



République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA-Bejaia

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

**Etude de l'effet de l'extrait méthanolique de
Rhamnus alaternus sur l'hyperlipidémie induite par
le triton WR-1339 chez les rats Wistar**

Présenté par : M^{elle} HECHACHE Kahina

M^{elle} KHELLOUFI Salima

Membre de jury

Présidente : M^{me} AMROUCHE W. (M.A.A)

Promoteur : M^r TACHERFIOUT M. (M.A.B)

Examineur : Mr BRIBI N. (M.A.A)

Examineur : M^r HARFI T. (M.A.B)

Année 2012 /2013

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le bon Dieu, le tous puissant de nous avoir donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre promoteur Mr TACHERFIOU' M, aussi bien pour ses conseils que pour sa disponibilité et son soutien, soyer assuré, monsieur de toutes nos estime et nos profonds respects.

Nous tenons à remercier également M^{me} DJABRI N. qui nous a aidés à réaliser cette étude.

Nous remercions très respectueusement Mme AMROUCHE W. qui nous fait l'honneur de présider le jury et de juger notre travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement Mr HERFI T. et M^r BRIBI N., d'avoir accepté et consacré leurs temps précieux pour examiner notre travail.

Nos remerciements spécifiques s'adressent a M^{me} GHERRABE I. et Mr BOURAHLA Y. de nous avoir aidé à décrocher notre stage au niveau de CRD / SAIDAL.

Nous tenons a remercier l'équipe du laboratoire Pharmaco-Toxicologie du Centre de Recherche et de Développement de SAIDAL El-Harrach pour leur aide

Nous tenons à remercier également le professeur Mr ABDELALI M. de nous avoir accueillis au sein du CHU d'Hussein Dey et toute l'équipe du laboratoire histologie-cytologie de l'hôpital Nefissa Hamoud (ex Parnet) d'Alger.

Nous tenons aussi à remercier Dr CHEBOU' T. maitre assistante hospitalo-universitaire en anatomie pathologie du CHU de Bejaia pour le temps qu'elle nous a consacré pour l'interprétation des coupes histologiques

Nous remercions également toute Person ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire

KAHINA et SALIMA

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes très chers et affectueux parents qui sont la lumière de ma vie, qui sont toujours présents pour m'encourager et toujours prêts à me soutenir et je prie Dieu le tout Puissant de me les garder.

Mes très chers frères : Hamanou , Karim , Nadir , Louanès , Abderrahmane .

Mes très chers sœurs : Razika , Ounissa , Nora , Celia , Defia

Mes belles sœurs : Wrida, Souraya

Les petits anges : Rihem , Islem , Arslen

Mon fiancé Yahia et sa famille

Mes beaux frères : Samir, Zaid.

Mon binôme et sa famille

Mes amies : Charihène , Faiza , Hana , Hassiba , Imène , Sabrina, Sousou, Souad, Marye,

Mounira, Habiba, Sondrina, Zahia.

La promotion pharmacologie 2012 /2013.

Salima

Dédicaces

A la mémoire de mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi papa. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère

Tu présentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de la tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes très chères sœurs et chers frères

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous mes sœurs : Ouahiba, Hayet et Karima, et à vous mes frères : Aziz, Smail et Bachir. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes chères amies

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Je dédie ce travail aussi, à mes enseignants qui m'ont suivi au long de mon cursus universitaire, avec tous mes considérations pour les efforts fournis de leurs part afin que je puisse arriver à ce stade.

A toute la promotion 2013 Pharmacologie moléculaire.

Kahina H.

Liste des abréviations

ABTS : sel d'ammonium de L'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ADP : adénosine-5-phosphate

Apo A /B/C /E: Apolipoprotéine A /B/C /E

ATP : Adénosine Triphosphate

CETP: Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol

CHE : Cholestérol Estérase

CHOD : Cholestérol Oxydase

CRD : Centre de Recherche et Développement

CT : Cholestérol Total

DAP : dihydroxyacétone phosphate

DO : Densité Optique

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent d'Acide Gallique

EDHF : *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*

EQ : Equivalent de la Quercétine

G : Grossissements

GPO : Glycérol Phosphate Déshydrogénase

G3P : glycérol-3-phosphate

HDL: High Density Lipoproteins

HCF : Hyperlipidémie Combinée Familiale

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H₃PW₁₂O₄₀ : acide phosphotungstique

H₃PM₁₂O₄₀ : d'acide phosphomolybdique

IDL : Intermediate Density Lipoproteins

IC₅₀ :

LCAT : Lecithine Cholesterol Acyl Transferase

LDL : Low Density Lipoproteins

LDL-c : Cholestérol-LDL

LH: Lipases Hépatiques

LPL: Lipoprotéine Lipase

LRP: Lipoprotein Related Protein

MCV : Maladies Cardio-Vasculaires

MO₈O₂₃ : molybdène

NaCl : Chlore de Sodium

NO : l'Oxyde Nitrique

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONAB: Office National Alimentation Bétail

POD: Peroxydase

RA: *Rhamnus Alaternus*

RE: Réticulum Endoplasmique

R-LDL: Low Density Lipoprotéin Receptor

SREBP: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

T G: Triglycéride

USA: United Stats of America

VLDL: Very Low Density Lipoproteins

W₈O₂₃ : Oxyde bleu de tungstène

WR-1339 : Tyloxapol

4-AP : 4-aminophenazone

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Caractéristiques des lipoprotéines	3
II	Classification des hyperlipidémies par l’OMS (classification modifiée de Fredrickson)	17
III	Principes anomalies des lipoprotéines au cours de diabète type 2	19
IV	Taux et latence de mortalité après une dose unique de l’extrait de RA	41
V	Evolution des symptômes cliniques lors de l’étude de la toxicité aigüe de l’extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i>	42
VI	Dosage des paramètres lipidiques sanguins avant traitement	43
VII	Dosage des paramètres lipidiques sanguins après traitement	43

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Structure d'une lipoprotéine	2
Figure 02	Endocytose par les récepteurs des LDL dans les cellules	6
Figure 03	Sommaire des voies générales du métabolisme des lipoprotéines	8
Figure 04	Schématisation du rôle des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines	10
Figure 05	Mécanismes d'action de la lipoprotéine lipase	12
Figure 06	Structure de gène R-LDL	13
Figure 07	Les différentes étapes impliquées dans la biosynthèse de cholestérol et les récepteurs LDL en montrant les types des mutations dans l'hypercholestérolémie familiale	14
Figure 08	Les mutations du gène de l'Apo E aux positions 112 et 158	15
Figure 09	Interactions entre les différents types de dyslipidémies, et le phénotype lipidique	17
Figure 10	Les différents processus induisant l'initiation de l'athérosclérose	21
Figure 11	Les feuilles (fraîches et sèches) et poudre de <i>Rhamnus alaternus</i>	24
Figure 12	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	26
Figure 13	Oxydation de l'ABTS	27
Figure 14	Souris Swiss albinos dans une cage et gavage par une sonde gastrique orale	29
Figure 15	La disséction des rats	33
Figure 16	Les étapes d'inclusion par l'automate (STP 120)	34
Figure 17	Distributeur de paraffine à gauche et Réfrigérateur à droite	34
Figure 18	Microtome (Leica RM 2125RT)	35

Figure 19	Les étapes de déparaffinage	35
Figure 20	Les étapes de coloration	36
Figure 21	Effet scavenger contre le radical DPPH de l'extrait méthanolique de <i>R. alaternus</i> à différentes concentrations	38
Figure 22	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS ⁺ par l'extrait méthanolique de <i>R. alaternus</i> à différentes concentrations	40
Figure 23	Coupe histologique du foie d'un rat du lot I (control normal) (Gx20)	47
Figure 24	Coupe histologique du foie d'un rat du lot II (control hyperlipédémique) (Gx63)	47
Figure 25	Coupe histologique du foie d'un rat du lot III (traité à 100mg/kg) (Gx63)	48
Figure 26	Coupe histologique du foie d'un rat du lot IV (traité à 200mg/kg) (Gx20)	48
Figure 27	Coupe histologique du foie d'un rat du lot V (traité à 400mg/kg) (Gx40)	48
Figure 28	Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot I (control normal) (Gx20)	50
Figure 29	Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot II (control hyperlipidémique) (Gx40)	50
Figure 30	Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot III (traité à 100mg/kg) (Gx40)	51
Figure 31	Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot V (traité à 400mg/kg) (Gx20)	51

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralisées sur les lipoprotéines

I-1- Définition.....	2
I-2- Classification des lipoprotéines.....	3
I-3- Rôles des différentes classes des lipoprotéines.....	4
I-4- Métabolisme des lipoprotéines.....	4
I-4-1- Les chylomicrons.....	4
I-4-2- Les VLDL (Very Low density lipoproteins).....	5
I-4-3- Les LDL (Low density lipoproteins).....	6
I-4-4- Les HDL (High density lipoproteins).....	7

Chapitre II: Les hyperlipidémies

II-1- Définition de l'hyperlipidémie.....	9
II-2- Les facteurs de risques.....	9
II-2-1- Les facteurs de risques primaires.....	9
II-2-2- Les facteurs de risques secondaires.....	10
II-2-2-1- Cholestase intrahépatique.....	10
II-2-2-2- Régimes riches en matières grasses.....	10

II-3- Classification des hyperlipidémies.....	11
II-3-1- Anomalie liées a l'élévation d'une seule lipoprotéine.....	11
II-3-1-1- L'hyperlipoprotéinémie de type I.....	11
II-3-1-2- L'hyperlipoprotéinémie de type IIa.....	12
II-3-1-3- Hyperlipidémie de type III.....	14
II-3-1-4- Hyperlipidémie de type IV.....	15
II-3-2- Anomalies liées à l'élévation de deux lipoprotéines.....	16
II-3-2-1- Hyperlipoprotéinémie type IIb.....	16
II-3-2-2- Hyperlipidémie de type V.....	16
II-4- Complications de l'hyperlipidémie.....	18
II-4-1- Diabète.....	18
II-4-2- Athérosclérose.....	20
II-4-3- Dans le cas d'obésité.....	21

Partie pratique

Chapitre III : Matériel et méthodes

III-1- Matériel végétal.....	23
III-1-1- Classification et description	23
III-1-2- Préparation du matériel végétal.....	23
III-1-3- Extraction.....	24
III-1-4- Analyses phytochimiques.....	25
III-1-4-1- Dosage des polyphénols totaux.....	25
III-1-4-2- Dosage des flavonoïdes.....	25

III-1-5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydant.....	26
III-1-5-1- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH.....	26
III-1-5-2- Détermination de l'activité scavenger du radical ABTS.....	27
III-2- Etude de la toxicité aiguë.....	28
III-2-1- Matériel animal.....	28
III-2-2- Protocole expérimentale.....	28
III-3- Etude de l'effet anti-hyperlipidémique.....	29
III-3-1- Matériel animal et induction de l'hyperlipidémie.....	29
III-3-2- Protocole expérimentale.....	29
III-3-3- Dosage des paramètres lipidiques sanguin.....	30
III-3-3-1- Dosage du cholestérol total.....	30
III-3-3-2- Dosage des triglycérides.....	31
III-3-3-3- Dosage de HDL.....	32
III-4- Etude histopathologique.....	33
III-4-1- Prélèvement d'organe.....	33
III-4-2- Fixation.....	33
III-4-3- Lavage déshydratation et éclaircissement.....	34
III-4-4- Imprégnation, enrobage à la paraffine et confection des bloque.....	34
III-4-5- Coupage et étalement.....	35
III-4-6- Déparaffinage des coupes.....	35
III-4-7- Coloration.....	36
III-4-8- L'observation microscopique.....	36
III-5- Analyse statistique.....	36

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV-1- Taux d'extraction.....	37
IV-2- Dosage des polyphénols totaux.....	37
IV-3- Dosage des flavonoïdes.....	37
IV-4- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydante.....	38
IV-4-1- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH.....	38
IV-4-2- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical ABTS.....	39
IV-5- Evaluation de la toxicité aigüe.....	40
IV-6- Etude de l'effet anti hyperlipidémie induite par le triton WR-1339.....	42
IV-7- Etude histopathologique.....	47
IV-7-1- Histologie du foie.....	47
IV-7-2- Histologie de l'aorte.....	50
IV-8- Discussion.....	53
V- Conclusion.....	54

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Du puis les temps les plus anciens, la tradition a guidé l'homme à l'utilisation des plantes dans les domaines de la santé. Les recherches modernes ne font que redécouvrir ce savoir acquis au cours des siècles. Aujourd'hui, on peut considérer que la phytothérapie constitue une alternative sérieuse qui fut à l'origine de la pharmacie classique issue de la chimie moderne.

En effet, de nombreux travaux ont pu démontrer les activités cliniques et les modes d'action thérapeutiques de la phytothérapie. Les plantes médicinales utilisées permettent d'aborder les traitements de façon plus globale et moins agressive, sachant qu'une plante peut contenir plusieurs milliers de substances et différents principes actifs qui représentent 25% des médicaments prescrits, soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes (**Bruneton, 1999**).

L'hyperlipémie ou hyperlipidémie est le nom donné à des dysfonctionnements se traduisant par un taux élevé de graisse dans le sang sous forme de lipoprotéines, c'est pourquoi on parle aussi d'hyperlipoprotéïnémie. C'est une maladie de plus en plus commune dans les pays riches et développés, 4 % des adultes de plus de 30 ans sont par exemple concernés en France (**OMS, 2011**). C'est un problème grave car facteur de risque d'athérome vasculaire qui est la première cause de mortalité dans de nombreux pays riches.

Rhamnus alaternus, est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en phytothérapie dans les pays de bassin méditerranéen ; dans le nord africain elle est utilisée comme purgative, laxative, diurétique, anti-hypertensive et dépurative. En Algérie, cette espèce est utilisée en générale pour le traitement des complications hépatique et dermatologiques, et comme puissant antioxydant (**Boussahel et al., 2013**).

Notre travail se divise en deux parties, la première partie est une synthèse bibliographique sur les lipoprotéines et les hyperlipidémies. La deuxième partie est la partie expérimentale qui traite l'étude des effets antioxydants de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, ainsi que l'étude de la toxicité aiguë effectuée sur des souris Swiss Albinos. Suivi de l'étude de l'effet de cet extrait sur une hyperlipidémie induite par le Triton WR-1339 sur des rats Wistar. Enfin, complétée par une étude histopathologique réalisée sur le foie et l'aorte des rats.

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les lipoprotéines

I-1- Définition

Les lipoprotéines sont des assemblages qui consistent en une micro-émulsion de lipides et de protéines, sous forme de particules dans le plasma sanguin qui sont considérées comme des formes de transport des lipides. Le rapport surface/volume minimum est atteint par l'adoption d'une structure sphérique (**Tremblay, 2006**).

Les lipoprotéines plasmatiques sont des complexes macromoléculaires hydrosolubles, de structure globulaire, constitués par un core de lipides hydrophobes (noyau): triglycérides, cholestérol estérifié entouré d'une couche de lipides plus polaires (La surface ou écorce), essentiellement des phospholipides, d'esters de cholestérol, et de protéines dénommées apoprotéines (figure 01). Ces dernières ont pour fonction première de solubiliser les lipides mais, de plus, elles possèdent des signaux d'adressage cellulaire et qui se différencient selon la lipoprotéine. Cette structure permet de stabiliser le globule lipidique et de former les liaisons hydrogène avec le milieu aqueux (sang) (**Pownall et Gotto, 1999**).

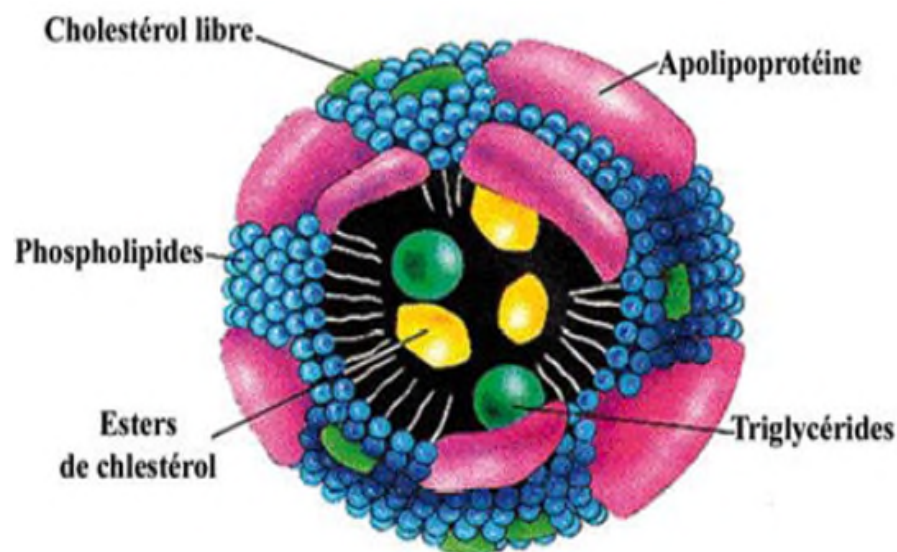


Figure 01 : Structure d'une lipoprotéine (**Saïle et Hassan, 2007**)

Chaque lipoprotéine possède une teneur et une composition en apolipoprotéine et en lipides différentes des autres lipoprotéines et la taille des particules est proportionnelle à la quantité de lipides non polaires transportés (le rapport surface/volume diminue lorsque la taille augmente). Ainsi, il est possible de les séparer en considérant leurs propriétés physiques et chimiques : taux de flottaison, taille, migration électrophorétique et composition (**Tremblay, 2006**).

Tableau I : Caractéristiques des lipoprotéines (Dallongville, 2006)

Lipoprotéines	Source	Diamètre (Å)	Densité (g/mL)	Composition %					Apos
				TG	EC	CL	PL	apo	
Chylomicrons	Intestin	750-12 000	<0,94	86	3	2	7	2	A-I B48 C-I-II-III E
VLDL	Foie	300-800	0,94-1,006	55	12	7	18	8	B100 C-I-II-III E
IDL	VLDL Chylos	250-350	1,000-1,019	23	29	9	19	19	B100 C-I-II-III E
LDL	VLDL	180-250	1,019-1,063	6	42	8	22	22	B100
HDL	Foie Intestin VLDL Chylos	50-120	1,063-1,125	4	15	5	34	47	AI-II C-I-II-III

I-2- Classification des lipoprotéines

Les deux sites majeurs de synthèse des lipoprotéiques sont l'intestin et le foie, ces particules sont classées par leurs densité croissante en : chylomicrons, résidus de chylomicrons, lipoprotéines de très faible densité (VLDL), lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), lipoprotéines de faible densité (LDL), lipoprotéines de haute densité (HDL) (Tableau I). Chaque classe de lipoprotéines a une fonction spécifique au sein des organismes vivants. Elles forment trois classes principales correspondant à des voies métaboliques distinctes. La voie des lipides exogènes assure la distribution des graisses alimentaires de l'intestin vers le tissu adipeux et le foie. La voie endogène contrôle le transport des lipides hépatiques vers le tissu adipeux et les muscles. Enfin, la voie du transport inverse a pour fonction l'épuration du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (Turpin, 1997).

I-3-Rôles des différentes classes des lipoprotéines

En fonction de l'organe d'origine et de l'organe d'arrivée, les transporteurs mis en jeu sont pas les mêmes, de ce fait leurs rôles est partagées comme suit (**Ghatak et al ., 1995**) :

Chylomicrons : sont essentiellement composés de triglycérides et assurent leur transport de l'intestin vers le foie et le tissu adipeux (La voie exogène).

Lipoprotéines de très faible densité (*Very Low density lipoproteins, VLDL*) : assurent le transport des triglycérides du foie vers le tissu extra-hépatique (La voie endogène).

Lipoprotéines de faible densité (*Low density lipoproteins, LDL*) : sont composées de cholestérol et assurent son transport du foie vers le tissu extra-hépatique (La voie endogène). Si les LDL s'accumulent au niveau du sang, cela provoque des maladies cardiovasculaires (mauvais cholestérol)

Lipoprotéines de haute densité (*High density lipoproteins, HDL*) : (bon cholestérol) assurent l'épuration du tissu extra-hépatique, en transportant le cholestérol vers le foie, ou il est transformé en sels biliaires (La voie inverse)

I-4- Métabolisme des lipoprotéines

I-4-1- Les chylomicrons

L'alimentation apporte des lipides qui, dans le tube digestif, sont émulsionnés par les sels biliaires et hydrolysés par les enzymes. Le tube digestif absorbe le cholestérol, les acides gras ainsi que le glycérol (**Davenport, 1982**).

Dans l'entérocyte, les acides gras estérifiés en triglycérides s'associent au cholestérol estérifié et à l'apolipoprotéine B-48 (ApoB-48) former des chylomicrons natifs. Ces chylomicrons sont ensuite excrétés dans le plasma par exocytose où ils commencent leurs maturations par associations à d'autres lipoprotéines (ApoE et ApoC) venant de HDL circulante (**Arbouche Lezoul, 2007**).

Au niveau des vaisseaux alimentant les tissus approximés (tissu adipeux, muscles striés, muscle cardiaque...etc), la lipoprotéine lipase (LPL) activé par ApoC-II, hydrolyse les triacylglycérols en acides gras et 2-monoacylglycérol qui sont absorbés par ces tissus.

Enfin le 2-monoacylglycérol est coupé en acide gras et glycérol sous l'action d'une lipase intracellulaire. Les acides gras sont récupérés par le tissu et le glycérol retourne par la voie sanguine au foie, les HDL arrachent les ApoC-II du reste de chylomicrons (remnant), le reliquat obtenu va être capté par le foie à l'aide des récepteurs hépatiques qui reconnaissent le complexe (ApoB-48-ApoE), où il se fixe et rentre par endocytose, il est hydrolysé par les lysosomes pour libérer les acides aminés des apoprotéines, le cholestérol libre et des esters de cholestérol (**Redgrave, 1999**).

I-4-2- Les VLDL (Very Low density lipoproteins)

La synthèse des VLDL est réalisée de façon continue par les cellules hépatiques (90%) permettant la sécrétion permanente des triglycérides de synthèse endogène, elles proviennent de l'assemblage de triacylglycérols, des différentes formes de cholestérol, de l'ApoB-100 et de l'ApoA-I (**Ginsberg, 1999**).

Pour qu'elles deviennent fonctionnelles, elles s'associent au niveau du plasma, à l'ApoE nécessaire à leur reconnaissance par les récepteurs de ces tissus périphériques, et à l'ApoC-II pour l'activation des LPL. Les deux ApoE et ApoC-II sont fournis par les HDL circulantes. Au cours de leur séjour dans la circulation sanguine, les VLDL perdent au contact des tissus une partie de leurs triacylglycérols par hydrolyse par les LPL activés. Elles diminuent en taille mais deviennent plus denses pour donner les IDL (β -VLDL) qui sont composés des ApoB100 et ApoE, des esters de cholestérol, et des molécules restantes de triglycérides (**Tremblay, 2006 ; Hamel, 2008**).

Une fraction des IDL va être recapturé par le foie grâce à des récepteurs spécifiques des ApoB100 et ApoE, ou par des récepteurs LRP (Lipoprotein Related protein). Le reste des triacylglycérols contenant dans les IDL de l'autre fraction, va être hydrolysé par les lipases hépatiques (LH), pour former à la fin les LDL qui ne contiennent que de l'ester de cholestérol, ApoB-100 et une petite portion de triglycérides (**Ginsberg, 1999**).

Durant ce processus de transformation des VLDL en LDL (ou IDL), Les ApoC et ApoE retournent aux HDL or un inter-échange se produit entre les VLDL et les HDL : Les HDL récupèrent de façon concomitante des triacylglycérols et des phospholipides des VLDL alors que ces dernières s'enrichissent en esters de cholestérol provenant des HDL. L'agent de transfert est la protéine de transfert des esters de cholestérol (**Raisonnier, 2003**).

I-4-3- Les LDL (Low density lipoproteins)

LDL représentent la fin des produits provenant du catabolisme des VLDL et sont les principales lipoprotéines transportant le cholestérol dans la circulation. Par l'action des lipases, les particules VLDL ont perdu la majeure partie de leurs triglycérides et se sont ainsi retrouvées enrichies en esters de cholestérol pour former les particules LDL (**Mahley et al., 1984**).

Les LDL sont essentiellement synthétisées au niveau sérique. Ils constituent une source de cholestérol exogène aux tissus. Certaines zones des membranes cellulaires des tissus utilisateurs des LDL sont tapissées de récepteurs, formés dans le réticulum endoplasmique (RE). Après maturation dans l'appareil de Golgi ils rejoignent donc ces zones appelées vésicules ouvertes (**Brown et Goldstein, 1985**).

Lors de leur passage les LDL sont reconnues grâce à l'apoB-100 qu'elles contiennent encore. Elles se lient à ces récepteurs formant des complexes récepteurs-ligands. Lorsque les récepteurs sont saturés, les vésicules ouvertes s'invaginent, se ferment sur elle même donnant un réceptosome inclus dans le cytoplasme par endocytose sous forme de particules (endosomes), fusionnent ensuite avec les lysosomes. Les lysozymes hydrolysent les triglycérides et les phospholipides en acides gras, et les ester de cholestérols en cholestérol libre et en acides gras. Les récepteurs protéiques sont soit hydrolysés par le même enzyme en acides aminés ou recyclés. Tous ces produits seront réutilisés par la cellule (**Figure 02**) (**Brown et Goldstein, 1985**).

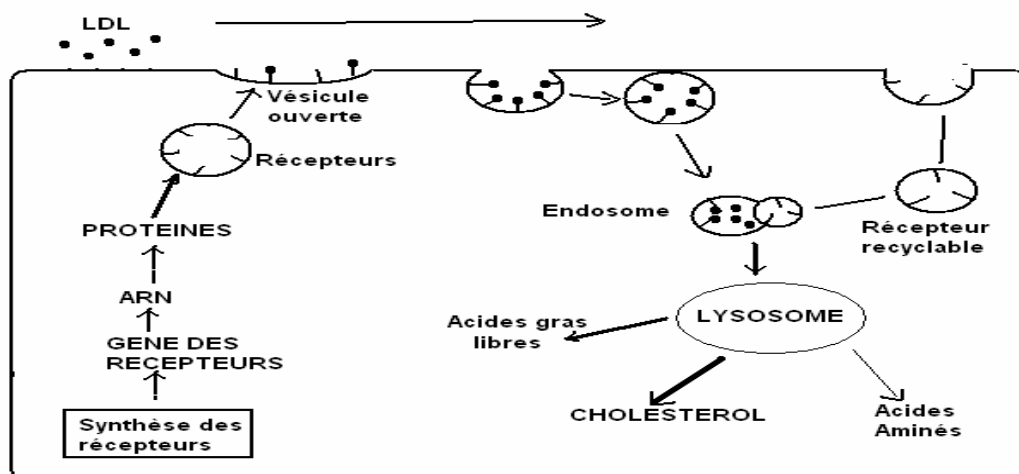


Figure 02 : Endocytose par les récepteurs des LDL dans les cellules (Brown et Goldstein, 1985)

Il a également été clairement démontré que les LDL sont une classe de lipoprotéines hétérogènes. En effet, plusieurs études ont rapporté que les LDL petites et denses seraient davantage dommageables dans le développement de maladies cardio-vasculaires que les particules plus larges. En effet, les LDL petites et denses seraient plus facilement internalisées dans l'espace subintimal, où elles adhèreraient à des matrices de protéoglycans, seraient oxydées, et augmenteraient ainsi le risque d'événements athéro-thrombotiques (**Austin et al., 1990**).

I-4-4- Les HDL (High density lipoproteins)

Les HDL constituent pour l'organisme un réservoir des apoprotéines E, A et C. Ce sont elles qui transfèrent aux chylomicrons et aux VLDL l'apoC-II, activatrice de la lipoprotéine lipase, indispensable à leur métabolisme. Elles assurent aussi la récupération de l'apoC-II avant le recyclage des reliquats des chylomicrons, de l'apoC-II et de l'apoE avant la métabolisation des LDL par endocytose et hydrolyse dans les lysosomes (**Peelman, 2000**).

Des HDL discoïdales (HDL naissantes) sont sécrétées par le foie et excrétées par exocytose dans la circulation sanguine comme des particules inorganisées, constituées d'apolipoprotéines et de phospholipides (essentiellement des phosphatidylcholines) et reçoivent du cholestérol non estérifié des cellules périphériques. Les HDL se structurent en particules sphériques riches en esters de cholestérol il est immédiatement estérifié par une enzyme plasmatique, lecithine cholesterol acyl transferase (LCAT) (**Peelman, 2000**). Le cholestérol estérifié devient hydrophobe et est ainsi piégé dans les HDL. Ce processus retire de la circulation et des cellules l'excès du cholestérol libre, au fur et à mesure qu'elles s'enrichissent en cholestérol qui joue le rôle de structurant (**Breslow, 1995**).

Les HDL circulantes peuvent être retirées par le foie de la circulation par endocytose médiée par des récepteurs spécifiques. Les esters du cholestérol sont hydrolysés. Le cholestérol libre peut être recyclé dans d'autres lipoprotéines, utilisé pour la formation des hormones ou éliminé sous forme de sels biliaires (**Raisonnier, 2003**).

Il existe une certaine hétérogénéité à l'intérieur de la classe des HDL. Ainsi, on peut retrouver des différences qualitatives et quantitatives dans la composition des lipides, des apos, des enzymes, et des protéines de transfert donnant lieu à différentes sous-classes de HDL qui sont caractérisées par des différences au niveau de la forme, la densité, la taille, la

charge et l'antigénécité. On retrouve des particules HDL contenant l'apo A-I et A-II et d'autres contenant seulement l'apo A-I. Il a été suggéré que les HDL avec seulement l'apo A-I seraient plus efficaces que les HDL contenant l'apo A-I et A-II pour promouvoir l'efflux de cholestérol (Von Eckardstein et al., 1994)

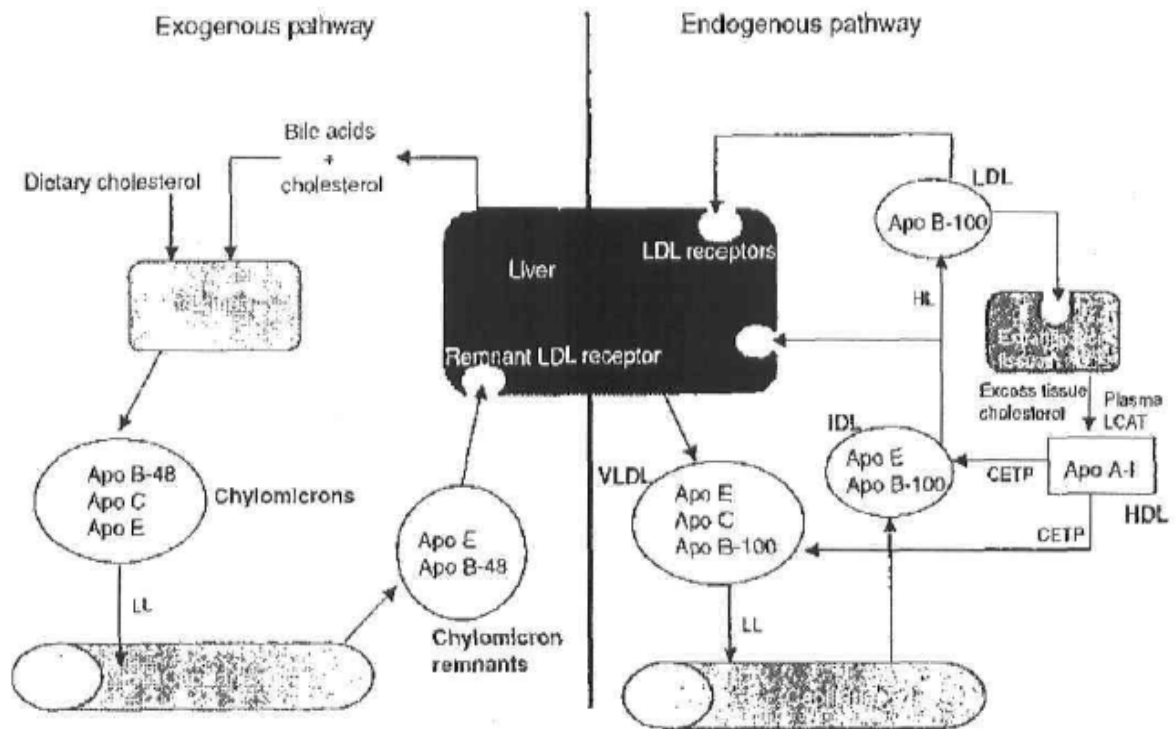


Figure 03 : Sommaire des voies générales du métabolisme des lipoprotéines (Tremblay, 2006)

Chapitre II

Les hyperlipidémies

II-1- Définition de l'hyperlipidémie

L'hyperlipidémie regroupe l'ensemble des augmentations quantitative d'une ou plusieurs classes de lipoprotéines plasmatiques, elle s'accompagne le plus souvent d'une modification qualitative des lipoprotéines, ce qui donne des hyperlipoprotéinémies, hypercholestérolémies, hypertriglycéridémies, diminution du HDL-cholestérol et une augmentation du LDL-cholestérol. Ce qui se traduit sous forme de modifications pathologiques (**Anaes, 2000**).

II-2- Les facteurs de risques

Les hyperlipidémies peuvent être la conséquence de plusieurs facteurs, selon leurs origines on distingue : Les facteurs de risques primaires qui sont les résultats des prédispositions génétiques qui peuvent intervenir dans le cas d'une hyperlipidémie familiale (**Johnson, 1989**). Cette hyperlipidémie primaire peut être modifiées et aggravées par d'autres facteurs dits secondaires : environnement nutritionnelles, pathologies associées (**Moulin, 2001**).

II-2-1- Les facteurs de risques primaires

Toute anomalie portant sur la structure primaire ou la régulation de l'expression d'un ou plusieurs gènes du métabolisme des lipoprotéines, définit nommément une hyperlipidémie. La plupart des hyperlipidémies sont hérissables et se présentent donc comme des maladies familiales. Le type de hyperlipidémie, sa gravité, sa précocité, celles de ses complications cardiovasculaires, l'existence d'anomalies métaboliques associées (diabète, hypertension artérielle, obésité) et leur mode de transmission dans la famille orientent d'emblée vers une hérédité monogénique ou polygénique (**Benlian, 1996**).

Dans le premier cas, la prédisposition génétique dépend d'un seul gène ou locus, qui détermine l'essentiel des caractères associés à la dyslipidémie, qui est généralement plus sévère et plus précoce. Les hyperlipoprotéinémies monogéniques peuvent résulter d'anomalies moléculaires de gènes d'apolipoprotéines, d'enzymes ou de récepteurs intervenant dans les trois voies de régulation du métabolisme des lipoprotéines. Dans le deuxième cas, plusieurs gènes interviennent à des degrés divers, souvent en interaction avec des facteurs d'environnement, pour favoriser l'apparition de l'anomalie lipidique, qui est souvent plus tardive (**Benlian, 1996**).

II-2-2- Les facteurs de risques secondaires

II-2-2-1- Cholestase intrahépatique

C'est une stagnation de la bile dans les voies biliaires situées à l'intérieur du foie. Elle est due à une obstruction de ces voies ou à une diminution de la sécrétion de la bile par atteinte des cellules du foie. Cette maladie peut induire plusieurs modifications métaboliques tels que les hypercholestérolémies, qui sont parfois très sévères et une augmentation apparente du cholestérol LDL ou la teneur en phospholipides augmente et le taux de triglycérides diminue, mais il n'y a pas de modification de la composition des HDL. (Danielsson *et al.*, 1977 ; Miller ; 1990 ; Chuang *et al.*, 1995).

Le taux plasmatique des esters de cholestérol et l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) augmentent. Cette enzyme synthétisée par le foie joue un rôle dans l'estérification des acides gras au cholestérol et un rôle fondamental dans la synthèse et la dégradation des lipoprotéines (Figure 4) (Blomhoff *et al.*, 1978 ; Silbernagl et Lan, 2003).

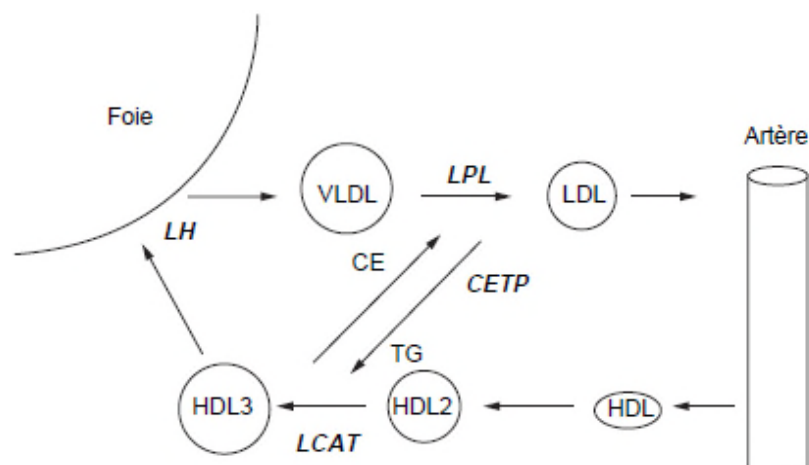


Figure 04 : Schématisation du rôle des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines (Picard, 2000)

II-2-2-2- Régimes riches en matières grasses

Un régime riche en matières grasses peut entraîner une hyperlipidémie et une augmentation modérée du taux sérique de cholestérol. Dans ce cas, la majorité du cholestérol est transportée par les HDL-c (HDL1) (Mahley *et al.*, 1974). Une partie substantielle des HDL observées en réponse après ingestion de cholestérol est d'origine périphérique (Sloop *et al.*, 1983). Lorsque ces HDL arrivent dans le plasma, elles sont transformées en HDL-c sous

l'action de la LCAT (qui est activé par leur Apo AI) (Figure 4) (Bauer, 2003). Les concentrations de LDL et d'IDL augmentent et les concentrations de HDL (HDL2) diminuent. L'hypercholestérolémie se traduit par l'apparition de VLDL, et par l'enrichissement des LDL, des IDL et des HDLc en cholestérol (Mahley et al., 1974). Les régimes très riches en matières grasses (plus de 50 %) peuvent en outre provoquer une augmentation des triglycérides (Reynolds et al., 1994).

II-3- Classification des hyperlipidémies : la Classification internationale de Fredrickson

La classification internationale de Fredrickson repose sur l'électrophorèse des lipoprotéines, et est définie par le type de lipoprotéine dont la concentration plasmatique est augmentée. On en décrit six phénotypes (I, IIa, III, IV, IIb, V) dont quatre sont liés à l'élévation d'une seule lipoprotéine (I : augmentation des chylomicrons, IIa : augmentation des LDL, III : augmentation des IDL, IV : augmentation des VLDL), et deux à l'élévation de deux lipoprotéines (IIb : augmentation des VLDL et LDL, V : augmentation des chylomicrons et des VLDL) (Fredrickson et al., 1967)

II-3-1- Anomalie liées a l'élévation d'une seule lipoprotéine

II-3-1-1- L'hyperlipoprotéinémie de type I

L'hyperlipidémie de type I est due à un défaut génétique (déficit en lipoprotéine lipase) qui entraîne un ralentissement important du catabolisme des lipoprotéines riches en TG, et notamment des chylomicrons (ou hyperchylomicronémie qui est rare et d'environ 1 cas sur 1 000 000), ou de son activateur l'apoCII (co-facteur activateur nécessaire à l'activité de la lipoprotéine lipase). Le cholestérol total (CT) est normal ou bas (< 2,2 g/l soit 5,72 mmol/l), les TG sont élevés atteignant parfois des concentrations importantes pouvant dépasser 50 g/l, dépendant de la teneur de l'alimentation en graisses. La complication majeure est la pancréatite aiguë (Cugnet et al., 2008).

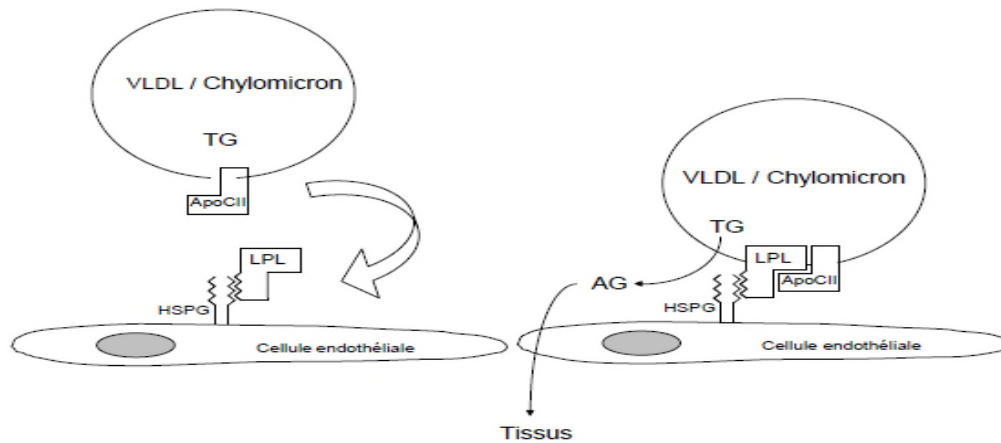


Figure 05 : Mécanismes d'action de la lipoprotéine lipase (Mahley *et al.*, 2003)

II-3-1-2- L'hyperlipoprotéinémie de type IIa

Dite aussi hypercholestérolémie pure ou familiale, elle est à l'origine due aux altérations génétique qui touchent le gène codant pour la synthèse des récepteurs des LDL (ou R-LDL) qui sont de haute affinité aux LDL, cette affection empêche la capture cellulaire des LDL, est caractérisée par une élévation du CT et des LDL, les concentrations de HDL et de TG étant normales (Silbernagl et Lan, 2003).

Le gène codant pour le R-LDL est constitué d'environ 45kb. Il est situé sur le bras court du chromosome 19 (Figure 6) L'anomalie touchant ce gène peut se traduire par deux formes : polygénique due à des défauts génétiques mineurs amplifiés et associée a des erreurs alimentaires (régime trop riche en graisses saturées) ; c'est la forme d'hypercholestérolémie la plus fréquente et monogénique due à un défaut de synthèse de récepteurs des LDL (Goldstein *et al.*, 1983).

Le R-LDL est une glycoprotéine de 839 acides aminés (160kDa) retrouvée à la surface des cellules et formé de 5 domaines fonctionnels. Ce récepteur lie et internalise les lipoprotéines plasmatiques présentant à leur surface l'apo B ou l'apo E. Ainsi, le R-LDL reconnaît les LDL, les IDL et les résidus de CM (Brown, 1981), L'affinité du R-LDL est plus grande pour les lipoprotéines contenant l'apo E, (Pitas *et al.*, 1980), les VLDL et les lipoprotéines (a), sont pauvres en ligand de R-LDL a leurs surfaces (Soutar, 1999)

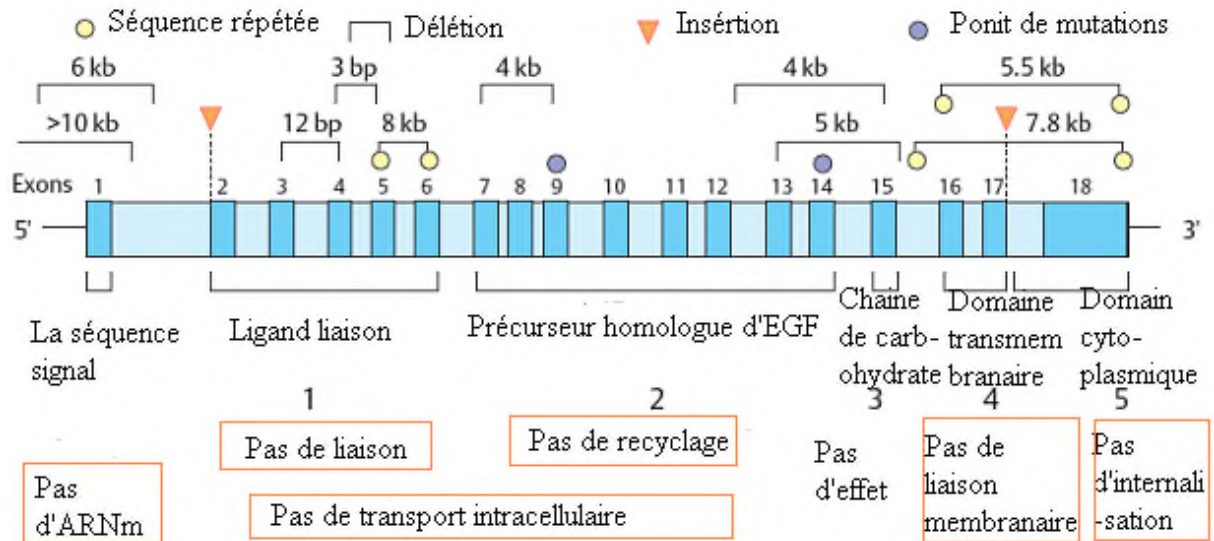


Figure 06: Structure de gène R-LDL (Brown et Goldstein, 1986)

D'autres épisodes peuvent se rencontrer dans ce type de dyslipidémie : un blocage de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique, une diminution de l'insertion du récepteur au niveau de la membrane cellulaire, ou une altération de l'endocytose (Figure 7) (Silbernagl et Lan, 2003).

Le R-LDL joue donc un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol. Puisque les taux plasmatiques de cholestérol-LDL (LDL-c), jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, l'activité de ce récepteur a une influence sur la susceptibilité d'un individu à développer une maladies cardiovasculaires (MCV) (Brown et al., 1981; Brown et Goldstein, 1986)

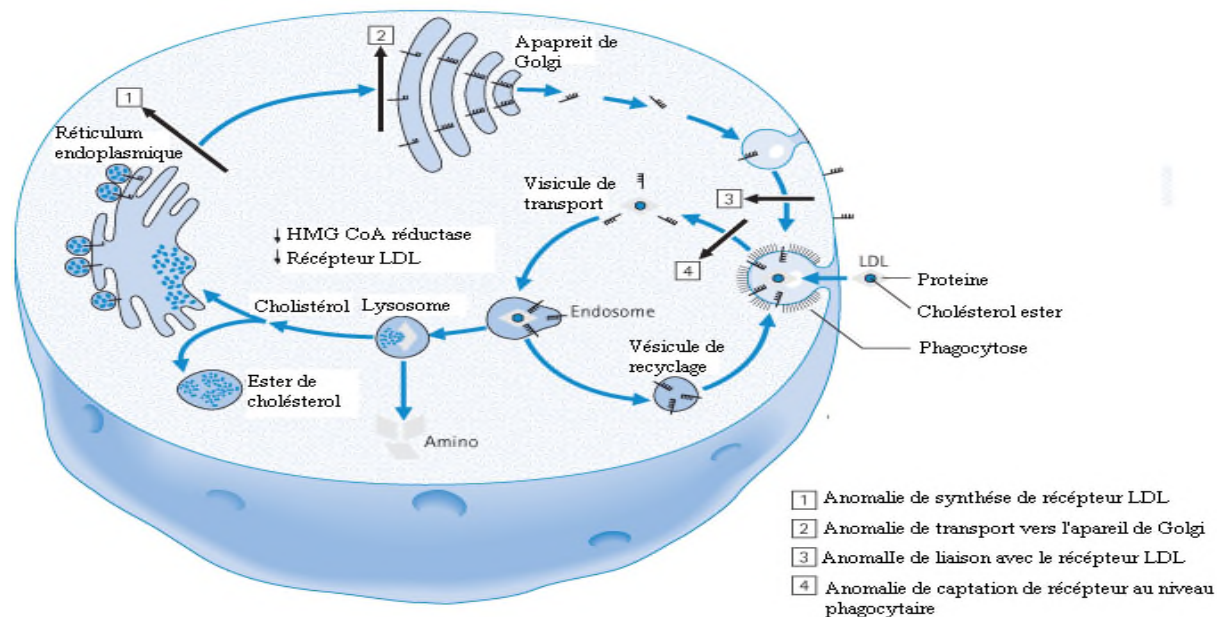


Figure 07 : Les différentes étapes impliquées dans la biosynthèse de cholestérol et les récepteurs LDL en montrant les types des mutations dans l'hypercholestérolémie familiale (passarge, 2007).

II-3-1-3- Hyperlipidémie de type III

Elle se caractérise par une augmentation simultanée du CT et des TG et à ce titre, elle entre dans le groupe des hyperlipidémies mixtes, elle est rare et très athérogène, au niveau des artères coronaires et périphériques. L'analyse de la composition lipidique des VLDL, montre que ces lipoprotéines sont enrichies en cholestérol (Gregg *et al.*, 1981). Un variant Apo E anormale qui n'est pas reconnu par les récepteurs E, est exprimé à la place de l'Apo E normale. On aboutit ainsi à un trouble de la capture des résidus de chylomicrons, d'IDL et les VLDL au niveau hépatique et à une augmentation de leur concentration plasmatique (Silbernagl et Lan, 2003).

Il existe, en effet, trois allèles du gène de l'Apo E, epsilon2, epsilon3 et epsilon4. Ils résultent d'une transition d'une cytosine (C) en une thymine (T) aux positions correspondantes aux acides aminés 112 et 158 de la protéine (Figure 8). Chaque individu possède un phénotype constitué de deux allèles et peut appartenir à l'un des six groupes suivants : E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4 ou E4/E4, trois génotypes homozygotes et trois hétérozygotes. (Rall *et al.*, 1982).

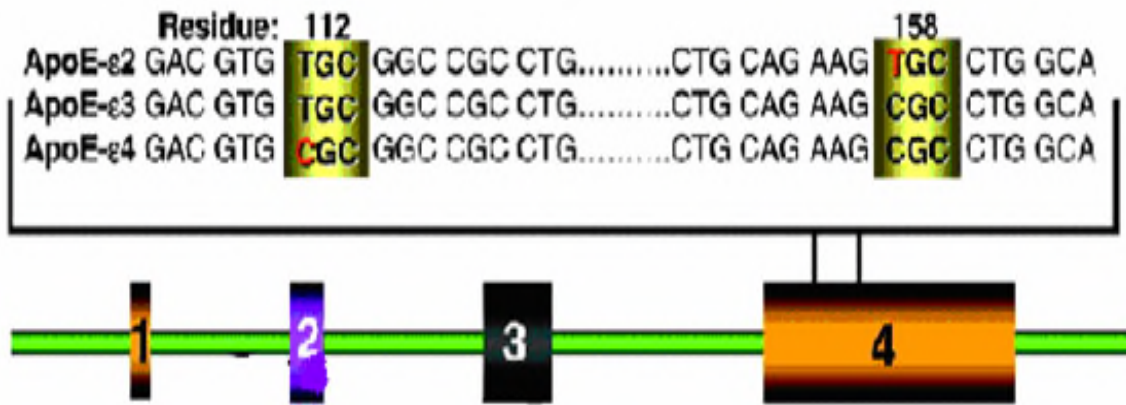


Figure 08 : Les mutations du gène de l'Apo E aux positions 112 et 158 (Simon *et al.*, 2003)

L'Apo E est une composante majeure prenant part au processus général d'homéostasie du cholestérol, maintien l'édifice lipoprotéique et, elle représente un ligand spécifique du récepteur de l'Apo E exclusivement hépatique, qui interagit avec les lipoprotéines contenant l'Apo E en vue de leur catabolisme. Ceci concerne en particulier les lipoprotéines riches en TG et en cholestérol et qualifiées de résidus de chylomicrons d'origine intestinale et de VLDL qui se composent de 10 à 20 % d'Apo E (Davignon, 2002)

Les sujets de type III sont presque tous porteurs du phénotype E2/E2, celui-ci entraîne une liaison défectueuse des IDL à leur récepteur, ce qui provoque leur accumulation plasmatique. La coexistence d'une autre circonstance métabolique ou de l'environnement comme l'obésité, une alimentation riche en graisses saturées fait appelle aux autres maladies, cela peut être une hyperlipidémie surajoutée (de type IIa, ou une hyperlipidémie combinée familiale HCF par augmentation de la synthèse d'Apo B), ou un risque élevé d'athérosclérose (Mahley, 1989).

II-3-1-4- Hyperlipidémie de type IV

Ce type représente 30% des dyslipidémie, fréquemment observée chez les sujets en surcharge pondérale (Gotto *et al.*, 1999 ; Labrousse, 2002). Les TG d'origine endogènes (VLDL) sont élevés (hypertriglycémie endogène), et les concentrations plasmatiques du CT et des LDL sont normales et celles du HDL basses, (Labrousse, 2002 ; Denis, 2011).

Une hypertriglycéridémie est habituellement consécutive aux anomalies de la lipoprotéine lipase et à l'insulinorésistance (**Charuhas et al., 1997**). Cette insulinorésistance favorise la lipolyse. Les acides gras libérés en excès sont ré-estérifiés en triglycérides, ensuite utilisés pour la formation de VLDL dans le foie (**Annis, 1986**).

Le catabolisme retardé surtout du fait d'une activité réduite de l'enzyme LPL qui permet l'hydrolyse des particules de VLDL, induit l'augmentation de la concentration sérique de VLDL, et une diminution des HDL (**Halimi, 2000**).

II-3-2- Anomalies liées à l'élévation de deux lipoprotéines

II-3-2-1- Hyperlipoprotéïnémie type IIb

C'est une hyperlipidémie mixte et fréquente, mais dont la définition recouvre également HCF, maladie génétiquement transmise sur le mode monogénique autosomique dominante (**Grundy et al., 1987**). En plus du cholestérol, les TG sont également légèrement augmentées. La cause de cette maladie réside vraisemblablement dans une surproduction d'Apo B-100, qui augmente la synthèse de VLDL et aboutit donc à une formation accrue de LDL. La dysbêtalipoprotéïnémie familiale prédispose au déclenchement d'une hyperlipoprotéïnémie de type III (**Silbernagl et Lan, 2003**).

Au sein d'une même famille, les anomalies biologiques (hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie) sont très variables d'un individu à l'autre, et surtout chez le même individu d'un dosage à l'autre, en raison essentiellement de la sensibilité de cette affection aux facteurs d'environnement impliqués dans l'augmentation des TG : l'alcool, la consommation excessive de sucres purs et/ou l'existence d'une obésité androïde. Un même individu peut donc présenter dans le temps successivement une hypercholestérolémie de type IIa, une hyperlipidémie mixte de type IIb ou une hypertriglycéridémie de type IV.

II-3-2-2- Hyperlipidémie de type V

Il s'agit d'une affection exceptionnelle, qui réunit les caractéristiques de l'hyperlipidémie de type I et de type IV. Elle associe donc une élévation des chylomicrons et des VLDL. Il existe une augmentation du CT et des TG, celle-ci étant variable selon l'apport alimentaire (**Denis, 2011**).

Tableau II: Classification des hyperlipidémies par l’OMS (classification modifiée de Fredrickson) (Mahamuni et al., 2012)

Type	Total cholesterol	LDL cholesterol	Plasma TGs	Lipoprotein abnormality	Primary causes	Secondary causes
I	Elevated	Low or normal	Elevated	Excess chylomicrons	Lipoprotein lipase deficiency, apoC-II deficiency	Systemic lupus erythematosus
II a	Elevated or normal	Elevated	Normal	Excess LDL	Familial hypercholesterolemia	Hypothyroidism
II b	Elevated	Elevated	Elevated	Excess LDL and VLDL	Familial combined hyperlipidemia	Nephrotic syndrome, diabetes, anorexia nervosa
III	Elevated	Low or normal	Elevated	Excess chylomicron remnants and Intermediate density lipoproteins	Familial type III Hyperlipoproteinemia	Hypothyroidis diabetes, obesity
IV	Elevated or normal	Normal	Elevated	Excess VLDL	Familial combined hyperlipidemia, Familial Hypertriglyceridemia	Diabetes, chronic renal diseases
V	Elevated	Normal	Elevated	Excess chylomicrons and VLDL	Familial hypertriglyceridemia, apoC-II deficiency	Alcohol, diuretics, β blockers, oral

apoC-II = apolipoprotein-C II; LDL = low-density lipoprotein; TG = triglyceride; VLDL = very low-density lipoprotein.

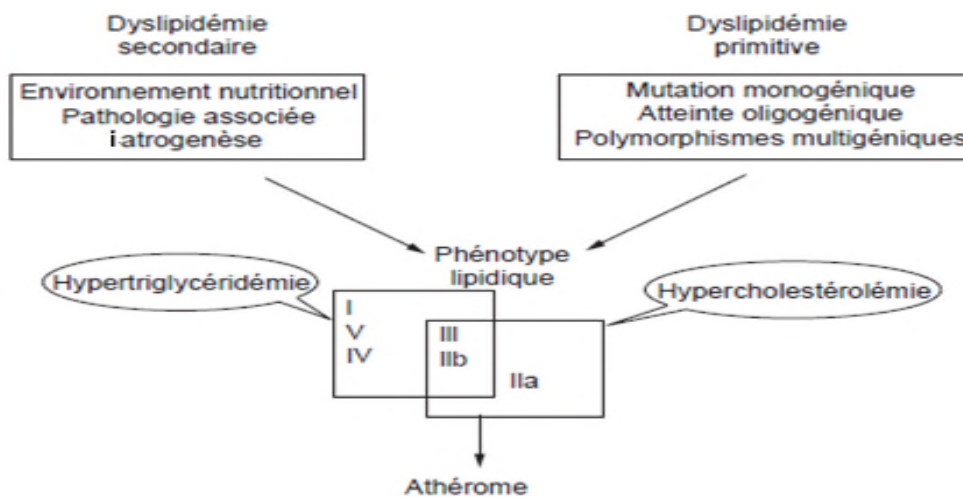


Figure 09 : Interactions entre les différents types de dyslipidémies, et le phénotype lipidique (Moulin, 2001).

II-4- Complications de l'hyperlipidémie

II-4-1- Diabète

Le diabète sucré est un trouble métabolique qui se caractérise par une hyperglycémie, causée soit par une carence en insuline qui inhibe l'enzyme 3-hydroxy -3-méthyl glutamyl coA réductase (HMG-coA réductase) impliquée dans la biosynthèse du cholestérol, ce qui se traduit par une hyperlipidémie. Soit par un accroissement de la résistance des tissus à l'action de l'insuline, soit par ces deux mécanismes à la fois. Les modifications du statut insulinaire observées au cours du diabète (insulinopénie dans le diabète de type 1 et insulino-résistance dans le diabète de type 2) peuvent être mises en cause. L'hyperglycémie intervient aussi directement, en modifiant le métabolisme lipidique au niveau hépatique et en favorisant la glycation non enzymatique des apolipoprotéines (**Manson et al., 1991**).

Le diabète de type 1 concerne 10% des patients diabétiques et le diabète de type 2 90% (**Turner et al., 1997; Furlanos et al., 2006**). Les patients diabétiques de type 2 présentent un risque cardiovasculaire significativement augmenté, trois à cinq fois supérieur à celui de la population non diabétique (**Stamler et al., 1993; Haffner et al., 1998**).

Un métabolisme défectueux des triglycérides sériques qui résulte de la résistance à l'insuline établit une situation où le métabolisme de cholestérol est aussi fortement influencé. Ceci implique des modifications quantitatives et qualitatives touchant toutes les classes de lipoprotéines, dues aux liens métaboliques entre elles. Les anomalies quantitatives sont caractérisées essentiellement par une augmentation des triglycérides et une baisse du HDL-cholestérol, le taux plasmatique de LDL-cholestérol est chez les diabétiques de type 2 normal ou discrètement augmenté (**Vergès, 1999; Steiner et al., 1998**).

L'augmentation du taux des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL, IDL) s'explique d'une part, par une augmentation de la production hépatique des VLDL et d'autre part, par un ralentissement du catabolisme des VLDL et des IDL (**Kissebah et al., 1982; Duvillard et al., 2000**). Cela résulte essentiellement d'une activité réduite de la lipoprotéine lipase, dont la synthèse est normalement stimulée par l'insuline. Elle est responsable de l'hydrolyse des triglycérides transportés par les VLDL et les chylomicrons, et du transfert des acides gras ainsi libérés vers le tissu adipeux et les muscles. La surproduction des VLDL est due à deux facteurs : l'incapacité de l'insuline de réduire leur synthèse hépatique, et un flux

accélééré d'acides gras en provenance du tissu adipeux vers le foie qui pousse la synthèse des VLDL, a cause de la résistance a l'insuline préalablement avérées (**Lewis et al., 1996**).

Des anomalies quantitatives à caractères athérogènes, sont aussi observées au cours de diabète type 2, elles correspondent à des VLDL de grandes tailles qui sont majoritaires et enrichies en triglycérides et en cholestérol, qui sera captées par les macrophages, a l'aide des récepteurs scavenger pour former des cellules spumeuses puis une plaque d'athérome, Il est aussi observé des LDL denses de petite taille, enrichies en triglycérides à caractères athérogènes et très oxydées qui sont aussi captées par les récepteurs scavengers des macrophages, ce qui alimente la formation des cellules spumeuses (**Vergès et al., 2003**). Ce processus suis le phénomène de la glycation non enzymatiques des apolipoprotéines AI, AII, C et E au sein des VLDL (**Curtis et Witztum, 1985**). La glycation de l'apolipoprotéine E est en particulier responsable du ralentissement du catabolisme des VLDL, en diminuant la liaison de l'apo E à son récepteur spécifique (**Mano et al., 1990**). Une glycosylation de l'apolipoprotéine B des LDL, celle-ci est en corrélation avec l'hyperglycémie (**Kim et Kurup, 1982**). Les LDL glyqués perdent l'affinité a leurs récepteurs spécifiques, ce qui explique le ralentissement de leurs catabolismes et l'augmentation de leurs séjours plasmatiques ce qui favorise leurs oxydation (**Steinbrecher et Witztum, 1988**).

Tableau III : Principes anomalies des lipoprotéines au cours de diabète type 2 (**Vergés, 2004**).

Lipoprotéine	Taux plasmatiques	Anomalies cinétiques	Anomalies qualitatives
VLDL	↗	↗ Production ↘ Catabolisme	↗ VLDL1 (grande taille) Glycation apolipoprotéine
LDL	Normal (ou légèrement ↗)	↘ Catabolisme ↘ Turn-over	LDL petites et denses. Riches en TG ↗ Oxydation. Glycation apolipoprotéine
HDL	↘	↗ Catabolisme	Riches en TG. Glycation apolipoprotéine

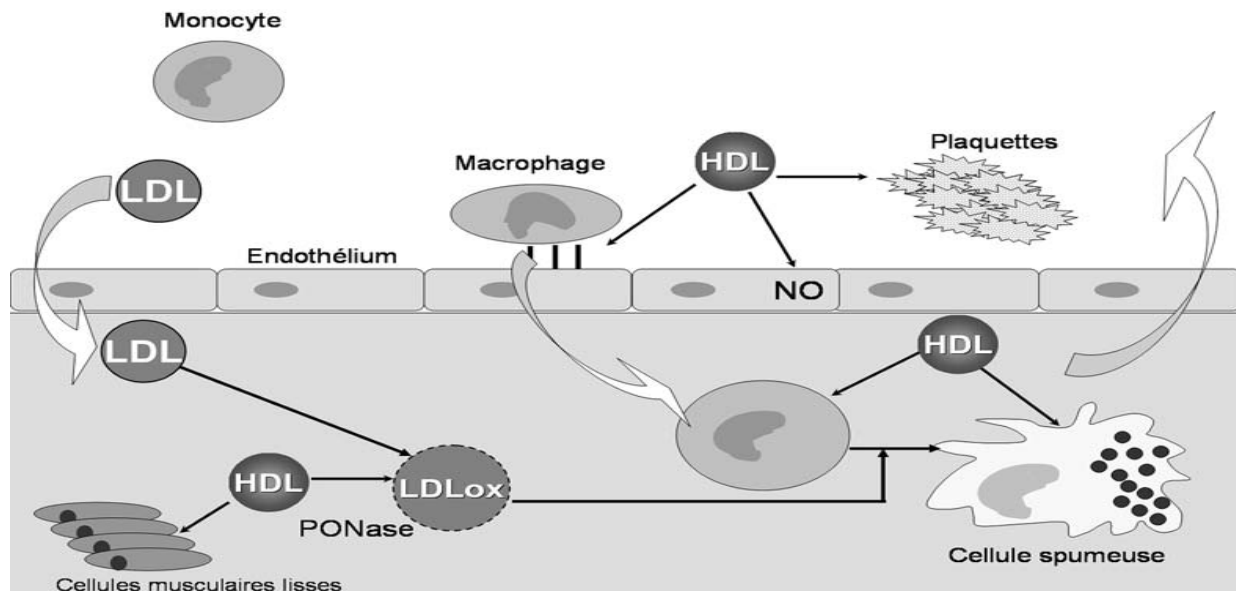
II-4-2- Athérosclérose

L'athérosclérose est en fait un phénomène complexe impliquant de nombreux facteurs tel que l'hypercholestérolémie (Gotto et Pownall, 2003). La dysfonction endothéliale est le processus menant à l'état inflammatoire qui initie l'athérosclérose (Figure 9) (Leopold et Loscalzo, 2000). Dans des conditions physiologiques normales, l'endothélium forme une couche semi-perméable entre les éléments circulant du sang et la paroi du vaisseau sanguin; il sécrète aussi des substances vasoactives afin de réguler le tonus de l'artère : il diminue le tonus vasculaire à l'aide du l'oxyde nitrique (NO) et de l'EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*), et il équilibre l'effet vasodilatateur de ces substances à l'aide de peptides vasoconstricteurs, tels que l'endothéline et l'angiotensine II. Dans les zones artérielles où le flux laminaire est perturbé, la diminution des forces de cisaillement augmente la perméabilité de l'endothélium et facilite l'infiltration des LDL dans l'espace sous-endothélial (Gimbrone et al., 2000). De plus la diminution de ces forces, entraîne une activation endothéliale des SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) qui vont réguler positivement l'expression des gènes codant pour le récepteur des LDL et la cholestérol synthase (Liu et al., 2002).

L'hyperlipidémie favorise l'augmentation de la captation et de la synthèse des LDL par les cellules endothéliales, à l'origine d'une accumulation sous-endothéliale de LDL (Carmena et al., 2004). Les LDL qui traversent l'endothélium se retrouvent dans l'espace sous-endothélial où elles peuvent être piégés par des protéoglycanes sécrétés par les cellules endothéliales au niveau de l'intima des artères à cause d'une interaction avec l'apoB100 (Berliner et al., 1995). La survenue préalable d'une dysfonction endothéliale conduit à une production d'espèces réactives de l'oxygène, qui vont attaquer la partie lipidique et protéique et les emprisonnées dans l'intima ; La molécule d'apo B100 ainsi modifiée sera reconnue par le système immunitaire comme étant une substance étrangère et les macrophages de l'espace subendothéliale recrutés au niveau de la lésion pourront alors les internaliser via les récepteurs scavengers ou le récepteur des LDL oxydés qui ne sont pas sous le contrôle inhibiteur du contenu intracellulaire en cholestérol, (Sparrow et al., 1989; De Winther et al., 2000; Boullier et al., 2001) .

Les macrophages se surchargent en cholestérol et se transforment en cellules spumeuses qui vont s'accumuler dans la paroi artérielle (Tontonoz et al., 1998), ce qui va

engendrer un processus (inflammatoire et migratoire) induisant à la formation des plaques qui caractérise l'athérosclérose, ces plaques sont composées de dépôts lipidiques riches en cholestérol (athérome) enveloppés dans une gangue fibreuse (sclérose) (Lusis, 2000).



Figur 10 : Les différents processus induisant l'initiation de l'athérosclérose (Fruchart, 2000)

II-4-3- L'obésité

Il est bien établi qu'un excès de lipides alimentaires et/ou du type d'acides gras (saturés ou insaturés) peut contribuer au développement de plusieurs maladies, telles que l'obésité (Kelley et al., 2002). Parmi les facteurs qui aggrave cette pathologie, on trouve des complications qui sont liées aux hypertriglycéridémie secondaires qui sont extrêmement fréquentes : elles toucheraient un individu sur 300, en particulier l'hyperlipidémie de type IV (Gotto et al., 1999) et les patients concernés sont porteurs d'une obésité androïde (ou abdominale) associé à la présence de perturbations métaboliques (Grundy, 1999).

Dans ce cas, l'hypertriglycéridémie serait liée à l'état d'insulinorésistance (Grundy, 1999 ; Howard, 1999) qui siègerait dans le tissu adipeux, entraînant une sécrétion inappropriée d'acides gras. L'augmentation de la graisse viscérale expose le foie à un flux accru d'acides gras et de glucose servant de substrats pour une augmentation de la production des VLDL; ces particules sont de grande taille et enrichies en apoprotéine E. Ces anomalies altèrent également le transfert des phospholipides et des apoprotéines des particules riches en

triglycérides vers les HDL et les échanges d'ester de cholestérol et de TG entre HDL et VLDL. Les HDL s'enrichissent en TG. Par ailleurs, la clairance des HDL est accélérée du fait d'une augmentation de l'activité de la lipase hépatique. Cet état s'accompagne aussi de changements de la composition des LDL qui deviennent moins riches en ester de cholestérol, plus denses, plus petites et plus athérogènes (**Austin, 1996**).

La fréquence des complications associées à l'obésité augmente, en particulier celle du diabète (type II) (**Laville et al., 2005**). Or l'état d'hyperinsulinémie résultant de l'insulinorésistance, et d'hypertriglycéridémie pourrait être responsable en partie d'une accumulation de triglycérides intrahépatocytaires qui résulte d'un déséquilibre entre les capacités de synthèse des triglycérides (soit à partir du glucose par la voie de lipogénèse, soit à partir des lipoprotéines circulantes) et les capacités d'oxydation des acides gras dans l'hépatocyte ce qui s'aggrave vers une stéatose hépatique non alcoolique (**Ratziu et al., 2000**).

Partie pratique

Matériel et méthodes

III-1- Matériel végétal

III-1-1- Classification et description

Rhamnus alaternus appartient à l'embranchement Magnoliophyta (Spermaphytes Angiospermes) et à la classe des Magnolopsida ou Dicotylédones. Elle est de l'ordre des Rhamnales, de la famille des Rhamnaceae et du genre *Rhamnus*.

C'est un arbuste dimoïque distribué le long du bassin méditerranéen, qui fleurit pendant la fin de l'hiver et les débuts du printemps. Elle produit des fruits charnus qui mûrissent à la fin du printemps et début de l'été. Les fruits sont habituellement porter en deux ou trois graines qui sont couvertes par un endocarpe qui s'ouvre quand la pulpe de fruit est enlevée (**Gulias et al., 2004**).

Rhamnus alaternus possède plusieurs noms vernaculaires, en Tunisie, elle est connue sous le nom d'Oud EL-khir. En Kabylie, elle est appelée Mlillesse. En français, c'est Nerprun méditerranéen et en anglais Buckthorn. Elle a été traditionnellement employée en tant que digestive, diurétique, laxative, hypotenseur et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (**Izhaki et al., 2002 ; Ben Ammar et al., 2007 ; Ben Ammar et al., 2009**).

III-1-2- Préparation du matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Rhamnus alaternus*, que nous avons récolté au niveau du village Taghzouit de la région de Bejaia durant le mois mars 2012. Une fois récoltée, les feuilles fraîches de *Rhamnus alaternus* ont été séchées à l'air libre pendant 20 jours, puis transférées à l'étuve à 35 °C pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et une meilleure extraction. Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les particules ainsi obtenues après broyage sont tamisées sur un tamis de diamètre de 250µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stocké à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à extraction (Figure 11).

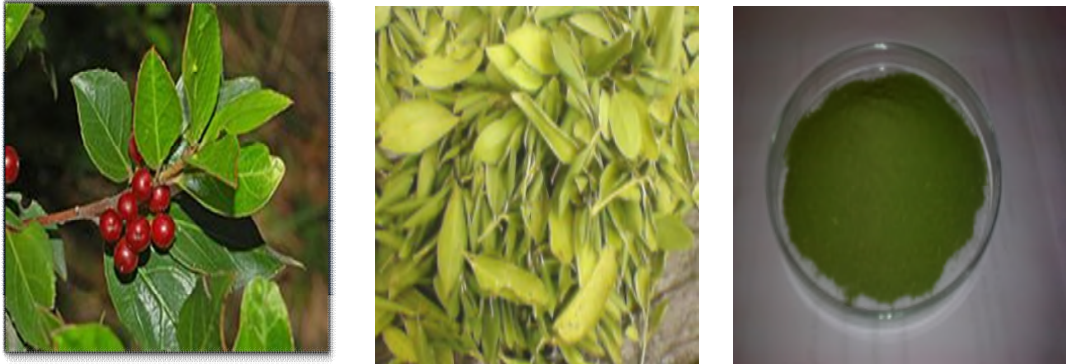


Figure 11: Les feuilles (fraîches et sèches) et poudre de *Rhamnus alaternus* (Aronne et wilcock, 1995).

III-1-3- Extraction

L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal selon le protocole préconisé par (Owen et Johns, 1999) avec de légère modification. 50g de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* sont macérés dans 300 ml de méthanol. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 07 heures à une température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée sur papier de Wattman N°03, et le filtrat est récupéré (filtrat 1). Ensuite, 200 ml de méthanol ont été ajoutée pour le précipité, et le mélange a été laissé sous agitation pendant une nuit (afin d'avoir une extraction exhaustive) et ensuite filtré dans les même conditions, le filtrat (filtrat 2) est récupéré. Les deux filtrats ont été mélangé et laisser pour évaporation dans une étuve à 40 °C jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant et le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

P₀ : poids de la poudre avant extraction.

P₁ : poids de l'extrait sec après extraction

III-1-4- Analyses phytochimiques

III-1-4-1- Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits a été déterminé en suivant le protocole d'**Owen et Johns (1999)**, avec quelques modifications. Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Follin-Ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange jaune d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) qui se réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration est proportionnelle aux taux des composées phénoliques (**Ribéreau-Gayon et al., 1982**).

A température ambiante, 250 μ l d'extrait ont été ajouté à 1,25ml du réactif de Folin-Ciocalteu (0,1N) et le tout est bien mélangé. Après 5 min d'incubation, 1 ml d'une solution de monohydrate carbonate de sodium (7,5% p/v) a été ajoutée et le tout est bien mélangé. La préparation a été laissée incuber pendant 1 heure à l'obscurité, puis l'absorbance a été mesurée à 740 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.

Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage de l'échantillon. La quantité des polyphénols totaux est exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique (mg EAG/g d'extrait) (annexe I).

III-1-4-2- Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïde des extraits a été déterminé en suivant le protocole de **Quettier-Deleu et al. (2000)**, avec quelque modification. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres en présence du chlorure d'aluminium, grâce aux groupements hydroxyles libres (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait (**Berset, 2006**).

A température ambiante, 1 ml de la solution d'extrait est ajouté à 1 ml d'une solution de chlorure d'aluminium (2%), le tout bien mélanger. Après incubation pendant 15 min, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 410 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.

Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de la quercétine dans les mêmes conditions que le dosage de l'échantillon. La quantité des flavonoïdes est exprimée en équivalents milligramme de quercétine (annexe I).

III-1-5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydant

III-1-5-1- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), radical libre de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en diphényl picryl hydrazine (Athamena et al., 2010). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

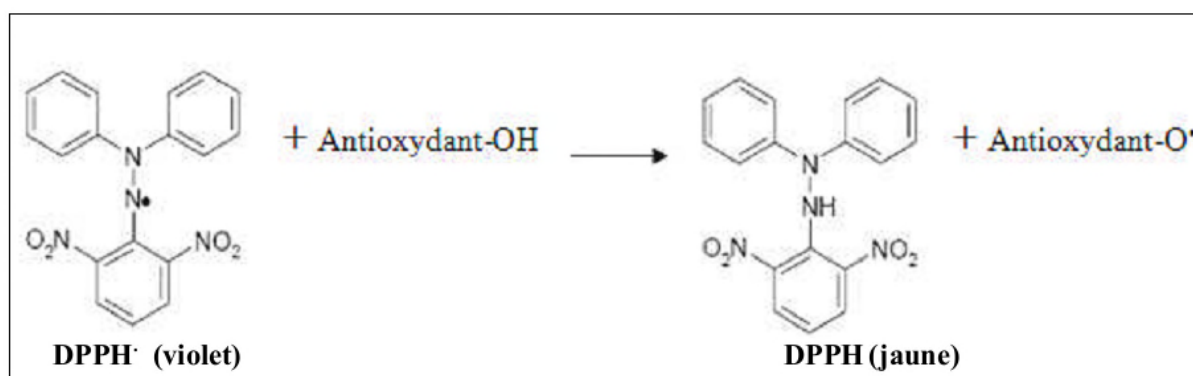


Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Bastida et al., 2002).

La mesure de l'activité scavenging du radical DPPH a été effectuée en suivant le protocole d'Athamena et al. (2010). Une solution de DPPH (5mM) a été préparée par la solubilisation de 9.85 mg de DPPH dans 5ml de méthanol. 50 µl de cette solution ont été ajoutés à 2.45ml de solution d'extrait à des concentrations variables (0-100µg/ml) ou standard, acide gallique et quercétine (2, 4, 6,8 ,10 µg/ml). Après incubation pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517nm. L'activité antiradicalaire a été estimée en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition du radical DPPH} = [(A_T - (A_E - A_B)) / A_T] \times 100$$

A_T : absorbance de témoin (méthanol + DPPH).

A_E: absorbance de l'échantillon (extrait + DPPH).

A_B : absorbance du blanc de l'échantillon. (Extrait + méthanol).

III-1-5-2- Détermination de l'activité scavenger du radical ABTS

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS (sel d'ammonium de L'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Au cours de ce test, le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) de couleur sombre (vert bleu) en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

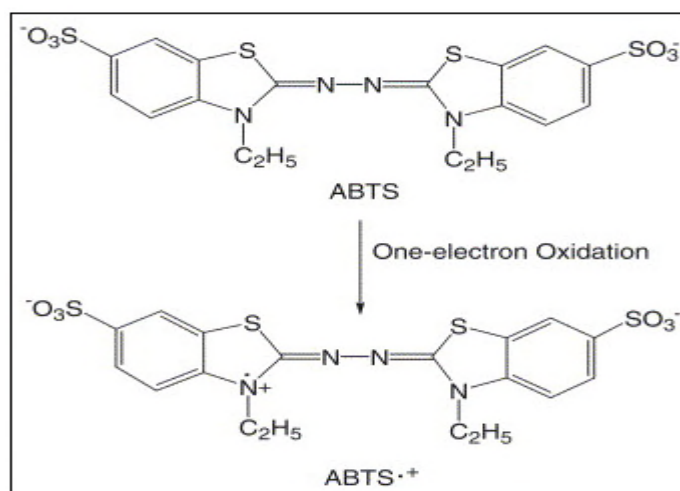


Figure 13: Oxydation de l'ABTS (Owen et Johns, 1999)

La mesure de l'activité scavenging du radical ABTS a été effectuée en suivant le protocole de **Mighri et ses collaborateurs (2010)**, avec de légères modifications.

Le radical ABTS a été préparé par la réaction de la solution d'ABTS (7mM) avec du persulfate de potassium ($K_2O_8S_2$) (2,45mM), cette solution est laissée à l'obscurité pendant 16h, et à température ambiante (formation du radical $ABTS^{\bullet+}$). La solution d' $ABTS^{\bullet+}$ est diluée ensuite avec de l'eau distillée afin d'obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734nm.

1.99ml de cette solution d'ABTS diluée sont ajoutés à un volume de 20 μ l de l'extrait (0-100 μ g/ml), ou du standard, Trolox (concentration), après 07 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 734nm. Le pourcentage de l'activité scavenger du radical $ABTS^{\bullet+}$ est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de radical } ABTS^{\bullet+} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

A_0 : Absorbance du contrôle (contenant seulement l' $ABTS^{\bullet+}$)

A_1 : Absorbance de la solution de l' $ABTS^{\bullet+}$ contenant l'extrait de *Rhamnus alaternus*.

III-2- Etude de la toxicité aiguë

III-2-1- Matériel animal

L'étude a été menée sur des souris Swiss albinos des deux sexes pesant entre 23 et 28g obtenues à partir du CRD (Centre de Recherche et Développement) de SAIDAL à El Harrach (Alger). Les animaux ont été identifiées, et placées dans des cages transparentes en polypropylène, à une température ambiante de 20 à 24°C, et d'humidité relative de 50%, avec un cycle de 10/14 h (lumière/obscurité), et disposés de granules d'aliment standard provenant de L'ONAB (Office National Alimentation Bétail), El-Kseur de Bejaïa, et l'eau de robinet, la litière utilisée est la sciure renouvelée 3 fois par semaine pour garder le bon conditionnement hygiénique des souris (Figure 14).

III-2-2- Protocole expérimentale

Les étapes de cette étude ont été menées conformément à la directive de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), Guideline-407, adopté le 03 octobre 2008. Les essais de la toxicité aiguë permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court (de 01 à 14 jours) après l'administration d'une substance. Afin d'étudier ses effets toxiques possibles ou changement du comportement normal ainsi que la mortalité.

04 groupes de 05 souris répartie d'une manière homogène intra lots (sexe, nombres, poids) ont été employés dans cette expérience ; le groupe témoin a reçu une solution d'eau physiologique (0.9% solution de NaCl), et les groupes d'essai ont reçu des doses uniques de 1, 2 et 5 g/kg d'extrait méthanolique par poids corporel. L'administration de l'eau physiologique et de l'extrait méthanolique a été effectuée par gavage en utilisant une sonde gastrique orale (Figure 14). Les souris n'ont pas eu accès à la nourriture ni à l'eau pendant 04h après le traitement, et elles sont observées individuellement après l'unique dose, puis chaque jours pendant 14 jours. Le comportement et les symptômes cliniques des souris sont notés pendant toute la durée de l'expérience.



Figure 14: Souris Swiss albinos dans une cage et gavage par une sonde gastrique orale
(SAIDAL, 2013)

III-3- Etude de l'effet anti-hyperlipidémique

III-3-1- Matériel animal et induction de l'hyperlipidémie

Cette étude a été réalisée sur 25 rats Wistar femelles pesant entre (201 et 231 g).. Ils ont été traités et hébergés dans les mêmes conditions cité ci-dessus pour les souris. L'hyperlipidémie a été induite par injection intra-péritonéale du Triton WR-1339 (Tyloxapol, Sigma–Aldrich, USA) à une dose de 300 mg/kg du poids corporel dissoute dans une solution saline (0.9% solution NaCl). Après l'injection du Triton WR-1339, les rats développent une hyperlipidémie aiguë.

III-3-2- Protocole expérimentale

Dans ce model expérimental, 25 rats Wistar ont été laissé à jeun pendant une nuit, et ont été répartie en 05 groupe de telle sorte que la différence de poids des rats à l'intérieur et entre les groupes ne dépasse pas $\pm 20\%$ des poids moyens des rats. Le groupe 1 (control normal) reçoit une injection intra-péritonéale d'une solution saline (eau physiologique), suivi d'un gavage avec de l'eau physiologique. Le groupe 2 (control hyperlipidémique) reçoit une injection intra-péritonéale du Triton WR-1339 à une dose de 300mg/kg du poids corporel, suivi d'un gavage avec de l'eau physiologique. Les groupes 3, 4 et 5 reçoivent une injection intra-péritonéale du Triton WR-1339 à une dose de 300mg/kg du poids corporel, suivi d'un

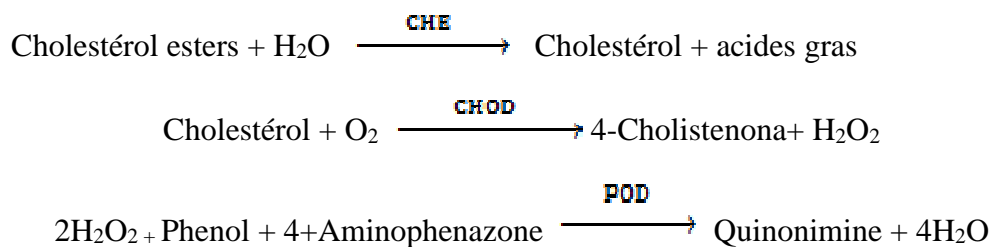
gavage avec l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* à des doses respectives de 100, 200 et 400mg/kg du poids corporel.

Deux prélèvements sanguins ont été effectués sous anesthésie par voie du sinus retro orbitaire, le premier avant traitement, et le second 24h après traitement, sachant que durant ces 24h, les rats n'ont pas eu accès à la nourriture mais seulement à l'eau. Une fois le sang est récupéré, il est centrifugé à 3000tours/minute pour récupérer le sérum qui va servir au dosage des paramètres lipidiques sanguin : Cholestérol total, HDL et triglycérides.

III-3-3- Dosage des paramètres lipidiques sanguin

III-3-3-1- Dosage du cholestérol total

Le cholestérol plasmatique est libéré par le cholestérol estérase à partir des esters de cholestérols puis oxydés par le cholestérol oxydase en cholestenona, parallèlement à la libération des molécules H₂O₂. L'intensité de la couleur formé, est proportionnelle a la concentration de cholestérol dans l'échantillon. L'origine de la coloration donnée est du a la formation d'un complexe selon la réaction suivante (**SPINREACT, 2013**) (Annexe III)



Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré dans le tableau ci-dessus. Après mélange et incubation pendant 05min à 37°C, les absorbances sont lues à 505nm et la couleur est stable pendant au moins 60 minutes

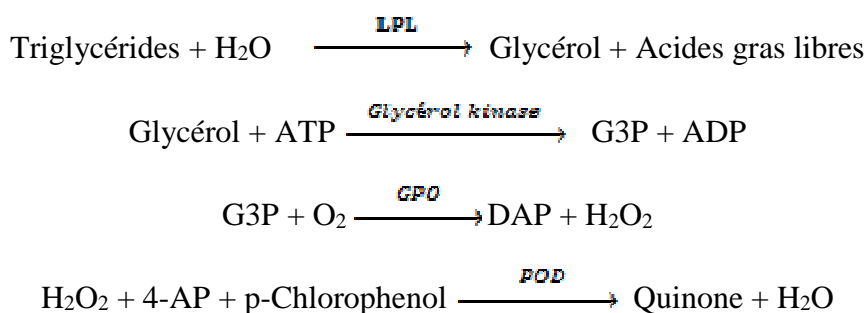
	Blanc	Standard	Echantillon
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard (µL)	---	10	---
Echantillon (µL)	---	---	10

Le taux du cholestérol total est calculé selon la formule suivante

$\frac{(A)Echantillon}{(A)Standard} \times 200$ (la concentration de standard) = mg/dL de cholestérol dans l'échantillon. Le facteur de conversion = mg/dL \times 0.0258 = mmol/L

III-3-3-2- Dosage des triglycérides

Les triglycérides de l'échantillon sont incubés avec les lipoprotéine lipases (LPL), qui libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-phosphate (ADP) par le glycérol kinase en présence d'ATP. Le glycérol-3-phosphate est convertie par la suite par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec le 4-aminophenazone (4-AP) et le p-chlorophenol en présence de peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rougeâtre (SPINREACT, 2013) (Annexe III)



Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré dans le tableau ci-dessous. Après mélange, les tubes sont incubés les tubes à 37°C, pendant 5minutes. Les mesures de la densité optique (DO) sont effectuées au spectrophotomètre à 505 nm (490-550). Le taux des triglycérides est exprimé en mmol/L est donné par la formule suivante.

	Blanc	Standard	Echantillon
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard (μL)	---	10	---
Echantillon (μL)	---	---	10

$$\frac{(A)_{\text{Echantillon}}}{(A)_{\text{Standard}}} \times 200 \text{ (la concentration de standard)} = \text{mg/dL triglycérides dans l'échantillon}$$

Facteur de conversion : $\text{mg/dL} \times 0.0113 = \text{mmol/L}$

III-3-3-3- Dosage de HDL

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) présentes dans l'échantillon, se précipitent par le phosphotungstate en présence d'ions magnésium. Après centrifugation et élimination du culot, le surnageant contenant les lipoprotéines de haute densité (HDL) est utilisé pour doser les HDL-cholestérol

Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré au tableau ci-dessus. Après l'ajout de réactif (annexe), le tout est bien homogénéiser et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite le mélange est centrifugé à 4000 tour/minute pendant 20 minutes ou pendant 2 minutes à 12000 tours/minute. Le surnageant contenant le HDL-c est récupéré est utilisé pour doser le taux du HDL par la même méthode cité précédemment concernant le cholestérol total (**SPINREACT, 2013**) (Annexe III)

R (μL)	100
Echantillon (mL)	1.0

La mesure des densités optiques (DO) est effectuée au spectrophotomètre à 505 nm. La concentration du HDL cholestérol est calculée selon la fonction suivante :

$$A_{505\text{nm}} \text{Echantillon} \times 320 = \text{mg/dl HDL-c dans l'échantillon.}$$

III-4- Etude histopathologique

III-4-1- Prélèvement d'organe

Après la seconde collecte du sang, les cadavres des rats sacrifiés sous anesthésie sont fixés sur une plaque en liège sur sa partie dorsale en fixant ses quatre pattes à l'aide des punaises de fixation (Figure 15). Une petite incision est provoquée au niveau de périnée qui permet d'insérer une sonde d'incision. Suite à ça, on procède à la dissection de la cavité abdominale. Le foie et l'aorte ont été isolés pour observer des changements histopathologique ou des anomalies tissulaires (lésions, couleur, consistance...etc.).

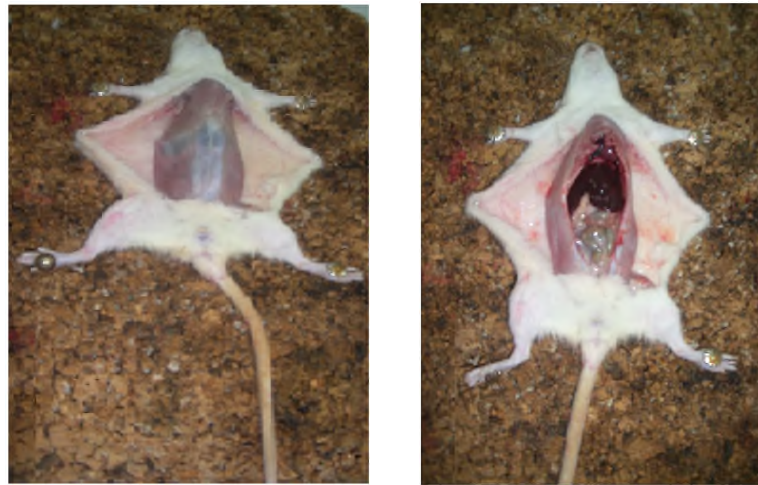


Figure 15: La disséction des rats (SAIDAL, 2013)

III-4-2- Fixation

Il consiste à figer les structures des organites cellulaires tout en conservant les constituants cellulaires et tissulaires dans un état proche du vivant. L'agent fixateur solidifie le gel protéique qui circule entre les mailles du réseau membranaire limitant le cytoplasme et les organites. Les organes récupérés sont lavés avec de l'eau physiologique, et immédiatement immergés dans un liquide fixateur qui est le formol (10%) afin d'éviter leur dégradation et obtenir une rigidité tissulaire suffisante. Les organes sont coupés en petits fragments et déposés dans des cassettes spéciales en plastiques.

III-4-3- Lavage déshydratation et éclaircissement

Avant de procéder à la déshydratation, les pièces fixées sont lavées à l'eau courante pendant 30 minutes ou plus, afin d'éliminer l'excès de fixateur. Les pièces fixées et lavées sont ensuite placées dans l'automate qui constitue de 12 cylindres, réparties en : 6 cylindres d'alcool (éthanol 100°) pour déshydrater les échantillons (étape de déshydratation), 4 cylindres de xylène pour les purifier d'alcool (étape d'éclaircissement) et 2 cylindres de paraffine-xylène pour éliminer le xylène, chaque bain prend 1h30 dans chaque cylindre (Figure 16)



Figure 16: Les étapes d'inclusion par l'automate (STP 120) (Parnet, 2013)

III-4-4- Imprégnation, enrobage à la paraffine et confection des blocs

Après avoir laissé les cassettes dans les deux bains de paraffine-xylène dans l'automate pendant 3 heures, et les émergés dans deux bains à chaud et successifs de paraffine pure pendant 2 heures chacun dans le distributeur de paraffine. L'enrobage et la confection des blocs, consiste à placer le fragment d'organe dans un moule métallique rempli préalablement par la paraffine pure et fondu couvert d'une cassette. Après l'enrobage, les cassettes sont incubées dans le réfrigérateur jusqu'à refroidissement et durcissement de la paraffine, les blocs démoulés et taillés sont prêts à être coupés (Figure 17)



Figure 17: Distributeur de paraffine à gauche et Réfrigérateur à droite (Parnet, 2013)

III-4-5- Coupage et étalement

Les coupes sont réalisées avec un microtome à Naffessa HAMOUD de Hussein dey. L'épaisseur des coupes est de 2 μm , cette épaisseur permet au rayons lumineux de microscope de traverser le prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires. Ces dernières sont recueillies sur des lames de verre propres a partir d'un bain marin et étalée à l'aide d'une solution d'eau gélatinée à 0.4% (Annexe IV) puis laissées séché pendant une heure a 37°C (Figure 18).



Figure 18: Microtome (Leica RM 2125RT) (Parnet, 2013)

III-4-6- Déparaffinage des coupes

Avant la coloration, les coupes doivent êtres débarrassées de la paraffine, les lames sont baignées dans 2 bains successifs de xylène pendant 15 minutes chacun suivi de 3 bains successifs d'éthanol de degrés décroissant (100%, 90%, 70%) pendant 3 minutes chacun, puis rincé à l'eau distillée pendant 1 minute (figure 19)

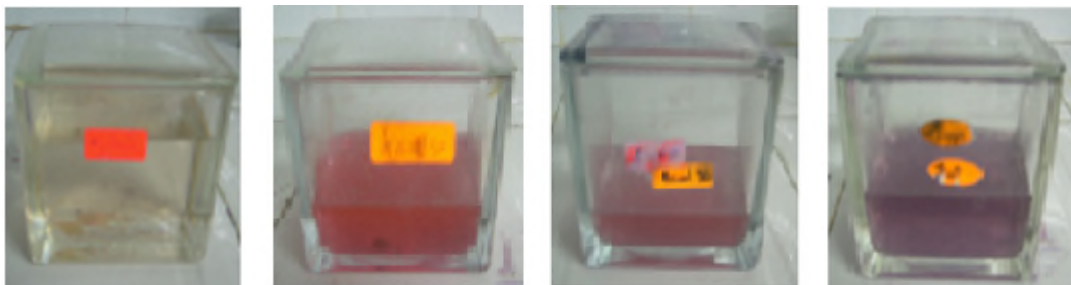


Figure 19: Les étapes de déparaffinage (Parnet, 2013)

III-4-7- Coloration

La méthode de coloration des tissus biologique la plus courante est l'hématoxyline éosine, elle est formée de deux colorants sur la même préparation, un colorant nucléaire, l'hématoxyline (violet/noir) et un colorant cytoplasmique, l'éosine (rouge) (Figure 20).

On commence la coloration en mettant les lames dans un bain d'hématoxyline pendant 3 minutes (Annexe IV) suivi d'un rinçage à l'eau courante pendant 5 minutes. Les Lames sont par la suite mises dans l'éosine pendant 30 secondes puis rincées rapidement avec de l'eau. L'étape qui suis consiste a une déshydratation avec l'éthanol à des concentrations croissantes (70°, 90°, 100°) pendant 2 minute chacune. La coloration est terminée avec un bain de xylène qui prend de 2 à 3 minutes et on les laisse sécher dans une étuve.

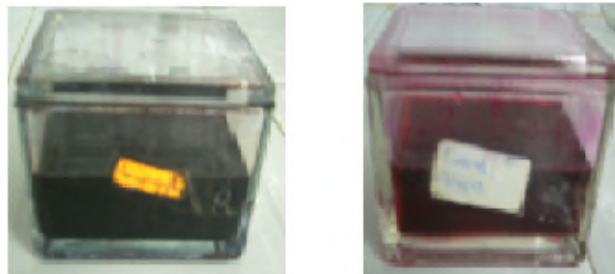


Figure 20: Les étapes de coloration (Parnet, 2013)

III-4-8- L'observation microscopique

Les coupes sont montées entre lames et lamelles, puis observées au microscope optique. L'observation s'est faite a des grossissements $G \times 20$, $G \times 40$ et $G \times 63$ révèle des noyaux violet et des cytoplasmes en rose, et la prise des photos est effectué avec un appareil photos numérique (POLAROID DIGITAL CAMERA).

III-5- Analyse statistique

Dans chaque essai, les données expérimentales représentent la moyenne de cinq essais indépendants \pm écart-type. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test t de Student. Les valeurs sont considérées comme significativement différente si $p < 0,05$, hautement significative si $p < 0,01$ et très hautement significative si $p < 0,001$. Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type

Résultats et discussions

IV-1- Taux d'extraction

Une macération a été réalisée sur la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* avec le méthanol, après extraction de 50g de l'échantillon et évaporation du solvant du filtrat, on a obtenu un extrait qui correspond à un rendement de 13,12%. Ce rendement est beaucoup plus élevé par rapport à celui obtenu par **Ljubuncic et ses collaborateurs (2005)** en utilisant comme solvant l'eau distillé qui est de l'ordre de 8%. Cette différence est due peut être à la nature du solvant car, le taux d'extraction des composés phénoliques à partir d'une matière végétale peut être influencé par leur nature chimique, la nature du solvant, la méthode d'extraction utilisée, le diamètre des particules de l'échantillon et du temps de macération.

IV-2- Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques constituent une classe principale des antioxydants présents dans les plantes et sont généralement quantifiés par une méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (**Kanatt et al., 2007**).

Après l'addition de la solution de monohydrate carbonate de sodium et le réactif de Folin Ciocalteu à l'extrait des feuilles de *Rhamnus alaternus*, une couleur bleue est obtenu, cette coloration varie en fonction de la concentration de l'extrait de la plante. Donc les feuilles de *R. alaternus* sont riches en composés phénoliques. La teneur en composés phénoliques de l'extrait est exprimée mg EAG/g E (Annexe I). La teneur en composés phénoliques totaux montre que l'extrait méthanolique de *R. alaternus* contient environ 40.67 ± 0.81 mg EAG/g d'extrait sec.

IV-3- Dosage des flavonoïdes

Lors du dosage des flavonoïdes, après l'addition d' $AlCl_3$ et après incubation une couleur jaunâtre est obtenue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait de la plante, ce qui confirment la présence des flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de *R alaternus*. La teneur en flavonoïdes de l'extrait est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe I).

La teneur en flavonoïdes montre que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* contient environ $48,38 \pm 0,58$ mg EQ/g (mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec). Donc, les feuilles de *R. alaternus* sont très riches en flavonoïdes polaires, ce taux est même très inférieur à celui rapporté par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** qui ont démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ 283 ± 11 mg EQ /g. Cette différence pourrait s'expliquer par la région dans laquelle la plante est cultivée, ainsi que la période de la récolte.

IV-4- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydante

1V-4-1- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH

L'extrait éthanolique de la plante *R. alaternus* a montré une activité anti radicalaire contre le radical DPPH dépendante de la concentration de l'extrait, par diminution de couleur violette de la solution DPPH. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente en fonction de la concentration de l'extrait (Figure 21).

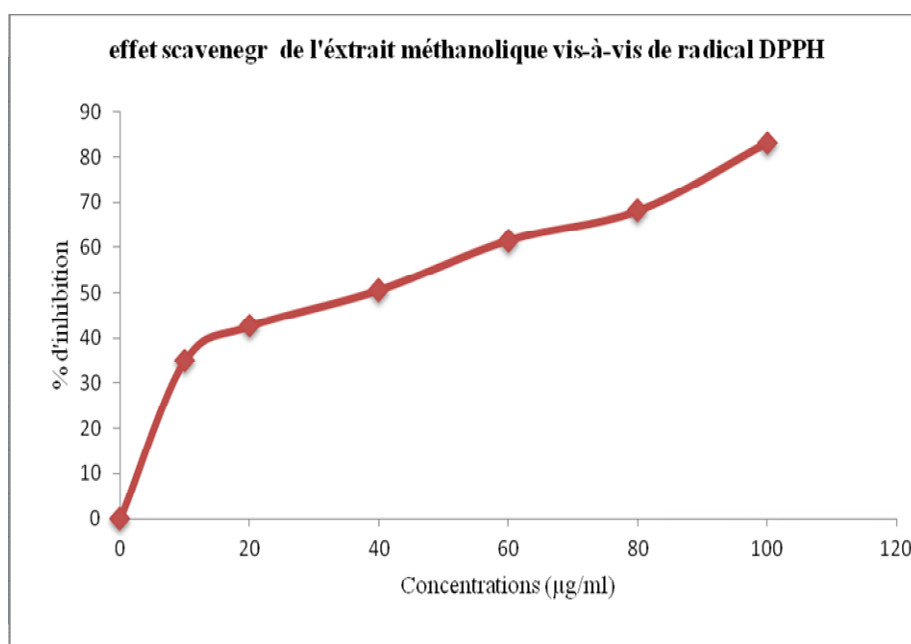


Figure 21: Effet scavenger contre le radical DPPH de l'extrait méthanolique de *R. alaternus* à différentes concentrations

La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH de l'extrait et des standards (acide gallique et quercétine) montre une activité anti-radicalaire dépendante de la concentration. A chaque fois que la concentration augmente, le pourcentage d'inhibition augmente. Par exemple, à la concentration de 40 μ g/ml, on a un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 61.68% et à 100 μ g/ml, le pourcentage atteint 83.09%. On remarque que même à des faibles concentrations, l'extrait montre un pourcentage d'inhibition important, ce qui nous permis de déduire que les composés phénoliques contenu dans l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* sont très efficace comme antioxydants. La valeur de l'IC₅₀ calculé pour l'extrait de *R. alaternus* est de l'ordre de 37,97 μ g/ml. Cette valeur obtenue est élevée par rapport à celles rapportées dans les études réalisées sur l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie qui est de l'ordre de 25,38 μ g/ml (**Ben Ammar et al., 2005**). Cette différence pourrait s'expliquer par la nature des composés phénoliques contenus dans l'extrait qui est influencé par la période de récolte (mai - juin), sachant que notre échantillon a été récolté au mois de mars. Comme elle pourrait s'expliquer aussi par la différence des conditions climatique et celles du sol ou la plante est cultivée.

Les IC₅₀ de l'acide gallique et de la quercétine (Annexe II) sont respectivement de l'ordre 1,79 μ g/ml et 2,04 μ g/ml. Ils sont largement inférieurs à celui de l'extrait méthanolique (37,97 μ g/ml), donc l'acide gallique et la quercétine présentent une grande activité antiradicalaire. De même, l'extrait présente une bonne activité anti-radicalaire contre le DPPH mais à des concentrations beaucoup plus élevés.

IV-4-2- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical ABTS

L'activité antioxydant de l'extrait de *R. alaternus* a été déterminée aussi par la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant capacity), cette activité est déduite par la capacité des molécules à inhiber le radical ABTS⁺. Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ par l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est représenté dans la (figure 22).

D'après cette figure, on remarque que le taux d'inhibition augmente en fonction de l'augmentation de la concentration. A 25mg/ml, il est de l'ordre de 54.02% et augmente jusqu'à atteindre 98.38% à 75mg/ml. Cette augmentation devient presque stable à des concentrations supérieures à 75 mg/ml, ce qui signifie que toutes les molécules ABTS⁺ sont réduites en ABTS. La valeur de l'IC₅₀ calculé pour l'extrait de *R. alaternus* est de l'ordre de 23.21 μ g/ml.

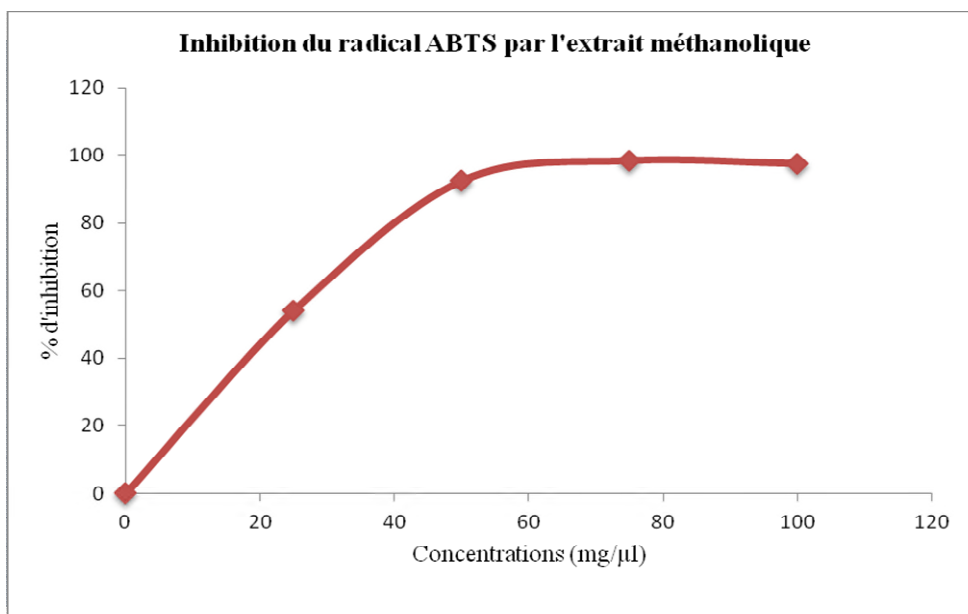


Figure 22: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ par l'extrait méthanolique de *R. alaternus* à différentes concentrations

On constate aussi que même à des concentrations faibles, l'extrait exhibe un bon pourcentage d'inhibition, ce qui nous permis de déduire que les composés phénoliques contenu dans l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* sont très efficace comme antioxydants, surtout riches en flavonoïdes tels que Rhamnocitrin-3-O-B-isorhamnoside et le kaempferol-3-O-B-isorhamnoside qui sont étudiées par **Bhourri et ses collaborateurs (2012)** pour leurs effets anti-radicalaires contre le radical ABTS pour lesquels ils ont rapporté des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 72% et 97% respectivement à une concentration de 0.2mg/ml.

IV-5- Evaluation de la toxicité aigüe

Cette étape a pour but d'évaluer les effets toxiques de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* sur des souris adultes Swiss Albinos. Cette étude a été menée conformément à la directive de l'OCDE, Guideline-407 adopté le 03 octobre 2008, avec de légères modifications ou la dose limite de 2000mg/kg a été augmentée à 5000mg/kg.

Tableau IV: Taux et latence de mortalité après une dose unique de l'extrait de RA.

Dose (mg/kg)	Nombre d'animaux par lot	Mortalité	Latence de mortalité
0	5	0	0
1000	5	0	0
2000	5	0	0
5000	5	0	0

D'après ce tableau, on constate que la dose de 5000mg/kg est une dose bien tolérée par les souris, d'ailleurs aucun cas de mortalité lié à l'administration de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* n'a été enregistré. Donc, d'après la classification de toxicité selon l'échelle de Hodge et Sterner, on peut conclure que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est considéré comme une substance presque non toxique ($5000\text{mg/kg} < \text{DL}_{50} \text{ orale} < 15000\text{mg/kg}$).

Durant les 14 jours de cette expérience, aucun signe de toxicité, changement comportementale ou symptôme clinique n'a été observé (tableau V). Dans la littérature, aucune étude n'a été faite pour évaluer la toxicité de la plante ou l'un de ses composés.

Tableau V: Evolution des symptômes cliniques lors de l'étude de la toxicité aigüe de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*

Signes cliniques observés sur les souris	Lot témoin		Lot traité (1000mg/kg)		Lot traité (2000mg/kg)		Lot traité (5000mg/kg)	
	4h	Chaque jour	4h	Chaque jour	4h	Chaque jour	4h	Chaque jour
Peau et fourrure	-	-	-	-	-	-	-	-
Yeux	-	-	-	-	-	-	-	-
Oreilles	-	-	-	-	-	-	-	-
Muqueuse	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportement anormaux	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-
Léthargie	-	-	-	-	-	-	-	-
Somnolence	-	-	-	-	-	-	-	-
Diarrhée	-	-	-	-	-	-	-	-
Coma	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremblements	-	-	-	-	-	-	-	-

Après 14 jour d'observation, aucun changement symptomatique n'a été marqué après le gavage des souris avec des doses croissantes de l'extrait de *R.alaternus* (Tableau V)

IV-6- Etude de l'effet anti hyperlipidémie induite par le triton WR-1339

Les paramètres lipidiques sanguins ont été déterminés avant et après 24h de l'injection du triton WR-1339 aux rats, les résultats sont exprimés en moyenne de cinq dosages \pm l'écart-type. Les résultats sont montrés dans les tableaux (VI et VII).

Tableau VI: Dosage des paramètres lipidiques sanguins avant traitement

Lot	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c(mg/dl)	VLDL-c (mg/dl)
I	156.04 ± 11.69	156.27 ± 25.51	55.95 ± 8.93	61.67 ± 4.96	31.25 ± 5.09
II	119.61 ± 8.38	148.55± 17.96	50.35 ± 7.53	30.77 ± 5.03	30.48 ± 2.73
III	90.74 ± 10.56	86.08 ±8.19	26.58 ± 2.39	49.32 ± 6.23	17.64 ± 1.71
IV	101.01 ± 7.73	108.17± 12.52	23.02 ± 2.64	56.35 ± 6.07	36.63±4.62
V	103.41± 13.5	56.53± 12.26	17.04 ± 2.64	79.65 ± 6.41	11.30 ± 2.45

Tableau VII: Dosage des paramètres lipidiques sanguins après traitement

Lot	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c(mg/dl)	VLDL-c (mg/dl)
I	133.33±29.03	97.46±5.91	30.30±12.05	73.32±14.8	19.48±1.18
II	357.21±33.62 ^a	897.98±64.83 ^a	115.76±20.33 ^a	63.84±8.01	179.59±12.96 ^a
III	159.46±13.07 ^b	183.32±15.58 ^b	24.704±2.72 ^b	98.08±12.71 ^b	36.662±3.11 ^b
IV	106.25±16.92 ^b	183.19±23.11 ^b	19.00±4,71 ^b	56.6±7.25	36.63±4.62 ^b
V	190.10±15.83 ^b	335.44±48.14 ^b	41.18±7.27 ^b	80.02±9.64 ^c	70.08±7.03 ^b

I : control normal traité par l'eau physiologique par gavage et ip ; *II* control hyperlipidémique traité par l'eau physiologique par gavage et 300mg/kg du triton WR-1339 par ip ; *III*, *IV* et *V* traité par 300mg/kg du triton WR-1339 par ip et 100, 200 et 400mg/kg de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* respectivement

^a : augmentation significative à p <0,001, comparativement aux valeurs du groupe I.

^b : diminution significative à p <0,001, comparativement aux valeurs du groupe II.

^c : diminution significative à p <0,05, comparativement aux valeurs du groupe II.

Après injection du triton WR-1339 à une dose de 300mg/kg, les résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) des paramètres lipidiques sanguins (cholestérol total, triglycérides, HDL-c et VLDL-c) à l'exception du LDL-c du lot II (contrôle hyperlipidémique) en comparaison avec le lot I (contrôle normal). Après traitement avec différentes doses de l'extrait méthanolique (100, 200 et 400mg/kg), le phénomène inverse se produit, c'est-à-dire une diminution des paramètres lipidiques des lots III, IV et V (traité par l'extrait) en comparaison avec le lot II (contrôle hyperlipidémique). Cette diminution est soit très hautement significative ($p < 0.001$), soit significative ($p < 0.05$).

Ces résultats montrent une diminution significative des paramètres lipidiques sanguins chez les rats des lots III, IV et V (traité par l'extrait) par rapport à ceux des rats du lot II (hyperlipidémique). Le taux du cholestérol total a diminué d'un taux de 55% avec la première dose (100mg/kg), de 70% avec la deuxième dose (200mg/kg) et de seulement 47% avec la plus forte dose (400mg/kg) par rapport au lot hyperlipidémique. Celui des triglycérides a aussi diminué d'une façon très significative, atteignant presque 80% de diminution avec les doses de 100 et 200mg/kg, mais seulement 63% à la dose de 400mg/kg du poids corporel. A 100 et 200mg/kg, le taux des VLDL a chuté d'environ 80%, et à 400mg/kg, ce taux diminue de 179.59mg/dl à 70.08mg/dl, ce qui correspond à 60% de diminution.

Le taux du HDL-c a baissé de 115.76 mg/dl chez le lot II à environ 20mg/dl chez les lots III et IV (100 et 200mg/kg d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* respectivement), ce qui correspond à une diminution d'environ 80%. Cette diminution est seulement de 65% à 400mg/kg. Par contre, le taux du LDL-c a augmenté de 53% et 25% avec les doses de 100 et 400mg/kg et a baissé d'environ 10% avec la dose de 200mg/kg.

L'hyperlipidémie est connue comme étant un facteur de risque majeur intervenant dans le développement des maladies cardiovasculaires et les maladies coronariennes, qui sont fortement associées avec des déséquilibres métaboliques des lipides et des lipoprotéines plasmatiques (**Oulmouden et al., 2011**).

Le triton WR-1339 également connu sous le nom de Tyloxapol était utilisé pour la première fois pour exploiter sa capacité à bloquer la clairance lipidique en mesurant les taux de synthèse des triglycérides et du cholestérol. C'est un détergent non-anionique de structure polymérique qui a une utilisation très répandue comme un outil pour l'étude du métabolisme des lipides et qui a été utilisé avec succès dans plusieurs études pour induire

l'hypercholestérolémie. Cette dernière dure pendant les 72 heures qui suivent l'induction. Après cette période, les valeurs diminuent spontanément pour atteindre les niveaux similaires aux valeurs de base (**Bertges et al., 2011 ; Oulmouden et al., 2011**).

La forte augmentation des taux de cholestérol et de triglycérides du plasma en raison de l'injection de Triton WR-1339 résulte principalement d'une augmentation de la sécrétion de VLDL-c par le foie accompagnée d'une forte réduction du catabolisme des VLDL-c et LDL-c (**Otway et Robinsons, 1967 ; Mohammadi et al., 2009**).

Oulmouden et ses collaborateurs (2011) ont constaté que le Triton WR-1339 peut également s'avérer utile pour étudier l'implication des lipoprotéines dans le catabolisme des triglycérides du moment que des changements dans la composition ou la concentration de ces protéines peut être lié au retard dans le catabolisme des triglycérides qui suit l'administration du détergent.

Le Triton WR-1339 est connue pour entraîner une hyperlipidémie en deux phases. La phase I est supposée être due à une augmentation de la biosynthèse du cholestérol hépatique grâce à l'interférence du triton avec l'absorption tissulaire des lipides plasmatiques. Tandis que la phase II implique l'interférence du triton avec l'excrétion et le métabolisme du cholestérol (**Adeneye et al., 2010**).

L'étude montre qu'il y a une diminution remarquable dans les concentrations plasmatiques du cholestérol total, des triglycérides, du HDL et des VLDL des rats hyperlipidémiques 24 heures après l'administration de doses croissantes de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (100, 200 et 400 mg/kg) (tableau), ce qui va conduire à la modification des risques cardiovasculaire. Le taux des LDL augmente à 100 et 400mg/kg mais diminue aussi à la dose de 200mg/kg. D'ailleurs la réduction du taux des LDL est la cible de plusieurs médicaments hypolipémiants. Ce résultat à la dose de 200mg/kg suggère que l'activité anti-cholestérol de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* peut résulter d'un catabolisme rapide du cholestérol LDL par ces récepteurs hépatiques pour l'élimination finale sous la forme d'acide biliaires, comme en témoigne l'étude de **Khanna et ses collaborateurs (2002)**, lorsqu'ils ont étudié l'activité hypolipémiante de *Phyllanthus niruri* chez les rats hyperlipémiés. Cependant, cette hypothèse doit être validée par une étude expérimentale.

Malheureusement, notre extrait n'a pas engendré une augmentation du taux du HDL cholestérol qui est souvent souhaité. Des études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre le taux de cholestérol HDL et le risque de maladie cardiovasculaire. L'augmentation du taux de cholestérol HDL de 1 mg peut réduire le risque de maladie cardiovasculaire de 2 à 3% (**Oulmouden et al., 2011**)

Plusieurs études ont utilisé ce modèle d'expérience pour montrer l'efficacité de quelques produits naturels ou chimiques sur le métabolismes lipidique, afin de maitre au point certaines extrait ou substances à pouvoir hypolipidémiant (**Bertges et al., 2011**). Ainsi, **Adeneye et ses collaborateurs (2010)** ont utilisé ce model pour tester l'effet de l'extrait aqueux de *Hunteria umbellata* sur des rats rendu hyperlipidémique par le triton WR-1339, leur étude a démontré que l'extrait de cette plante, diminue d'une façon significative les taux de cholestérol, triglycéride, HDL-c et LDL-c plasmique à des dose de 50, 100 et 200mg/kg. **Oulmouden et ces collaborateurs (2011)** ont testé le même effet de l'extrait aqueux de *Foeniculum Vulgare* à une dose de 250mg/kg, ils ont constaté que cette dose fait baisser significativement le taux plasmatique du cholestérol, des triglycérides et des LDL-c, en plus, elle fait augmenter le taux du HDL-c. **Pandit et ses collaborateurs (2011)** ont étudié l'effet de l'extrait méthanolique de *Ficus hispida*, ils ont constaté que cet extrait fait diminuer significativement les taux de cholestérol, triglycéride, HDL-c et LDL-c plasmique.

IV-7- Etude histopathologique

IV-7-1- Histologie du foie

Les figures (23, 24, 25, 26 et 27) représentent respectivement des coupes histologiques du foie colorées avec l'hématoxyline/éosine réalisées après 24 heures qui suit le traitement ; lot I (control normal), lot II (control hyperlipidémique) et lot III, IV et V (traité avec des doses respectives de 100, 200 et 400mg/kg de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*).

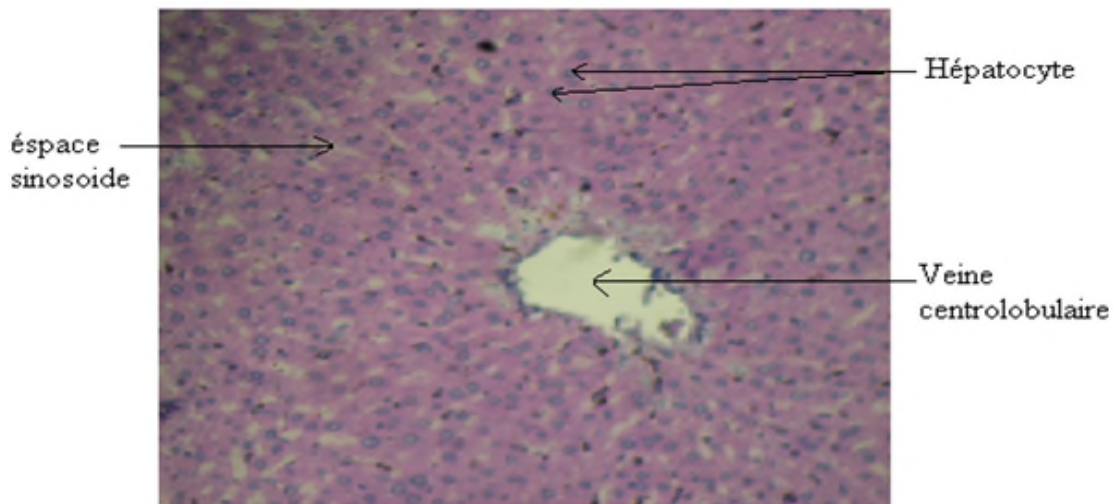


Figure 23: Coupe histologique du foie d'un rat du lot I (control normal) (Gx200)

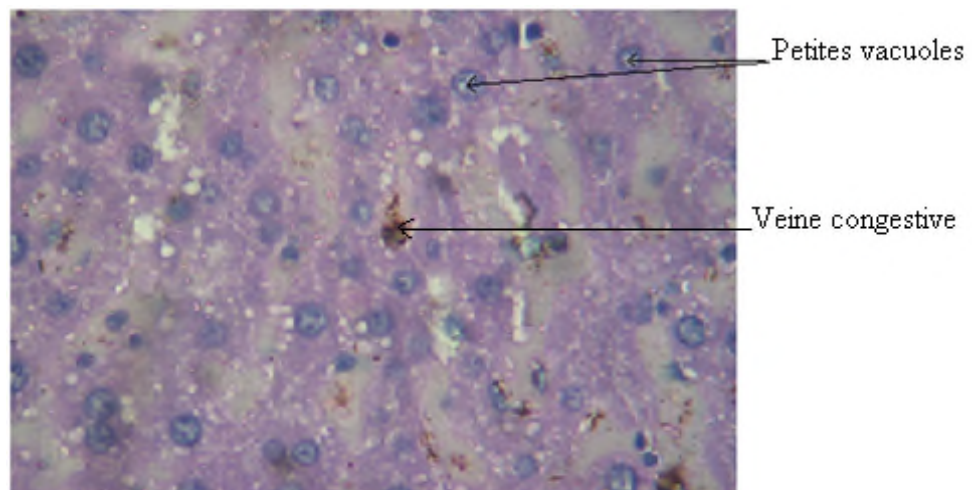


Figure 24: Coupe histologique du foie d'un rat du lot II (control hyperlipidémique) (Gx630)

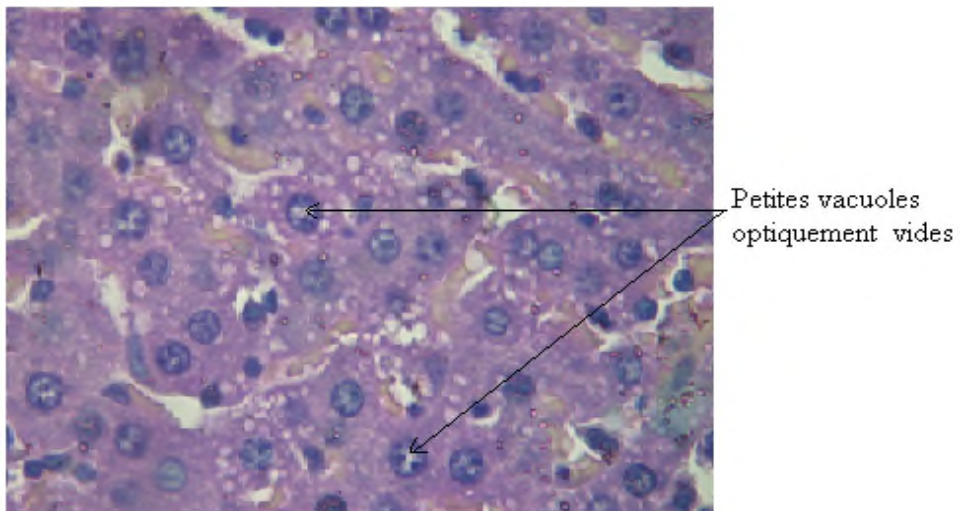


Figure 25: Coupe histologique du foie d'un rat du lot III (traité à 100mg/kg) (Gx630)

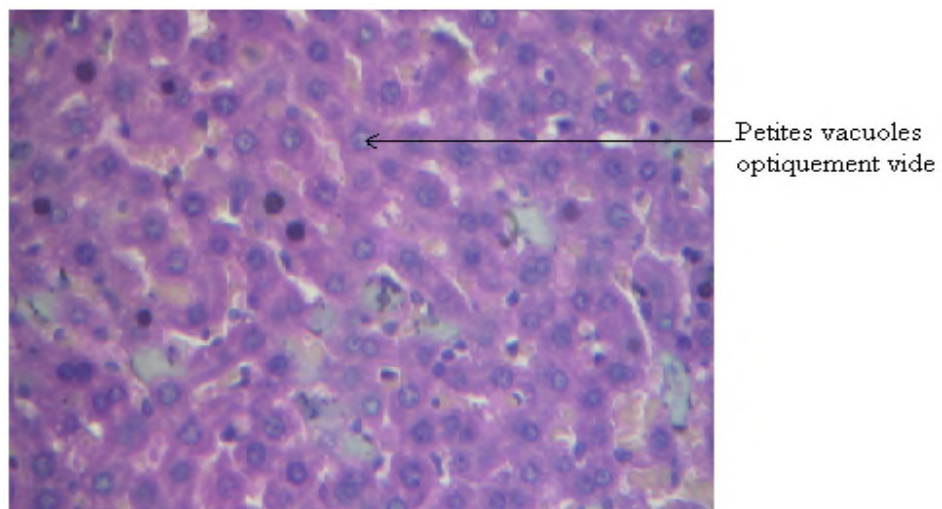


Figure 26: Coupe histologique du foie d'un rat du lot IV (traité à 200mg/kg) (Gx200)

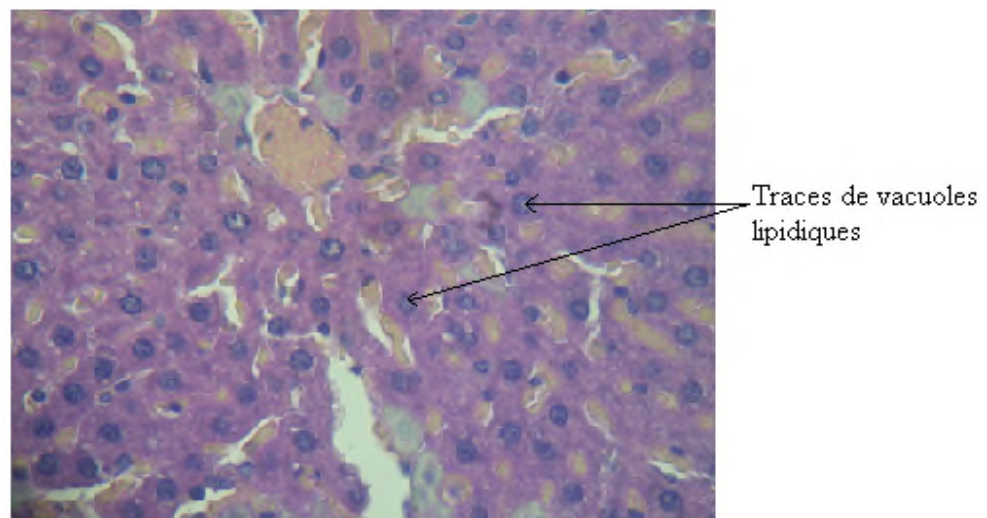


Figure 27: Coupe histologique du foie d'un rat du lot V (traité à 400mg/kg) (Gx400)

La (figure 23) représente une coupe histologique du foie d'un rat témoin non traité (lot I), qui révèle un aspect normal sans modification hépatiques, les hépatocytes s'organisent de façon radiale autours des veines centro-lobulaires qui reçoit le sang à partir du parenchyme hépatique au contacte des sinusoides.

Le foie d'un rat du lot II (lot hyperlipidémique) (Figure 24) montre que le Triton WR-1339 induit une diffusion massive des lipides à l'intérieur des hépatocytes, ce qui provoque une disposition intra hépatique de ces lipides sous forme de petites vacuoles optiquement visibles et vides. En outre, on remarque des veines congestives par rapport à celles observées dans l'architecture du foie normale dans le lot I témoin.

La (figure 25) qui représente une coupe du foie d'un rat du lot III (300mg/kg de Triton WR-1339 par ip et 100mg/kg de l'extrait par voie orale), montre l'apparition des petites vacuoles lipidique qui se diffusent dans les hépatocytes. Ce qui signifie qu'à cette dose de l'extrait, les vacuoles persistent toujours. Par contre, la coupe histologique d'un rat du lot IV (300mg/kg de Triton WR-1339 par ip et 200mg/kg de l'extrait par voie orale) (Figure 26) montre des petites vacuoles lipidiques qui sont présentes dans les hépatocyte par rapport au lot témoin non traité (lot I), mais elles sont moins importantes en comparaison avec les vacuoles marquées dans le lot II (hyperlipidémique) et le lot III (300mg/kg de Triton WR-1339 par ip et 100mg/kg de l'extrait par voie orale) .

La (figure 27) qui représente la coupe histologique du foie d'un rat du lot V (300mg/kg de Triton WR-1339 par ip et 400mg/kg de l'extrait par voie orale) montre que quelques hépatocytes contiennent des vacuoles lipidiques et qui sont absentes chez le foie des rats du lot I (control normal). Ces vacuoles sont présentes avec un taux très inférieur et négligeable en comparaison avec le lot II, le lot III et le lot IV.

IV-7-2- Histologie de l'aorte

Les figures (28, 29, 30 et 31) représentent respectivement des coupes histologiques de l'aorte colorées avec l'hématoxyline/éosine réalisées après 24 heures qui suit le traitement ; lot I (control normal), lot II (control hyperlipidémique) et lot III, IV et V (traité avec des doses respectives de 100, 200 et 400mg/kg de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*).

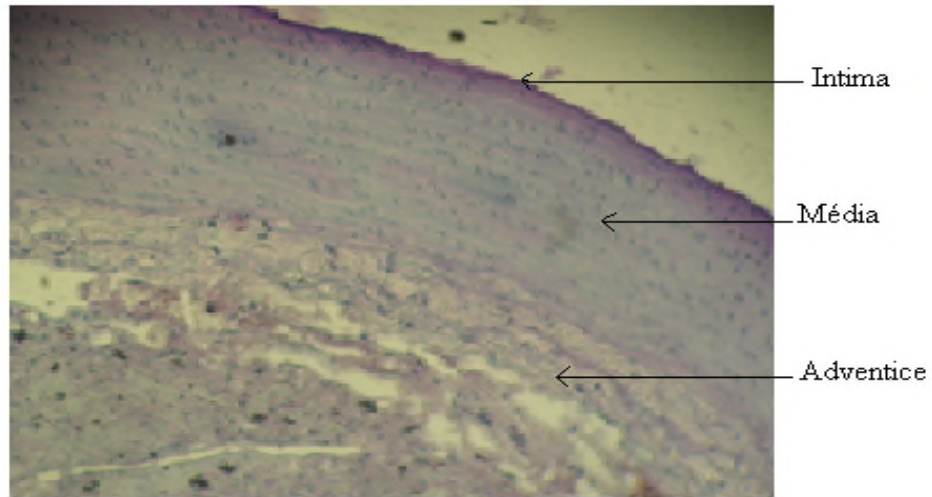


Figure 28 : Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot I (control normal) (Gx200)

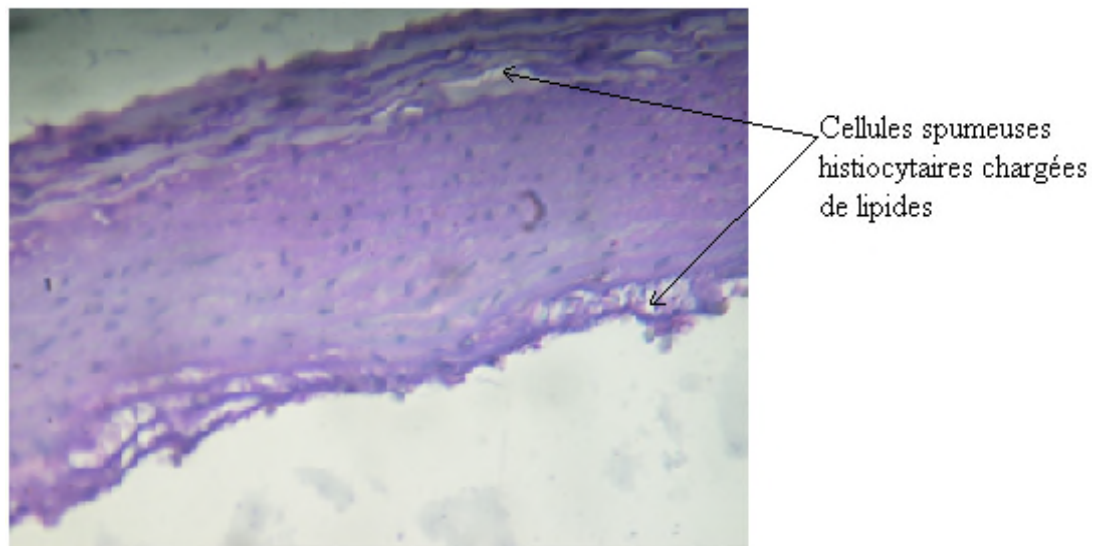


Figure 29: Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot II (control hyperlipidémique) (Gx400)

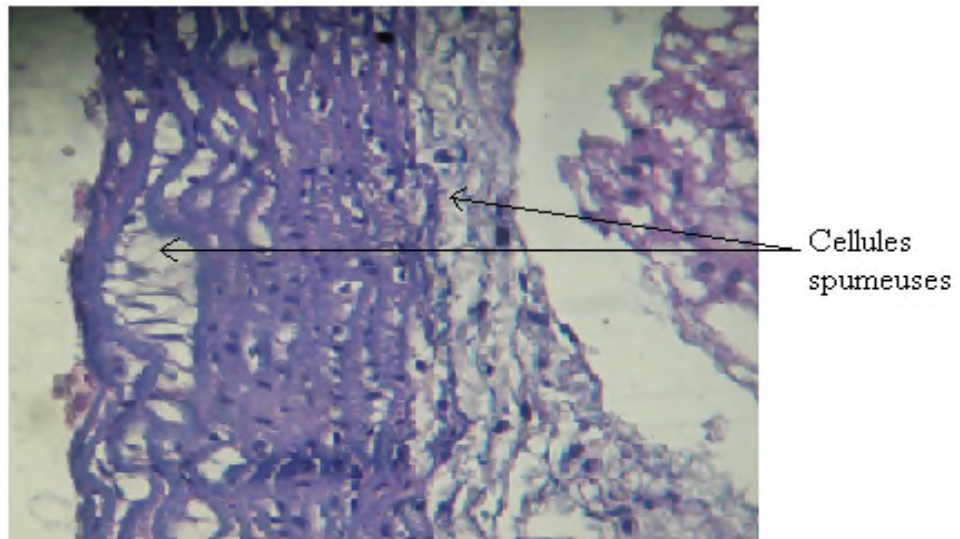


Figure 30: Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot III (traité à 100mg/kg) (Gx400)

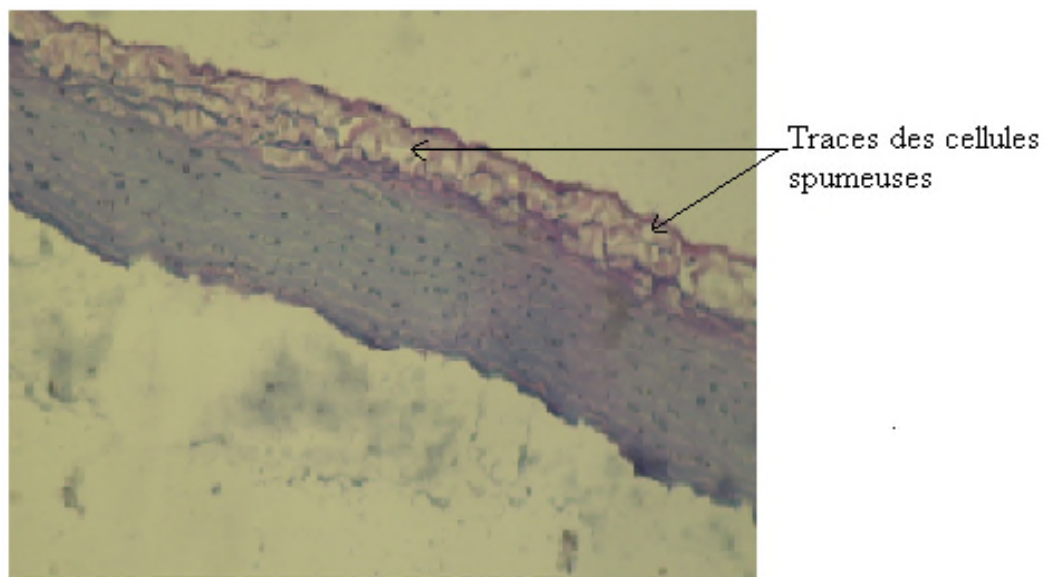


Figure 31: Coupe histologique longitudinale de l'aorte d'un rat du lot V (traité à 400mg/kg) (Gx200)

Remarque : L'observation microscopique pour les coupes de l'aorte des rats du lot IV, n'a pas été faite, car l'aorte a été ratée lors de la réalisation des coupes

La (figure 28) représente une coupe histologique de l'aorte d'un rat du lot témoin (lot I) colorées par l'hématoxyline/éosine, on peut constater une paroi qui est composée de trois tuniques parallèles qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice. L'intima apparaît sous forme d'une seule couche continue des cellules endothéliales, directement en contact avec le sang circulant. La média est révélée sous forme d'une couche moyenne de la paroi aortique et elle est la plus épaisse. Elle est constituée des lames élastiques qui sont très ondulées et qui délimitent les espaces inter laminaires. L'adventice est présentée comme la couche la plus externe de la paroi de l'aorte, elle est formée essentiellement de faisceau de fibre de collagène.

Au niveau de l'aorte des rats du lot II (lot hyperlipidémique) (Figure 29), on remarque l'apparition des cellules spumeuses histiocytaires chargées de lipides au niveau des espaces inter-laminaires de la média et au niveau de l'adventice, induite par une agrégation des lipides après injection de 300mg/kg de triton WR-1339.

La coupe longitudinale de l'aorte des rats du lot III (100mg/kg de Triton WR-1339 par ip et 100mg/kg de l'extrait par voie orale) (Figure 30) montre une accumulation considérable des cellules spumeuses au niveau de l'intima ainsi qu'au niveau de l'adventice en comparaison avec le lot témoin non traité (lot I), cette agrégation lipidique est causée après l'injection de triton malgré sa succession directe par un gavage de l'extrait méthanolique à une dose de 100mg/kg.

La (figure 31) qui représente la coupe histologique de l'aorte d'un rat du lot V (300mg/kg de Triton WR-1339 par ip et 400mg/kg de l'extrait par voie orale) montre une sédimentation importante des cellules spumeuses au niveau de l'adventice en comparaison avec le lot témoin (lot I), et modérée si on la compare avec le lot III traité avec la plus faible dose de l'extrait de RA qui est de 100mg/kg.

IV-8-Discussion

La découverte de la capacité du triton WR-1339 à provoquer une hyperlipidémie dans des modèles expérimentaux, lui a donnée une large gamme d'utilisation pour étudier le métabolisme lipidique. La maladie coronarienne est la principale cause de l'athérosclérose. Cependant, il n'existe pas de modèles animaux appropriés pour l'infarctus du myocarde humain. Il est essentiel de développer des modèles animaux pour l'infarctus du myocarde pour révéler ses mécanismes et de développer de nouvelles interventions thérapeutiques. Bien que plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées présentant une hypercholestérolémie et athérosclérose ont été signalés, par contre, l'athérosclérose coronarienne et les lésions myocardiques ultérieures ressemblant à ceux des humains n'ont pas été reporté (**Oulmouden et al., 2011**).

Cette partie de notre travail a pour but de révéler l'effet bénéfique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, sur les dépôts lipidiques aux niveaux des artères coronariennes et du parenchyme hépatique, en effectuant une comparaison inter lots en fonction des doses de l'extrait administré, et par rapport aux lots témoin (control normal) et hyperlipidémique (control hyperlipidémique).

Nos résultats montrent que le triton WR-1339 provoque une hyperlipidémie aigüe très importante aux niveaux des rats du lot II, ce qui explique d'ailleurs la présence des cellules spumeuses et des vacuoles lipidiques respectivement aux niveaux de l'aorte et du foie des rats de même lot. Donc, le triton WR-1339 a pu déclencher un début d'athérosclérose et une microstéatose au niveau du foie. Une diminution significative de l'agrégation des cellules spumeuses au niveau de l'aorte et des vacuoles lipidiques au niveau du foie a été observée chez les rats des lots III, IV et V. Cette diminution est en fonction de la concentration de la dose de l'extrait administré, plus la concentration est élevée plus la diminution est importante. Ces résultats indiquent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est efficace pour diminuer le risque de déclenchement d'athérosclérose et de stéatose hépatique.

Conclusion et perspectives

0Conclusion

Rhamnus alaternus est une plante très répandue dans le nord de l'Algérie et vu son utilisation locale comme plante médicinale, elle présente un grand intérêt pharmacologique. Elle est caractérisée par l'abondance de nombreuses substances, douées d'activités biologiques et joue un rôle clé dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies.

Le présent travail est consacré à l'étude de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus*, d'une part, caractérisation physico-chimique et étude de la capacité antioxydante et anti-radicalaire. D'autre part, l'étude de la toxicité aiguë et l'effet sur l'hyperlipidémie induite par le triton WR-1339. Ainsi, notre étude nous a permis d'émettre les résultats suivants :

Le protocole d'extraction appliqué est de type liquide-solide, par le méthanol. Le taux d'extraction est de 13,12%. Ce résultat montre que *Rhamnus alaternus* serait très riche en composés phénoliques polaires. L'évaluation du contenu en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a montré que l'extrait contient environ 40.67 ± 0.81 mg EAG/g d'extrait sec. Le dosage des flavonoïdes par la méthode de réduction de chlorure d'aluminium a donné un taux $48,38 \pm 0.58$ mg EQ/g d'extrait.

L'extrait présente une activité anti-radicalaire très importante contre le radical DPPH, le pourcentage d'inhibition à $100 \mu\text{g/ml}$, est de 83.09% avec un IC_{50} de $37,97 \mu\text{g/ml}$. Pour l'ABTS, le pourcentage d'inhibition à une dose de $100 \mu\text{g/ml}$ est estimé à 98.38% et l' IC_{50} est de $23.21 \mu\text{g/ml}$. Ce qui montre que cet extrait est très efficace comme antioxydant et anti-radicalaire.

L'étude de la toxicité aiguë sur des souris Swiss Albinos a montré que l'administration de dose croissante de 1000, 2000 et 5000mg/kg du poids corporel n'a pas entraîné aucune mortalité ni aucun changement comportemental grave. Donc, d'après la classification de toxicité selon l'échelle de Hodge et Sterner, on peut conclure que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est considéré comme une substance presque non toxique ($5000 \text{mg/kg} < \text{DL}_{50} \text{ orale} < 15000 \text{mg/kg}$).

L'étude de l'effet de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* sur l'hyperlipidémie induite par le triton WR-1339 chez les rats Wistar à des doses de 100, 200 et 400mg/kg, a montré que cet extrait diminue de façon significative le taux du cholestérol total,

des triglycérides, des VLDL-c et du HDL-c à toute les doses. Par contre, le taux du LDL-c a augmenté de 53% et 25% avec les doses de 100 et 400mg/kg et a baissé d'environ 10% avec la dose de 200mg/kg. Ces résultats indiquent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* provoque un bon effet hypolipidémiant et que la dose la plus efficace est de 200mg/kg, puisque c'est la seule dose qui a engendré une diminution de tous les paramètres y compris le LDL-c

L'analyse des coupes histologiques du foie et de l'aorte des rats traités, a révélé une diminution remarquable des vacuoles lipidiques aux niveaux des hépatocytes et une disparition progressive des cellules spumeuses au niveau de l'intima et de l'adventice de l'aorte. Cette diminution est en fonction de la dose de l'extrait administré. Ces résultats indiquent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est efficace pour diminuer le risque de déclenchement d'athérosclérose et de stéatose hépatique.

Au terme de ce travail, il serait intéressant de compléter cette recherche par l'étude de la toxicité sub-chronique et chronique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, afin de voir s'il y'aura des effets toxiques à long terme. Comme il serait intéressant de fractionner cet extrait brut pour pouvoir isoler une fraction et pourquoi pas une molécule qui est responsable de cet effet hypolipidémiant et de tester son efficacité contre les hyperlipidémies sub-chronique et chronique.

*Références
bibliographiques*

Référence Bibliographiques

***A.N.A.E.S. (Agence Nationale d'accréditation et d'évaluation en Santé) (2000).** Modalités de dépistage et diagnostique biologique des dyslipidémies en prévention primaire : Service recommandations et références professionnelles, octobre 2000, Paris.

***Annis K. (1986).** Measured energy expenditure in bone marrow transplant patients. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 15 (Suppl) (1986), p. 34S

***Arbouche Lezoul Z. (2007).** Les effets du traitement substitutif post ménopausique chez la diabétique de type 2, sur le métabolisme des lipoprotéines et le métabolisme glucidique. Thèse doctorat, Université d'Alger, 241p.

***Aronne G et Wilcock C-C. (1995) :** Reproductive lability in pre-dispersal biology of *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae) *Protoplasma*, 187:49-59

***Athamena S., Chalghem I., Laouar A.K., Laroui S et Khebri S. (2010).** Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*, **11** (1) : 69-81

***Austin M.A., King M. C., Vranizan K. M., and Krauss, R.M. (1990).** Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*, **82**: 495-506.

***Austin M.A., Edwards K.L. (1996).** Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and noninsulin dependent diabetes. *Curr Opin Lipidol*, **7**: 167-171.

***Bauer J.E. (2003).** Comparative lipoprotein metabolism and lipid abnormalities in dogs and cat - Part II. Diagnostic approach to hyperlipemia and hyperlipoproteinemia. *American College of Veterinary Internal Medicine*. **148 (79)**: 89.

***Ben Ammar R., Kilani S., Abdelwahed A., Hayder N., Mahmoud A., Chibani J., Chekir- Ghedira L. et Ghedira k. (2005).** In vitro mutagenicity, antimutagenicity and free

radical scavenging activities of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **8 (3)**: 439-445.

***Ben Ammar R., Bouhlel I., Valenti K., Ben Sghaier M., Kilani S., Mariotte A-M, Dijoux- Franca M-G., Laporte F., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2007).** Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pre- treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays .*Chemico-Biological Interactio*, **168**: 171-183.

***Ben Ammar R., Bhourri W., Ben Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., kilani S., Mariotte A.M., Chekir-Ghedira L., Dijoux- Franca M.G.et Ghedira K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, **116 (1)**: 258–264

***Benlian P., De Gennes J.L., Dairou F., Hermelin B., Ginon I., Villain E., Lagarde J.P. Federspiel M. C., Bertrand V. Bernard C. et Bereziat G. (1996).** Phenotypic expression in double heterozygotes for familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100. *Hum Mutat.* **7**: 340-345.

***Berger M.M. (2006) :** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances, nutritional manipulation of oxidative stress : review of the evidence. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20** : 48-53.

***Bertges L. C., Mourão J. C. A., Souza J. B., Coelho Cardoso V.A. (2011).** Hyperlipidemia induced by Triton WR1339 (Tyloxapol) in Wistar rats. *Rev Bras Cien Med Saúde*, **1(1)**: 32-4.

***Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., and Lusis, A. J. (1995).** Atherosclerosis: basic mechanisms. oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91**: 2488-2496.

***Boullier, A., Bird, D. A., Chang, M. K., Dennis, E. A., Friedman, P., Gillotre-Taylor, K., Horkko, S., Palinski, W., Quehenberger, O., Shaw, P., Steinberg, D., Terpstra, V., and Witztum, J.(2001).** Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis *Ann.N.Y.Acad.Sci* **947**: 214-222.

- *Boussahel S., Dahamna S., Ruberto G., Siracusa L., Harzallah D. (2013).** Phytochemical study and antioxidant activities of leaves extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Pharmacognosy Communications* **3**: 46-47.
- *Breslow J.L.(1995).** Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism. *In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (Eds). Disease. 7th.ed. McGraw-Hill, New York. pp.2031-2052.*
- *Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie phytochimie In : *Plantes médicinales*.3édition. *TEC et DOC : Lavoisier*, Paris, pp227-387.
- *Brown, M. S., Kovanen, P. T., and Goldstein, J. L. (1981).** Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors, *Science* **212**: 628-635.
- *Brown, M. S. et Goldstein, J. L. (1986).** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **232**: 34-47.
- *Blomhoff J.P., Holme R., Ostrem T. (1978).** Plasma cholesterol esterification and plasma lipoproteins in bile-duct-ligated dogs. *Scand J Gastroenterol.* **13(6)**: 693-702
- *Carmena, R., Duriez, P., and Fruchart, J. C. (2004).** Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*, **109(3)**: 2-7.
- *Charuhas P.M., Fosberg K.L., Bruemmer B. (1997).** A double blind randomized trial comparing outpatient parenteral nutrition with intravenous hydration: effect on resumption of oral intake after marrow transplantation. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, **21 (1)**: 57-61.
- *Chuang J.H., Shieh C.S., Chang N.K. Chen W. J. et Lo S. K. (1995).** Metabolic effect of parenteral nutrition .In dogs with obstructive jaundice. *J Am Coll Nutr.* **14(2)**: 197-201.
- *Cugnet C., Marçais C., Charrière S., Guitard-Moret M., Decaudain A., Sassolas A. et Moulin P. (2008).** Génétique des hypertriglycéridémies. *Médecine des Maladies Métaboliques.* **2(1)**: 15-22.

- ***Curtis L.K., Witztum J.L. (1985).** Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI and E are glycosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes*, **34 (4):** 52-61.
- ***Dallongeville, J. (2006).** Le métabolisme des lipoprotéines. *Cah. Nutr. Diét.* **41 (1):** 55-60
- ***Danielsson B., Ekman R., Johansson B.G. et Petersson B. G. (1977).** Plasma lipoprotein changes in experimental cholestasis in the dog. *Clinica Chimica Acta*, **80 (1) :** 157-70.
- ***Davenport H.W. (1982).** Physiology of the digestive tract. 5th ed. Year Book Chicago, PP. 123
- ***Davignon J. (2002).** Apolipoprotéine E, une molécule polymorphe et pléiotrope : Rôle dans l'athérosclérose et au-delà. *Sang Thrombose et Vaisseaux*, **14:** 107–120.
- ***Denis I. 2011.** Métabolisme normal et pathologique des lipides CHU de CAEN. pp23-26
- ***De Winther, M. P., Gijbels, M. J., Van Dijk, K. W., Havekes, L. M., and Hofker, M. H. (2000).** Transgenic mouse models to study the role of the macrophage scavenger receptor class A in atherosclerosis. *Int J Tissue React*, **22:** 85-91.
- ***Duvillard L., Pont F., Florentin E., Galland-Jos C., Gambert P., Vergès B. (2000).** Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes. A stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest*, **30:** 685-694.
- ***Fourlanos S., Perry C. et Stein M.S. (2006).** A clinical screening tool identifies autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care*, **29:** 970-975.
- ***Fredrickson D.S., Levy R.I. et Lees R.S. (1967).** Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanism and disorders. *N Engl J Med* **276 (1) :** 34-44.
- ***Fruchart, J.C. (2000).** Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction. *John Libbey Eurotext* **4 (5):** 51-247.
- ***Gimbrone, M. A., Jr., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R., and Garcia-Cardena, G. (2000).** Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, **902:** 230-240

***Ginsberg H.N., Dixon J.L., Goldberg I.J. (1999).** VLDL/LDL cascade system: assembly, secretion and intravascular metabolism of apoprotein B-containing lipoproteins. *Arnold, Hodder Headline Group, London*, pp. 55-70.

***Goldstein J.L., Kita T., Brown M.S. (1983).** Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. *N Engl J Med*, **309** : 288-296.

***Gotto AM, Pownall H. (1999).** Manual of lipid disorders. Reducing the risk for coronary heart disease. Lippincott-Williams and Wilkins. Baltimore, pp. 231-232

***Gotto, A. and Pownall, H. (2003).** Manual of Lipids Disorders : Reducing the Risk for Coronary Heart Disease. Lippincott Williams & Wilkins., Philadelphia, 482p.

***Gregg R.E., Zech L.A., Schaefer E.J., Brewer H.B. J. (1981).** Type III hyperlipoproteinemia : defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. *Science*, **211** : 584-586.

***Grundy S.M., Chait A., Brunzell J.D. (1987).** Familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis* **7**: 203-207.

***Grundy S.M. (1999).** Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, **83**: 25-29.

***Gulias J., Traveset A., Riera N. et Mus M. (2004).** Critical Stages in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany*, **93**: 723-731.

***Haffner S.M, Lehto S., Ronnema T., Pyorala K., Laakso M. (1998).** Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, **339**: 229-234.

***Halimi S. (2000).** Dyslipidémie des diabètes et des états d'isulino-résistance. *Néphrologie*, **21 (7)** : 345-346

***Hamel P. (2008).** Effets des lipoprotéines de faible densité oxydées sur les cellules ostéoblastiques. Thèse de doctorat, Université Québec

- *Howard B .V. (1999). Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* **84 (1A)**: 28-32.
- *Izhaki I., Tsahar E., Irena P. et Jacob F. (2002). Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits .*New Phytologist*, **156**: 217-223.
- *Johnson R.K. (1989). Canine Hyperlipidemia. In : Ettinger S.J. (Ed.), Textbook of Veterinary Internal Medicine. 3rd ed. Saunders : Philadelphia, pp 203-208.
- *Kanatt S.R., Chander R. et Sharma A. (2007): Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L) in radiation-processed lamb meat .*food chemistry*,**100**:451-458
- *Kelley D.E., Goodpaster B.H., Storlien L. (2002). Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr*, **22**: 325-46.
- *Khanna A.K., Rizvi F., and Chander R. (2002). Lipid Lowering Activity of Phyllanthus niruri in hyperlipemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **82**: 19-22.
- *Kim H.J.K. et Kurup I.V. (1982). Non enzymatic glycosylation of human plasma low density lipoprotein. Evidence for *in vitro* and *in vivo* glycosylation. *Metabolism*, **31(3)**: 48-53.
- *Kissebah A.H., Alfarsi S., Evans D.J. et Adams P.W.(1982). Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B kinetics in non insulin dependent diabetes mellitus . *Diabetes* **31** : 217-225.
- *Labrousse F. 2002. Hypertriglycéridémie. Endocrinologie-Nutrition. In *Encycl Méd Chir*. Elsevier., Paris, pp 5-10
- *Laville M ., Romon M., Chavrier G, Guy-Grand B, Krempf M, Chevallier JM, Marmuse JP, Basdevant A. (2005). Recommandations regarding obesity surgery. *Obes Surg* 15(14): 76-80.
- *Leopold, J. A. and Loscalzo, J. (2000). *Clinical importance of understanding vascular biology*. *Cardiol.Rev* **8**: 115-123.

***Lewis G.F., Steiner G. (1996).** Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. *Diab Care* **19** : 390-5.

***Liu Y., Chen B. P., Lu M., Zhu Y., Stemerman M. B., Chien S. and Shyy J. Y. (2002).** Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:76-81.

***Ljubuncic P., Azaizeh H., Portnaya I., Coganc U., Said O., Saleh K.A., Bomzon A.(2005):** Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel, *Journal of Ethnopharmacology* **99** :43–47

***Lusis A. J. (2000).** Atherosclerosis. *Nature* **407**: 233-241.

***Mahley R.W., Weisgraber K.H., Innerarity T. (1974).** Canine lipoproteins and atherosclerosis. II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipidemia. *Circ Res* **35(5)**: 722-33

***Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C. et Weisgraber K.H. (1984),** Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J.LipidRes.* **25**:1277-1294.

***Mahley R.W., Rall S.C. J.r. 1989.** Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In *The metabolic basis of inherited disease* SCRIVER C.R., BEAUDT et A.L., SLY W.S., Eds, Mc. Graw-Hill .New York .pp. 1195-1213.

***Mahley R.W., Weisgraber K.H., Farese R.V. 2003.** Disorders of lipid metabolism. In *Text book of endocrinology*. Larsen PR., KRONENBERG HM.,MELMED S., POLONSKY KS., WILLIAMS., Eds, 10thed Saunders . Philadelphia, pp.1642-1705.

***Mano J.C.L., Szeto L.et Steiner G. (1990).**Glycation of very low density lipoprotein from rat plasma impairs its catabolism. *Diabetologia* **33(3)**: 39-42.

***Manson J.E., Colditz G.A., Stampfer M.J., Krolewski A.S, Rosner B. et Arky R.A (1991).** A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med* **151(114)**: 1-7.

***Mighri H., Hajlaoui H., Akrouit A., Najjaa H., Neffati M. (2010):** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone C. R. *Chimie* **13**: 380–386.

***Miller J.P. (1990).** Dyslipoproteinaemia of liver disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* **4**: 807-832

***Mohammadi H., Elmalki A., Hassar M., Bouchrif B., Qarbal F., Dahbi F., Hilal L. et Ghalim N. 2009.** Glyceamic control, HbA1c, and lipid profile in children with type 1 diabetes mellitus. *European Journal of Scientific Research.* **29**: 289-294.

***Moulin P. 2001.** Dyslipidémies secondaires. Endocrinologie-Nutrition .In *Encycl Méd Chir*, Elsevier., Paris, pp 10-12.

***Oulmden F., Saile R., El Gnaoui N., Benomar H., Lkhider M., Amrani S. et Ghalin N. (2011).** Hypolipidemic and Anti-Atherogenic Effect of Aqueous Extract of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Extract in an Experimental Model of Atherosclerosis Induced by Triton WR-1339. *Eur Jour of Sci Res* **52(1)**: 91-99.

***Owen P.L. et Johns T. (1999):** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacologie*, **64**: 149-160.

***Pandit K., Karmarkar S.M., Bhagwat A.M. (2011).** Evaluation of antihyperlipidémic activity of *Ficus hispida* linn leaves in Triton WR-1339 (Tyloxapol) induced hyperlipidémia in mice. *Int J Pharm Pharm Sci* **3**: 188-191.

***Parnet, 2013**

***Passarge E. (2007).** *color Atlas of Genetics* .3^{eme} edition to James Lafayette German III ,MD, New York, p 371.

***Peelman F., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (2000).** *Curr Opin. Lipidol. Apr*; **11(2)**: 155-160.

***Picard S. 2000.** Endocrinologie-Nutrition .Autres dyslipidémies génétiques. In *Encycl Méd Chir* .Eds. Elsevier, Paris.pp 5-10.

***Pitas R. E., Innerarity T. L., et Mahley R.W. (1980).** Cell surface receptor binding of phospholipid . protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein , *J Biol.Chem* **255**: 5454-5460.

***Pownall H., Gotto A. M., J.r. (1999).** *Structure and dynamics of human plasma lipoproteins*, Oxford University Press Inc., New York, pp. 3-15.

***Quettier-deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J. C. Bailleul F. et Trotin F. (2000) :** Phenolic compounds and antioxidants activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, **72**: 35-42.

***Raisonnier A. (2004).** *Lipides et lipoprotéines Objectifs au cours de Biochimie PCEM2 Biochimie Métabolique et Régulations. Paris VI, Paris*, 106 p.

***Rall S.C., Weisgraber KH., Innerarity T.L., Mahley R.W. (1982).** Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **79 (4)**: 696-700.

***Ratziu V., Giral P., Charlotte F., Bruckert E., Thibault V., Theodorou. (2000).** Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* **118**: 1117-1123.

***Redgrave T. G. 1999.** *Chylomicrons*, London Arnold, Hodder Headline Group, London, pp. 31-54.

***Reynolds A.J., Fuhrer L., Dunlap H.L. (1994).** Lipid metabolite responses to diet and training in sled dogs. *J Nutr* **124(12)**: 2754-2759.

***Ribéreau-Gayon P.1968.**Notion générales sur les composés phénoliques. In *Composées phénoliques des végétaux*. Edition Dunod, Paris, pp. 105-133.

***Ribéreau Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et Ribéreau Gayon P. (1982) .**Composés phénoliques. In *Traité d'oenologie, sciences et techniques du vin* . Edition Dunod, Paris, pp. 477-499.

***Mahamuni S. P., Rekha D., Farid M., Sachin L.(2012).** Therapeutic approaches to drug targets in hyperlipidemia, *BioMedicine* **2**: 137 – 146.

***SAIDAL, 2013**

***Saïle R & Hassan T. (2007).** Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. *Les technologies de laboratoire 2*: 4-11.

***Silbernagl S ,Lang F.2003.** Reins, équilibre hydrominéral. Métabolisme des lipoproteines. In *Atlas de poche de physiopathologie*. Flammarion, pp.118-247.

***Simon M., Hone E., Gandy S., Martin R.(2003).** Expanding the association between the APO E gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alteration in APOE transcription. *Journal of neurochemistry* **84**: 1215-1236.

***Sloop CH, Dory L, Hamilton R. (1983).** Characterization of dog peripheral lymph lipoproteins: the presence of a disc-shaped “nascent” high density lipoprotein. *J Lipid Res* **24(11)**: 1429-40.

***Soutar A. K. (1999).** *Low-density lipoprotein receptors*, Arnold, Hodder Headline Group .London, pp. 303-322.

***Spaineact.** 2013.

***Sparrow C. P., Parthasarathy S., et Steinberg D. (1989).** A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol.Chem* **264**: 2599-2604.

***Stamler J., Vaccaro O., Neaton J.D.et Wenworth D.(1993).** For the multiple risk factor intervention trial research group Diabetes other risk factors and 12 year cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care* **16**: 434-444.

***Steinbrecher U.P., Witztum J.L. (1988).** Glycosylation of low-density lipoprotein to an extend comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* **33(13)**: 4.

***Steiner G., Tkac I., Uffelman K.D et Lewis G .F. (1998).** Important contribution of lipoprotein particle number to plasma triglyceride concentration in type 2 diabetes Atherosclerosis **137**: 211-214.

***Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J. G., Thomazy V. A., et Evans R. M. (1998).** PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized

LDL. *Cell* **93**: 241-252.

***Tremblay A. (2006).** Etude du métabolisme des lipoprotéines dans diverses dyslipidémies; thèse de doctorat; Université Laval.

***Turpin G .1997.**Pourquoi, quand, comment traiter les dyslipoprotéinémie, 176 P.

***Turner R., Stratton I., Horton V. (1997).** Autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. *UK Prospective Diabetes Study Group* **350 (12)**: 88-93.

***Vergès B. (1999).** Dyslipidemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. *Diabetes Metab* **25 (3)**: 32-40.

***Vergés B .2004.** Hyperlipidémie des diabétiques .Elsevier SAS. pp. 106-116.

***Vergès B., Galland F., Duvillard L. (2003).** Direct measurement of plasma oxidized LDL levels in type 2 diabetic patients before and after insulin therapy *Diabetologia* **46 (2)**:73.

***Von Eckardstein A., Huang Y. et Assmann G. (1994).** Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr.Opin.LipidoL* **5**:404-416.

Annexes

Annexe I : Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des antioxydants.

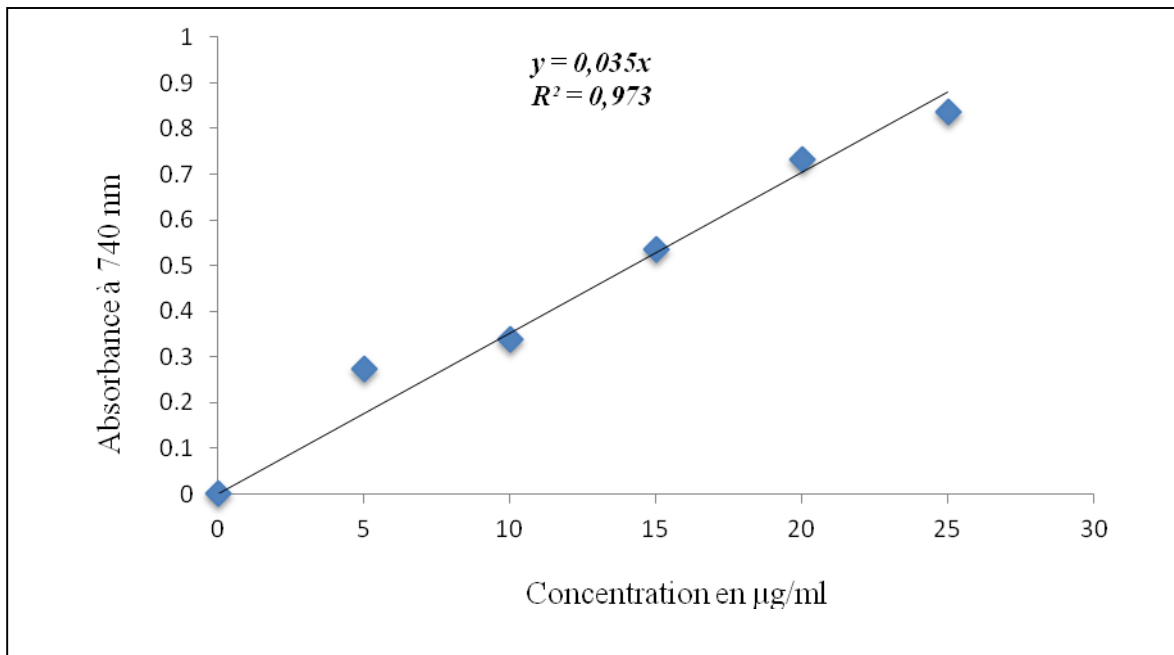


Figure 01 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique.

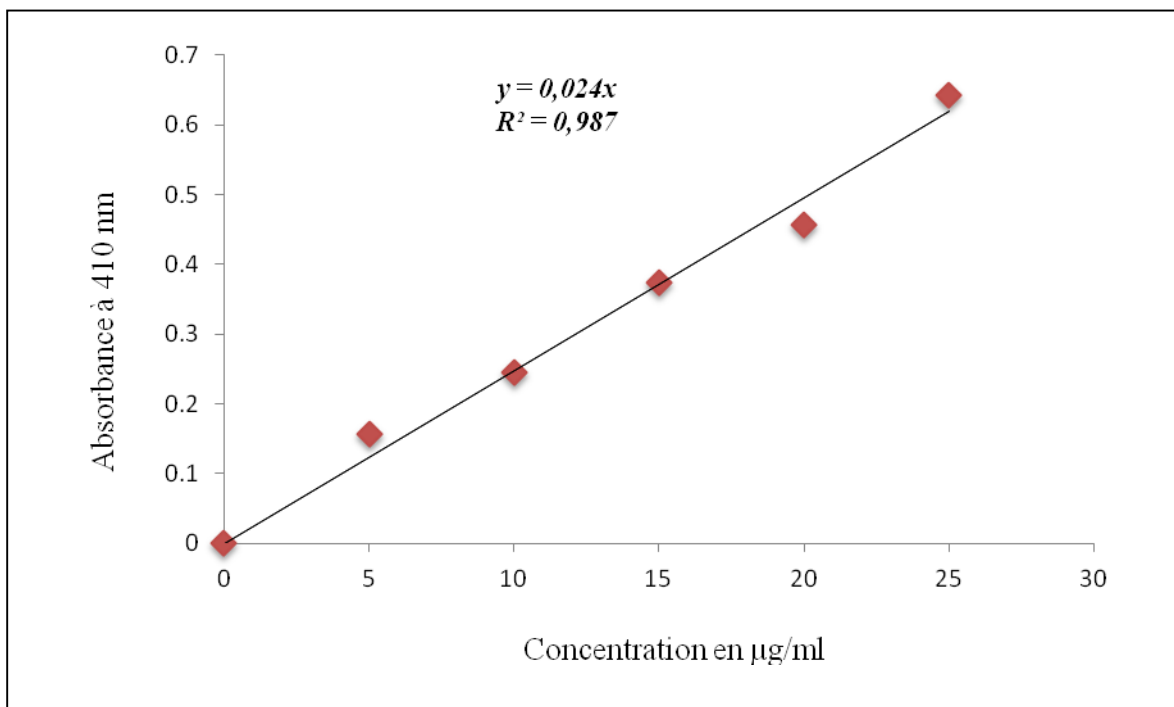


Figure 02 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.

Annexe II : Evolution de l'activité anti-radicalaire en fonction des standards.

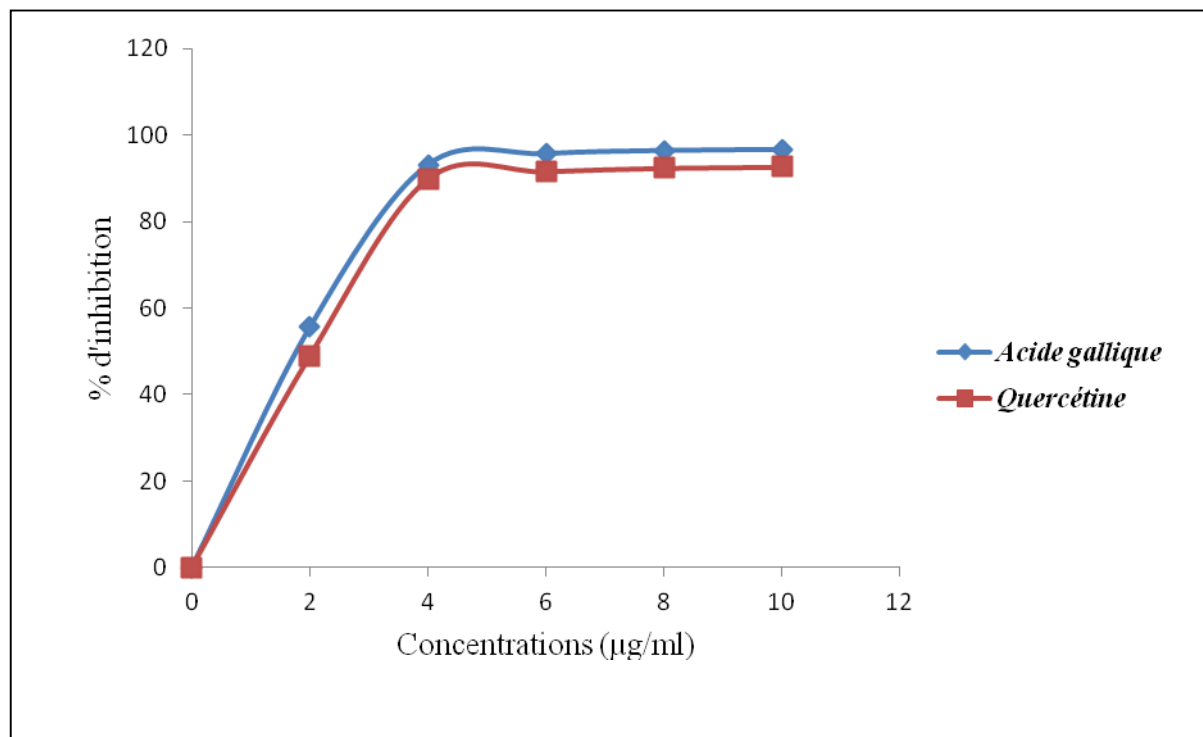


Figure 01 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration en acide gallique et quercétine.

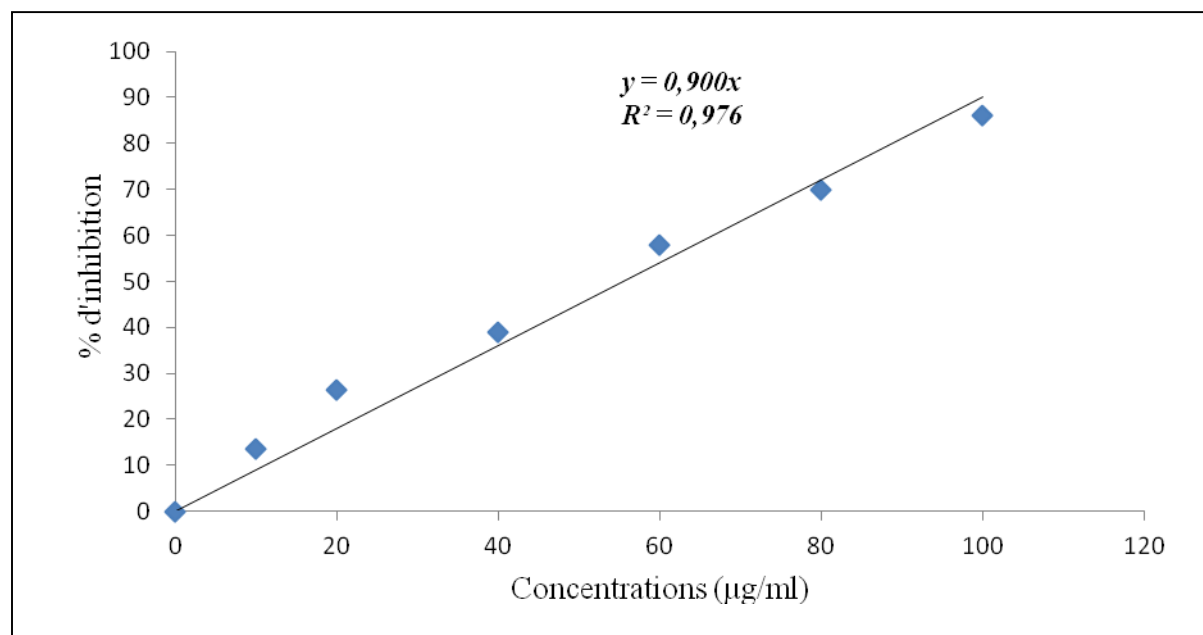


Figure 02 : Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ en fonction de la concentration en trolox.

Annexe III : Fiches techniques de la composition des réactifs du dosage des paramètres lipidiques sanguins

Fiche technique N° 1

Réactif pour le dosage du cholestérol total

R1 Buffer	PIPE pH 6.9	90 mmol/L
		26 mmol/L
R2 Enzyme	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.4 mmol/L
CHOLISTEROL CAL	Cholestérol primaire standard aqueux	200mg/dL

Fiche technique N° 2

Réactif pour le dosage des triglycérides

R1 Buffer	GOOD pH 7.5	50 mmol/L
	P-chlorophenol	2 mmol/L
R2 Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycerokinase (GK)	500 U/L
	Glycero-3-oxydase (pod)	2500 U/L
	Peroxydase (POD)	440 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL	Triglycérides aqueux standard primaire	200 mg/dL

Fiche technique N° 3

Réactif pour le dosage du HDL-c

R	Acide phosphotungstic	14 mmol/L
Réaction de précipitation	Magnesium chloride	2 mmol/L
Etalon	Cholestérol	Ref : 1001092
		Ref : 1001093

Annexe IV : Fiches techniques de la composition des produits utilisés lors de la préparation des coupes histologique

Fiche technique N° 1

Eau gélatiné 0,4 % (**Martoja, 1967**)

Gélatine en poudre	0,4 g
Eau distillée	100 ml

La solution est homogénéisée sous agitateur sur une plaque chauffante

Fiche technique N° 2

Hématoxyline de Groat : préparation à froid

Solution A	Acide sulfurique concentré	0,8 ml
	Alum de fer	1g
	Eau distillée	50 ml
Solution B	Hématoxyline	0,5g
	Alcool 90°	50 ml

Résumé

Rhamnus alaternus (Nerprun méditerranéen) appelée localement (Melilésse) est une plante herbacée distribué le long du bassin méditerranéen, L'efficacité de cette plante a été prouvé en médecine traditionnelle, elle est utilisée comme purgative, laxative, diurétique, antihypertensive et dépurative. Ces différentes applications nous a conduit à identifier ses composantes phytochimiques comme les flavonoïdes et les polyphénols, d'étudier le pouvoir anti-radicalaire, la toxicité aigue et tester l'activité antihyperlipidémique de l'extrait méthanolique de RA. Dans l'étude de la toxicité aigue, des souris Swiss albinos des deux sexes ont reçues par voie orale des doses de l'EM de 1, 2 et 5 g/kg et observer les changements comportementaux et la mortalité. Dans l'étude de l'activité antihyperlipidémique, des rats Wistar femelles ont reçues une dose de triton WR-1339 300mg/kg, et de l'EM à des doses 100, 200 et 400mg/kg, on' a effectuées des coupes histologique pour le foie et l'aorte des rats traitées.après leurs dissection. Aucune mortalité ou comportement anormal n'a été observée dans l'étude de la toxicité aigue sur les souris pour tous les trois doses. Les résultats de l'étude de l'hyperlipidémie aigue, indiquent que l'EM de RA provoque un bon effet hypolipidémiant et que la dose la plus efficace est de 200mg/kg. Après l'étude comparative sur des coupes histologiques réalisées sur le foie et l'aorte des rats traités, une disparition progressive en fonction des doses de l'EM de RA, a été observée.

Mots clés : *Rhamnus alaternus*, Hyperlipidémies aigue, toxicité aigue, WR-1339.

Abstract

Alaternus Rhamnus (buckthorn Mediterranean) called locally (Melilésse) is an herb distributed along the Mediterranean, the effectiveness of this plant has been proven in traditional medicine, it is used as a purgative, laxative, diuretic and detoxifying antihypertensive. These applications have led us to identify its phytochemicals such as flavonoids and polyphenols, to study the anti-radical power, to test the acute toxicity and antihyperlipidemic activity of ME of RA. In the acute toxicity study, Swiss albinomice of both sexes received oral doses of ME 1, 2 and 5 g /kg and observe behavioral changes and mortality. In the study of antihyperlipidemic activity of female Wistar rats received a dose of TritonWR-1339 300 mg/kg, and ME at doses 100, 200 and 400mg/kg. We have made histological cups for the liver and the aorta of treated rats after their dissection. No mortality or abnormal behavior was observed in the study of acute toxicity in mice for all three doses. The results of the study of acute hyperlipidemia, indicate that ME of RA causes a good lipid-lowering effect and that the most effective dose was 200mg/g. After a comparative study of histological sections performed on the liver and aorta of rats, a gradual disappearance based doses of ME of RA was observed.

Key words: *Rhamnus alaternus*, acute hyperlipidemia, acute toxicity, WR-1339.