60°C. Les échantillons étant imbibés de paraffine sont placés dans des moules spécifiques, puis sont remplis de paraffine. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » renfermant un réservoir de paraffine maintenu à l'état liquide par un système de chauffage. Un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour aboutir à la solidification rapide (10 à 15 min) du bloc de paraffine contenant le tissu.

✓ **Confection des coupes**

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

✓ Coloration au trichrome de masson

Elle permet de mettre en évidence les structures tissulaires et cellulaires. Les coupes sont colorées par : Le trichrome de masson. Les coupes sont observées au microscope optique (Leica) à différents grossissements (Obj. $\times 10$, Obj. $\times 40$ et Obj. $\times 100$).

5. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (standard error of the mean). L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test t de Student. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p :

* $p \leq 0.05$, HFD vs C;

** $p \leq 0.01$, HFD vs C;

+ $p \leq 0.05$, traités vs HFD;

++ $p \leq 0.01$, traités vs HFD.

Le calcul statistique est réalisé par IBM SPSS Statistics 20.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

RESULTATS

Les résultats obtenus sont consignés dans cette partie.

I. Screening phytochimique

1. Les tests qualitatifs

Les résultats de l'analyse qualitative préliminaire des différents vinaigres (Grenade, Figue de barbarie et Pomme) sont indiqués dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Composition phytochimique des 3 vinaigres de fruits

Métabolites secondaires	Les réactifs	Le vinaigre de grenade	Le vinaigre de figue de barbarie	Le vinaigre de pomme
Tannins	FeCl ₃	+++	ND	+
Flavonoïdes	Mg ⁺⁺	+++	+	++
Alcaloïdes	Mayer	+	ND	+
	Wagner	+	ND	+
Saponosides		+++	++	+++
Triterpènes	Chloroforme acide sulfurique	+++	++	+++
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	+++	ND	++
Quinones	NaOH	ND	ND	ND
Anthocyanes	Ammoniaque	ND	ND	+

+++ : Fortement positif; ++ : Moyennement positif; + : Faiblement positif; ND : non déterminé.

Les tests phytochimiques qualitatifs ont montré que le vinaigre de grenade est très riche en tannins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, triterpènes et les composés réducteurs. De même, nous avons enregistré que le vinaigre de pomme est riche en saponosides, triterpènes, flavonoïdes, les tannins, les alcaloïdes et les composés réducteurs. Par contre, le vinaigre de figue de barbarie ne contient que les tannins, les saponosides et les triterpènes.

2. Les tests quantitatifs

2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur des composés phénoliques des différents types de vinaigres ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage $r^2 = 0.99$ (Figure 41, Annexe 2) et exprimée en milligrammes équivalent acide gallique par millilitre du vinaigre (mg EAG/mL), les résultats sont illustrés dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Teneurs en polyphénols totaux des 3 vinaigres

Vinaigres de fruits	Polyphénols totaux (mgEAG/mL)
Vinaigre de grenade	37,90 ± 0,33
Vinaigre de figue de barbarie	28,76± 0,14
Vinaigre de pomme	33,06± 0,06

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3).

Les résultats du dosage de polyphénols révèlent que le vinaigre de grenade contient la teneur la plus élevée de 37,90±0.33 mg EAG/mL, suivie par le vinaigre de pomme et le vinaigre de figue de barbarie avec 33,06± 0,06 et 28,76± 0,14 mg EAG /mL, respectivement.

2.2. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes (la quercétine comme standard) montre une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde (1 à 20 µg/mL) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0.99$ (Figure 42, Annexe 2). Le tableau XVI représente les différentes concentrations des vinaigres en flavonoïdes.

Tableau XVI: Teneurs en flavonoïdes des 3 vinaigres

Vinaigres de fruits	Flavonoïdes (mg EQ/mL)
Vinaigre de grenade	6,86± 0,03
Vinaigre de figue de barbarie	3,87 ± 0,02
Vinaigre de pomme	4,60± 0,36

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3).

Selon le tableau XV, les teneurs en flavonoïdes varient dans les mêmes proportions que celles des polyphénols : le vinaigre de grenade est le plus riche en flavonoïdes (6,68±0,03 mg EQ/mL) suivie du vinaigre de pomme (4,60 ± 0,36 mg EQ/mL) et enfin le vinaigre de figue de barbarie avec 3,87 ± 0,02 mg EQ/mL.

3. Mesure du pH et de l'acidité titrable

Les résultats de pH et de l'acidité titrable sont présentés dans le tableau XVII.

Tableau XVII: Les valeurs du pH et du pourcentage de l'acidité titrable

	pH	Acidité titrable (%)
Vinaigre de grenade	2,95± 0,0033	0,98± 0,01
Vinaigre de figue de barbarie	3,24 ± 0,0033	0,31 ± 0,02
Vinaigre de pomme	3,28±0,0066	0,73± 0,06

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3).

Le vinaigre de grenade a le pH et l'acidité titrable les plus élevés (2,95± 0,0033 et 0,98± 0,01%, respectivement) par rapport au vinaigre de pomme (3,28 ± 0,0066 et 0,73±0,06%, respectivement) et le vinaigre de figue de barbarie (3,24±0,0033 et 0,31±0,02%, respectivement).

4. Identification des acides organiques par HPLC

L'identification des acides organiques par HPLC se caractérise par 6 principaux pics dans le vinaigre de grenade (figure 49, Annexe 3), 4 pics dans le vinaigre de figue de barbarie (figure 50, Annexe 3) et dans le vinaigre de pomme (figure 51, Annexe 3). Le tableau XVIII illustre les différents acides organiques présentent dans les trois types des vinaigres.

Table XVIII : Identification des acides organiques par HPLC

Acides organiques (mg/mL)	Vinaigre de grenade	Vinaigre de figue de barbarie	Vinaigre de pomme
Acide oxalique	1,13	2,21	0,51
Acide formique	0,56	n.d.	n.d.
Acide ascorbique	0,52	0,19	0,14
Acide acétique	0,031	0,15	0,05
Acide citrique	4,55	0,84	0,13
Acide malique	0,02	n.d.	n.d.

Les résultats présentés dans le tableau XVII montrent que tous les vinaigres contiennent l'acide oxalique, l'acide ascorbique, l'acide acétique, et l'acide citrique. La concentration la plus élevée en acide acétique est détectée dans le vinaigre de figue de barbarie (0,15 mg/mL), celle du vinaigre de pomme est de 0,05 mg/mL et puis celle du vinaigre de grenade est de 0,031 mg/mL. Les acides formique et malique sont identifiés uniquement dans le vinaigre de grenade. Les concentrations les plus élevées des acides ascorbique et citrique sont notées dans le vinaigre de grenade (0,52 mg/mL et 4,55 mg/mL, respectivement) suivie par, celles du vinaigre de figue de

barbarie (0.19 mg/mL et 0.84 mg/mL, respectivement) et le vinaigre de pomme (0,14 mg/mL et 0,13 mg/mL, respectivement) (Tableau XVIII).

5. Identification des acides phénoliques par HPLC

Le tableau XIX illustre les différents acides phénoliques contenant dans les différents types du vinaigre. L'identification des acides phénoliques se caractérise par 4 pics dans le vinaigre de grenade (figure 57, Annexe 4) et de pomme (figure 59, Annexe 4), 3 pics dans le vinaigre de figue de barbarie (figure 58, Annexe 4).

Tableau XIX: Identification des acides phénoliques dans les vinaigres

Acides phénoliques (mg/mL)	Vinaigre de grenade	Vinaigre de figue de barbarie	Vinaigre de pomme
Acide gallique	12,00	2,27	8,52
Acide caffeique	20,64	17,46	4,67
Vanilline	20,74	n.d.	53,52
Acide benzoïque	97,59	13,20	n.d.
Acide salicylique	n.d.	n.d.	2,37

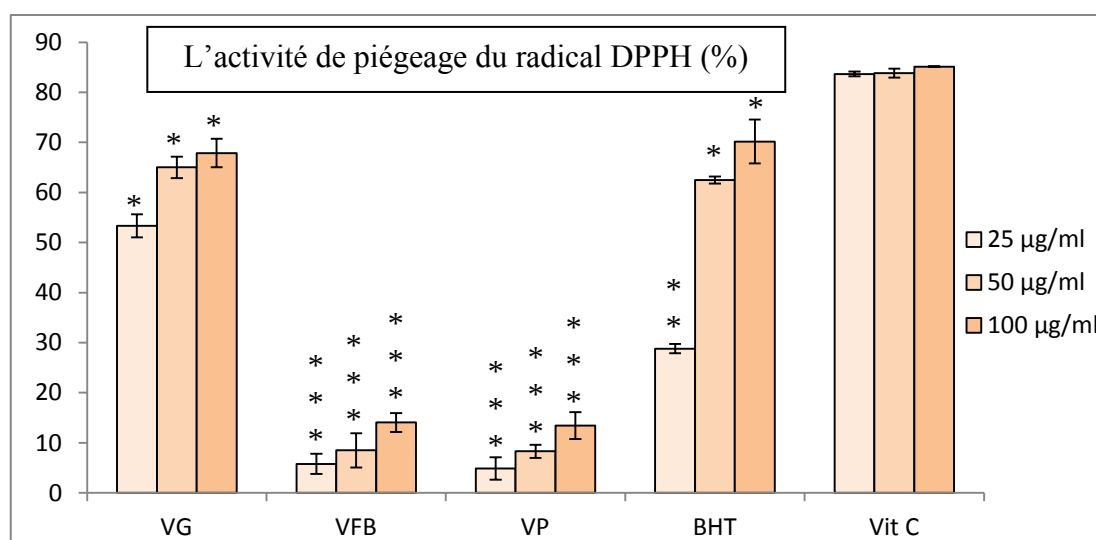
Le tableau XIX montre que la concentration la plus élevée en acide gallique est détectée dans le vinaigre de grenade (12 mg/mL) suivie par celle du vinaigre de pomme (8,52 mg/mL) et le vinaigre de figue de barbarie (2,27 mg/mL) seul. L'acide salicylique est identifié que dans le vinaigre de pomme. La teneur la plus élevée de l'acide caffeique est notée dans le vinaigre de grenade (20,64 mg/mL) suivie par celle du vinaigre de figue de barbarie (17,64 mg/mL) et le vinaigre de pomme (4,67 mg/mL).

6. Evaluation de l'activité biologique des vinaigres

6.1. Activité de piégeage du radical DPPH

La comparaison entre les valeurs EC_{50} et l'activité antioxydante exprimées comme la TEAC, le FRAP et l'ORAC, prouve que la méthode de DPPH reflète les résultats obtenus avec les différentes approches expérimentales (Romani et *al.*, 2012).

Les différentes teneurs de l'activité de piégeage du radical libre des vinaigres étudiés comparés à ceux du BHT et la vitamine C sont reportées dans la figure 23.



VG : vinaigre de grenade, VFB: vinaigre de figue de barbarie, VP: vinaigre de pomme, BHT : Butyl hydroxy toluène, Vit C: vitamine C.
Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=03). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; vs vitamine C.

Figure 23: Activité de piégeage du radical libre par les vinaigres, du BHT, et de la vitamine C

La vitamine C montre le pouvoir de piégeage le plus élevé parmi les autres antioxydants. A une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$, il inhibe complètement le radical stable DPPH (85,15%). Cependant, le BHT montre un pouvoir de piégeage le plus faible par rapport au vinaigre de grenade. Quant aux autres vinaigres (figue de barbarie et pomme), ils sont caractérisés par un pouvoir de piégeage faible : 14,05% d'inhibition pour le vinaigre de figue de barbarie et 13,43% d'inhibition pour le vinaigre de pomme à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$. L'activité de piégeage du radical DPPH des vinaigres et des standards suit l'ordre suivant :

Acide ascorbique > vinaigre de grenade > BHT > vinaigre de figue de barbarie > vinaigre de pomme (Figure 23).

Le tableau XX montre les concentrations d'inhibition à 50% des vinaigres de fruits, du BHT et de la vitamine C.

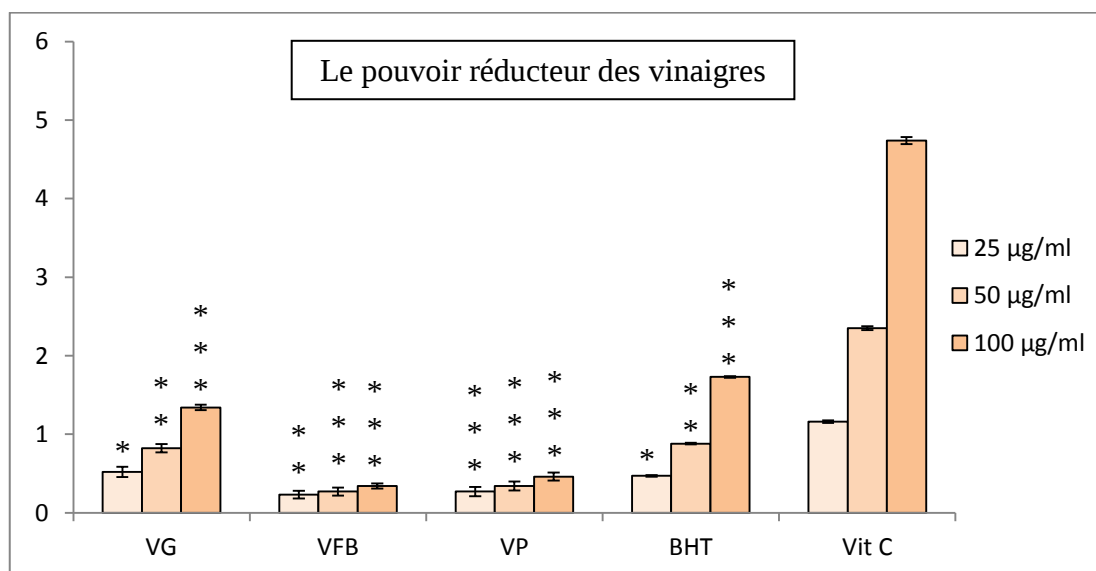
Tableau XX : IC 50 de trois vinaigres de fruits, du BHT et de la vitamine C

	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Le vinaigre de grenade	23,5
Le vinaigre de figue de barbarie	----
Le vinaigre de pomme	----
Le BHT	43,5
La vitamine C	15

Les résultats obtenus révèlent que l'activité de piégeage du radical libre DPPH de vinaigre de grenade est importante ; elle est supérieure à celle du BHT et inférieure à celle de la vitamine C (Tableau XX).

6.2. Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'un composé sert d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Deepa et *al.*, 2009; Kanatt et *al.*, 2010). Il est utilisé pour déterminer la capacité des antioxydants à donner l'électron et il est l'une des caractéristiques principales des composés phénoliques (Velioglu *etal.*, 1998; Dorman et *al.*, 2003). Les résultats du pouvoir réducteur exprimés en absorbances en fonction de la concentration sont indiqués dans la figure 24.



VG : vinaigre de grenade, VFB: vinaigre de figue de barbarie, VP: vinaigre de pomme, BHT : Vit C: vitamine C. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=03). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$; vs vitamine C.

Figure 24 : Pouvoir réducteur des différents vinaigres étudiés, BHT et de la vitamine C

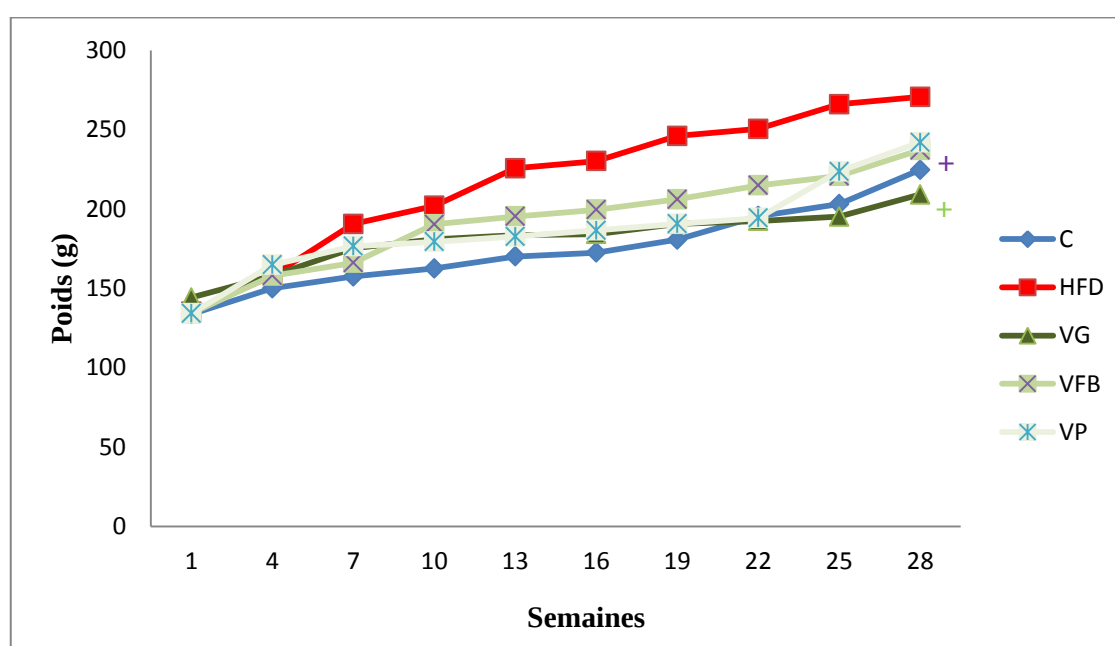
Il est relevé que tous les composés (vitamine C, BHT et les trois vinaigres de fruits) montrent un certain degré de pouvoir réducteur. Cependant, le pouvoir réducteur des vinaigres et du BHT est inférieur à celui de la vitamine C, qui est connu pour être un fort agent réducteur (Zou et *al.*, 2006). A 25 µg/ml, le vinaigre de grenade a un pouvoir réducteur plus élevé (0,52) que le BHT (0,47) et les deux autres vinaigres (figue de barbarie et pomme). Puis, aux concentrations (50 à 100 µg/mL), le BHT a un pouvoir réducteur plus grand que celui des vinaigres (Figure 24).

II. Expérimentation animale

1. Evolution pondérale

1.1. Influence des vinaigres de fruits sur la croissance corporelle

Cette étude est consacrée à évaluer l'effet préventif de trois vinaigres de fruits (riches en polyphénols) chez les rats wistar rendus dyslipidémiques par le régime hypergras. La figure 25 montre la variation du poids corporel des rats contrôles, dyslipidémiques et traités pendant 7 mois.



C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme.

Chaque point représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). * $p \leq 0.05$, HFD vs C; ** $p \leq 0.01$, HFD vs C; + $p \leq 0.05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0.01$, traités vs HFD.

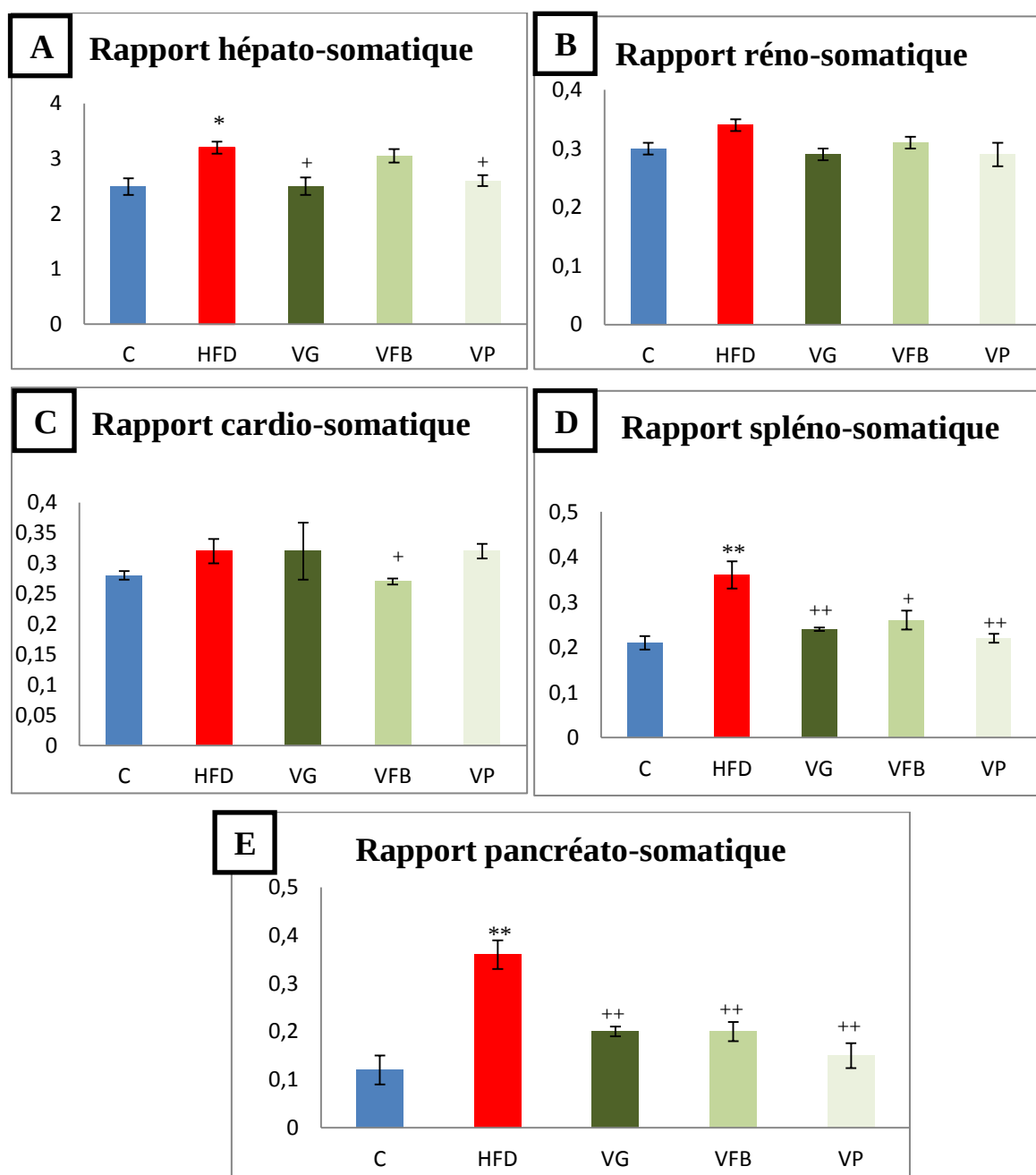
Figure 25: Evolution du poids corporel des rats contrôles, dyslipidémiques, et traités durant 28 semaines de traitement.

La variation du poids des rats constitue un paramètre très important. Le suivi régulier des animaux nous a amené à obtenir les valeurs relatives à la figure 27. On note une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du poids corporel des rats issus du lot 2 (HFD) par rapport au lot 1 (contrôle) ($270,56 \pm 5,81$ v $224,63 \pm 25,84$). Cependant, le vinaigre de grenade a empêché une prise de poids excessive comparativement au lot expérimental. Distinctement, une différence entre la croissance des rats dyslipidémiques, ceux du contrôle et des traités est notée. Nous observons une augmentation du poids corporel des rats dyslipidémiques, alors que ce gain

est prévenu chez les rats contrôle et traités. Le vinaigre de grenade et de figue de barbarie ont diminué significativement ($p \leq 0.05$) le poids corporel.

1.2. Influence des vinaigres de fruit sur les indices organo-somatiques (IOS)

La figure 26 illustre les différentes indices organo-somatiques des différents lots.



C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme.

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM ($n=10$). * $p \leq 0.05$, HFD vs C; ** $p \leq 0.001$, HFD vs C; + $p \leq 0.05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0.001$, traités vs HFD.

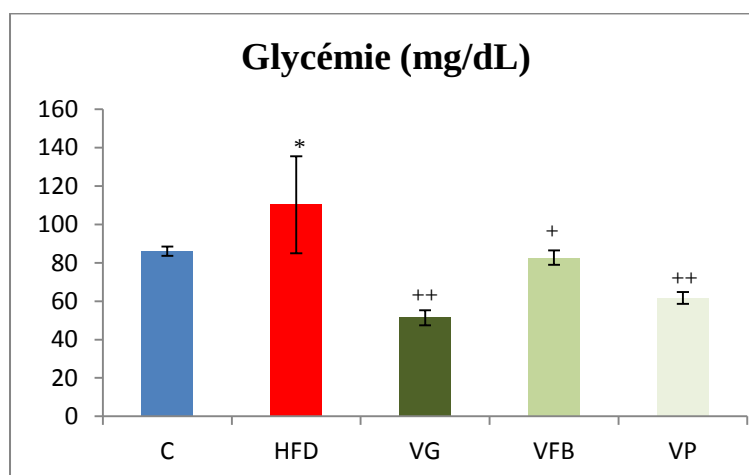
Figure 26 : Les variations des indices organo-somatiques chez les rats contrôle, dyslipidémique et traités pendant 07 mois.

Les IOS sont influencées par le régime hypergras dont ceux du foie (28,51%), du pancréas (98,5%), de la rate (71,43%), des reins (17%) en comparant avec ceux du lot contrôle. Cependant, le vinaigre de grenade et de pomme ont diminué significativement ($p \leq 0.05$) ces indices. En outre, les trois types du vinaigre ont prévenue très significativement ($p \leq 0.01$) l'indice pancréato-somatique.

2. Effet des vinaigres sur les paramètres biochimiques

2.1. Effet des vinaigres sur la glycémie

La figure 27 montre la glycémie des différents lots contrôle et expérimentaux à l'issue de l'essai 28 semaines.



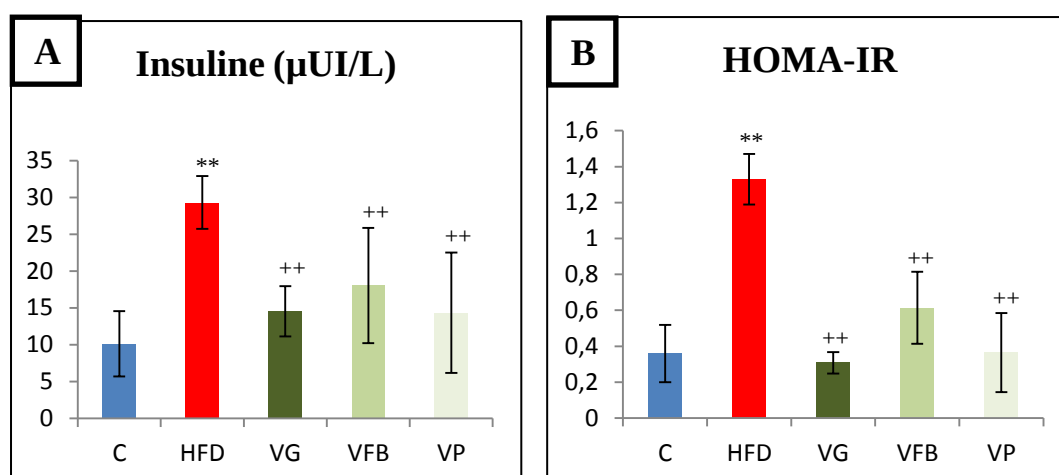
C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). * $p \leq 0,05$, HFD vs C, + $p \leq 0,05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0,01$, traités vs HFD.

Figure 27 : la glycémie des différents lots contrôle et expérimentaux durant 28 semaines.

Le groupe de rat dit dyslipidémique (HFD) montre une augmentation de la glycémie en moyenne de $110,26 \pm 25,21$ mg/dL par rapport au groupe contrôle ($86,07 \pm 2,49$ mg/dL), en déclenchant le début de l'installation du diabète type II. Pour le groupe traité avec le vinaigre de grenade, les résultats montrent une glycémie stable qui atteint des valeurs normales ($51,39 \pm 3,59$ mg/dL). Il en est de même, pour les rats traités par le vinaigre de pomme et de figue de barbarie ($61,73 \pm 3,08$ et $82,69 \pm 3,81$ mg/dL, respectivement).

2.2. Effet des vinaigres sur l'insulinémie et l'insulinorésistance

Les taux de l'insuline et de l'insulinorésistance sont illustrés dans la figure 28.



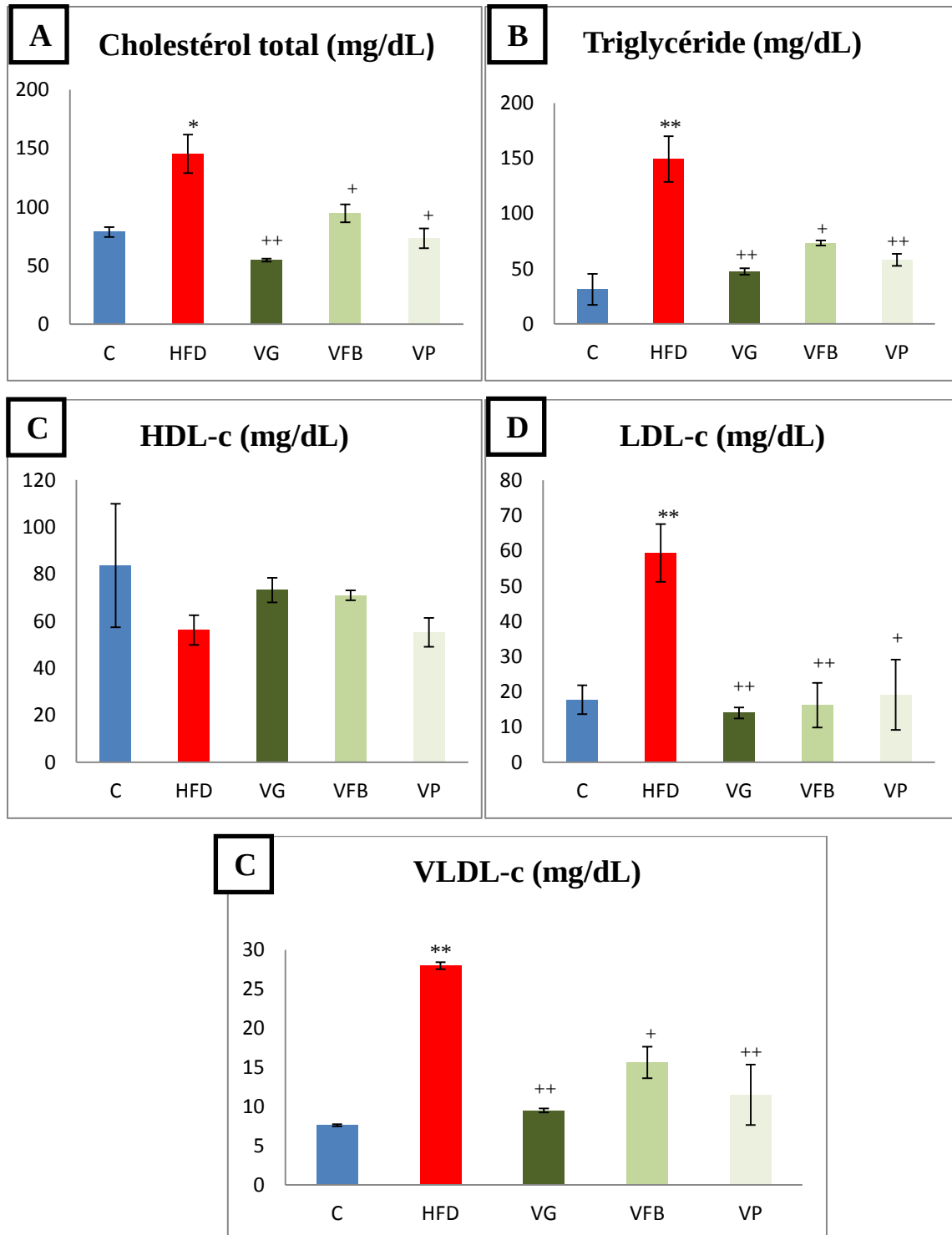
C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). ** $p \leq 0,01$, HFD vs C, ++ $p \leq 0,01$, traités vs HFD.

Figure 28 : Variations de l'insulinémie et de l'insulinorésistance chez les rats contrôles, dyslipidémiques et traités pendant 07 mois.

Le taux de l'insulinémie des rats dyslipidémiques sont significativement plus élevés ($p \leq 0,05$) comparés aux rats contrôle. La valeur moyenne de l'insulinorésistance est calculée par homeostasis model assessment (HOMA) est significativement ($p \leq 0,05$) supérieure chez les rats dyslipidémiques ($1,32 \pm 0,14$) comparés au groupe contrôle ($0,35 \pm 0,16$), et approximativement 2 à 4 fois supérieure à celle observée chez les rats traités par les vinaigres de grenade ($p \leq 0,05$), de figue de barbarie et de pomme. Les trois vinaigres de fruits agissent de façon similaire par leur action sur les taux de l'insuline et l'insulinorésistance.

2.3. Effet des vinaigres sur le profil lipidique au niveau sérique

La dyslipidémie constitue un facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires. Pour cette raison, le profil lipidique a été évalué au niveau sérique et hépatique (La figure 29).



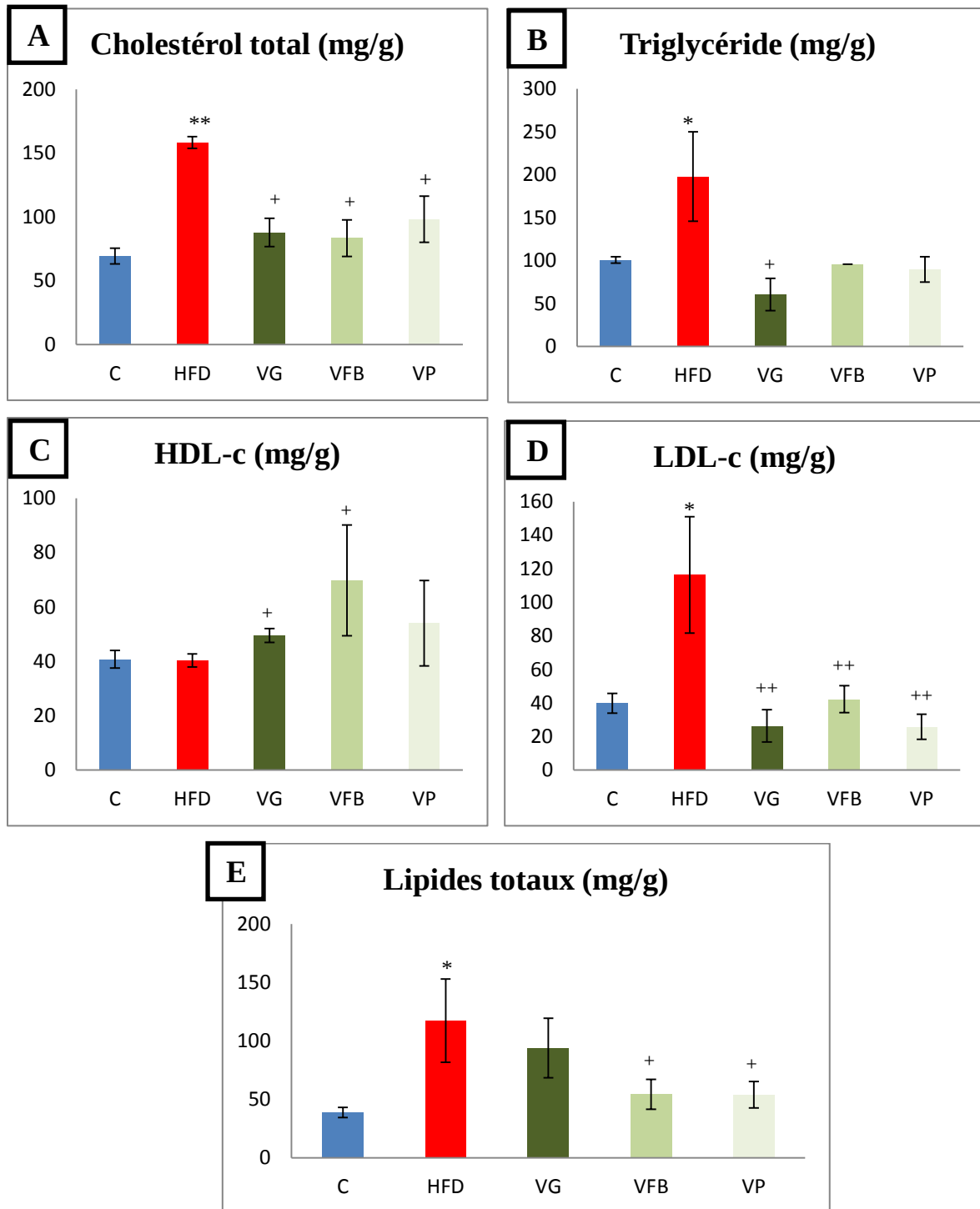
C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). ** $p \leq 0,01$, HFD vs C; + $p \leq 0,05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0,01$, traités vs HFD.

Figure 29 : Variations du bilan lipidique au niveau sérique chez les rats contrôles, dyslipidémiques et traités pendant 07 mois.

Les résultats présentés dans cette figure montrent que les concentrations plasmatiques du cholestérol total, triglycéride, et LDL-c sont significativement ($p \leq 0,05$) élevées chez le groupe dyslipidémique avec des pourcentages allant jusqu'à (84,84%, 37,62%, et 23,47%; respectivement) alors que le taux de HDL-c était plus bas (32,82%). Le traitement avec les vinaigres a significativement ($p \leq 0,05$) amélioré le profil lipidique en diminuant les concentrations de cholestérol total, triglycéride, et LDL-c. Tandis qu'on note une augmentation de HDL-c (30,33%) pour le vinaigre de grenade, (26%) pour le vinaigre de figue de barbarie, et (2%) pour le vinaigre de pomme.

2.4. Effet des vinaigres sur le profil lipidique au niveau hépatique

La figure 30 montre le profil lipidique au niveau hépatique. Nous remarquons que le régime hypergras a augmenté très significativement ($p \leq 0,01$) le cholestérol total et les triglycérides, et significativement ($p \leq 0,05$) LDL-c et les lipides totaux. En revanche, les vinaigres ont amélioré significativement ($p \leq 0,05$) le taux du cholestérol total, triglycérides, LDL-c, et les lipides totaux. Le vinaigre de figue de barbarie a augmenté le taux du HDL-c de 73%.



C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). * $p \leq 0.05$, HFD vs C; ** $p \leq 0.01$, HFD vs C; + $p \leq 0.05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0.01$, traités vs HFD.

Figure 30 : Les variations du bilan lipidique au niveau hépatique chez les rats contrôle, dyslipidémique et traités pendant 7 mois.

2.5. Evaluation du risque cardiovasculaire

Le lien entre dyslipidémie et les maladies cardiovasculaires est particulièrement bien établi. L'élévation du Cholestérol Total et du LDL-c est associée à une augmentation du risque cardiovasculaire de façon curvilinéaire. Une faible concentration de HDL-c peut être considérée comme un facteur de risque supplémentaire, alors qu'une concentration élevée de HDL-C est un facteur de protection (EHJ, 2006).

Du fait de cette relation inverse entre le risque cardiovasculaire et le LDL-c d'une part et le HDL-c d'autre part, il a été proposé d'utiliser plusieurs indices en tant que prédicateur de risque cardiovasculaire. Le tableau XX montre une estimation du risque cardiovasculaire des différents groupes.

Tableau XX : Estimation du risque cardiovasculaire des différents groupes après 28 semaines d'expérimentation.

	CI	AI	CAI
C	0,94 ± 0,16	0,55 ± 0,13	0,16 ± 0,03
HFD	1,58 ± 0,25 ^{**}	1,60 ± 0,16 ^{**}	0,71 ± 0,12 [*]
VG	0,74 ± 0,24 ⁺⁺	0,32 ± 0,02 ⁺⁺	0,16 ± 0,07 ⁺
VFB	1,33 ± 0,42	0,41 ± 0,09 ⁺⁺	0,23 ± 0,11 ⁺
VP	1,32 ± 0,56	0,60 ± 0,24 ⁺⁺	0,22 ± 0,13 ⁺

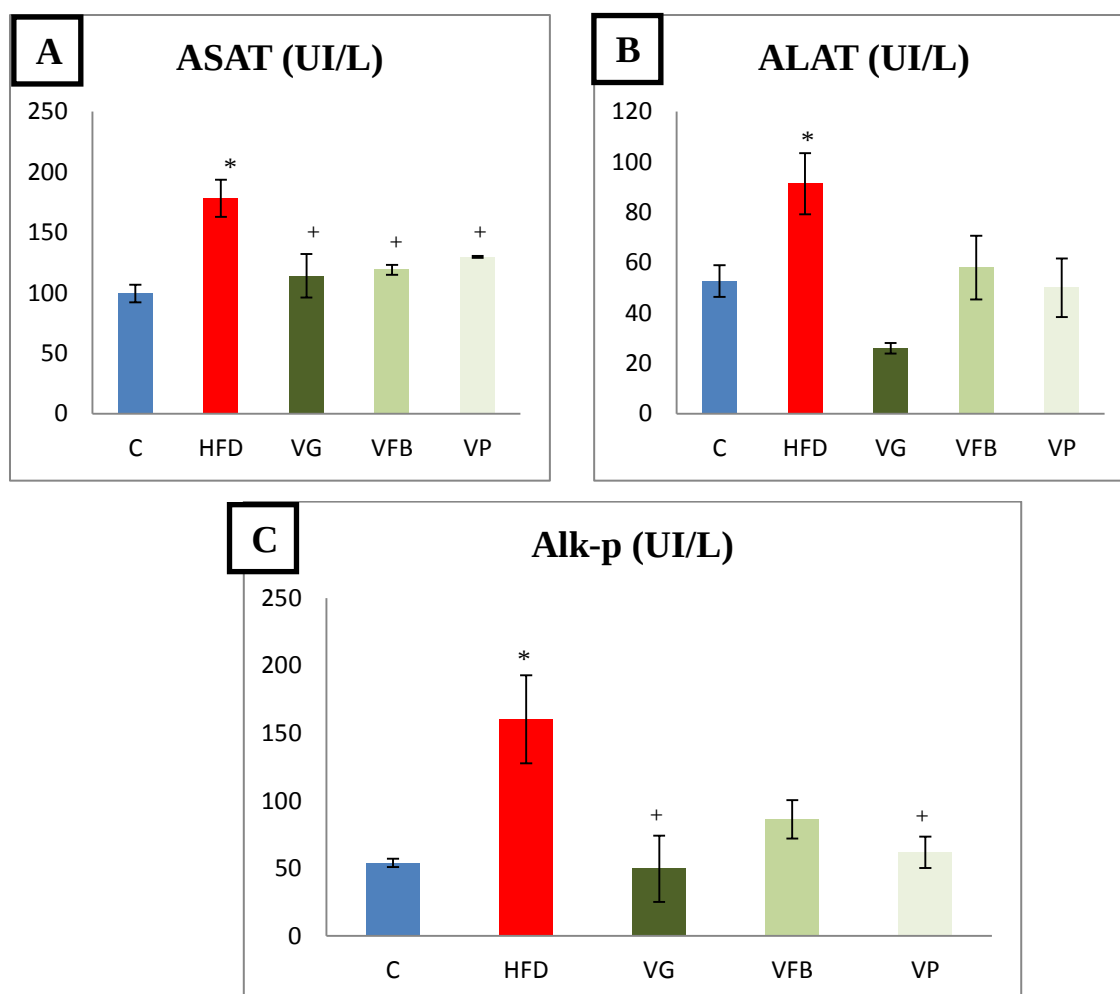
C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme.

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=10). * p≤0.05, HFD vs C; ** p≤0.01, HFD vs C; + p≤0.05, traités vs HFD; ++ p≤0.01, traités vs HFD.

Le régime hypergras a élevé très significativement (p≤0,01) le risque cardiovasculaire (Indice cardiaque, indice d'athérogénicité, et ratio du risque cardiovasculaire) vs contrôle. Cependant, le traitement par les vinaigres a corrigé significativement (p≤0,05) ces indices.

2.6. Effet des vinaigres sur la fonction hépatique

Les concentrations de la fonction hépatique (AST, ALT et Alk-p) sont présentées dans la figure 31. Le groupe dyslipidémique (HFD) présente une augmentation significative (p≤0.05) d'AST, ALT, et Alk-p avec 1,79, 1,73, et 3 fois respectivement. Cependant, les vinaigres de fruit ont amélioré significativement (p≤0,05) l'activité de ces enzymes.

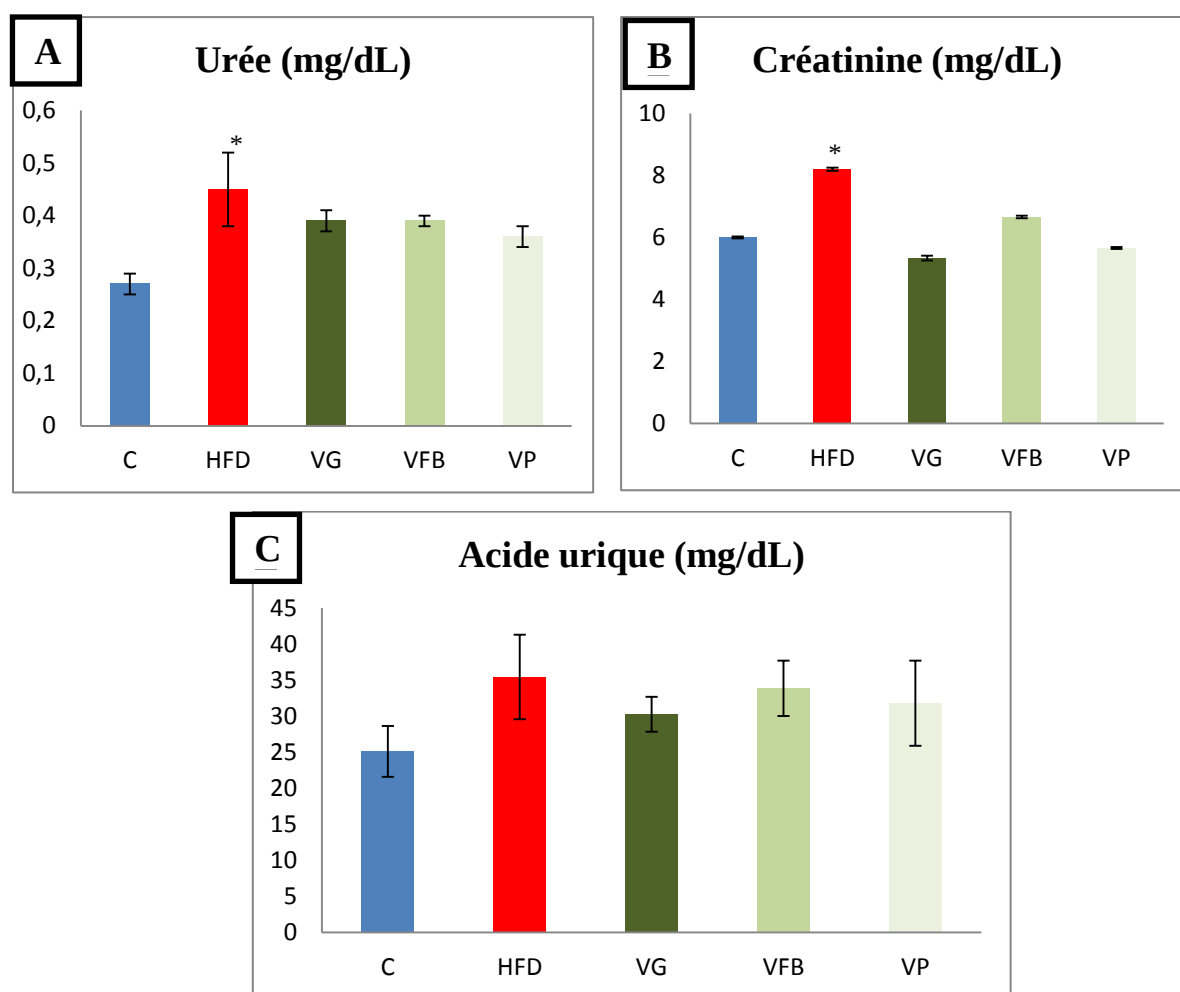


C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). * $p \leq 0,05$, HFD vs C; + $p \leq 0,05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0,01$, traités vs HFD.

Figure 31 : Evaluation de la fonction hépatique des différents groupes après 28 semaines d'expérimentation.

2.7. Effet des vinaigres sur le bilan rénal

La figure 32 montre les taux plasmatiques de l'urée, la créatinine, et de l'acide urique des différents groupes. Les valeurs plasmatiques de l'urée, la créatinine, et de l'acide urique sont altérées chez le groupe dyslipidémique (HFD) (+ 100%, + 37% et + 41% ; respectivement). Chez les lots traités par les vinaigres, on note que ces paramètres gardent leurs taux presque normaux avec une différence non significative par rapport au groupe dyslipidémique.



C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme.
Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). * $p \leq 0.05$, HFD vs C

Figure 32 : Bilan rénal des rats contrôles, dyslipidémiques, et traités durant 28 semaines d'expérimentation.

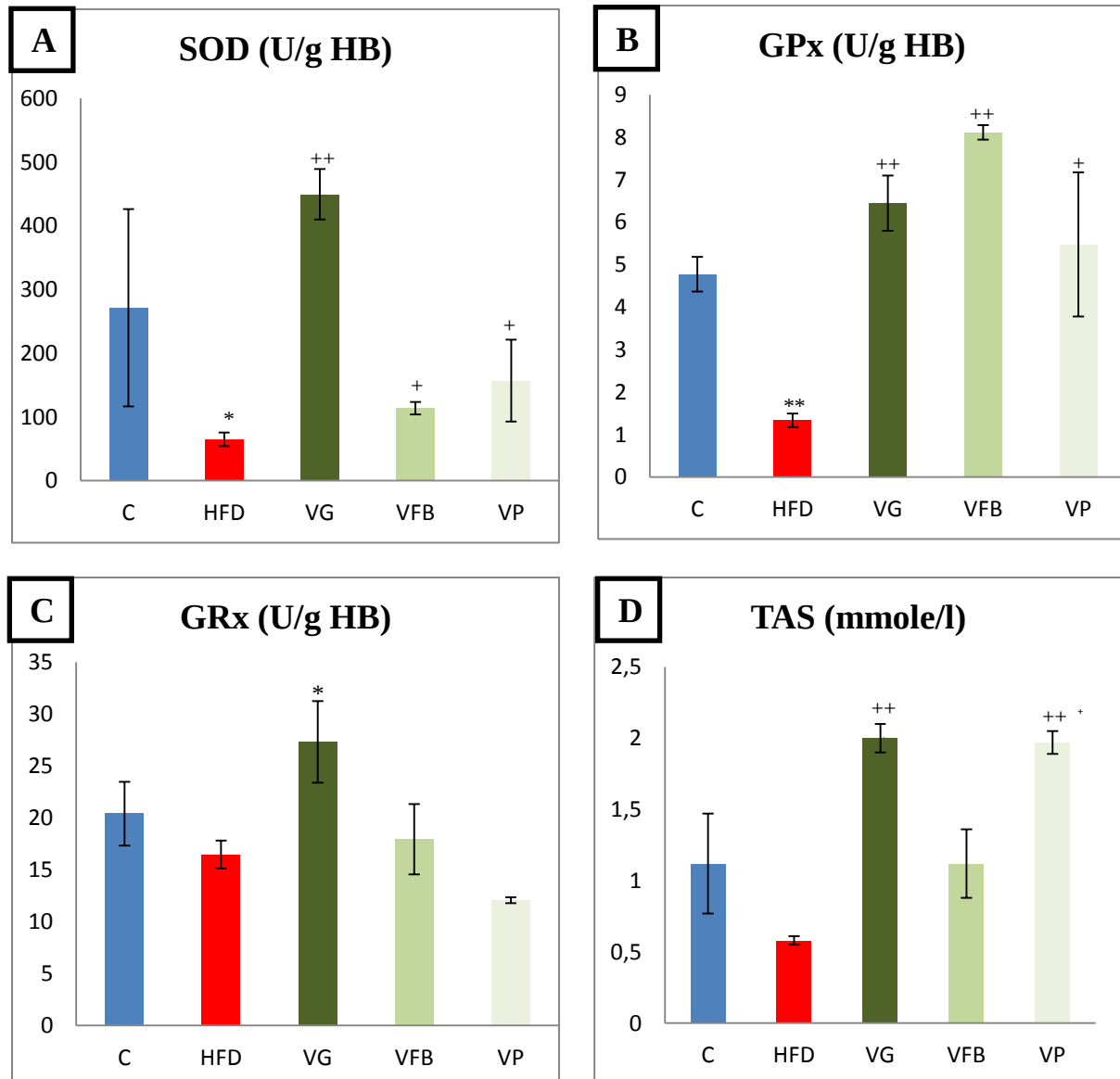
3. Etude des paramètres du stress oxydant

Il est admis que les vinaigres constituent une source importante des antioxydants naturels en particulier les polyphénols, raison pour laquelle plusieurs études d'éventuel effet antioxydant des vinaigres constituent un facteur crucial pour l'évaluation de leurs effets et pour la compréhension de leurs mécanismes d'action.

Les vinaigres de fruit ont été évalués pour son effet sur les paramètres du stress oxydant associé à la dyslipidémie au niveau sérique et hépatique qui constitue un siège de tous les métabolismes.

3.1. Effet des vinaigres sur l'activité des enzymes antioxydantes et sur le statut antioxydant total (TAS)

La figure 33 présente l'effet des vinaigres sur l'activité des enzymes antioxydantes et sur le statut antioxydant total chez les cinq groupes étudiés.



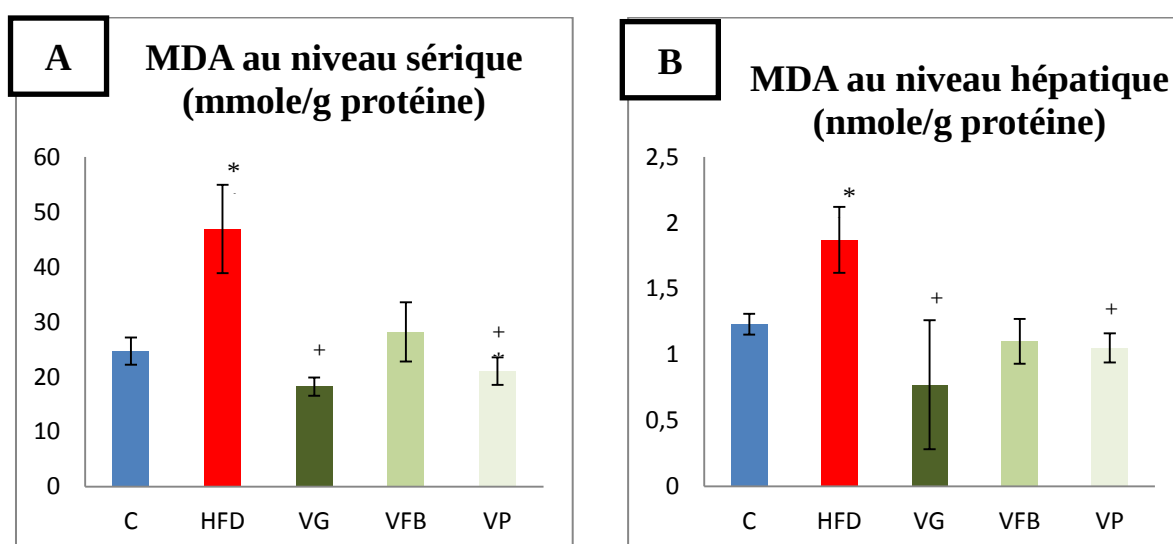
C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=10). * $p \leq 0.05$, HFD vs C; ** $p \leq 0.001$, HFD vs C; + $p \leq 0.05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0.001$, traités vs HFD.

Figure 33 : Effet des vinaigres de fruit sur l'activité des enzymes antioxydantes et le statut antioxydant total

L'activité de la SOD, la GPx, et la GRx sont altérée avec (- 76%, - 72% et - 19%; respectivement) chez les rats dyslipidémiques par rapport aux rats du groupe contrôle. Cette altération est réduite significativement ($p \leq 0,05$) par la supplémentation en vinaigres de fruit. Par ailleurs, le TAS est réduit (- 48%) chez le groupe dyslipidémique par rapport au groupe contrôle. En revanche, les vinaigres de grenade et de figue de barbarie ont prévenu très significativement ($p \leq 0,01$) cette réduction.

3.2. Effet des vinaigres sur la peroxydation lipidique

La figure 34 montre les taux plasmatiques et hépatiques du MDA. Le régime hypergras a augmenté significativement ($p \leq 0,05$) le taux du MDA au niveau sérique et au niveau hépatique par (+ 90%, + 50%; respectivement) chez le groupe dyslipidémique par rapport au groupe contrôle. Le traitement avec les vinaigres de grenade et de pomme a significativement baissé le taux du MDA au niveau sérique (- 61%, - 55%; respectivement) et au niveau hépatique (- 59%, - 44%; respectivement).



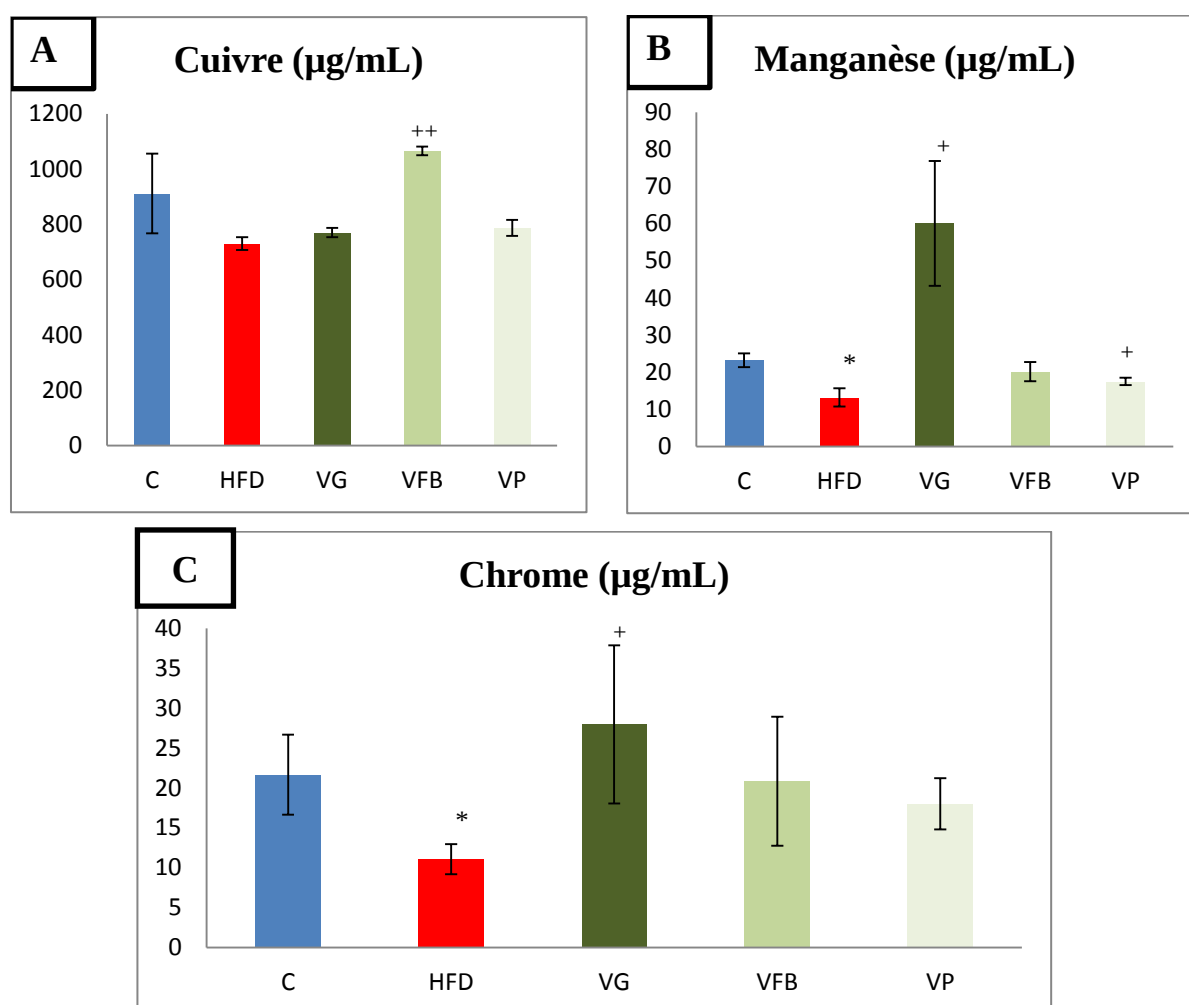
C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). * $p \leq 0,05$, HFD vs C; ** $p \leq 0,001$, HFD vs C; + $p \leq 0,05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0,001$, traités vs HFD.

Figure 34 : Dosage du MDA au niveau sérique et hépatique au niveau des différents lots expérimentaux

3.3. Effet des vinaigres sur les oligoéléments

Les oligoéléments ou bien les éléments traces, classés comme micronutriments, jouent un rôle majeur dans l'hémostase énergétique. Le manganèse et le cuivre sont des cofacteurs indispensables aux réactions métaboliques d'enzymes antioxydantes, principalement la SOD. La figure 37 montre les taux plasmatiques de quelques oligoéléments (Cu, Mn et Cr).

On note une diminution significative ($p \leq 0,05$) de cuivre, manganèse et chrome avec (-20%, -43% et 96%; respectivement) chez les rats dyslipidémiques par rapport au groupe contrôle. Le traitement avec le vinaigre de grenade semble avoir un effet significatif dont on a remarqué une augmentation importante du taux du cuivre, de (+45%), du manganèse de (+52%) et de chrome (+152%) (Figure 35).



C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme.

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). * $p \leq 0,05$, HFD vs C; + $p \leq 0,05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0,01$, traités vs HFD.

Figure 35 : Les taux plasmatiques des oligoéléments chez les différents groupes.

3.4. Effet des vinaigres sur le statut martial

Dans cette étude le statut martial a été évalué par le dosage de deux paramètres notamment le fer sérique et la ferritine. Les données mentionnées dans le tableau XXII montrent une diminution significative ($p \leq 0,05$) du fer sérique avec -57% et une hypoferritinémie (- 35%) chez les rats dyslipidémiques (HFD) par rapport au groupe contrôle. Le traitement par le vinaigre de figue de barbarie semble avoir un effet significatif dont on a remarqué une augmentation importante du fer (+ 77%) et de la ferritine (162%).

Tableau XXII : Effet des vinaigres de fruit sur le statut martial

	Fer sérique ($\mu\text{g/mL}$)	Ferritine ($\mu\text{g/mL}$)
C	110 $\pm$ 3,51	68,25 $\pm$ 6,9
HFD	47 $\pm$ 8,02 ^{**}	44,1 $\pm$ 5,41
VG	65,33 $\pm$ 11,35	79,6 $\pm$ 9,5
VFB	203 $\pm$ 6,00 ⁺⁺	115,63 $\pm$ 16,02 ⁺⁺
VP	136,33 $\pm$ 39,30 ⁺	84,63 $\pm$ 25,32 ⁺

C : Contrôle; HFD: Dyslipidémique; VG: Traité par le vinaigre de grenade; VFB: Traité par le vinaigre de figue de barbarie; VP: Traité par le vinaigre de pomme.

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=10). ** $p \leq 0.001$, HFD vs C; + $p \leq 0.05$, traités vs HFD; ++ $p \leq 0.001$, traités vs HFD.

4. Analyse des coupes histologiques

L'histologie du foie des groupes contrôle montre une architecture normale des cellules hépatiques en travées séparées les unes des autres par les capillaires sinusoides, un cytoplasme granuleux et préservé avec une veine centro-lobulaire clairement visible.

Chez le groupe dyslipidémique, on remarque une désorganisation des travées hépatocytaires qui présentent un cytoplasme clair avec la présence des micro et des macro-vésicules lipidiques qui entoure la veine centro-lobulaire, séparées les unes des autres par des capillaires sinusoides qui sont dilatés. On remarque la présence de plusieurs types de cellules immunitaires notamment les monocytes et les lymphocytes.

L'étude histologique du parenchyme hépatique des rats traités par les vinaigres de fruit a montré une réparation remarquable de ces dommages avec la présence de quelques capillaires sinusoides dilatés.

Figure A

Cette figure montre une partie d'un lobule hépatique constitué d'une veine centro-lobulaire ou médiolobulaire (VCL) entourée par des hépatocytes en travées (travées de Remak) séparées les unes des autres par les capillaires sinusoides (flèches). Ces capillaires sont séparés les hépatocytes par un espace appelé espace de Disse.

Coloration : Trichrome de masson.

Figure B

Cette image est centrée sur un espace porte qui contient une branche de la veine porte (VP) bordée de cellules endothéliales aplaties, de l'artère hépatique (*) et un canal biliaire (+).

Coloration : Trichrome de masson.

Figure C

Au plus fort grossissement, les hépatocytes (H) de forme polygonale qui apparaissent rouge avec un noyau central (violet).

Coloration : Trichrome de masson.

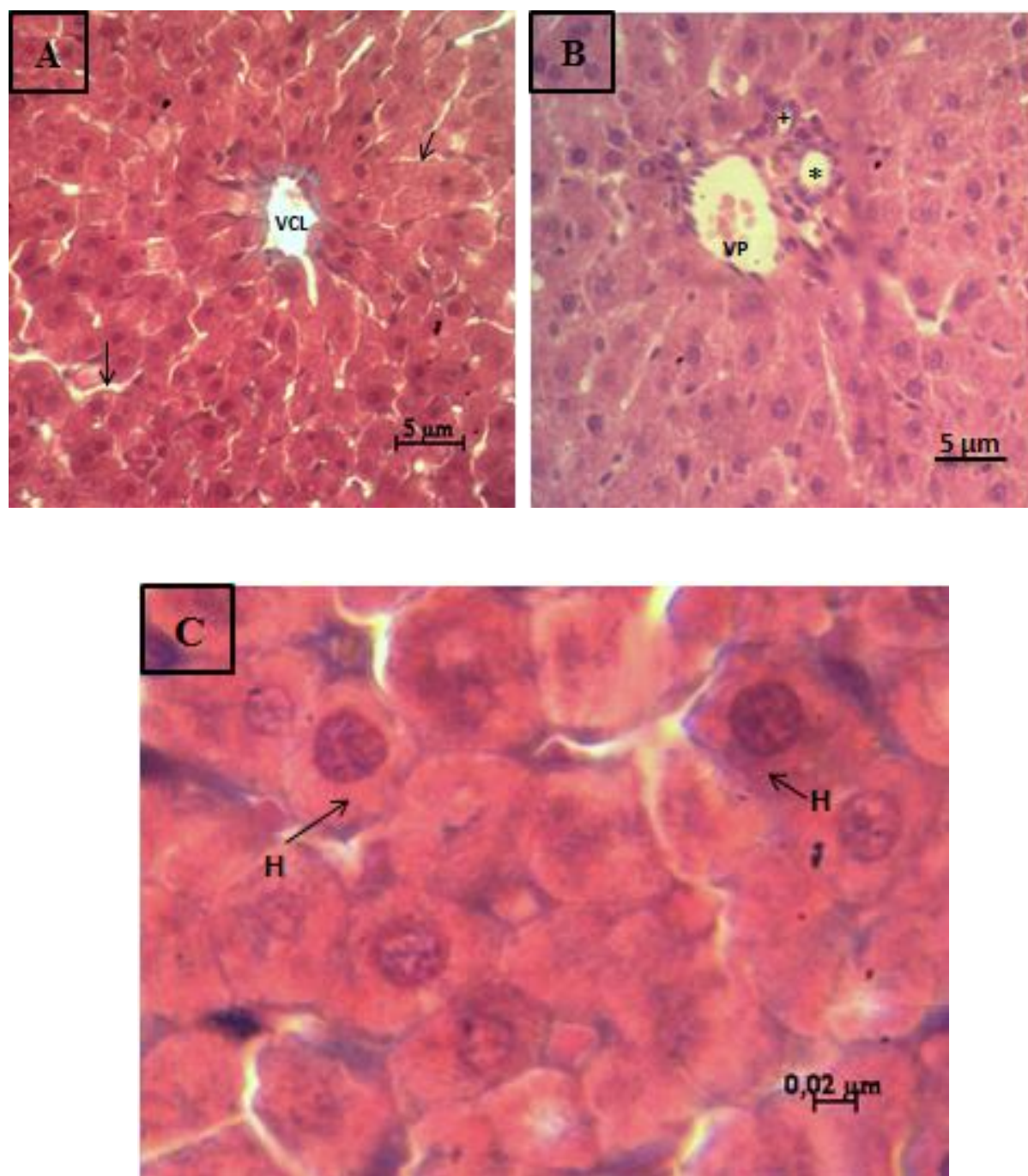


Figure 36 : Etude histologique du parenchyme hépatique chez le groupe contrôle (A, B : Scale bar : 5 µm et C : Scale bar : 0,02 µm)

Figure A

On remarque une désorganisation de travées hépatocytaires qui entoure la veine centro-lobulaire (VCL) séparées les unes des autres par les capillaires sinusoides (flèches) qui sont dilatés.

Coloration : Trichrome de masson.

Figure B

La présence d'une infiltration de cellules immunitaires au niveau des espaces portes (flèches).

Coloration : Trichrome de masson.

Figure C

Au fort grossissement, les hépatocytes présentent un cytoplasme clair avec la présence des micro et des macro-vésicules lipidiques, on parle alors de la stéatose hépatique (les flèches). On note la présence des cellules de Kupffer (CK), appartenant aux cellules microphagies mononucléées.

Coloration : Trichrome de masson.

Figures D et E

Au tour de la veine porte, des neutrophiles (N) et un monocyte (M) sont visibles.

Coloration : Trichrome de masson.

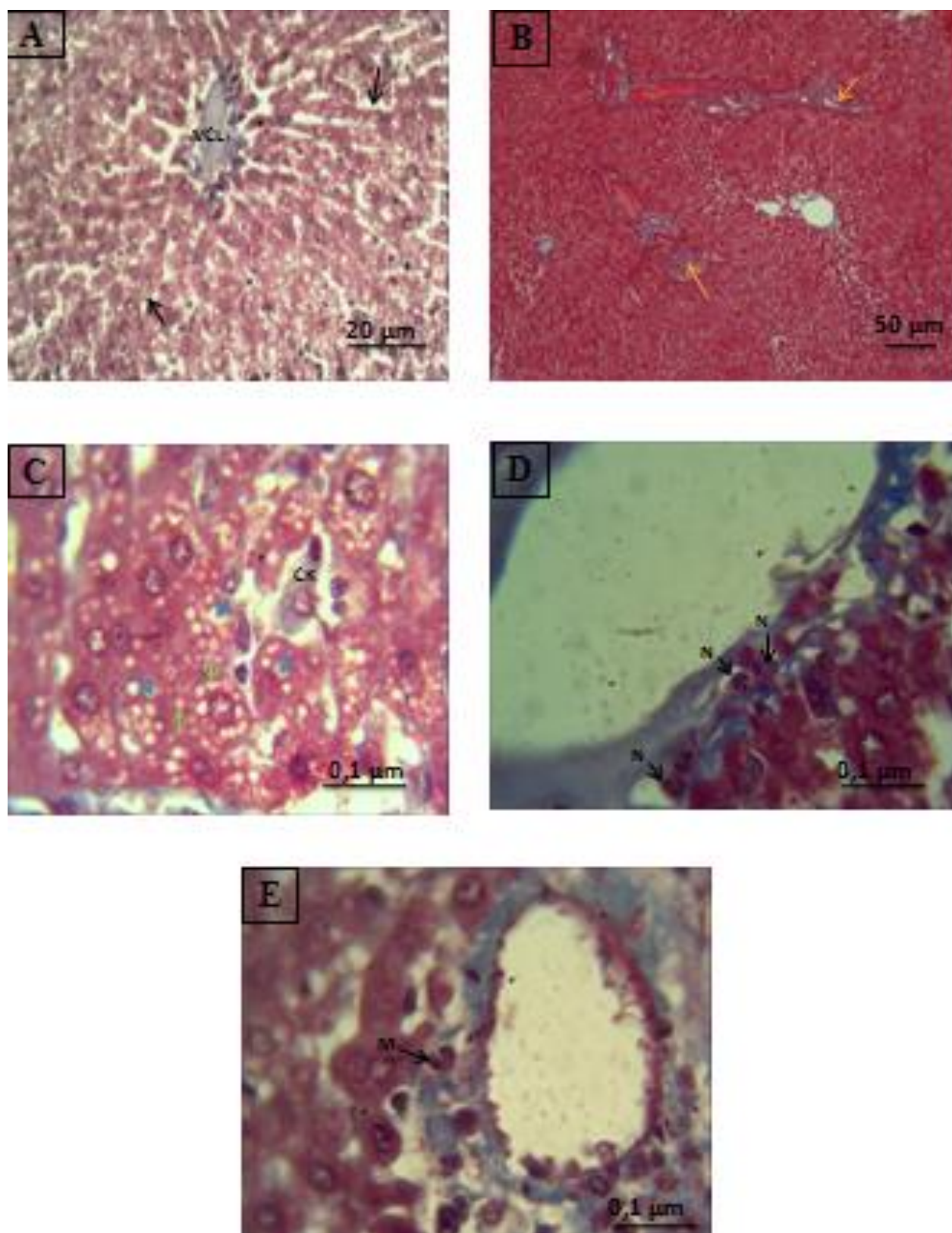


Figure 37 : Etude histologique du parenchyme hépatique chez le groupe dyslipidémique (A : Scale bar : 20 μm, B : Scale bar : 50 μm et C, D, E : Scale bar : 0,1 μm)

Figure A et B

Ces deux figures montrent une partie de lobule hépatique des rats traités par le vinaigre de grenade, l'architecture du lobule hépatique est conservée avec des travées hépatocytaires bien délimitées.

Coloration : Trichrome de masson.

Figure C et D

On note la présence des vacuoles lipidiques (adipocyte) au niveau de la veine porte (VP) chez les rats traités par le vinaigre de figue de barbarie. On remarque des capillaires sinusoides qui sont dilatés (flèche).

Coloration : Trichrome de masson.

Figure E et F

Ces deux images présentent un espace porte (Figure E) qui contient une veine porte (VP) remplie de cellules sanguines chez le groupe traité par le vinaigre de pomme. On remarque des hépatocytes bien délimités avec des capillaires sinusoides qui sont dilatés (flèches).

Coloration : Trichrome de masson.

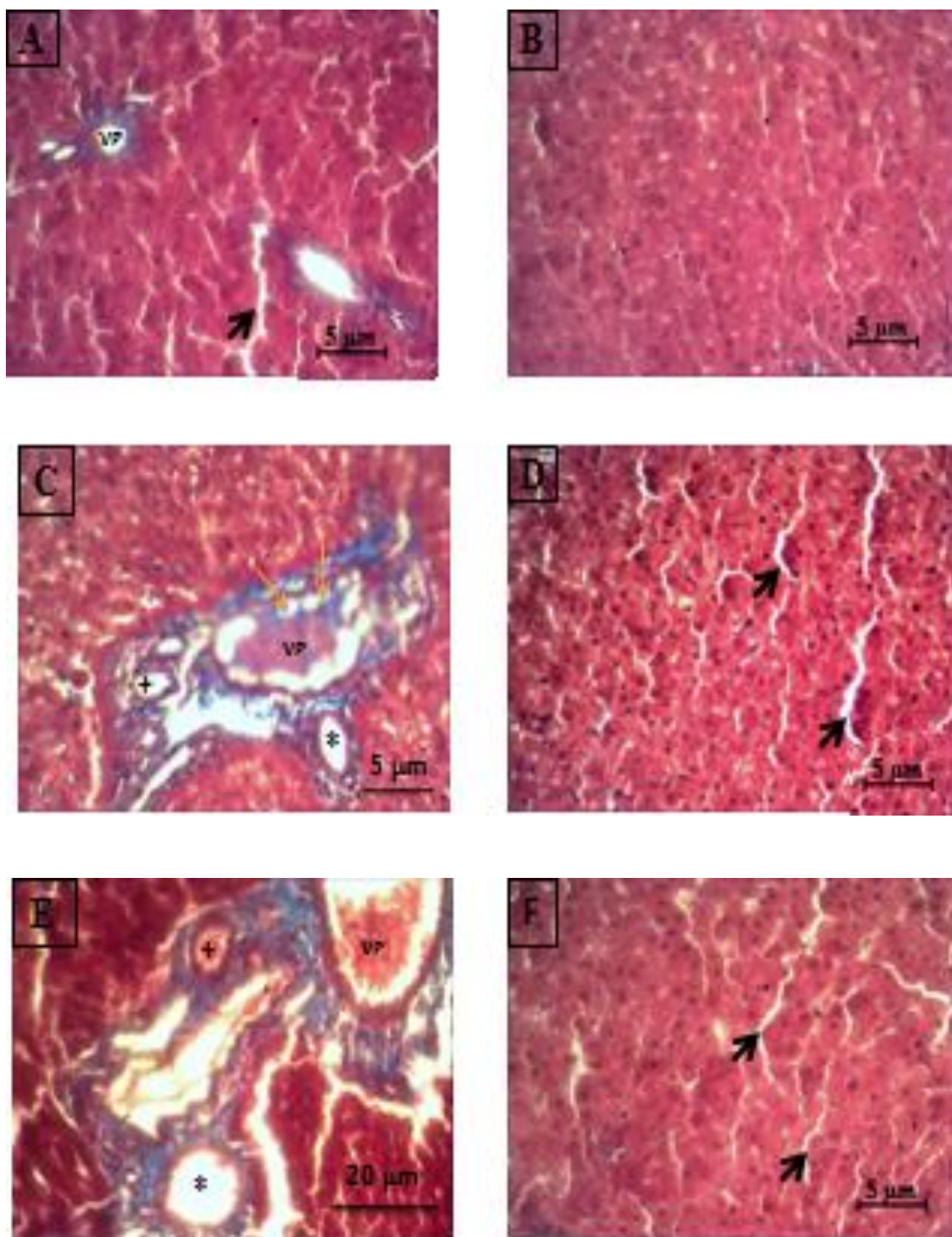


Figure 38 : Etude histologique du parenchyme hépatique chez les groupes traités (A, B, C, D et F : Scale bar : 5 µm et E : Scale bar : 20 µm)

DISCUSSION

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, on note plus de 16,7 millions de décès dans le monde en 2002 (Mackay et Mensah, 2004).

En effet, depuis les années 1990, plus de 85 millions de personnes sont décédés dans le monde entier à cause des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux. Ce chiffre peut atteindre jusqu'à 143 millions de décès d'ici l'année 2020 (Mackay et Mensah, 2004; Fon Tacer *et al.*, 2007).

La cause principale de ces maladies est la dyslipidémie, par conséquent la stratégie clé dans le traitement de ces pathologies est de maintenir le bilan lipidique notamment une diminution du CT, TG, et LDL-c et l'augmentation du HDL-c.

L'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie sont responsables d'un stress oxydant associé à un état d'insulinorésistance. L'activité des ROS peut induire la peroxydation lipidique qui, par la suite, stimule la glycation des protéines, l'inactivation des enzymes et l'altération de la structure et la fonction des biomembranes, jouant ainsi un rôle crucial dans les complications à long terme de la dyslipidémie (Baynes, 1991). Dans ce cas, le stress oxydant coexiste avec la réduction du statut antioxydant ce qui peut augmenter l'effet délétère des radicaux libres (Collier *et al.*, 1990).

Le modèle animal dyslipidémique expérimental a montré un niveau élevé du stress oxydant dû à l'état chronique et persistant de l'hypercholestérolémie et/ou l'hypertriglycéridémie. Ces dernières, sont les caractéristiques de la dyslipidémie, qui augmentent la production des espèces réactives de l'oxygène et affectent les réactions antioxydantes catalysées par les enzymes scavengers des ERO (Uchimura *et al.*, 1999).

La stratégie thérapeutique de dyslipidémies telles que les fibrates et les statines indique une action modeste avec une efficacité limitée (Rosenblat *et al.*, 2013). En outre, elle a généralement des effets secondaires, une diminution de l'efficacité, contre l'athérosclérose et les complications coronariennes à long terme et un faible rapport coût-efficacité (Davignon, 2012). Cependant, la découverte et le développement de nouvelles thérapies naturelles est encore plus qu'indispensable.

La médecine traditionnelle pratiquée par l'homme à travers le monde est basée essentiellement sur l'utilisation des condiments comme sources de substances naturelles actives. Parmi ces condiments, les vinaigres qui occupent une place importante dans le traitement de nombreuses pathologies entre autres l'obésité, l'insulinorésistance et la dyslipidémie (Qui *et al.*, 2010).

L'intérêt de ce travail est d'étudier l'effet antioxydant du vinaigre de 3 fruits riches en composés bioactifs notamment la grenade, la figue de barbarie et la pomme chez le rat Wistar rendu dyslipidémique.

Les vinaigres de fruits ont subi un screening phytochimique qualitatif et quantitatif. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes peuvent servir comme des indicateurs importants de la capacité antioxydante et être utilisés comme une sélection préliminaire pour n'importe quel produit quand il est destiné comme source naturelle des antioxydants dans les aliments fonctionnels (Viuda-Martos et *al.*, 2011).

Les tests qualitatifs ont révélé la présence de certains composés bioactifs: les tannins, les saponosides, les triterpènes et les flavonoides.

Le screening phytochimique quantitatif a montré que les vinaigres de grenade, de figue de barbarie, et de pomme contiennent $37,90 \pm 0,33$; $28,76 \pm 0,14$ et $33,06 \pm 0,06$ mgEAG/mL, respectivement, de polyphénols totaux parmi lesquels $6,86 \pm 0,03$; $3,87 \pm 0,02$ et $4,60 \pm 0,36$ mgEQ/mL, respectivement de flavonoïdes. D'après ces résultats, le vinaigre de grenade est le vinaigre le plus riche en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes).

Le contenu en acides phénoliques et en flavonoïdes des vinaigres est variable, il dépend de la nature du fruit, la méthode de préparation, la durée de fermentation et les conditions de stockage (Ubeda et *al.*, 2011 ; Lee et *al.*, 2013). Ces composés sont connus par leurs propriétés de piégeage des radicaux libres et pour inhiber l'oxydation des lipides *in vitro* (Noda et *al.*, 2007).

L'évaluation de l'effet des vinaigres contre le stress oxydant est un objectif principal dans notre étude, raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier *in vitro* avant de passer à l'*in vivo*. Pour cela deux tests ont été réalisés : L'effet scavenger par le test de DPPH (Burits et Bucar, 2000; Şahin et *al.*, 2004) et la capacité à réduire du fer (FRAP) (Oyaizu, 1986).

Par définition, l'activité antioxydante est la capacité d'un composé à inhiber la dégradation oxydante (la peroxydation lipidique) (Roginsky et Lissi, 2005). Elle est corrélée positivement ($R^2 > 0,87$) avec les polyphénols totaux incluant les flavonoïdes (Alzoreky et Nakahara, 2001 ; Negi et Jayaprakasha, 2003; Li et *al.*, 2006; Madrigal-Carballo et *al.*, 2009).

Le test DPPH, *in vitro*, a pour but d'évaluer préliminairement les mécanismes qui devraient se produire à l'intérieur des systèmes biologiques, est soutenue par les résultats obtenus à partir des études antérieures (Baratto et *al.*, 2003; Heimler et *al.*, 2006). Selon ces études, la capacité de piégeage des composés testés contre le radical DPPH suit une tendance qui reflète celle de l'activité antioxydante contre le radical superoxyde (O_2°), le radical hydroxyle (OH°), la capacité inhibitrice contre l'oxydation des lipoprotéines basse densité (LDL) induite

chimiquement, ce test peut être utilisé comme modèle biologiquement approprié (Romani et *al.*, 2012).

La teneur élevée en composés phénoliques contenue dans le vinaigre de grenade peut expliquer sa forte activité antioxydante. L'activité de piégeage du DPPH comme une réaction d'oxydoréduction, elle est directement liée aux composés phénoliques du vinaigre de grenade (Reddy et *al.*, 2007).

Reddy et *al.*, (2007) ont montré que le fuit brut de grenade riche en tannins (acide ellagique et punicalagines) possède une activité antioxydante forte en inhibant la génération des ROS avec IC_{50} de 0.33 à 11 $\mu\text{g/mL}$. Selon la composition polyphénolique, l'activité de balayage DPPH variait avec les produits de fruits de grenade, de 74 à 4485 $\mu\text{M/g}$ (Madrigal-Carballo et *al.*, 2009).

Wang et *al.*, (2011) ont étudié les corrélations entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques de grenade et les résultats obtenus indiquent une forte corrélation entre le DPPH et les composés phénoliques totaux ($R^2=0.98$).

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH° suggèrent que les composés qui se trouvent dans le vinaigre sont capables de piéger les radicaux libres par l'intermédiaire de mécanismes de donation d'électrons ou d'hydrogène et pourrait donc être en mesure d'empêcher l'initiation des réactions en chaîne des radicaux libres délétères induites dans les membranes cellulaires.

Ceci montre également la capacité des vinaigres à piéger les différents radicaux libres dans les différents systèmes. Ils peuvent être des agents thérapeutiques utiles pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux libres (Abdelazim et *al.*, 2011).

Le pouvoir réducteur d'un composé sert d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Deepa et *al.*, 2009; Kanatt et *al.*, 2010; Zheng et *al.*, 2011).

D'après les résultats présentés dans la figure 26, on observe que la concentration a un effet significatif ($p \leq 0.05$) sur le pouvoir réducteur. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Zheng et *al.*, (2011) qui ont signalé que le pouvoir réducteur de grenade augmente linéairement avec l'augmentation de sa concentration avec un coefficient de corrélation $R^2=0.9992$.

Aux concentrations 25 et 50 $\mu\text{g/mL}$, le BHT et le vinaigre de grenade ont le même pouvoir réducteur. A la concentration 100 $\mu\text{g/mL}$ le BHT a un pouvoir réducteur plus élevé que celui du vinaigre de grenade. Duh et *al.*, (1999) a rapporté que les propriétés de réduction sont généralement associées à la présence des réductones. Ces derniers sont des terminateurs des

réactions en chaîne de radicaux libres (Negi et Jayaprakasha, 2003; Huang et al., 2005; Xiao-Juan Duan et al., 2006; Zhang et al., 2010).

Gordon (1990) et Shimida et al., (1992) ont rapporté que l'action antioxydante des réductones est basée sur la rupture des chaînes de radicaux libres par donation d'atome d'hydrogène. Il a été également rapporté que les réductones réagissent avec certains précurseurs de peroxydes. Ainsi, ils empêchent la formation de ces derniers.

Les composés à pouvoir réducteur indiquent qu'ils sont des donneurs d'électrons et peuvent réduire les intermédiaires oxydés des processus de peroxydation des lipides, de sorte qu'ils puissent agir en tant qu'antioxydants primaires et secondaires (Chanda et Dave, 2009). L'analyse des vinaigres par l'HPLC montre que les trois vinaigres sont riches en acide acétique, acide ascorbique, acide citrique, acide gallique et acide caféique. Ces composés ont un effet antioxydant, antiobésité et anti-hypercholestérolémique (Sugiyama et al., 2003).

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le milieu extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' $OH^{\bullet}$ (Packer et al., 1997 ; Evans, 2000).

Cependant, l'acide ascorbique n'est pas seulement un antioxydant efficace pour piéger les radicaux libres mais aussi il joue en synergie avec les composés phénoliques (Shigeoka et al., 2002). Il régénère les antioxydants et améliore leur capacité antioxydante lorsqu'ils sont ensemble (Ozcelik et al., 2003).

Dans cette étude, la concentration de l'acide gallique dans le vinaigre de grenade est plus élevée que le vinaigre de figue de barbarie et de pomme. Toutefois, le teneur de l'acide acétique dans le vinaigre de grenade est plus faible que le vinaigre de pomme et de figue de barbarie.

En outre, dans les vinaigres de xérès et le vin, acide gallique, caféique, chlorogénique, protocatéchique, p-coumarique, acide férulique et vanillique étaient étroitement corrélés avec l'activité antioxydante (Budak et al., 2014).

Enfin les résultats obtenus par le screening phytochimique, nous ont permis de conclure que les vinaigres de fruits sont riches en composés phénoliques doués d'activités biologiques très importantes.

En plus, la capacité puissante des vinaigres vis-à-vis les radicaux libres et l'oxydation donne un grand espoir concernant son effet contre le stress oxydant *in vivo*.

Les vinaigres, connus longtemps par ses effets antidiabétique et antihyperlipidémique dans la médecine traditionnelle (Kondo et al., 2009b; Setorki et al., 2010; Budak et al., 2014; Beheshti et al., 2012).

Cependant, le vinaigre de figue de barbarie n'a jamais été valorisé dans le monde. Notre étude constitue une nouvelle approche non seulement pour l'évaluation *in vivo* de son effet antihyperlipidémique mais aussi pour la révélation de son effet contre le stress oxydant associé à la dyslipidémie et les complications qui en résultent voire les maladies cardiovasculaires et les dommages hépatiques.

Afin de tester les effets antihyperlipidémique, antioxydant et hepatoprotectif des vinaigres de fruit, une dose de 7mL/kg/jour a été choisie en se basant sur des études qui ont été faites par les vinaigres de l'avoine et de la tomate (Qiu et *al.*, 2012 ; Lee et *al.*, 2013).

La partie principale de notre étude était consacrée à l'évaluation de l'activité antihyperlipidémique et antioxydante *in vivo* en utilisant un modèle animal le rat wistar.

Les rats sont rendus dyslipidémiques par le régime hypergras soit une prise journalière de 126.5 cal durant sept (07) mois, provoquant une production accrue des radicaux libres qui nous servira par la suite d'étudier l'effet antioxydant des vinaigres.

Après sept mois d'expérimentation, le régime hypergras provoque un gain de poids de $147,50 \pm 14,67$ g chez le groupe dyslipidémique par rapport au groupe contrôle.

La première conséquence visible d'un régime hypergras est une surcharge pondérale pouvant aller jusqu'à l'obésité. Les régimes alimentaires contenant plus de 30% des apports énergétiques sous formes de lipides entraînent, en effet, le développement d'une obésité chez les rats et les souris, dû à une augmentation de la prise calorique (West et York, 1998 ; Hill et *al.*, 2000).

Ainsi, des rats Wistar soumis pendant 4 semaines à un régime riche en lipides comptant de 60% des calories totales, ont une masse corporelle 20% supérieure à celle des rats soumis à un régime standard (12% de lipides) (Bartness et *al.*, 1992).

En revanche, ces animaux soumis à un régime contenant peu de lipides (< 20%) deviennent rarement obèses, même lorsqu'ils sont maintenus dans une petite cage limitant toute activité physique (Hill et *al.*, 2000).

Toutefois, l'obésité n'est pas uniquement un problème de poids ; elle est également à l'origine de nombreuses pathologies, notamment le diabète de type 2 (Saltiel, 2000). L'accumulation des triglycérides dans le tissu adipeux stimule la lipolyse par un effet de masse et augmente ainsi la concentration en acides gras libres plasmatiques (Nurjhan et *al.*, 1992 ; Lewis et *al.*, 2002).

Ce flux d'acides gras libres provoque alors de nombreux désordres métaboliques dont: Une dyslipidémie et une stéatose hépatique, une détérioration du métabolisme du glucose et de la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique et le foie, conduisant à la mise en place d'une

résistance à cette hormone et un dysfonctionnement des cellule β -pancréatiques (Reaven, 1988 ; Lewis et *al.*, 2002).

Les vinaigres de fruit dont ceux de grenade et de pomme diminuent significativement ($p \leq 0.05$) le gain du poids (Soltan et Shehata, 2012). Yamashita et *al.*, (2007) ont rapporté que l'acide acétique inhibe l'expression des gènes lipogéniques des acides gras synthase (FAS) et acetyl-CoA (ACC) via AMP-activated protein kinase (AMPK)/carbohydre responsive element-binding protein, qui diminue le poids corporel chez les rats obèses.

De plus, nos résultats indiquent que l'indice hépato-somatique, qui renseigne sur l'évolution du poids de l'organe par rapport à celui de l'organisme entier, est significativement ($p \leq 0.05$) élevé chez le groupe dyslipidémique. L'ingestion du vinaigre de grenade et de pomme diminue significativement ($p \leq 0.05$) ce paramètre avec (- 69% et - 18.75%, respectivement).

La glycémie a été augmentée chez le groupe dyslipidémique ($110,26 \pm 25,21$ mg/dL) par rapport au groupe contrôle ($86,07 \pm 2,49$ mg/dL) (figure 29). Les vinaigres de grenade, de figue de barbarie et de pomme ont réduit la concentration de glucose par 114%, 25% et 44% ; respectivement. Tous ces types de vinaigres ont montré une diminution importante de la glycémie par rapport au groupe dyslipidémique.

Cela pourrait être dû à la présence des composés bioactifs (l'acide acétique et les acides organiques) dans les vinaigres. Plusieurs mécanismes ont été proposés sur l'effet des vinaigres sur la diminution de la glycémie.

Parmi ces mécanismes, l'acide acétique interfère dans la digestion de l'amidon en réduisant la quantité de glucose absorbé dans la circulation sanguine après un repas (Ogawa et *al.*, 2000). Une étude suggère que le vinaigre ralentit la vitesse de vidange gastrique et donc retarde l'absorption des glucides et améliore la satiété (O'Keefe et *al.*, 2008).

L'acide acétique améliore l'absorption de glucose dans le sang par les tissus périphériques (Fushimi et *al.*, 2001). Une autre étude montre que le vinaigre de pomme diminue la glycémie après un petit-déjeuner riche en glucides (Johnston et *al.*, 2004).

A l'état physiologique, la sécrétion de l'insuline permet de maintenir un taux constant de la glycémie qui reflète la sensibilité des organes (tissu adipeux, muscle squelettique et le foie) à l'insuline. A l'état pathologique, on remarque une hyperinsulinosécrétion associée à une hypoinsulinosensibilité (insulinorésistance).

Il a en effet été montré que l'insulinémie à jeun est un bon marqueur de l'insulinorésistance (Haffner et *al.*, 1996). De plus, à partir de la glycémie et de l'insulinémie on peut calculer le score de HOMA-IR qui nous permet de prédire l'insulinorésistance (Cacho et *al.*, 2008).

Une personne ayant une sensibilité à l'insuline normale aura un score de HOMA-IR égal à 1, et plus ce score sera élevé, plus l'insulinorésistance sera établie.

Le score de HOMA-IR est un bon marqueur pour évaluer l'insulinorésistance chez des personnes ayant une intolérance au glucose ou un diabète modéré. En revanche, il est inapproprié pour les personnes présentant un dysfonctionnement du pancréas.

En outre, l'insulinorésistance est associée à une augmentation de sécrétion des LRT hépatiques et intestinaux, qui conduit à une hypertriglycémie, une augmentation de l'ApoB et une diminution du cholestérol HDL (Avramoglu et *al.*, 2006; Duezet *al.*, 2006). L'insulinorésistance est aussi associée à une élévation de la lipidémie post-prandiale (Harbis et *al.*, 2004).

Le bilan lipidique au niveau hépatique est important pour l'évaluation de la dyslipidémie. Plusieurs études ont rapporté que les complications cardiovasculaires sont dues aux perturbations du métabolisme lipidique (El-hilaly et *al.*, 2006; Akuyam et *al.*, 2007 ; Gupta et *al.*, 2008 ; Qi et *al.*, 2008).

Une consommation excessive de lipides induit un déséquilibre du contenu plasmatique en acides gras libres et favoriser l'hyperglycémie, dans des conditions étant à l'origine d'une augmentation du stress oxydant (Bakker et *al.*, 2000 ; Evans et *al.*, 2002).

Une quantité importante d'acides gras libres plasmatiques s'accompagne d'une accumulation d'acyl-CoA à chaîne longue (LC-CoA) dans les tissus due à une altération de l'oxydation des lipides (Ellis et *al.*, 2000 ; Perez-Carreras et *al.*, 2003).

Différents études montrent que les LC-CoA inhibent l'ANT, entravant l'entrée d'ADP dans la mitochondrie (Paulson et *al.*, 1984). Une faible concentration en ADP intramitochondriale ralentit alors le processus d'oxydation phosphorylante avec pour conséquence une diminution de la respiration mitochondriale, une augmentation du potentiel de membrane ($\Delta\psi$) et de la production de ROS (Barja, 2002).

Dans le muscle squelettique et le foie de rats soumis à un régime hypergras, la respiration mitochondriale (état 4 et 3) est ainsi diminué comparativement à celle de rats soumis à un régime standard (Iossa et *al.*, 2000 ; Iossa et *al.*, 2003). Cette diminution de la capacité d'oxydation phosphorylante est également révélée par la réduction de l'expression de gènes des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I, II, III et IV) ainsi que de leur activité (Perez-Carreras et *al.*, 2003 ; Sparks et *al.*, 2005).

Les résultats de notre étude ont montré une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du CT (+ 84,33%), TG (+ 76,22%) et LDL-c (+ 97,79%) associée à une diminution remarquable de HDL-c (- 32,82%). L'administration du vinaigre de grenade diminue de manière significative

($p \leq 0.05$) le CT (- 165%), TG (- 68%) et LDL-c (- 76%) et augmente le HDL-c par (+ 30%). La pomme est un fruit très riche en composés bioactifs et phytochimiques (Leontowicz et *al.*, 2002).

Les glycosides de quercétine sont les principaux flavonoïdes dans les pommes (Boyer et Liu, 2004). Ils sont connus comme piègeurs de radicaux libres et de chélateurs des ions de métaux de transition (Kamada et *al.*, 2005). Les triterpènes sont la plus grande classe et la plus répandue classe de métabolites secondaires des pommes (Zhang et *al.*, 2006) et le groupe important de composés bioactifs des pommes (He et Liu, 2008).

Des études ont démontré que les triterpènes possèdent des propriétés anti-athérogènes (Zhang et *al.*, 2006).

Le vinaigre de grenade a le taux de l'acidité titrable le plus élevé par rapport aux autres vinaigres. Plusieurs études ont montré que l'acide acétique (composant actif dans tous les vinaigres) régule l'ATP citrate lyase (ATP-CL), acide gras synthase et ACC via SREBP-1, ce qui diminue les triglycérides chez les rats hyperlipidémiques (Fushimi et *al.*, 2006).

Plusieurs études réalisées chez les souris, les rats et les lapins ont prouvé l'amélioration du profil lipidique par les vinaigres (Shishehbor et *al.*, 2008; Setorki et *al.*, 2010; Soltan et Shehata, 2012; Park et *al.*, 2014).

Fushimi et *al.* (2006) ont rapporté que le taux du cholestérol total est diminué au niveau sérique lorsque l'acide acétique (0,3 p/p) est administré avec un régime contenant 1% du cholestérol pendant 19 jours. Moon et *al.*, (2010) ont rapporté des résultats similaires en observant que le vinaigre de persimmon diminue la concentration sérique du cholestérol chez les souris. Shishehbor et *al.*, (2008) ont rapporté que le vinaigre de cidre améliore le profil lipidique au niveau sérique chez des rats contrôles et diabétiques en réduisant LDL-c et TG et en augmentant le HDL-c.

Les résultats obtenus dans ce travail, suggèrent que ces vinaigres possèdent une activité hypolipémiant et pourraient avoir un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. L'augmentation du HDL-c et la diminution du CT de plasma, empêchent le développement de l'athérosclérose (Setorki et *al.*, 2010).

La triglycéridémie à jeun reflète fidèlement la production hépatique des VLDL et leur régulation par l'activité de la lipoprotéine lipase. La cholestérolémie est synonyme à la fois de production et de l'épuration hépatique du cholestérol.

Nous rappelons que la valeur des triglycérides circulants a été retenue comme étant des facteurs de risque dans le développement de l'athérosclérose. A la base de ces données, il apparait que le groupe dyslipidémique présente un trouble lipidique majeur caractérisé par une dyslipidémie à lipoprotéines VLDL d'origine hépatique.

Nous rappelons que le dosage des triglycérides a été effectué à jeun et par conséquent, ces triglycérides ne peuvent provenir que du foie et non pas de l'intestin (les chylomicrons ne sont pas impliqués dans ce statut). Les triglycérides sous l'action des hormones lipolytiques, libèrent des quantités importantes d'AGL et glycérol. Ces métabolites à leur tour, stimulent la néoglucogenèse hépatique et l'hyperglycémie via la voie de signalisation qu'emprunte la protéine kinase PKC (Jaulin-Bastard *et al.*, 2001).

Dans cette étude, on note 149,2 mg/dL du triglycéride sérique et 198,44 mg/g au niveau hépatique, ceci semble être lié au processus d'épuration des VLDL sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) et leur utilisation par les tissus périphériques. Cette enzyme endothéliale est insulino-dépendante.

Le CT dosé dans le sang à deux origines : endogène (dégradation des lipoprotéines et catabolisme des hormones) et exogène (alimentaire). Dans notre situation nutritionnelle, le jeun, le CT semble ne provenir que du métabolisme des hormones stéroïdes (cortisol, œstrogène, testostérone, aldostérone, et androgènes) et celui des lipoprotéines VLDL-c en IDL-c et LDL-c.

Le HDL-c est une fraction du cholestérol total. Certains travaux mettent l'accent sur le LDL-c comme facteur de risque majeur aux complications vasculaires (Dejager, 1998), car cette lipoprotéine est la plus exposée à l'oxydation, d'où la théorie du stress oxydatif dans la genèse de l'athérosclérose (Pentikainen *et al.*, 2000).

Chez les groupes traités, on note principalement l'augmentation du taux des HDL-C connus sous le nom du bon cholestérol, qui joue un rôle bénéfique contre les complications cardiovasculaires principalement l'athérosclérose (Delattre, 2005) et une diminution du taux des LDL-c dits mauvais cholestérol parce que leur taux élevé et persistant au niveau du sang augmente leur susceptibilité à l'oxydation par les radicaux libres (Delattre, 2005) en produisant ainsi des LDL oxydées qui entrent dans la formation des lésions athéromateuses doués de propriétés proathérogéniques très élevées (Staprans *et al.*, 2005).

La diminution du cholestérol total peut résulter de la modification du métabolisme des lipoprotéines en augmentant l'activité de la Lécithin Cholestérol Acyl Transférase (LCAT) (Hogue *et al.*, 2004) ou en augmentant l'absorption des LDL par augmentation de leurs récepteurs (Slater, 1980). Cette dernière interprétation semble être la plus proche surtout qu'on a noté une diminution significative des LDL-c.

Par ailleurs, il est important de souligner que même si les valeurs des taux des HDL-c et de LDL sont normales, les lipoprotéines LDL peuvent présenter des anomalies structurales qui favorisent l'athérogènes. Parmi celles-ci on peut citer la glycosylation, l'adjonction de

triglycérides et l'oxydation de la fraction protéique qui aboutit à la constitution de particules libres protéiques moins volumineuses et plus denses.

On estime que les particules LDL modifiés (small dense LDL) sont particulièrement actives au niveau des vaisseaux et se caractérisent par un pouvoir athérogène élevé (Dejager et *al.*, 1995). Ces LDL-c denses et de petites tailles (SDS-LDL) traversent facilement l'endothélium pour activer les macrophages au sein de la paroi vasculaire qui donnent alors naissance aux cellules spumeuses. Elles favorisent également la prolifération des cellules musculaires lisses et peuvent ainsi activer les facteurs de la coagulation.

Il existe donc chez le patient diabétique une majoration du risque athérogène. Les LDL denses et de petites tailles apparaissent à partir d'un taux de triglycérides supérieur à 1,5 g/L.

Le lien entre la dyslipidémie et maladies cardiovasculaires est particulièrement bien établi. L'élévation du Cholestérol Total et du LDL-c est associée à une augmentation du risque cardiovasculaire de façon linéaire. Une faible concentration de HDL-c peut être considérée comme un facteur de risque supplémentaire, alors qu'une concentration élevée de HDL-c est un facteur protecteur.

Dans notre étude on a enregistré un ratio de $[C \text{ Total} / HDL-C] = 2,58$ chez les rats dyslipidémique, seuil prédisposé au risque. Les rats traités par les vinaigres ont montré une diminution significative ($p \leq 0.05$). La réduction de ces indices est due à la présence des composés phénoliques et flavonoïdes dans les vinaigres (Farmer, 2007).

Ce résultat vient confirmer nos conclusions précédentes concernant le rôle préventif des vinaigres de fruit contre les complications cardiovasculaires.

Les transaminases ALAT, ASAT et Alk-p sont des enzymes hépatocytaires dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha-aminé à un acide alphacétonique.

Le dosage sanguin des transaminases est prescrit dans deux principales pathologies : les maladies hépatiques (cytolyse qui peut être en rapport avec le métabolisme des lipoprotéines, telle que la stéatose) et l'infarctus du myocarde (IDM) (Ioanno, 2006). Plusieurs études ont montré une corrélation positive entre les transaminases et le syndrome métabolique, une augmentation du ratio ALAT / ASAT est un prédicateur de l'athérosclérose (Setorki et *al.*, 2010).

Dans ce travail, le régime hypergras augmente significativement ($p \leq 0.05$) de ASAT, ALAT, et Alk-p par 1,79 ; 1,73 ; et 3 fois, respectivement chez le groupe dyslipidémique, comparé au groupe contrôle. Le vinaigre de grenade améliore significativement ($p \leq 0.05$) la fonction hépatique. Ce résultat peut être du soit à l'activité antioxydante remarquable de vinaigre

de grenade et qui a été révélée in vitro (Soltan & Shehata, 2012), soit à son action bénéfique au niveau hépatique qui sera discutée dans la partie histologique.

Les constituants azotés ou non azotés sont au nombre d'une quinzaine environ dans le sérum, mais en pratique courante, seuls trois d'entre eux sont d'une importance capitale en néphrologie : l'urée, la créatinine, et l'acide urique (Boubchir, 2002). Pour la présente étude, nous sommes intéressés aux ces trois paramètres.

L'urée est le produit final ultime du catabolisme des protéines dans le corps (Boubchir, 2002). Dans la présente étude, une augmentation de l'urée a été notée chez le groupe dyslipidémique de 100% par rapport au groupe contrôle, cela peut être expliqué par la dégradation accélérée des protéines hépatiques et plasmatiques (Sugden et Fuller, 1991) ou par l'altération de l'homéostasie de l'azote qui conduit à l'augmentation de l'élimination hépatique de celui-ci sous forme d'urée.

La balance négative observée de l'azote peut être partiellement causée par les changements qu'ont subis les hépatocytes (Almdal et *al.*, 1986). D'une autre part, l'augmentation de l'urémie à jeun peut refléter un dysfonctionnement des reins, surtout qu'elle a été utilisée pendant longtemps pour apprécier l'intensité d'une insuffisance rénale (Boubchir, 2002).

L'administration des vinaigres aux rats a diminué les taux de l'urée sanguine par 92,85% pour le vinaigre de grenade, 27,77% pour le vinaigre de figue de barbarie, et 33,33% pour le vinaigre de pomme. Ces résultats nous ont permis de suggérer le rôle prophylactique des vinaigres sur le métabolisme des protéines et son effet préventif contre les dommages hépatiques et le dysfonctionnement rénal.

La créatinine est un dérivé de la dégradation de la créatine et du phosphocréatine qui sont considérées comme des composés de stockage de l'énergie dans les muscles. La concentration de la créatinine dans le sérum peut varier selon un certain nombre de facteurs incluant le régime alimentaire, la masse musculaire et le sexe.

Elle dépend aussi de la capacité des reins à éliminer la créatinine d'où son utilisation aussi comme indicateur de l'insuffisance rénale (Boubchir et *al.*, 2002).

Généralement une augmentation de créatinine apparaît simultanément avec l'augmentation de l'azote urique sanguin. La concentration de la créatinine est considérée souvent comme un paramètre clinique pour détecter les effets toxiques reliés au traitement par des composées sur les reins chez les animaux expérimentaux (Travlos et *al.*, 1996).

Ces données peuvent expliquer l'augmentation de la créatinine chez les rats dyslipidémiques dans notre étude. Une réduction significative de ce taux en créatinine chez les

rats traités oralement par les vinaigres de grenade et de pomme pendant sept mois nous a conduit à penser soit à l'amélioration de la fonction rénale chez les rats dyslipidémiques, soit à la diminution du catabolisme de la créatine et la phosphocréatine au niveau des muscles par le biais des flavonoïdes contenant les vinaigres.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Palsamy et Subramanian, 2008) où ils ont noté un effet semblable avec le resveratrol en tant que flavonoïde chez les rats.

L'acide urique, produit ultime du catabolisme des bases puriques (Boubchir, 2002), et l'un des antioxydants hydrosolubles endogènes majeurs de l'organisme (Delattre et *al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons constaté l'augmentation significative ($p \leq 0.05$) du taux de l'acide urique chez le groupe dyslipidémique.

Modan et *al.*, (1987) ont expliqué cette augmentation soit par la production accélérée de l'acide urique, soit par la diminution de sa sécrétion. Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres, dont il augmente la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique qui prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à médier des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant (Becker et *al.*, 1993).

Dans la biologie clinique, une concentration sanguine élevée de l'acide urique est considérée comme indicateur pathologique reflétant une insuffisance rénale (Boubchir et *al.*, 2002). Le traitement des rats par le vinaigre de grenade diminue la concentration de l'acide urique par 14,66 %.

Plusieurs travaux ont indiqué une augmentation des marqueurs du stress oxydant au cours de la dyslipidémie (Poirier et *al.*, 2000 ; Saengsirisuwan et *al.*, 2001) soit par la réduction du système de défense et/ ou par l'augmentation de la peroxydation lipidique (Vijayaraj et *al.*, 2013). Le but principal de notre étude est d'évaluer l'effet des vinaigres de fruits sur la peroxydation lipidique et le statut antioxydant (les enzymes antioxydantes et le statut oligominéral) affectés par le stress oxydant associé à la dyslipidémie.

Dans la présente étude, nous avons évalué la peroxydation lipidique au niveau sérique et au niveau hépatique qui représente un site principal de tous les métabolismes énergétiques (Hamelet et *al.*, 2007).

La production des ERO et la peroxydation lipidique sont rapportées d'être augmentées chez les rats dyslipidémiques, en suggérant que la dyslipidémie provoque un déséquilibre de la balance redox, dû à l'altération du métabolisme des lipides (Vincent et *al.*, 2010), surtout qu'un

traitement associé aux antioxydants (la vitamine E et la vitamine C) a montré une amélioration significative et une prévention contre les complications cardiovasculaires (Nicolosis, 1999).

De nombreuses études mettent en exergue une relation entre l'augmentation du stress oxydant et le développement de la résistance à l'insuline (Ceriello, 2000 ; Maddux et *al.*, 2001). Ceci se caractérise par des altérations au niveau : Des récepteurs à l'insuline et de ses substrats (IRS), des transporteurs du glucose stimulés par l'insuline (notamment GLUT-4 dans le muscle) et des fonctions des cellules β -pancréatiques. Plus précisément, l'activation de la PKC entraîne une phosphorylation de résidus sérine/thréonine des IRS qui conduit à l'inactivation des récepteurs hormonaux (Shulman, 2000 ; Yu et *al.*, 2002), en inhibant ainsi la transmission du signal insulinémique et la capture cellulaire du glucose qui en découle (Shulman, 2000 ; Yu et *al.*, 2002).

Ceci est conforté par Maddux et *al.* (2001) qui ont observé sur des myotubes L6 surexprimant GLUT-4 une inhibition du transport du glucose stimulé par l'insuline après exposition de ces cellules à un stress oxydant. Enfin, dans les cellules β -pancréatiques, l'augmentation de la production d'ERO induite par l'hyperglycémie est associée à une diminution de la sécrétion de l'insuline (Maechler et *al.*, 1999 ; Sakai et *al.*, 2003).

Par ailleurs, les cellules β -pancréatiques ont un faible pouvoir antioxydant avec des enzymes antioxydantes dont les activités sont de 70% à 95% inférieures à celles du foie, ce qui les rend plus vulnérables aux ROS (Robertson et *al.*, 2004 ; Tiedge et *al.*, 1997).

De plus, la diminution de GSH observée chez les sujets diabétiques peut contribuer à l'altération de la sécrétion de l'insuline. En effet, la modification du rapport GSH/GSSG plasmatique affecte la réponse des cellules- β (Ammon et *al.*, 1989). Ainsi, une concentration plasmatique élevée en acides gras libres et en glucose peut entraîner la destruction des cellules β -pancréatiques (Evans et *al.*, 2002).

Des altérations de la fonction hépatique affectent clairement le métabolisme de l'organisme en développant des maladies métaboliques, notamment l'insulinorésistance et le syndrome métabolique. Ainsi, la compréhension des mécanismes de régulation du métabolisme énergétique hépatique est une condition préalable pour le développement de nouvelles stratégies pharmacologiques visant à traiter ces maladies.

Lors de cette étude, la peroxydation lipidique est évaluée par l'analyse des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui sont les marqueurs les plus utilisés (Camara et *al.*, 2006). Nos résultats montrent une augmentation significative ($p \leq 0.05$) des TBARS au niveau sérique et hépatique chez les rats dyslipidémiques.

L'augmentation du taux des TBARS indique l'augmentation de la peroxydation lipidique et le degré des dommages au niveau du foie. Le traitement des rats par le vinaigre de grenade a diminué significativement ($p \leq 0.05$) la formation des TBARS au niveau sérique et hépatique. Ces résultats sont clairement indicatifs de l'effet modulateur des vinaigres sur le stress oxydant. Initialement, nous avons démontré l'effet scavenger, l'activité antioxydante et anti-peroxydation lipidique des vinaigres.

Le statut antioxydant total (TAS) regroupe l'ensemble des mécanismes impliqués dans la défense anti-stress oxydant, mais aussi sans préciser la part de chacune des composantes anti-antioxydantes qui présente une défaillance. Toutefois, l'évaluation du TAS dans la dyslipidémie permet de déceler la vulnérabilité de la pathologie devant l'agression des ERO et des ERN pour prendre des mesures thérapeutiques ou nutritionnelles. Il s'agit de la peroxydation lipidique, les dérivés d'oxydation des protéines et de l'ADN.

Les données obtenues par le TAS indiquent clairement que la dyslipidémie altère la protection antioxydante. En effet, le régime hypergras diminue le TAS de 48,21 %, alors que les vinaigres de grenade et de pomme ont augmenté hautement significativement ($p \leq 0.01$) ce statut de 96,55 % et de 82,75 %, respectivement.

Cette défaillance de la protection antioxydante chez le groupe dyslipidémique est due principalement aux troubles métaboliques (cholestérol et acides gras). Nos résultats concordent avec ceux de la littérature où une partie de la TAS est expliquée par les taux élevés de Malondialdéhyde (MDA) (Carmiel-Aggee *et al.*, 2005).

En outre, l'élévation accrue des acides gras libres favorise la synthèse de céramides qui vont activer la NO synthase (Bonnefont-Rousselot, 2002). L'excès de NO formé accentue la formation du radical du monoxyde d'azote, ce qui va inhiber la cytochrome C oxydase, entraînant l'ouverture du Pore de transition de Perméabilité (PTP) de la membrane interne mitochondrial. Sous l'effet des radicaux libres, cette brèche du PTP conduit à la fuite de protons et entraîne à son tour un gonflement mitochondrial, la sortie du cytochrome C dans le cytosol et l'activation des caspases, phénomène relié à la mort des cellules.

Cependant, Les polyphénols possèdent des propriétés anti-oxydantes. Effectivement, il a été démontré qu'ils inhiberaient ou préviendraient la peroxydation lipidique et notamment la formation des Low Density Lipoprotein (LDL) oxydés (Osakabe *et al.* 2001 ; Schroeter *et al.* 2002 ; Valko *et al.* 2006 ; Wu *et al.* 2009 ; Yoshihara *et al.* 2010).

Les polyphénols présentent également un effet protecteur vis-à-vis de certaines pathologies cardiovasculaires ou de cancers (Damianaki *et al.* 2000 ; Ding *et al.* 2013 ; Valko *et al.* 2006 ; Yoshihara *et al.* 2010).

Nous venons de caractériser le stress oxydant comme étant le facteur majeur dans les effets délétères liés aux désordres nutritionnels. Afin de rétablir la balance stress oxydant/défenses antioxydantes, il paraît judicieux de renforcer les défenses naturelles de l'organisme par des apports en antioxydants exogènes, dans cette étude les vinaigres de fruits.

Les enzymes antioxydantes (SOD, GPx et GRx) et les oligoéléments (Mn, Cu et Cr) jouent un rôle clé dans la protection des cellules (Choi et *al.*, 2007). Les ERO peuvent être évaluées indirectement en mesurant les activités de ces enzymes (Chang-Quan et Gui-Qin, 2010).

Dans cette investigation, nous avons évalué la défense antioxydante enzymatique par la SOD, GPx et la GRx. Les résultats ont montré que le régime hypergras a altéré significativement ($p \leq 0.05$) l'activité antioxydante enzymatique.

L'implication de la SOD dans la pathogénie de la dyslipidémie a été incriminée dans différents travaux où il a été observée une chute très significative ($p \leq 0.01$) de son activité (Bouzidi et *al.*, 2010). Le vinaigre de grenade améliore l'activité de la SOD (7-fois), GPx (4,81 fois), et GRx (1,66 fois).

L'effondrement de l'activité antioxydante peut résulter non seulement de l'agression des produits du stress oxydant, mais aussi de l'intensification de la peroxydation lipidique, comme nous l'avons montré avec les taux de TAS effondrés.

La supplémentation avec les vinaigres réduit le stress oxydant au niveau sérique en augmentant l'activité de la SOD, GPx et GRx, et en diminuant les concentrations du MDA au niveau hépatique. Cela serait probablement dû à l'influence des composés bioactifs présents dans les fruits, tels que les flavonoïdes et leurs pouvoirs antioxydant.

D'autre part, les composés phénoliques sont connus par leurs capacités de recycler la vitamine E et de piéger les radicaux libres, ceci peut donc participer directement à une réduction de l'utilisation du GSH (Babu et *al.*, 2006).

Sudheeh et Vijayalakshmi, (1999) ont observé que les flavonoïdes de la grenade. sont efficaces dans la réduction du profil lipidique au niveau sérique et tissulaire. Dans la même étude, ils ont remarqué que les fractions riches en flavonoïdes obtenue à partir de l'extrait des fruits de *Punica granatum* L., administré oralement aux rats à la dose 10 mg/kg/jour, ont montré un effet antiperoxydatif potentiel.

Les concentrations du malondialdéhyde, des hydroperoxydes et des diènes conjugués ont été sensiblement diminuées dans le foie tandis que les activités enzymatiques de la catalase, de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GRx) ont montré une augmentation significative ($p \leq 0.05$) (Sudheeh et Vijayalakshmi, 1999).

Qiu et *al.*, (2010) ont montré que le traitement par le vinaigre de l'avoine (*Avena sativa* L.) stimule l'activité enzymatique de la SOD et de la GPx au niveau sérique et hépatique chez des souris exposés à ^{60}Co γ -irradiation.

De plus, des études réalisées chez des rats rendus dyslipidémiques et traités par le vinaigre de Shixiao San par Wang et *al.*, (2014) ont montré une augmentation de l'activité de la SOD avec 40.7% et une diminution du MDA avec 81.8% au niveau sérique.

Les vinaigres de fruit sont riches en acide organiques et en composés phénoliques (Aykin et *al.*, 2015) qui ont une activité antioxydante élevée. Thilakrathna et *al.*, (2012) et Shibani et *al.*, (2012) ont montré dans des études *in vitro* la capacité des triterpènes et des flavonoïdes de grenade et de pomme à capturer les radicaux libres de l'anion superoxyde et la chélation du fer (Fe^{2+}). Par conséquent, l'effet antioxydant de vinaigre de pomme et de grenade peut être dû à la présence de ces molécules.

Ashoush et *al.*, (2013) ont trouvé que le fruit du grenade a un effet hépatoprotecteur et suggèrent que cet effet pourrait, au moins en partie, être causé par une augmentation de la glutathion réduit (GSH) et une réduction de la peroxydation lipidique.

Par ailleurs, les travaux de Tesoriere et *al.*, (2004) ; Tesoriere et *al.*, (2005) ; Pimienta-Barrios et *al.*, (2008) ont montré que le traitement avec l'extrait du jus de fruit de figue de barbarie entraîne un effet positif dans la balance redox principalement dans la réduction des LDL oxydés.

De même, une autre étude suggère que la défense antioxydante et la réduction des dommages de la molécule d'ADN sont augmentées avec l'augmentation de la consommation de figue de barbarie, cela montre l'efficacité des constituants de ce fruit (Siriwardhana et *al.*, 2006).

Le stress oxydant peut résulter d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (la ferritine et la transferrine). De nombreuses études ont montré que la production d' $^{\circ}\text{OH}$ dépend largement de la présence de fer susceptible d'agir en tant que catalyseur des réactions radicalaires.

Toutefois, il est un élément constitutif essentiel de l'hémoglobine et de divers enzymes tels que : cytochrome oxydase, catalase, ribonucléotide réductase, xanthine oxydase. Dans le plasma, le fer est transporté par la transferrine grâce à son interaction avec un récepteur membranaire spécifique (TfR).

Le statut martial a été exploré dans ce travail par le fer sérique, la ferritine et la transferrine. On note une diminution significative ($p \leq 0.05$) du fer sérique et de la ferritine chez le groupe hyperlipidémique. Plusieurs études montrent les anomalies du statut martial qui sont décrites sous la définition d'hépatosidérose dysmétabolique (SHDM), se trouve dans la stéatose

hépatique non alcoolique, l'obésité, et les dyslipidémies (Georges et *al.*, 1999 ; Younossi et *al.*, 1999).

Les oligoéléments tels que le manganèse (Mn), le cuivre (Cu), le chrome, le zinc (Zn) et le sélénium (Se) sont des cofacteurs indispensables aux réactions métaboliques d'enzymes antioxydantes, principalement la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes sont présentes dans tous les tissus.

Toutefois, leur localisation dans les compartiments cellulaires est différente. La SOD-Mn est mitochondriale, la SOD-Cu/Zn est cytosolique et GPx-Se se trouve dans les deux compartiments.

Dans cette étude, le régime hypergras maintient stables les concentrations en cuivre et en manganèse vs groupe contrôle. Cette donnée peut s'expliquer par un effet compétitif entre le manganèse et le fer sur la transferrine ou sidérophiline, puisqu'ils sont transportés par la même protéine. Ce qui explique la mobilisation du fer qui en se fixant à la transferrine, maintient le Mn à l'état libre (Fitsanakis et *al.*, 2010).

Cependant, le fer est prooxydant quand il est sous forme libre et réduit, alors que le Mn est antioxydant. Le Mn s'incorpore dans l'arginine synthase, favorise la production du NO et devient un modulateur de la fonction endothéliale vasculaire (Klimis-Zacas et Kalea, 2008).

De même, le manque de la biodisponibilité de Mn dans les tissus riches en mitochondries, rend la SOD-Mn inactive, ce qui peut aggraver les effets du stress oxydant.

Le cuivre est impliqué dans l'inhibition du stress oxydant, intégré dans la Cu-SOD pour la protection du cytosol. Dans cette étude le cuivre maintient le même niveau entre le groupe contrôle, dyslipidémique et traité par le vinaigre de grenade.

Le chrome agit comme facteur de tolérance glucidique sur la glucorégulation), en favorisant l'insulinosensibilité, particulièrement au niveau du muscle squelettique. En effet, le chrome trivalent est un potentialisateur de l'insuline. Son mode d'action passe par une augmentation du nombre de récepteurs de l'insuline, une modification de la liaison insuline/récepteur, une augmentation de l'internalisation de l'insuline et une activation de la translocation des transporteurs du glucose Glut4 et Glut1 (Qiao et *al.*, 2009).

La liaison de l'insuline à la sous-unité α de son récepteur est induite par une cascade de réactions de phosphorylation catalysées par la tyrosine kinase qui est activée par le Cr, alors que la phosphotyrosine phosphatase, qui inactive le récepteur de l'insuline, est inhibée par le Cr (Vladeva et *al.*, 2005).

Certains travaux ont montré que la déficience en Cr est associée à une hyperglycémie et une insulino-résistance, à une dyslipidémie (diminution du HDL-c, augmentation des triglycérides et de la Lp(a)).

Une étude a montré que Mn amélioré la synthèse du cholestérol dans le foie et une l'hypercholestérolémie a été rapportée dans le cas d'une carence en Mn (Tajik et Nazifi, 2010).

L'étude histologique du parenchyme hépatique a montré différents aspects de dommages et à différents degrés chez le groupe dyslipidémique par la présence d'une stéatose micro et macrovésiculaires et un recrutement adipocytaire au niveau des vaisseaux sanguins mais également un dépôt de collagène qui confirme une fibrose et une infiltration de cellules immunitaires.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le dosage de la fonction hépatique et les valeurs de TBARS au niveau hépatique. Une étude menée chez le rat Wistar soumis à un régime hypergras a montré la présence d'une stéatose hépatique associée à une peroxydation lipidique (Feillet-Coudray et *al.*, 2009).

Chez les rats traités, les vinaigres de grenade et de pomme préviennent la stéatose hépatique. Nos résultats concordent avec ceux d'une étude de Ashoush et *al.*, (2013) qui ont démontré que le traitement avec l'extrait de la grenade (10mL/kg) réduit la stéatose hépatique associée à une amélioration de l'inflammation, chez un modèle animal de NASH.

Néanmoins, le traitement avec le vinaigre de figue de barbarie n'a pas réussi à prévenir toutes les lésions puisque quelques foyers inflammatoires demeurent au sein du foie des rats VFB, en rapport probablement avec la dose ou la préparation du vinaigre.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude vise à évaluer d'une part le potentiel néfaste d'un régime hypergras et d'autre part montrer les effets bénéfiques des vinaigres de fruit. Pour mener à terme notre investigation une étude phytochimique a été réalisée sur les vinaigres et une étude biologique a été faite sur un modèle animal rendu dyslipidémique durant 7 mois. L'exploitation des paramètres biochimiques, marqueurs de stress oxydant et l'étude histologique du foie ont été évalués. Les résultats obtenus peuvent être résumés dans les points suivants :

- ✓ Les vinaigres de fruits sont très riches en acides organiques et en composés bioactifs notamment les acides phénoliques, les tannins, les saponosides, les flavonoïdes et les triterpènes.
- ✓ Les rats soumis à un régime hypergras montrent une augmentation significative du poids corporel et l'indice hépato-somatique. En revanche, le traitement par les vinaigres de grenade et de pomme a stabilisé ces deux paramètres étudiés par rapport au groupe contrôle.
- ✓ Sur le plan biochimique, le régime hypergras s'est manifesté par un déséquilibre métabolique essentiellement marqué par une hypercholestérolémie, une hypertriglycémie et une augmentation significative du bilan hépatique et rénal. Cependant, l'administration des vinaigres de fruit a restauré les paramètres biologiques à leur valeur normale, par rapport aux rats contrôles.
- ✓ Les rats soumis au régime hypergras développent une augmentation du taux sérique et tissulaire de MDA et diminution de l'activité enzymatique antioxydante (SOD, GPx et GRx) avec un effondrement du statut antioxydant total (TAS). Ces paramètres ont été corrigés par la supplémentation des vinaigres.
- ✓ Les coupes histologiques réalisées sur le foie, permettent de confirmer l'effet cytoprotecteur des vinaigres de fruit par la régénération des hépatocytes.

Le régime hypergras a altéré plusieurs paramètres incluant biochimiques et en particulier les marqueurs du stress oxydant. Ce dernier est un syndrome qu'il convient mettre en évidence vu son implication dans plusieurs pathologies. Les antioxydants naturels sont considérés comme une thérapie idéale pour faire face au stress oxydant.

Le vinaigre de fruit est l'un des condiments utilisés par l'humain pour ses propriétés culinaires et médicinales et sa richesse en composés actifs capables de piéger les radicaux

libres et d'inhiber les processus d'oxydation, mais aussi la présence des éléments minéraux indispensables pour le fonctionnement des enzymes antioxydantes.

Pour conclure, l'effet des vinaigres de fruit est bénéfique pour l'organisme si une utilisation rationnelle est préconisée. Un apport adéquat du vinaigre dans notre régime alimentaire serait avantageux sur notre santé.

Il serait souhaitable d'approfondir cette étude en concevant un aliment fonctionnel ou nutraceutique permettant de prévenir ce type de pathologie en n'ayant pas recours à l'utilisation des médicaments qui ont des effets plus néfastes que bénéfiques.

Sur le plan nutraceutique et biomédical

- Extraire des huiles essentielles à partir des graines de la figue de barbarie et de grenade, riches en acides gras polyinsaturés de la série oméga 3 et oméga 6.
- Identifier les biomolécules à principe actif antioxydant et antiagrégant contenus dans les huiles essentielles de la figue de barbarie et de grenades pour les incorporer dans les milieux nutritifs et pour les suppléments nutritionnelles.

Sur le plan expérimental

- Tester sur des modèles expérimentaux (rat du sable ou gerbilles désertiques), du diabète de type 2, d'athérosclérose et de pathologies rhumatoïdes les extraits bioactifs contenus dans les huiles essentielles de figue de barbarie et de grenade. L'hypothèse est de tester si les huiles de ces 02 fruits peuvent être préventifs de l'hyperglycémie patente du sujet prédisposé au diabète (obèse, familles de diabétiques) et à l'hypertension artérielle.
- Tester les extraits bioactifs contenus dans les vinaigres de figue de barbarie et de grenade sur l'agrégation plaquettaire, les ischémies, les sténoses et les thromboses (action sur le retour veineux).

Sur le plan cellulaire et moléculaire

- Tester les extraits bioactifs contenus dans les huiles essentielles de figue de barbarie et de grenade sur le stress oxydatif au niveau mitochondrial (chaîne respiratoire) vasculaire.
- Tester les extraits bioactifs sur la relaxation endothéliale, en particulier les effets sur le métabolisme du monoxyde d'azote et la NADPH oxydase.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Azim SH, Hassan AM, Abdel-Wahhab MA. Dietary supplementation with whey protein and ginseng extract counteract the oxidative stress and DNA damage in rats fed aflatoxins-contaminated diet. *Mutation Research* 2011; 723: 65-71.

Aguiar A, Nasciment RAA, Ferretti LP, Gonçalves AR. Determination of organic acids and ethanol in commercial vinegars. *Braz J Food Technol* 2005; 5: 1-6.

Akuyam SA, Isah HS, Ogala WN. Evaluation of serum lipid profile of underfive Nigerian Children. *Annals of African medicine* 2007; 6(3): 119-123.

Allain P. Hypolipémiant. In : Les médicaments. 3^{ème} édition. Bouchemaïne : Cdm Editions 2000 ; 434-437.

Almdal TP, Petersen KF, Hansen BA, Vilstrup H. Increased capacity of urea synthesis in streptozotocin diabetes in rats. *Diabetologia* 1986; 29: 812-816.

Alonso AM, Castro R, Rodriguez MC, Guillen DA, Barroso CG. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Res Intl* 2004; 37: 715-21.

Al-Waili N, Salom, K, Al-Ghamdi AA. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its clinical practice. *Scientific World Journal* 2011; 11: 766-787.

Alzoreky N, Nakahara K. Antioxidant activity of some edible yemeni plants evaluated by ferrylmyoglobin/ABTS assay. *Food Sci. Technol. Res.* 2001; 7: 141-144.

Ammon H.P., Klumpp S., Fuss A., Verspohl E.J., Jaeschke H., Wendel A., Muller P. A possible role of plasma glutathione in glucose-mediated insulin secretion: in vitro and in vivo studies in rats. *Diabetologia* 1989; 32: 797-800.

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2005; 70: 200-14.

Aouba A., Eb M., Rey G., Pavillon G., Jouglé E. Données sur la mortalité en France : principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. *BEH* 2011 ; 22, 249-260.

Arcoleo A, Ruccia M, Cusmano S. Sui pigmenti flavonici delle Opuntiae. Nota 1. Isorhamnetina dai fiori di *O. ficus-indica* Mill. *Ann Chim* 1961 ; 51:751-758.

Arii K, Suehiro T, Yamamoto M, Ito H, Hashimoto K. Suppression of plasma cholesteryl ester transfer protein activity in acute hyperinsulinemia and effect of plasma nonesterified fatty acid. *Metabolism* 1997; 46: 1166-70.

Arnaud J, Bellanger J, Bienvenu F, Chappuis P, Favier A. Recommended method for assaying serum zinc with flame atomic absorption. *Ann Biol Clin* 1986; 44: 77-87.

Aruoma OI, Spencer JPE, Butler J, Hlliwel B. Commùentary reaction of plant derived and syntitic antioxidants whith trichloromethylperopxyl radicals. *Free rad. Res.* 1995; 22: 187-190.

Ashoush IS, El-Batawy OI, El-Shourbagy. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats. *Annals of Agricultural Science* 2013; 58(1): 27-32.

Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002; 105: 310-5.

Atta N.F., El-Kady M.F. Novel poly (3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids. *Sens. Actuators B* 2010; 145 : 299-310.

Aykin E, Budak NH, Guzel-Seydim ZB. Bioactive components of mother vinegar. *Journal of the American college of nutrition* 2015; 34: 80-89.

Aytan N, Jung T, Tamturk F, Grune T, Kartal Ozer N. Oxidative stress related changes in the brain of hypercholesterolemic rabbits. *Biofactors.* 2008; 33: 225–236.

Babu PVA, Sabitha KS, Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 162: 114-120.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120, 483-495.

Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649–683.

Baratto M.C., Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Romani A., Visioli F., Basosi R., Pogni R. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free Radical Research* 2003; 37: 405–412.

Barja G. The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2002; 34: 227-233.

Barouki R. Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* 2006 ; 3(22) : 266-72.

Bartness TJ, Polk DR, McGriff WR, Youngstrom TG, DiGirolamo M. Reversal of high-fat diet-induced obesity in female rats. *Am J Physiol* 1992; 263: 790-797.

Baskin SI, Salem H. Oxidant, antioxidant and free radicals. *Academic press Inc* 1994; 363: 25-62.

Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405–412.

Beaudeux JL, Dominique BR. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. *Edition médicale internationale* 2005 ; 550.

- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic boil Med* 1993; 14: 615-13.
- Bec-Roche M, Fredenrich M. Hypertriglycérémie: le risque de pancréatite aiguë, *EMC* 2008; 2(6) : 608-611.
- Beheshti Z, Chan YH, Nia HS, Hajihosseini F, Nazari R, Shaabani M, Omran MTS. Influence of apple cider vinegar on blood lipids. *Life science journal* 2012; 9(4): 2431-2441.
- Bell LM, Watts K, Siafarikas A, Thompson A, Ratnam N, Bulsara M, Finn ., O'Driscoll G, Green DJ, Jones TW, Davis EA. Exercise alone reduces insulin resistance in obese children independently of changes in body composition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(11): 4230-5.
- Berger M. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nut. Clin et Mét.* 2006; 20: 48-53.
- Berrouiguet A, Benyoucef M, Meguenni K, Brouri M. Prevalence of cardiovascular risk factors: A survey at Tlemcen (Algeria). *J Epidémiol.* 2009; 3: 313-319.
- Berthelot MPE. Antioxidant status in diabetic rat liver. Effects of vanadate. *Biochem Pharmacol* 1998; 45(3): 539-42.
- Berti L., Mosthaf L., Kroder G., Kellerer M., Tippmer S., Mushack J., Seffer E., Seedorf K., Haring H. Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 3381-3386.
- Bertrand P. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, spécialité : *écotoxicologie*. 2008 : 17-29.
- Bezzera RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J. Nutr* 2000; 130 : 1531-1535.
- Bisbal C, Lambert K, Avignon A. Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2010; 13: 439-446.
- Bjornsdottir K, Breidit JF, McFeeters RF. Protective effect of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. *Appl Environ Microbiol* 2006 ; 72: 660-4.
- Blackburn CV, McClure PJ. 2002. Modeling the growth, survival and death of bacterial pathogens in food, Kinetic growth models. In: Blackburn CV, editor. Foodborne pathogens. New York: WoodHead Publishing 2002; 56-72.
- Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002 ; 32(3) :14-23.
- Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Met Care* 2002; 5: 561-68.

- Booth IR, Kroll RG. The preservation of foods by low pH. In: Gould GW, editor. Mechanisms of action of food preservation procedures. New York: Elsevier Science Publishers 1989. 119–60.
- Boubchir MA. Biochimie de néphrologie 2002. 2ème ed. 2002 ISBN-00-789-23:320.
- Bourre JM. Radicaux libres, acides gras polyinsaturés, mort cellulaire, vieillissement cérébral. *C R Soc Biol* 1988 ; 182: 5-36.
- Bouzidi N, Mekki K, Boukaddoum A, Dida N, Kaddous A, Bouchenak M. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on redox status in chronic renal failure patients with dyslipidemia. *Journal of renal nutrition* 2010; 20(5); 321-328.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem* 1973; 134: 707-716.
- Boyer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* 2004; 3 (5): 5-19.
- Brownlee H, Hedjer J, Scott I. Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Phys. Mol. Plant pathol.* 1992; 40: 227-232.
- Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanism. *Intl J Food Microbiol* 1999; 50: 1–17.
- Bruneton J. Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier 1993. 278-279.
- Buchanan RL, Edelson SG. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 4009–13.
- Budak HN, Kumbul Doguc D, Savas CM, Seydim AC, K˘ok Tas T, Ciris IM, G˘uzel-Seydim ZB. Effects of apple cider vinegars produced with different techniques on blood lipids in high-cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 6638–44.
- Budak NH, Aykin E, Seydim AC, Greene AK, Guzel-Seydim BZ. Functional properties of vinegars. *Journal of Food Science* 2014; 79(5): 757-764.
- Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 2000; 14: 323- 328.
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(5): 1269-1276.
- Cadenas E, Davies JA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222-230.

- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Journal of Life Sciences* 2004; 74, 2157-2184.
- Caligiani A, Acquotti D, Palla G, Bocchi V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution H NMR spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2007; 585:110–19.
- Calop J, Limat S, Fernandez C. Pharmacie clinique et thérapeutique. 3^{ème} édition. Paris : Elsevier Masson, 2008 ; 443-460.
- Capewell S, Ford E, Croft J, Critchley J, Greenlund K, Labarthe D. Cardiovascular risk factor trends and potential for reducing coronary heart disease mortality in the United States of America. *W Health Organ.*, 2010; 88: 120-130.
- Carlson LA, Hallberg D, Micheli H. Quantitative studies on the lipolytic response of human subcutaneous and omental adipose tissue to noradrenaline and theophylline. *Acta Med Scand.* 1969; 185(6): 465-9.
- Carmiel-Haggai M., Cederbaum A.I., Nieto N. A high fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* 2005; 19 : 136-138.
- Castelli WP, Doyle JT, Gordon T, Hames CG, Hjortland MC, Hulley SB, Kagan A, Zukel WJ. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease: the cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation.* 1977; 55: 767-772.
- Ceriello A. . The possible role of postprandial hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia*, 2003; 46(1): 9-16.
- Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000; 49: 27-29.
- Chait A, Bierman EL, Albers JJ. Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. *J Clin Invest* 1979; 64: 1309–19.
- Chanda S., Dave R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2009; 3: 981-996.
- Chang J, Fang TJ. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. *Food Microbiol* 2007; 24: 745–51.
- Chang-Quan W, Gui-Qin Y. Betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine* 2010; 10: 527-532.
- Cheng HY, Ye RC, Chou CC. Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *Food Res Intl* 2003; 36: 49–56.

Choi SW, Yeon JT, Park KI, Lee CH, Youn BS, Oh J. Biological activities of the extracts from fruit and stem of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*) 2. Effects on dietary induced hyperlipidemia. *Korean J Pharmacol* 2002; 33: 230–237.

Choi MK, Chae KY, Lee JY, Kyung KH. Antimicrobial activity of chemical substances derived from s-alk (en) yl L-cysteine sulfoxide (alliin) in garlic, *Allium sativum*. *Food Sci Biotechnol*. 2007; 16: 1-7.

Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydatons. *OCL* 2006 ; 13(1) : 24-29.

Cocchi M, Durante C, Garndi M, Lambertini P, Manzini D, Marchetti A. Simultaneous determination of sugars and organic acids in aged vinegars and chemometric data analysis. *Talanta* 2006 ; 69: 1166–75.

Collier A, Wilson R, Bradley H. Thomson IA: Small M. Free radicals activity in type II diabetes. *Diabetic Med* 1990; 7: 27-30.

Colin-Henrion M, Renard CMGC, Richomme, P, Jourjon F, Mehinagic E. From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall polysaccharides. *Food Chemistry* 2009; 117: 254–260.

Combettes-Souverain M, Issad T. Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab.*, 1998; 24, 477–489.

Damianaki A, Bakogeorgou E, Kampa M, Notas G, Hatzoglou A, Panagiotou S, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2000; 78(3): 429-441.

Das H, Wong J, Lien E. Carcinogenicity and cancer prévening acntivitis of flavonoides: A structure-system-activity-relationship (SSAR) analysis 1994; 1-200.

Davignon J. Pleiotropic effects of pitavastatin. *Br J Clin Pharmacol* 2012; 73: 518-35.

Dawber T, Knanel W, Revotskie N, Kagan A. The Epidemiology of Coronary Heart Diseases. The Framingham Enquiry, *Proc R Soc Med* 1962; 55(4): 265–271.

Deepa V.S., Kumar P.S., Latha S., Selvamani P., Srinivasan S. . Antioxidant studies on the ethanolic extract of *Commiphora* spp. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8 (8): 1630-1636.

Dejager S, Gerber S, Foubert L, Turpin G. Sheehan's syndrome: differential diagnosis in the acute phase. *J Inter Med* 1998; 244: 261-6.

De Oliveira M, Sampaio M, Simon F, Gibert B, Mors W. Antitumor activity of condensed flavenols. *An. Acad. Brazil* 1972; 41-44.

Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. *Edition médicale internationale*. 2005 ; 1-587.

- Delattre J. Radicaux libres et stress oxydant ed 2005: TECDOC. Londres-paris –new york.: 620
- Didray N, Pinkas M, Torck M, DuBreuil L. Components and activity of Tussilago farfara. *Ann Pharm Fr* 1982; 40: 75-80.
- Dietary Approaches that Delay Age-Related Diseases Lee H.S, Won N.H, Kim H.H, Lee H.J, Yun W.J, Lee K.W. Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebularin* vivo and in vitro. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1639-1644.
- Ding Y, Yao H, Yao Y, Fai LY, Zhang Z. Protection of dietary polyphenols against oral cancer. *Nutrients* 2013; 5(6): 2173-2191.
- Dohar JE. Evolution of management approaches for otitis externa. *Pediatr Infect Dis J* 2003 ; 22: 299–308.
- Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 4563-4569.
- Dornas W, Oliveira T, Franklin Augusto L, Nagem T. Experimental atherosclerosis in rabbits. *Arq Bras Cardiol.* 2010; 95: 272-278.
- Duan XJ, Zhang WW, Li XM, Wang BG. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga. *Polysiphoniaurceolata*. *Food Chem* 2006; 95(1):37-43.
- Duez H., Lamarche B., Uffelman K.D., Valero R., Cohn J.S., Lewis G.F. Hyperinsulinemia Is Associated With Increased Production Rate of Intestinal Apolipoprotein B-48–Containing Lipoproteins in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 1; 1-8.
- Duh PD, Tu YY, Yen GC. Antioxidant activity of the aqueous extract of Harn Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 1999; 32: 269-77.
- Durackova Z, Djrolo F, HOUNGBE H, AVODE G, ATTLOULOU V, ADDRA B, KODJOH N, AVIMADJ M. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdzakova A (ed). 1997; 19-43.
- Durackova Z., Djrolo F., HOUNGBE H., AVODE G., ATTLOULOU V., ADDRA B., KODJOH N., AVIMADJ M. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdzakova A (ed). 2008; 19-43.
- Elhilaly J, Tahraoui A, Israili ZH, Lyoussi B. Hypolipidemic effects of acute and subchronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. Whole plant in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 105: 441-448.
- Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chishoim DJ, Kraegen EW, Cooney W. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: 554-560.
- Entani E, Asai M, Tsujihata S, Tsukamoto Y, Ohta M. Antibacterial action of vinegar against

food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* 1998; 61: 953–9.

European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal* (2007) 28, 2375–2414.

Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 599-622.

Evans M.J., Maddux B.A., Goldfine I.D. The molecular basis for oxidative stress induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal*, 2005; 7: 1040-1052.

Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr* 2000; 72: 647-652.

Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidative systems. *Free Radical Biology Medicine*, 46: 624-632.

Ferrari CKB. Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal* 2001; 8: 175-184.

Fineman MS, Koda JE, Shen LZ, Strobel SA, Maggs DG, Weyer C, Kolterman OG. The human amylin analog, pramlintide, corrects postprandial hyperglucagonemia in patients with type 1 diabetes. *Metabolism* 2002; 51(5): 636-641.

Fitsanakis V.A., Zhang N., Garcia S., Aschner M. Manganese (Mn) and iron (Fe): interdependency of transport and regulation. *Neurotox Res* 2010 ; 18(2): 124–131.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.

Fon Tacer K, Kuzman D, Seliskar M, Pompon D, Rozman D. TNF- α interferes with lipid homeostasis and activates acute and pro-atherogenic processes. *Physiol. Genomics*. 2007; 31(2): 216-227.

Fridovich I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochem Photobiol*. 1978 ; 28(4-5) :733-41.

Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brolin RE. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J Clin Invest* 1993; 92: 2191–8.

Friedwald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S., Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

Fushimi T, Suruga K, Oshima Y, Fukiharu M, Tsukamoto Y, Goda T. Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol- rich diet. *Br J Nut* 2006; 95: 916–24.

Galati EM, Mondello MR, Giuffrida D, Dugo G, Miceli N, Pergolizzi S, Taviano MF. Chemical characterization, biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 4903–4908.

García Parrilla M.C., Heredia F.J., Troncoso A.M. Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging. *Food research international* 1999; 32: 433-440.

Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet and metabolic diseases. *Current opinion in lipidology* 2008; 19, 63-68.

Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2000; 10: 38-44.

Golay A, Zech L, Shi MZ, Chiou YAM, Reaven GM, Chen YDI. High density lipoprotein (HDL) metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus: measurement of HDL turn over using tritiated HDL. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 512–8.

Gordon MH. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: Hudson, B.J.F. (Ed.), *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, Chapter 1, London and New York 1990: 1–18.

Goudable J1, Favier A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol* 1997; 11: 115-20.

Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F. The ‘neuroadrenergic hypothesis’ in hypertension: current evidence. *Experimental Physiology* 2010 ; 95(5) : 581–586.

Grimaldi A, Dyslipidémie et athérogenèse, Editions Elsevier, Paris, 2004; 241.

Gupta RK, Kesari AN, Diwakar S, Tyagi A, Tandon V, Chandra R, Watal G. *In vivo* evaluation of ant-oxidant and anti-lipidimic potential of annona scanosa aqueus extract in type 2 diabetic models. *Journal of ethnopharmacology* 2008; 118: 21-25.

Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free radial biology & Medicine* 2009; 46: 531-542.

Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide. *TRENDS in biochemical sciences* 2006; 31(9): 509-15.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3^{ème} edition, Oxford University Press, 1999.

Hamelet J, Demuth K, Paul J. Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *J Hepatology* 2007; 46: 151–9.

Harbis A, Perdreau S, Vincent-Baudry S, Charbonnier M, Bernard MC, Raccach D, Senft M, Lorec AM, Defoort C, Portugal H, Vinoy S, Lang V, Lairon D. Glycemic and insulinemic meal responses modulate postprandial hepatic and intestinal lipoprotein accumulation in obese, insulin-resistant subjects. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 896–902.

Harborne JB. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall Thomson Science (UK); 3ème ed.1998: 203-234.

Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*1997 ; 99: 2173-82.

Hayase F, Kato H. Antioxidative components of sweet potatoes.*J Nutr Sci Vitaminol*. 1984; 30(1): 37-46.

Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A. Antiradicalactivity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry* 2006; 99: 464–469.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer* 1993; 20: 21–29.

Higashi Y, Maysuoka H, Umei H, Sugano R, Fujii Y, Soga J, et al. Endothelial function in subjects with isolated low HDL cholesterol: role of nitric oxide and circulating progenitor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 298: 202–209.

Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(6): 1841–1856.

Ikewuchi JC, Ikewuchi CC. Alteration of plasma lipid profiles and atherogenic indices by *Stachytarpheta jamaicensis* L. (Vahl). *Biokemistri* 2009; 21(2): 71-77.

Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G. Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br J Nutr* 2000; 84: 377-385.

Jaulin-Bastard F., Saito H., Le Bivic A., Ollendorff V., Marchetto S., Birnbaum D., Borg J.P. The ERBB2/HER2 receptor differentially interacts with ERBIN and PICK1PSD-95/DLG/ZO-1 domain proteins. *J Biol Chem*. 2001; 276: 15256–15263.

Jayaprakash GK, Selvi T, Sakariah KK. Antimicrobial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International* 2003; 36: 117–122.

Jenkins AJ, Hill MA, Rowley KG. Diabetes and Oxidant Stress. Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective. Holtzman J.L (ed). 2007; 123-160.

Jian B, de la Llera-Moya M, Ji Y, Wang N, Phillips MC, Swaney JB, Tall AR, Rothblat GH. Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 5599–606.

Johnston, C. S., Kim, C. M. , Buller, A. J. .Vinegar improves insulin sensitivity to a high carbohydrate meal in subjects with insulin resistance or type-2 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27: 281- 282.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8: 1865-1879.

- Kamada C, Da Silva E, Ohnishi-Kameyama M, Moon J, Tero J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radical Research* 2005; 39: 185–194.
- Kanatt SR, Chander R, Sharma A. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2010; 45: 216–222.
- Kang M.J, Lee EK, Lee SS. Effects of two P/S ratios with same peroxidiz-ability index value and antioxidants supplementation on serum lipid concentration and hepatic enzyme activities of rats. *Clinica Chimica Acta* 2004; 350:79–87.
- Karaman S, Baskan KS, Apak R, Tutem E. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. *Food Chemistry* 2010; 120: 1201–1209.
- Kawasaki T, Kashiwabara A, Sakai T, Igarashi K, Ogata N, Watanabe H, Ichiyanagi K, Yamanouchi T. Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance innormal male rats. *Br J Nut* 2005; 93: 613–618.
- Kayamori F, Igarashi K. Effects of diet arynasunin on the serum cholesterol level inrats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1994; 58: 570–571.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365(9455): 217–23.
- Kehrer J.P. Free radcals as mediators of tissue injury and disease. *Critical review in toxicology*, 1993; 23 (1): 21–48.
- Kissebah AH, Peiris AN. Biology of regional body fat distribution: relationship to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1989; 5: 83–109.
- Klein DE, Nappi VM, Reeves GT, Shvartsman SY, Lemmon MA. Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration. *Nature* 2004; 430: 1040–1044.
- Klimis-Zacas D., Kalea A.Z. Manganese: modulator of arterial function and metabolism. *In:Cell biology and toxicology* 2008; 1: 345 - 349.
- Koda J.E. , Fineman M. , Rink T.J. , Dailey G.E. , Muchmore D.B. , Linarelli L.G. Amylin concentrations and glucose control. *Lancet* 1992; 339 (8802): 1179–1180.
- Kondo T, Kishi M, Fushimi T, Ugajin S, Kaga T. Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009; 73(8), 1837–1843.
- Krebs M, Roden M. Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes Obes Metab*, 2005; 7: 621–32.
- Kreofsky T, Scalager G, Vuk-Pavlovic Z, Abraham R, Rohrabach M. Condensed tannins promotes the release of arachidonic acid from rabbit residents alveolar macrophages. *Am J. Resir. Cell. Mol. Boil.* 1992; 7: 172–181.

Lachman J, Orsak M, Pivec V. Antioxidant contents and composition in some fruits and their role in human nutrition. *Horticultural Science* 2000a; 27: 103–117.

Lachman J, Orsak M, Pivec V, Kucera J. Effect of the year and storage on ascorbic acid content and total polyphenol content in three apple varieties. *Czech Journal of Food Sciences* 2000b; 18: 71–74.

Laight DW, Carrier MJ, Anggård EE. Investigation of oxidant stress and vasodepression to glyceryl trinitrate in the obese Zucker rat in vivo. *Br J Pharmacol* 1998 ; 125 : 895-901.

Laranjinha J, Almeida L, Madeira V. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low-density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 1994;48: 487-494.

Lee HS, Won NH, Kim HH. Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebular* in vivo and in vitro. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1639–44.

Lee JH, Cho HD, Jeong JH, Lee MK, Jeong YK, Shim KH, Seo KI. New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model. *Food Chemistry* 2013, 141: 3241-3249.

Leontowicz H, Gorinstein S, Lojek A, Leontowicz M, Ciuż M, Soliva-Fortuny R, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S, Martin-Belloso O. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *J Nutr Biochem* 2002; 13(10): 603-610.

Lewington S. , Whitlock G. , Clarke R., Sherliker P., Emberson J., Halsey J., Qizilbash N., Peto R., Collins R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: A meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 2007; 370(9602): 1829-1839.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 201-229.

Li BB, Smith B, Hossain MDM. Extraction of phenolics from citrus peels. *Separat Purif Technol* 2006; 48: 182-188.

Liu F, He Y. Application of successive projections algorithm for variable selection to determine organic acids of plum vinegar. *Food Chem* 2009; 115:1430–36.

Luc G, Lecerf JM. Les dyslipidemies, Editions Masson, Paris, 2002.

Luc G. Mécanismes d'action des fibrates et des statines : quelles nouveautés ? *Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction*, 2002 ; 4 : 232-8.

Maataoui BS, Hmyene A, Hilali S. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. 2006 (1): 3-8.

Mabry TJ, Ulubelen A. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids,

coumarins and lignans. *J. Agric Food Chem.* 1980 ;28: 188-196

Macheix JJ, Fleuriot A, Jay Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux 2005; ISBN2-88074-625-6.

Mackay J, Mensah G (2003). The atlas of heart disease and stroke. The World Health Organization. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 ; 25:29-38.

Maddux BA, See W, Lawrence JC, Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 2001; 50: 404-410.

Madrigal-Carballo S, Rodriguez G, Krueger C, Dreher M, Reed J. Pomegranate (*Punica granatum* L.) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenols composition. *J. Funct. Foods* 2009; 1: 324–329.

Magnan C. Lipotoxicité et insulino-résistance. *Nutrition clinique et métabolisme* 2006 ; 20 : 108-113.

Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*. 2008; 134(6): 1641-54.

Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H. Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes* 1998; 47: 779–87.

Martoja R, Martoja M. .Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris 1967 ; 1-331.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C. . Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28, 412–419.

Mazzone T, Foster D, Chait A. In vivo stimulation of low-density lipoprotein degradation by insulin. *Diabetes* 1984; 33: 333–8.

McCord JM, Fridovich Y. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.

Meddleton E, Kardasinski JC. The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London 1993; 617-652.

Michalik L, Auwerx J, Berger J. International union of pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, *Pharmacological Reviews* 2006; 58(4): 726-741.

Millagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves

increased liver oxidation stress. *Obesity* 2006; 14(7): 1118-1123.

Modan M, Halkin H, Karasik A, Lusky A. Elevated serum uric acid-a facet of hyperinsulinaemia. *Diabetologia*; 1987; 30: 713-8.

Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases. *Marcel Dekker* 1998; New-York.

Moon YJ, Choi DS, Oh SH, Song Y-S, Cha Y-S. Effects of persimmon-vinegar on lipid and carnitine profiles in mice. *Food Sci Biotech* 2010; 19: 343-8.

Morales ML, Gonzalez AG, Troncoso AM. Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. *J Chromatogr A* 1998; 822: 45-51.

Moussard C. .Biochimie structural et métabolique. 2^{ème} Edition. Editions De Boeck, Bruxelles, 2002 ; 448.

Muller S, Konig I, Meyer W, Kojda G. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by Eccentric Isosorbide Mononitrate. *J Am Coll Cardiol.*,2004; 44: 624-631.

Murra Y, Granne R, Rodwel L, Biochimie de Harper, 27eme edition. Editions De Boeck, Bruxelles, 2008, 848.

Nasar M, Jarrari A, Subhani T, Shetty B, Shakeel F. .Antioxidant status of atorvastatin in hypercholesterolemic patients. *J Chem Soc* 2009; 74: 1063-1073.

Natarajan P, Ray KK, Cannon CP. .High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55: 1283-1299.

Negi PS, Jayaprakasha GK. Antioxidant and antibacterial activities of Punica granatum peel extracts. *Journal of Food Science* 2003; 68: 1473-1477.

Nehlig A. Effets physiologiques du café et santé humaine. *Cah Agric* 2012 21 ; 2(3) : 1-11.

Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology.* 2010 ; 52(2):774-88.

Nicolosi RJ, Lawton CW, wilson TA. Vitamin E reduced plasma LDL-C, LDLoxidation, and early aortic atheroscleroris compared with black tea in hypercholesterolemic Hamsters. *Nutrition research* 1999; 19(8): 1201-1214.

Nitenberg A. Hypertension, endothelial dysfunction and cardiovascular risk. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2006; 99(10): 915-21.

Noda Y, Berlett BS, Stadtman ER, Aponte A, Morgan M, Shen RF. Identification of enzymes and regulatory proteins in *Escherichia coli* that are oxidized under nitrogen, carbon, or phosphate starvation. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104: 18456-18460.

Nurjhan N, Consoli A, Gerich J. Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 89: 169-175.

Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y. Antioxydant activity of tannins and flavonoids in eucaliptus rostarata. *Phytochimie*. 1993 ; 33 : 557-561.

Okuda T, Kimura Y, Yoshida T, Hatano T, Okuda H, Arichi S. Studies on the activitis of tannins and related compounds from medicinal and drugs. Inihibitory effects of lipid peroxydation in mitochondria and microsome of lever. *Chem. Pharm. Bull.* 1983 ; 31 : 1625-1631.

Organisation Mondiale de la Santé, Maladies cardiovasculaires. Aide-mémoire. 2011 OMS. Disponible sur : URL :<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/index.html>

Organisation Mondiale de la Santé. (2007). Health status: mortality. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; World health statistics. 17-50.

Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001; 42:1173–9.

Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res* 2001; 34(1): 93-99.

Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese journal of nutrition* 1986; 44: 307-315.

Ozcelik B., Lee J.H., Min D.B. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science* 2003; 68: 487–490.

Ozgen M, Durgac C, Serce S, Kaya C. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in mediterranean region of turkey. *Food Chem* 2008 ; 111: 703-706.

Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22(1-2): 359-78.

Paglia DE, Valentine W.N., Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.

Pal Yu B. Cellular defences against damage from reactive oxygen species .*Physiopathological Review* 1994; 74: 139-155.

Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in STZ-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine pharmacotherapy*. 2008; 62: 598-605.

Paolisso G., Gambardella A., Tagliamonte M.R., Saccomanno F., Salvatore T., Gualdiero P., D'Onofrio M.V., Howard B.V. Does free fatty acid infusion impair insulin action also through an increase in oxidative stress? *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4244-4248.

Park JE, Kim JY, Kim J. Pomegranate vinegar beverage reduces visceral fat accumulation in association with AMPK activation in overweight women: A double-blind, randomized, and placebo controlled trial. *J Funct Food* 2014; 8: 274–81.

Pattwell DM, Jackson MJ. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 2004; 32(1): 14-8.

Paulson DJ, Ward KM, Shug AL. Malonyl CoA inhibition of carnitine palmityltransferase in rat heart mitochondria. *FEBS* 1984; 176: 381-384.

Pentikainen MO, Oorni K, Kovanen PT. Lipoprotein lipase (LPL) strongly links native and oxidized low density lipoprotein particles to decorin-coated collagen Roles for both dimeric and monomeric forms of LPL. *J Biol Chem.* 2000; 275: 5694–701.

Perez-Carreras M, Dehoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castiliano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007.

Pimienta-Barrios E, Méndez-Moran L, Ramirez Hernandez CB, García de Alba-García EJ, Domínguez-Arias MR. Effect of xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) fruit consumption on glucose and seric lipids. *Agrociencia* 2008; 42: 645–653.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K, Defraigne J.O. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 2002; 16: 233–239.

Plessi M, Bertelli D, Miglietta F. 2006. Extraction and identification by GC-MS of phenolic acids in traditional Balsamic vinegar from Modena. *J Food Compost Anal* 19:49–54.

Poirier B, Lannaud-Bournoville M, Conti M, Bazin R, Michel O, Bariéty J, Chevalier J, Myara I. Oxidative stress occurs in absence of hyperglycaemia and inflammation in the onset of kidney lesions in normotensive obese rats. *Nephrol Dial Transplant* 2000 ; 15 : 467-76.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel.* 2009 ; (4) : 8.

Puri V, Ranjit S, Konda S, Nicoloro SMC, Straubhaar J, Chawla A, Chouinard M, Lin C, Burkart A, Corvera S, Perugini RA, Czech MP. Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2008; 105: 7833-7838.

Qi XY, Chen WJ, Zhang LQ, Xie BJ. Magrocidex extract from *Siratia grosveuori* scavenges free radicals in vitro acid lowers oxidative stress serum glucose and lipid levels in aloxan induced diabetic mice. *Nutrition research* 2008; 28: 278-284.

Qiao W, Peng Z, Wang Z, Wei J, Zhou A. Chromium improves glucose uptake and metabolism

through upregulating the mRNA levels of IR, GLUT4, GS, and UCP3 in skeletal muscle cells. *Biol Trace Elem Res* 2009 ; 131 : 133-42.

Qiu J, Ren C, Fan J, Li Z. Antioxidant activities of aged oat vinegar *in vitro* and in mouse serum and liver. *J Sci Food Agric* 2010; 90: 1951-1958.

Quintanilha T, Packer L, Davies J, Racanelly L, Davies J. Membrane effects of vitamin E deficiency: Bioenergetics and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria. *Ann Acad Sci* 1982; 393: 32-47.

Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kahkonen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. 2000. Antimicrobial effect of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Intl J Food Microbiol* 2000; 56: 3-12.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37(12): 1595-607.

Reddy M, Gupta S, Jacob M, Khan S, Ferreira D. .Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L., *Planta Medica* 2007; 73(5): 461-467.

Reynoso-Camacho R, González de Mejía E. Nopal (*Opuntia* spp.) and other traditional Mexican plants. In: Pasupuleti, V.K., Anderson, J.W. (Eds.), *Nutraceuticals, Glycemic Health & Type 2 Diabetes*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, 2008; 379-399.

Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is lowered by 24-h insulin and acipimox administration: blunted response to insulin in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48: 1631-7.

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53(1): 119-124.

Robichon C, Girard J, Postic C. Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP. *Med. Sci.*, 2008; 24(10): 841-6.

Rodbell M. "Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 1964; 239: 375-380.

Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem* 2005; 92: 235-254.

Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*. 1997;77(3):731-58.

Romaní J, Caixàs A, Carrascosa JM, Ribera M, Rigla M, Luelmo J. Effect of narrowband ultraviolet B therapy on inflammatory markers and body fat composition in moderate to severe psoriasis. *Br J Dermatol*. 2012; 166(6): 1237-44.

Rosenblat M, Volkova N, Aviram M. Pomegranate phytosterol (β -sitosterol) and polyphenolic

antioxidant (punicalagin) addition to statin, significantly protected against macrophage foam cells formation. *Atherosclerosis* 2013; 226: 110-117.

Rutala WA, Barbee SL, Agular NC, Sobsey MD, Weber DJ. Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 33–8.

Saengsirisuwan V, Perez FR, Sloniger JA, Maier T, Henriksen EJ. Interactions of exercise training and lipoic acid on skeletal muscle glucose transport in obese Zucker rats. *J Appl Physiol* 2001 ; 91 : 145-53.

Saenz C, Tapia S, Chávez J, Robert P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem* 2009 ; 114 : 616-622.

Şahin.F, Güllüce M, DafereraD, Sökmen A, Sökmen M, PolissiouM, AgarG, Özer H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 2004; 15: 549-557.

Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal K.M. Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects (part II). *Therapie*. 1998; 53(4): 315-39.

S´aiz-Abajo MJ, Gonz´alez-S´aiz JM, Pizarro C. Multi-objective optimisation strategy based on desirability functions used for chromatographic separation and quantification of l-proline and organic acids in vinegar. *Anal Chim Acta* 2005; 528: 63–76.

Salbe, A. D., Johnston, C, S., Buyukbese, A. M., Tsitouros. P. D. and Harman, S. M. . Vinegar lacks antiglycemic action on enterol carbohydrate absorption in human subject. *Nutrition Research*. 2009; 29: 846- 849.

Saltiel AR. Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest* 2000; 106: 163-164.

Salunkhe DK. Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press. 1990.

Salvayre AN, Salvayre R. Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL*. 2005 ; 12 (5) : 433-438.

Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the Risk of Coronary Heart Disease. *Circulation* 2007; 115: 450 – 458.

Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*, 2005; 22: 674-82.

Schmitt B, Ferry C, Daniel N, Weill P, Kerhoas N, Legand P. Effet d'un régime riche en acides gras ω 3 et en CLA9-cis, 11 trans sur l'insulinorésistance et les para mètres du diabète de type 2. *OCL* 2006 ; 13(1) : 70-75.

- Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 2002; 23(5): 861-880.
- Setorki M, Asgary S, Eidi A. Acute effects of vinegar intake on some biochemical risk factors of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Lipids Health Dis* 2010; 28:1-10.
- Shahidi F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends Food Sci Technol* 2009 ; 20 : 376-387.
- Shiban MS, Al-Otaibi MM, Al-Zoreky. Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and nutrition sciences* 2012; 3: 991-996.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot.* 2002; 53: 1305-19.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40: 945-948.
- Shishehbor F, Mansoori A, Sarkaki AR. Apple cider vinegar attenuates lipid profile in normal and diabetic rats. *Pak J Sci* 2008; 11: 2634-8.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171-176.
- Siriwardhana N., Shahidi F. et Joen Y. .Potential antioxidative effects of cactus pear fruit extract on radical scavenging and DNA damage reduction in human peripheral lymphocytes. *J food lipids* 2006; 13(4): 445-458.
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ, The importance of lipid-driven malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43: 550-7.
- Smith RK, Carroll PM, Allard JD, Simon MA. MASK, a large ankyrin repeat and KH domain-containing protein involved in Drosophila receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 2002; 129: 71-82.
- Soltan SAS, Shehata MEM. .Antidiabetic and hypocholesterolemic: Effect of different types of vinegar in rats. *Life Sci J* 2012; 9: 2141-152.
- Straprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2005; 49 : 1075-82.
- Subramanian S, Han C, Chiba T, McMillen T, Wang S, Haw A, Kirk E, Brien K, Chait A. Dietary cholesterol worsens adipose tissue macrophage accumulation and atherosclerosis in obese LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Vasc Biol.*, 28: 685-691. *Bras Cardiol* 2008; 95: 272-278.
- Sudgen PH, Fuller SJ. Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem. J.* 1991; 273: 21-37.

Sudheesh S., Vijayalakshmi N.R. Lipid-lowering action of pectin from *Cucumis sativus*. *Foodchem* 1999; 67(3): 281-286.

Sugiyama A, Saitoh M, Takahara A, Satoh Y, Hashimoto K. Acute cardiovascular effects of a new beverage made of wine vinegar and grape juice, assessed using an in vivo rat. *Nutrition research* 2003; 23(9): 1291–1296.

Sugiyama M, Tang AC, Wakaki Y, Koyama W. Glycemic index of single and mixed meal foods among common Japanese foods with white rice as a reference food. *European Journal Clinical Nutrition*, 2003; 57: 743- 752.

Surangi H., Thilakarathna H.P., Rupasinghe V. Anti-atherosclerotic effects of fruit bioactive compounds: A review of current scientific evidence. *Canadian Journal of Plant Science* 2012; 92(3): 407-419.

Tajik J , Nazifi S. .Correlation of Serum Lipid and Lipoproteins with Trace Elements in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *VRF* 2010; 1(2): 91-97.

Taskinen MR, Kahri J, Koivisto V, Shepherd J, Packard CJ. Metabolism of HDL apolipoprotein A-I and A-II in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35: 347–56.

Tesoriere LM, Fazzari Allegra M, Livrea MA. Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of Sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *J Agric Food Chem* 2005; 53:7851–7855.

Tesoriere LM, Butera D, Pintaudi AM, Allegra M, Livrea MA. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(2):391–395.

Thomas SR. Stocker R. Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implication for atherosclerosis. *Free radical biology & medicine*. 1999; 28:1795-1805.

Tim V. Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation. *J Am Med Inform Assoc* 2009; 16(4): 471-9.

Travlos GS, Morris RW, Elwell MR, Duke A, Rosenblum S, Thompson MB. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology* 1996; 107: 17-29.

Trease GE, Evans WC. A textbook of Pharmacognosy (13th edition) Bacilluere Tinal Ltd, London.1989.

Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997 ; 17 : 3-8.

Ubeda C, Hidalgo C, Torija MJ, Masb A, Troncoso AM, Morales ML. Evaluation of antioxidant activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by different processes. *LWT-Food Science and Technology* 2011; 44: 1591-1596.

Uchimura K, Nagasaka A, Hayashi R, Makino M, Nagata M, Kakizawa H, Kobayashi T, Fujiwara K, Kato T, Iwase K, Kato K, Itoh M. Changes in superoxide dismutase and myeloperoxidase activities in leucocytes from patients with diabetes mellitus. *J.Diabet Complications* 1999 ;13: 264-270.

Ursini F, Tubaro F, Rong J, Sevanian A. Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. *Nutrition reviews*. 1999; 57(8): 241-249.

Vague J. The degree of masculine differentiation of obesity: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 315–321.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39: 44–84.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetable and grain products. *J Agric. Food Chem.* 1998; 46: 4113-4117.

Verges B. Physiopathology of dyslipidemia in patients with metabolic syndrome or type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Clinique and metabolism* 2007; 21: 9-16.

Verges B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 2005; 31(5): 429-439.

Vijayaraj P, Muthukumar K, Sabarirajan J, Nachiappan V. Antihyperlipidemic activity of *Cassia auriculata* flowers in triton WR 1339 induced hyperlipidemic rats. *Exp Toxicol Pathol* 2013; 65: 135–41.

Vincent HK, Powers SK, Stewart DJ, Shanely RA, Demirel H, Naito H. Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999 ; 23 : 67-74.

Vincent MR, Colpitts CC, Ustinov AU, Muqadas M, Joyce MA, Barsby NL, Epand RF, Epand RM, Khramyshev SA, Valueva OA, Korshun VA, Tyrrell DLJ, Schang LM. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 17339–17344.

Viuda-martos M, Ruiz-navajas Y, Fernández-lópez J, Sendra E, Sayas-barberá E, Pérez-álvarez JA. Antioxidant Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Bagasses Obtained as Co-Product in the Juice Extraction. *Food Research International*, 2011; 44(5), 1217-1223.

Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *The lancet*. 2003; 36: 2017-2023.

Vladeva SV, Terzieva DD, Arabadjiiska DT. Effect of chromium on the insulin resistance in patients with type II diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)* 2005; 47: 59-62.

Wang X, Zhao X, Gu L, Zhang Y, Bi K, Chen X. .Determination of aqueous and vinegary

- extracts of Shixiao San using metabolomics coupled with multivariate data analysis and evaluation of antihyperlipidemic effect. *Asian journal of pharmaceutical sciences* 2014; 9: 17-26.
- Wang Z, Pan Z, Ma H, Atungulu GG. Extract of phenolics from pomegranate peels. *OpenFood Sci* 2011; 5: 17–25.
- Wodecki ZJ. Chromatographic determination of citric acid for monitoring the mould process. *Journal of chromatography*, 1991; 558: 302-305.
- Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003; 51, 609-614.
- Wu C.H., Lin J.A., Hsieh W.C., Yen G.C. Low-density-lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro. *J Agric Food Chem* 2009; 57(11): 5058-5064.
- Yamashita H, Fujisawa K, Ito E, Idei S, Kawaguchi N, Kimoto M, Hiemori M, Tsuji H. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type-2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 17: 1236–43.
- Yang JY, Li Y, Wang F, Wu CF. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 6525–6531.
- Yoshihara D., Fujiwara N., Suzuki K. Antioxidants: benefits and risks for long-term health. *Maturitas* 2010; 67(2): 103-107.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002; 277: 50230-50236.
- Zhang B, Chen KS, Bowen J, Allen A, Espley R, Karunairetnam S, Ferguson IB. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *J. Expt. Bot.* 2006; 57: 3825–3836.
- Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, Urabe T. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke* 2005; 36: 2220-2225.
- Zhang YL, Yang Y, Zu X, Chen F, Wang Liu F. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem* 2010; 118: 656–662.
- Zheng X, Long W, Guo Y, Ma E. Effects of cadmium exposure on lipid peroxidation and the antioxidant system in fourth-instar larvae of *Prosilocerus akamusi* (Diptera: Chironomidae) under laboratory conditions. *J Econ Entomol.* 2011; 104: 827–832.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des réactifs des tests phytochimiques

1. Réactif de Mayer

- **Solution A** : 1.358g de chlorure de mercure HgCl_2 sont dissous dans 60 ml d'eau distillée ;
- **Solution B** : 5g d'iodure de potassium KI sont dissous dans 10ml d'eau distillée ;

Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100ml avec d'eau distillée.

2. Réactif de Wagner

2g de KI et 1,27g de I sont dissous dans 75ml d'eau distillée, puis ajustés à 100 ml avec d'eau distillée.

3. Liqueur de Fehling

- **Solution A** : solution de sulfate de cuivre à 40 g/l ;
- **Solution B** : 200 g de tartrate de potassium-sodium et 150 de NaOH pour 1 litre d'eau distillée ;

Mélanger les deux solutions à volumes égaux (A mélanger juste avant l'emploi).

Annexe 2 : Les courbes d'étalonnage de l'étude phytochimique

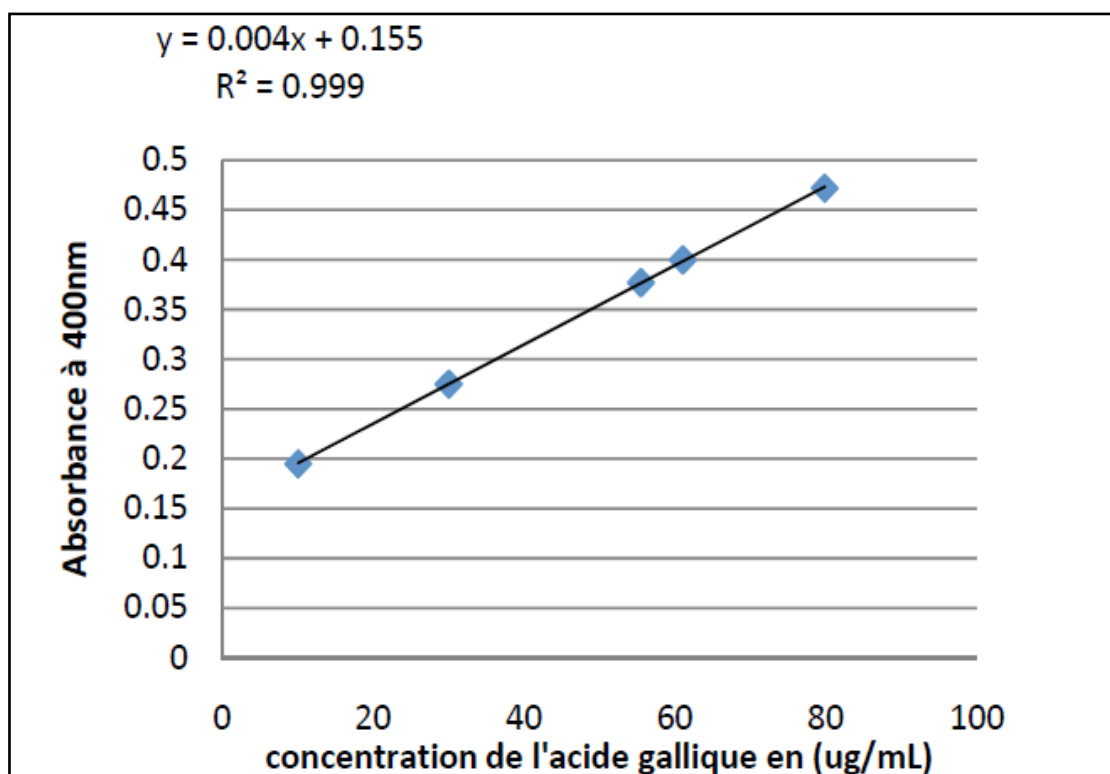


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

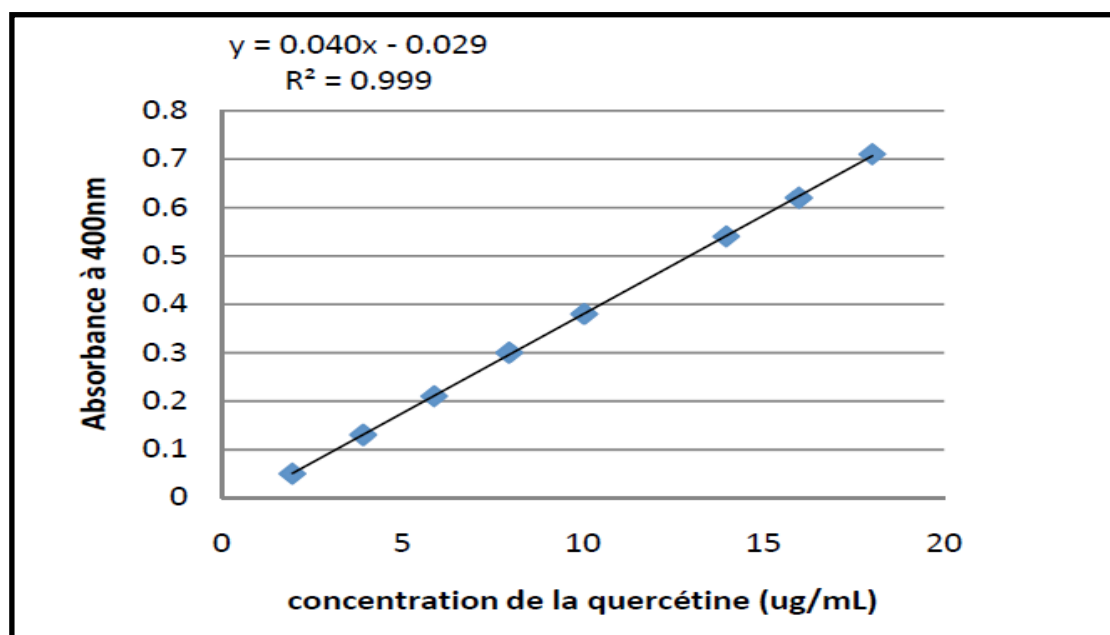


Figure 40 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Annexe 3 : Les chromatogrammes de l'identification des acides organiques

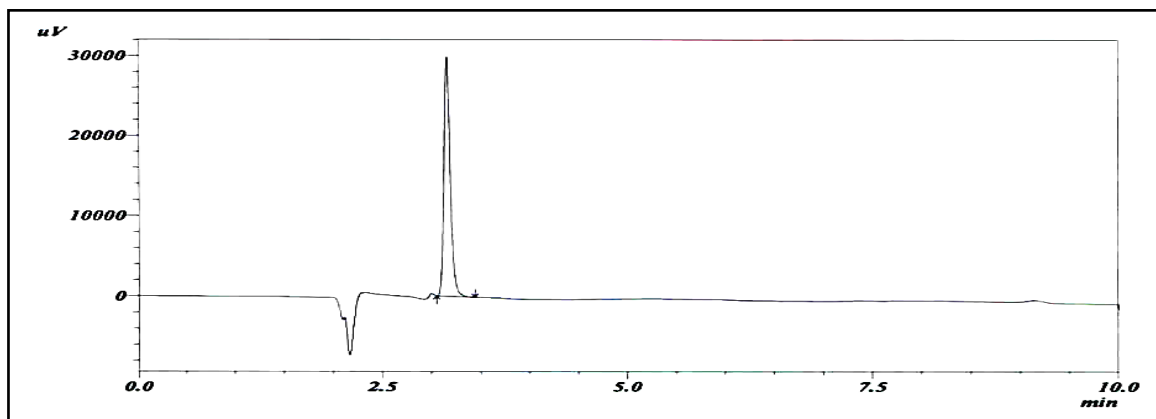


Figure 41 : Chromatogramme de l'acide acétique (standard)

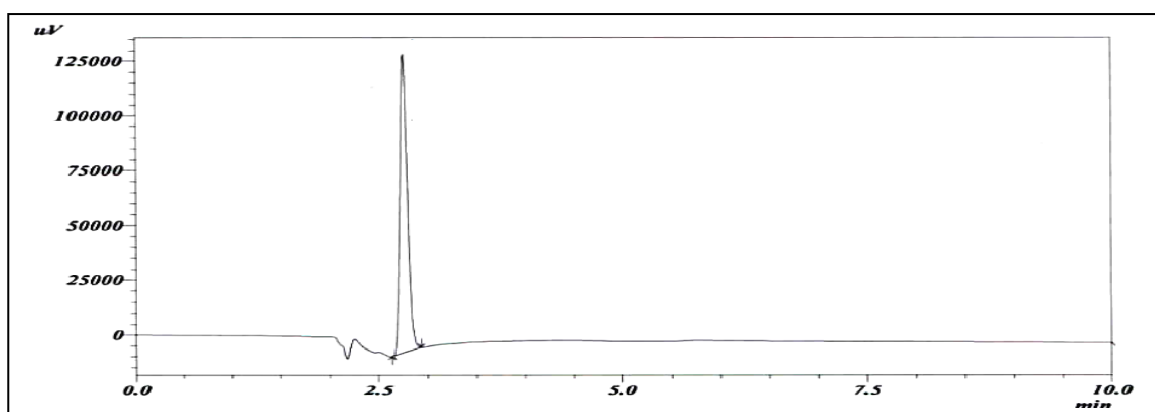


Figure 42 : Chromatogramme de l'acide ascorbique (standard)

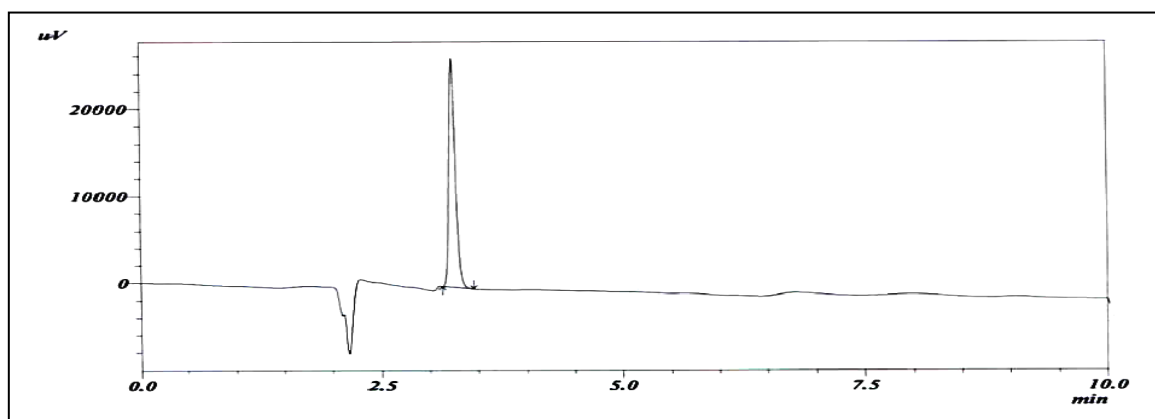
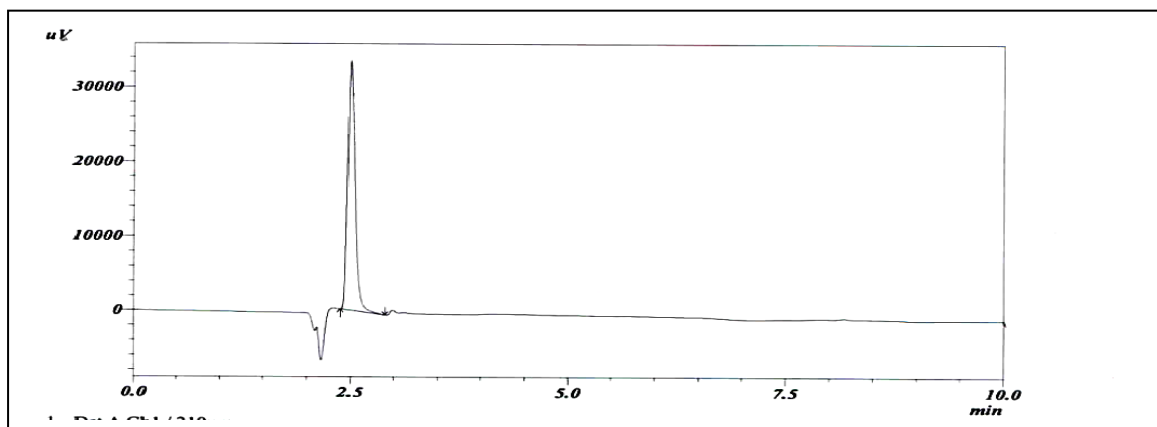
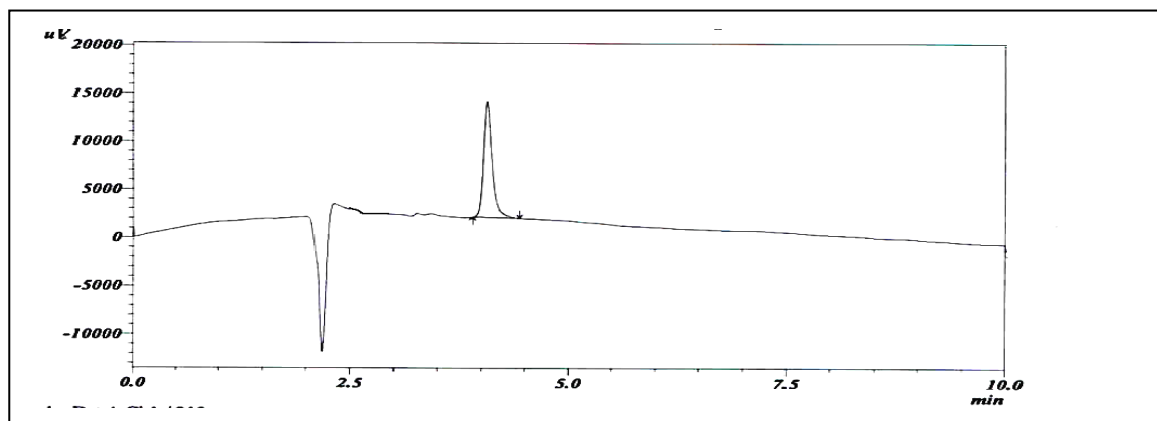
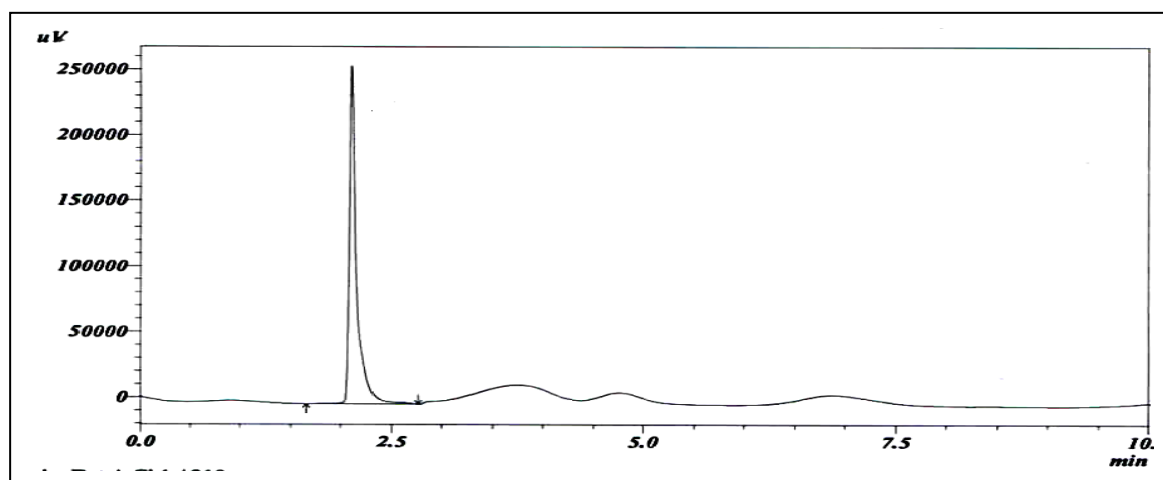


Figure 43 : Chromatogramme de l'acide citrique (standard)**Figure 46 :** Chromatogramme de l'acide formique (standard)**Figure 47 :** Chromatogramme de l'acide malique (standard)**Figure 48 :** Chromatogramme de l'acide oxalique (standard)

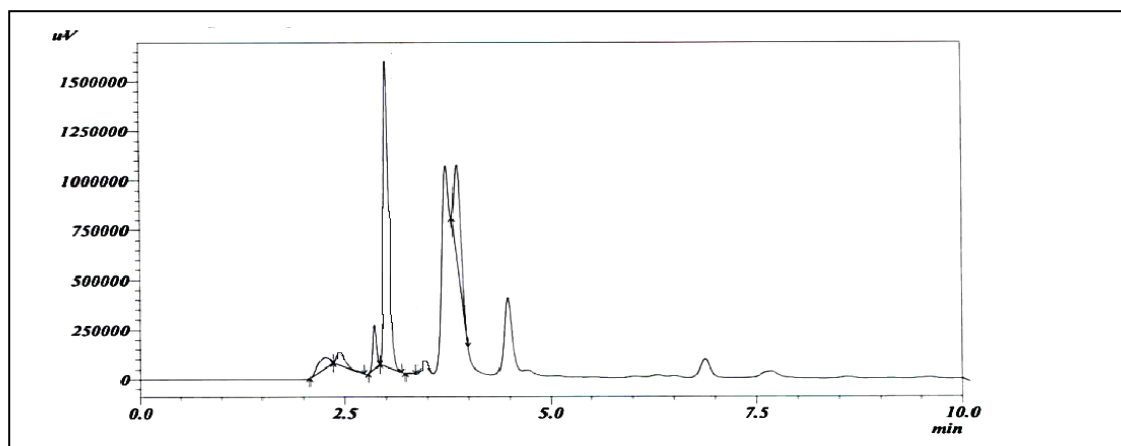


Figure 49 : Chromatogramme de vinaigre de grenade

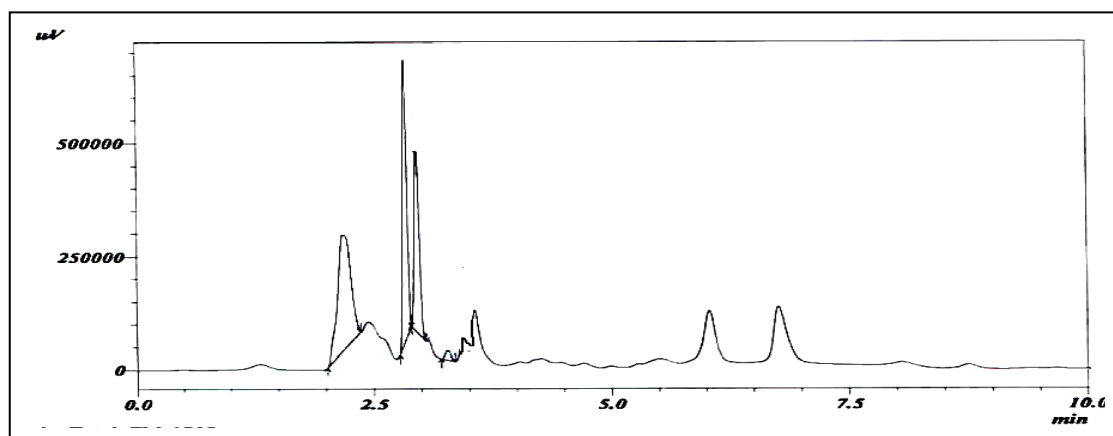


Figure 50 : Chromatogramme de vinaigre de figue de barbarie

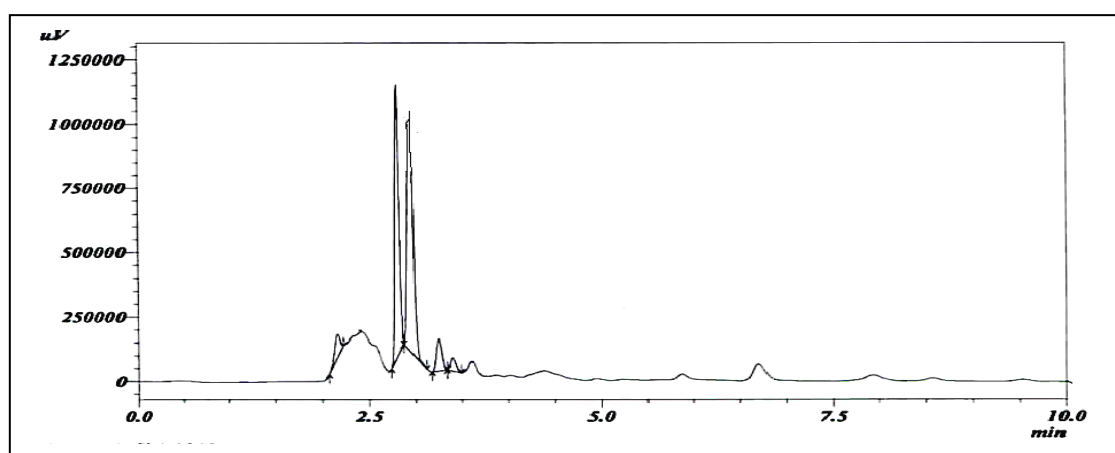


Figure 51 : Chromatogramme de vinaigre de pomme

Annexe 4 : Les chromatogrammes de l'identification des acides phénoliques

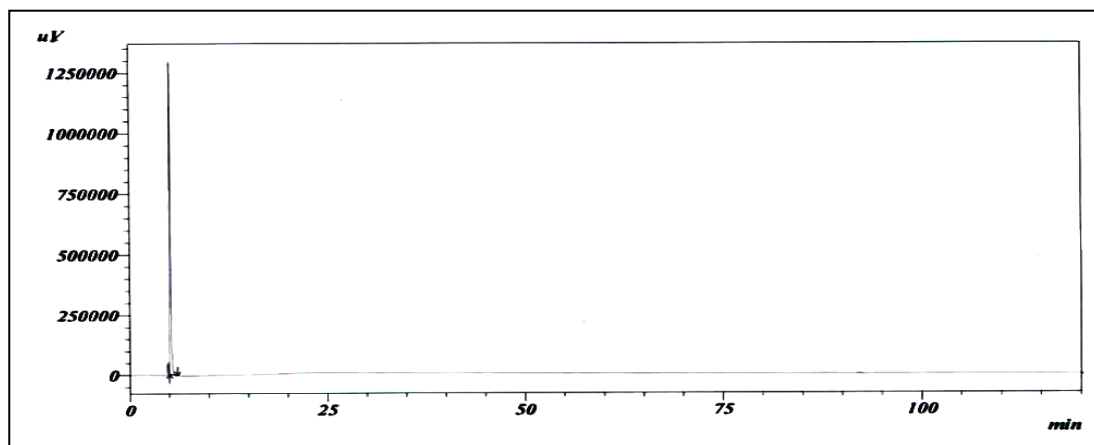


Figure 52 : Chromatogramme de l'acide gallique (standard)

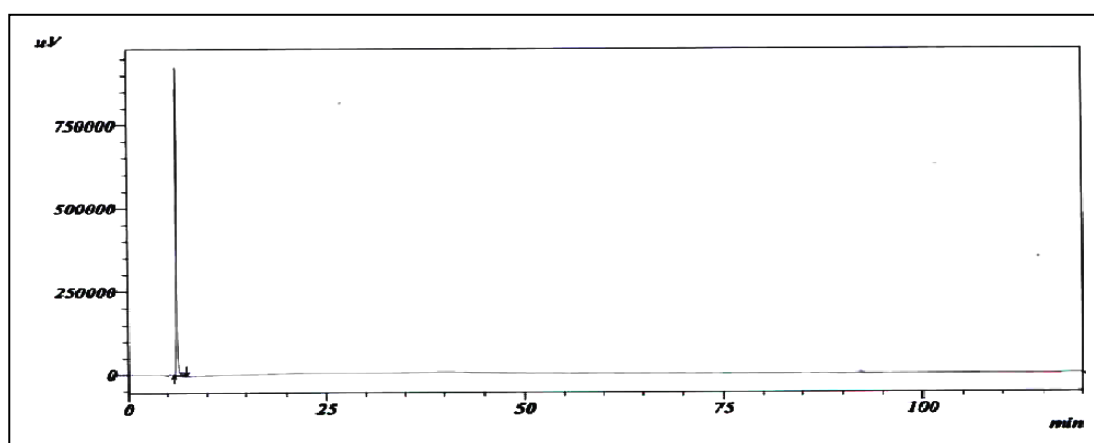


Figure 53 : Chromatogramme de l'acide caffeique (standard)

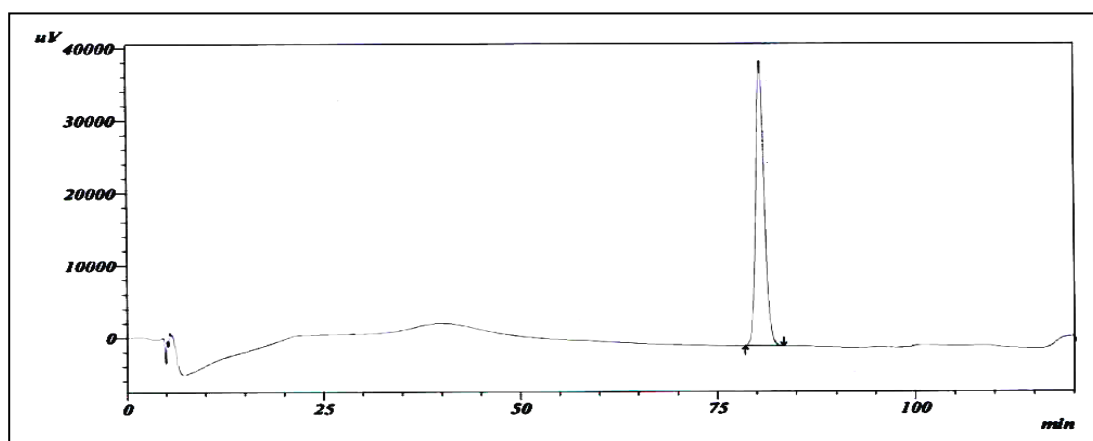


Figure 54 : Chromatogramme de l'acide benzoïque (standard)

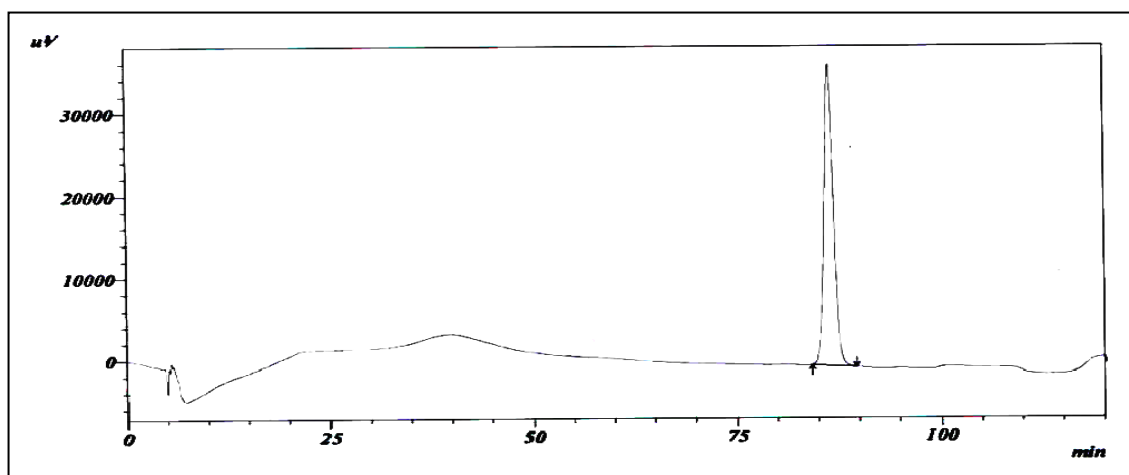


Figure 55 : Chromatogramme de l'acide salicylique (standard)

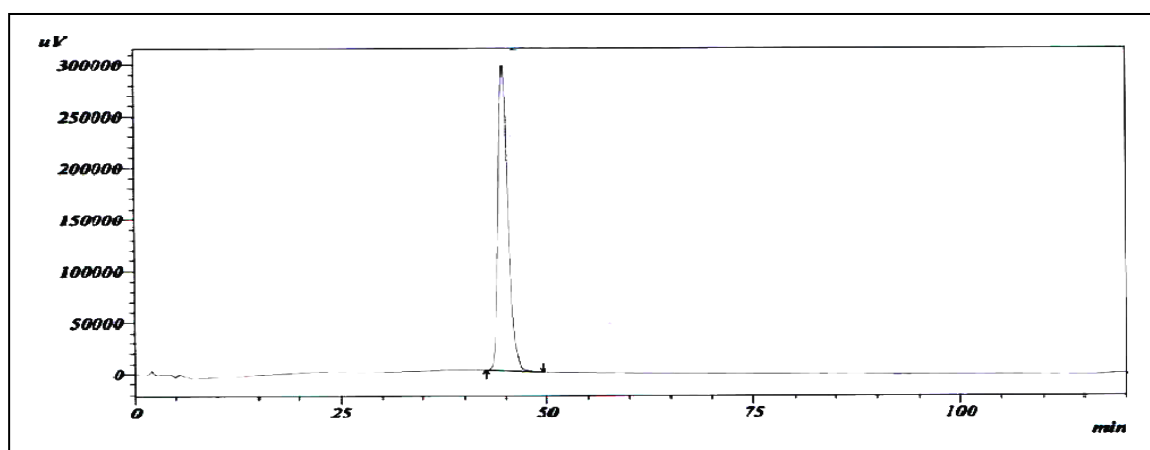


Figure 56 : Chromatogramme de vanilline (standard)

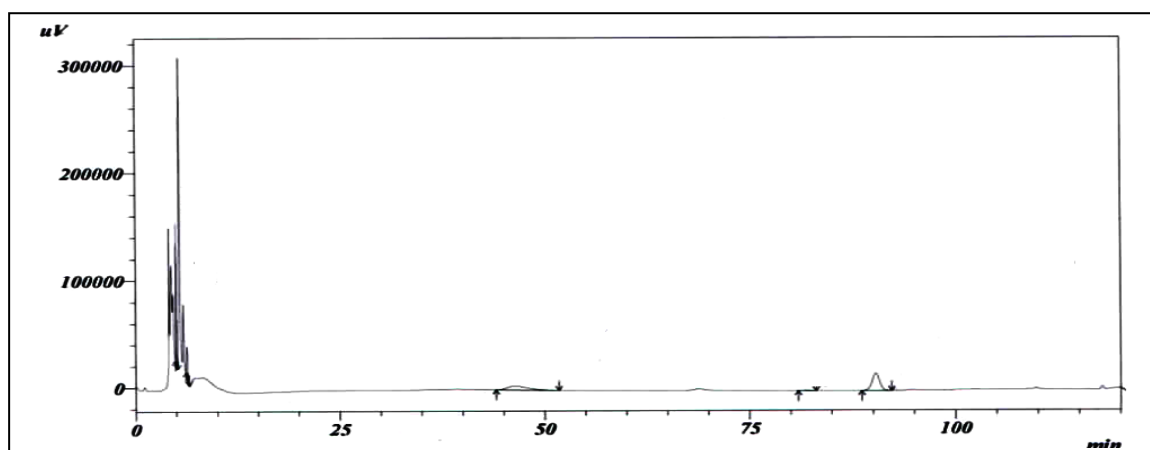


Figure 57 : Chromatogramme de vinaigre de grenade

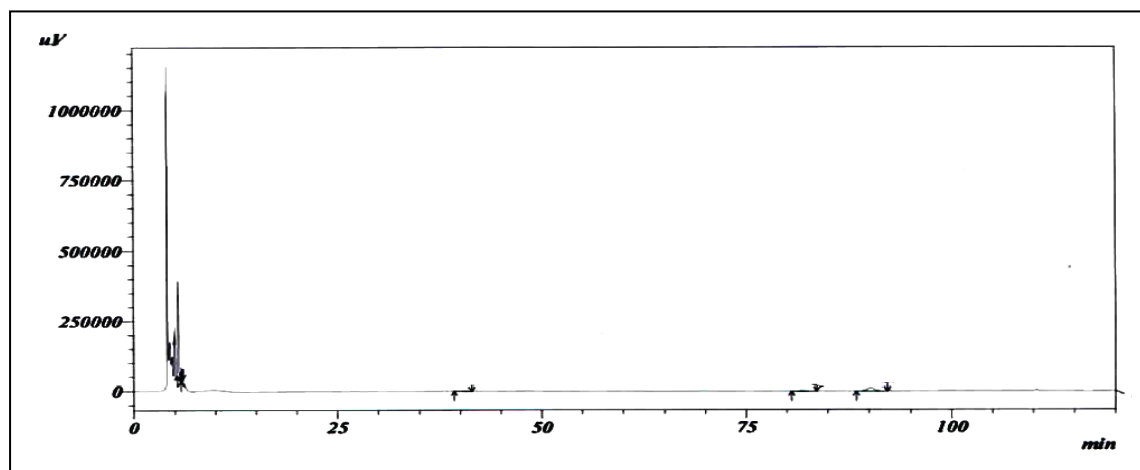


Figure 58 : Chromatogramme de vinaigre de figue de barbarie

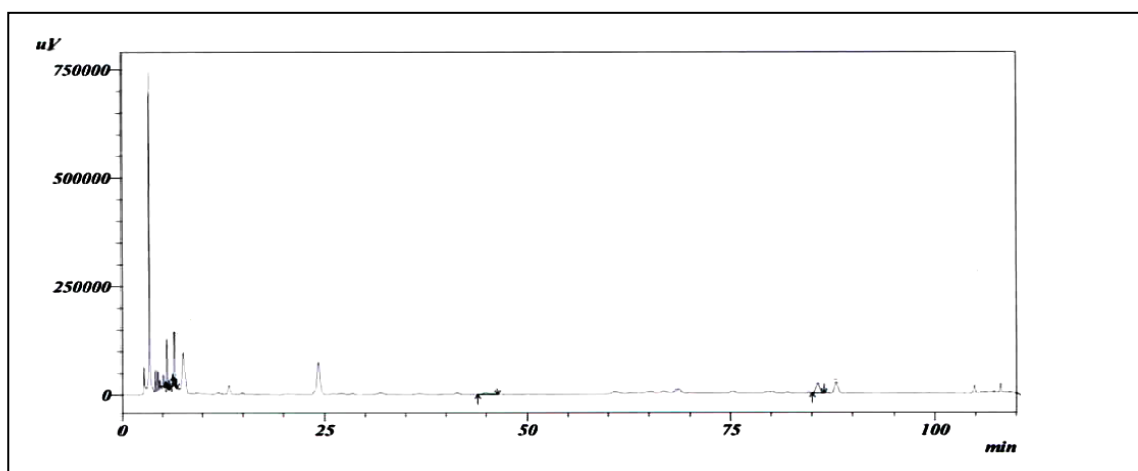
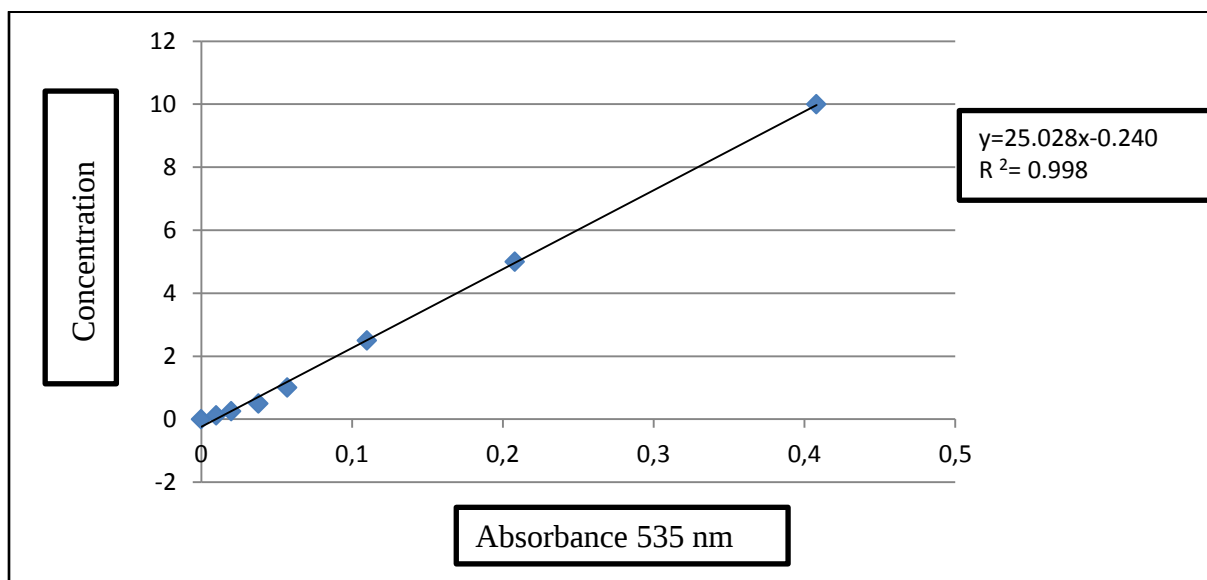
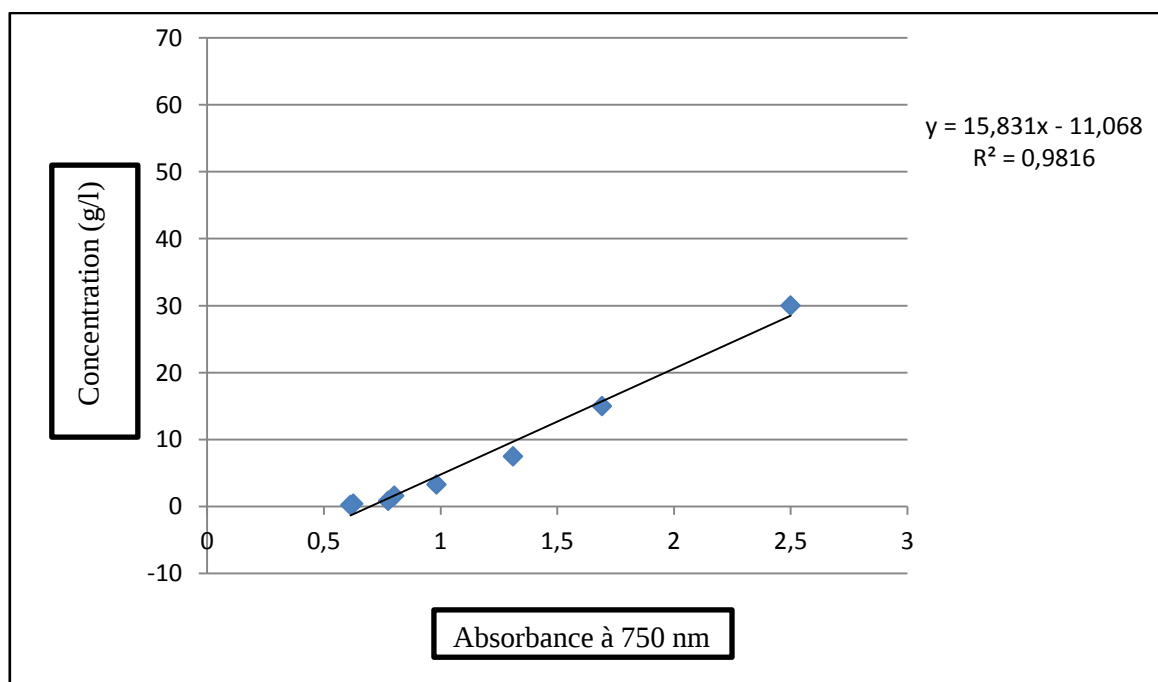


Figure 59 : Chromatogramme de vinaigre de pomme

Annexe 5 : Les courbes d'étalonnage du stress oxydant**Figure 60 : Courbe d'étalonnage du MDA****Figure 61 : Courbe d'étalonnage du BSA**