

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Effet gastroprotecteur de l'extrait de *Clematis flammula* contre un ulcère gastrique induit par l'indométacine

Présenté par :

TABTI Rabah et TIGHREMT Mustapha

Soutenu le : 11 Juin 2016

Composition du jury

M. M. HAMOUM	MAB	Président
Mme. N. DEBBACHE	MCB	Encadreur
Mme. B. KHETTAL	MCA	Examinatrice

Année Universitaire : 2015/2016

Remerciements

Nous remercions tout d'abord DIEU, le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience et la volonté pour achever ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice, Mme DEBBACHE pour son encadrement de qualité, ses conseils, son orientation, sa disponibilité à toute épreuve, et pour la confiance qu'elle nous a accordé,

Nous lui sommes très reconnaissants d'avoir mis toute sa compétence à notre disposition, pour ses conseils judicieux, sa patience et son suivi régulier à l'élaboration de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Mme YOUS pour son aide précieuse et sa patience tout au long de ce mémoire.

Nos sincères considérations et remerciements sont aussi exprimés aux membres du jury : Mr HAMOUM. M pour l'honneur qu'il nous fait par sa présence en qualité de président du jury et Mme KHETTAL. B pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent également à Mme ATMANI pour la confiance qu'elle nous a accordée en nous accueillant au sein du laboratoire de génétique et pour ses précieux conseils.

Mme RAHMANI, pour son aide et précieux conseils dans le laboratoire durant la période expérimentale.

Un grand merci à tous.

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

*A la mémoire de mon très cher père, qui ma toujours soutenu et encouragé
jusqu'à son dernier souffle, que dieu le tout puissant l'accueille en son vaste
paradis et lui accorde sa sainte miséricorde, tu restera toujours dans nos cœurs ;*

*A ma très chère mère, qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude avec tous les
moyens, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité*

Pour toi je prie dieu de te garder en bonne santé ;

A mes très chères sœurs et mon cher frère ;

A toute ma famille et mes proches ;

A mon cher ami et collègue Mustapha ainsi que toute sa famille;

*A mes très chers amis (es) que j'aime beaucoup, merci d'avoir été toujours à mes côtés et de
m'avoir soutenu ;*

A tous mes amis(es) et camarades de promotion ;

A tous ceux ou celles que j'aime, que je n'ai pas mentionné mais que je n'ai pas oublié.

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Que dieu leur prête santé ;

A ma très chère Yemma-nini que dieu le tout puissant l'accueille en son vaste paradis et lui accorde sa sainte miséricorde,

A mes grand-parents, que dieu les garde pour nous ;

A mon cher frère et ma chère sœur;

A toute ma famille et mes proches ;

A mon cher ami et collègue Rabah ainsi que toute sa famille;

A mes très chers amis (es) que j'aime beaucoup, merci d'avoir été toujours à mes côtés et de m'avoir soutenu ;

A tous mes amis(es) et camarades de promotion ;

A tous ceux ou celles que j'aime, que je n'ai pas mentionné mais que je n'ai pas oublié.

-Mustapha-

Liste des abréviations

4-HNE : 4-Hydroxynonéal

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdiens

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANOVA: Analysis of variance.

APAP : N-Acétyle-Para-Amino-Phénol

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

CAT : Catalase

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CMC : Carboxyméthylcellulose

COX : Cyclo-Oxygénase

COX-1 : cyclo-oxygénase 1

COX-2 : cyclo-oxygénase 2

ERN : Espèces Réactives de l'Azote

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

GIP : Peptide inhibiteur gastrique

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion

HCO₃ : Ions de bicarbonates.

H₂CO₃ : Acide carbonique

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HHT : 12-1-hydroxy-5,8,10-heptadécénoïque

HSP 70: Heat shock protein 70

IL-1 β : Interleukine 1 β

iNOS : Inducible nitric oxide synthase

IPP : Inhibiteurs de la pompe à protons

IsoP : Isoprostanes

LOO[•] : Radical lipidique peroxydé

LOOH : Hydroxile lipidique

LPO : Peroxydation lipidique

- MDA** : Malondialdéhyde
- Nf- κ B** : Nuclear factor κ B
- NAD⁺**: Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide.
- NADH**: Nicotinamide adénine dinucléotide.
- NAPQI** : N-Acétyl-Para-benzoquinone-Imine
- NMRI** : The Naval Medical Research Institute
- NO** : Oxyde nitrique
- NOS** : Nitric oxide Synthase
- (O₂⁻)**: Anion superoxide
- (OH⁻)** : Radical hydroxide
- (¹O₂)** : Oxygène singulet
- (ONOO⁻)** : Radical peroxytrites
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- PGE** : Prostaglandines
- PG1** : Analogue de la prostaglandine d'origine synthétique
- PUFA** : Acides gras polyinsaturés
- PG** : Prostaglandines
- RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate
- SEM**: Standard error of the mean
- SODs**: Superoxide dismutases
- Stat-1** : Transducteur de signaux et activateur de la transcription 1
- TBA** : Acide thiobarbiturique
- TBARS** : Substances réactives de l'acide thiobarbiturique
- TEP** : 1,1,3,3-tetraethoxypropane
- TNF- α** : Facteur de nécrose tumorale- α
- VIH** : Virus d'Immunodéficience Humain
- XO** : Xanthine oxydase

Liste des figures

Figure 1 : Coupe longitudinale de l'estomac	2
Figure 2 : Les couches tissulaires de l'estomac	3
Figure 3 : Vue transversale de la muqueuse gastrique, avec ses glandes gastrique et les types de cellules qui la composent	5
Figure 4 : Régulation et mécanismes de sécrétion de HCl.....	6
Figure 5 : Eléments de la barrière muqueuse gastrique	10
Figure 6 : Diagramme du mécanisme d'induction des ulcères gastro-intestinaux par les AINS	12
Figure 7 : Processus de la peroxydation lipidique.....	15
Figure 8 : Formation et métabolisme du MDA	17
Figure 9 : Schéma des défenses antioxydantes	18
Figure 10 : Inhibition de la pompe à protons	20
Figure 11 : Piégeage des ERO (X•) par un noyau catéchol	22
Figure 12 : Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes	23
Figure 13 : Photographie originale de <i>Clematis flammula</i>	25
Figure 14 : Photographie originale de souris Albinos	27
Figure 15 : Souris au sein de l'animalerie	28
Figure 16 : Photographie originale de voie d'administration	31
Figure 17 : Photographie originale des étapes de sacrifice des souris	32
Figure 18 : Réaction de l'acide thiobarbiturique avec le MDA	33
Figure 19 : Photographie originale des estomacs	35
Figure 20 : Photographie des estomacs.....	36

Figure 21 : Photographie originale d'un estomac traité avec du Misoprostol.....36

Figure 22 : Effet de l'administration orale du véhicule (CMC 0,8%), du Misoprostol et de l'extrait éthanolique de *C. flammula* sur l'ulcère induit par l'indométacine chez les souris.....38

Figure 23 : Représentation en histogramme de l'effet du Misoprostol et de l'extrait éthanolique de *C. flammula* sur l'ulcère induit par l'indométacine chez les souris.
.....38

Figure 24 : Les valeurs des niveaux de MDA gastriques (nmol MDA/mg de tissus) chez les groupes expérimentaux39

Liste des Tableaux

Tableau I : Les principales sources des ERO.....13

Tableau II : Répartition des différents lots selon le type du traitement administré30

Tableau III : Le pourcentage d'ulcération et d'inhibition pour les différents groupes37

Tableau IV : Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par les différentes concentrations d'extrait et le misoprostol.....40

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique	
I.1- L'estomac.....	2
I.1.1- Anatomie.....	2
I.1.1.1-Morphologie.....	2
I.1.1.2-Histologie	3
I.1.2-Physiologie	4
I.1.2.1-Les sécrétions gastriques	4
I.1.2.2-Le suc gastrique	5
I.1.2.3-Mécanisme de sécrétion acide	6
I.1.2.4-Régulation de la sécrétion gastrique acide	7
I.2- L'ulcère gastrique	8
I.2.1 Physiopathologie et étiologie de l'ulcère.....	8
I.2.2-Mécanismes de protection de la muqueuse gastrique	9
I.2.3- Induction de l'ulcère par les AINS	10
I.3-Le stress oxydant	12
I.4-La peroxydation lipidique	14
I.4.1-Mécanismes de la peroxydation lipidique	14
I.4.2-Les produits de la peroxydation lipidique	16
I.4.3-Méthodes d'évaluation de la peroxydation lipidique.....	16
I.4.4-Formation et métabolisme du MDA.....	16
I.5- Les antioxydants.....	17
I.5.2- Antioxydants enzymatiques.....	17
I.5.3- Antioxydants non enzymatiques.....	18
I.6- La thérapeutique de l'ulcère.....	18
I.6.1- Les mécanismes physiologiques de protection anti-ulcère.....	18
I.6.2- Les traitements médicamenteux anti-ulcère	19
I.6.3- La phytothérapie et l'ulcère	20

I.6.4- Les polyphénols	20
CHAPITRE II : Matériel et méthodes	
II-1-Matériel.....	25
II-1-1-Matériel végétal	25
II-1-1-1-Taxonomie.....	25
II-1-1-2-Usage en médecine traditionnelle.....	26
II-1-1-3-Les études antérieures	26
II-1-1-4-Composition chimique.....	27
II-1-2- Animaux et conditions d'élevage.....	27
II-1-3- Matériel de laboratoire.....	28
II-2-Méthodes.....	29
II-2-1-Préparation des extraits de feuilles <i>Clematis flammula</i>	29
II-2-2-Traitement des animaux et induction d'ulcère par l'indométacine....	29
II-2-3-Sacrifice des animaux.....	32
II-2-4-Broyage des estomacs.....	32
II-2-5-Evaluation de l'activité anti-ulcère	32
II-2-6. Détermination du taux des MDA	33
II.2.7 Analyses statistiques.....	34
CHAPITRE III : Résultats et discussion	
III-1-Résultats	35
III.1-1 Effet de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>C. flammula</i> sur l'ulcère induit par l'indométacine.....	35
III.1-2 Les observations macroscopiques.....	35
III.2- Evaluation de degré d'ulcération et d'inhibition chez les groupes.....	37
III.3- Evaluation des effets de l'extrait sur les taux gastriques de MDA.....	39
III-2- Discussion	41
Conclusion	45
Références bibliographiques	46

INTRODUCTION

L'ulcère gastrique est une maladie qui affecte un grand nombre de personnes à travers le monde, c'est une maladie commune avec de multiples étiologies. Des facteurs tels que le tabac, le stress, un régime inapproprié, et des déficiences au niveau des mécanismes de gastro-protection sont étroitement reliés au développement des ulcérations de la muqueuse gastrique. L'infection bactérienne avec *Helicobacter pylori* a aussi été soulignée comme étant un facteur prédisposant au développement des ulcères gastriques (Li et al., 2014). Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites en excès en conséquence d'un déséquilibre redox à l'intérieur des cellules sont largement responsables du développement de nombreuses maladies principalement les inflammations chroniques (Halliwell et Gutteridge, 1990).

Au fil des années, une grande quantité de savoir a été accumulée concernant le développement de l'ulcère gastrique, et un large spectre de médicaments tels que les antiacides, inhibiteurs de pompes à protons, anticholinergiques, et antagonistes des récepteurs histaminiques ont été développés. Néanmoins, les thérapies existantes ont généralement des effets indésirables (hypersensibilité, arythmie, impotence, gynécomastie, et changements hématopoïétiques) et sont très coûteux. Ceci a stimulé la recherche continue pour de nouvelles alternatives thérapeutiques. A ce point, on insère les plantes médicinales pour leurs différents avantages tels qu'une grande disponibilité, une protection efficace, un cout plus bas, une toxicité moindre (Batista et al., 2015).

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'études pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation.

Ce travail vise à étudier l'activité gastro-protectrice des extraits bruts d'une plante médicinale *Clematis flammula*, qui appartient à la famille des Renonculacées. Pour cela notre étude abordera dans une première partie une synthèse bibliographique rappelant brièvement la physiologie de l'estomac, le rôle des différents facteurs entrant dans la physiopathologie de l'ulcère gastrique notamment celui des ERO. Dans une seconde partie seront abordés les procédés expérimentaux suivis de la discussion des différents résultats obtenus et enfin une conclusion finale et perspectives à venir.

CHAPITRE I

*SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE*

I.1-L'ESTOMAC

I.1.1- Anatomie

I.1.1.1-Morphologie

Placé entre l'œsophage abdominal et l'intestin grêle, l'estomac se situe dans les régions épigastrique, ombilicale et de l'hypochondre gauche de l'abdomen. C'est la partie la plus dilatée du tractus gastro-intestinal, il est subdivisé en quatre régions

- Le cardia, qui entoure l'abouchement de l'œsophage dans l'estomac ;
- Le fundus gastrique, qui est la région située au-dessus de l'orifice du cardia ;
- Le corps de l'estomac, la plus grande région, est la portion moyenne qui se prolonge vers le bas par la partie pylorique en forme d'entonnoir ;
- La portion pylorique, qui est la portion distale de l'estomac et qui est divisée en antrum pylorique et en canal pylorique (Coquerel et Beghin, 2012).

Les autres éléments de l'estomac sont : La grande courbure, qui est le lieu d'insertion du ligament gastrosplénique et du grand omentum; la petite courbure, qui est le lieu d'insertion du petit omentum ; l'incisure cardiale, qui est l'angle supérieur créé par la pénétration de l'œsophage dans l'estomac; et l'incisure angulaire, qui est une inflexion dans la petite courbure (Lacour et Belon, 2015).

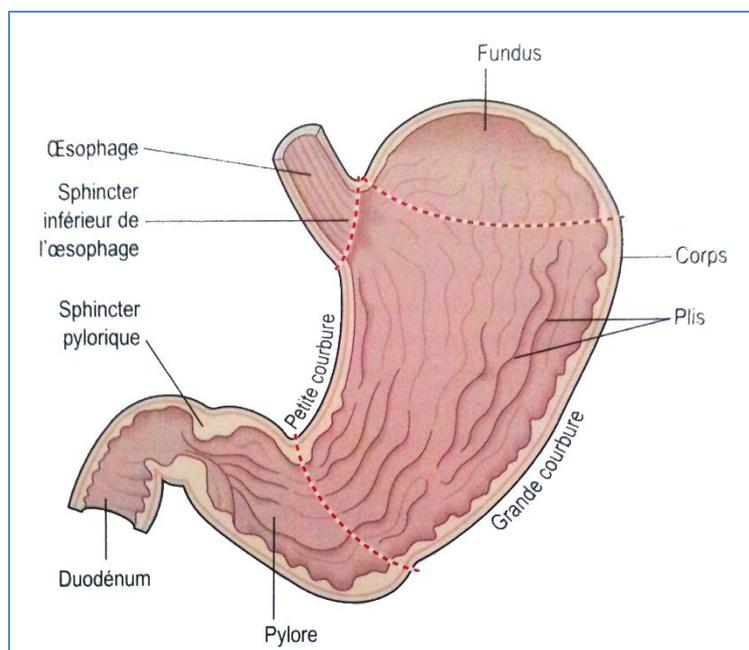


Figure 1: Coupe longitudinale de l'estomac (Waugh, 2011).

I.1.1.2-Histologie

La paroi de l'estomac est formée des quatre couches :

- Une muqueuse interne quand l'estomac est vide elle forme de grands replis, appelés plis gastriques, la surface de la muqueuse est une couche de cellules épithéliales simples prismatiques non ciliées appelées cellules à mucus superficiel ;
- Une sous muqueuse avec de nombreuses glandes sous-muqueuses qui élaborent du mucus qui facilite l'avancée du bol alimentaire, elle se compose de tissu conjonctif aréolaire qui relie la muqueuse à la musculieuse ;
- Une musculieuse possède trois couches de tissu musculaire lisse : une couche longitudinale externe, une couche circulaire moyenne et une couche oblique interne ;
- D'une séreuse externe qui tapisse l'estomac se compose d'épithélium simple pavimenteux et de tissu conjonctif aréolaire, elle fait partie du péritoine viscéral (Tortora et Derrickson, 2010).

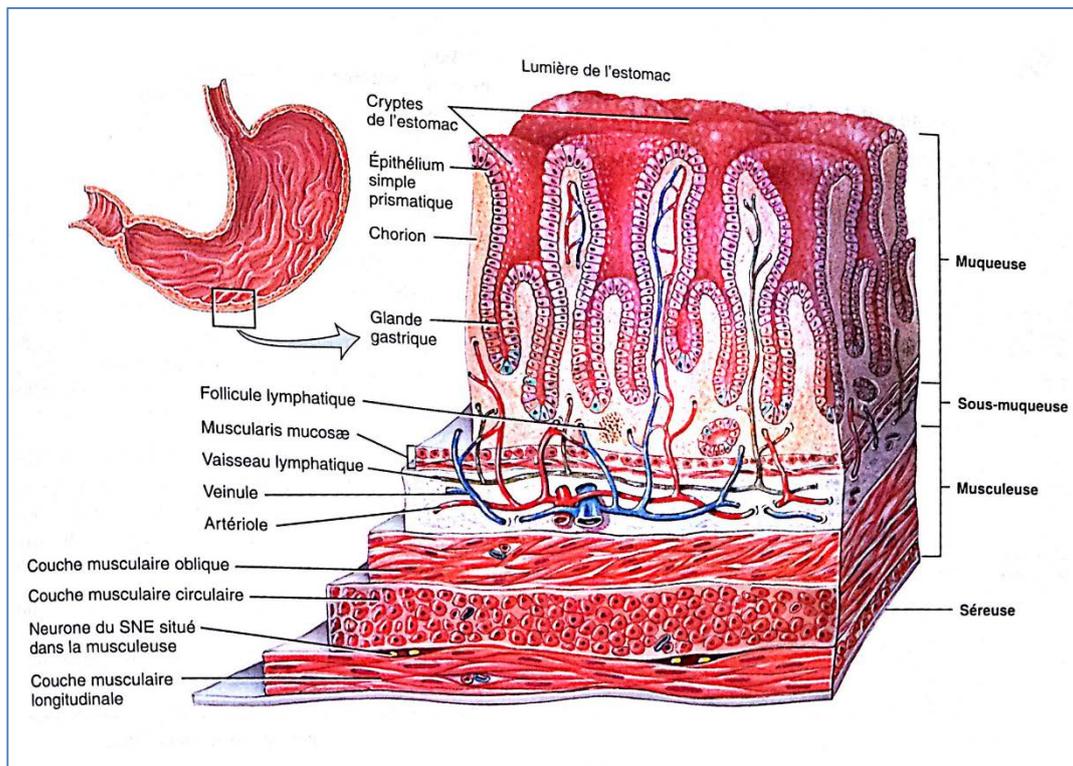


Figure 2 : Les couches tissulaires de l'estomac (Tortora et Derrickson, 2010)

I.1.2-Physiologie

I.1.2.1-Les sécrétions gastriques

Le principal rôle de l'estomac est de transformer les aliments à l'état de chyme semi liquide afin de les rendre acceptables pour l'intestin. L'agent de cette transformation est le suc gastrique, qui est sécrété par les glandes gastriques. De plus, l'estomac sécrète un mucus qui forme une couche de protection pour la muqueuse gastrique vis-à-vis de l'acidité gastrique et qui en lubrifiant les ingesta en facilitant le passage vers l'aval (Figure 03).

La muqueuse est différente dans le fundus et le corps de l'estomac et dans l'antre pylorique

-La muqueuse fundique : Elle comporte des cryptes larges et peu profondes, ces glandes sont composées de trois types de cellules :

- Les cellules principales, produisent le pepsinogène, qui est la forme inactive de la pepsine, une enzyme protéolytique. Les cellules principales se trouvent surtout dans les régions basales des glandes gastriques (Tortora et Derrickson, 2010).
- Les cellules pariétales (cellules bordantes), disséminées à travers les cellules principales, sécrètent de l'acide chlorhydrique et le facteur intrinsèque (permet l'absorption de la vitamine B₁₂ dans l'intestin grêle (Artigau, 1999).
- Les cellules endocrines peu nombreuses, les cellules D qui sécrètent la somatostatine.

-La muqueuse pylorique : Elle présente des cryptes étroites et profondes et comporte 2 types de cellules.

- Les cellules à mucus du collet, qui se trouvent dans la partie supérieure, ou « collet », des glandes, produisent un type de mucus. La fonction précise de ce mucus n'est pas encore connue (Brun et Caillaud, 2009).
- Les cellules endocrines, cellules G (sécrètent la gastrine), les cellules D (la somatostatine) (Lacour et Belon, 2015).

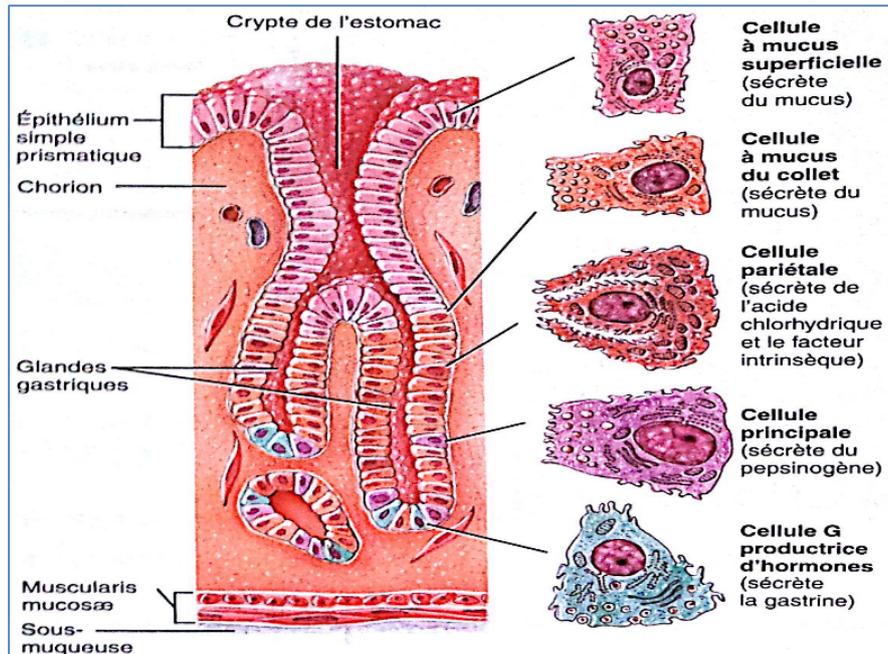


Figure 3 : Coupe transversale de la muqueuse gastrique, avec ses glandes gastriques et les types de cellules qui la composent (Tortora et Derrickson, 2010)

I.1.2.2-Le suc gastrique

Quand la nourriture atteint l'estomac, la paroi de ce dernier s'étend et le pH du contenu gastrique augmente parce que les protéines des aliments ont tamponné certains des acides gastriques. Ces changements déclenchent des influx nerveux qui stimulent l'écoulement du suc gastrique, ce dernier est un liquide incolore, limpide et acide (pH compris entre 1,5 et 2,5) contenant 7 g/l de substances dissoutes, pour moitié organiques et pour moitié minérales (Lacour et Belon, 2015).

-Les substances minérales

- L'acide chlorhydrique : sécrété dans la lumière des glandes par les cellules pariétales, ou bordantes. Il permet de tuer de nombreuses bactéries ingérées avec les aliments (Brun, 2009).
- Les bicarbonates : sécrétés par les cellules à mucus, participant à la défense de la muqueuse gastrique contre l'acidité.

-Les substances organiques

- Le mucus : sécrété par les cellules à mucus et forme à la surface de l'épithélium un film continu qui assure une protection physique et chimique contre l'acidité.

- Le facteur intrinsèque : c'est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales. Elle lie la vitamine B12 (cobalamine) et la transporte jusqu'à l'iléon, ou elle est absorbée.
- Les pepsinogènes I et II : sécrétés par les cellules principales, ce sont les formes inactives de la pepsine qui sont activées par l'acidité gastrique.
- La lipase gastrique : sécrétée par les cellules principales. Elle est active en milieu acide, et hydrolyse les triglycérides en diglycérides et acides gras.

I.1.2.3-Mécanisme de sécrétion acide

La sécrétion acide commence avec l'insertion des canalicules dans la membrane luminale des cellules pariétales et l'ouverture des canaux Cl^- et K^+ . L'augmentation de la concentration locale de K^+ active la H^+/K^+ ATPase qui permet de sécréter les protons.

Les ions H^+ sécrétés proviennent de la dissociation de H_2CO_3 formé à partir du CO_2 et de H_2O sous l'action de l'anhydrase carbonique. Les ions bicarbonates sont éliminés dans le sang en échange d'ions Cl^- au pôle basolatéral de la cellule. Ainsi, s'explique la vague alcaline postprandiale. L'arrêt de la sécrétion acide sera lié au repli dans la cellule des canalicules sécrétoires (Lacour et Belon, 2015) (Figure 4).

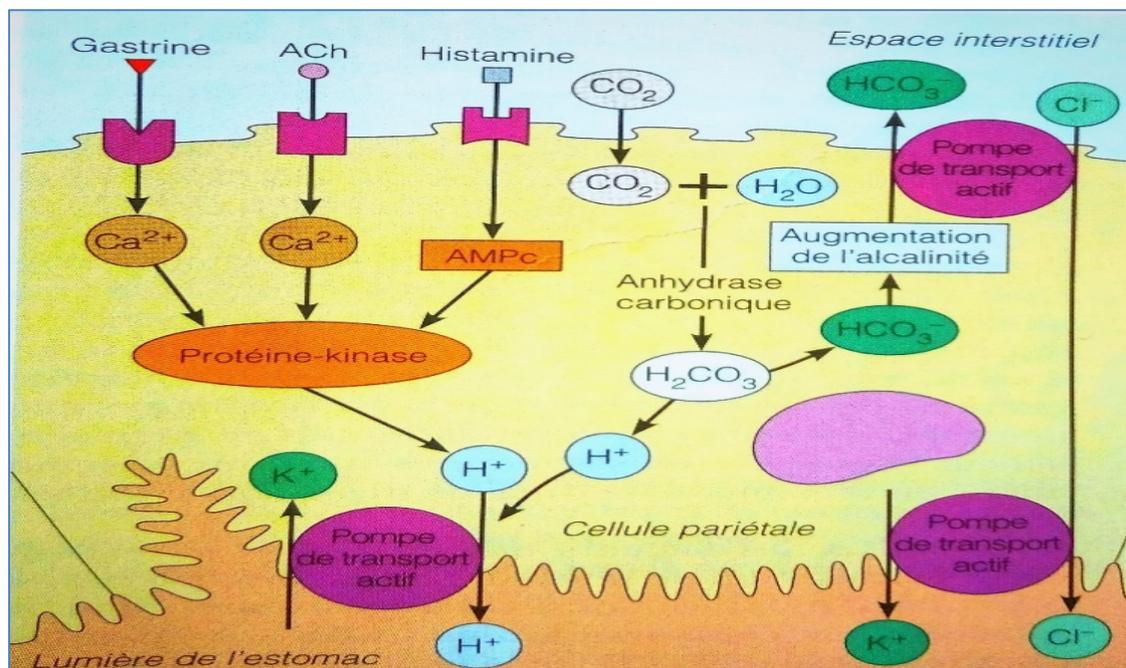


Figure 4 : Régulation et mécanismes de sécrétion de HCl (Artigau, 1999)

I.1.2.4-Régulation de la sécrétion gastrique acide

La prise alimentaire stimule la sécrétion acide de façon brutale et soutenue en plateau pendant deux heures, puis le retour à la situation basale se fait progressivement ; ce processus est aussi régi par des mécanismes nerveux et hormonaux. La sécrétion de HCl est stimulée par l'intermédiaire de trois substances chimiques qui agissent toutes par l'intermédiaire de système de seconds messagers (AMP_c et Ca^{2+}) (Marieb et Hoehn, 2010).

➤ **Les stimulants de la sécrétion gastrique**

- L'histamine : produite par les histaminocytes ou cellules entérochromaffines-like (ECL), agit par voie paracrine, en se fixant sur des récepteurs H_2 des cellules pariétales (récepteurs couplés à l'adénylcyclase) pour augmenter l' AMP_c intracellulaire.
- La gastrine : produite par les cellules G, agit par voie endocrine sur les cellules pariétales elles-mêmes et sur les histaminocytes en stimulant la libération d'histamine. Les récepteurs à gastrine sont couplés à une protéine G qui active la phospholipase C et aboutit à une augmentation du Ca^{2+} cytosolique.
- L'acétylcholine : libérée par la stimulation du nerf vague, elle agit directement sur les cellules pariétales (récepteurs M_3) et indirectement en stimulant les histaminocytes et les cellules à gastrine (Lacour et Belon, 2015).

La sécrétion acide optimale nécessite l'action synergique des trois médiateurs.

➤ **Les inhibiteurs de la sécrétion gastrique**

L'estomac et le duodénum agissent en tandem, lorsque le chyme pénètre dans le duodénum, les récepteurs de la paroi duodénale réagissent et déclenchent alors le réflexe entérogastrique qui inhibe la sécrétion gastrique (Artigau, 1999). Dont on cite :

- La **somatostatine** : élaborée par les cellules D, qui agit par voie paracrine, inhibe la sécrétion gastrique de toutes les substances.
- La **sécrétine** : agit par voie endocrine, inhibe la sécrétion et la motilité gastrique au cours de la phase gastrique de la sécrétion.
- Les **prostaglandines** : agit par voie paracrine (récepteurs couplés à une protéine G inhibitrice de l'adénylate cyclase) (Lacour et Belon, 2015).

- **Peptide inhibiteur gastrique (GIP)** : produit au niveau de la muqueuse du duodénum, inhibe la production de HCl (effet mineur).
- **Peptide intestinal vasoactif (VIP)** : produit au niveau de la muqueuse du duodénum, il inhibe la production de HCl au niveau de l'estomac (Marieb et Hoehn, 2010).

Tous agissent directement sur la cellule pariétale, il existe trois phases qui jouent un rôle dans la sécrétion gastrique comme suit :

- ❖ **Phase céphalique** : déclenchée par la pensée, la vue, l'odeur, le goût et le contact des aliments dans la bouche et l'œsophage. Il s'ensuit une stimulation de nerf vague, libérant l'acétylcholine qui augmente la sécrétion acide de l'estomac (Brun, 2009).
- ❖ **Phase gastrique** : détermine la sécrétion acide maximale, elle est déclenchée par l'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac, ou il y aura stimulation des cellules à gastrine qui est le principal médiateur. Aussi les ions H^+ stimulent la sécrétion de somatostatine ce qui inhibe la sécrétion de gastrine et d'histamine, diminuant la sécrétion du débit acide des cellules pariétales (Lacour et Belon, 2015).
- ❖ **Phase intestinale** : elle complète l'inhibition de la sécrétion acide réalisée par la somatostatine gastrique. L'arrivée dans le duodénum d'un chyme acide entraîne une sécrétion de sécrétine, de somatostatine et de GIP (peptide inhibiteur gastrique) qui inhibent, par voie endocrine, la sécrétion acide gastrique (Artigau, 1999).

I.2- L'ulcère gastrique

L'ulcère gastrique résulte de l'érosion des muqueuses atteignant surtout le corps et le fundus de l'estomac mais pouvant également survenir au niveau de l'antrum, du duodénum et de l'œsophage distal (Araujo et al., 2011).

I.2.1 Physiopathologie et étiologie de l'ulcère

L'étiologie de l'ulcère gastrique est multifactorielle (Suzuki et al., 2012). Un taux élevé de sécrétion d'acide et la diminution de la barrière muqueuse contribuent au déclenchement et à

la progression de cette maladie (Sung *et al.*, 2009). L'étiologie s'étend de l'infection par *H. pylori* au stress, à un style de vie caractéristique et aux médicaments (Levenstein et Kaplan, 1998). Les médicaments qui contribuent le plus à provoquer l'ulcère sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Chan *et al.*, 2008). La consommation de ces médicaments a montré un lien accru aux dommages de la muqueuse, les érosions et les saignements gastriques et duodénaux. Ces effets sont principalement dus à l'inhibition de la cyclooxygénase 1 (COX1) ayant pour résultat la réduction de la défense de la muqueuse ainsi que par l'inhibition de la thromboxane A₂ ce qui compromet la fonction plaquettaire et entraîne des saignements gastriques (Yuan *et al.*, 2006). Un autre mécanisme qui est bien décrit dans les dommages gastriques induits par les anti-inflammatoires non stéroïdiens est la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Takeuchi, 2012).

I.2.2-Mécanismes de protection de la muqueuse gastrique

La muqueuse de l'estomac est exposée à des conditions qui comptent parmi les plus rudes dans tout le tube digestif. En effet, le suc gastrique est un acide corrosif (la concentration des ions H⁺ dans l'estomac peut être 100 000 fois supérieur à ce qu'elle est dans le sang). Cependant, l'estomac se protège activement, car il dispose de mécanismes intrinsèques de protection contre les agents corrosifs (Marieb et Hoehn, 2010).

- La Couche de mucus : c'est la première ligne de défense de la muqueuse gastrique, composée de trois éléments (Gimenez *et al.*, 2000) :
 - Une épaisse couche de mucus riche en ions bicarbonate, qui permettent le maintien d'un pH proche de la neutralité.
 - Les cellules épithéliales de la muqueuse, reliées par des jonctions serrées, ce qui empêche le suc gastrique de s'introduire dans les couches sous-jacents.
 - Les cellules épithéliales de la muqueuse qui une fois endommagées sont rapidement éliminées et remplacées par la division des cellules souches.
- Les prostaglandines : La PGE₂ et la PGI₂ sécrétées par la muqueuse gastrique, stimulent la sécrétion de mucus et de bicarbonates ainsi favorisent le flux sanguin. Les prostaglandines inhibent la sécrétion d'acide (Gimenez *et al.*, 2000).

- Le flux sanguin : Il est essentiel pour fournir les nutriments et l'oxygène aux cellules, mais aussi pour évacuer les ions hydrogènes résiduels (Silbernalg et Lang, 2012).

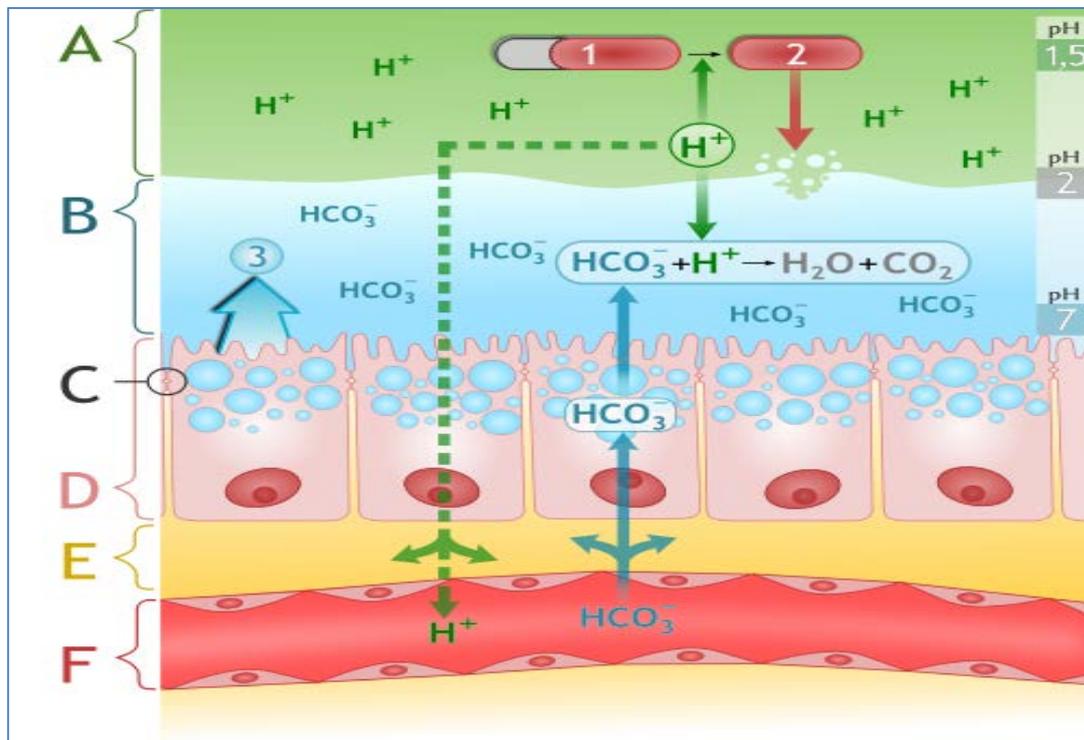


Figure 5 : Eléments de la barrière muqueuse gastrique (A : mucus, B : bicarbonates, C : jonctions serrées, D : cellules épithéliales, E : espace sous épithélial, F : flux sanguin) (Hansen *et al.*, 2011).

I.2.3- Induction de l'ulcère par les AINS

Le mécanisme d'action des AINS est basé sur l'inhibition de la synthèse des Prostaglandines (PG). Les PG sont l'un des principaux médiateurs de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre, ils sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique, la réaction est catalysée par l'enzyme cyclooxygénase (COX) (Sinha *et al.*, 2013). Il existe deux isoformes de la COX, COX-1 et COX-2, qui ont des fonctions différentes. La COX-1 est exprimée de manière constitutive et est responsable de la synthèse des Prostaglandines, qui protègent la muqueuse gastrique de l'acide sécrété, maintiennent le flux sanguin dans la muqueuse gastrique et produisent du bicarbonate. L'autre isoforme est la COX-2 est déclenchée par des dommages cellulaires, de différentes cytokines pro-inflammatoires et des facteurs tumoraux dérivés.

Il existe trois mécanismes d'induction de l'ulcère par les AINS :

- L'inhibition de la COX-1 et diminuant ainsi la concentration des PG gastroprotectrices.
- Perméabilisation membranaire, les AINS ont également un effet cytotoxique direct, indépendant de l'inhibition de l'activité de la COX, sur les cellules de la muqueuse gastrique causant des lésions et des blessures. Il a été suggéré que les AINS augmentent la perméabilisation de la membrane conduisant à une rupture de la barrière épithéliale et provoquent à la fois la nécrose et l'apoptose des cellules de la muqueuse gastrique.
- Production de médiateurs pro-inflammatoires supplémentaires. L'inhibition de la synthèse des PG par les AINS conduit à l'activation simultanée de la lipooxygénase et l'augmentation de la synthèse des leucotriènes. Ces derniers provoquent l'inflammation et l'ischémie tissulaire conduisant à des lésions de la muqueuse gastrique. Parallèlement, il y a également augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les facteurs de nécrose tumorale. Ceci entraîne l'occlusion des micro-vaisseaux gastriques conduisant à la réduction du flux sanguin gastrique et la libération des ERO.

Tous ces événements initient une phase inflammatoire du développement de l'ulcère avec le recrutement et l'activation métabolique des neutrophiles et des macrophages, libérant des cytokines pro-inflammatoires (Tnf- α et IL-1 β) et produisant des espèces radicalaires qui provoquent un stress oxydant (Fialkow et *al.*, 2007).

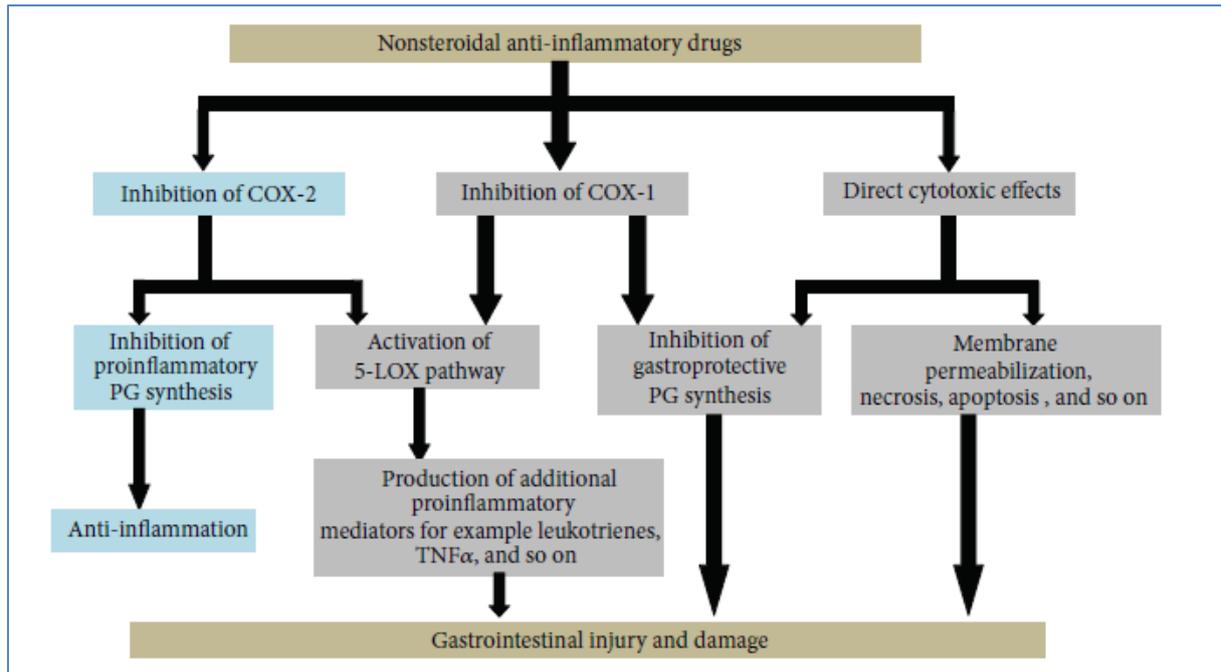


Figure 6 : Diagramme du mécanisme d'induction des ulcères gastro-intestinaux par les AINS (Sinha et *al.*, 2013).

I.3-Le stress oxydant

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des ERO et des métabolites réactifs, communément appelés oxydants, et leur élimination par des mécanismes protecteurs, désignés sous le nom d'antioxydants (Durackova, 2010). Les dommages oxydants de la muqueuse par les ERO sont parmi les facteurs principaux impliqués dans l'ulcération gastrique (Srikanta et *al.*, 2010).

Les ERO regroupent les espèces radicalaires et non radicalaires contenant de l'oxygène, les plus importants sont ceux impliqués dans plusieurs états pathologiques comme le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), le radical d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochlorique (HOCl), le radical oxyde nitrique, et le radical peroxynitrite ($\text{ONOO}\cdot$). Ce sont des espèces fortement réactives, capables d'endommager les molécules biochimiques telles que l'ADN, les protéines, les glucides, et les lipides (Surh et *al.*, 2001). Les principales sources des radicaux libres sont soit endogènes ou exogènes, elles sont résumées dans le Tableau I.

Tableau I : Les principales sources des ERO.

Sources des ERO	
Endogènes	Exogènes
<ul style="list-style-type: none"> • La mitochondrie : les fuites d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale provoque la réduction de l'oxygène moléculaire, formant ainsi le $O_2^{\cdot-}$ (Kowaltowski et <i>al.</i>, 2009). • La phagocytose • Les oxydases comme la : xanthine oxydase • Les métaux de transition • Le peroxyosome : sont une source importante de H_2O_2 qui est utilisé comme substrat par la catalase péroxydomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. (Belviranli et Gökbel, 2006) • L'exercice physique • L'inflammation • Le Choc émotionnel • L'ischémie/reperfusion • Le réticulum endoplasmique lisse : contient des catalases dont la plus connue est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi les ERO (Morel et <i>al.</i>, 1999). 	<ul style="list-style-type: none"> • Radiation ionisantes : peuvent produire le HO\cdot par radiolyse de l'eau ou les ERO via des réactions secondaires (Riley, 1994) • Cigarette et polluants industriels : sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (Bartsch et Nair, 2000 ; Bonnefont-Rousselot et <i>al.</i>, 2001). • Rayonnement UV : induisent la synthèse de radicaux libres ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}, $\frac{1}{2}O_2$) et de molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) (Ward et <i>al.</i>, 1987). • Produits chimiques & médicaments • Ozone

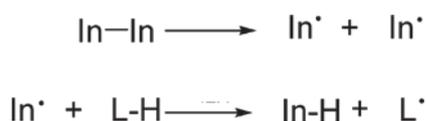
I.4-La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique se produit sur des acides gras polyinsaturés situés sur les membranes cellulaires, en réaction radicalaire en chaîne. On soupçonne le radical hydroxyle d'amorcer les ERO et d'arracher un atome d'hydrogène, produisant ainsi un radical lipidique qui est par la suite converti en diène conjugué. En outre, par addition d'oxygène, il se forme un radical peroxyde ; ce radical hautement réactif attaque d'autres acides gras formant des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) et un nouveau radical. Ainsi, la peroxydation lipidique est propagée. Un certain nombre de composés sont formés, par exemple, les alcanes, le malondialdéhyde et les isoprostanes. Ces composés sont utilisés en tant que marqueurs dans les tests de la peroxydation lipidique et ont été quantifiés dans de nombreuses maladies telles que les maladies neurodégénératives, les lésions d'ischémie-reperfusion, et le diabète (Lovell *et al.*, 1995).

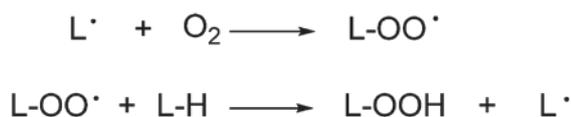
I.4.1-Mécanismes de la peroxydation lipidique

Ce processus se compose de trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

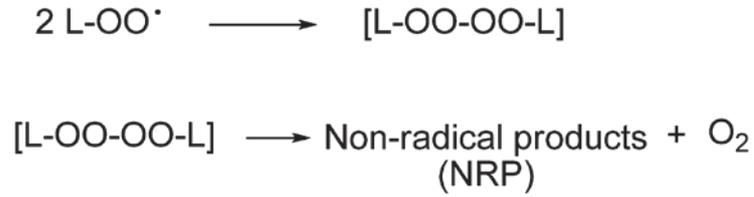
- **Initiation** : lors de cette étape des pro-oxydants comme le radical hydroxyl arrachent un hydrogène allylique formant un radical lipidique centré sur du carbone (L \cdot) (Figure 7).



- **Propagation** : Lors de cette phase, un radical lipidique (L \cdot) réagit rapidement avec l'oxygène pour former un radical lipidique peroxydé (LOO \cdot). qui arrache un atome d'hydrogène d'une autre molécule lipidique générant un nouveau (L \cdot) (qui continue la réaction en chaîne) et des lipides hydroperoxydes (LOOH).



- **Terminaison :** Dans la réaction de terminaison, des antioxydants comme la vitamine E donnent un atome d'hydrogène aux espèces LOO· et forment un radical vitamine E correspondant qui réagit avec un autre LOO· formant des produits non radicalaires.



* In, Initiator; L, Lipid

Une fois que la peroxydation lipidique est initiée, une propagation de réactions en chaîne se déroule jusqu'à ce que les produits de terminaison soient réduits (Ayala et al., 2014).

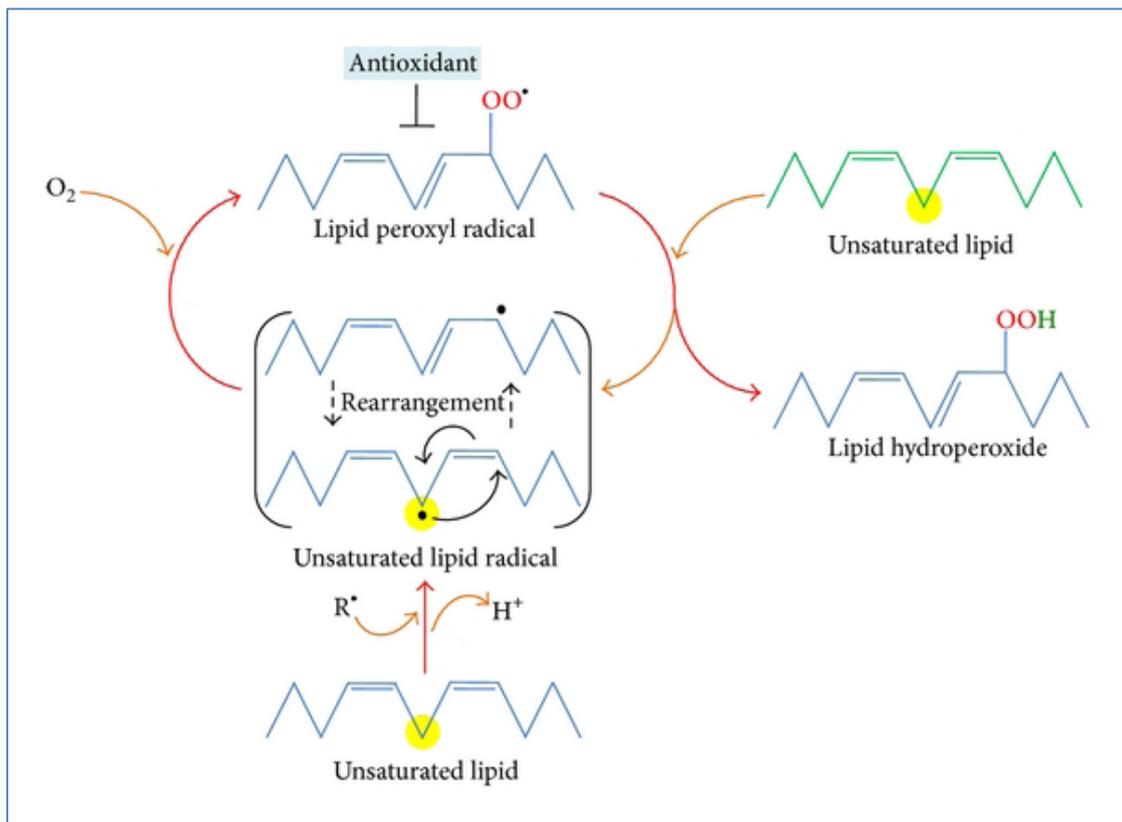


Figure 7 : Processus de la peroxydation lipidique (Ayala et al., 2014).

I.4.2-Les produits de la peroxydation lipidique

Les principaux produits primaires de la peroxydation des lipides sont des hydroperoxydes lipidiques (LOOH). Parmi les nombreux aldéhydes différents qui peuvent être formés en tant que produits secondaires lors de la peroxydation des lipides, le malondialdéhyde (MDA), le propanal, hexanal, et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) (Esterbauer et *al.*, 1982; Poli et *al.*, 1985), le MDA semble être le produit le plus mutagène de la peroxydation des lipides, alors que 4-HNE est le plus toxique (Esterbauer et *al.*, 1990).

I.4.3-Méthodes d'évaluation de la peroxydation lipidique

Le MDA a été largement utilisé pendant de nombreuses années en tant que biomarqueur pour l'évaluation de la peroxydation lipidique des acides gras oméga-3 et oméga-6 en raison de sa réaction rapide avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Pryor, 1989; Esterbauer et Cheeseman, 1990). Le test de TBA est fondé sur la réactivité du TBA vers le MDA pour donner un produit chromogène rose intensément coloré. Ce test a été utilisé pour la première fois par les chimistes dans le domaine agro-alimentaire pour évaluer automatiquement la dégradation par oxydation de graisses et des huiles (Sinnhuber, 1958). Cependant, la réaction du TBA est non spécifique ce qui a conduit à une importante controverse sur son utilisation pour la quantification du MDA à partir des échantillons *in vivo*. Plusieurs technologies pour la détermination du MDA libre, tels que la chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS / MS), la chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse (LC-MS / MS), et plusieurs autres méthodes ont été développées au cours de la dernière décennie (Giera et *al.*, 2012).

I.4.4-Formation et métabolisme du MDA

Le MDA peut être généré *in vivo* par décomposition de l'acide arachidonique (AA) (figure 08) et les grands PUFA en tant que produit secondaire au cours de la biosynthèse du thromboxane A2 (TXA2) et de l'acide 12-l-hydroxy-5,8,10-heptadécénoïque (HHT) (voie bleue), ou par des processus non enzymatiques par endoperoxydes bicycliques produites au cours de la peroxydation des lipides (voie rouge). Une fois formé, le MDA peut être métabolisé par voie enzymatique (voie verte). Les enzymes clés impliquées dans la formation et le métabolisme du MDA : cyclooxygénases (1), la prostacycline hydroperoxydase (a2), thromboxane synthase (3), l'aldéhyde déshydrogénase (4), décarboxylase (5), l'acétyl-CoA synthase (6), et le cycle de l'acide tricarboxylique (7) (Ayala et *al.*, 2014).

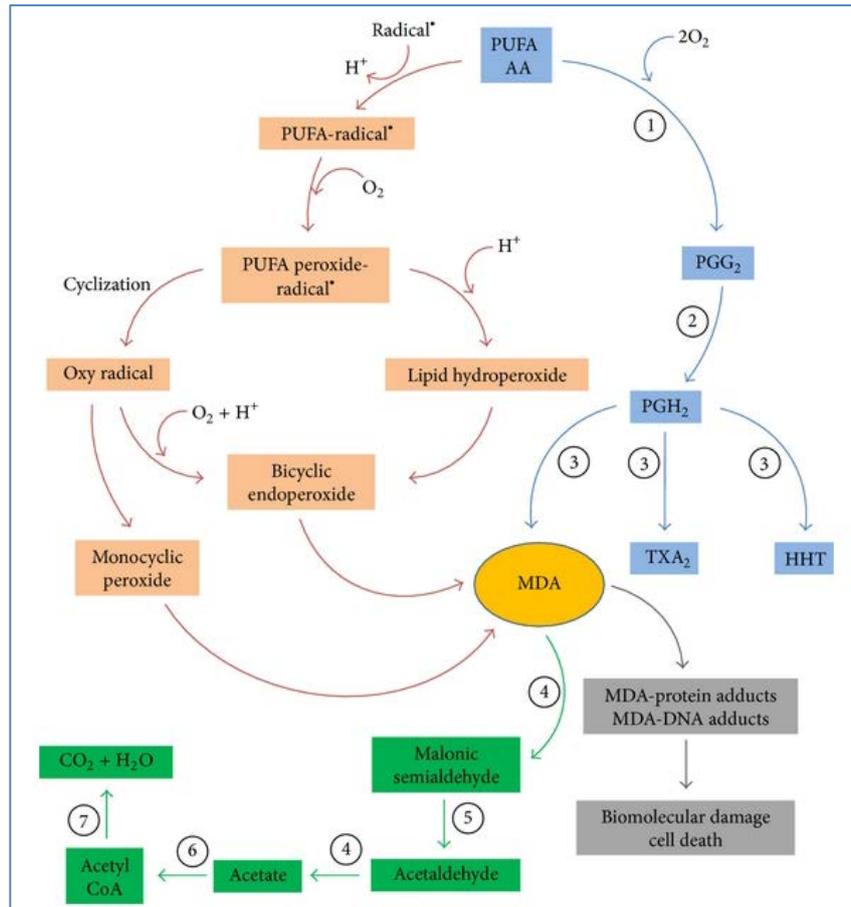


Figure 8 : Formation et métabolisme du MDA (Ayala et al., 2014).

I.5-LES ANTIOXYDANTS

Les réactions d'oxydation sont cruciales pour la vie aérobie, mais non contrôlée la génération des ERO est dommageable. Bien que les ERO sont générées en continu, le corps dispose d'un système pour se défendre contre les effets nocifs des ERO, appelé le système de défense antioxydant, qui comprend à la fois des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques (Zapolska-Downar et al., 2005).

I.5.2- Antioxydants enzymatiques

Il y a plusieurs systèmes d'enzymes qui catalysent des réactions pour neutraliser les ERO. Ces enzymes comprennent la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et réductase, et la catalase (voir figure 9) (Rahman, 2007).

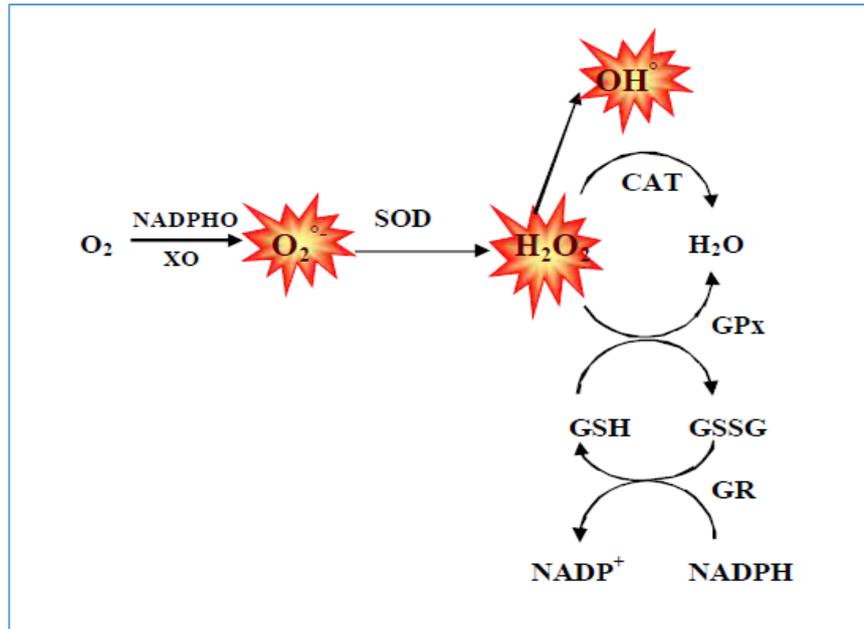


Figure 9 : Schéma des défenses antioxydantes (Mates et al., 1999).

I.5.3- Antioxydants non enzymatiques

Ils existent de nombreux réducteurs endogènes participant à la protection de l'organisme contre les ERO, les plus importants étant le glutathion, la bilirubine, l'acide urique, le coenzyme Q, les oestrogènes, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoiq. La principale source d'approvisionnement de l'organisme en antioxydants exogènes sont les aliments soit d'origine animale, soit d'origine végétale. Les plus connus sont la vitamine E, la vitamine C et les polyphénols (Rahman, 2007).

I.6-LA THERAPEUTIQUE DE L'ULCERE

I.6.1- Les mécanismes physiologiques anti-ulcère

➤ Les composants sulfhydryles endogènes non-protéiques (NP-SH)

De plus en plus de preuves indiquent que les sulfhydryles endogènes (SH) jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité gastro-duodénale et dans la protection contre les lésions induites par voie chimique dans les cellules, les tissus et les organes (Szabo, 1981). La concentration relativement élevée de sulfhydryle non-protéique (NPSH) qui est principalement le glutathion réduit (GSH, γ -glutamyl-cystéinyl glycine) en plus de la cystéine (CSH), le coenzyme A et d'autres thiols dans la muqueuse gastrique indiquent également leurs implications possibles dans la gastroprotection (Miller, 1985).

➤ **Les protéines de choc thermique (HSP)**

Elles ont été mises en cause comme un facteur supplémentaire utilisé comme mécanismes de défense de l'estomac au niveau intracellulaire. HSP₇₀ est généralement considérée comme un chaperon moléculaire majeur pour accélérer la récupération cellulaire de différents stimuli de faire face à des protéines dépliées ou dénaturées, à travers laquelle HSP₇₀ peut atteindre efficacement la défense de la muqueuse de l'ulcère ou de l'inflammation (Liu et *al.*, 2011).

➤ **Antioxydants cellulaires**

A concentration relativement faible, ils peuvent entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats en synergie avec les systèmes de défense cellulaires (Droge, 2002).

I.6.2- Les traitements médicamenteux anti-ulcère

➤ **Les antiacides**

Ils ont un pouvoir tampon qui neutralise les protons. Ils protègent la muqueuse gastrique, soit par pouvoir couvrant, soit par modification du mucus gastrique, contre l'action de HCl, se sont des médicaments à base d'aluminium et de magnésium (Gimenez et *al.*, 2000).

➤ **Les anti-sécrétoires**

Les IPP sont des pro-médicaments inactifs (oméprazole), Les IPP vont jusqu'au niveau des cellules pariétales par voie sanguine. Ils bloquent les pompes à protons, en se fixant de façon covalente par formation d'un pont disulfure avec l'ATPase, ce qui fait une inhibition irréversible de la pompe à protons. Les antagonistes des récepteurs H₂ à l'histamine (anti-H₂) (cimétidine), ainsi que les analogues des prostaglandines E₁ (Misoprostol) (Gimenez et *al.*, 2000).

➤ **Les pansements gastriques (sucralfate)**

Sont des préparations médicamenteuses administrées par voie orale afin de protéger la muqueuse gastrique lésée ou risquant de l'être. Elle sert de rempart entre la muqueuse lésée et les sucs digestifs (dont l'acide chlorhydrique), elles agissent par effet mécanique en formant un gel venant tapisser la surface du contenu de l'estomac (Lechat et *al.*, 1982).

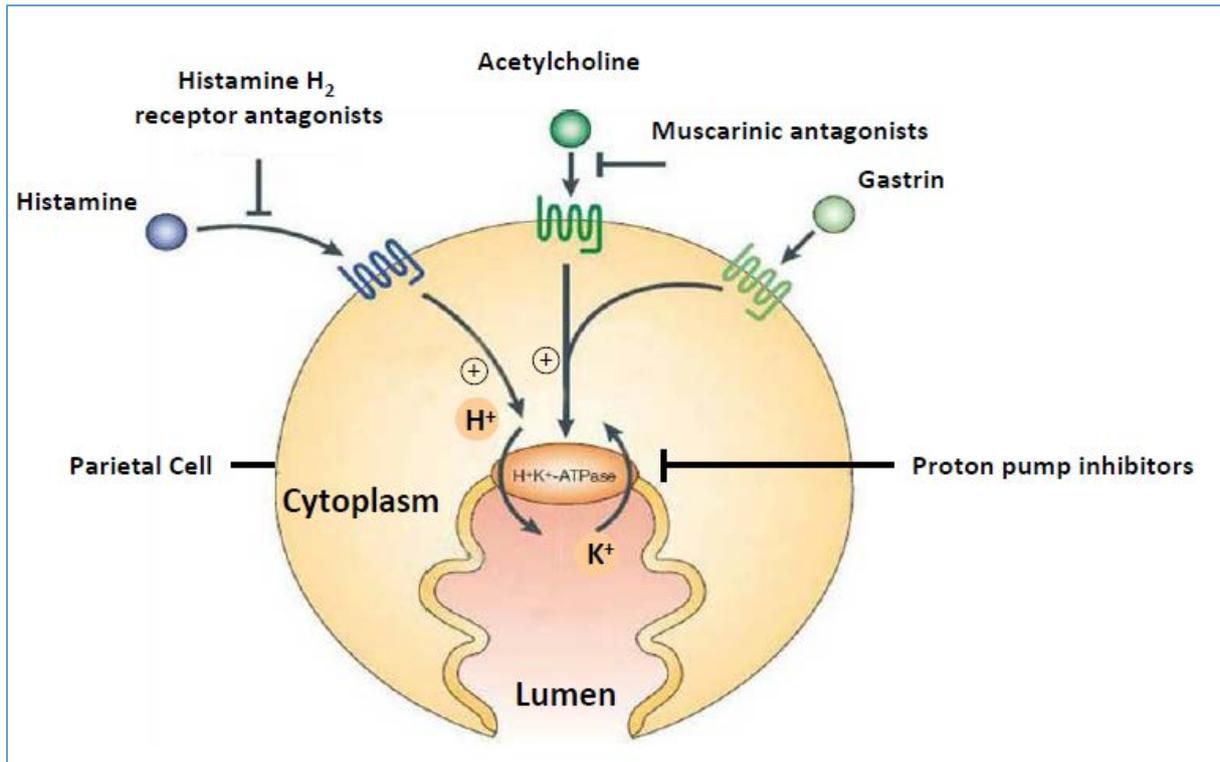


Figure 10 : Inhibition de la pompe à protons (Olbe et *al.*, 2003).

➤ Eradication de *H. pylori*

Repose sur une trithérapie, capable d'éradiquer dans 90% des cas *H. pylori*, un inhibiteur de la pompe à proton (IPP) et une bi thérapie antibiotique.

I.6.3- La phytothérapie et l'ulcère

C'est le traitement curatif ou préventif des maladies, et selon l'OMS cette dernière est considérée comme médecine alternative dans le traitement de plusieurs maladies dont l'ulcère gastrique. La phytothérapie est basée sur l'utilisation des extraits de plantes. Les polyphénols représentent la classe la plus étudiée et plusieurs effets thérapeutiques leurs ont été attribués (Fintelmann et weiss, 2004).

I.6.4- Les polyphénols

Ce sont les métabolites secondaires des plantes et sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou l'agression par des microbes pathogènes. D'un point de vue chimique, ils se définissent par leur cycle benzénique porteur d'au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester...). Les polyphénols ont été classés selon leur source d'origine, fonction biologique et leur structure

chimique (Kanti et Rizvi, 2009 ; Tsao, 2010). Le terme de «composés phénoliques» se rapporte ainsi uniquement aux molécules issues de la voie du shikimate ou des poly- β -cétoesters (polyacétates) (Macheix et *al.*, 2005).

Les classes principales incluent les acides phénoliques, flavonoïdes, et les tannins, ces derniers forment le groupe des composés phytochimique le plus important des plantes (Beta et *al.*, 2005).

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Guignard, 1996).

Tous les flavonoïdes dérivent d'un squelette à 15-carbone ($C_6-C_3-C_6$). Leur réaction biosynthétique cruciale est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec une molécule de p-coumaroyl-CoA pour donner un intermédiaire de chalcone, les chalcones agissent en tant que précurseurs pour la vaste gamme des dérivés flavonoïdes trouvés dans tout le règne des plantes. Parmi lesquels se trouvent : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanes, les flavan-3-oles, les flavylum, les chalcones, les aurones, les isoflavones... (de Lira Mota et *al.*, 2009).

- **Phénols simples**

Ces phytochimiques sont divisés en deux types principaux, acide benzoïque et dérivés acides cinnamiques de squelette C_1-C_6 et C_3-C_6 respectivement. Tandis que les fruits et les légumes contiennent beaucoup d'acides phénoliques libres. Ces acides phénoliques peuvent seulement être libérés ou hydrolysés par l'hydrolyse acide ou alcaline, ou par des enzymes (Psotová et *al.*, 2003; Tsao, 2010).

- **Les tannins**

Les tannins sont de poids moléculaire s'étendant entre 500 et 3000 Da. Ils forment des complexes avec les protéines, les alcaloïdes et la gélatine insolubles dans l'eau. Ils sont responsables du goût astringent de beaucoup de fruits et légumes, causant la précipitation des glycol-protéines salivaires et réduisant la lubrification buccale (de Jesus et *al.*, 2012). Ils sont

divisés en deux groupes, les tannins hydrolysables (esters d'acide gallique) et condensés (glycosides d'acide éllagique) (de Jesus et *al.*, 2012).

➤ **Activités biologiques des composés phénoliques**

Les polyphénols sont perçus comme des molécules « signal » qui pourraient stimuler les défenses antioxydantes d'une part via l'inhibition des activités enzymatiques pro-oxydantes et d'autre part via la modulation des voies de signalisation intracellulaires contrôlant l'expression des enzymes anti-oxydantes, parmi lesquelles des activités anti-inflammatoires, antioxydants, anti-angiogéniques, antiprolifératives (Morand et Milenkovic, 2014).

Les polyphénols peuvent protéger les constituants des cellules contre des dommages oxydants et, en conséquence, pour limiter le risque des diverses maladies dégénératives (Kanti et Rizvi, 2009 ; Tsao, 2010).

• **Activité anti-oxydante**

Les polyphénols sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels.

Les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxydes (ROO•), les alkoxydes (RO•).



X• : Représente une des ERO

Ar-O• : radical aryloxyle qui, s'il s'agit d'un noyau catéchol, peut réagir avec un autre radical pour former une *o*-quinone plus stable (Figure 11).

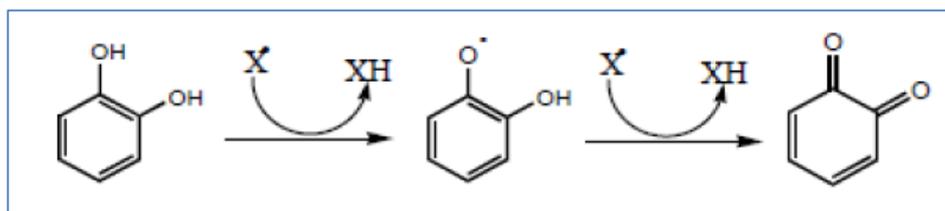


Figure 11 : Piégeage des ERO (X•) par un noyau catéchol.

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical $\text{OH}\cdot$ par la réduction de H_2O_2 lors de la réaction de Fenton (Pietta, 2000 ; Heim et *al.*, 2002) (figure 12).

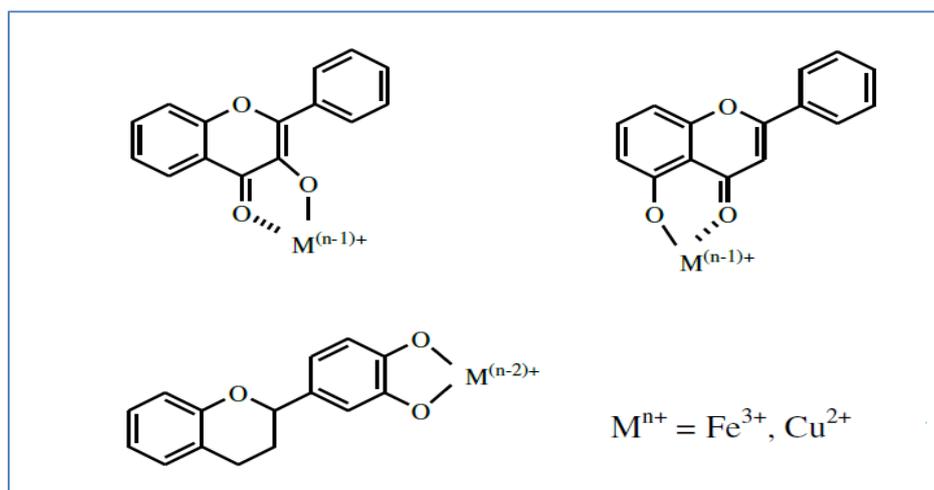


Figure 12 : Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Dangles, 2006).

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété d'enzymes pro-oxydantes (Dangles, 2006), via des interactions de Van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques) (Havsteen, 2002).

- **Activité anti-inflammatoire**

Les Cyclooxygénases et lipooxygénases jouent un rôle important en tant que médiateurs inflammatoires. Des composés phénoliques interfèrent avec la voie des cyclooxygénase et 5-lipoxygénase. Les flavonoïdes inhibent la biosynthèse d'eicosanoids, tel que les prostaglandines (Nijveldt et *al.*, 2001) et inhibent l'activation de $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ et/ou Stat-1 , qui sont susceptible de réguler la production de médiateurs inflammatoire en plus des iNOS (Hamalainen et *al.*, 2007).

- **Activité gastro protectrice**

Les polyphénols sont reconnus pour leur forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques, tel que les propriétés anti acide/anti peptique, gastro-protectrices et/ou d'anti-ulcère (Borrelli et Izzo, 2000).

Le mécanisme le plus important de l'action responsable de l'activité anti-ulcère des flavonoïdes est leurs propriétés antioxydantes (garcinol, la rutine et la quercétine), qui implique la réduction des radicaux libres, la chélation des ions et des métaux de transition, l'inhibition des enzymes d'oxydation, l'augmentation des antioxydants protéiques et non protéiques et la réduction de la peroxydation lipidique.

Aussi, ils protègent la muqueuse gastro intestinal contre les lésions produites par divers modèles expérimentaux de l'ulcère et contre différents agents nécrotiques. La quercétine a révélé un mécanisme anti sécréteur d'acide gastrique, antihistaminique, bloque la pompe à protons H^+/K^+ et inhibe la croissance de *H.pylori* (de Lira Mota et *al.*, 2009 ; Dryden et *al.*, 2006).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1-MATERIEL

II-1-1-MATERIEL VEGETAL

Nous nous sommes penchés sur la valorisation de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula*, une plante médicinale qui possède une grande réputation dans la médecine traditionnelle en Algérie.

II-1-1-1-Taxonomie

➤ **Systématique :**

Règne : Végétal

Division : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Ranunculales

Famille : Ranunculacées

Genre : *Clematis*

Espèce : *Clematis flammula*



Figure 13 : Photographie originale de *Clematis flammula*.

➤ **Description :**

Appelée clématite flammette, clématite brulante ou clématite odorante, Virgin's bower en anglais, ou encore Azenzou en kabyle et Nard barda ou Yasmine bari en arabe.

C'est une plante ligneuse volubile : ses tiges sarmenteuses, grêles, rampantes ou grimpantes s'allongent parfois jusqu'à 5 m, tandis que ses feuilles s'accrochent en s'enroulant autour du moindre support qu'elles frôlent. Les feuilles de la clématite flammette sont composées de 3 à 7 folioles étroites, portés par de longs pétioles.

Les fleurs sont très nombreuses, disposées en panicules lâches. La fleur, de 3 cm, est composée de 4 à 5 sépales pétaloïdes blancs, et hérissée de nombreuses étamines blanches.

La plante est hermaphrodite, de juin à août, ses fleurs odorantes forment des bouquets et plusieurs pistils évoluent en un fruit sec : akène.

Le nom d'espèce de cette clématite, *flammula*, signifie flamme, fait référence à la sensation piquante que procurent les feuilles lorsqu'on les goûte. C'est d'ailleurs un bon critère pour différencier cette espèce (Beloued, 1998).

➤ Répartition

On la rencontre souvent dans les lieux incultes de la région méditerranéenne, dans les milieux chauds et caillouteux, du Portugal jusqu'en Perse.

En Algérie, elle peuple les maquis du nord : au sahel littoral oranais, littoral algérois, hauts plateaux oranais et constantinois et notamment en Kabylie (Medjahdi et *al.*, 2009).

II-1-1-2-Usage en médecine traditionnelle

Les espèces de *Clematis* étaient autrefois utilisées comme un remède pour les maladies vénériennes (syphilis).

Extérieurement, elles sont utilisées pour traiter les maladies chroniques de la peau. En outre, elles sont utilisées pour le traitement de la goutte, des rhumatismes et des troubles osseux. Les feuilles sont utilisées comme antipaludéen, antidote des morsures de serpent, contre la dysenterie et comme diurétique. Elles sont aussi utilisées comme un cataplasme pour traiter des cloques et les plaies purulentes. C'est également un remède contre la douleur et la fièvre, les infections oculaires, les symptômes blennorragiques, et la varicosité (Yesilada et Kupeli, 2006).

Il a été rapporté que les mendiants dans la Rome antique frottaient leurs mains avec des jus de cette espèce de *Clematis* pour provoquer des cloques qui se forment sur leurs mains afin d'évoquer plus de compassion quand ils allaient demander de l'argent (Al-Taweel, 2007).

II-1-1-3-Les études antérieures

Les extraits bruts de différentes parties des plantes du genre *Clematis* ont démontré diverses activités microbiologiques comme anti-fongique, anti-bactérienne, anti-gonorrhéique et possèdent une activité contre les protéases du VIH-1 recombinant (Al-Taweel, 2007).

L'activité anti-inflammatoire quant à elle s'est traduite par l'inhibition des activités des COX-1, COX-2 et 5-LOX, ainsi la tige de *C. chinensis* est utilisée dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres états inflammatoires à travers l'inhibition de la COX-1.

L'administration de *Clematis mandshurica* a considérablement réduit la prolifération des synoviocytes et inhibe la production de facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), et l'interleukine-1 (IL-1) par les synoviocytes. Cette espèce a augmenté de manière significative l'expression de l'ARNm de l'IL-10 dans les synoviocytes des rats atteints d'arthrite adjuvante (Al-Taweel, 2007).

Les extraits de feuilles de *Clematis flammula* possèdent un potentiel antioxydant significatif qui est corrélé avec la teneur en phénols. Ainsi, elle représente une source peu coûteuse de molécules anti-oxydantes avec une faible activité cytotoxique. Les composés polaires et apolaires contenus dans l'extrait éthanolique semblent agir en synergie avec des agents chimio-thérapeutiques et se sont révélés être des agents potentiellement anti-cancéreux (Atmani et al., 2011).

II-1-1-4-Composition chimique

Il est rapporté dans la littérature que le genre *Clematis* est une source riche en triterpénoïdes saponins, ranunculine et ses dérivés, flavonoïdes et sucres. La Protoanémone, un dérivé de l'hydrolyse de la ranunculine, est une substance acre isolée de *C. flammula* qui provoque une irritation de la peau (Al-Taweel, 2007).

Les études précédentes ont également déterminé le taux de composés phénoliques contenus dans les feuilles de *Clematis flammula* et ont conclu qu'elles sont riches en tannins et pauvres en flavonoïdes (Atmani et al., 2011).

II-1-2- ANIMAUX ET CONDITIONS D'ELEVAGE

Des souris mâles albinos de type NMRI, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, dont le poids corporel varie entre 25 et 30g, ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité anti-ulcère de l'extrait éthanolique de feuilles de *Clematis flammula*. Les souris ont été gardées au niveau de l'animalerie de l'université A. Mira de Bejaia (Figure 14).



Figure 14 : Photographie originale des souris albinos.

Les souris ont été placées dans des cages, et la salle est maintenue à une température ambiante comprise entre (25 - 27° C), et un cycle de lumière de 12h par jour.

Les souris ont été nourries par une alimentation de type bouchon et ont constamment eu libre accès à l'eau potable (Figure 15).



Figure 15 : Souris au sein de l'animalerie (photographie originale).

II-1-3-MATERIEL DE LABORATOIRE

➤ Produits chimiques

Eau physiologique (NaCl 0,9%) ; Chloroforme ; CMC (Carboxy Méthyl Cellulose), acide acétique, indométacine, tampon phosphate (K_2HPO_4), TBA (Thio Barbiturique Acide), butanol pyridine (butanol-1-ol : $C_4H_{10}O$) (pyridine : C_5H_5N), Misoprostol (gélule de 20mg).

➤ Autres matériels

Plaque agitatrice (VELP) ; vortex (VLEP); loupe binoculaire (CARL ZEISS 0,8X10); balance de précision (RADWAG) (min 10mg – max 220g) et balance (KERN) (max 510g); pH mètre (HANNA) instruments; homogénéisateur (Heidolph) ; centrifugeuse (SIGMA); bain marie (memmert); spectrophotomètre (SHIMADZU); Appareil photo (SONY X16 MPixels); verrerie (pilon, mortier, verre de montre, bécher); kit de dissection; et sonde de gavage.

II-2-METHODES

II-2-1-Préparation des extraits de feuilles *Clematis flammula*

- **Récolte**

Les feuilles *Clematis flammula* ont été récoltées en mai 2015, dans la forêt Tizi Neftah cis à Amizour, wilaya de Bejaia.

- **Séchage**

Les feuilles ont été séchées à température ambiante (25 à 28°C) et laissées à l'ombre, puis mises dans l'étuve à 40°C pour enlever toute trace d'humidité.

- **Broyage et tamisage**

Ces dernières, ont été broyées avec un broyeur électrique (KIKA labortechnik M20), et tamisés pour donner une poudre très fine (< 63µm) à partir de laquelle l'extraction a été réalisée.

- **Extraction**

L'extraction des extraits bruts a été réalisée en utilisant l'éthanol à 96% comme solvant avec une proportion de 1:4 (m/v), le tout a été macéré pendant 24h puis décanté durant 24h à l'abri de la lumière. Le surnageant a été récupéré dans des cristalloirs et laissé séché à l'air libre jusqu'à obtention d'un résidu sec de poids stable. Les extraits ont été conservés dans des flacons en verre hermétique à - 4°C afin de préserver tous les principes actifs de la plante.

II-2-2-Traitement des animaux et induction d'ulcère par l'indométacine

Principe

Pour mettre en évidence l'activité anti-ulcère de l'extrait éthanolique de *C. flammula*, le model expérimental d'ulcère gastrique induit par l'administration intra gastrique de dose toxiques d'indométacine a été sélectionné. L'indométacine est un inhibiteur non-sélectif de la cyclooxygénase, qui est indirectement responsable de la surproduction des leucotriènes et des 5-lipoxygénases. L'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines mènent

à une diminution de la gastro-protection, une augmentation de la sécrétion acide, et l'exacerbation des ulcères chez les animaux d'expérience (Oliveira et *al.*, 2014).

L'indométacine cause également la génération des métabolites réactifs de l'oxygène (tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, et le radical d'hydroxyle), qui endommagent le tissu gastrique et cause la formation d'ulcère, La pathogénie des lésions de la muqueuse gastrique par l'indométacine est associée à une peroxydation lipidique accrue (Jana et *al.*, 2005).

L'extrait à effet gastro-protecteur va réduire les niveaux de MDA un marqueur de la peroxydation lipidique. Le test MDA est employé comme indicateur de stress oxydant dans les cellules et les tissus.

La méthode la plus commune de mesurer MDA est basée sur la réaction à de l'acide thiobarbiturique (TBA). L'analyse réactive des substances d'acide thiobarbiturique (TBARS) est la méthode colorimétrique largement répandue pour l'évaluation quantitative des produits lipidiques (Jetawattana, 2005).

Protocole

La méthode suivie est celle de Djahanguiri, (1969) in Devaraj and Krishna (2013) avec quelques modifications.

Au total 56 souris ont été réparties en 8 groupes avec 7 souris pour chaque groupe selon le tableau II.

Tableau II : Répartition des différents lots selon le type du traitement administré.

Groupe	Traitement
Véhicule	CMC 0,8 % Eau physiologique (NaCl à 0,9 %)
Indométacine	CMC 0,8 % Indométacine à 25 mg/kg
Test 25	Extrait à 25 mg/kg Indométacine à 25 mg/kg

Test 50	Extrait à 50 mg/kg Indométacine à 25 mg/kg
Test 100	Extrait à 100 mg/kg Indométacine à 25 mg/kg
Test 200	Extrait à 200 mg/kg Indométacine à 25 mg/kg
Misoprostol	Indométacine à 25 mg/kg Misoprostol à 200 µg/kg

Les souris ont été privées de nourriture 12h avant le traitement et ont été privées d'eau 1h avant tout traitement.

Les souris des différents groupes, ont été pesées et marquées avant toute administration.

L'extrait des feuilles de *C. flammula a* été dissous dans de la carboxyméthylcellulose (CMC) à 0,8 % et administré par voie intra-gastrique une heure avant le traitement avec de l'indométacine, dissous dans la CMC (25ml d'indométacine dans 10ml de CMC) (Figure 16).



Figure 16 : Photographie originale de la voie d'administration (Gavage intra-gastrique).

II-2-3-Sacrifice des animaux

Quatre heures après le traitement des différents groupes, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale sous anesthésie au chloroforme.

Les estomacs ont été prélevés suite à une dissection ventro-médiane, puis ouverts selon la grande courbure et lavés dans une solution saline froide et enfin étalés sur un verre de montre pour mieux observer les lésions formées. Les observations ont été réalisées à l'œil nu et à l'aide d'une loupe binoculaire à un agrandissement de (10X0.8). Les photographies ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique et les estomacs ont été ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation (Figure 17).

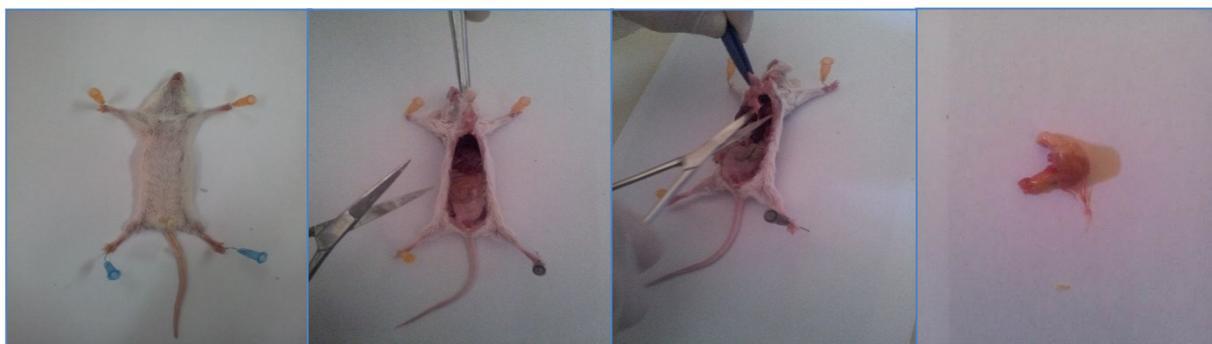


Figure 17 : Photographie originale des étapes de dissection des souris

II-2-4-Broyage des estomacs

Les estomacs ont été pilés dans un mortier avec un pilon avec l'ajout de tampon phosphate (pH 7,4), puis broyés à l'aide d'un homogénéisateur (Heidolph : SilentCrusher S).

Les homogénats ont été centrifugés à 1000 g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont été récupérés puis conservés à -80 °C dans des eppendorfs jusqu'à utilisation.

II-2-5-Evaluation de l'activité anti-ulcère de l'extrait

Les échantillons d'estomacs ont été pris en photo et enregistré sur ordinateur pour être analysés par la suite.

Le logiciel image J a été utilisé pour évaluer l'action inhibitrice de l'extrait sur l'ulcère provoqué par l'indométacine chez les souris, en mesurant les surfaces des zones lésées.

Les résultats obtenus nous ont permis de calculer deux paramètres différents :

- Le pourcentage d'ulcération a été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'ulcération} = (\text{surface totales des lésions} / \text{surface totale de l'estomac}) * 100$$

- Le pourcentage de protection ou d'inhibition de l'ulcère pour chaque groupe traité a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = ((U_{Sc} - U_{St}) / U_{Sc}) * 100$$

U_{Sc}: Surface ulcérée du contrôle.

U_{St}: Surface ulcérée du test (Zakaria *et al.*, 2011).

II-2-6. Détermination du taux des MDA

Le taux de lipides peroxydés est estimé par le test de l'acide thiobarbiturique (TBA), le protocole utilisé pour notre étude est inspiré de la méthode de Ohkawa *et al.* (1979) avec quelques modifications.

Principe

Le malondialdéhyde (MDA) est un sous-produit de peroxydation d'acides gras polyinsaturés, il est employé comme indicateur du stress oxydant dans les cellules et les tissus. La méthode la plus commune de dosage des MDA est basée sur la réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA), où 1 molécule de MDA réagit avec 2 molécules de TBA dans un milieu acide et à haute température (90-100°C) donnant un adduit rose, qui peut être extrait dans des solvants organiques tels que le butanol et mesuré par fluorométrie ou par spectrophotométrie en utilisant la longueur d'onde 532nm (Jetawattana, 2005) (Figure 18).

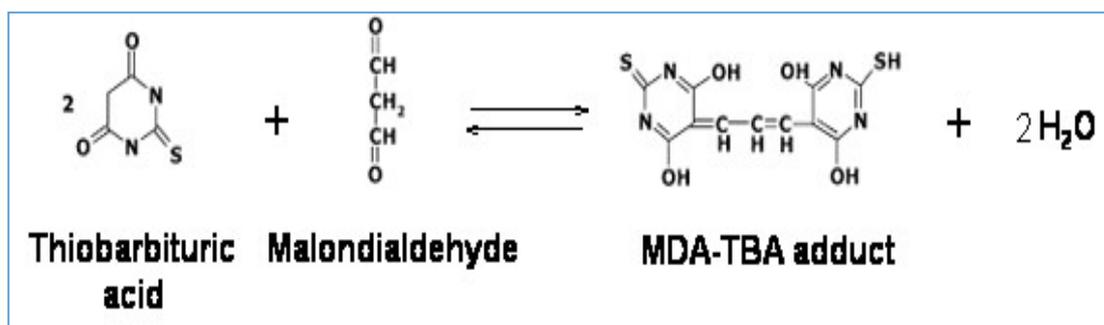


Figure 18 : Réaction de l'acide thiobarbiturique avec le MDA (Jetawattana, 2005).

Protocole

Après broyage des estomacs et leur centrifugation, le surnageant ainsi obtenu a été récupéré et utilisé pour l'évaluation de l'effet inhibiteur de l'extrait contre la peroxydation lipidique induite par le stress oxydant provoqué par l'indométacine.

Dans des tubes, 0,1 ml de l'homogénat ont été additionnés de SDS (8,1 %) et un mélange d'acide acétique (20 %) et TBA (1 %), 0,75ml d'acide acétique, dont le pH a été ajusté à 3,5 par une solution de NaOH (2 M), puis un volume d'eau distillée a été ajouté pour avoir un volume final de 2 ml. Le blanc a été préparé suivant le même protocole mais sans l'homogénat.

Les tubes ont été aussi tôt fermés puis légèrement agités, et ensuite mis dans un bain-marie à 95°C sous une constante agitation pendant 60 min. Dès leur sortie du bain-marie, les tubes ont été immédiatement placés dans un bain d'eau froide afin d'arrêter la réaction. Après refroidissement, un mélange de n-butanol et pyridine (15/1 : v/v) et d'eau distillée ont été ajoutés, et les tubes ont été énergiquement agités pendant une minute environ, puis centrifugés à une vitesse de 4000 g pendant 10 min.

L'absorbance du surnageant a été mesurée à 532 nm. La conversion de l'absorbance mesurée en équivalents de MDA (nmol/ mg de tissu) est obtenue en utilisant la courbe en utilisant le TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) comme standard.

II.2.7 Analyses statistiques

Les résultats de l'ensemble des tests réalisés sont exprimés en moyenne \pm SEM (n= 8). Les analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.0. Le test Anova univarié (one-way Anova), suivi du test de Dunnett, afin de comparer les valeurs des groupes traités aux valeurs du groupe contrôle, et le test de Tukey, pour comparer les valeurs entre elles, ont été utilisés. Les différences ont été considérées comme significatives à $P < 0,05$. Avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III-1-RESULTATS

III.1-1 Effet de l'extrait éthanolique de feuilles de *C. flammula* sur l'ulcère induit par l'indométacine

L'effet gastro protecteur de l'extrait éthanolique de feuilles *C. flammula* a été évalué sur des souris albinos. L'ulcère gastrique a été induit par gavage intra-gastrique d'une dose unique de 25 mg/kg de l'indométacine. Deux analyses ont été réalisées, dans le but d'évaluer l'effet gastro protecteur de l'extrait brut, l'analyse macroscopique basée sur une observation des lésions internes visibles sous loupe et le dosage des taux gastriques de MDA comme marqueur du stress oxydant induit par l'indométacine.

III.1-2 Les observations macroscopiques

Les souris ayant reçu l'indométacine, ont développé des lésions gastriques caractéristiques dans la partie mucoale de l'estomac, représentées par des ulcérations, rougeurs de la muqueuse, œdèmes, hémorragies, érosions et des perforations. Contrairement aux estomacs des souris traitées par le CMC, qui ont présenté un aspect normal (Figure 19). Ces observations plaident en faveur du bon choix de l'agent ulcérogène.

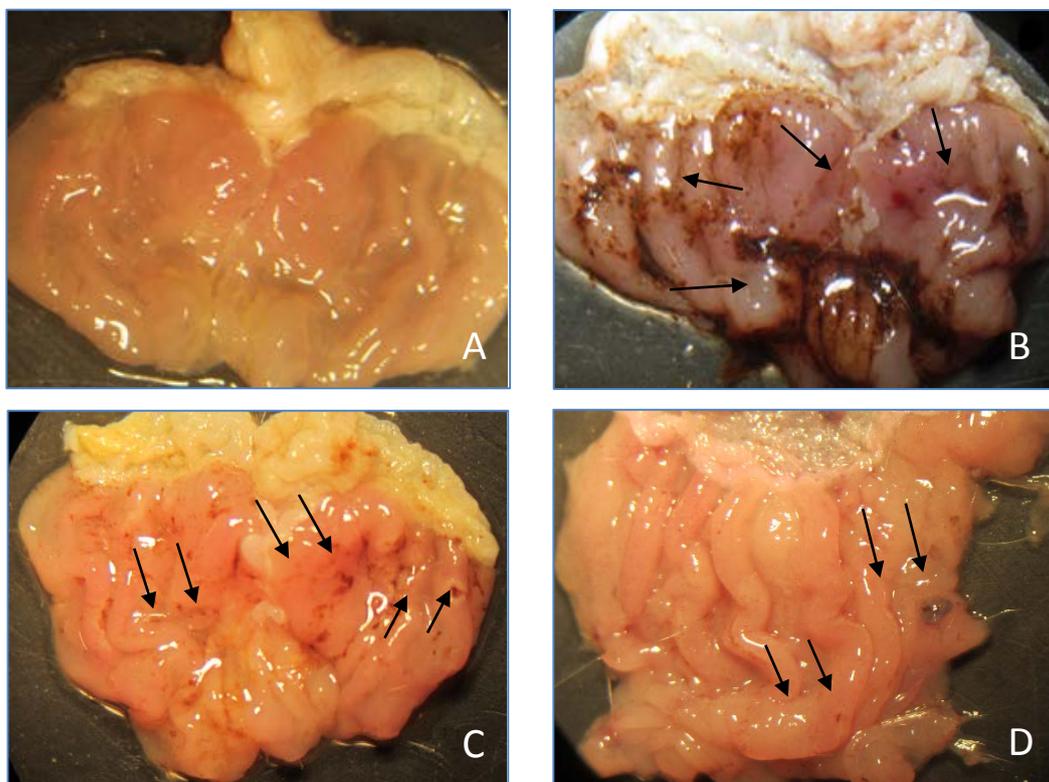


Figure 19 : Photographie originale des estomacs (grossissement 0.8x10) ; A : Estomac normal (Véhicule) ; B, C, D : Estomacs du groupe traité par l'indométacine (les lésions sont montrées par les flèches)

Les groupes de souris des groupes tests prétraités par l'extrait éthanolique à des concentrations de 25, 50, 100 et 200 mg/kg, ont montré une protection et une réduction des lésions gastriques induites par l'agent ulcérogène comparé au groupe Indométacine.

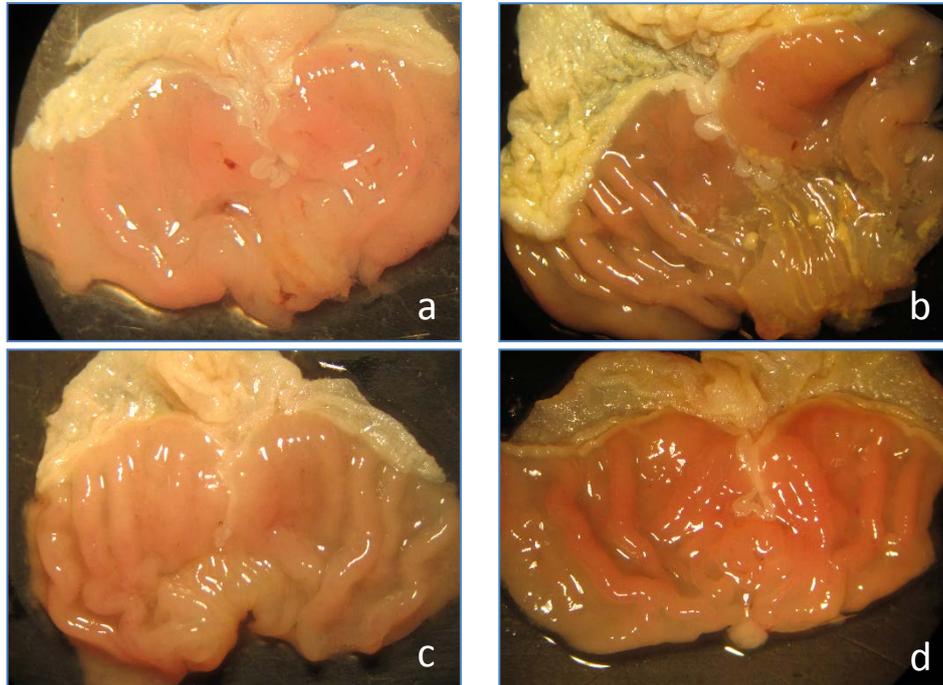


Figure 20 : Photographie des estomacs (grossissement 0.8x10) a) estomac traité par *C. flammula* à 25 mg/kg ; b) estomac traité par *C. flammula* à 50 mg/kg ; b) estomac traité par *C. flammula* à 100 mg/kg ; d) estomac traité par *C. flammula* à 200 mg/kg.

Le Misoprostol étant un médicament gastro-protecteur connu, a largement réduit le degré d'ulcérations observées chez les souris du groupe Indométacine se rapprochant de l'aspect observé chez les souris du groupe Véhicule. Ce qui permet de valider le protocole suivie (Figure 21).

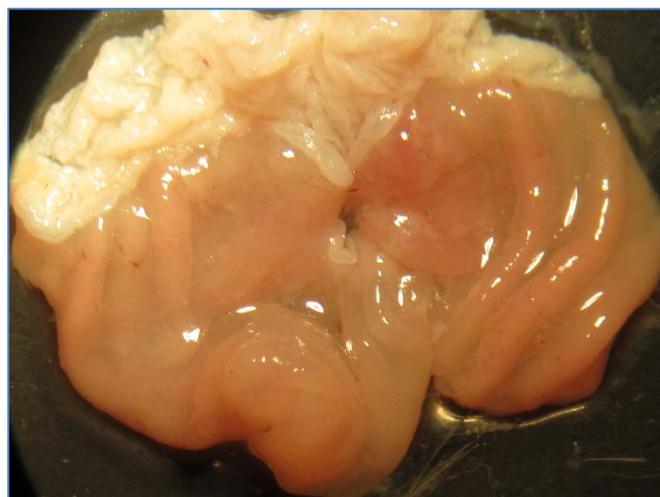


Figure 21 : Photographie originale d'un estomac traité avec du Misoprostol

III.2- Evaluation du degré d'ulcération et d'inhibition de l'ulcère par l'extrait chez les groupes

L'estimation des surfaces lésées et des surfaces totales, à l'aide de logiciel Image J a permis d'évaluer l'effet gastro-protecteur de l'extrait brut contre les lésions induites par l'indométacine.

Les figures 20 et 21 illustrent l'activité anti-ulcère de l'extrait à différentes concentrations, ainsi que le médicament de référence : le Misoprostol.

Le pourcentage d'ulcération maximal correspond au groupe Indométacine avec $20,74 \pm 3,39\%$. On remarque une réduction très hautement significative ($P < 0,001$) des surfaces lésées, chez le groupe traité par le Misoprostol, en comparaison au groupe traité par l'indométacine avec un pourcentage de $0,56 \pm 0,25$ ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de $97,29 \pm 1,14\%$. (Tableau III)

Tableau III : Le pourcentage d'ulcération et d'inhibition pour les différents groupes.

Groupes	Dose (mg/kg)	Modèle induit par l'indométacine	
		Ulcération(%)	Inhibition (%)
Véhicule	-	-	-
Indométacine	25	$20,74 \pm 0,47$	-
	25	$0,94 \pm 0,30^{***}$	95,47
Extrait Ethanol	50	$0,50 \pm 0,27^{***}$	97,61
	100	$0,38 \pm 0,14^{***}$	98,19
	200	$2,74 \pm 1,06^{***}$	86,78*
Misoprostol	200 μ g	$0,56 \pm 0,25^{***}$	97,29

Les valeurs des indices d'ulcères sont représentées par la moyenne \pm SEM (erreur standard sur la moyenne) ; n= 8 pour chaque groupe. ***P < 0.001 ; **P < 0.01 ; *P < 0.05 significativement différent par rapport au groupe contrôle.

Les souris ayant été traitées avec l'extrait éthanolique de *C. flammula* à différentes concentrations, ont révélé la présence d'une différence très hautement significative ($P < 0,001$) entre le groupe Indométacine et les groupes traités (25, 50, 100 et 200 mg/kg) présentant des pourcentages d'ulcération de $0,94 \pm 0,30$; $0,50 \pm 0,27$; $0,38 \pm 0,14$; $2,74 \pm 1,06\%$ respectivement (Figure 22).

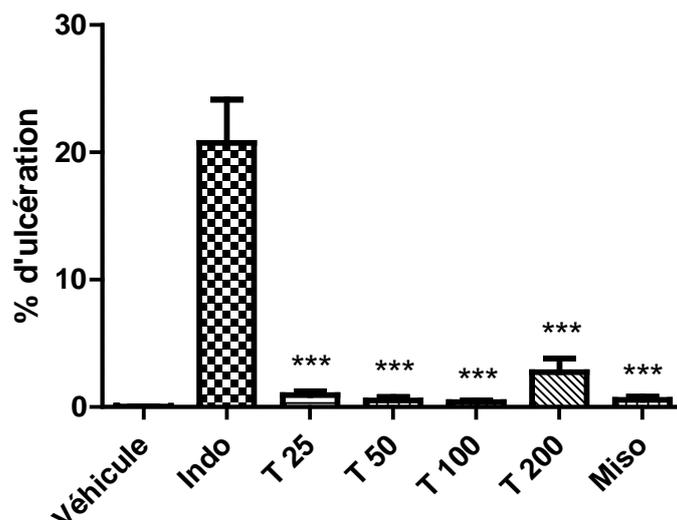


Figure 22 : Effet de l'administration orale du véhicule (CMC 0,8%), du Misoprostol et de l'extrait éthanolique de *C. flammula* sur l'ulcère induit par l'indométacine chez les souris. Véhicule ; Indo : Indométacine ; T 25 : Test 25 mg/kg; T 50 : Test 50 mg/kg; T 100 : Test 100 mg/kg; T 200 : Test 200 mg/kg; Miso : Test avec le Misoprostol. Le pourcentage d'ulcération est exprimé en moyenne \pm SEM pour $n = 8$, suivant le test one-way ANOVA, suivi du test de Dunnett. *** $p < 0.001$ comparé au groupe Indo.

Des pourcentages d'inhibition de l'ulcère $95,47 \pm 1.47$; $97,61 \pm 1.35$ et $87,19 \pm 0,68\%$ ont été exhibés par les extraits testés à 25, 50 et 100 mg/kg respectivement. L'effet enregistré par les extraits était comparable à celui révélé par le standard utilisé ($P < 0,05$).

Le groupe traité par l'extrait à 200mg/kg ($86,78 \pm 5,12$), a démontré une protection significativement ($P < 0,05$) plus faible comparé à celle exhibé par le Misoprostol et les autres groupes tests (Figure 23).

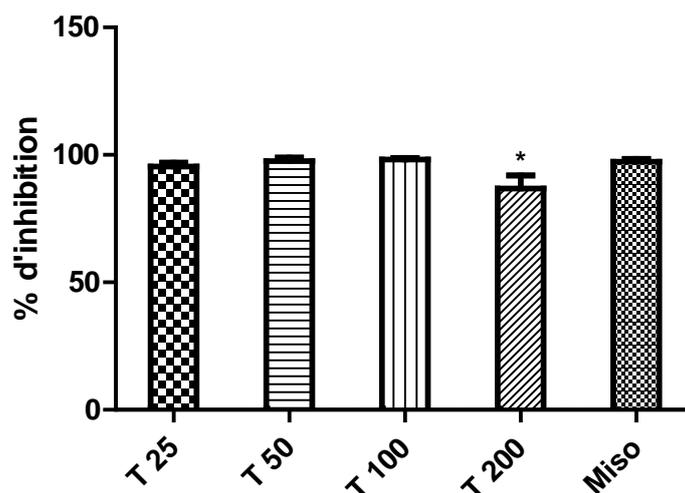


Figure 23 : Représentation en histogramme de l'effet du Misoprostol et de l'extrait éthanolique de *C. flammula* sur l'ulcère induit par l'indométacine chez les souris. Miso: Test avec le Misoprostol $200 \mu\text{g/kg}$; T 25 : Test 25 mg/kg; T 50 : Test 50 mg/kg; T 100 : Test 100 mg/kg; T 200 : Test 200 mg/kg. Le pourcentage d'inhibition est exprimé en moyenne \pm SEM pour $n = 8$, suivant le test one-way ANOVA, suivi du test de Tukey *** $P < 0.001$; * $p < 0.05$ comparé au groupe Misoprostol.

III.3- Evaluation des effets de l'extrait sur les taux gastriques de MDA

Les taux de MDA formés ont été mesurés et les résultats sont représentés dans la figure 24.

L'analyse statistique des résultats obtenus a révélé une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de MDA chez le groupe Indométacine ($357,58 \pm 0,33$ nmol/mg de tissu) comparativement au groupe Véhicule ($58,26 \pm 0,09$ nmol/mg de tissu).

Alors que chez les groupes traités par l'extrait éthanolique de *C. flammula* aux doses de 25, 50, 100 et 200 mg/kg et le Misoprostol à 200 μ g/kg, il a été constaté une réduction significative ($p < 0,001$) du taux de MDA ($117,85 \pm 0,20$; $92,85 \pm 0,16$; $74,10 \pm 0,16$ et $139,73 \pm 0,11$ et $46,42 \pm 0,14$ nmol/mg de tissu, respectivement) par rapport aux souris du groupe Indométacine.

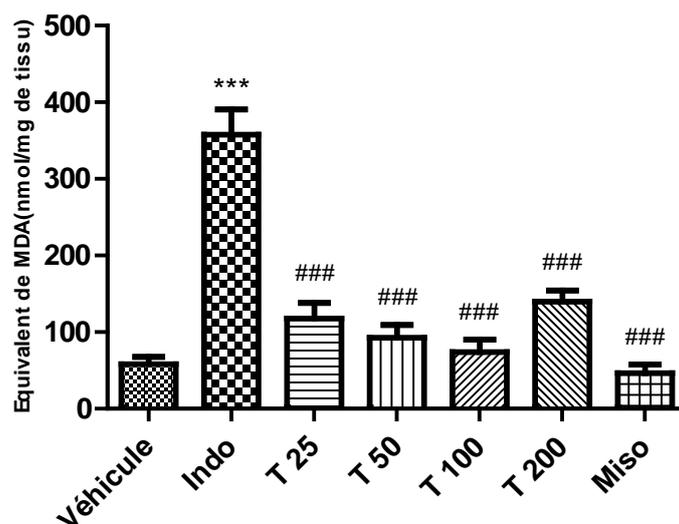


Figure 24 : Les valeurs des niveaux de MDA gastriques (nmol MDA/mg de tissus) chez les groupes expérimentaux. Miso: Test avec le Misoprostol 200 μ g/kg ; T 25 : Test 25 mg/kg; T 50 : Test 50 mg/kg; T 100 : Test 100 mg/kg; T 200 : Test 200 mg/kg, sont représentées par la moyenne \pm SEM (erreur standard sur la moyenne) ; n= 8 pour chaque groupe. ***P < 0.001 ; **P < 0.01 ; *P < 0.05 significativement différent par rapport au groupe véhicule et ###P < 0.001 ; ##P < 0.01 ; #P < 0.05 significativement différent par rapport Indo.

Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique ont révélé un effet comparable à celui exhibé par le Misoprostol ($P < 0,05$; $86,6 \pm 3.61\%$) pour les extraits testés à 50 et 100 mg/kg ($74,30 \pm 4.10\%$ et $78,63 \pm 5.62\%$ respectivement). En revanche les groupes traités par les extraits à 25 mg/kg ($64,27 \pm 6.26$) et 200 mg/kg ($60,29 \pm 3,84$) ont démontré une protection significativement ($P < 0,05$) et ($P < 0,01$) respectivement plus faible comparé à celle exhibé par le Misoprostol.

Tableau IV : Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par les différentes concentrations d'extrait et le Misoprostol.

Groupes	Dose (mg/kg)	Taux d'inhibition de la peroxydation
Test 25	25	$64,27 \pm 6.26^*$
Test 50	50	$74,30 \pm 4.10$
Test 100	100	$78,63 \pm 5.62$
Test 200	200	$60,29 \pm 3.84^{**}$
Misoprostol	200 μ g	$86,62 \pm 3.61$

Misoprostol 200 μ g/kg, Extrait éthanolique de feuilles de *C. flammula* 25, 50, 100 et 200 mg/kg + Indométacine 25 mg/kg. Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM, (n = 8), suivant le test one-way ANOVA, suivi du test de Tukey $^{**}P < 0.01$; $^*p < 0.05$ comparé au groupe Misoprostol.

III-2-DISCUSSION

L'ulcère gastrique est un trouble fréquent du système gastro-intestinal. La pathogénèse des ulcères gastriques est attribuée à un déséquilibre entre les facteurs protecteurs (mucus, bicarbonate, prostaglandine, flux sanguin, le système antioxydant, composés sulfhydryliques, oxyde nitrique et la prolifération cellulaire) et les facteurs agressifs (l'acide chlorhydrique, *Helicobacter pylori*, la pepsine, le stress, l'alcool, et l'utilisation continue des anti-inflammatoires non-stéroïdiens AINS) (Batista et al., 2015).

Parmi ces médicaments, l'Indométacine, qui possède des effets antipyrétiques, antithrombotiques et analgésiques, a montré qu'il était celui qui provoquait des lésions gastriques plus importantes chez les cobayes par rapport aux autres AINS. Pour cette raison, il est devenu un ulcérogène modèle utilisé en expérimentation animale pour déterminer les molécules à activité gastro-protectrice (Takeuchi et al., 2005)

Les prostaglandines (PGs) ont un rôle crucial dans la préservation des processus physiologiques comprenant la circulation de sang muqueux, l'angiogénèse, et la sécrétion de mucus et de bicarbonate. Les PGs sont synthétisés par les isozymes : cyclooxygénase-I (Cox-I) et de cyclooxygénase-II (Cox-II). Puisque l'indométacine est un inhibiteur non spécifique de COX, elle cause l'ulcération gastrique et intensifie les ulcères gastriques déjà présents chez l'Homme et les rongeurs par la suppression de la synthèse des PG (Antonisamy et al., 2016).

Il a été récemment démontré qu'en plus de l'inhibition des enzymes de COX, les ERO possédaient également un rôle important dans la pathogénèse des dommages de la muqueuse provoqués par l'indométacine (EL-Abhar, 2010). Les ERO induits par l'indométacine dans les tissus pourraient endommager les membranes et les tissus de l'estomac en augmentant la peroxydation lipidique (Miura et al., 2002).

Au cours de ces dernières décennies plusieurs études ont été menées dans le seul et unique but de substituer les médicaments synthétiques par des remèdes d'origine naturelle extraits à partir des plantes médicinales, possédant un effet antioxydant et biologiques importants. *Clematis flammula* largement étudiée (Atmani et al., 2009 ; Chawla et al., 2012) a fait objet de cette étude pour évaluer son effet gastro-protecteur.

L'étape la plus importante est l'extraction, pour cela le protocole d'extraction des polyphénols de la plante a été réalisé dans le but de réduire au minimum la perte de composés d'intérêt pendant le transport et la conservation des échantillons. Aussi, le taux élevé d'humidité ou d'eau stimule les activités enzymatiques. Le chauffage, l'exposition à la lumière et à l'oxygène peuvent affecter la composition polyphénolique de différentes manières (Tsao, 2010).

Ainsi, pour éviter la dégradation des polyphénols natifs, les feuilles de *Clematis flammula* ont été séchées à température ambiante, laissées à l'ombre afin d'éliminer toute trace d'humidité dans le but de préserver tous les principes actifs de la plante. Pour améliorer la qualité d'extraction un broyage et un tamisage ont été réalisés, un maximum de poudre fine de diamètre inférieur à 63µm a été récupéré.

L'extraction des polyphénols a été réalisée en utilisant l'éthanol comme solvant, le tout a été macéré pendant 24h puis décanté durant 24h à l'abri de la lumière. Le surnageant a été centrifugé et laissé séché à l'air libre jusqu'à obtention d'un résidu sec de poids stable. Les extraits ont été conservés à - 20°C afin de préserver tous les principes actifs (Atmani et al., 2011).

Après avoir été prétraités par voie intra-gastrique avec un véhicule, le Misoprostol (200 µg/kg) ou l'extrait éthanolique (25, 50, 100 et 200 mg/kg), les souris ont été ensuite exposées à des lésions gastriques aiguës induites par l'indométacine.

Les observations macroscopiques des estomacs ont montré des lésions caractéristiques chez le groupe traité par l'indométacine (25 mg/kg), avec une surface moyenne de l'ulcère de 20,74±3,39 dans le groupe indométacine. Tels que des hémorragies, des pétéchies, une muqueuse rouge et des ulcères vrais, que l'on ne retrouve pas chez les estomacs sains. Ces lésions sont caractéristiques des lésions induites par ce médicament, ce qui concorde avec les observations de différentes études (Karakaya et al., 2009; Martins et al., 2014; Adewoye et al., 2014 ; Saheed et al., 2015) ce qui est un bon argument en faveur de la méthode adoptée.

L'effet gastro-protecteur de l'extrait éthanolique de feuilles de *C. flammula* a été estimé par un test biochimique mesurant les niveaux de MDA gastriques.

Le MDA est un produit final stable de la peroxydation lipidique membranaire induite par les espèces réactives de l'oxygène, ainsi il est employé comme indicateur de la

peroxydation lipidique. Les interactions entre le MDA et composants de membrane ont comme conséquence la perturbation de la structure et la fonction des membranes de cellules (Avci et *al.*, 2014). La méthode la plus commune pour mesurer le MDA est basée sur sa réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le test des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) est une méthode colorimétrique largement répandue pour la détection de la peroxydation lipidique, la réaction rapporte un adduit MDA-TBA rose, le produit de 2 molécules de TBA combinées avec 1 molécule de MDA (Jetawattana, 2005).

Malgré la pratique mondialement reconnue de la partie aérienne séchée des espèces de *Clematis* contre les troubles inflammatoires dans la médecine traditionnelle, les parties aériennes fraîches sont réputées pour posséder une nature irritante causée par la transformation enzymatique de la ranunculine en protéoanémoneine caractéristique de la famille des Ranunculacées qui sont des substances hautement irritantes.

La protéoanémoneine est une substance qui se trouve sous forme de trace et se transforme en anémoneine qui est à son tour hydrolysée en acide carboxylique non toxique après dimérisation, d'autre part aucune trace de protoanémoneine n'a été trouvée dans la plante séchée (Yesilada et Küpeli, 2006 ; Chawla et *al.*, 2012).

Les résultats de cette étude ont montré que l'administration intra gastrique de l'extrait éthanolique de *C. flammula* exerce un effet protecteur contre le pouvoir ulcérogène de l'indométacine au niveau de la muqueuse gastrique, en effet il a été observé que *C. flammula* a réduit significativement les lésions induites par l'indométacine.

Il a été observé que l'extrait éthanolique de *C. flammula a* montré un effet optimal à une dose équivalente à 50 mg et à 100 mg. En effet une réduction significative du pourcentage d'ulcération et d'inhibition suivie d'une diminution des taux de MDA par rapport au groupe traité par l'indométacine a été notée. L'effet de l'extrait aux doses indiquées est comparable à celui exhibé par le Misoprostol, ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par des études antérieures (Oluwabunmi et Abiola, 2015 ; Chen et *al.*, 2016). Cependant cette activité diminue graduellement à 200 mg, ce qui pourrait être causé par l'encombrement stérique des composés bioactifs de l'extrait qui impacterait sur son absorption au niveau de la muqueuse gastrique (Dabburu et *al.*, 2012).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique de *C. flammula* possède le même profil pharmacologique que celui du Misoprostol, qui est un analogue semi-synthétique des prostaglandines E2, il imite leur action et donne un effet protecteur à la muqueuse gastrique en diminuant la sécrétion acide et en augmentant la sécrétion du mucus (Lullmann et Mohr, 2003). Ce qui nous laisse suggérer que l'extrait brut agirait en inhibant le degré d'acide gastrique et en régulant la synthèse des prostaglandines ou en stimulant la sécrétion du bicarbonate et du mucus (Bhalke et al., 2010 ; Zakaria et al., 2011 ; Awaad et al., 2013 ; Boudaoud-Ouahmed et al., 2015).

L'activité anti-ulcère de l'extrait éthanolique de *C. flammula* observée, serait due à la richesse de la plante en composés bioactifs ; en effet, l'analyse phytochimique de l'extrait brut de *C. flammula* a montré une composition riche en polyphénols, principalement en tannins (86.33 ± 10.82 mg Eq Catechin/g extrait), phénols simples (19.65 ± 3.61 mg Eq Catechin/g extrait) et pauvre en flavonoïdes (05.15 ± 0.10 mg Eq Catechin/g extrait) (Atmani et al., 2009). Les polyphénols partagent des propriétés physiques et chimiques qui sont à l'origine de leur actions physiologiques et pharmacologiques, notamment leur activité antioxydant par le piégeage des radicaux libres, également l'amplification du pouvoir antioxydant et leur capacité à se complexer avec d'autres molécules comme les protéines et les polysaccharides, (Morand et Milenkovic, 2014 ; Farzaei et al., 2015). Les tannins sont aussi capables de prévenir le développement de l'ulcère et ce via un effet vasoconstricteur, ou bien par précipitation des protéines au niveau du site de lésion et former ainsi une couche imperméable et protectrice (complexe de tannin-protéine/tannin-polysaccharide) au-dessus des tissus épithéliaux blessés permettant au processus curatif de se produire naturellement et protégé la muqueuse gastrique (de Jesus et al., 2012).

Des études menées sur les acides phénoliques parmi lesquels l'acide cinnamique et ses dérivés tel que l'acide caféique ont rapporté qu'ils inhibaient la production du TNF- α et de l'IL 10 par les monocytes humains en bloquant les récepteurs Toll-like (TLR-4), une classe importante des récepteurs de reconnaissance de forme (PRRs), présents sur les cellules immunisées qui sont impliquées dans l'induction de l'inflammation dans les cellules épithéliales intestinales. En outre l'acide cinnamique démontre une activité antioxydante efficace, une capacité neutralisante d'acide, une cytotoxicité contre *H. pylori*, et une inhibition significative des lésions provoquées par l'ulcère gastrique en stimulant notamment la sécrétion de mucus chez les rats (Oliveira et al., 2014).

CONCLUSION

L'utilisation des plantes médicinales a connu un essor important ces dernières années grâce aux propriétés thérapeutiques qu'elles procurent.

Notre étude avait pour but d'évaluer l'effet gastro-protecteur de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula* sur l'ulcère induit par l'indométacine.

L'effet gastro-protecteur a été évalué en mesurant les taux du malondialdéhyde (MDA) de la muqueuse gastrique, qui est le produit de la peroxydation lipidique induite par l'exposition des tissus à un stress oxydant. Les niveaux de MDA qui reflètent les dommages de la membrane cellulaire infligés par les ERO ont été mesurés par le test de l'acide thiobarbiturique (TBA).

Le prétraitement des souris par l'extrait éthanolique de la plante à des doses de 25, 50 et 100 mg/kg a réduit de manière très hautement significative les taux de MDA et a préservé la structure normale de la muqueuse gastrique après traitement par l'indométacine. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le standard (Misoprostol), cependant l'extrait à 200 mg/kg s'est révélé moins efficace. Un effet non doses dépendant a été obtenue dans cette étude.

Les résultats obtenus nous ont permis de suggérer que les composés actifs présents dans l'extrait de *Clematis flammula* ont la capacité d'inhiber et de prévenir la peroxydation lipidique, en réduisant les surfaces d'ulcération et en inhibant la peroxydation lipidique.

Des études complémentaires pourront être réalisées dans le but :

- D'isoler, caractériser et identifier les composés actifs présents dans les extraits qui sont responsables de l'effet gastroprotecteur et de l'activité antioxydante.
- Elucider les mécanismes d'action précis des composés bioactifs contre l'ulcère gastrique.
- Il serait nécessaire de poursuivre et d'approfondir les études de recherches dans le cadre d'une application pharmacologique de *C. flammula* dans l'espoir d'obtenir un principe actif efficace dans les soins prodigués, et de s'assurer de son innocuité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A

- Adewoye, E. O., et Salami, A. T. (2014). Anti-ulcerogenic mechanism of magnesium in indomethacin induced gastric ulcer in rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 28(2), 193-199.
- Al-Taweel, A. M. (2007). Phytochemical and Biological Studies of Some *Clematis* Species Growing in Saudi Arabia (Doctoral dissertation, King Saud University), p. 6-7.
- Antonisamy, P., Arasu, M. V., Dhanasekaran, M., Choi, K. C., Aravinthan, A., Kim, N. S. et Kim, J. H. (2016). Protective effects of trigonelline against indomethacin-induced gastric ulcer in rats and potential underlying mechanisms. *Food & function*, 7(1), 398-408.
- Araujo, D. A., Takayama, C., de-Faria, F. M., Socca, E. A., Dunder, R. J., Manzo, L. P. et Souza-Brito, A. R. (2011). Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), 721-729.
- Artigau J.P et al. (1999). *Anatomie et physiologie humaines*. 4^{ème} édition. Québec : Editions du renouveau pédagogique Inc. 870-878p.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N. et Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112 : 303-309.
- Atmani, D., Ruiz-Larrea, B.M., Ruiz-Sanz, J.I., Lizcano, L.J., Bakkali, F. et Atmani, D. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (4) : 589-598.
- Avci, E., Akarslan, Z. Z., Erten, H., et Coskun-Cevher, S. (2014). Oxidative stress and cellular immunity in patients with recurrent aphthous ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(5), 355-360.
- Awaad, A. S., El-Meligy, R. M., et Soliman, G. A. (2013). Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *Journal of Saudi chemical society*, 17(1), 101-124.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., et Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.

B

- Bartsch H. et Nair J. (2000). Ultrasensitive and specific detection methods for egzocyclic DNA adducts: Marker for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicology* 153, 105-114.
- Batista, L. M., Lima, G. R. D. M., De Almeida, A. B. A., Magri, L. D. P., Calvo, T. R., Ferreira, A. L. et Brito, A. R. M. S. (2015). Ulcer healing and mechanism (s) of action involved in the gastroprotective activity of fractions obtained from *Syngonanthus arthrotrichus* and *Syngonanthus bisulcatus*. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Beloued, A. (1998). *Plantes médicinales d'Algérie*. 2eme Edition, Office des publications universitaire. 162 p.
- Belviranlı M. et Gökbel H. (2006). Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur. J. Gen. Med.* 3, 126-131.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E. et Sapiststein H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.* 82, 390-393.
- Bhalke, R. D., Giri, M. A., Anarthe, S. J., et Pal, S. C. (2010). Antiulcer activity of the ethanol extract of leaves of *Sesbania grandiflora* (Linn.). *Int J Pharm Pharm Sci*, 2(4), 206-208.
- Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Beaudeau J.L., Peynet J., Legrand A. and Delattre J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Ann. Biologica et Clinica* 59, 453-459.
- Borrelli, F., & Izzo, A. A. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, 14(8), 581-591.
- Boudaoud-Ouahmed, H., Yous, F., Ouaret, N., Schini-Keirth, V. B., Djebbli, N., et Atmani, D. (2015). Evaluation of gastroprotective, hepatoprotective and hypotensive activities of *Ulmus campestris* bark extract. *Phytothérapie*, 1-12.
- Brun. et Caillaud (2009). *Physiologie humaine : Les fondements de la médecine*. Paris : Masson.409p
- Brzozowska, J., & Hanower, P. (1976). Sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'Université d'Abidjan. Série C: Sciences*, 12, 65-87.

C

- Chan, F. K., Abraham, N. S., Scheiman, J. M., et Laine, L. (2008). Management of patients on nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a clinical practice recommendation from the First International Working Party on Gastrointestinal and Cardiovascular Effects of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Anti-platelet Agents. *The American journal of gastroenterology*, 103(11), 2908-2918.
- Chawla, R., Kumar, S. et Sharma, A. (2012). The genus *Clematis* (Ranunculaceae): chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 116-150.
- Cheeseman, K. H., et Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481-493.
- Chen, X. Y., Chen, H. M., Liu, Y. H., Zhang, Z. B., Zheng, Y. F., Su, Z. Q. et Lai, X. P. (2016). The gastroprotective effect of pogostone from *Pogostemonis Herba* against indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Experimental Biology and Medicine*, 241(2), 193-204.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Coquerel. et Beghin, D. (2012). *Abdomen*. In : Drake, R.L. et Vogl, A.W., Mitchel, A.W.M. *GRAY'S : Anatomie pour les étudiants*. 2^{ème} édition. Paris : Elsevier Masson. 298p.

D

- Dabburu, K., Kondaveeti, S. B., et BabuK, S. (2012). Evaluation of gastro-protective effect of the hydro-alcoholic extract of *Juglans regia*. L leaves in experimental animals. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(11), 79.
- Dangles, O., Dufour, C., Andersen, Ø. M., et Markham, K. R. (2006). Flavonoid-protein interactions. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, 443-469.
- Devaraj VC, Krishna BG (2013) Antiulcer activity of a polyherbal formulation (PHF) from Indian medicinal plants. *Chin J Nat Med* 11(2): 145–148
- Djahanguiri, B. (1969). Effect of a single dose of phentolamine and MG 1999 on intomethacin-induced gastrique ulcer in rets. *Israël journal of medical sciences*, 5(3), 417.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Dryden, G. W., Song, M., & McClain, C. (2006). Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Current opinion in gastroenterology*, 22(2), 165.
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59(4), 459.

E

- El-Abhar, H. S. (2010). Coenzyme Q10: A novel gastroprotective effect via modulation of vascular permeability, prostaglandin E 2, nitric oxide and redox status in indomethacin-induced gastric ulcer model. *European journal of pharmacology*, 649(1), 314-319.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G., et Slater, T. F. (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, 208(1), 129-140.
- Esterbauer, H., et Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407-421.
- Esterbauer, H., Eckl, P., et Ortner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238(3), 223-233.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

F

- Farzaei, M. H., Abdollahi, M., et Rahimi, R. (2015). Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. *World journal of gastroenterology*: WJG,21(21), 6499.
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 42: 153–164
- Fintelmann, V., Weiss, R.F. (2004). *Manuel pratique de Phytothérapie*, Eddition Vigot, Paris, 3p.

G

- Giera, M., Lingeman, H., et Niessen, W. M. (2012). Recent advancements in the LC-and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia*, 75(9-10), 433-440.
- Gimenez, F., Brazier, M., Calop, J., Dine, T., Tchiakpé, L., Claerbout, J. F. (2000). Traitement de l'ulcère gastro-duodéal. *Pharmacie clinique et thérapeutique*, Edition Masson, Paris, 1065 p.
 - Guignard J.L., 1996. *Abrégé de biochimie végétale*, Edition Masson, Paris, 160 p.

H

- Halliwell, B., et Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., et Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-κB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, 2007.
- Hansen, J. T., Koeppen, B. M., & Koeppen, B. M. (2011). *Netter's Atlas of Human Physiology*. Elsevier Inc. 269p.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2), 67-202.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13, (10), 572-584.

J

- Jana, U., Bhattacharyya, D., Bandopadhyay, S., Pandit, S., Debnath, P., et Sur, T. (2005). Antiulcer activity of digitrall: A polyherbal drug in rats. *Indian journal of pharmacology*, 37(6), 406.
- de Jesus, N. Z. T., Falcão, H. D. S., Gomes, I. F., Leite, T. J. D. A., Lima, G. R. D. M., Barbosa-Filho, J. M. et Batista, L. M. (2012). Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3203-3228.
- Jetawattana, S. (2005). Free radical & radiation Biology; malondialdehyde (MDA) a lipid oxidation product. *Spring*, 77, 222.

K

- Kanti, BP. Rizvi, SI. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- Karakaya, K., Hanci, V., Bektas, S., Can, M., Ucan, H. B., Emre, A. U. et Cakmak, G. K. (2009). Mitigation of indomethacin-induced gastric mucosal lesions by a potent specific type V phosphodiesterase inhibitor. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 15(40), 5091.
- Konturek, S. J., Konturek, P. C., et Brzozowski, T. (2005). Prostaglandins and ulcer healing. *Journal of physiology and pharmacology*, 56, 5.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., et Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 333-343.

L

- Lacour. et Belon (2015). *Physiologie*. Paris : Elsevier Masson. 298p.
- Lechat, P., Lagier, G., Kouveix, B., Vincens, M., Weber, S. (1982). *Pharmacologie médicale*, 4eme Edition Masson, Paris, 763 p.
- Levenstein S Levenstein, S., & Kaplan, G. A. (1998). Socioeconomic status and ulcer: a prospective study of contributory risk factors. *Journal of clinical gastroenterology*, 26(1), 14-17.
- Li, R. W., Lin, G. D., Leach, D. N., Waterman, P. G., et Myers, S. P. (2006). Inhibition of COXs and 5-LOX and activation of PPARs by Australian Clematis species (Ranunculaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 104(1), 138-143.
- Li, W. F., Hao, D. J., Fan, T., Huang, H. M., Yao, H., et Niu, X. F. (2014). Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Chemico-biological interactions*, 208, 18-27.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- de Lira Mota, K. S., Dias, G. E. N., Pinto, M. E. F., Luiz-Ferreira, Â., Monteiro Souza-Brito, A. R., Hiruma-Lima, C. A. et Batista, L. M. (2009). Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules*, 14(3), 979-1012.
- Liu, W., Chen, Y., Lu, G., Sun, L., et Si, J. (2011). Down-regulation of HSP70 sensitizes gastric epithelial cells to apoptosis and growth retardation triggered by *H. pylori*. *BMC gastroenterology*, 11(1), 1.
- Lovell, M. A., Ehmman, W. D., Butler, S. M., et Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, 45(8), 1594-1601.
- Lullmann, H., Mohr, K. (2003). *Atlas de poche de pharmacologie*. 3^{ème} édition. Flammarion. Pp : 320-322.

M

- Macheix, J. J., A. Fleuriet, et al. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux*. PPUR Presses polytechniques. Lausanne. 26p
- Marieb. et Hoehn (2010). *Anatomie et physiologie humaines*. Paris: Pearson 1004p.
- Mates J.M., Perez-Gomez C. and Nunez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603.
- Martins, J.L.R., Rodrigues, O.R.L., Silva, D.M., Galdino, P.M., De Paula, J.R., Romão, W., Costa, H.B., Vaz, B.G., Ghedini, P.C. et COSTA, E.A. (2014). Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq). Sargent on gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 155, p. 1616–1624.
- Medjahdi, B., Ibn Tattou, M., Barkat, D. et benabedli, K. (2009). La flore vasculaire des monts des Trara (nord-ouest algérien). *Acta Botanica Malacitana*, 34 : 65-75.
- Miller, T. A., Li, D. O. N. G. H. U. I., Kuo, Y. J., Schmidt, K. L., et Shanbour, L. L. (1985). Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE2 and ethanol. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 249(1), G137-G144.
- Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. (2002). Lipid peroxidation induced by indomethacin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: involvement of indomethacin radicals. *Biochem Pharmacol* 63: 2069–74.
- Morand. C, Milenkovic. D. (2014). Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques* (42), 47-62.
- Morel Y., Mermod N. et Barouki R. (1999). An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H2O2 and NFI. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6825-6832.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

N

- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D. EC., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P. AM. (2001). Flavonoids: are view of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*; 74:418–25.

O

- Ohkawa, H., Ohishi, N. et Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 95 : 351-358.
- Olbe, L., Carlsson, E., et Lindberg, P. (2003). A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 132-139.
- Oliveira, F. D. A., Andrade, L. N., de Sousa, É. B. V., et de Sousa, D. P. (2014). Anti-ulcer activity of essential oil constituents. *Molecules*, 19(5), 5717-5747.
- Oluwabunmi, I. J., et Abiola, T. (2015). Gastroprotective effect of methanolic extract of *Gomphrena celosioides* on indomethacin induced gastric ulcer in Wistar albino rats. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 5(1), 41.

P

- Pietta, P. G., (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production*, 63, (7), 1035-42.
- Poli, G., Dianzani, M. U., Cheeseman, K. H., Slater, T., Lang, J., et Esterbauer, H. (1985). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochemical Journal*, 227(2), 629-638.
- Pryor, W. A. (1989). On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(2), 177-178.
- Psotová J., Lasovský J. et Vicar J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers*147, 147-153.

R

- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, 65(1), 27-33.

S

- Saheed, S., Olarewaju, S. A., Taofeeq, G., Olatunde, S. T., et Alanamu, A. A. (2015). Combined administration of Spondias mombin and Ficus exasperata leaf extracts stall Indomethacin-mediated gastric mucosal onslaught in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(1), 45-51.
- Silbernalg, S. et Lang. F. (2012). *Atlas de poche de physiopathologie* 2^{ème} édition. Paris: Flammarion médecine science, 156p.
- Sinha, M., Gautam, L., Shukla, P. K., Kaur, P., Sharma, S., et Singh, T. P. (2013). Current perspectives in NSAID-induced gastropathy. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Sinnhuber, R. O., Yu, T. C., et Yu, T. C. (1958). Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity a, b. *Journal of Food Science*, 23(6), 626-634.
- Srikanta, B. M., Sathisha, U. V., et Dharmesh, S. M. (2010). Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E 2 levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. *Biochimie*, 92(2), 194-203.
- Sung, J. J. Y., Kuipers, E. J., et EL-SERAG, H. B. (2009). Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 29(9), 938-946.
- Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K., et Lee, S. S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 243-268.
- Suzuki, R. B., Cola, R. F., Cola, L. T., Ferrari, C. G., Ellinger, F., Therezo, A. L. et Sperança, M. A. (2012). Different risk factors influence peptic ulcer disease development in a Brazilian population. *World J Gastroenterol*, 18(38), 5404-5411.
- Szabo, S., Trier, J. S., et Frankel, P. W. (1981). Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*, 214(4517), 200-202.

T

- Takeuchi, K., Tanaka, A., Hayashi, Y., et Yokota, A. (2005). COX inhibition and NSAID-induced gastric damage-roles in various pathogenic events. *Current topics in medicinal chemistry*, 5(5), 475-486.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Takeuchi, K. (2012). Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World J Gastroenterol*, 18(18), 2147-2160.
- Tortora. et Derrickson. (2010). *Manuel d'anatomie et de physiologie humaine*. 2^{ème} édition. Bruxelles : De boek. 478 p.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

Υ

- Yuan, Y., Padol, I. T., et Hunt, R. H. (2006). Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3(2), 80-89.
- Yesilada, E. et Kupeli, E. (2006). Clematis vitalba L. aerial part exhibits potent antiinflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 110 : 504–515.

W

- Ward J.F., Evans J.W. et Calabro-Jones P.M. (1987). Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *British Journal of Cancer* 55, 105-112.
- Waugh. et Grant. (2011). *Anatomie et physiologie normales et pathologiques*. Paris : Elsevier-Masson.

Z

- Zapolska-Downar, D., MIDER, A., et Naruszewicz, M. (2005). Trans fatty acids induce apoptosis. *Journal of physiology and pharmacology*, 56(4), 611-625.
- Zakaria, Z.A., Abdul Hisam, E.E., Rofiee, M.S., Norhafizah M., Somchit, M.N., Teh, L.K. et Salleh, M.Z. (2011). In vivo antiulcer activity of the aqueous extract of Bauhinia purpurea leaf. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 137, p. 1047– 1054.

Résumé :

Clematis flammula, de la famille des Ranunculacées, a été largement utilisée dans la médecine traditionnelle dans le traitement de diverses maladies. Le but de cette étude est d'évaluer scientifiquement l'effet gastroprotecteur, et le mécanisme antioxydant sous-jacent de l'extrait éthanolique des feuilles de *C. flammula* contre l'ulcère gastrique induit par l'indométacine chez la souris.

Les souris ont été traitées oralement par le misoprostol (200 µg / kg) ou par les extraits éthanoliques (25, 50, 100 et 200 mg / kg) et ont été exposés à des lésions gastriques aiguës induites par l'indométacine. Une évaluation macroscopique en mesurant les lésions gastriques, telles que la surface des lésions, et la mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) ont été réalisées.

Les résultats ont révélé que les souris des groupes tests ont significativement diminué ($p < 0,001$) les taux de MDA ($117,85 \pm 0,20$; $92,85 \pm 0,16$; $74,10 \pm 0,16$; $139,73 \pm 0,11$), par les extraits à 25, 50, 100 et 200 mg/kg respectivement, en comparaison avec le groupe prétraité avec l'indométacine ($357,58 \pm 0,33$).

Ces résultats suggèrent que l'effet gastroprotecteur de l'extrait éthanolique de feuilles de *C. flammula* contre l'ulcère gastrique induit par l'indométacine, pourrait être associée à la stimulation des prostaglandines médiées par les cyclooxygénases, l'effet antioxydant et/ou par stimulation de la sécrétion de mucus.

Mots clés : *Clematis flammula*, anti ulcère, indométacine, polyphénols, malondialdéhyde, peroxydation lipidique

Abstract:

Clematis flammula, of the Ranunculaceae family, has been widely used in traditional medicine in the treatment of several diseases. The aim of this study was to scientifically evaluate the possible gastroprotective effect, antioxidant effect and the underlying mechanisms of *C. flammula* leaves ethanolic extract against indomethacin-induced gastric ulcer in mice.

Mice were orally treated with vehicle, misoprostol (200 µg/kg) or ethanolic extract (25, 50, 100 and 200 mg / kg) and subsequently exposed to acute gastric lesions induced by indomethacin. Gross evaluation by measuring the gastric injury, such as extent of lesions, and malondialdehyde (MDA) level measurement were performed.

Results showed that pretreated mice with different doses of the ethanolic leaf extract *C. flammula*, (25, 50, 100 and 200 mg / kg) significantly decreased ($P < 0.001$) the level of MDA (117.85 ± 0.20 ; 92.85 ± 0.16 ; 74.10 ± 0.16 ; 139.73 ± 0.11) respectively, in comparison with indomethacin pretreated group (357.58 ± 0.33).

These results suggest that the gastroprotective effect of *C. flammula* leaves ethanolic extract against indomethacin-induced gastric ulceration might be associated with its stimulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandins, antioxidant and mucosal secretion stimulant effect.

Keywords: *Clematis flammula*, anti ulcer, indomethacin, polyphenols, malondialdehyde, lipid peroxidation

الملخص:

الظيان اللهبى (باللاتينية : *Clematis flammula*) من الفصيلة الحوذانية، استخدمت على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج العديد من الأمراض. الهدف من دراستنا هو تقييم التأثير الوقائي على المعدة، التأثير المضاد للأكسدة والآليات الكامنة للمستخلص الإيثانولي لأوراق الظيان اللهبى ضد قرحة المعدة التي يسببها الإندوميثاسين في الفئران.

عولجت فئران عن طريق الفم مع حمال، الميسوبروستول (200 ميكروغرام / كغ) أو المستخلص الإيثانولي (25، 50، 100 و 200 ملغ / كغ) وتعرضت بعد ذلك إلى جرح المعدة الحاد الناجمة عن الإندوميثاسين. تم إجراء التقييم الإجمالي عن طريق قياس إصابة المعدة، مثل مدى الجرح، ثم تم قياس مستوى المالوندي ألديهييد (MDA) Malondialdehyde.

أظهرت النتائج أن الفئران المعالجة مسبقا مع جرعات مختلفة من المستخلص الإيثانولي لأوراق الظيان اللهبى (25، 50، 100 و 200 ملغ / كغ) انخفض هام للغاية ($P < 0.001$) لنسبة المالوندي ألديهييد (MDA) Malondialdehyde.

(117.85 ± 0.20 ; 92.85 ± 0.16 ; 74.10 ± 0.16 ; 139.73 ± 0.11) على التوالي، مقارنة مع المجموعة المعالجة بالميسوبروستول سابقا (357.58 ± 0.33).

تشير هذه النتائج إلى أن التأثير الوقائي للمستخلص الإيثانولي لأوراق الظيان اللهبى على المعدة ضد قرحة المعدة المسببة بالإندوميثاسين قد تتوافق مع تحفيز البروستاغلاندين E2 بواسطة انزيمات الأكسدة الحلقية، التأثير المضاد للأكسدة وتحفيز إفرازات الغشاء المخاطي.

الكلمات المفتاحية: *Clematis flammula* الظيان اللهبى ، مضاد القرحة المعدية، الإندوميثاسين، بوليفينول، مالوندي ألديهييد ، البيروكسدة الدهنية