

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico – chimique.
Filière : Science biologique
Option : Biochimie appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Évaluation des activités biologiques des extraits phénoliques de
Clematis flammula L.

Présenté par :

DIB Sonia & CHIKHI Katia

Soutenu le **13 / 09/ 2022**

Devant le jury composé de :

M^{me} AMIR Hassiba.

MCA

Présidente

M^{me} YOUS Farah.

MAB

Encadreur

M^{me} KHETALL Bachra.

Professeur

Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022

Dédicaces

*À l'aide de Dieu, le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,
j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :*

*À mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur
patience, leurs sacrifices et leur soutien indéfectible tout au long de mes
études. Que Dieu leur prête santé ;*

À ma très chère sœur Wissam ;

À mes chers frères Atmane et Mouloud ;

*À toute ma famille et à mes
proches*

À mon binôme Katia et à toute sa famille.

À toute la promotion de Biochimie appliquée 2021/2022.

-Sonía-

Dédicaces

Je dédie ce travail

*À ma mère « Fadila » pour son amour, ses encouragements et ses
sacrifices*

*À mon père « Zaidi » pour son soutien, son affection et la confiance qu'il
m'a accordé*

*À la mémoire de ma chère grand-mère « Salîha » et ma tante «
Khadidja»*

*À ma tante «Hassina» qui m'a toujours poussé et motivé dans mes
études*

À mon unique frère « Rafik »

À ma charmante sœur « Fatma »

À ma deuxième sœur « Lynda »

À tous les membres de ma famille

À tous mes amies

À ma chère binôme « Sonia » et à toute sa famille

À tous ceux qui m'aiment

CHIKHI

KATIA



REMERCIEMENTS

En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier d'abord ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Nous remercions chaleureusement les membres du jury, Mme KHETALL Bachra et Mme AMIR hassiba, vous nous faites un grand honneur d'avoir accepté d'être le jury de notre soutenance, tout en remerciant vivement les responsables et le personnel du laboratoire de biochimie appliquée de l'université de Bejaia.

Nous adressons également nos remerciements les plus sincères à Mme YOUS Farah, notre promotrice, qui a bien voulu accepter de diriger ce mémoire et de nous aider tout au long de la réalisation de ce mémoire, aussi ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance.

Nos sincères gratitudee à tous nos chers enseignants, tout le corps professoral et l'équipe scientifique et pédagogique du laboratoire de biochimie appliquée pour la qualité de leur enseignement, leurs conseils et leur intérêt incontestable qu'ils portent à tous les

étudiants.

- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- RL** : Radicaux libres
- NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- COX-1** : Cyclooxygénases 1
- COX-2** : Cyclooxygénases 2
- LPO** : Lipoxygénases
- MPO** : Myéloperoxydase
- P450** : Cytochrome P45
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- SOD**: Super Oxyde Dismutase
- UV** : Ultra-Violet
- ADN** : Adénosine Désoxyribo Nucléique.
- MDA**: MalonDiAldéhydes.
- LDL**: Lipoprotéine de Basse Densité
- CAT**: Catalase.
- GPx** : Glutathion Peroxydases.
- GSH** : Glutathion Réduit
- GSSG** : Glutathion Oxydé.
- NADP** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- Fr** : Fer
- Cu** : Cuivre
- Hb** : Hémoglobines
- K⁺** : Ions Potassium
- G6PD** : Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase
- AIHA** : Anémie Hémolytique Auto-immun
- CF** : *Clematis flammula*
- rpm** : Rotation par Minute
- µm** : Micromètre
- EECF** : Extrait Éthanolique de *Clematis flammula* L.
- DDPH** : 2,2- Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
- PBS** : Phosphate Buffer Salin (tampon phosphate)
- CFG** : *Clematis flammula* Graines
- ABTS** : Acide 2,2-Azino-Bis (3-éthylbenzothiazolin-6-sulphonique)

Liste des abréviations

TPT : Teneur en Polyphénols Totaux

NO : Oxyde Nitrique

ONS : Oxyde Nitrique Synthases

XO : Xanthine Oxydase

LOX : Lipooxygénase

AA : Acide Aminé

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Feuilles et fleurs de <i>Clematis flammula</i> L.	02
02	Effets biologiques des polyphénols	04
03	Structure de base des composantes des acides phénoliques.	05
04	Structure de base du squelette des flavonoïdes.	06
05	Structure des tanins (A) hydrolysables et (B) condensés.	07
06	Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.	10
07	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.	12
08	Voie du pentose phosphatase dans les globules rouges.	14
09	Graines de <i>Clematis flammula</i> L.	17
10	Schéma représentant les différentes étapes de dosage des polyphénols totaux.	19
11	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	19
12	Schéma représentant le protocole de mesure de l'activité anti-radicalaire DPPH.	20
13	Protocole expérimental de l'évaluation de l'activité hémolytique.	21
14	Histogrammes montrant le pourcentage d'inhibition de l'extrait de CFG sur l'hémolyse en fonction de la concentration croissante de l'extrait de CFG.	27

Liste des tableaux

Tableau	Titre	page
I	Classification taxonomique de <i>Clematis flammula</i> .L	03
II	Les différents effets d'espèces réactives de l'oxygène.	07
III	Liste des différentes causes de l'hémolyse survenant in vivo et in vitro.	13
IV	Quelques exemples de plantes médicinales douées de l'activité anti-hémolytique.	16

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

1. Les plantes médicinales.....2

1.1. Description botanique « *clematis flammula* L. ».....2

1.1.1. Toxicité et composition chimique.....3

1.1.2. Utilisation traditionnelle.....3

2. Les composés phénoliques.....4

2.1. Généralités4

2.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....5

2.3. Classification.....5

3. Activités biologiques des extraits de plantes.....7

3.1. Activité antioxydants.....7

3.1.1. Radicaux libres.....7

3.1.2. Espèces réactives de l'oxygène.....8

3.1.3. Stress oxydatif et ses conséquences.....10

3.1.4. Systèmes de défenses antioxydants.....11

3.2. Activité anti-hémolytique.....12

3.2.1. Globules rouges.....12

3.2.2. Hémolyse.....13

3.2.3. Traitements anti-hémolytique.....15

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Matériels végétale17

2. Méthodes.....17

2.1. Préparation de l'extrait17

2.2. Dosage des polyphénols totaux.....18

2.3. Evaluation de l'activité antioxydants « Test DPPH ».....19

2.4. Evaluation de l'activité anti-hémolytique.....20

2.4.1. Préparation de la solution d'hématies.....20

2.4.2. Préparation de l'extrait	21
2.4.3. Protocole expérimentale de l'évaluation de l'activité anti-hémolytique.....	21
4. Etude statistique.....	22

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Taux d'extraction des extraits bruts	23
2. Activité antioxydants « test DPPH ».....	25
3. Activité anti-hémolytique de l'extrait <i>clematis flammula</i> L.....	36
3.1. Activité anti-hémolyse hypotonique.....	26
Conclusion.....	30
Références bibliographiques.....	31
Annexes	
Résumé	

INTRODUCTION

Introduction

Le règne végétal a depuis longtemps été considéré comme une source précieuse de produits naturels pour le maintien de la santé humaine. Selon l'organisation mondiale de la santé (l'OMS), l'utilisation des produits phytochimiques à des fins pharmaceutiques augmente progressivement dans de nombreux pays. En effet, les plantes médicinales sont la meilleure source pour obtenir une variété de traitements orchestré par une variété de métabolites secondaires considérés comme des substances actives capables de traiter de nombreux pathologies (**Selvamohan et al., 2012**).

Le stress oxydatif est défini comme un état dans lequel les systèmes producteurs des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dépassent le système antioxydants. Un état impliqué dans le développement de diverses maladies. En outre, une activité anti-radicalaire et neutralisante est apportée par les composés phénoliques en empêchant l'oxydation (**Zbadi et al., 2018**).

Les globules rouges en raison de leur forte teneur en acides gras insaturés et leur capacité à transférer de l'oxygène, sont constamment exposés au stress oxydatif, en l'occurrence, cela mène à la production des dommages membranaires (**Cyboran-Mikolajczyk et al., 2018**). Plusieurs études ont prouvé l'efficacité des extraits des plantes et leurs dérivés pour contrer les dommages médiés par les ERO chez les érythrocytes ainsi que l'hémolyse induite par un milieu hypotonique. Notamment, cette propriété a été attribué a la capacité de la stabilisation membranaire des globules rouges par la présence des composés phénolique, en outre, les flavonoïdes et les saponines (**Johri et al., 2017 ; Bhat et al., 2019**).

Clematis flammula L. appartient à la famille des ranunculaceae et contient un large éventail d'environ 355 espèces. Plusieurs composés phénoliques ont été identifiés dans son genre, notamment les saponines, les stéroïdes, les alcaloïdes et les caumarines. Leurs principales caractéristiques est d'offrir une variété de propriétés pharmacologiques, notamment analgésique, antibactérienne, anticancéreuse et anti-inflammatoire (**Yous et al., 2018**).

L'objectif de notre approche est d'effectuer une optimisation pour déterminer les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques contenus dans les graines de *Clematis flammula* L. afin d'évaluer les activités antioxydants et anti-hémolytique.

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les plantes médicinales

L'histoire des plantes médicinales et aromatiques a toujours été étroitement liée à l'évolution des civilisations et a toujours eu une place primordiale en phytothérapie, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (Amarti et al., 2011).

En l'occurrence, les plantes médicinales sont impliquées dans différents domaines sous forme de principes actifs, d'huiles, d'extraits et de composées de nombreux et variables principes actifs en fonction des espèces végétales. Consommées sous forme de solutions organiques, aqueuses ou sous leurs formes fraîches, elles sont considérées comme étant des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Iserin, 2001).

En parallèle, les différents genre de Clematis comme *Clematis gouriana Roxb*, *Clematis Tashiroi*, *Clematis Flammula* sont considérés comme des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies (Chawla et al., 2012).

1.1 Description botanique « *Clematis flammula* L. »

Clematis flammula L., également appelée Clématite brûlante, en Arab El Yasmine elbari et dans la région de la Kabilie, Azenzou est le nom qui lui est attribué. Est une plante à feuilles caduques avec une base ligneuse, de 3 à 5 m de hauteur. Ses feuilles sont composées de 9 à 15 folioles largement ovales et longues allant de 1,5 à 4 cm. Elle est dotée de très nombreuses fleurs blanches à odeur suave, disposées en panicules lâches qui mesurent 3 cm de diamètre, et composées de quatre sépales blancs ainsi que de nombreuses étamines blanches de 5 à 10 mm de long. Sa floraison se déroule de mai à août, suivie par une fructification plumeuse à aigrettes (Eichler et al., 2011). (Figure 01).



Figure 01 : Feuilles et fleurs de *Clematis flammula* L. (photographies originales).

La systématique de cette plante décrite par (Miikeda *et al.*, 2006) est présentée dans le tableau N° I comme suite :

Tableau N° I : Classification taxonomique de *Clematis flammula* L. (Miikeda *et al.*, 2006).

Règne	plantes
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsides (dicotylédones)
Sous classe	Magnolides (polypetales)
Ordre	Ranunculales
Famille	Ranunculacées
Genre	Clematis
Espèce	<i>Clematis flammula</i> L.

1.1.1 Toxicité et composition chimique

Le Genre Clematis est doté de nombreux constituants tels que les coumarines, les flavonoïdes, les tri-terpènes, les lignanes, les alcaloïdes, les huiles volatiles, les huiles essentiels, les stéroïdes, les composés macrocycliques, les polyphénols et les saponines. Ces différentes molécules sont utilisées pour soigner plusieurs pathologies. Malgré leur utilisation en médecine traditionnelle, ces espèces possèdent d'autres molécules toxiques telles que la protoanémone, l'acide aristolochique, l'anémone et la clématine qui sont des substances chimiques irritantes pour la peau et les muqueuses. Néanmoins, l'effet néfaste de ces molécules disparaît lorsque cette plante est asséchée (Chawla *et al.*, 2012).

1.1.2 Utilisation traditionnelle

Les parties aériennes des différentes espèces de clématites sont particulièrement utilisées en Europe et en Asie de l'Est comme antidysentérique, diurétique, antipaludéen, antidote aux morsures de serpent, dans le traitement des affections cutanées chroniques, goutte, varice, des maladies osseuses, cataplasme pour traiter les plaies purulentes, les cloques ainsi que les ulcères cutanés. En Chine, elles sont utilisées pour traiter les rhumatismes, en Corée, les parties aériennes sont utilisées pour traiter l'asthme, le bérubéri et comme anti-inflammatoire. En Afrique du Sud, l'infusion d'écorce, de tige et de feuilles est utilisée pour traiter la schistosomiase (Chawla *et al.*, 2012). En Algérie, dans la région de Kabylie, les feuilles de *Clematis flammula* L. sont utilisées pour traiter l'arthrite, les brûlures superficielles et

comme insectifuge pour prévenir la détérioration des céréales (Atmani et al., 2011). En Tunisie, la partie aérienne est utilisée dans le traitement des maladies de la peau et les muqueuses. L'équipe de Saidi et al. (2017) a démontré que malgré sa toxicité, l'anémoneine, présente à de très faibles concentrations dans l'huile essentielle des parties aériennes de clématite, a l'effet exactement inverse de ce qu'on lui attribue, notamment dans le traitement des lésions cutanées (Saidi et al., 2017).

2 Les composés phénoliques

2.1 Généralités

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, ils forment un très vaste ensemble de substances chimiques naturelles. Largement répandus dans le règne végétal, ils ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Martin et Andrantsitohaina, 2002) (Figure 02).

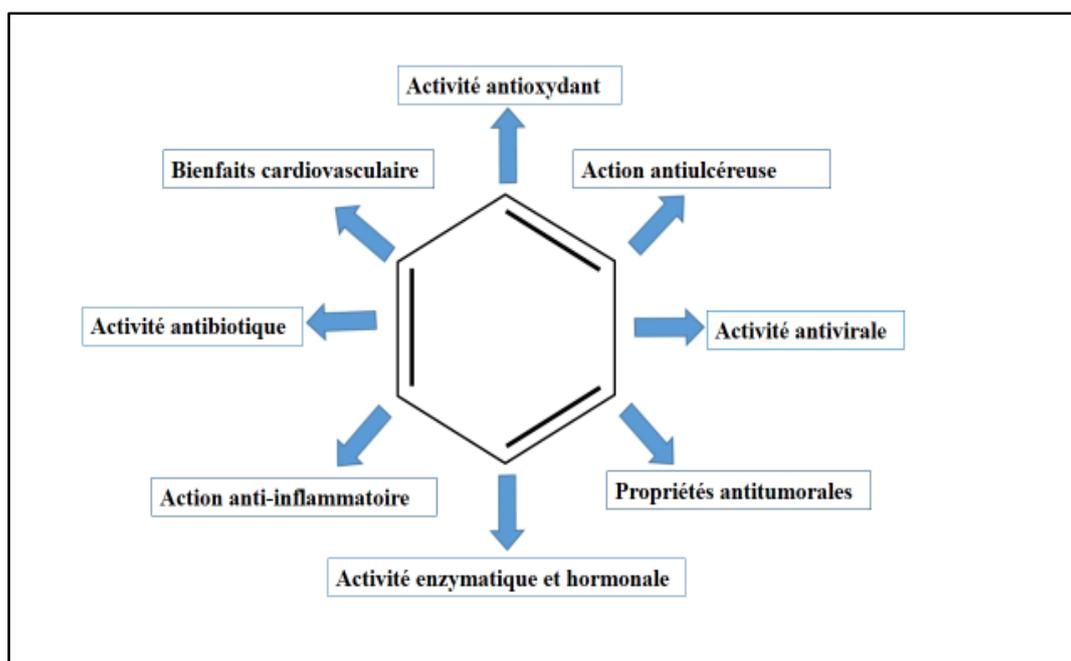


Figure 02 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andrantsitohaina, 2002).

Ces composés possédants dans leur structure en commun, au moins un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles substitués à d'autres molécules, fréquemment à des sucres (résidus glycosides) (Lourdes Reis Giada, 2013). Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, ils se répartissent des plus simples composés, tel que les acides phénoliques aux composés hautement polymérisés tels que les tanins (Martin et Andrantsitohaina, 2002).

2.2 Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir d'hydrates de carbone via deux voies : (Martin et Andrantsitohaina, 2002).

- Celle de l'acide shikimique : responsable de la conversion des glucides phosphates, issue de l'oxydation des pentoses phosphates après transamination et / ou désamination, en acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples.
- Celle de l'acétate : qui conduit à des polyacétates de longueurs variables menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou à des naphthoquinones.
- ✓ La combinaison des deux voies conduit à la formation de composés d'origine mixte, les flavonoïdes.

2.3 Classification

Les composés phénoliques peuvent être classés de différentes manières pour la raison de leur diversité et la présence d'un grand nombre de structures hétérogènes (Lourdes Reis Giada, 2013).

➤ Acides phénoliques :

Ils sont synthétisés à partir de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque. Les acides phénoliques représentent environ un tiers des composés polyphénoliques de notre alimentation et se retrouvent dans toutes les matières végétales, mais ils sont particulièrement abondants dans les fruits au goût acide (Pandey et Rizvi, 2009). Ces substances se caractérisent par la présence d'un cycle benzénique, d'un groupe carboxylique et d'un ou de plusieurs groupes hydroxyles et/ou de méthoxyle dans la molécule (LourdesReis Giada, 2013) (Figure 03).

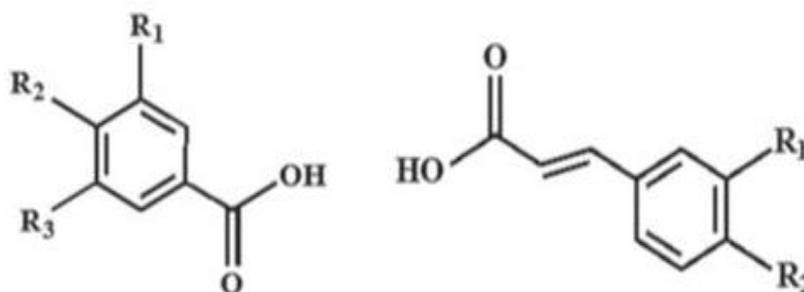


Figure 03 : Structure de base des composantes des acides phénoliques (Pandey et Rizvi, 2009).

➤ **Flavonoïdes :**

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal, ils possèdent un squelette composé de 15 carbones (C6-C3-C6), dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B), d'un hétérocycle oxygéné et d'un cycle C. Ils sont responsables des pigmentations jaune, rouge et orange des fleurs, des fruits ainsi que des feuilles. Cette catégorie est connue principalement pour leur activité antioxydants, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de pathologies (**Ghedira, 2005**).

Selon l'état d'oxydation du noyau centrale, les flavonoïdes sont répartis en six sous-groupes : les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones, et les anthocyanidines (**Abbase et al., 2017**) (Figure 04).

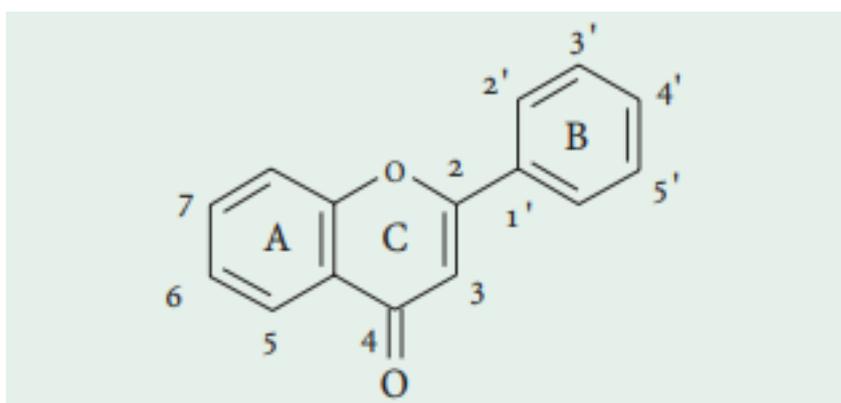


Figure 04 : Structure de base squelette des flavonoïdes (**Ghedira, 2005**).

➤ **Tannins :**

Les tannins sont des composés phénoliques polaires d'origine végétale, à poids moléculaire variant entre 500 et 3000 Dalton (**Berthod et al., 1999 ; Lourdes Reis Giada, 2013**). Composants ainsi, soit les esters galloyliques, soit les proanthocyanidines oligomères et polymère, lesquels, sont issus de la voie shikimique. Les tannins constitués de répétitions variables de (C6-C3-C6) avec une capacité de se complexer avec les hydrocarbures et les protéines, ce qui explique leurs propriétés tannantes. Selon leurs structures et leurs origines biologiques, les tanins sont classés en deux groupes principaux, à savoir les tannins hydrolysables, composés d'acides ellagiques et galliques avec noyau de sucre principalement du glucose et les tannins condensés sont composés de flavonoïdes sans noyau de sucre (**Das et al., 2020**) (Figure 05).

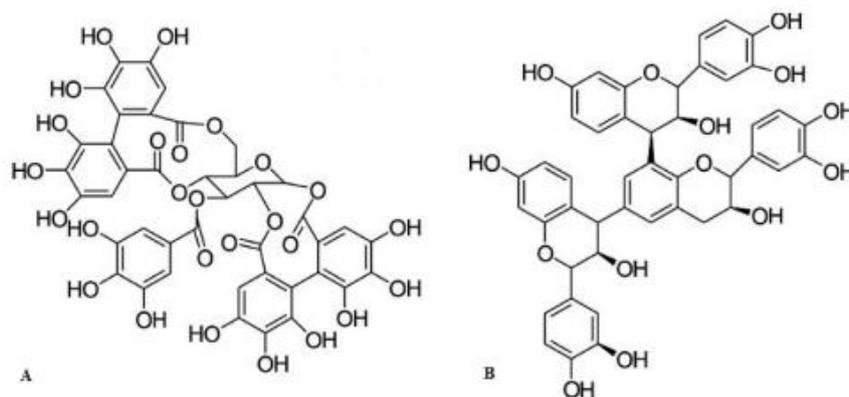


Figure 05 : Structure des tanins (A) hydrolysables et (B) condensés (Das *et al.*, 2020).

3 Activités biologiques des extraits de plantes

3.1 Activité antioxydants

Certains extraits ont un potentiel d'activité antioxydants liés principalement à la structure des composés phénoliques plus précisément à la présence et au nombre de groupements hydroxyles ainsi qu'aux effets de conjugaison et de résonance des doubles liaisons. Ces composés sont capables de piéger les radicaux libres, soit par transfert d'un atome d'hydrogène ou d'un électron (Bendray *et al.*, 2013).

3.1.1 Radicaux libres

La production des radicaux libres (RL) dans l'organisme et au sein des différentes cellules est continue par de nombreux mécanismes tant exogène que endogène (Beaudeau *et al.*, 2006). Un RL est une espèce chimique (atome ou molécule), capable d'avoir une existence indépendante en contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs couches externes, ce qui leur confère une très grande instabilité (Halliwell et Whiteman, 2004) (Tableau N° II) (Ozcan et Ogun, 2015 ; Krumova et Cosa, 2016).

Tableau N° II : Les différents effets d'espèces réactives de l'oxygène

Effets néfastes	Effets physiologiques
<ul style="list-style-type: none"> - impliqué dans le dommage oxydatif cellulaire à l'ADN, aux protéines, aux lipides. - contribuent à un large éventail de pathologies - Les cibles atomiques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Messagers dans la signalisation cellulaire. - Régulation de la prolifération, de la migration, de la contraction cellulaire. - Interaction avec des groupes fonctionnels spécifiques des protéines cibles.

➤ **Les radicaux libres endogènes**

Les radicaux libres endogènes peuvent provenir de différents compartiments cellulaires. La mitochondrie est la source majeure même en cas d'hypoxie mitochondriale (**Beaudeau et al., 2006**). Ils peuvent aussi être produits par le cytochrome P450 (**Goepfert et al., 1995**), ainsi que par différentes enzymes tels que la xanthine oxydase, la NAD(P)H oxydase, les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2), la NO synthase, les lipoxygénases (LPO) ou la myéloperoxydase (MPO) (**Beaudeau et al., 2006**).

➤ **Les radicaux libres exogènes**

Les radicaux libres d'origine extérieur, proviennent essentiellement de la consommation d'alcools, de la fumée de tabac, de l'exposition aux rayonnements, des rayons X ou Y, des solvants organiques et des pesticides, de la pollution, de la contamination par des produits chimiques tel que les xénobiotiques (toxique, médicaments), des carences nutritionnelles, de l'amiante, les ultra-sons, des micro-ondes et des métaux lourds (**Favier, 2003 ; Morelle, 2003**).

3.1.2 Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des espèces oxydantes incluant à la fois les radicaux libres oxygénés et certains dérivés non radicalaires de l'oxygène. Ces derniers sont facilement transformables en radicaux dont la toxicité est plus importante (**Halliwell et Whiteman, 2004**).

➤ **Génération des espèces réactives à l'oxygène**

Les molécules d'oxygène (O_2) sont des bi-radicaux. En effet, il possède deux électrons simples dans des orbitales différentes. L'oxygène est capable de recycler quatre électrons, mais sa capacité oxydative est limitée par d'importantes barrières dynamiques (**Barouki, 2006**). Communément, la génération des ERO est une cascade de réactions qui commence par la formation de l'anion superoxyde (**Ozgan, 2014**).

- **Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$**

En présence de métaux, rayonnements, d'enzymes oxydase ou complexe de la chaîne respiratoire, l' O_2 est capable de capter un électron pour former un radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (**Barouki, 2006**). Or, il est naturellement synthétisé par les macrophages, les phagocytes polynucléaires ainsi que par la réduction d' O_2 par différents oxydase comme NADPH oxydase selon les réactions suivantes (**Morelle, 2003 ; Barouki, 2006 ; Wu et al., 2009**).



- **Peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , est produit à partir de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase (SOD) via une réaction de dismutation (**Barouki, 2006**). Cette enzyme est également générée par les macrophages comme moyen de défense. Bien que le peroxyde ne soit pas un radical libre, il engendre un O_2 très réactif, lequel, est un radical libre. Cette réaction se fait selon les étapes suivants (**Morelle, 2003 ; Wu et al., 2009**) :



- **Radical hydroxyle OH^{\cdot}**

Une molécule hautement réactive c'est le radical le plus dangereuse, qui puisse être générée durant la réaction de Fenton/ Haber-Weiss (**WU et al., 2009 ; Ozgan, 2014**).



En outre, en l'action de la xanthine-oxydase, laquelle, sous l'influence de certaines radiations et des métaux le peroxyde d'hydrogène est cassé en libérant un radical hydroxyle et un atome d'hydrogène (**Ozgan, 2014**).

- **L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$**

Est une forme excitée de l'oxygène moléculaire, non radicalaire, peut être générée en présence d'oxygène et les rayonnements UV sous l'influence de ces dernières $^1\text{O}_2$ peut être transformé en oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (**Barouki, 2006 ; Ozgan, 2014**) selon la réaction suivante :



- **Les radicaux alcoxyl (RO) et peroxyde (ROO)**

La présence des métaux de transition et rayons ultra violet provoque une destruction des peroxydes ce qui entraîne la formation de ces radicaux selon les réactions suivantes (**Ozcan, 2014**) :



- **Radical peroxynitrite ONOO^- :**

L'intération de $\text{O}_2^{\cdot -}$ avec un autre radical libre qui est l'oxyde nitrique NO conduit à la formation d'un radical toxique le peroxynitrite ONOO^- (**Barouki, 2006**).



3.1.3 Stress oxydatif et ses conséquences

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la formation excessive (ERO) et la diminution des défenses antioxydants de l'organisme (Halliwell et Whiteman, 2004).

La majorité des maladies causées par le stress oxydatif se développent avec l'âge, créant des lésions au niveau des protéines, de l'ADN et des lipides (Favier, 2003).

➤ Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles de l'attaque par les radicaux hydroxyles OH^\bullet , ces radicaux sont capables d'extraire l'hydrogène du carbone situé entre deux doubles liaisons pour former des radicaux diènes conjugués puis oxydés en radicaux libres pyroxylés qui vont s'associer avec d'autres acides gras pour former des nouveaux radicaux diènes conjugués qui sont les hydroperoxydes. Ces hydroperoxydes peuvent être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase, ou poursuivre de l'oxydation et décomposition en aldéhydes acides et alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui sont éliminés par les poumons. Les radicaux peroxydes peuvent libérer une variété d'aldéhydes toxiques, y compris le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal.

Cette réaction est très néfaste à l'organisme allant à la formation des LDL oxydés, des plaques d'athérosclérose et un chamboulement dans la transduction de signaux cellulaires (Favier, 2003) (Figure 06).

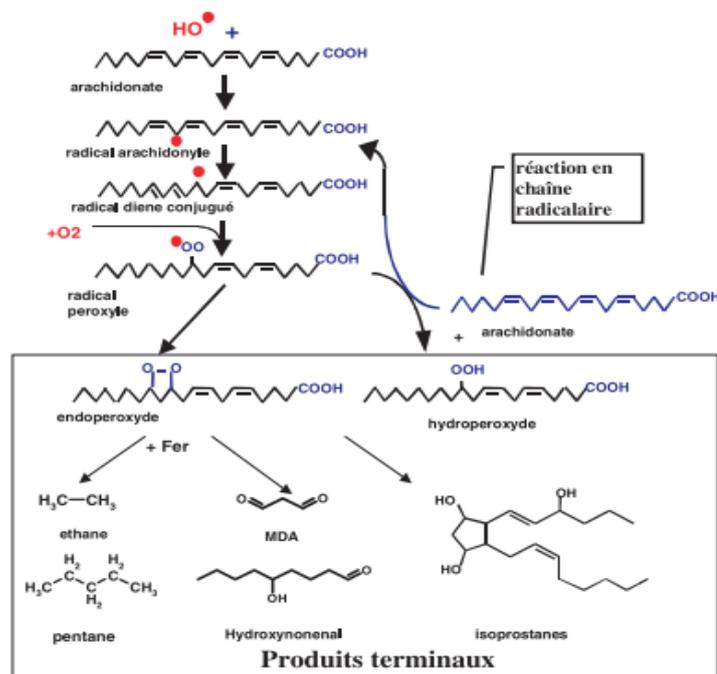


Figure 06 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

3.1.4 Systèmes de défenses antioxydants

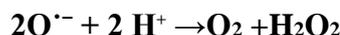
Les antioxydants sont une classe de substances ou d'enzymes qui neutralisent les radicaux libres et préviennent ainsi l'apparition de maladies associées au stress oxydatif (**Kulawik et al., 2013**). Ils peuvent agir selon les mécanismes suivants :

- Les antioxydants sont convertis en radicaux libres, lesquels ensuite évoluent en produits d'oxydation stables, conduisant à l'épuisement des oxydants (**Halliwell, 1995**).
- les molécules réagissent avec les radicaux peroxy ou alcoxy pour former des produits non radicalaires, interrompant ainsi la propagation de la peroxydation (**Schafer et Buettner, 1999**).

A. Les antioxydants enzymatiques endogènes

Quatre types d'enzymes antioxydants existent pour éliminer les ERO comme le montre la figure 07.

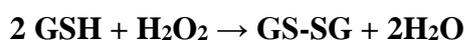
- ❖ **Superoxyde dismutase (SOD)** : localisée au niveau extracellulaire dans le cytosol ou le noyau de tous les types de cellules, ainsi que dans les mitochondries (**Wu, 2009**). Sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (**Matés et al., 1999 ; Morelle, 2003**). Selon la réaction suivante :



- ❖ **La catalase** : Retrouvée dans toutes les cellules de l'organisme, la catalase catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Morelle, 2003 ; Valko et al., 2006**).



- ❖ **La glutathion peroxydase (GPx)** : ce type d'enzyme est omniprésent dans le cytosol et dans les mitochondries (**Wu, 2009**). Les GPx interviennent dans un système bi-enzymatique ou combinée à la glutathion réductase (GR) et utilise le glutathion comme donneur d'hydrogène qui se transforme en glutathion oxydé (GSSG) et réduit les peroxydes en H_2O_2 et en ROOH (**Morelle, 2003 ; Valko et al., 2006**). Selon les réactions suivantes :



- ❖ **La glutathion réductase** : réduit le glutathion oxydé, oxydant ainsi le NADPH en $NADPH^+$, et enfin le GSH est régénéré par catalyse au glutathion réductase (GR) (**Serdar et al., 2006**).



B. Les antioxydants non enzymatiques

Les plus actifs sont les vitamines (A, C, E), cependant, il existe d'autres molécules très utiles en cytoprotection tels que le glutathion et l'ubiquinone, la transferrine, la céruloplasmine, l'albumine, les thiols, l'acide α -lipoïque, les oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse) ainsi que les polyphénols qui peuvent être classés comme scavengers des radicaux libres et chélateurs des métaux de transition (Fr, Cu) (Defraigne et Pincemail, 2008).

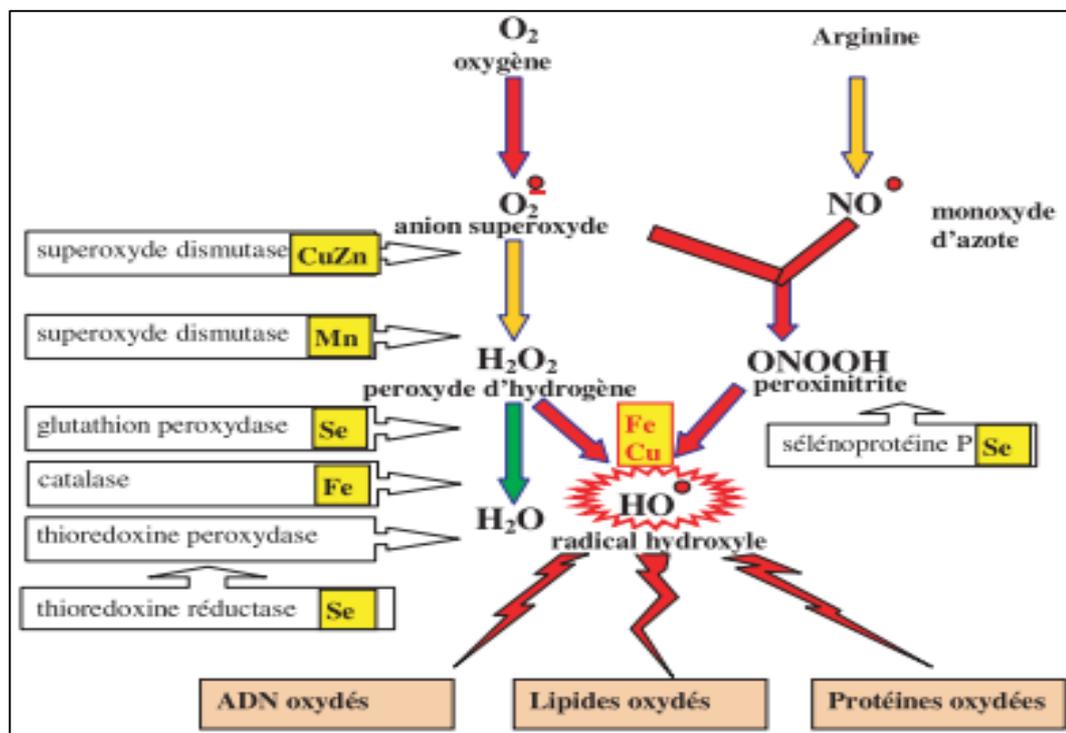


Figure 07 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

3.2 Activité anti-hémolytique

3.2.1 Globules rouges

Les globules rouges (GR), appelés également érythrocytes aussi les hématies, ils représentent un quart des cellules du corps humain avec plus de 2 milliards de nouveaux érythrocytes fabriqués chaque jour. Ce sont de petites cellules anucléées avec une forme biconcave composées essentiellement d'une membrane plasmique à perméabilité sélective, cytoplasme comportant : 95 % d'hémoglobines (Hb), de l'eau, des ions (K^+ essentiellement), des enzymes, et du glucose. Ces cellules mesurant $8\mu\text{m}$ du diamètre et $2\mu\text{m}$ d'épaisseur, avec un cycle de vie qui dure 120 jours. Elles apportent d'oxygène aux tissus du corps et exportent

le dioxyde du carbone (CO₂) des tissus aux pommons (Lévy, 2001 ; Ruggeri *et al.*, 2018 ; Yeo *et al.*, 2019).

➤ Membrane érythrocytaire

Le globule rouge caractérisé par une membrane comprenant une double bicouche lipidique, stabilisée par du cholestérol, se composant de plusieurs protéines pouvant être : soit superficielles et mobiles, soit transmembranaires soit sous membranaires. A l'extérieur, il existe une couche supplémentaire riche en mucopolysaccharides définissant les groupes sanguins (Lévy, 2001 ; Tortora *et al.*, 2014).

3.2.2 Hémolyse

Le processus d'hémolyse est caractérisé par une dégradation accélérée des membranes érythrocytaires, libérant ainsi leurs contenus. Dans ce phénomène non seulement l'hémoglobine est libérée, mais également d'autres composants du cytoplasme des érythrocytes tels que : le lactate déshydrogénase et le potassium. L'hémolyse peut être due soit à des raisons physiopathologiques, soit à des causes exogènes au patient (tableau N° III) (Marques-Garcia, 2020).

Tableau N° III : Liste des différentes causes d'hémolyse survenant in vivo et in vitro.

Causes de l'hémolyse in vivo	
Congénitale	Acquis
Défauts d'hémoglobine	Causes à médiation immunitaire
Défauts de la membrane RBC	hypersplénisme
Métabolisme défectueux des globules rouges	Brulures
Déficit en glucose-6- phosphate déshydrogénase	Infections
Déficit en pyruvate kinase	Domages mécaniques en circulation
Autres déficits en enzymes érythrocytaires	Erreurs d'immunophénotypage en transfusion sanguine
	Drogues (pénicillines..) et toxines (plomb...)
Causes de l'hémolyse in vitro	
Dépendant de l'opérateur	Manipulation du spécimen
	Transport du spécimen
Dépend de l'appareil	Traitement des échantillons
	Stockage du spécimen

➤ **Impacte du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase sur la membrane érythrocytaire (hémolyse) :**

Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est le déficit enzymatique le plus répandu. Il est responsable d'un stress oxydatif qui détruit la membrane des érythrocytes et provoque une anémie hémolytique (Saoud, 2019). La G6PD occupe une place particulièrement importante dans le métabolisme rudimentaire du globule rouge.

Elle catalyse la première étape de la voie des pentoses phosphatase qui transforme le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone et réduit le coenzyme, le nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (NADP), en NADPH (White et al., 2017).

Ce qui aide à préserver la forme réduite du glutathion (GSH), le GSH agit comme un antioxydants et élimine le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) des cellules pour les protéger contre les dommages oxydatifs par conséquent, une carence en G6PD peut entraines une accumulation excessive de H_2O_2 et les dommages oxydatifs qui peuvent conduire à une destruction de la membrane cellulaire des globules rouge (Jeon et al., 2021) (Figure 08).

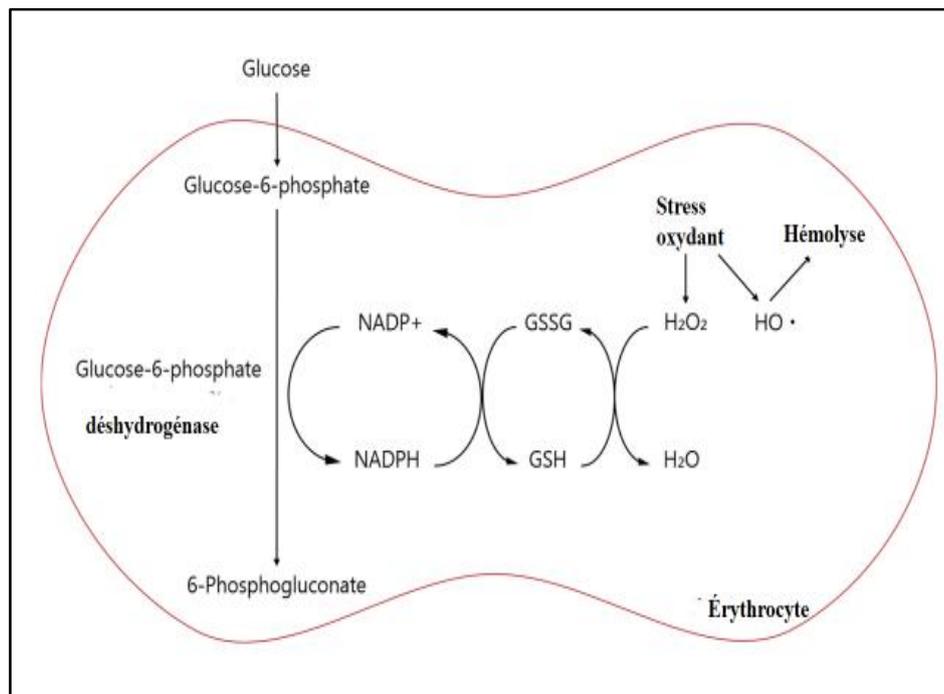


Figure 08 : Voie de la pentose phosphatase dans les globules rouges (Jeon et al., 2021).

➤ **Maladies liées à l'hémolyse :**

L'hémolyse se représente sous la forme d'une anémie aigue ou chronique on en distingue trois types.

1. Anémie hémolytique auto-immune (AIHA)

Elle se développe grâce aux auto-anticorps anti-globule rouge qui se lient aux globules rouge et provoquent une accélération de destruction de ces dernières, Selon les caractéristiques d'auto-anticorps AIHA on distingue l'AIHA chaud et l'AIHA froid (Yokoyama et *al.*, 2004).

2. Anémie hémolytique immunitaires médicamenteuse

C'est une anémie rare qui produit des anticorps induits par des médicaments comme la pénicilline, le céfotétan, la ceftriaxone et les anti-inflammatoire non stéroïdiens (Philips et *al.*, 2018).

3. Anémie allo-immun

On distingue deux situations d'anémie allo-immun : transfusion de composants sanguins et maladie hémolytique du nouveau-né, dans les deux cas, les allo-anticorps de types igG des globules rouge sont formé après exposition à des antigènes érythrocytaire étrangers (Domen, 1998).

3.2.3 Traitements anti-hémolytique

A. Anti-hémolytique synthétique

Les médicaments anti-hémolytique retardent ou inhibent la lyse des globules rouges. Plusieurs sont existants, on citera l'acide folique, les suppléments de fer, la vitamine B12 ainsi que d'autres vitamines, les corticostéroïdes, les stéroïdes, les médicaments immunosuppresseurs (Federici et *al.*, 2007 ; Zanella et *al.*, 2014 ; Barcellini et *al.*, 2015).

B. Anti-hémolytique d'origine végétale

L'étude et la recherche de substance anti-hémolytique d'origine végétale est en plein essor. En effet, les études menées montrent que les plantes constituent un réservoir de substance à potentiel anti hémolytique dont le mécanisme d'action reste à déterminer de manière générale. Quelques exemples en sont cités dans le tableau N° IV.

Tableau N° IV : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique

Matrice végétale	Tests utilisés	Effets	références
Extrait de Feuilles <i>Gymnemas ylvestre</i>	Hémolyse induit par le H ₂ O ₂	Effet anti-hémolytique : IC50= 29,83g/ml	(James et Alewo, 2014)
Extrait de Fleurs <i>Albutinus indicum</i>	Hémolyse induite par NaCl	Effet anti-hémolytique : 70,24% à 1 mg/ml d'extrait	(Shobana et Vidhya, 2016).
Extrait de feuilles <i>Piber betel</i>	Hémolyse induite par le H ₂ O ₂	Effet anti-hémolytique : 40,6% pour une concentration de 5 mg/ml.	Chakraborty et Shah, 2011).
Extrait de feuilles <i>Spilanthes paniculata</i>	Hémolyse induit par la chaleur	Effet anti-hémolytique : 34,21 % à 1 mg/ml d'extrait.	(Hossain et al., 2014)
Extrait de feuilles <i>Mucuna pruriens</i>	Hémolyse induit par solution hypotonique	Effet anti-hémolytique : 69,31 % à 80 µg /ml d'extrait	(Assumptaanosike et Ngozi igboegwu, 2019)
Extrait de feuilles <i>Arbutus unedo</i>	Hémolyse induit par HOCL	Effet –anti-hémolytique 73,90 % à 1 mg/ml d'extrait	(Moualek et al., 2016).
Extrait de feuilles <i>Arbutus unedo</i>	Hémolyse induit par une solution hypotonique	(Effet anti-hémolytique 69,% à 1,6 mg/ml d'extrait	(Moualek et al., 2016).

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

1 Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur l'extrait éthanolique des graines d'une plante largement utilisée en médecine traditionnelle : *Clematis flammula* (Figure 09).



Figure 09 : Graines de *Clematis flammula* L.(photographie originale).

2 Méthodes

2.1 Préparation de l'extrait

- **Récolte :**

La plante a été récoltée en Novembre de l'année 2021 au Nord de Bejaia, et a été identifiée dans le département de botanique de l'université de Bejaia.

- **Séchage :**

Les graines ont été séchées dans un endroit aéré et ombragé afin d'éliminer toutes les traces d'humidités tout en préservant la composition phénolique.

- **Broyage et tamisage :**

Après séchage et trie, les graines de *Clematis flammula* L. ont été tamisées dans une tamiseuse pour obtenir une poudre de 250 μm de diamètre.

Ensuite la poudre a été stockée dans des bocaux fermés en verre et conservés au frais jusqu'à son utilisation.

- **Optimisation des conditions d'extraction :**

Dans la présente étude, différentes études préliminaires ont été réalisées pour déterminer les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques contenus dans les graines de *Clematis flammula* L. par l'utilisation de la macération comme méthode d'extraction.

- ✓ **Macération 1** : consiste à mélanger à une température donnée différentes masses (50 mg, 75 mg, 100 mg) de poudre dans 4 ml d'éthanol à différentes concentration d'éthanol/eau (de 0% à 100%) et laisser agiter le tout pendant différentes durées de temps allant d'une demi-heure à 6h, puis, centrifugé pendant 5 min à 6000 rpm.
- ✓ **Macération finale** : consiste à mélanger à une température adéquate, 50 mg de quantité de poudre dans 4 ml d'éthanol à une concentration d'éthanol et à une durée de temps lesquels ont donné une activité DPPH et un taux de polyphénols optimales choisies par le logiciel JMP Pro14.

- **Extraction :**

Après plusieurs essais d'optimisation de l'extraction menés au sein du laboratoire de biochimie appliquée, l'étape finale optimale de décoction a été sélectionnée. Une quantité de 50 g de poudre a été macérée dans 1600 ml d'éthanol puis mise dans un bain Marie, sous agitation, à une température et pendant une durée adéquate, après le mélange a été met dans les éprouvettes, suivi d'une décantation de 18 h à l'obscurité . l'évaporation du solvant chargé de polyphénol s'est faite à l'aide d'un rota vapeur à pression et l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* L. (EECF) a été conservé dans des boîtes de pétri en verre ombré à moins 20 C° afin de préserver ses principes actifs. Le taux d'extraction a été calculé suivant la formule suivante :

$$[\text{Rendement (\%)} = (\text{poids de l'extrait sec/ poids de la matière première végétale}) \times 100]$$

2.2 Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Le principe de la méthode de Folin-Ciocalteu est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait polyphénolique, ce qui provoque une oxydation des composées phénolique, donnant un complexe de couleur bleu (Ali-Rachedi, 2018).

- **Procédure expérimentale**

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode décrite par Singleton et Ross, (1965) avec quelques modifications (Figure 10).

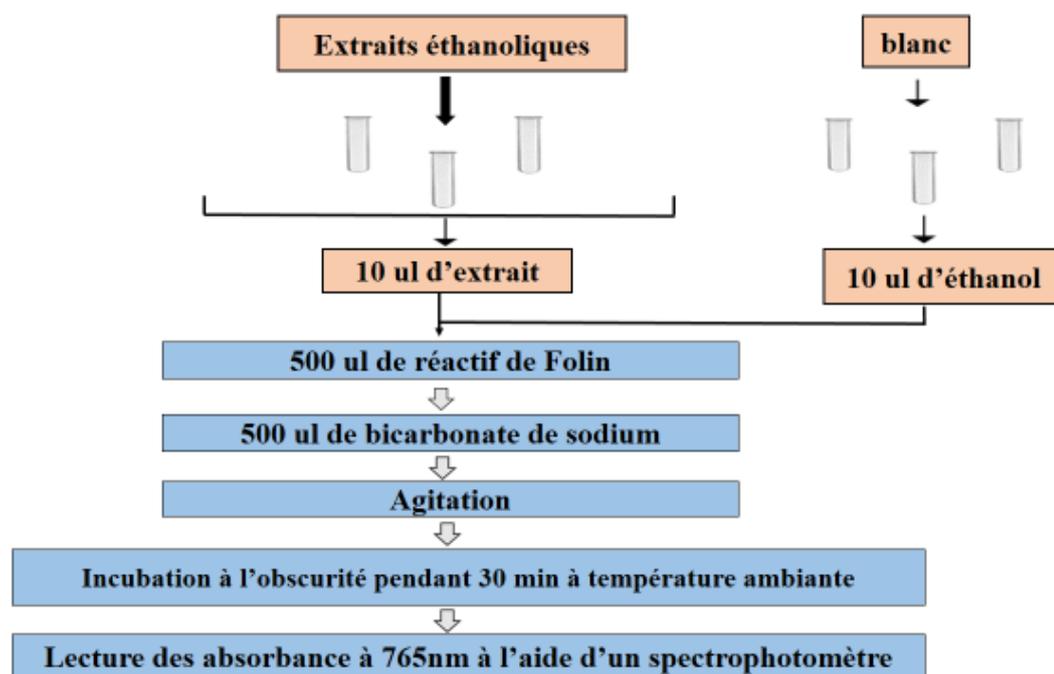


Figure 10 : Schéma représentant les différentes étapes de dosage des polyphénols totaux

2.3 Evaluation de l'activité antioxydants « Test DPPH »

- Principe

Le DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violette foncée (forme oxydante) qui se transforme en coloration jaunâtre (forme réduite) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine en présence d'antioxydants dans les différentes concentrations de l'extrait des graines de C.F dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu. Cette décoloration a été mesurée par spectrophotométrie à 517 nm (Molyneux, 2003) :



Ou (AH) n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH pour le transformer en molécule DPPH- H (Brand-Williams et al., 1995) (Figure 11).

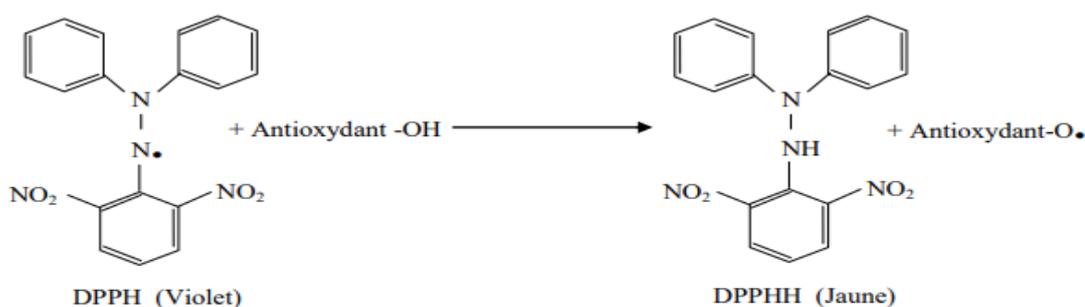


Figure 11 : Réaction d'un antioxydants avec le radical DPPH (Talbi et al., 2015).

- **Procédure expérimentale**

La mesure de l'activité anti radicalaire DPPH a été effectuée selon le protocole expérimental décrit par **Molyneux, (2003)** avec quelques modifications (Figure 12).

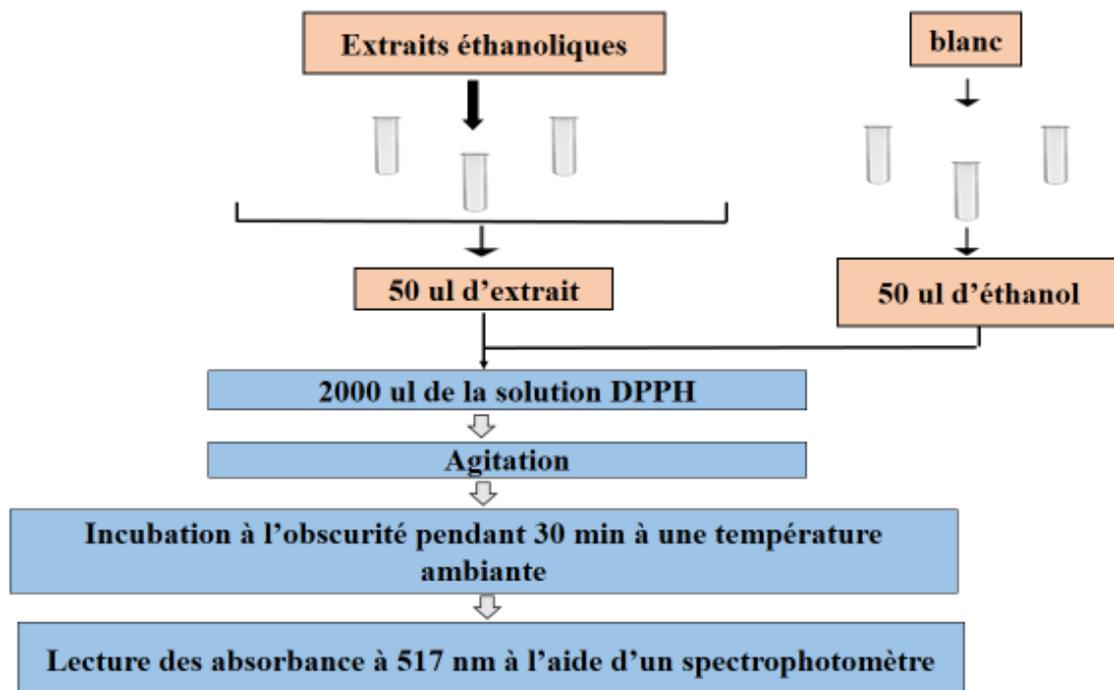


Figure 12 : Schéma représentant le protocole de mesure de l'activité anti-radicalaire DPPH.

L'activité anti radicalaire de chaque extrait a été estimée en pourcentage d'inhibition selon la formule suivant :

$$I\% = [(AC-AE) / AC] \times 100$$

AC : absorbance de contrôle (solution de DPPH)

AE : absorbance de l'échantillon

2.4 Evaluation de l'activité anti-hémolytique

L'évaluation de l'activité anti-hémolytique a été réalisée selon la méthode décrite par **Tanaka et al. (1973)** avec quelques modifications.

2.4.1 Préparation de la solution d'hématies

Le sang utilisé a été prélevé sur tube hépariné à partir de cinq donneurs sains différents, puis centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min pour éliminer le surnageant. Le culot a été récupéré et lavé trois fois avec une solution PBS iso-saline formée de tampon phosphate de potassium (pH=7,4) et de NaCl (0,9%). Chaque lavage consiste en une suspension des cellules dans du PBS Iso-salin et une centrifugation à 3000 rpm/15min. Après la dernière centrifugation, le

culot est resuspendu à nouveau dans une solution du PBS iso-salin à raison de faire la dilution (1/9). Puis, mis au frais jusqu'au moment de leur utilisation.

2.4.2 Préparation de l'extrait

Une quantité de l'extrait a été dissoute dans une solution hypotonique à (pH 7,4), puis mise au sonicateur et vortexée pendant quelques minutes, puis une dilution a été réalisée pour avoir différentes concentrations de l'extrait.

2.4.3 Protocole expérimentale de l'évaluation de l'activité anti-hémolytique

On a distribué 0,125 ml de sang isotonique dilué dans chaque un des tubes puis on a ajouté 1,25 ml d'extrait hypotonique dilué au tube 1, cinq répétitions ont été faites pour les quatre concentrations de chaque groupe sanguin, au tube 2 on a ajouté 1,25 ml d'acide ascorbique (cinq répétitions pour concentration 0,5 et cinq d'autre pour concentration 0,25), pour les témoins positifs on a ajouté 1,25 ml solution hypotonique une hémolyse va se produire alors les témoins négatifs on a ajouté 1,25 ml solution isotonique, puis on met tout dans une étuve à 37 C° pendant 10 minutes et la lecture de l'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre VIS-723 G. (Figure 13).

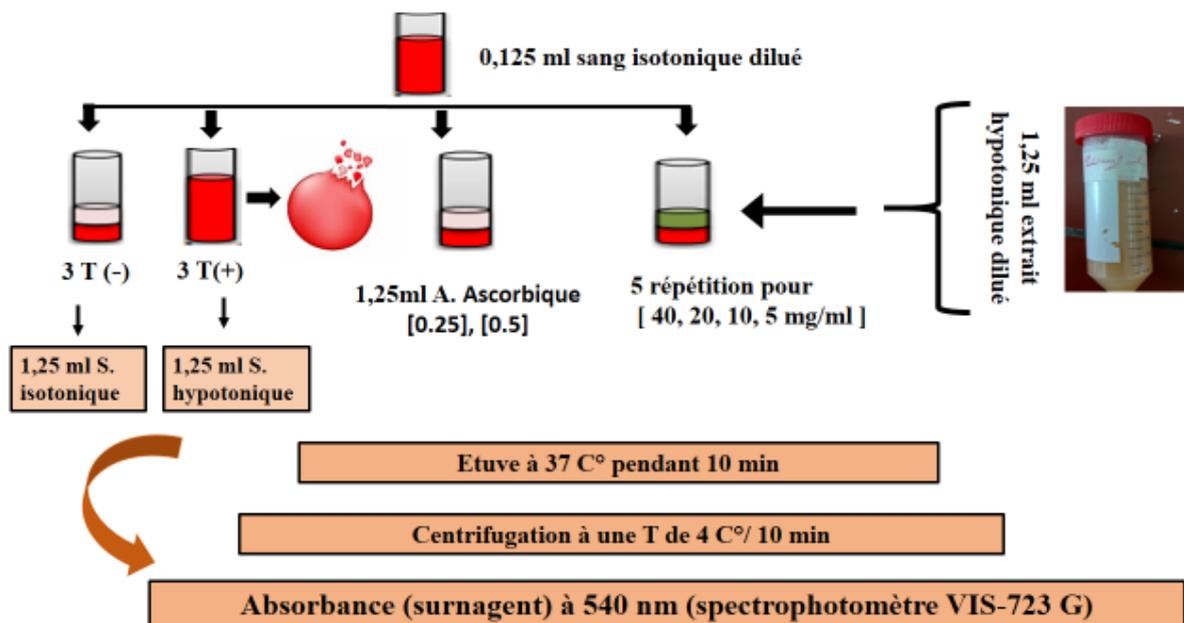


Figure 13 : Protocole expérimental de l'évaluation de l'activité anti-hémolytique.

3 Etude statistique

Le logiciel JMP Pro14 a été utilisé pour la partie optimisation de l'extraction des polyphénols. Les résultats *in vitro* ont été exprimés en moyenne \pm écart type (SD) pour le DPPH et pour les phénols totaux. Les tests anti hémolytiques *in ex vivo* ont été obtenus avec cinq répétitions. L'analyse de variance (modèle one-way ANOVA) a été réalisée en combinaison avec le test de Dunnett pour plusieurs comparaisons en utilisant le logiciel Graph Pad Prism5.03 (États-Unis). Les différences avec les témoins ont été prises en compte significatif à * $p < 0,05$.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

1 Taux d'extraction des extraits bruts

Le séchage des graines de *Clematis flammula* L., à une température ambiante, dans un endroit aéré et ombragé a pour but d'éliminer toutes les traces d'eau afin d'éviter la détérioration des composés phénoliques (**Macheix et al., 2004**).

Le protocole de l'extraction par macération des graines de *Clematis flammula* L. (CF) dans l'éthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute avec un aspect pâteux, de couleur marron brique brillante et une forte odeur.

L'étape important du présent travail a consisté en l'extraction des principes actifs de (CF), afin d'obtenir un extrait contenant un maximum de composés phénoliques ; pour cette raison une optimisation des conditions d'extraction a été adoptée. En effet, il a été noté que l'utilisation de l'éthanol comme agent extracteur avait été un solvant adéquat pour l'obtention d'une quantité considérable de composés polyphénoliques, car, il avait la capacité de solubiliser les composés phénoliques, moyennement polaires (**Cowan, 1999**).

D'après les résultats obtenus nous notons que le taux d'extraction des polyphénols totaux est égal à $0,08 \pm 0,007$ mg EAG/g de poudre végétal, cette valeur est différente de celle obtenue par **Atmani et al. (2009)** $19,65 \pm 3,61$ mg EQ catechin/g extrait ainsi que par **Atmani et al. (2011)** $80,14 \pm 20$ mg catechin équivalent/ g extrait, sachant que le même solvant d'extraction qui est l'éthanol a été utilisé. En effet, ce type de solvant conduit à la création d'une moyenne modérément polaire qui assure à la fois l'extraction des composés phénoliques et la préservation de leur activité antioxydants.

L'étude par **Ourabah et al. (2020)** avait apporté un taux en polyphénols totaux supérieur à nos résultats ($26,65 \pm 0,43$ mg acide gallique équivalent / g de poudre végétale). D'une autre part des études de **Yous et al. (2018)** sur la même plante ont démontré que la teneur en polyphénols totaux était largement supérieure à nos résultats avec une moyenne ($271,11 \pm 0,74$ ug acide gallique équivalent/mg extrait sec), sachant qu'ils avaient utilisé la même méthode que **Atmani et al. (2009)** ; **Atmani et al. (2011)** Avec le même solvant qui était l'éthanol à 96%. Cette différence est probablement lie à la méthode d'extraction et au fait qu'ils avaient utilisé les feuilles de *Clematis flammula* L. comme source de polyphénols, ce qui explique que les graines de cette plante ont une teneur assez faible en polyphénols ce qui n'exclut pas le fait que ces dernier n'aient pas une bonne activité biologique, de ce fait, la qualité de leurs composants soit de meilleure qualité.

En effet la teneur en composés phénoliques d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et les facteurs extrinsèques (facteurs géographiques, conditions climatiques, la période de récolte ainsi que la durée, les conditions de stockage et la maturité de la plante) (Falleh et al., 2008 ;Cheurfa et Allem, 2016),mais également les changements saisonnières ainsi que la méthode d'extraction par le solvant (Yous et al., 2018).

Les produits chimiques d'origine végétale sont principalement divisés en trois groupes : les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Ces derniers sont les plus étudiés, ils comprennent les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques), les tannins (hydrolysables et condensés) les flavonoïdes, coumarines et les stilbènes. Ces éléments qui protègent les plantes, les fruits et les légumes des dommages, des oxydatifs, des infections, des blessures et des rayonnements UV, des insectes et dans la réponse cellulaire au stress. Notamment, participent à la résistance mécanique des parois cellulaires et contribuent à la formation de la couleur, la saveur et l'odeur des différentes parties de la plante. En l'occurrence, ces composés ont été utilisés comme des molécules thérapeutiques et plus précisément comme agents antioxydants et anti-inflammatoires par l'homme (Naczk et Shahidi, 2004).

Des recherches approfondies sur la composition chimique de la clématite ont révélé une riche composition polyphénolique aux nombreux effets biologiques et thérapeutiques. Ces molécules constituent les principales classes de composés chimiques du genre Clematis. Parmi ces composés on retrouve les saponines triterpéniques, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les lignanes, les stéroïdes, les coumarines, les composés macrocycliques, les glycosides phénoliques, l'anémone et les huiles essentielles (Chawla et al., 2012).

En l'occurrence, l'étude réalisée sur l'espèce *Clematis gouriana Roxba* démontré que l'extrait éthanolique de cette espèce contenait une large gamme de polyphénols dont les alcaloïdes, les phénols, les tannins, les saponines, les flavonoïdes, les coumarines glycoside, les stéroïdes, les huiles fixes (Anusha et Suja, 2019). Une étude supplémentaire réalisée sur *Clematis flammula* L. à révélé que l'extrait de fleur de cette espèce contenait deux flavonoïdes glucosides type 1 et 2, et que l'extrait de feuilles de cette plante contenait des trisaccharides (Saidi et al., 2019).

L'étude réalisée sur *Clematis Tashiroi* a démontré que l'extrait éthanolique de cette espèce contenait une variété de polyphénols, y compris l'acide ferrulique, l'acide coumarique et l'acide caféique (Zhang et al., 2015). Ces travaux ultérieurs ont sollicité notre curiosité sur la richesse

phytochimique des graines de CF et sur les éventuelles activités biologiques qui peuvent leurs êtres attribués.

2 Activité antioxydants « Test DPPH »

Il existe de nombreux tests pour évaluer l'activité antioxydants d'un extrait d'une plante donnée, ces tests sont différents les uns des autre sur le plan de leurs principes d'analyse et des conditions expérimentales.

Dans le présent travail, le test DPPH a été utilisé, l'une des méthodes les plus largement utilisées comme model pour déterminer l'effet scavenger de multiples produits naturels tels que les composés phénoliques. Son principe est basé sur le don d'électrons des antioxydants afin de neutraliser le radical DPPH. La réaction s'accompagne d'un changement de la couleur du mauve vers la couleur jaune et la densité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Dans cette étude, l'activité antioxydants des extraits éthanoliques de CF vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée en suivant sa réduction par spectrophotométrie à 517 nm (**Munteanu et al., 2021**).

A partir des résultats que nous avons obtenu, nous avons constaté que l'extrait de graines de *Clematis flammula* (CFG) avait une forte capacité de piégeage du radical libre DPPH avec un pourcentage d'inhibition égal à 61,44 % ce qui explique que notre extrait possède une activité antioxydants assez forte que celle obtenue par l'étude de **Atmani et al., (2009)** sur la même plante avec un pourcentage égale à 23% mais sur une autre partie de la plante.

Autre investigation réalisée sur l'espèce *Clematis gouriana* par **Anusha et al. (2019)** ont démontré que le pourcentage d'inhibition DPPH est faiblement inférieur à nos résultats avec un pourcentage égal à 51,63%. Ces grandes différences est probablement due à la partie visée du végétale ou bien aux concentrations de l'extrait éthanolique dans la solution réactionnelle du DPPH.

De nombreuses études ont démontré que l'activité antioxydants de CFG était due à la présence des composés phénoliques. En effet, ces composés agissent comme des agents réducteurs et antioxydants grâce à leurs fonctions de donneurs d'hydrogène de leurs groupes hydroxyles et par conséquent, ces polyphénols pourraient potentiellement être responsable de l'activité antioxydants observée dans notre étude.

La différence de pourcentage d'inhibition du test DPPH dépend d'un certain nombre de facteurs, notamment leurs caractéristiques structurelles, leurs concentrations au site de la réaction ainsi que de la nature du substrat oxydable (**Losada-Barreiro et al., 2017**).

Eventuellement, provoqué par la nature des composés présents dans chaque extrait, par exemple, les flavonoïdes glucoside 1 et 2 et les dérivé p-coumaroyl qui sont présents dans le *Clematis flammula* L. possédant une bonne activité antioxydants grâce à leur capacité de transfert d'électrons ou à la présence les hydroxyles C-4 et C-6, principalement impliqués dans les réactions de transfert d'atomes hydrogène vers les radicaux DPPH et ABTS, mais le flavonoïde de glucoside 1 contient le fragment P-coumaroyl lorsque il va se lier au groupe glucoside d'apigénine sur le carbone C-6 montre une activité antioxydants plus élevée par rapport au flavonoïdes 2 ou le coumaroyl attaché au glucoside d'apigénine sur le carbone C-4. Egalement, la position du fragment P-coumaroyl dans les flavonoïdes glucoside 1 améliorerait la capacité de piégeage des radicaux DPPH par rapport au flavonoïde glucoside 2 (Saidi et al., 2019).

Les antioxydants sont des enzymes ou des substances chimiques qui neutralisent les radicaux libres et préviennent ainsi l'apparition des maladies associées au stress oxydative. En l'occurrence, pouvant protéger contre l'oxydation par divers mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. Notamment, des mécanismes de piégeage des radicaux où les polyphénols réagissent avec la membrane plasmique au contact des composés non polaires présents dans la couche membranaire interne hydrophobe en empêchent l'accès des oxydants et en protégeant la structure et la fonction de la membrane (Hussain et al.,2016).

3 Activité anti-hémolytique de l'extrait *clematis flammula* L.

3.1 Activité anti-hémolyse hypotonique

Un milieu hypotonique est un milieu ayant une concentration en solutés inférieure à celle du cytoplasme, ce qui suggère que la pression osmotique est plus faible que celle intracellulaire, ce déséquilibre conduit à l'entrée de l'eau vers l'intérieur de la cellule à travers la membrane.

De ce fait, une diffusion massive d'eau dans les globules rouges conduit au gonflement des hématies puis, à leur éclatement et donc la libération de son contenu cytoplasmique notamment l'hémoglobine.

L'influence de l'extrait de CFG sur l'hémolyse induite par l'hypotonicité en fonction des concentrations croissantes en extrait sont représentés dans la Figure 14.

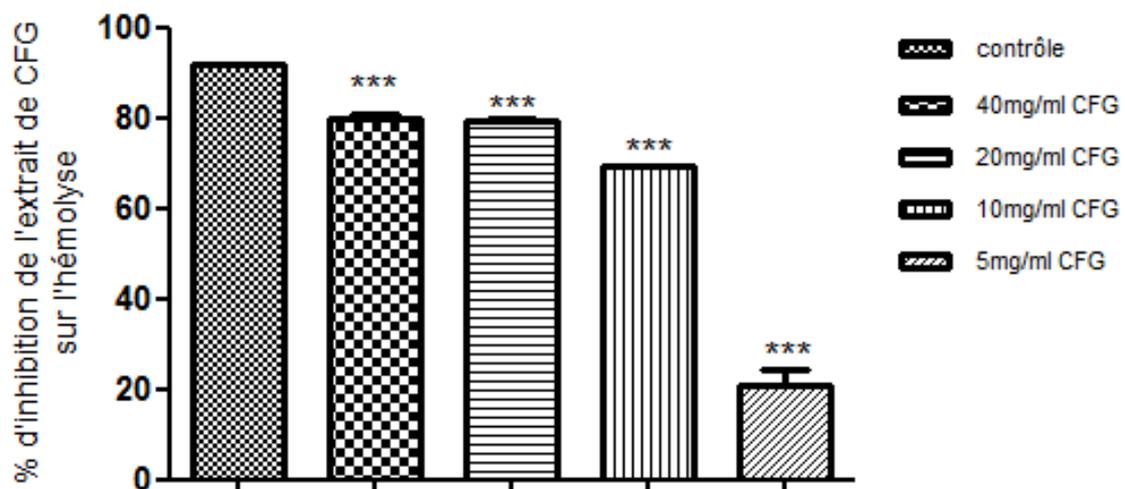


Figure 14 : Histogrammes montrant le pourcentage d'inhibition de l'extrait de CFG sur l'hémolyse en fonction de la concentration croissante de l'extrait de CFG.

D'après l'histogramme précédent, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition de l'extrait de graines de CF est très hautement significatif pour des concentrations égales à 40, 20, 10, 5 mg/ml de l'extrait de CFG par rapport au contrôle qui représente 91 % d'inhibition de l'hémolyse.

L'étude réalisée par **Assumpta Anosike et al. (2019)** sur le pourcentage d'inhibition de l'extrait de *Mucuna pruriens* sur l'hémolyse dévoile une hausse dans le pourcentage d'inhibition par l'augmentation de la concentration de l'extrait dont le pourcentage maximale enregistré était égale à 69,31 %.

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, nous pousses à suggérer que l'évolution de l'activité anti-hémolytique a été proportionnelle à la concentration de l'extrait, en l'occurrence, plus la concentration de l'extrait augmente plus le pourcentage d'inhibition de l'extrait de CFG sur l'hémolyse augment et que plus la concentration de l'extrait diminue plus le taux d'hémolyse augmente.

Une étude sur hémolyse oxydative des érythrocytes induits par diverses vitamines ont démontré que l'acide ascorbique (vitamine C) était l'agent hémolytique le plus puissant par rapport à d'autres vitamines et que le degré d'hémolyse augmente avec le temps ainsi qu'à l'augmentation des concentrations de l'acide ascorbique. Cette observation a bien été retrouvée dans nos résultats. Ce type d'hémolyse est dû à l'interaction de l'acide ascorbique avec les hématies provoquant une peroxydation lipidique au niveau de la membrane

(oxydation de Fe^{+2} en Fe^{+3}). Néanmoins, ce qui provoque l'hémolyse des érythrocytes est la forte concentration en acide ascorbique, toutefois, à de faibles concentrations il agit comme un antioxydants (**Ibrahim et al., 2006**).

En effet l'acide ascorbique est un antioxydants utilisé pour gérer l'hémolyse associée aux dommages oxydatifs chez les personnes présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) mais il peut provoquer un stress oxydatif et une hémolyse lorsqu'il est utilisé à de fortes concentrations. En effets, cet évènement conduit la conversion de l'acide ascorbique dans les tissus en sa forme oxydée ; l'acide déhydroascorbique, ce qui entraîne la diminution des réserves de glutathion intra érythrocytaires. Par contre, en déficit de glucose-6-phosphate déshydrogénase, ces réserves de glutathion ne sont pas reconstituées ce qui conduit à des dommages oxydatifs et donc à l'hémolyse qui en résulte (**Juneja et al., 2022**).

Une étude sur l'hémolyse induite par l'hémine, un agent hémolytique potentiel, avec une hémolyse de 27 % induite par 50 μ M d'hémine et l'ajoute de 0,2 mM d'acide ascorbique aux érythrocytaire provoque une hémolyse de 60 %. Ce qui prouve que l'acide ascorbique seul n'a pas provoqué d'hémolyse ce qui explique que l'acide ascorbique est capable stimuler la peroxydation lipidique érythrocytes en présence d'hémine. Mais peut fonctionner comme un prooxydants ou antioxydants dans l'hémolyse à médiation de l'hémine ou solution hypotonique, selon que glutathion (GSH) soit disponible ou non (**Li et al., 2006**).

La stabilité membranaire est un processus de maintien de l'intégrité des membranes érythrocytaires contre la lyse osmotique induite par une solution hypotonique. Des études ont démontré que la peroxydation des lipides par les peroxydes entraîne une oxydation des groupes SH membranaires et donc il y'aura la perte de la stabilité membranaire ce qui réduite la capacité des globules rouges à résister au stress mécanique et osmotique. Dans la présente étude, l'effet de stabilisation membranaire de différente concentration de l'extrait de CFG sur les différents groupes sanguines due à la présence de flavonoïdes et les saponines qui exercent un effet profond sur la membrane tandis que les tanins et saponines possèdent la capacité de se lier aux cations, stabilisant ainsi les membranes érythrocytaires et d'autres macromolécules biologiques. Le mode d'action des extraits avec des potentiels de stabilisation membranaire pourrait être attribué à leur liaison aux membranes érythrocytaires avec altération subséquente des charges de surface des cellules ce qui conduit à empêcher une interaction physique avec des agents agrégeants ou favoriser la dispersion par répulsion mutuelle de charges similaires qui sont impliquées dans l'hémolyse des globules rouges (**Asgary et al., 2005 ; Assumpta Anosike et al., 2019**).

D'autres études ont montré qu'en présence des flavonoïdes notamment, le 3-hydroxyflavone (3-HF) et de la fisétine, la membrane érythrocytaire devient plus ordonnée ce qui peut rationaliser leurs activités anti-hémolytique (**Chaudhuri et al., 2007**).

D'une part une étude sur *Arbutus unedo* a prouvé que l'extrait de cette plante contenait une activité anti-inflammatoire qui montrait un bon effet anti-hémolytique des RBC contre l'hémolyse induit par la solution hypotonique. Cet effet protecteur a été expliqué par la capacité de l'extrait à modifier l'afflux du calcium dans les membranes. De ce fait, l'effet anti-inflammatoire est expliqué par le fait que ces membranes ressemblent à la membrane lysosomale et donc aide à l'inhibition de la libération de la teneur lysosomale sur le site de l'inflammation par l'extrait (**Moualek et al., 2016**).

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

Conclusion

La présente étude avait pour objectif d'optimiser l'extraction des composés de la poudre des graines de *Clematis flammula* L. par l'utilisation de la macération comme méthode d'extraction et d'effectuer une lecture critique et une synthèse bibliographique des études portant sur le potentiel de l'extrait de la plante sur le test DPPH et anti-hémolytique tout en exposant un protocole expérimentale dans ce sens.

Dans un premier temps, le plan centré a permis d'identifier les meilleurs paramètres d'extraction par macération : éthanol à des concentrations croissantes à un volume de 4 ml et à des températures adéquates sous agitation, pendant divers temps d'extraction.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu et l'activité antioxydants, évaluée par DPPH, basé sur la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, les résultats obtenus pour montrent que l'extrait éthanolique optimisé affiche une teneur en polyphénols égale à $0,08 \pm 0,007$ mg AG Eq/g ayant un pourcentage d'inhibition égale à $61,44 \pm 0,44$ %.

En ce qui concerne l'activité anti-hémolytique, les résultats montrent que l'extrait à concentration élevée possède un important effet protecteur induit par un stress hypotonique exprimé par un pourcentage d'inhibition avoisinant les 80%.

Comme perspectives, des recherches sur l'effet anti-hémolytique induit par le H_2O_2 et une mesure des MDA seraient nécessaires pour confirmer l'activité antioxydants de l'extrait de CFG additionnée d'une évaluation de ses activités sur la toxicité in vivo.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abbas M, Saeed F, Anjum F M, Afzaal M, Tufail M.** Natural polyphenols : An overview. *International Journal of Food properties* ; 2017, 20(8) : 1689-1699.
- **Ali-Rachedi F, Meraghni S, Touaibia N, Mesbah S.** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L.* *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* ; 2018, 87 : 13-21.
- **Amarti F, El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Farah A, Khia A, Guedira A, Rahouti M, Chaouch A.** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydant de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Pytothérapie* ; 2011 ,9 :149-157.
- **Amiard J C, Amiard-Triquet C.** Les Biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. *Lavoisier* ; 2008 : 27-28.
- **Anusha S, Suja S R.** Anti-inflammatory, antioxidant and phytochemical properties of *Clematis gouriana Roxb.ex.DC.leaves*. *International Journal of Research and Analytical Reviews* ; 2019, 6(1) : 31-37.
- **Asgary S, Naderi GH, Askari N.** Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experemental Clinical Cardiology* ; 2005, 10(2) : 88-90.
- **Assumpta Anosike C, Ngozi Igboegwu O, Chiletugo Nwodo O F.** Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves on normal and sickle erythrocytes. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* ; 2019, 9 : 278-284.
- **Atmani D, Begoña Ruiz-Larrea M, Ruiz-Sanz J I, Lizcano L J, Bakkali F, Atmani D.** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* ; 2011, 5(4) : 589-598.
- **Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaou H.** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* ; 2009, 112(2) : 303-309.
- **Barascud Y, Guelfi J F, Concordet D, Dossin O, Braun P J.** La fragilité osmotique des érythrocytes du chien : validation préanalytique et analytique, valeurs usuelles, variations pathologiques. *Revue Médecine vétérinaire* ; 1998, 149(8-9) : 867-874.
- **Barcellini W, Fattizzo B.** Clinical Application of hemolytic markers in the differential diagnosis and management of hemolytic anemia. *Disease Markers* ; 2015,3 : 1-7.
- **Barouki R.** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/ Sciences* ; 2006, 22(3) : 266-272.

- **Beaudeau J-L, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J.** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose oxidative stress in atherosclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* ; 2006, 21 : 144-150.
- **Bendary E, Francis R R, Ali H M G, Sarwat M I, EL Hady S.** Antioxydant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compound. *Annals of Agricultural Sciences* ; 2013, 58(2) : 173-181.
- **Berthod A, Billardello B, Geoffroy S.** Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analisis* ; 1999, 27 :750-757.
- **Bhat S H, Ullah M F, Abu-Duhier F M.** Anti-hemolytic activity and antioxidant studies of *caralluma quadrangula* : potential for nutraceutical development in cancer and blood disorders. *International journal of pharmaceutical Research and Allied Sciences* ; 2019 ; 8(4) : 121-129.
- **Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C.** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* ; 1995, 28 : 25-30.
- **Chakraborty D, Shah B.** Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ; 2011 3(3) : 192-199.
- **Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta P k.** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins : antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* ; 2007, 41 : 42-48.
- **Chawla R, Kumar S, Sharma A.** The genus Clematis (Ranunculaceae) : chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* ; 2012, 143(1) : 116-150.
- **Cheurfa M, Allem R.** Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'Aloisia triphylla. *Phytothérapie* ; 2016, 14(3) : 181-187.
- **Cowan M M.** Plante products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* ; 1999, 12(4) :564-582.
- **Cyboran-Mikołajczyk S, Csonka A, Molnar J, Szabó D, Oszmiański J, Kleszczyńska H.** In Vitro Studies of anti-hemolytic and cytotoxic activity of procyanidin-rich extract from the leaves of actinidia arguta. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* ; 2018, 68(2) : 171-177.

- **Das A K, Islam M N, Faruk MO, Ashaduzzaman M, Dungani R.** Review on tannins : extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany* ; 2020, 135 :58-70.
- **Defraigne J O, Pincemail J.** Stress oxydant et antioxydants : Mythes et réalités. *Revue Médicale de Liège* ; 2008, 63 :10-19.
- **Domen R E.** An overview of immune hemolytic anemias. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* ; 1998, 65(2) : 89-99.
- **Eichler H, Jeanes J A, Walsh N G.** Ranunculaceae. In : *Kellermann Jürgen* (ed). Flora of soith Australia (ed.5) stat herbarium of south Australia. Australia (Adelaide) : *Kellermann*, 2011 :1-18.
- **Falleh H, Ksouri R, chaieb k, karray-bouraoui,N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C.** Phenolic composition of *Cyanara cardunculus* L, organs, and their biological activities. *C.R. Biologies* ; 2008, 331 : 372-379.
- **Favier A.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* ; 2003 : 108-115.
- **Federici L, Loukili NH, Zimmer J, Affenberger S, Maloisel F, Andrés E.** Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature. *La Revue de médecine interne* ; 2007, 28(4) : 225-231
- **Ghedira K.** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* ; 2005,3(4) : 162-169.
- **Goeptar A R, Scheerens H, Vermeulen, N P.** Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology* ; 1995,25 : 25-65.
- **Haleng J, Pincemail J, Defraigne J-O, Charlier C, Chapelle J-P.** Le stress oxydant. *Revue medical de liège*; 2007 62(10) : 628-638.
- **Halliwell B.** Antioxydant characterization : methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* ; 1995, 49(10) : 1341-1348.
- **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you what do the results mean ? *British Journal of pharmacology* ; 2004, 142(2) : 231-255.
- **Hossain M M, Ahamed S K, Dewan S M R, Hassan M, Istiaq A, Islam M S, Moghal M R.** In vivo antipyretic, antimetic, in vitro membrane stabilization, antimicrobial, and

- cytotoxic activities of different extracts from *Spilanthes paniculata* leaves. *Biological Research* ; 2014, 47(45) : 1-9.
- **Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou M C B, Rahu, N.** Oxidative stress and inflammation what polyphenols can do for us ?. *Hindawi publishing corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ; 2016, 4 : 1-9.
 - **Ibrahim I H, Sallam S M, Omar H, Rizk M.** Oxidative hemolysis of erythrocytes induced by various vitamins. *International journal of Biomedical science* ; 2006, 2(3) : 295-298.
 - **Iserin P.** Larousse encyclopédie des plantes médicinales ; 2001 : 1-336.
 - **James O, Alewo I M.** In vitro antihemolytic activity of gymnema sylvestre extracts against hydrogen peroxide (H₂O₂) induced haemolysis in human erythrocytes. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* ; 2014, 2(7) : 861-869.
 - **Jeon J, Yang S, Choi N, Kim S.** Dental management in a child patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : a case report. *Korean pediatric dent* ; 2021, 48(3) : 2288-3819.
 - **Johri S, Khan N.** Assessment of in vitro antioxidant and antihaemolytic activities in *Triticum aestivum* grass and papaya leaves. *Indo American Journal of pharmaceutical Research* ; 2017, 7(11) : 867-874.
 - **Juneja D, Jain R, Nasa P.** Vitamin C-induced hemolysis : Metasummary and review of literature. *Indian Journal of Critical Care Medicine* ; 2022, 26(2) : 224-227.
 - **Klotz L, Pellieux C, Briviba K, Pierlot C, Aubry J, Sies, H.** Mitogen-activated protein kinases (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *European journal of biochemistry* ; 1999, 260(3) : 917-922.
 - **Krumova K, Cosa K.** Overview of reactive oxygen species, in singlet Oxygen. application in biosciences and nanosciences. *Royal Society of Chemistry* ; 2016,1 : 1-21.
 - **Kulawik P, Özogul F, Glew R, Özogul Y.** Significance of antioxidants for seafood safety and human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 2013, 61(3) : 475-491.
 - **Lévy J P, Varet B, Clauvel J P, Lefrère F, Bezeaud A, Guillin C M.** Hématologie et transfusion. Paris : Editeur Masson Abreges Connaissances Et Pratique, 2001 : 22.

- **Li S, Su Y, Li M, Zou C.** Hemin-mediated hemolysis in erythrocytes : effects of ascorbic acid and glutathione. *Acta Biochimica Biophysica Sinica* ; 2006, 38(1) : 63-69.
- **Losada-Barreiro S, Bravo-Díaz C.** Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry* ; 2017, 133 : 379-402.
- **Lourdes Reis Giada M.** Food Phenolic Compounds : Mains classes, Sources and Their Antioxydant Power. In : José A. Morales-González. Oxydative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants. Brazil : INTECH, 2013 : 87-112.
- **Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado Y.** Composé phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, repartition et role. In : les polyphénols en agroalimentaire. Paris : Edition Technologie et document, 2004 : 380-398.
- **Marques-Garcia F.** Methods for hemolysis interference study in laboratory medicine- a critical review. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* ; 2020, 31(1) : 85-97.
- **Martin S, Andriantsitohaina R.** Mécanisme de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'angiologie* ; 2002, 51 : 304-315.
- **Matés J M, Pérez-Gómez C, De Castro J N.** Antioxydant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* ; 1999, 32(8), 595-603.
- **Miikeda O, Kita K, Handa T, Yukawa T.** Phylogenetic relationships of clematis (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* ; 2006, 152(2) : 153-168.
- **Miraldi, E, Baini G.** Medicinal plants and health in human history : from empirical use to modern phytotherapy. *Journal of the Siena Academy of Sciences* ; 2018, 10(1) : 7-12.
- **Molyneux P.** The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin journal of science and technology* ; 2003, 26(2) : 211-219.
- **Morelle J.** L'oxydation des aliments et la santé. Paris : Editions Francois-Xavier de Guibert, 2003 : 17, 18, 33, 44, 47, 48, 58,59.
- **Moualek I, Iratni Aiche G, Mestar Guechaoui N, Lahcene S, Houali K.** Antioxydant and anti-inflammatory activities of Arbutus unedo aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* ; 2016, 6(11) : 937-944.

- **Moutounet M.** Dosages des polyphénols des mouts de raisin. *Connaissance Vigne vin* ; 1981, 15(4) : 287-301
- **Munteanu I G, Apetrej C.** Analytical methods used in determining antioxidant activity : a review. *International Journal of Molecular Sciences* ; 2021, 22 : 2-18.
- **Naczki M, Shahidi F.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* ; 2004, 1054 : 95-111.
- **Olchowik E, Lotkowski K, Mavlyanov S, Abdullajanova N, Ionov M, Bryszewska M, Zamaraeva M.** Stabilization of erythrocytes against oxidative and hypotonic stress by tannins isolated from sumac leaves (*Rhus typhina* L.) and grape seeds (*Vitis vinifera* L.). *Cellular & Molecular Biology letters* ; 2012, 17 : 333-348.
- **Ourabah A, Atmani-Kilani D, Debbache-Benaida N, Kolesova O, Azib L, Yous F, Benloukil M, Botta B, Atmani D, Simonetti G.** Anti-Candida albicans biofilm activity of extracts from two selected indigenous Algerian plants: *Clematis flammula* and *Fraxinus angustifolia*. *Journal of Herbal Medicine* ; 2020, 20 : 1-6.
- **Ozcan A, Ogun M.** Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. In : Sivakumar Joghi Thata Gowder. Basic principles and clinical significance of oxidative stress. Turkey : INTECH, 2015 : 37-58.
- **Pandey K B, Rizvi S I.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ; 2009, 2(5) : 270-278.
- **Phillips J, Henderson A C.** Hemolytic anemia : evaluation and differential diagnosis. *American family physician* ; 2018, 98(6) : 354-361.
- **Priyadarsini K I.** Molecular Mechanisms Involving Free Radical Reactions of Antioxidants and Radioprotectors. *Founder's Day Special Issue* ; 2005 : 1-6.
- **Ruggeri F S, Marcott C, Dinarelli S, Longo G, Girasole M, Dietler G, Knowles T P J.** Identification of oxidative stress in red blood cells with nanoscale chemical resolution by infrared nanospectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* ; 2018, 19(9) : 2582.
- **Saidi R, Chawech R, Baccouch N, Mezghani Jarraya R.** Study toward antioxidant activity of *Clematis Flammula* extracts : purification and identification of two flavonoid-glucoside and trisaccharide. *South African Journal of Botany* ; 2019, 123 : 208-213.
- **Saidi R, Khanous L, Allah S K, Hamdi B, Ayadi A, Damak M, Hammami H, Mezghani-Jarraya R.** Antifungal, molluscicidal and larvicidal assessment of anemonin and *Clematis flammula* L. extracts against mollusc *Galba truncatula*,

intermediate host of *Fasciola hepatica* in Tunisia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* ; 2017, 10(10) :967-973.

- **Saoud M Z, benkirane S, Bennis F Z, Mechal Y.** Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : à propos de 54 cas. *Hématologie* ; 2019, 25(1) : 16.
- **Serda Z, Aslan K, Dirican M, Sarandöl E, Yeşilbursa D, Serdar A.** Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clinical Biochemistry* ; 2006, 39(8) : 794-803.
- **Selvamohan T, Ramadas V, Shibila Selva Kishore S.** Antimicrobial activity of selected medicinal plants against some selected human pathogenic bacteria. *Advances in applied science research* ; 2012, 3(5) : 3374-3381.
- **Schafer F Q, Buettner G R.** Singlet oxygen toxicity is cell line-dependent : à study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochemistry and photobiology* ; 1999 ; 70(6) : 858-867.
- **Shobana S, Vidhya R.** Evaluation in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon Indicum*(Linn). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ; 2016, 5 :1182-1196.
- **Singleton V L, Rossi J A.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* ; 1965, 16 : 144-158.
- **Talbi H, Boumaza A, El-mostafa K, Talbi J, Hilali A.** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa L.* *Journal of materials and environmental science*; 2015, 6(4) : 1111-1117.
- **Tanaka K, Kobayashi K, Kazusi S.** Temperature-dependent reaction of flufenamic acide with rat erythrocyt membrane. *Biochemical Pharmacology* ; 1973, 22 : 879-886.
- **Tortora G J, Derrickson B.** Manuel d'anatomie et de physiologies humaines. Paris : 7^{ème} Editions du Renouveau Pédagogique, INC, 2009 : 354.
- **Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** Free radicals, metals and antioxydants in oxydative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* ; 2006, 160(1) : 1-40.
- **White K, Kim M, Ding D, Han C H, Park H J, Meneses Z, Tanokura M, Linser P, Salvi R, Someya S.** G6pd deficiency does not affect the cytosolic glutathione or thioredoxin antioxidant defense in mouse cochle. *The journal of neuroscience* ; 2017, 37(23) : 5570-5781.

- **Wu J, Hecker J G, Chiamvimona N.** Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* ; 2009, 61(4) : 351-363.
- **Yakoyama K, Ikeda Y.** Autoimmune hematological diseases. *Japan Medical Association Journal* ; 2004, 47(9) : 412-418.
- **Yeo J H, Lam Y W, Fraser S T. (2019).** Cellular dynamics of mammalian red blood cell production in the erythroblastic island niche. *Biophysical Reviews* ; 2019, 11(6) : 873-894.
- **Yous F, Atmani-Kilani D, Debbache-Benaida N, Cheraft N, Sebaihi S, Saidene N, Benloukil M, Atmani D.** Anti-ulcerogenic and proton pump (H⁺, K⁺ ATPase) inhibitory activity of *Clematis flammula* L. extract. *South African Journal of Botany* ; 2018, 119 : 390-399.
- **Zanella A, Barcellini W.** Treatment of autoimmune hemolytic anemias. *Haematologica* ; 2014, 99(10) : 1547-1554.
- **Zbadi R, Mohti H, Moussai F.** stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine translationnelle* ; 2018, 24(2) : 134-41.
- **Zhang L J, Huang H T, Huang S Y, Lin Z H, Shen C C, Tsai W J, Kuo Y H.** Antioxydant and anti-inflammatory phenolic glycosides from *Clematis tashiroi*. *Journal of Natural Products* ; 2015, 78(7) : 1586-1592.

ANNEXES

Annexe N° 01

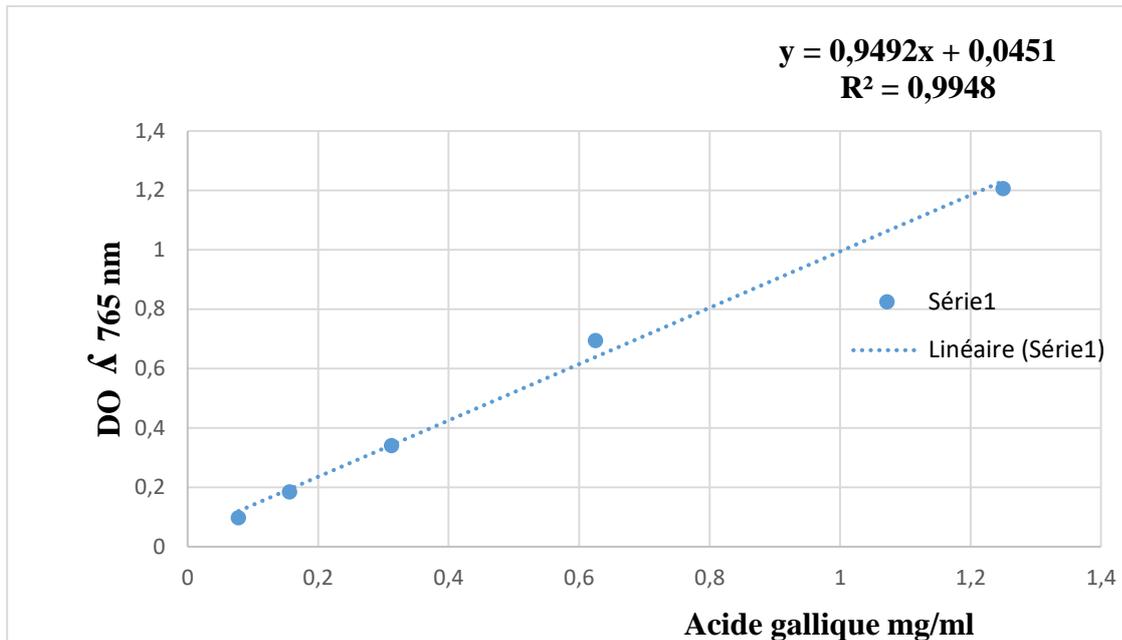


Figure 1 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Annexe N° 02

Matériel de laboratoire

➤ Réactifs

Eau distillée, Réactif de Folin, bicarbonate sodium, solution de DPPH, solution de quercétine, solution acide gallique, solution hypotonique (50 mM), solution isotonique (154 mM), éthanol (différentes concentrations), tampon de phosphate (10 mM), acide ascorbique.

➤ Appareillages

Broyeur électrique (Brandmann), tamiseuse (Retsch), balance de précision (Radwag), centrifugeuse (Sigma 1-6), bain Marie (Raypa), vortex (VELP Z×3), spectrophotométrie (UV-9200), PH-mètre (Hanna PH 211), appareil photo (Samsung Galaxy 16 MP), étuve (Binder), rota vapeur (RVO 400 SD).

Résumé

Clematis flammula L. est une plante appartenant à la famille des Ranunculaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter l'arthrite rhumatoïde, les brûlures et les plaies superficielles. Le but de la présente étude est d'optimiser l'extraction afin de déterminer la teneur de son extrait éthanolique (EE) en composés phénoliques, ainsi que d'évaluer ses activités antioxydantes et anti-hémolytiques. La teneur en polyphénols totaux (TPT) a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'activité antioxydante a été réalisée par le test de DPPH. L'activité anti-hémolytique sur milieu hypotonique, a été évaluée sur cinq sangs d'individus humains. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de *Clematis flammula* L. contenait un taux en polyphénols totaux égale à $0,08 \pm 0,007$ mg AG Eq/g d'extrait sec. Dans le test DPPH, les extraits étudiés ont exhibé une importante activité anti-radicalaire avec un pourcentage d'inhibition égale à $61 \pm 0,4$ %. En ce qui concerne l'activité anti-hémolytique, le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par le NaCl est enregistré dans l'extrait à une concentration 40, 20, 10 et 5 mg/ml CFG avec un pourcentage d'inhibition égale à 80, 79, 69 et 20% respectivement.

Mots clés : *Clematis flammula* L., polyphénols totaux, activité antioxydante, activité anti-hémolytique.

Abstract:

Clematis flammula L. is a plant belonging to the Ranunculaceae family, widely used in traditional medicine to treat rheumatoid arthritis, burns and superficial wounds. The purpose of this study is to optimize the extraction in order to determine the content of its ethanolic extract (EE) in phenolic compounds, as well as to evaluate its antioxidant and anti-hemolytic activities. The content of total polyphenols (TPT) was determined by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was carried out by the DPPH test. The anti-hemolytic activity on hypotonic medium was evaluated on five blood samples from human individuals. The results obtained showed that the extract of *Clematis flammula* L. contained a level of total polyphenols equal to $0,08 \pm 0,007$ mg FA Eq/g of dry extract. In the DPPH test, the extracts studied exhibited significant anti-free radical activity with a percentage inhibition equal to $61 \pm 0,4$ %. Regarding the anti-hemolytic activity, the percentage inhibition of NaCl-induced hemolysis is recorded in the extract at a concentration of 40, 20, 10 and 5 mg/ml CFG with a percentage inhibition equal to 80, 79, 69 and 20% respectively.

Key words: *Clematis flammula* L., total polyphenols, antioxidant activity, anti-hemolytic activity.

ملخص

الياسمين البري هو نبات من عائلات الحدان يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج التهاب المفاصل الروماتويدي، الحروق والجروح السطحية. الهدف من هذه الدراسة هو تحسين الاستخراج من أجل تحديد محتوى المستخلص الإيثانولي في المركبات الفينولية. وكذلك لتقييم انشطته المضادة للأكسدة والمضادة للانحلال. تم تقدير محتوى البوليفينول الكلي (TPT) بواسطة كاشف folin ciocalteu. تم إجراء النشاط المضاد للأكسدة بواسطة اختبار HPPD. ثم تقييم النشاط المضاد للانحلال في وسط ناقص التوتر، على خمس عينات دم من أفراد البشر. أظهرت النتائج أن مستخلص الياسمين البري يحتوي على كمية من المركبات الفينولية تساوي $0,08 \pm 0,007$ مع المكافئ لحمض القاليك/من المادة الجافة. في اختبار HPPD، أظهرت المستخلصات المدروسة نشاطاً مضاداً للجذور الحرة مع نسبة تثبيط تساوي $61,4 \pm 0,44$. مما يثبت وجود علاقة ارتباط جيدة بين محتوى المركبات الفينولية في مستخلصاتنا والنشاط المضاد للأكسدة. فيما يتعلق بالنشاط المضاد لانحلال الدم الناتج عن كلور الصوديوم في المستخلص بتركيز 40، 20، 10 و 5 مغ/مل بنسبة مئوية تساوي 80%، 79%، 69% و 20% على التوالي.

الكلمات المفتاحية : البوليفينول الكلي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد لانحلال، الياسمين البري.