

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique Université A.  
Mira Bejaia  
Faculté Science de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER**  
**Spécialité : Biochimie fondamentale**

Présenté par :  
Atmaniou Nadjjet.

*Thème*

---

**Analyse histopathologique et évaluation de  
l'activité de la catalase d'organes prélevés  
chez des rongeurs**

---

Soutenu le : 19/06/2022

Membre de jury :

Président :	Mme Boudjou Souhila	MCB
Promotrice :	Mme Yous F.	MCB
Examineur :	Mme Bedjou Fatiha	professeur

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

*Je veux tout d'abord exprimer mes profonds remerciements au bon DIEU  
qui m'a adonné la volonté d'achever ce travail.*

*Mes profonds remerciements vont à mon encadreur Madame, YOUS Farah  
enseignante à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université  
Abderrahmane Mira de Béjaia, pour son attention, sa simplicité, sa sympathie et  
sa générosité scientifique. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de toute  
ma gratitude pour son permanent soutien.*

*Je remercie tous les membres du laboratoire d'analyse de biochimie appliquée  
de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia « Targa Ouzmour » de m'avoir  
permis de réaliser la partie pratique du présent travail.*

*On remercie aussi tous les membres du laboratoire médecine d'Aboudaou.*

*Nous tenons à présenter notre sincère remerciement aux membres du jury  
Pour avoir accepté de juger ce travail.*

# *Dédicaces*

*À l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser  
ce travail que je dédie*

*À mes très chers parents : Said et Nadia*

*À mes frère : Fahem et Amirouche*

*À mes sœurs : Alya et Fouzia*

*et à leurs enfants Omer et Ghilas*

*À toute ma famille*

*À mes amies et collègues*

*À toute personne qui lira le présent travail...*

*Nadjet...*

---

---

**Sommaire**

**TABLE DES MATIERES**

Table des figures  
Table des tableaux  
Table des abréviations  
Introduction.....01

**Chapitre 1 : synthèse bibliographique**

I. Le foie.....02

    I.1 Anatomie et physiologie du foie.....02

    I.2. Formation du foie.....02

    I.3 Structure macroscopique .....02

    I.4. Vascularisation du foie.....04

    I.5 Pathologies du foie.....05

        I.5.1 Hépatopathie.....05

        I.5.2 Hépatopathie alcoolique.....05

        I.5.3 Hépatopathie non alcoolique.....06

II. Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD).....06

    II.1. Nosologie détaillée.....08

    II.2.Classification des causes de la stéatose.....08

    II.3. Traitement.....09

III. Les enzymes.....11

    III.1 Définition.....11

    III.2 catalase.....11

        III.2.1 Structure de la catalase.....11

        III.2.2 Fonction de la catalase.....12

IV. Genre *Juglans*.....12

    IX.1.Classification taxonomique.....14

    IX.2. Origine et répartition géographique de *Juglans Regia* L.....14

    IX.3.Description botanique.....14

IX.4. Production agricole et composition biochimique de <i>juglas regia</i> L.....	15
IX.5. Utilisation médicinale populaire de <i>Juglans regia</i> L.....	16

## **Chapitre II: Matériel et méthode**

I. Matériel.....	16
II. Méthodes.....	16
II.1. Dosage de l'activité antioxydants par le test DPPH.....	16
II. 2. Dosage des polyphénols totaux.....	17
II. 3. Détermination de l'activité de la catalase.....	17
II. 4. Etude Histologique.....	19
II .5. Dosages des protéines.....	23

## **Chapitre 111 : Résultats et discussions**

1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH.....	25
2. Dosage des polyphénols totaux.....	26
3. Dosage de l'activité de la catalase.....	27
4. Etude hépato-histologique.....	29
4.1. Coupes histologiques du groupe témoin.....	29
4.2. Coupes histologiques du groupe malade.....	30
4.3. Coupes histologiques du groupe nourriture.....	31
4.4. Coupes histologiques du groupe EEJR (traité par <i>juglans regia</i> L).....	32
Résumé	

## Liste des figures

<b>Figure N°</b>	<b>Titre</b>	<b>N° Page</b>
1	Schéma d'un lobule hépatique.	03
2	Segmentation hépatique et circulation du sang et de la bile dans le foie.	05
3	Mécanismes de la stéatose alcoolique.	07
4	Coupe de foie, colorée au trichrome de Masson, présentant une stéatose.	07
5	Structure de la catalase.	07
6	Feuille de <i>juglans regia</i> L.	11
7	Fruits de <i>juglans regia</i> L.	13
8	L'écorce de <i>juglans regia</i> L.	13
9	Photographie montrant l'étape de mise des foies en cassettes	19
10	Photographie montrant l'automate de déshydratation des échantillons	20
11	Cassette contenant échantillon de foie incluses dans de la paraffine	21
12	Etapas de coupe au microtome	22
13	Photographie récapitulant des étapes de coloration et celles du montage.	23
14	Activité de la catalase.	29
15	Coupes histologiques du tissu hépatique du groupe témoin.	29
16	Coupes histologiques du tissu hépatique du groupe malade.	30
17	Coupe histologie de tissu hépatique du groupe nourriture.	31
18	la coupe histologie de tissu hépatique du groupe EEJR.	32

## Liste des tableaux

<b>Numéro tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Numéro de page</b>
<b>01</b>	Les types 3 et 4 représentant la NASH	07
<b>02</b>	Classification des causes de la stéatose non alcoolique	08

## Liste des abréviations

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non Alcoholic Steatohepatitis

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ROS: Reactive Oxygen Species

ALD: alcoholic liver disease (Hépatopathie alcoolique)

CAT : Catalase.

DPPH : 2,2'-diphényl-1-picryl hydrazyl

EMA : Agence européenne des médicaments

FDA : Food and Drug Administration

ALAT : Alanine amino transférase

ASAT : Aspartate aminotransférase

GGT :  $\gamma$ -glutamyl transférase

IMC : Indice de masse corporelle

ALAT: Alanine aminotransférase

USA : Amérique du Sud occidentale.

TG: Triglycérides

AG : Acides gras

SM : Syndrome métabolique

IR : Insulinorésistance

HE : Hématoxyline et à l'éosine

JREE : Effet éthanol à *Juglans Regia*.

# Introduction

## INTRODUCTION

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain. Il assure de nombreuses fonctions vitales. Vascularisé à 75 %, il est constamment exposé aux toxines, aux antigènes dérivés de l'alimentation et aux microbes de la circulation sanguine (**Buffet et Buffet, 2015**) où il agit comme un filtre détoxifiant l'organisme des substances endogènes et exogènes (**Baudin, 2017**).

La stéatose hépatique non alcoolique (NALFD) est une maladie très courante, elle constitue la première cause de maladie hépatique chronique en Occident (**Corrado et al., 2014**). Son incidence croissante est en grande partie expliquée par l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité. Elle touche environ 25 % de la population mondiale (**Stevanović et al., 2020**). Elle se définit par l'accumulation excessive des lipides dans le foie en l'absence de surconsommation d'alcool (**Sanyal et al., 2011**).

La NAFLD est une maladie multifactorielle, son développement est associé principalement à l'obésité, principalement viscérale, au diabète de type 2, à la dyslipidémie, à l'âge, au sexe et également aux mauvaises habitudes alimentaires accompagnées du caractère sédentaire (**Chalasani et al., 2012 ; Schwenger et Allard, 2014**).

Sa pathogénèse complexe est expliquée par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes excédant les 5% du poids total du foie (stéatose simple), par une attaque déclenchée par des cytokines/adipokines inflammatoires, par un dysfonctionnement mitochondrial et par un stress oxydatif conduisant à une stéatohépatite et/ou fibrose hépatique (**Day et James, 1998**). En l'occurrence, cette finalité serait la raison la plus fréquente des transplantations hépatiques d'ici 2030 (**Byrne et Targher, 2015**).

La catalase est une enzyme antioxydante la plus couramment mesurée dans les recherches liées aux radicaux libres, suivi du dosage des phénols totaux. En effet, elle a la capacité d'éliminer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Aebi, 1984**).

*Juglans Regia* L. est une plante utilisée en médecine traditionnelle en raison de la présence de différents métabolites secondaires avec une activité pharmacologique notoire. Dans la présente étude, notre intérêt s'est porté sur l'évaluation de l'effet thérapeutique contre la NALFD de l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. en s'intéressant à son effet antioxydant via deux paramètres ; la catalase et le test de DPPH.

# **Chapitre I : Synthèse Bibliographique**

# Chapitre I : synthèse bibliographique

## I. Le foie

### I.1. Anatomie et physiologie et emplacement du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme, par conséquent, c'est l'un des organes les plus densément vascularisés du corps humain. Il contient plus de 10% du volume sanguin total avec 1,4 litre de sang pour les adultes en moyenne, qui le traversent à chaque minute ; et pèse en moyenne 1,5 kg, mesurant environ 10 cm. Sa couleur est rouge brun, sa consistance est ferme, mais friable ; il est entouré d'une capsule fibreuse mince et résistante, la capsule de Glisson (Mellal, 2010). Il se situe du côté supérieur droit de la cavité abdominale, entre le diaphragme et l'estomac, et s'avère responsable de plusieurs fonctions physiologiques vitales, il reçoit et gère la plupart des nutriments et des substances nocives provenant du métabolisme cellulaire et de la circulation (Meeks et al, 1991).

### I.2. Formation du foie

Le foie se forme à partir du bourgeon hépatique qui prend naissance de la face antérieure du duodénum, puis se développe dans le mésogastre antérieure. Cette étape induit la division du foie en trois parties : une partie moyenne formée par le péritoine hépatique qui enveloppe le foie ; une partie antérosupérieure qui fixe le foie au diaphragme, c'est le ligament suspenseur du foie ; une partie postéro-inférieure unissant l'estomac au foie, qui constitue le petit épiploon. Il existe au-dessus du foie, un segment du mésogastre antérieure interposé entre le ligament supérieur et le petit épiploon, c'est le ligament coronaire unissant la face postérieure du foie au diaphragme (Mellal, 2010).

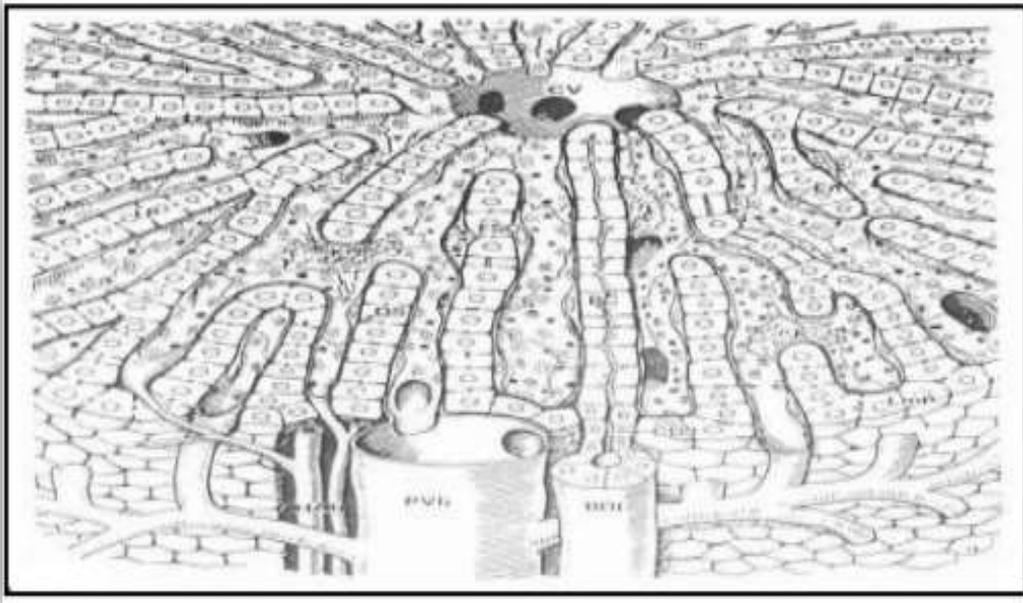
### I.3. Structure macroscopique

Le foie se divise en quatre lobes inégaux ; le lobe hépatique droit est le plus volumineux, le lobe hépatique gauche est la partie la plus étroite de l'organe. Entre ces deux lobes majeurs, on distingue le lobe carré et le lobe caudé. La vésicule biliaire est attachée au foie à la limite du lobe carré et du lobe hépatique droit. Le lobe carré et le lobe caudé sont séparés par un sillon appelé le hile du foie. C'est au niveau du hile que la veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie, et que passent des canaux biliaires majeurs (Thomson et Shaffer, 2001) .

Chaque lobe du foie est divisé en segments ou lobules ; on compte 8 segments en tout. Ces lobules sont formés de cellules hépatiques, les hépatocytes. Ces divisions anatomiques sont importantes pour les interventions chirurgicales : lorsqu'une partie du foie est endommagée et doit être extraite, la résection suit souvent ces contours anatomiques (Oriana et Denis, 2015).

## Chapitre I : synthèse bibliographique

- **Le lobule hépatique** : Il correspond à l'unité structurale du foie, c'est-à-dire aux travées dont les sinusoides se drainent dans la veine centro-lobulaire. Toutefois, deux autres concepts, davantage adaptés à la physiologie et à la pathologie, ont été développés pour définir la subdivision de cet organe, en particulier, l'acinus et les sinusoides hépatiques (Dadoune et al., 1990).



**Figure 1:** Schéma d'un lobule hépatique (Rey-Grobellet et al, 1996).

- **L'acinus** : cette structure est organisée autour des branches terminales des veines portes. Dans cet espace, deux zones fonctionnelles peuvent être facilement définies grâce à des repères anatomiques : la zone périé portale, centrée par l'espace porte et la zone périé veineuse, centrée par la veine centro-lobulaire. La zone périé portale correspond approximativement à la zone centrale de l'acinus, tandis que la zone périé veineuse correspond approximativement à la zone périphérique de l'acinus (Marc, 2012).
- **Les sinusoides hépatiques** : ils épousent complètement la forme des espaces ménagés entre les lames de cellules parenchymateuses. De ce fait, ils ont un calibre plus large et plus irrégulier que celui des capillaires ordinaires. Leur paroi discontinue dépourvue de lame basale est faite d'une seule couche de cellules endothéliales soutenue par une lame réticulinique fenestrée (Rey-Grobellet et al, 1996).
- **Les cellules du foie** : Les cellules parenchymateuses ou hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées (ou de Ito), Les cellules « natural killer » (ou pitcells) et les fibroblastes (Marc, 2012).

## Chapitre I : synthèse bibliographique

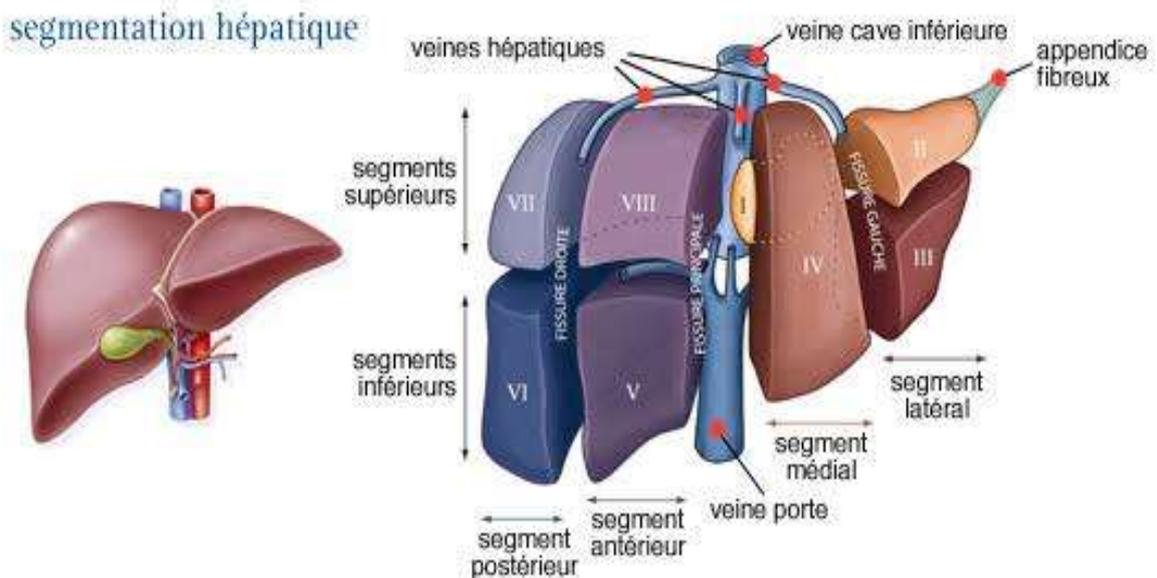
- **Canaux biliaires:** Ils produisent la bile, un liquide jaune-vert qui aide le corps à digérer les graisses. La bile circule à travers une série de canaux dans le foie jusqu'à ce qu'elle atteigne l'intestin grêle ou la vésicule biliaire, où elle est emmagasinée. Lorsqu'il y a de la nourriture dans l'intestin grêle, la bile produite par le foie circule directement dans le canal hépatique commun, puis le canal cholédoque, avant d'être évacuée dans le duodénum pour aider à la digestion. Lorsque l'intestin grêle est vide, la bile s'accumule dans le canal cholédoque jusqu'à ce qu'elle remonte dans le canal cystique, puis dans la vésicule biliaire, où elle sera entreposée jusqu'à ce que le corps en ait besoin (SCC, 2015).

### I.4. Vascularisation du foie

Le foie est l'un des organes les plus densément vascularisés du corps humain, il possède une double vascularisation : il reçoit deux courants sanguins différents : non seulement par l'artère hépatique mais également par la veine porte et ressort par la veine cave inférieure. Le sang de l'artère hépatique apporte essentiellement l'oxygène nécessaire aux cellules du foie (Lacombe, 2005).

- Le foie peut posséder une à trois artères : L'artère hépatique moyenne, l'artère hépatique droite, l'artère hépatique gauche. L'ensemble veine porte-artère hépatique constitue, avec le canal cholédoque, le pédicule hépatique. La ramification de ce pédicule permet d'isoler 8 segments. La numérotation de ces segments a été déterminée par Couinaud, en partant du centre vers la périphérie.
- Le sang quitte le foie par trois veines sus-hépatiques principales (droite, médiane et gauche) et des veines accessoires qui drainent le segment 1 (ou lobe de Spiegel). Les veines sus-hépatiques principales délimitent 4 secteurs, composés chacun de 1 à 2 segments : latéral gauche (segments 2 et 3) paramédian gauche (segment 4), paramédian droit (segments 5 et 8) et latéral (ou postérieur) droit (segments 6 et 7). Elles se jettent toutes dans la veine cave inférieure (Shaffer et Myers, 2005) (Figure 02)

## Chapitre I : synthèse bibliographique



**Figure 02** : Segmentation hépatique et circulation du sang et de la bile dans le foie (Shaffer et Myers, 2005).

### I.5. Les pathologies du foie

#### I.5.1 Hépatopathie :

C'est une inflammation du foie due à un cumul de gras appelée stéatose. Plus précisément, la stéatose hépatique consiste en une accumulation de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme, ceux-ci n'en contenant normalement que des traces non observables.

Les TG intra-hépatiques proviennent des plusieurs carrefours métaboliques. En effet, ils sont produits à partir des acides gras (AG) captés par le foie depuis le sérum, suite soit à une lipolyse du tissu adipeux, soit à une augmentation quantitative des apports lipidiques alimentaires (Fabbrini et al., 2010).

#### I.5.2 Hépatopathie alcoolique

L'hépatopathie alcoolique (ALD) représente probablement la plus ancienne forme de maladie hépatique du genre humain (Patrick, 1952) et l'alcool reste encore une cause majeure de la pathologie hépatique dans le monde. Les caractéristiques histologiques des lésions induites par l'alcool varient en fonction du degré et de l'extension des lésions. Ces lésions comprennent la stéatose (foie gras), l'inflammation lobulaire, la fibrose péri-portale, les corps de Mallory, la vacuolisation des noyaux, la prolifération des canaux biliaires, et la fibrose ou cirrhose (Lefkowitz, 2005).

## Chapitre I : synthèse bibliographique

### I.5.3 Hépatopathie non alcoolique

L'hépatopathie non alcoolique (NAFLD) est un problème médical de plus en plus reconnu à travers le monde, chez l'adulte et chez l'enfant. La NAFLD peut être la cause la plus fréquente de la maladie chronique du foie, avec une prévalence estimée à 24% dans la population générale. Des analyses récentes de dépistage de la population ont montré que la NAFLD peut être l'explication sous-jacente de 80% des tests hépatiques chez les adultes dépassant de loin la prévalence de l'hépatite C (**Ruhl et al., 2004**).

De plus, la NAFLD n'est plus considérée comme un simple processus « inoffensif », mais plutôt un spectre de lésions hépatiques qui s'étend de la stéatose simple à la NASH, avec lésions progressives incluant la fibrose, la cirrhose, l'insuffisance hépatique (**Brunt et Tiniakos, 2005**).

À la suite du rapport de recherche de la Mayo Clinique publié en 1980, l'histologie du foie atteint est similaire au type d'hépatite observé chez les alcooliques (**Ludwig et al, 1980**). **Matteoni et al, (1999)** ont tendu le concept de la NASH à la NAFLD inclure la stéatose simple sans inflammation, nécrose ou fibrose du tissu hépatique.

### II. Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)

La NAFLD est une maladie bénigne chez la plupart des patients. La stéatose hépatique, aussi nommée "foie gras", est un trouble lié à l'accumulation de lipides dans le foie, formant des dépôts (**Lee, 1995**). Cependant, la NAFL est susceptible d'évoluer vers la NASH, une accumulation de gras dans le foie associé à une réaction inflammatoire dans 20 à 30% des cas (**Caussy, 2020**). Néanmoins, la NASH est associée à une mortalité hépatique 10 fois plus élevée par rapport à une population générale et un risque multiplié par deux de décès cardiovasculaire (**Ekstedt et al., 2006**).

# Chapitre I : synthèse bibliographique

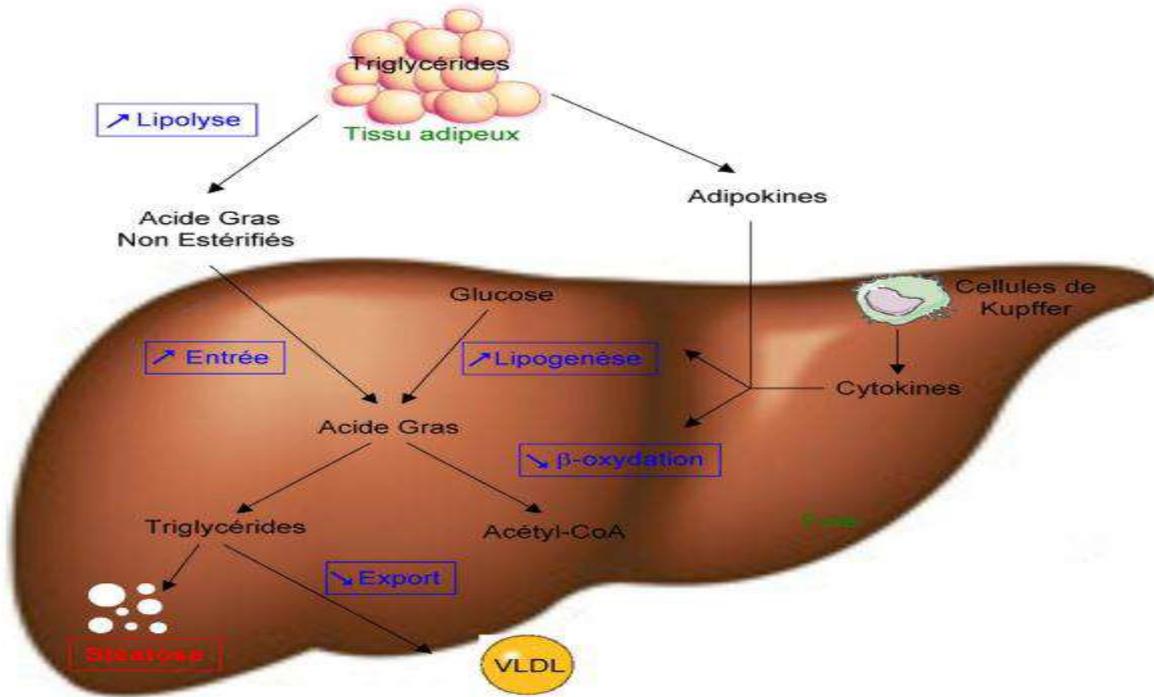


Figure 03: Mécanismes de la stéatose non alcoolique (Teixeira-Clerc, 2015).

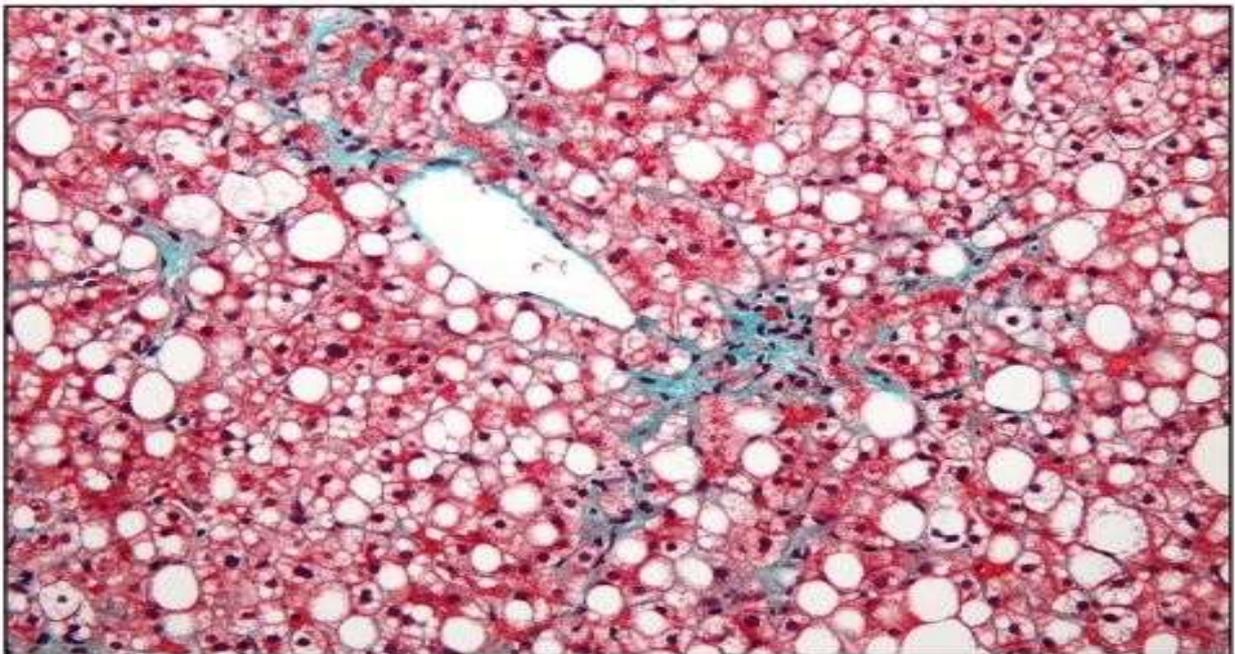


Figure 04: Coupe de foie colorée au trichrome de Masson et NALFD

# Chapitre I : synthèse bibliographique

## II.1. Nosologie détaillée:

La NAFLD regroupe des entités hétérogènes en fonction de leur nature, de leur mécanisme et de leur pronostic. Par conséquent, il est particulièrement difficile d'élaborer une classification pour la NAFLD ; aucun consensus n'a été atteint sur le sujet (**Lahmek et Nahon, 2005**). Selon les études, l'obésité reste la première condition associée à la NAFLD et elle est décrite chez 40 à 100% des patients ayant une NAFLD (**Ludwig et Coll, 1980 ; Lee, 1989**). Il existe 4 types histologiques de maladies stéatosiques hépatiques voir (**Tableau 01**)

**Tableau 01:** Les types 3 et 4 représentent la NASH (**Matteoni et al., 1999**).

Categories	Les types
Catégorie1	Stéatose simple
Catégorie2	Stéatose + inflammation non spécifique
Catégorie3	Stéatose + dégénérescence par ballonnisation
Catégorie4	Stéatose +fibrose et/ou corps de Mallory

## II.2. Classification des causes de la stéatose

Pour la maladie, les causes non alcooliques de la stéatose peuvent être des troubles nutritionnelles ou un dérèglement du métabolisme lipidique ou glucidique. Plus rarement, la NAFLD peut être la conséquence d'une toxicité médicamenteuse ou peut-être associée à une infection virale C ou encore à une lipodystrophie d'origine génétique ou compliquant une infection par le (Immunodéficience Humaine, VIH) (**Ratziu et Poynard, 2006**).Voici un tableau résumant les causes principales de la NAFLD. (**Tableau 02**)

# Chapitre I : synthèse bibliographique

**Tableau 02:** Classification des causes de la stéatose non alcoolique

<b>Causes métaboliques et nutritionnelles</b>	
Principals	Obésité 70 à 75% ; Diabète 40 à 50% Hypertriglycéridémie 40 à 50%
Autres	Dénutrition prolongée Alimentation parentérale Courts circuits digestifs Gastroplastie pour obésité morbide
<b>Causes non métaboliques</b>	
Medicaments	Corticoïdes, méthotrexate, Tamoxifène, amiodarone, perhexiline, nifédipine, diltiazem, chloroquine, hycanthone, Diméthyl formamide
Agents toxiques Divers	Huile est toxiques Lipodystrophie, Maladie de Weber-Christian, Infection par le VHC, A-B et la lipoprotéïnémie

## II.3. Le traitement

À l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) ou par l'Agence européenne du médicament (EMA), mais certaines options thérapeutiques sont possibles (**Lanthier, 2020**).

Six essais de phase III et environ vingt essais cliniques de phase II pour le traitement de la fibrose hépatique ou de la NASH sont en cours (**Caussy, 2020**). Actuellement, le traitement de la NAFLD repose sur les règles hygiéno-diététiques incluant l'augmentation de l'activité physique ainsi qu'une meilleure alimentation (**Jagot, 2013**).

## Chapitre I : synthèse bibliographique

### ✓ **Modification de l'hygiène de vie**

La NAFLD est étroitement liée à la sédentarité et à l'excès calorique, Les actions de première ligne à entreprendre dans la prise en charge de la NAFLD sont l'augmentation de l'exercice physique et une meilleure alimentation (**Ait Boudaoud et al., 2019**).

### **Activité physique :**

L'activité et l'exercice physique sont des régulateurs clés du métabolisme, ils améliorent la stéatose hépatique chez les personnes atteintes de la NAFLD en parallèle à la perte de poids et à la modification du régime alimentaire (**Hallsworth et Adams, 2019**). Elle réduit la teneur en lipides intrahépatique, les marqueurs des lésions hépatocellulaires ainsi que l'insulino-résistance et l'IMC (**Ahmed et al., 2019**).

### **Régimes alimentaires :**

Plusieurs travaux autour des effets des régimes alimentaires et l'activité physique dans la NAFLD ont été publiés : Dans leur travail, **Musso et al, (2018)**, il a été démontré qu'une perte de poids de plus de 7% était nécessaire pour obtenir des améliorations significatives des lésions histologiques de la stéatose, de la ballonnisation et de l'inflammation.

Plusieurs types de régime alimentaire ont été testés sur des patients avec une NAFLD comme le régime méditerranéen, riche en acides gras mono et polyinsaturés, ainsi qu'en composés aromatiques tels que les polyphénols (**Anania et al., 2018**) et le régime hypocalorique riche en fibres et en protéines et à la teneur en graisse hépatique (**Arslanow et al., 2016**). **Gelli et al, (2017)** ont réalisé une étude sur 46 patients pendant 6 mois pour déterminer l'efficacité du régime méditerranéen sur la réduction de la gravité de la NAFLD. Ils ont trouvé que 20% des patients ont présenté une rémission de stéatose hépatique. Cette réduction est accompagnée d'une baisse des taux d'enzymes hépatiques ALAT, ASAT et GGT et d'une réduction de l'IMC et du tour de taille.

L'étude de **Shidfar et al, (2018)** visait à examiner l'effet de l'huile d'olive vierge sur l'ALAT et l'ASAT et la gravité de la stéatose chez les patients NAFLD soumis à un régime amaigrissant. Ils ont conclu que la consommation d'un régime hypocalorique enrichi en huile d'olive, ainsi qu'une légère réduction de poids, renforcent les effets souhaités de la perte de poids en améliorant les niveaux des enzymes hépatiques. Notamment, les régimes pauvres en glucides sont plus utilisés pour le traitement de la NAFLD, ils favorisent la perte de poids et

## Chapitre I : synthèse bibliographique

diminuent la teneur en triglycérides intrahépatiques et augmentent le cholestérol total (Ullah et al., 2019).

### III. Les enzymes:

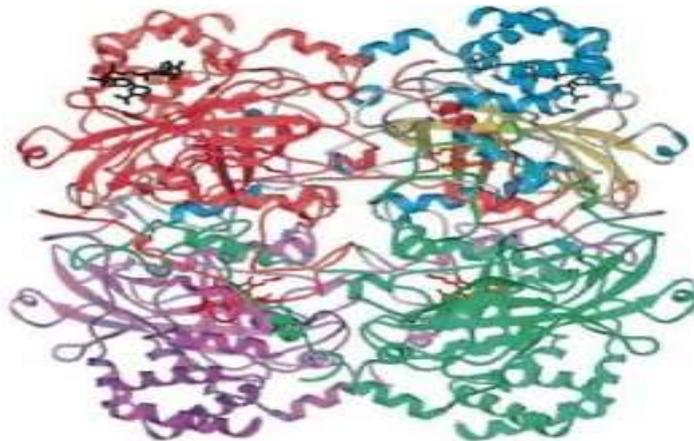
#### III.1 Définition :

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique qui exercent une activité catalytique spécifique d'un très grand nombre de réactions chimiques (Navarre et Françoise, 2010). Ce sont des protéines fabriquées par l'organisme. Elles sont constituées de milliers d'acides aminés liés en une chaîne linéaire. Ils jouent un rôle dans toutes les fonctions (Burhan et al., 2002). Il existe plusieurs types d'enzymes tel que les lipases, les protéases... etc. Les principaux facteurs du milieu qui contrôlent la fonction des enzymes sont la température, le pH et l'activité de l'eau etc (Pierre, 2000).

#### III.2 La catalase :

La catalase est une enzyme commune dans presque tous les organismes vivants exposés à l'oxygène. Elle joue un rôle très important dans la protection de la cellule contre les dommages oxydatifs par des EROS et possède l'un des nombres les plus élevés de turnover de toutes les enzymes ; une molécule de catalase peut convertir des millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène chaque seconde (Switala et Loewen, 2002). Son pH optimal varie entre 6,8 et 7,5 et sa température environ 37°.

##### III.2.1 Structure



**Figure 05:** Structure de la catalase (Putnam et al., 2000).

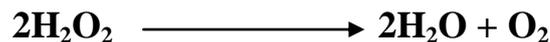
## Chapitre I : synthèse bibliographique

La catalase est une enzyme tétramérique (d'environ 60 kDa pour chaque sous-unité ; chacune possède 527 résidus d'acide aminé et un groupe hème avec le fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Goth et Nagy, 2013). De plus, la catalase est liée au NADPH qui la protège et améliore son activité (Ichal et al., 2011).

### III.2.2 Rôle physiologique de la catalase

La catalase est responsable de la détoxification du  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit dans les conditions physiologiques. La catalase des globules rouges semble être le principal régulateur des deux concentrations du  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire et extracellulaire (Goth et Nagy, 2013) et peut agir pour protéger l'hémoglobine des érythrocytes humains, qui sont exposées à des concentrations importantes d'oxygène (Putnam et al., 2000), et d'autres tissus contre le stress oxydant (Goth et Nagy, 2013). Elle a également été impliquée comme un facteur important dans l'inflammation (Putnam et al., 2000).

La catalase transforme le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oxygène et en eau, diminuant ainsi sa demi-vie et atténuant de ce fait la génération de radicaux hydroxyles selon la réaction (3) suivante (Ichai et al., 2011):



Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais son rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer son excès afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Goudable et Favier, 1997).

En cas de carence de la catalase, qui est due à la dépression de la transcription du gène de la catalase (Sato et al., 1992), la concentration à l'état stable du  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut augmenter conduisant à des dommages oxydatifs au niveau des cellules. Ces dommages oxydants représentent probablement un facteur de risque pour plusieurs maladies, dont le diabète sucré (Putman et al., 2000 ; Goth et Nagy, 2013).

## IV. Le genre Juglans

Juglans est un genre de plante de la famille Juglandaceae, connu par ses graines ou noix. Ce genre comporte 21 espèces réparti en Europe et au Japon. Parmi eux, quatre espèces essentielles :

*Juglans mandshurica*

*Juglans regia*

*Juglans cathayensis*

*Juglans hopriensis* d'origine chinoise

## Chapitre I : synthèse bibliographique



**Figure 06 :** Feuille de *Juglans regia* L.



**Figure 07:** Fruits de *Juglans regia* L.



**Figure 08 :** L'écorce de *Juglans regia* L.

# Chapitre I : synthèse bibliographique

## IX.1. Classification taxonomique

Selon Crète, (1956), le noyer appartient à :

- Embranchement : Phanérogames
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Apétales
- Ordre : Amentales
- Famille : Juglandacea
- Genre : Juglans
- Espèce : *Juglans Regia* L.

## IX.2. Origine et répartition géographique de *Juglans Regia* L.

Les noix sont la nourriture d'arbres la plus vieille connue pour l'homme, datant de 7000 av. J.C. Les Romains appelaient des noix *Juglans regia* L. "le gland royal du Jupiter". La première histoire indique que des noix anglaises sont venues de la Perse antique, où elles ont été réservées pour la redevance. Ainsi, on connaît souvent la noix comme "la Noix persane." On a négocié des Noix le long du parcours de Route de la soie entre l'Asie et le Moyen-Orient (Kajji, 2020).

Une petite population des arbres d'espece *J. Regia* a échappé de la dernière période glaciaire en Europe du Sud, mais la plus grande partie de matière végétale sauvage trouvée dans la Péninsule balkanique et une grande partie de Turquie. Dans les différentes régions de l'Algérie, le noyer se trouve sous forme de peuplement, on le trouve généralement à Annaba, Sétif, la grande Kabylie, Tébessa, Tlemcen, Djelfa et ausud de Tiaret (Bonev, 1973).

## IX.3. Description botanique

*Juglans regia* L. noyer cendré encore appelé arbre à noix longues ou Noyer tendre est un arbre de petite à moyenne taille : il atteint une hauteur d'environ 25 mètres, et dépasse rarement les 30 mètres. Son diamètre peut atteindre 80 à 90 cm, à feuilles caduques (Sahah et al., 2019).

Le noyer cendré fleurit d'avril à juin selon les localités. C'est un arbre monoïque et la pollinisation est anémophile. Les fleurs des deux sexes arrivent à maturité à des moments différents. Cet arbre possède un tronc court qui se divise en quelques grosses branches

## Chapitre I : synthèse bibliographique

ascendantes à grande propagation. Les petites branches ont, quant à elles, tendance à se recourber vers le bas, peuvent retourner vers les extrémités (**Bonhomme, 2019**).

C'est une espèce claire exigeante, surtout la lumière solaire pour bien grandir. L'écorce est lisse, olive-brune quand l'arbre est jeune et argentée-grise sur des branches plus vieilles, et montre de larges fissures avec une texture plus lourde. Les fleurs masculines sont dans des chatons penchants de 5 à 10 cm de long, les fleurs féminines sont terminales et dans les groupes de deux à cinq, mûrissant en automne dans un fruit avec une cosse verte, semi charnue brune et ondulée, la graine est grande, avec une coquille relativement mince et comestible, avec une saveur riche (**Verma et al., 2013 ; Sahah, 2019**).

Les noix restent généralement sur l'arbre jusqu'à la chute des feuilles. Le fruit arrive à maturité au cours des mois de septembre ou d'octobre.

L'embryon peut demeurer à l'état dormant pendant 2 ans, cependant, il germe habituellement au printemps suivant la chute des noix (**Bonhomme, 2019**).

### **IX.4. Production agricole et composition biochimique de *juglas regia* L.**

Le noyer est cultivé commercialement partout en Europe du Sud, Afrique du nord, Asie orientale, aux USA et en Amérique du Sud occidentale. Dans cette dernière région, l'Argentine est le producteur principal, avec environ 8500 tonnes métriques par an. La graine de noix représente de 40 à 60 % du poids de noix, dépendant principalement sur la variété. La graine a un haut niveau d'huile (52-70%) dans laquelle les acides gras polyinsaturés prédominent en plus de l'huile, les noix fournissent les quantités appréciables de protéines (en hausse de 24% du poids de graine de noix), des glucides (12- 16%) fibre (1,5-2%) et minéraux (1,7-2%) (**Kajji, 2020**).

Légèrement astringent, le goût de fruit de noix a été associé à la présence de composés phénoliques. La plupart des composés phénoliques généralement identifiés dans la noix sont des acides phénoliques et des tanins condensés. La haute concentration des composés phénoliques se trouve dans la coque. Les composés phénoliques sont intéressants de leurs effets positifs et favorables sur la santé humaine de leurs effets antiathérogène apparents et propriétés antioxydants. quelques molécules retrouvées dans cette plante par HPLC : acide tannique et quercétine (**Aslan et al., 2018**).

## Chapitre I : synthèse bibliographique

### IX.5.Utilisation médicinale populaire de *Juglans regia* L.

Traditionnellement utilisé comme antimicrobien, anthelminthique, astringent, kératolytique, anti diarrhéique, hypoglycémique, dépuratoire, tonifiant, carminative et pour le traitement de sinusite, le froid et le mal d'estomac. Dans la médecine populaire turque, des feuilles fraîches appliquées sur le corps nu ou le front pour réduire la fièvre ou sur l'articulation gonflée pour soulager la douleur rhumatismale (**Santos, 2013**).

Le grain de *Juglans regia* a été utilisé pour le traitement de la maladie d'intestin incendiaire (inflammatoire) dans la médecine traditionnelle iranienne. En Palestine, il est utilisé pour le traitement de diabète, de l'asthme, de la prostate En médecine chinoise traditionnelle, son péricarpe extérieur vert séché nommé 'Qinglongyi' en chinois, a été rapporté pour traiter la douleur (**Sabatier, 1998**).

La plante est utilisée comme un remède de l'inflammation dermique, de la transpiration excessive des mains et des pieds de l'eczéma chronique et de la scrofule. Les feuilles de cette plante sont utilisées pour traiter la démangeaison de cuir chevelu et des pellicules, des coups de soleil et des brûlures superficielles aussi bien qu'un émollient complémentaire dans des affections cutanées. Il a aussi un haut pouvoir anti-athérogénique et possède une activité ostéoblaste remarquable qui ajoute à l'effet avantageux des noix une action cardio-protectrice (**Labuckas, 2008**).

L'écorce est utilisée pour le nettoyage de dents. Dans Le Népal la pâte d'écorce est utilisée pour soigner l'arthrite, les maladies de peau, le mal de dent et la croissance de cheveux. Le manteau de graine est utilisé pour guérir des blessures. La coquille de *Juglans regia* L. est utilisée dans la médecine de gens de la Calabre pour guérir la malaria (**Aslan et al., 2018**).

# **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

## Chapitre II: Matériel et méthodes

### I. Matériel

#### ➤ Réactifs

Eau physiologie (NaCl 0,9%), eau distillée, chloroforme, solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), éthanol (90%), Hydrogénophosphate de potassium (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), phosphate de potassium monobasique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), solution de Bradford, carbonate de sodium.

#### ➤ Appareillages

Plaque chauffante et agitatrice (VELP), balance de précision (RADWAG), homogénéisateur (Heidolph), vortex (VELP), centrifugeuse (SEGMA2-16 PK), spectrophotomètre (SHIMADZU), pH mètre.

### II. Méthodes

#### II.1. Dosage de l'activité antioxydants par le test DPPH

Le DPPH est un radical stable utilisé pour l'étude des propriétés anti-radicalaire des extraits poly-phénoliques (Sanchez-Moreno, 2002). Une quantité de poudre de DPPH a été dissoute dans 100ml d'éthanol et la solution obtenue a été conservée pendant 12h au frais et à l'abri de la lumière. La méthode utilisée a été décrite par Molyneux, (2003). Un volume de l'extrait obtenu à partir de chaque macération a été ajouté à 2ml de solution de DPPH. À l'aide d'un spectrophotomètre, la lecture des l'absorbances a été réalisée à 517nm au bout de 30min. Le calcul du pourcentage d'inhibition à partir des absorbances obtenues a été calculé avec l'équation suivante :

$$\% \text{ D'inhibition du radical DPPH}^\bullet = \frac{A_c - A_e}{A_c} \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du blanc

**A<sub>e</sub>** : absorbance de l'échantillon

#### II. 2.Dosage des polyphénols totaux

Détermination de la teneur polyphénolique par spectrophotométrie, a été réalisée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalte. Ce dosage est fondé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le protocole suivi est basé sur celui décrit par (Sigleton et Ross, 1965) avec quelques modifications.

## Chapitre II: Matériel et méthodes

Un volume de l'extrait a été ajouté à de volume de 500 ul de Folin-Ciocalteu et de de 450 ul carbonate de sodium, puis conservés à l'abri de la lumière pendant 1h. L'absorbance a été mesurée à 765nm en utilisant l'acide gallique à différentes concentration comme molécule de référence.

### II. 3. Détermination de l'activité de la catalase :

Les organes utilisés pour l'évaluation de l'activité de la catalase ont été prélevés chez des rats chez lesquels la NALFD a été provoqué durant quatre mois de l'année 2022-2023. Les animaux avaient été répartis en quatre groupes et traités selon le protocole suivant :

**Groupe de rats témoins(T)**: Groupe d'animaux recevant un régime standard

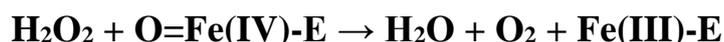
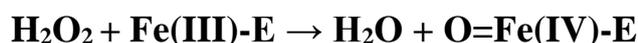
**Groupe de rats témoins positif (EEJR)** : Groupe d'animaux recevant un régime riche en gras et en sucre rapides afin d'induire la maladie puis ils ont été remis sous un régime normal et notamment traités durant la même période avec l'extrait de *Juglans regia* L.

**Groupe de rats témoins négatif (Malade)** : Les rats de ce lot ont été nourris avec un régime riche en sucre et gras d'origine animale et n'ont pas été traités ni remis sous le régime normal.

**Groupe de rats (nourriture)** : les rats de ce lot ont été nourris avec le régime riche en gras et en sucres rapides, après induction de la maladie, ils ont été remis sous un régime normal mais n'ont reçu aucun traitement.

#### ➤ Principe de l'activité de la catalase :

La catalase est une oxydoréductase hémunique dont l'atome de fer de l'hème a la capacité de réaliser une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), créant pyrogallol oxydé ainsi une molécule d'eau et un groupe Fe(IV)=O hautement oxydant. Ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour donner du dioxygène (Clairborne, 1985).



#### Protocol suivit de la catalase

Des morceaux des foies prélevés et conservés ont été découpés en petits morceaux. L'homogénat a été préparé via une homogénéisation manuelle à l'aide d'un mortier, dans des conditions à froid mais aussi en ajoutant un tampon PBS (pH=7,4).

## Chapitre II: Matériel et méthodes

En suite nous avons réalisé une centrifugation à froid (-4°C) 6000g/7min, afin de conserver les propriétés enzymatiques du tissu étudié. L'activité de la catalase a été mesurée en suivant la disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui se transforme en O<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O à une longueur d'onde de 240 nm.

### ➤ Mode opératoire :

La constitution du mélange réactionnel était formée de 380 µl de solution tampon phosphate de potassium, un volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de 20 µl de surnageant. La diminution de l'absorbance du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 240 nm durant 60s à une température égale à 25°C pour mesurer l'activité de la catalase.

Les résultats ont été exprimés en unités (U) où une unité représente 1 umol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommé /mg prot / min, suivant :

**N** : quantité de protéines présente dans le volume de l'échantillon utilisé ;

**U** : µmole de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommé/ min / mg de protéine ;

**K** : constante de vitesse de la réaction est calculée selon la formule suivante :

$$K = (2,303 / T) \times \log (A1/A2)$$

**A1** : absorbance au temps zéro ;

**A2** : absorbance après une minute ;

**T** : intervalle de temps en minute.

### II. 4. Etude Histologique :

Différents organes à savoir ; le foie a été rapidement prélevé et conservé dans une solution de formol à 10%. Ce tissu était destiné à des études macroscopique et microscopique. L'examen histologique a été effectué au niveau du laboratoire de recherche de l'université de médecine de Bejaia.

L'examen microscopique fait appel à une technique de base comportant différentes étapes à savoir ; une fixation, une déshydratation, une inclusion en paraffine, réalisation des coupes, Réhydratation et colorations à l'Hématoxyline-Eosine (HE) suivie de l'observation au microscope optique à l'objectif 40.

## Chapitre II: Matériel et méthodes

### A. Fixation :

Pour l'étude histologique, le foie est rapidement fixé dans le formol à 10%, pendant 6 heures. Cette étape est importante car le formol permet le maintien de la morphologie tissulaire proche de celle à l'état vivant.

- Mettre la pièce anatomique (le foie) dans un bain de formol à 10% entre 24h et 48h. (il est préférable de la laisser 48h).
- Il faut veiller à préparer un bain qui représente 10 fois la masse de la pièce à fixer.
- Prélever un fragment de l'organe à étudier.
- Le positionner dans une cassette que l'on ferme et que l'on trempera dans des bains successifs.

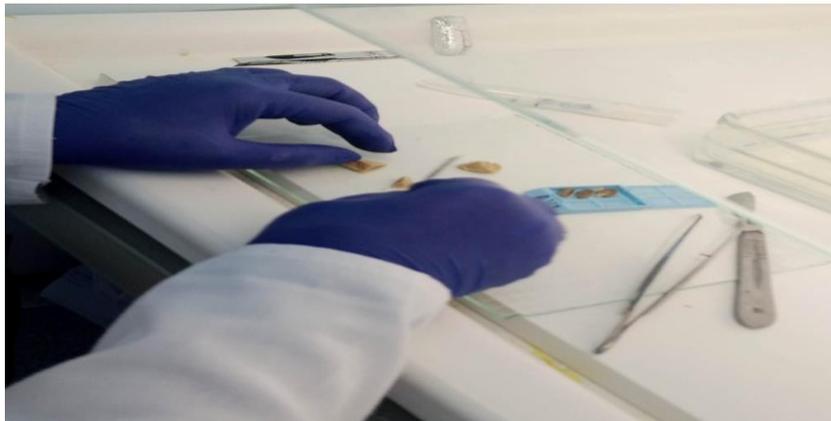


Figure 09 : Photographie montrant l'étape de mise des foies en cassettes.

### B. Déshydratation :

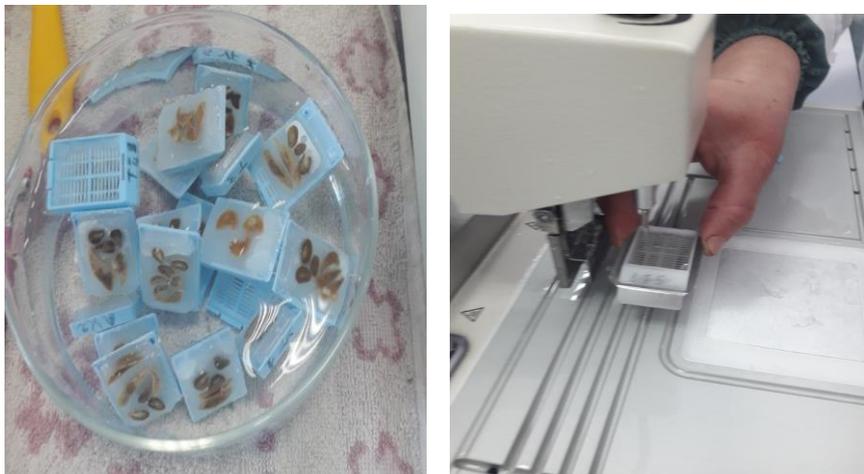
- Mettre dans 3 bains successifs d'alcools absolus pour déshydrater l'organe sachant que la paraffine est très hydrophobe,
- Ensuite mettre dans 2 bains successifs d'acétone pendant 2H,
- Mettre dans 3 bains successifs de xylène durant 45min chacun ;
- Mettre dans de la paraffine liquide pour laver les excès de solvant. Pour cela on utilise une étuve entre 56°C et 60 °C pour garder la paraffine liquide.



**Figure 10 :** Photographie montrant l'automate de déshydratation des échantillons.

### C. Inclusion en paraffine:

- Dans un moule métallique préalablement placé à l'étuve à 56°C,
- Mettre au fond quelques gouttes de paraffine liquide (Les pinces doivent être chaudes pour faciliter cette opération),
- Mettre l'organe en veillant au sens pour obtenir une coupe de tous le tissu,
- Rajouter de la paraffine liquide, On place l'inclusion sur la paillasse pour refroidir délicatement la paraffine.



**Figure 11:** Cassette contenant échantillon de foie incluses dans de la paraffine

## Chapitre II: Matériel et méthodes

### D. La coupe histologique avec le microtome :

- Reculer le porte objet au maximum,
- Placer le bloc dans le porte objet sans le fixer,
- Placer le rasoir face gravée vers l'extérieur : le fixer (face à couper dans un plan vertical parallèle au fil du rasoir, les deux arêtes du bloc les plus longues horizontalement),
- Dégrossir à la main,
- Régler l'épaisseur des coupes à 5 micromètres,
- Mettre le cliquet,
- Couper.

### E. Fixation de la coupe sur la lame

- Sur une plaque chauffante maintenant une température de 50 °C,
- On place une lame sur laquelle on dépose une solution eau distillée albuminé à 1% en veillant à faire un dôme d'eau sur la lame pour éviter des bulles d'air,  
L'eau albuminée permet à la coupe de bien glisser sur la lame



**Figure 12 :** Etapes de coupe au microtome

## Chapitre II: Matériel et méthodes

### F. Déparaffinage

- Il est nécessaire d'enlever la paraffine. (en veillant à ne pas enlever la coupe de la lame),
- Passage de la lame dans 2 bains de toluène durant deux minutes chacun. (en veillant à la propreté du dernier bain),
- Passage par trois bains d'alcool à 100°, 80° puis 50° durant deux minutes chacun pour réhydrater l'échantillon,
- On place la lame dans un bain d'eau du robinet pendant quelques secondes,
- On place la lame dans un bain d'eau distillée pendant quelques seconds.

### G. Coloration à HE:

- Bain à l'hématoxyline, permet de colorer les noyaux (5min),
- Rinçage eau du robinet (3 min),
- Rinçage eau distillée,
- Bain à l'éosine, permet de colorer le cytoplasme en rose 3 minutes,
- Rinçage eau distillée,
- Bain dans l'alcool à 95% 1 min,
- Bain dans l'alcool à 100 % 1 min.



**Figure 13:** Photographie récapitulant des étapes de coloration et celles du montage

## Chapitre II: Matériel et méthodes

### H. Le Montage :

Cette opération est réalisée entre la lame et la lamelle avec une goutte de Eukitt

### I. Observation microscopique :

Observation microscopique par un grossissement (Gx100 et 40)

### II.5 Dosages des protéines :

#### ➤ Principe :

La teneur en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford, basé sur le changement d'absorbance se manifestant par le changement de couleur de bleu de coomassie après liaison avec les acides aminés basiques, et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la protéine (Marion, 1976).

#### ➤ Mode opératoire :

Dans des tubes eppendorfs, un volume de 20ul d'échantillon a été ajouté à 980ul de Bradford. Après 10min, la densité optique du mélange a été déterminée à 595nm. Les concentrations sont définies par référence à une gamme étalon à base de BSA.

#### ➤ Analyse statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  Equartype pour les mesures *in vitro*. Les tests *in vivo* ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 8.0.2. L'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test Dunnett. Les résultats ont été considérés comme étant significatifs à 0,05.

# **Chapitre III : Résultats ET Discussion**

# Résultats et discussion

## 1. Dosage des polyphénols totaux :

Un nombre conséquent de recherches scientifiques ont révélé que différentes classes de polyphénols pouvaient protéger ou traiter la NAFLD, notamment, freiner la progression de la pathologie vers la NASH, parmi lesquelles : les flavonoïdes, les anthocyanes, les flavonols (par exemple la quercétine) et les flavanols (catéchines) (**Rafiei et al., 2019**).

La noix a fait l'objet de plusieurs études révélant sa richesse en composés phénoliques, lesquels sont considérés, entre autre, comme des participants à la capacité antioxydants (**Liu et al., 2007**) et la prévention de la majorité des pathologies (**Tosun et Al., 2009**).

Par conséquent, déterminer leur contenu est crucial pour étudier la composition phytochimique des plantes médicinales.

Dans la présente étude, le dosage des phénols totaux a été réalisé sur l'extrait éthanolique de *Juglan Regia* L. (EEJR) par la méthode de Folin-Ciocalteu. La teneur en phénols totaux calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et a révélé un taux égale à  $510 \pm 30$  mg acide gallique équivalent par gramme d'extrait sec.

Dans l'étude réalisée par **Cintesune et al, (2023)**, la teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *Juglans regia* L. était de  $102,02 \pm 5,06$  mg GAE/g. D'autres études effectuées par **Ryszard et al, (2008)**, ont dévoilé une teneur en polyphénols équivalent à  $546 \pm 14$  mg/g d'extrait de *Juglan nigra* L. un tau équivalent à celui retrouvé dans la présente étude.

Cette différence en la teneur totale en composés phénoliques entre les extraits pourrait être lié au fait que le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols car plusieurs composés peuvent réagir avec ce réactif donnant un taux phénolique élevé. La partie de la plante étudiée, le solvant et la méthode d'extraction utilisée peuvent également avoir un impact sur la quantité en polyphénols extraite.

Plusieurs facteurs permettent de déterminer la teneur en composés phénoliques. les facteurs extrinsèques, tels que les facteurs géographiques et climatiques, les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence (**Aganga et al., 2001**).

L'extrait de *Juglans regia* L. possède des propriétés protectrices contre les lésions hépatiques induites par le régime riche en gras qui sont dues à la présence des polyphénols.

## Résultats et discussion

Sachant que les poluphénols ont un rôle cruciale dans le traitement de la NALFD en agissant sur les oxydants et l'inflammation tissulaire, signifie que les acides phénoliques de *Juglans regia* L. pourraient potentiellement contribuer à l'effet anti-NAFLD de la présente étude.

### 2. Test de piégeage des radicaux libres DPPH :

L'activité anti-radicalaire a été réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydants qui donne un hydrogène ou un électron et la forme non radicalaire DPPH-H peut ainsi se former (**Bortolomeazzi et al., 2007**).

Cette capacité de réduction est expliquée par l'augmentation du pourcentage d'inhibition. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin, dont l'acide ascorbique (antioxydants de référence). La réaction s'accompagne d'un changement de la couleur du mauve vers le jaune, et la décoloration agit comme un indicateur de l'activité antioxydants (**Manteanu et al., 2021**). Elle permet de déterminer l'IC50 qui est la concentration nécessaire pour piéger 50% du radical libre (DPPH), ainsi, une faible valeur d'IC50 représente une capacité antioxydants élevée et vice-versa (**Stahr et al., 2021**).

Les résultats obtenus pour le test DPPH est de l'ordre de  $0,52 \pm 0,1$  mg/ml, on en déduit que l'EEJR possède une forte capacité de piégeage du radical libre DPPH, et que notre extrait possède une forte activité antioxydants.

En comparant la concentration inhibitrice 50% des radicaux libres DPPH avec une recherche ultérieure réalisée sur l'écorce de la même espèce de plante (**Khadhri et al., 2022**), via une extraction par du méthanol était de l'ordre de  $3,4 \pm 0,04$  mg/ml et de l'ordre de  $1,27 \pm 0,03$  mg/ml par une extraction par infusion. Une autre investigation réalisée sur les feuilles de la même plante *Juglans regia* L. par **Zhao et al, (2014)**, ont démontré que l'IC50 était de l'ordre de 0,022 mg/ml, une valeur bien inférieur à celle retrouvée dans notre expérimentation.

L'étude de **Bhatia et al, (2006)** avait utilisé l'extrait aqueux de l'écorce du *juglans regia* L. et ont démontré une inhibition de 50% du DPPH presque équivalente à celle retrouvée dans notre étude avec une concentration de 0,56 mg/ml. Ce qui suggère que les molécules antioxydants se retrouvent principalement dans la phase aqueuse de l'extraction.

## Résultats et discussion

La différence observée concernant les IC50 test DPPH vis-à-vis des autres recherches de la bibliographie scientifiques est potentiellement liée aux différentes méthodes d'extraction et au solvant additionné à la poudre de plante, ainsi qu'aux différentes parties visées dans la plante.

Et d'autres facteurs, comme la maturation de la plante, les conditions climatiques et le temps d'extraction. La relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir piègeur des radicaux libres ont montré que l'activité radicalaire est dépendante du degré de polymérisation et de la polarité de l'antioxydants (**Popovici et al., 2009**).

Notamment, cet effet antioxydants est potentiellement dû à la présence des polyphénols car ils sont d'excellents donneurs d'hydrogène qui sont acceptés par les radicaux libres afin de donner des espèces radicalaires et non radicalaires beaucoup moins réactives (**Losada-Barreiro et al., 2017**).

En effet, les antioxydants sont considérés comme des éléments essentiels des soins de santé, agissent en empêchant ou en ralentissant la progression des dommages oxydatifs en minimisant l'oxydation des biomolécules lorsqu'elles sont présentes à de faibles concentrations par rapport à celles des substrats oxydables (**Zhang et al., 2009**).

L'activité de l'EEJR *in vitro* nous a révélé des résultats prometteurs, ce qui nous a encourager à investiguer dans l'étude de l'activité antioxydants *in vivo* sur les cellules de foie ayant subit la NALFD. Précisément, notre choix s'est porté sur enzyme antioxydants, la Catalase.

### 3. Dosage de l'activité de la catalase

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (**Aebi, 1984**).

La réaction se fait en deux étapes dont la réaction bilan est :



L'activité de la CAT a été mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène.

## Résultats et discussion

La figure N°7 illustre les résultats de la mesure de l'activité de la catalase six mois après le 21<sup>ème</sup> jour de l'administration de l'extrait de *juglans regia* L. Dans le groupe témoin, nous avons observé une valeur de l'activité de la catalase égale à  $0,42 \pm 0,01 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot}/\text{min}$ .

En ce qui concerne le groupe malade une réduction de l'activité de la catalase hautement significative a été constatée avec une valeur égale à  $0,30 \pm 0,01 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot}/\text{min}$  vis-à-vis du groupe témoins. Le groupe nourriture, une réduction significative de l'activité de la catalase égale à  $0,33 \pm 0,01 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot}/\text{min}$  à été relevé vis-à-vis du groupe témoins.

Chez le groupe traité par l'EEJR une augmentation de l'activité de la catalase atteignant une valeur de  $0,36 \pm 0,1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot}/\text{min}$ . aucune différence significative vis-à-vis du groupe témoin n'a été mentionné. Ce qui confirme l'effet protecteur de l'EEJR sur l'activité de la catalase, ce qui lui a conféré une activité similaire à celle du groupe témoin.

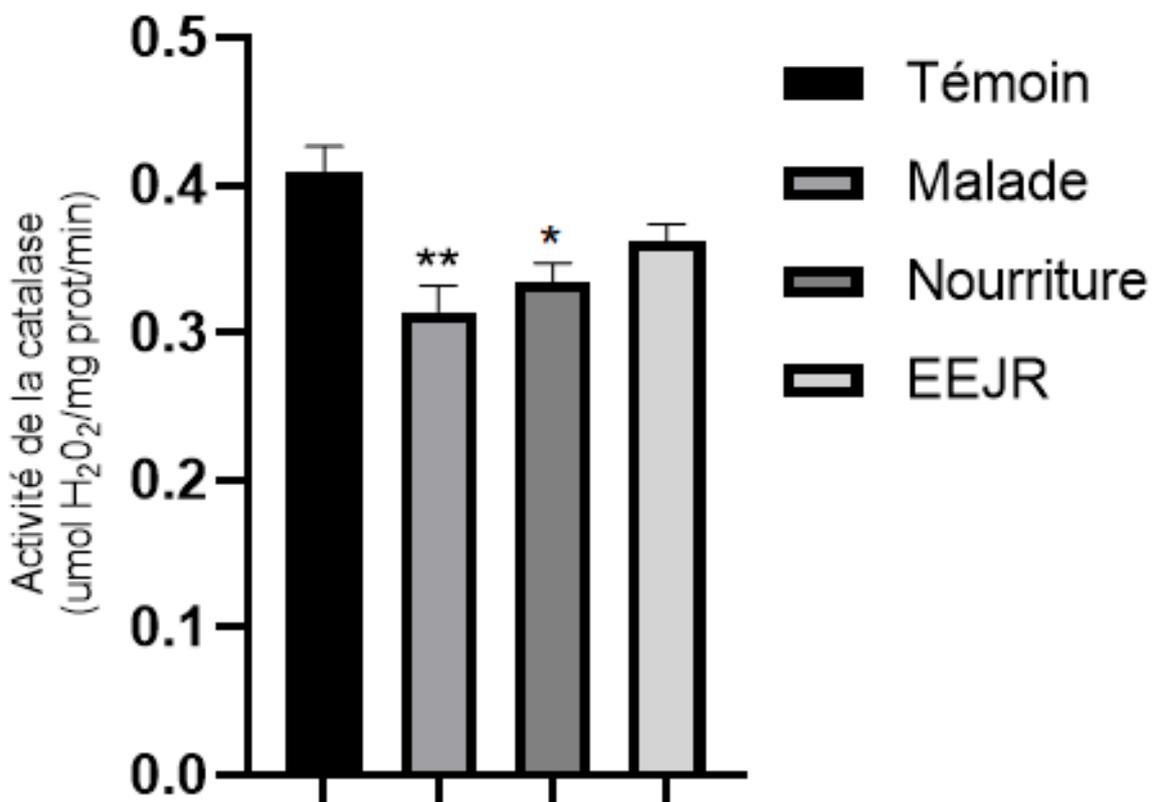


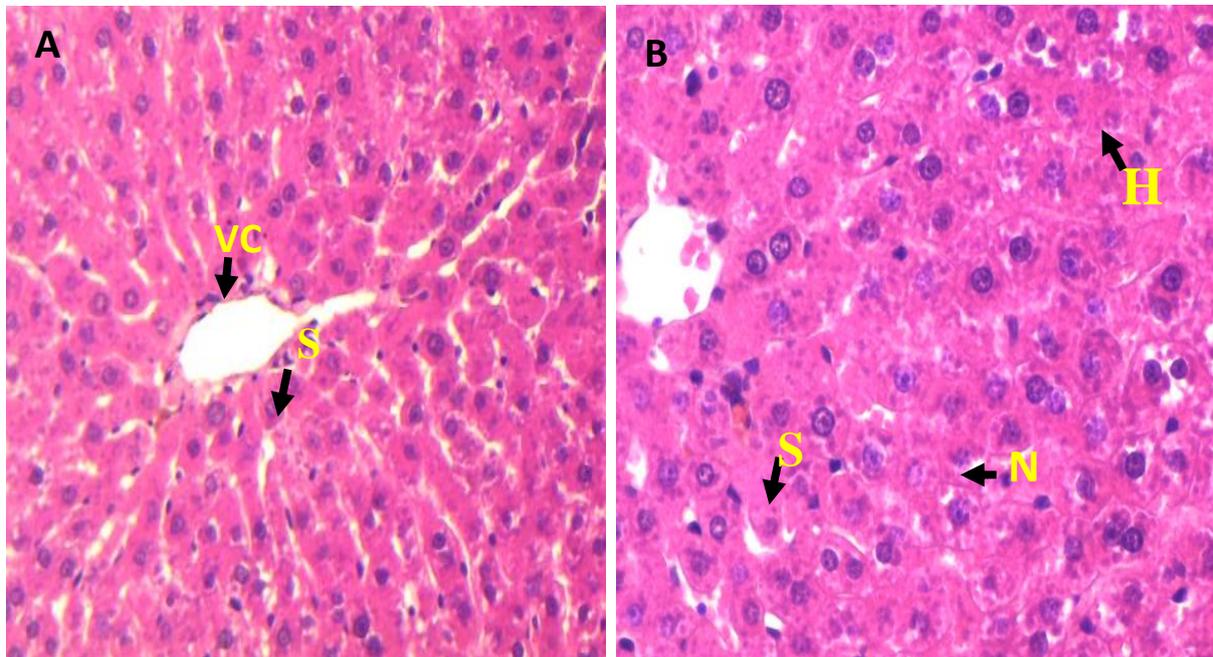
Figure 7 : Activité de la catalase.

## Résultats et discussion

### 4. Etude hépato-histologique :

Les résultats de l'étude histologique du foie des différents groupes sont présentés dans les figures suivantes:

#### 4.1. Coupes histologiques du groupe témoin



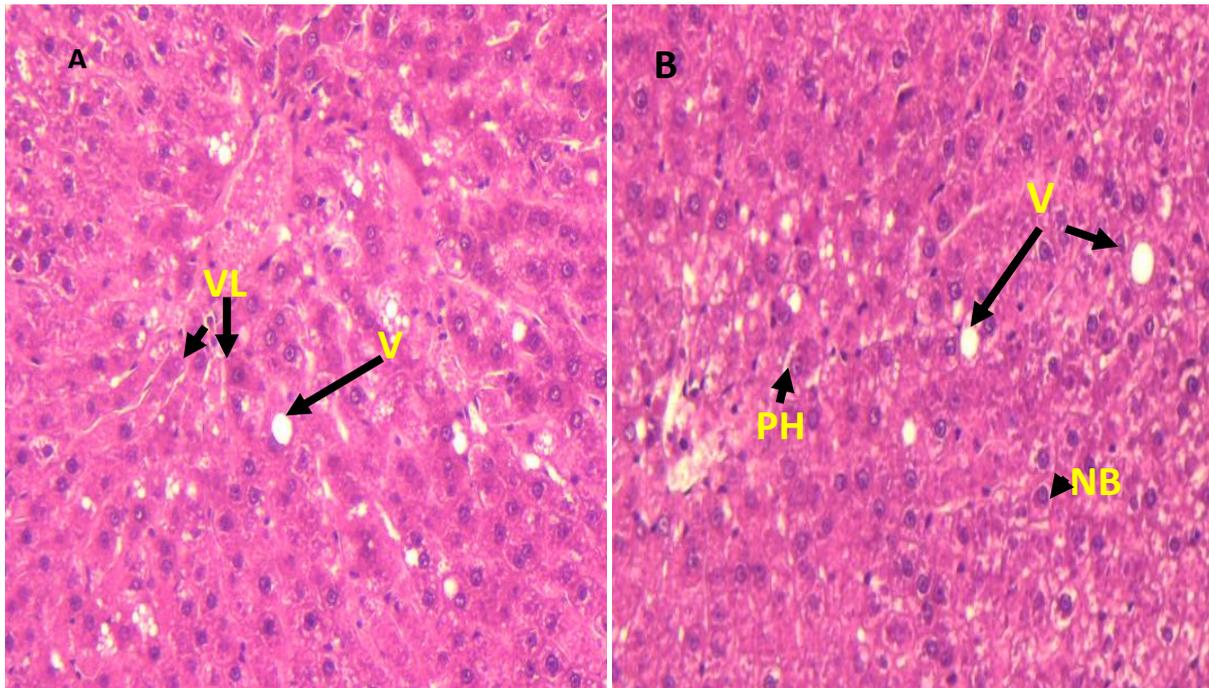
**Figure 21** : Coupes histologiques du tissu hépatique du groupe témoin. Coloration avec hématoxyline éosine A ( $G \times 10$ ) et B ( $G \times 20$ ) H : les hépatocytes apparaissent roses avec un ou 2 noyaux centraux ; VC : veine centro-lobulaire, S: sinusoides ; N : Noyau.

Les deux photographies montrent un parenchyme hépatique sain, organisé en lobules sans séparation visible, schématiquement hexagonaux, avec un espace porte à chaque sommet. Ces lobules sont centrés par une veine centro-lobulaire. Entre les espaces portes et la veine centro-lobulaire, les travées d'hépatocytes sont séparées par des sinusoides. En effet, les hépatocytes sont des cellules polygonales de grande taille organisées en travées de 1 à 2 cellules d'épaisseur. Ce sont des cellules polarisées (pôle basal du côté sinusoidal, pôle apical du côté canaliculaire).

On observe également, un canalicule biliaire, qui est un petit espace intercellulaire, situé entre le pôle canaliculaire de deux ou trois hépatocytes. Nous avons examiné les tissus par microscope optique. Nous avons observé que le foie présentait également une organisation lobulaire centrée sur une veine, des lobules hépatiques sont composés de travées d'hépatocytes (travées de Remak) irriguées par un réseau de capillaires sinusoides qui confluent dans la veine centro-lobulaire (Boukeng et Cannet, 2018).

## Résultats et discussion

### 4.2. Coupes histologiques du groupe malade :



**Figure 21** : Coupes histologiques du tissu hépatique du groupe malade. Coloration à l'hématoxyline éosine A (G×10) et B (G × 20) H H: hépatocyte. NB : noyaux binucléés. PH : parenchyme hépatique. VL: veine centro-lobulaire ; V : vacuoles lipidique ronde.

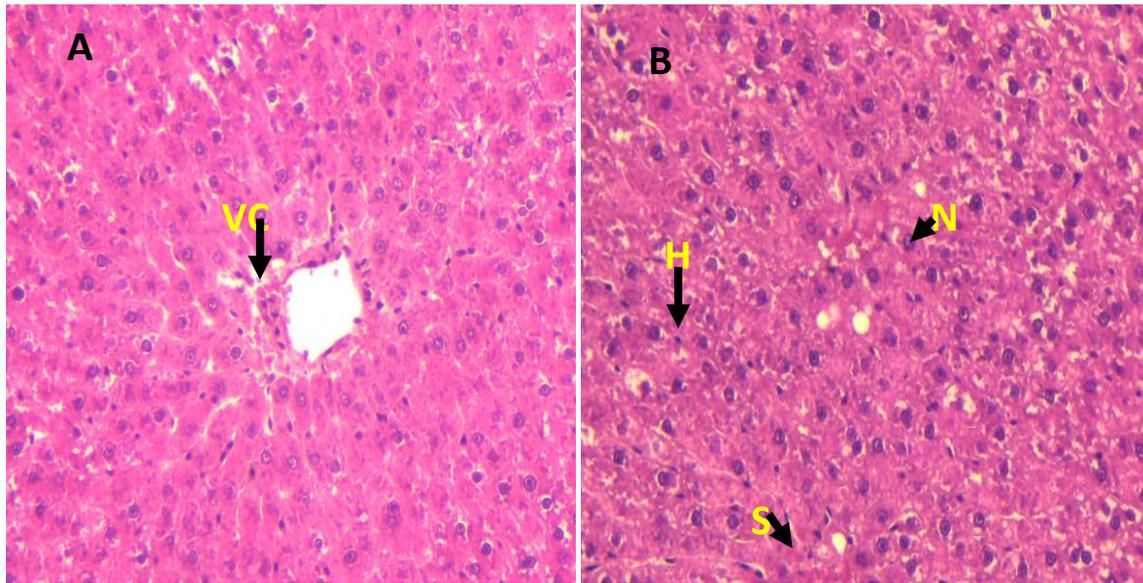
Les rats de ce lot ont été nourrit avec le régime riche en gras et en sucre et ils n'ont reçu aucun traitement après induction de la maladie et ils n'ont pas été remis sous le régime normal.

L'étude histologique montre que le régime riche en gras et sucre sans traitement révèle augmentation de taux de gras dans le foie (NALFD) représenté par u L'apparition de vacuoles rondes riche en gras. Un signe de l'installation de la NALFD au niveau du foie du groupe malade. Ce qui confirme le protocole choisi pour l'induction de la NALFD a bien fonctionné.

On observe au niveau des tissus des foies du groupe malade un aspect d'une architecture dégénérative. Les travées de Remak ne sont plus distinguables, les veines centro-lobulaires apparaissent dilatées, les sinusoides ne sont pas visibles et l'apparition d'une nécrose hépatique à la suite d'un gonflement des hépatocytes. Ce type de manifestations, a également des effets néfastes sur le tissu hépatique en induisant une hépto-toxicité (Ahmed et al., 2013). En comparaison aux témoins, la majorité des hépatocytes de ce groupe augmentent de taille. Cette augmentation est hautement significative et constitue un indice d'augmentation d'activité des hépatocytes, ces processus provoque la destruction des tissus de foie (Mohamed et al., 2016).

## Résultats et discussion

### 4.3. Coupes histologiques du groupe nourriture :



**Figure 21** : la coupe histologie de tissu hépatique du groupe nourriture. Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G × 20) H : les hépatocytes apparaissent roses avec un ou 2 noyaux centraux ; VC : veine centro-lobulaire, S: sinusoides ; N : Noyau.

Les rats de ce lot ont été nourris avec le régime riche en gras et en sucres rapides, après induction de la maladie, ils ont été remis sous un régime normal mais n'ont reçu aucun traitement.

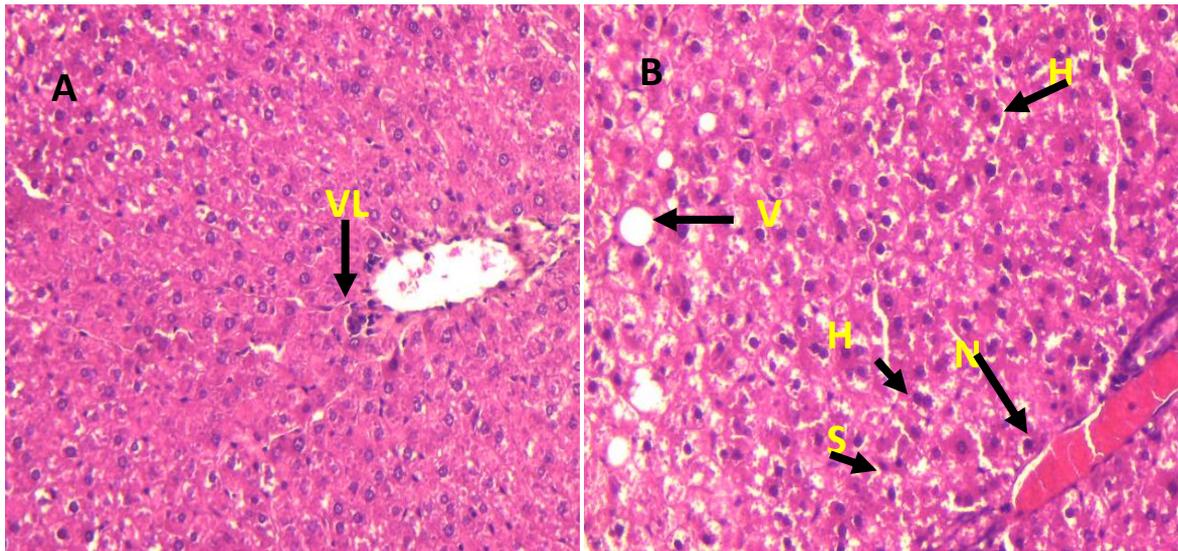
Dans l'étude réalisée par **Sellmann et al, (2015)** a révélé une augmentation intense du poids corporel des rongeurs, constatée durant les quatorze premières semaines accompagnée d'une augmentation de l'inflammation hépatique à seize semaines mais n'induisant pas d'importante augmentation des transaminases circulantes.

En l'occurrence, l'accumulation des acides gras dans le foie par la suite induit l'apparition d'un stress oxydatif et des dommages subséquents aux cellules hépatiques (**Abenavoli et al, 2021**) ainsi que le développement de tout le spectre de la NAFLD avec le développement d'une obésité accompagné des complications métaboliques notoires (**Ikawa-Yoshida et al., 2017**).

On observe que un retour vers un régime normal non riche en gras et sucre et sans suivit d'un traitement est accompagné d'une diminution du poids et d'une augmentation de l'activité de la catalase.

## Résultats et discussion

### 4.4. Coupes histologiques du groupe EEJR (traité par *Juglans regia* L.) :



**Figure 21** : la coupe histologie de tissu hépatique du groupe JRREE. Coloration hématoxyline éosine A (G×10) et B (G × 20) H H: hépatocyte. NB : noyaux binuclées. PH : parenchyme hépatique. VL: veine centrolobulaire ; V : vacuoles lipidiques.

Nos résultats révèlent que l'extrait de poudre de *Juglans regia* L. a la capacité de réduire le gras chez les rats du lot EEJR, nos résultats sont en accord avec les résultats de **Liang et al, (2017)**, lequel, a rapporté que l'extrait de feuilles de *Juglans regia* L. avait un effet actif sur le métabolisme des lipides et sur l'inflammation au niveau du foie. Ces résultats suggèrent que l'extrait de *Juglans regia* L. possède des propriétés protectrices contre les lésions hépatiques induites par le régime riche en gras via la présence des polyphénols.

La présente étude a démontré que l'extrait brut de *Juglans regia* L. avait la capacité de débiter à traiter la NAFLD induites par un régime riche en gras et en sucre chez des rats wistar. La capacité antioxydants a été mise en évidence *in vitro*, grâce à l'effet anti-DPPH et *in vivo* via l'évaluation de l'activité catalasique au niveau du foie. L'abaissement des taux de lipides est nettement observé au niveau des coupes histologiques. Une diminution des volumes des vacuoles lipidiques a été remarquable. En effet, Le noyer est connu pour être une immense ressource de polyphénols spécifiquement, des ellagitanins ayant une propriété antioxydants très élevée (**Shimoda et al., 2009**).

# **Conclusion et perspectives**

## CONCLUSION

Le présent travail avait pour principal objectif, l'évaluation de l'effet médicamenteux de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Juglans regia* L. sur la NAFLD chez le rat, en s'appuyant sur l'activité de la catalase dans le foie des différents groupes étudiés. A côté de ce travail principal, une évaluation de la teneur en polyphénols totaux et l'étude de l'activité antioxydants via le radical DPPH a été entreprise.

L'ensemble de nos travaux a permis de souligner les effets bénéfiques de l'administration de l'extrait de *Juglans regia* L. de la plante choisie dans l'amélioration du statut antioxydants de la catalase et du profil lipidique au niveau des coupes histologiques. Nous pouvons ainsi déduire que l'extrait récolté constitue une bonne source d'antioxydants. Cela est observé lors des résultats obtenus de quantification du taux de polyphénols, considérés comme une source sûre d'antioxydants exogènes. Notamment, au niveau de la capacité de piégeage du radical DPPH. Les résultats confirment la présence importante des métabolites secondaires ayant une activité antioxydants dans l'extrait de plante.

L'an passé, le travail évalué sur de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Juglans regia* L. a donné un effet bénéfique lors du dosage des différents paramètres biochimique bien que une réduction du taux de la glycémie chez les rats n'a pas été observée.

Sur le plan histologique, après observation microscopique des ultra-structures des tissus et des cellules hépatiques des différents groupes, nous avons observé une diminution des volumes des vacuoles de gras dans les tissus traitées par l'EEJR ainsi qu'une diminution des lésions tissulaires au niveau de foie.

Toute fois, nous pouvons conclure que *Juglans regia* L. est riche en substances biologiques actives, lui conférant un grand intérêt pharmacologique notamment dans le traitement de la NAFLD.

Cette étude nous ouvre de nouvelles perspectives afin de connaître le mécanisme exact d'action de *Juglans regia* L. dans la prévention de la stéatose hépatique non alcoolique. Parmi ces perspectives nous proposons :

- La réalisation d'une étude plus profonde sur les caractéristiques biologiques et phytochimiques de *Juglans regia* L. pour découvrir, d'isoler et d'identifier les principes actifs responsables de cette activité observée en utilisant des nouvelles méthodes plus précises telles que la HPLC préparative.
- Approfondir des études sur la toxicologie de *Juglans regia* L. pour connaître son efficacité thérapeutique.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Brunt EM. Tiniakos DG. (2005). Pathological features of NASH. *Front Biosci* : 1475- 1484.
- Dadoune JP. Hadjiisky P. Siffroi JP. Vendrely E. (1990). *Histologie*. Flammarion : 282-287.
- Fabbrini E. Sullivan S. Klein S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease : biochemical,metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 51:679-689
- Goth I. Nacky T. (2013). Inherited catalase deficiency: is it bening or a factor in various age related disorder? *Mutation Research*. 753:147-154.
- Goth I. Lenkey A. Bigler W. (2001). Blood catalase Deficiency and diabetes in Hungary, *Diabet care*. 24 (10), 1938-1840.
- Goudbal J. Favier A. (1997). Radicaux libre oxygens et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*. 11:115-120.
- Ichai C. Quintard H. et Orban JC. (2011) Désordres métabolique et réanimation : du la phylosophie au traitement. *Springer science et business media*. 520-523.
- Jacotot B. (1997).Vitamine E et athérosclérose. *Revue Médecine Interne*. Vol. 15: 627-629.
- Lacombe M. (2005). Le système digestif. *Précis d'anatomie et de physiologies humaines*. Ed Lamarre. 11 : 102-110.
- Lahmek P. Nahon S. (2005). Stéatopathies hépatiques non alcooliques. *Hépatologie*. 1-11.
- Lee WM. (2003). Acute liver failure in the United States. *Seminars in Liver Disease*. 23:217-26.
- Lefkowitz JH. (2005). Morphology of alcoholic liver disease. *Seminars in Liver Disease*. 9:37-53.
- Ludwig L. Coll S. (1980). Non-alcoholic stéato-hepatitis. *Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*.*Mayo Clinic Proceeding*. 55 : 438-434.
- Marc, D. (2012). Evaluation rétrospective d'un critère prédictif de mortalité après hépatectomie majeure en réanimation. Thèse de Doctorat en médecine. Université de Lorraine

Matteoni CA. Younossi ZM. Gramlich T. Boparai N. Liu YC. Ami MC. Cullough AJ. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease : a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 116: 1413-1419.

Meeks RG. Harrison SD. Bull RJ. (1991). *Hepatotoxicology*. Boca Raton (Florida): CRC Press, 700-701.

Mellal A. (2010). *Application pratique de l'anatomie humaine*. Publibook. 174-181.

Oriana C. Denis C. (2015). *Le Foie et les Voies Biliaires: Anatomie*. Centre Hépato-Biliaire Paul Brousse. 322-324

Patrick CH. (1952). *Alcohol, Culture, and Society*. Durham, NC: Duke University Press. Pattingre S. Bauvy C. Carpentier S. Levade T. Levine B. Codogno. 19-23.

Putman CD. Arvai AS. Bourne Y. Tainer JA. (2000). Active and inhibited Human catalase structure ; Lingand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of molecular biology*. 296 : 295-309.

Ratziu V. Poynard T. (2009). Stéatohépatite métabolique : 30 ans de recherches qui ont changé la NASH, *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 33 : 850-858.

Ruhl C E. Everhart JE. (2004). Epidemiology of nonalcoholic fatty liver. *Clinics in Liver Disease*. 8 : 501- 519.

Santosa A. Barrosa L. Calhelhaa RC. Dueñasb M. Carvalhoa AM. Santos-Buelgab C. Ferreira I. (1978). Leaves and decoction of *Juglans regia* L.: different performances regarding bioactive compounds and in vitro antioxidant and antitumor effects. *Industrial Crops and Products*. 51 : 430-436.

Sato K. Ito K. Kohara H. Yamaguichi Y. (1992). Negative Regulation of catalase gene expression in Hepatoma cells. *Molecular and cellular biology*. 6: 2525-2533.

Tajamul IS. Shah TI. Sharma E. Ahmad G. (2014). *juglans regia* Linn: A phytopharmacological review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2 : 364-372.

Thomson ABR. Shaffer E. (2000). First principles of gastroenterology : the basis of disease and an approach to management, 3e éd. Canadian Association of Gastroenterology, Astra Zeneca Canada Inc., 662-663.

## RÉSUMÉ

### Résumé :

Le présent travail a eu pour but l'évaluation de l'activité de catalase et des coupes histologiques obtenues au niveau du foie chez les rats ayant subi la stéatose hépatique non alcoolique (NALFD) et ayant été traités par l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. (EEJR). La plante d'intérêt est souvent utilisée en phytothérapie traditionnelle. En l'occurrence, notre étude c'était portée sur l'évaluation de l'effet traitant de son extrait sur la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Sachant que cette pathologie a été provoquée par un régime riche en gras et en sucre.

Dans cette perspective, l'analyse quantitative a exhibé une quantité égale à  $510 \pm 30$  mg d'acide gallique équivalent de composés phénoliques avec un IC50 de pouvoir d'inhibition du DPPH égale à  $0,52 \pm 0,1$  mg/ml. En ce qui concerne l'activité de la catalase, une différence significative a été retenue sur le groupe traité par l'EEJR, égale à  $0,36 \pm 0,1$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot}/\text{min}$ . L'étude histologique a mis en évidence une visible diminution des volumes des vacuoles lipidiques chez le groupe traité par l'EEJR.

En conclusion, l'EEJR semble avoir un effet bénéfique sur le traitement de la NAFLD, en l'occurrence, liés à ses propriétés antioxydants et à son action sur les paramètres antioxydants de la pathologie. Elles peuvent inhiber l'accumulation de lipides hépatiques, l'inflammation et le dommage tissulaire hépatique.

**Mots clés :** NAFLD, *Juglans regia* L., Catalase, polyphénols, DPPH.

### Abstract :

The purpose of this work was to evaluate catalase activity and histological sections obtained in the liver in rats that have undergone non-alcoholic fatty liver disease (NALFD) and have been treated with the ethanolic extract of *Juglans regia* L. (EEJR). The plant of interest is often used in traditional herbal medicine. In this case, our study focused on the evaluation of the effect of its extract on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Knowing that this pathology was caused by a diet high in fat and sugar.

In this perspective, the quantitative analysis exhibited an amount equal to  $510 \pm 30$  mg of gallic acid equivalent of phenolic compounds with an IC50 of DPPH inhibition power equal to  $0.52 \pm 0.1$  mg / ml. With regard to catalase activity, a significant difference was retained in the group treated with the JREL, equal to  $0.36 \pm 0.1$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot}/\text{min}$ . The histological study showed a visible decrease in lipid vacuole volumes in the JREA treatment group.

In conclusion, JREA seems to have a beneficial effect on the treatment of NAFLD, in this case, related to its antioxidant properties and its action on the antioxidant parameters of the pathology. They can inhibit liver lipid buildup, inflammation and liver tissue damage.

**Keywords:** NAFLD, *Juglans regia* L., Catalase, polyphenols, DPPH.