

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

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Option Génétique Appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante d'un extrait
d'une plante médicinale locale, *Clematis flammula*
sur un modèle animal**

Présenté par :

M^r MAOUCHE Ahmed
M^{lle} BENNAI Baya

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} Debbache N.	(M.A.A. Université de Bejaia)
Examinatrice : M^{lle} Cheraft N.	(M.A.B. Université de Bejaia)
Examinatrice : M^{lle} Sebaihi S.	(M.A.B. Université de Bejaia)
Promotrice : M^{me} Atmani D.	(M.C.B. Université de Bejaia)
Co-Promotrice : M^{lle} Tahiri O.	(M.A.B. Université de Bejaia)

2011-2012

Remerciements

Nous tenons à remercier notre promotrice M^{me} Atmani. D de nous avoir ouvert la porte de son laboratoire et d'avoir accepté de nous encadrer tout au long de ce travail malgré ses nombreuses charges.

Nous tenons à remercier notre Co-promotrice M^{lle} Tahiri. O pour ces orientation et pour le temps qu'elle nous a consacré tout au long de ce travail

Toutes nos expressions de respect à M^{me} Debbache. N qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de président de jury.

Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés à M^{lle} Cheraft. N et Sebaïhi. S, qui ont accepté d'examiner ce travail et consacré de leur temps pour son évaluation.

Nos remerciements sont également exprimés à tous le personnel du laboratoire de Biochimie appliquée, commençant par M^r Atmani D, M^{me} Rahmani M, M^{lle} Chaïer. N et M^{lle} ayaouni. K.

Nous tenons également à remercier M^{elle} Saïdene Naïma pour sa disponibilité au quotidien, ses laborieux conseils et tous ces encouragements, qui nous ont permis de continuer, ainsi qu'à Nawel et aux étudiants de master II.

Enfin, nos remerciements s'adressent à tous les enseignants et à toute personne qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je tiens vivement, à dédier ce travail en signe de respect et de reconnaissance :

Aux deux personnes très chères qui ont partagé mes joies et mes peines, qui ont été toujours à mes côtés, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui : ma mère et mon père

A ma sœur Lydia

Et à tous mes proches sans exception, et sur tous mes oncles et ma tante

A mon binôme Baya

Et à tous mes amis en particulier :

Nassim , Farid , Yanis , , Mokrane , Houcine

Elyas,, Hamid , Mennad , et Mahdi ,

A toute la promotion Génétique Appliquée

2011/2012

A Tous ceux qui ont contribué à m'aider à la réalisation de ce mémoire.

Ahmed

Dédicaces

A mes chers parents, les étoiles qui guident mon chemin.

A mes sœurs, Dihia, Kenga, Sissi.

A mes deux cousines Yasmína et Meriem.

A mon binôme Ahmed.

*A tous mes amis que j'adore, ainsi que toute la promotion
Génétique.*

*A la mémoire de mon grand-père Da Moussa
Bennai.*

A la mémoire de Mr Bakli Mohamed.

Baya

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Partie théorique

Chapitre I : Les radicaux libres et stress oxydant

I. 1. Les Radicaux libres	02
I.1.1. Définition	02
I.1.2. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène	02
I.1.3. Les principales sources des ERO	03
I.2. Le stress oxydant	05
1.2.1. Les cibles du stress oxydant	05

Chapitre II : Peroxydation lipidique

II. Peroxydation lipidique	07
II.1 Mécanisme de la peroxydation lipidique	07
II.2 Etude in vivo de la peroxydation lipidique	09

Chapitre III : Système antioxydants

III. Systèmes antioxydants	11
III.1. Les antioxydants enzymatiques	11
III.2. Les antioxydants non enzymatiques	12
III.2.1. Les inhibiteurs de la peroxydation lipidique.....	13

Partie pratique

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1. Matériel végétale.....	18
IV.1.1. Description botanique de la plante.....	18
IV.1.2. Usage et effet thérapeutique	18
IV.1.3. Récolte et identification.....	19
IV.1.4. Broyage et tamisage.....	19
IV.1.5. Extraction	20

Sommaire

IV.1.6. Préparation de l'extrait.....	20
IV.2.Evaluation de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Clematis flammula</i>	20
IV.2.1. Les animaux	20
IV.2.2. Test de cytotoxicité	20
IV.2.3. Plan expérimental.....	21
IV.2.4. Test de TBA.....	22
IV.2.5 Estimation de la bilirubine totale	22
IV.2.6. Corrélation des poids	23
IV.2.7. poids relatif des foies	23
IV.2.8.Analyse statistique.....	23
 V: Résultats et discussions	
V.1.Taux d'extraction	24
V.2. Test toxicité	24
V.3. Test de TBA	25
V.4. Mesure de la bilirubine totale	29
V.5. Corrélation entre la lipoperoxydation et le poids corporel.....	31
V.6. Poids relatifs du foi.....	31
 Conclusion et perspectives	 33
 Références bibliographiques	 34

Liste des abréviations

- **ADN** : Adénosine Désoxyribonucléique.
- **AGPI** : Les acides gras polyinsaturés.
- **ARN** : Adénosine Ribonucléotidique.
- **BSA** : Bovine Sérum Albumine.
- **CAT** : Catalase.
- **CCl₄** : Tétrachlorure de carbone.
- **CCl₃[°]** : Radical trichlorométhyle.
- **CH₂** : Groupement méthylène.
- **ClO⁻** : Hypochlorite.
- **DPPH** : 2,2-diphényl -1-picryl-hydrazyl.
- **ERO** : Espèces réactives de l'oxygène.
- **Fe²⁺** : Ion ferrique.
- **Fe³⁺** : Ion ferreux.
- **GC/MS** : Gaze chromatographie, Masse spectrophotométrie.
- **GR** : Glutathion réductase.
- **GSH** : Glutathion réduit.
- **GSSG** : Glutathion oxydé.
- **GPx** : Glutathion peroxydase.
- **H⁺** : Proton d'hydrogène.
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène.
- **HO-1** : hème oxygénase.
- **HOCl** : Acide hypochloreux.
- **4-HNE** : 4-hydroxy-2-nonenal
- **L[°]** : Radical alkyl.
- **LC-MS** : Liquide chromatographie, mass spectrophotométrie.
- **LOOH** : Hydroperoxyde.
- **LPO** : Peroxydation lipidique.
- **MDA** : Malondialdehyde.
- **NADP oxydase** : Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate oxydase
- **NO[°]** : Radical nitrique.

- $^{\circ}\text{OH}$: Radical hydroxyle.
- $^{\circ}\text{OOC}\text{Cl}_3$: Radical proxytrichloromethyl.
- $^1\text{O}_2$: Oxygène singulet.
- O_2 : Oxygène.
- O_2° : Anion superoxyde.
- O_3 : Ozone.
- OH^- : Anion hydroxyle.
- **Se** : Seleno-enzymes.
- **SOD** : Superoxyde dismutase.
- **TBA** : Acide Thiobarbiturique.
- **TBARS** : Espèces réactives à Acide Thiobarbiturique
- **TCA** : Acide trichoroacétique.
- **α -Toc** : Alpha tocophérol.

Liste des figures

Figure 01: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène.....	2
Figure 02 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire.....	6
Figure 03: Les étapes de la peroxydation lipidique.....	8
Figure 04 : La production des isoprostanes	9
Figure 05 : Structure du 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)	10
Figure 06 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants	11
Figure07 : Cycle catalytique proposé pour les GPx dépendante du sélénium	12
Figure 08 : Structure du tannin hydrolysable	15
Figure 09 : Structure du tannin condensé	16
Figure 10 : Structure du stilbene (Resveratrol)	16
Figure 11 : Structure de la lignine	17
Figure 12 : Structure d'un saponine de type terpénoïde.....	17
Figure 13: Photographie des feuilles de <i>Clematis flammula</i>	18
Figure 14: Administration intragastrique intragastrique	21
Figure15: Protocole d'estimation de la peroxydation lipidique.....	22
Figure 16: Mesures de la peroxydation lipidique induit par le CCl ₄	27

Liste des tableaux

Tableau I : La classification de <i>Clematis flammula</i>	18
Tableau II : Mesure du poids corporel	25
Tableau III : Dosage de la bilirubine totale.....	29
Tableau IV : Poids relatifs des foies.....	32

Introduction

Introduction

Le stress oxydant est produit suite à un déséquilibre entre les espèces oxydantes et le système de défense antioxydant de l'organisme. Les acteurs du stress oxydant peuvent avoir des effets délétères sur de nombreux constituants cellulaires comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Joshi et *al.*, 1995).

Au niveau des lipides, le processus d'oxydation met en jeu une réaction en chaîne radicalaire qui entraîne l'oxydation des acides gras insaturés. Cette oxydation génère des produits de dégradation secondaires des lipides comme les malondialdéhydes (MDA) ou les 4-hydroxy-2-nonenals (HNE) qui exercent des effets inhibiteurs sur les systèmes enzymatiques membranaires (chaîne respiratoire) et sur la synthèse protéique (Long et *al.*, 2010). Ces effets délétères contribuent énormément à la genèse de maladies qui sont les plus fatales de notre époque notamment le cancer, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer et les maladies hépatiques (Sarmishtha et *al.*, 2000). Il est donc crucial de prévenir la lipopéoxydation pour combattre ces maladies.

Il a été démontré qu'une consommation de fruits et légumes est associée à un faible risque pour ces maladies, attribué aux substances antioxydantes et d'autres composés phyto-chimiques qui les composent (Dugas et *al.*, 2000). Récemment, l'intérêt de la recherche scientifique s'est dirigé vers l'étude des plantes médicinales et leurs composés phytochimiques antioxydants, les polyphénols (Harish & Shivanandappa, 2006). Ces derniers sont destinés à remplacer les antioxydants synthétiques qui se sont avérés toxiques (Shahwa, 2012).

Le but de ce présent travail est d'évaluer le potentiel hépato-protecteur de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula* sur des souris albinos.

Partie théorique

Chapitre 1
Radicaux libres et
stress oxydant

I.1. Radicaux libres

I.1.1. Définition

Un radical libre peut être défini comme toute espèce, atome ou molécule, caractérisé par la présence d'au moins un électron unique en son orbite externe et une courte durée de vie qui le rend très actif du fait de la tendance de cet électron à se réappairier (Ghisolfi-Marque, 1995).

La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques humains sont les radicaux superoxydes et hydroxyles, mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydant, en particulier le peroxyde d'hydrogène (Goudable & Favier, 1997).

I.1.2. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène

Les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) est un terme collectif qui inclut les radicaux d'oxygène et certains non-radicaux qui sont des agents oxydants et/ou sont facilement convertis en radicaux libres (HOCl , O_3 , $^1\text{O}_2$, et H_2O_2) (figure 1) (Buonocore et al., 2010).

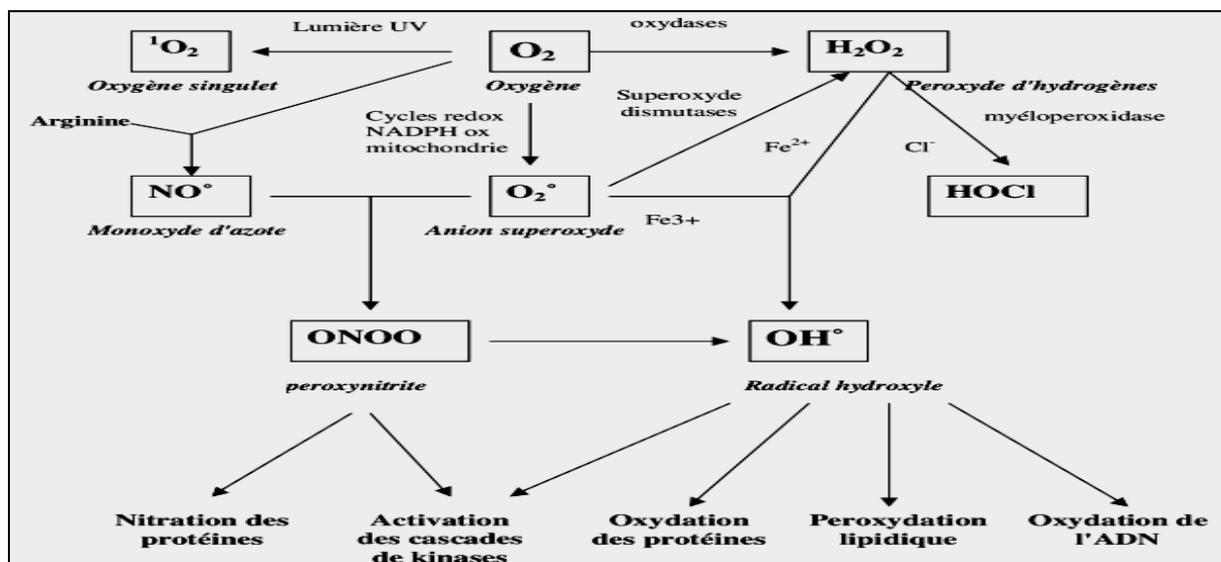


Figure 01 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003)

I.1.2.1. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène ou l'eau oxygénée est une forme active de l'oxygène qui n'est pas très réactive. Il se forme par dismutation de l'anion superoxyde O₂^{•-} sous l'action d'une enzyme : le superoxyde dismutase (SOD) (Réaction 01) (Belkheiri, 2010).

**I.1.2.2. L'oxygène singulet (¹O₂)**

L'oxygène singulet ou ¹O₂ représente le premier état électronique excité d'O₂ qui est formé seulement par activation photochimique de l'oxygène (réaction02) (Belkheiri, 2010).

**I.1.2.3. L'anion superoxyde**

L'anion superoxyde est considéré comme un ERO «primaire». Il peut interagir avec d'autres molécules pour générer des ERO «secondaires» et peut être à la fois un facteur de réduction et d'oxydation (Buonocore et al., 2010). Dans la réaction d'oxydation il forme l'oxygène moléculaire, alors que dans la réaction de réduction il forme le peroxyde d'hydrogène (réactions 3, 4) (Bonfont-Rousselot et al., 2002).

**I.1.2.4. Le radical hydroxyle**

Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des molécules biologiques (Belkheiri, 2010) car il peut initier une peroxydation lipidique en chaîne ce qui le rend très dangereux. Il peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants mais il est surtout formé par la réaction de Fenton à partir du H₂O₂ et en présence d'un métal de transition (réaction 05) (Goudable & Favier, 1997).



I.1.3. Les principales sources des ERO

Les ERO peuvent être produits à partir de deux sources différentes endogènes et exogènes.

I.1.3.1. Sources endogènes

Les sources potentielles endogènes comprennent les mitochondries, le métabolisme du cytochrome P450, les peroxysomes, microsomes, le système monooxygénase, et plusieurs autres enzymes impliquées dans le processus inflammatoire (Buonocore et *al.*, 2010).

I.1.3.1.1. Les mitochondries

Les mitochondries sont considérées comme un site majeur de production des ERO (Gill & Tuteja, 2010). Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la respiration mitochondriale dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, une fuite d'électrons de la chaîne respiratoire contribue à la réduction de 2% de l'oxygène présent dans la mitochondrie produisant ainsi l'anion superoxyde (Favier, 2003).

I.1.3.1.2. La NADPH oxydase

La NADPH oxydase est une source d'anions superoxydes produits directement par les cellules phagocytaires activées au niveau d'une inflammation. (Favier, 2003). Cette production de superoxyde est à l'origine de la production de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou l'hypochlorite (ClO⁻) indispensables à la destruction du matériel phagocyté (Fontaine et *al.*, 2002).

I.1.3.1.3. La xanthine déshydrogénase

L'enzyme xanthine déshydrogénase catalyse l'hydroxylation oxydative des purines (Truglio, 2002) et spécifiquement l'hydroxylation oxydative de la xanthine et de l'hypoxanthine en acide urique (Montalbini, 2000).

Au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion cette enzyme est modifiée en xanthine-oxydase qui génère du superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine. (Fontaine, 2002)

I.1.3.1.4. Les métaux de transition

Les ions métalliques comme le fer et le cuivre sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires *in vitro* : ils transforment le H₂O₂ en radical hydroxyle (°OH) par la réaction de Fenton (réaction 6), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique normale, la concentration libre de fer ou de cuivre est particulièrement basse, ces métaux étant séquestrés par des protéines spécialisées, de sorte que cette réaction n'a pas lieu (Fontaine et *al.*, 2002).



I.1.3.2. Sources exogènes

Les radicaux libres peuvent aussi être produits par une multitude de processus exogènes tels que des agents de l'environnement (fumée de cigarettes) et des xénobiotiques (les radiations, les barbituriques) (Buonocore et *al.*, 2010).

I.2. Stress oxydant

Les cellules produisent continuellement des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le cadre de processus métaboliques. Ces radicaux libres sont neutralisés par un système de défense antioxydant élaboré composé d'enzymes comme la catalase, le superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, et de nombreux antioxydants non-enzymatiques, y compris les vitamines A, E et C, le glutathion, ubiquinone, et les flavonoïdes. (Thirumalai et *al.*, 2011). Un déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (Favier, 2003).). Donc le stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre entre les antioxydants et oxydants.

I.2.1. Cibles du stress oxydant

Les ERO attaquent plusieurs macromolécules biologiques, les plus importantes sont l'ADN, les protéines et les lipides.

I.2.1.1. L'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (Favier, 2003). Les lésions de l'ADN sont générées en continu par de nombreux mécanismes dans les cellules vivantes. Le type de dommages à l'ADN appelé "dommages induits par oxydation" dans les cellules vivantes est causée par les radicaux libres, en particulier par le

radical hydroxyle très réactif ($^{\circ}\text{OH}$) (figure 02). Ce type de dommages à l'ADN semble jouer un rôle important dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Jaruga- Dizdaroglu,2008).

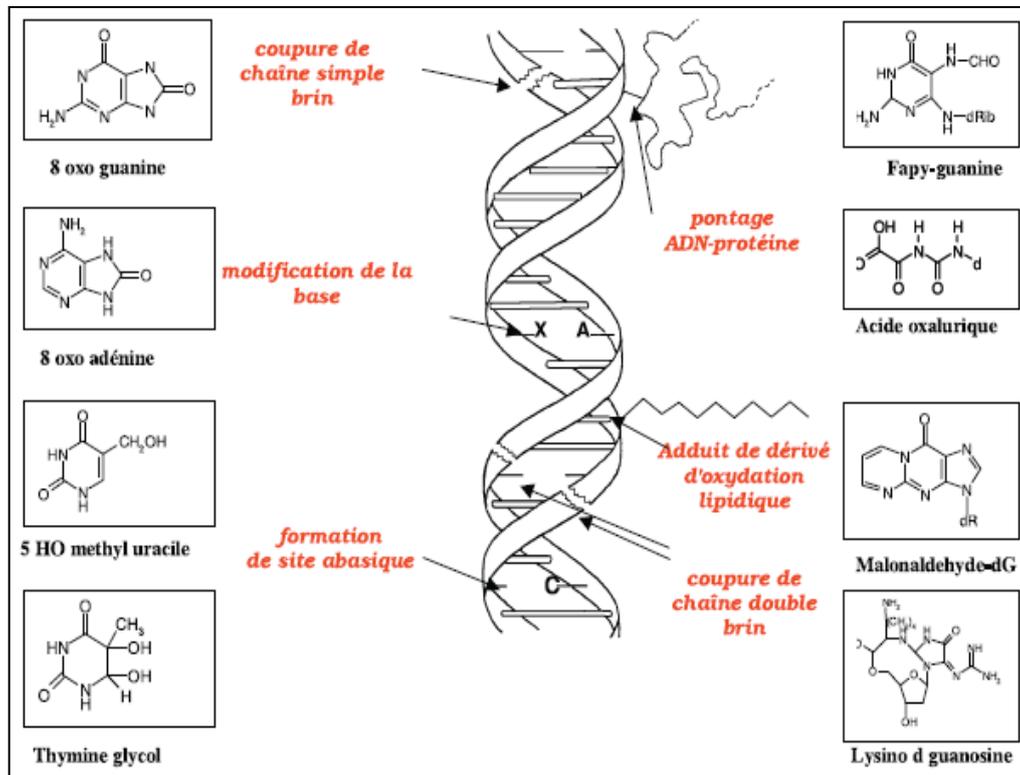


Figure 02 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (Favier, 2003).

I.2.1.2. Les protéines

Différents types de modifications oxydatives des protéines peuvent être induites directement par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou indirectement par des réactions secondaires de sous-produits de stress oxydatif. Les modifications de conformation de protéines peuvent conduire à l'augmentation de l'agrégation, la fragmentation, la distorsion de la structure secondaire et tertiaire, la susceptibilité à la protéolyse, et la diminution de la fonction normale (Çakatay et al., 2005).

I.2.1.3. Les lipides

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent facilement affecter les lipides membranaires provoquant ainsi des dommages en propageant un cycle de réaction (Muthu et al., 2010). Cette réaction appelée peroxydation lipidique fera l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 11

Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique (LPO) a d'abord été étudiée dans le phénomène de la détérioration des aliments dans les années 1930, par la suite elle a reçu une attention renouvelée de points de vue chimique, biochimique et biologique. La peroxydation lipidique (LPO) peut induire une perturbation de l'organisation des membranes cellulaires, réduisant ainsi sa fluidité et amenant à sa dégradation. Aussi, les nombreux produits du métabolisme de la peroxydation comme les hydroperoxydes ou leurs dérivés aldéhydes peuvent inhiber la synthèse protéique et bloquer les actions des macrophages (Christopher *et al.*, 1995). En fait, les MDA constituent l'un des produits les plus abondants de la LPO dans les cellules, et ils peuvent également être produits de façon endogène pendant la biosynthèse des prostaglandines. Ils se sont révélés mutagènes dans les cellules humaines (Feng *et al.*, 2006). Ces dommages fonctionnels sur les protéines et l'ADN l'impliquent dans la pathogenèse de diverses maladies (Niki, 2009) comme des lésions inflammatoires et des dysfonctionnements hépatiques (Leelaprakash *et al.*, 2011), en plus d'un rôle très important dans le développement du cancer humain (Sarmishtha *et al.*, 2000) et des maladies neuro-dégénératives comme le Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Feng *et al.*, 2006)

II.1. Mécanisme de la peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (Favier, 2003). Cette réaction en chaîne se compose de trois étapes principales : l'initiation, la propagation et la terminaison (Min & Ahn, 2005).

II.1.1. Initiation

Les radicaux qui vont initier la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) sont principalement les radicaux hydroxyles ($^{\circ}\text{OH}$) (Cillard & Cillard, 2006).

La phase d'initiation consiste en la soustraction, par un radical libre, d'un atome d'hydrogène (H) à un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) d'une chaîne acylée d'acide gras polyinsaturé (LH). (Christopher *et al.*, 1995). Elle conduit à la formation d'un radical alkyl (L°) se stabilisant par un remaniement électronique et conduisant à la formation de deux diènes conjugués (réaction 7) (Coulon, 2004).



II.1.2. Propagation

Le radical formé dans l'étape d'initiation réagit très rapidement avec l' O_2 pour donner un radical peroxyde (Cillard & Cillard, 2006) qui réagit à son tour avec une autre molécule d'AGPI, formant ainsi un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical d'acide gras qui assure la propagation de la chaîne de peroxydation (réactions 8, 9) (Coulon, 2004).



II.1.3. Terminaison

Cette dernière étape consiste en la formation de composés stables issus de l'association de deux espèces radicalaires. La probabilité de rencontrer des radicaux libres conduisant à leur disparition est beaucoup plus faible que celle avec les acides gras polyinsaturés dont les concentrations sont relativement supérieures. Ainsi, la phase de terminaison ne peut survenir qu'après un certain temps (Coulon, 2004). Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont les malondialdéhydes ou MDA (Figure 03) (Favier, 2003).

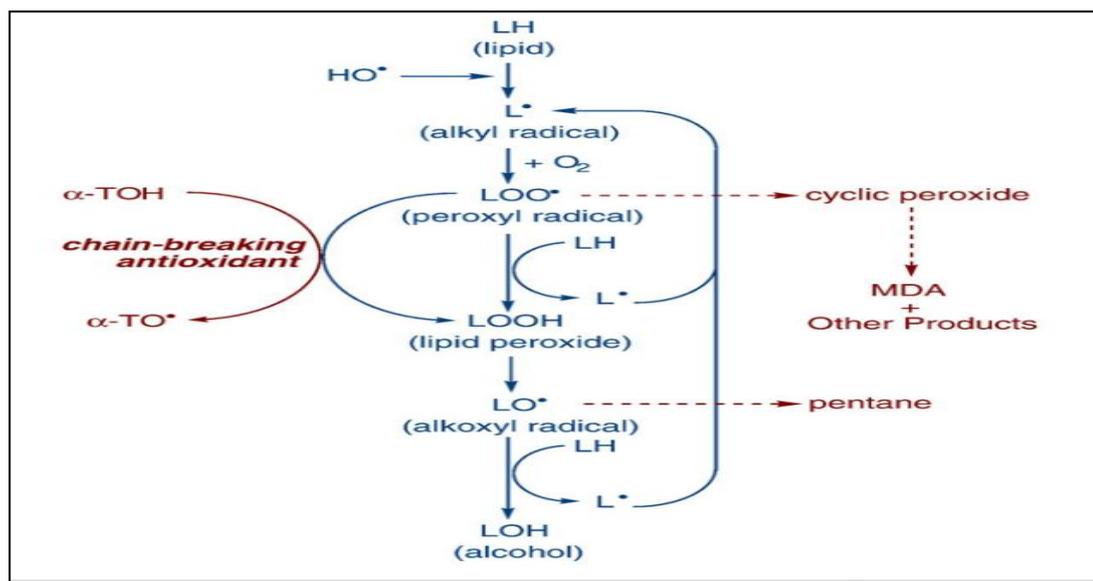


Figure 03: Les étapes de la peroxydation lipidique (Sachdev & Davies, 2008).

II.2. Etude *in vivo* de la peroxydation lipidique

L'induction de la peroxydation lipidique chez des modèles animaux est considérée comme l'élément le plus important pour l'étude de ce phénomène et son inhibition.

Pour cela, divers agents initiateurs peuvent être utilisés, notamment, le fer (Selvam & Kurien, 1987), le plomb (Berrahal, 2007) et l'aluminium (Balaji et al., 2004). Cependant, le CCl_4 est un hépatotoxique classique, largement utilisé chez le modèle animal pour induire des lésions hépatiques. (Khan et al., 2011).

II.2.2. Tests de détection de la peroxydation des lipides

Les produits de la peroxydation lipidique, notamment des phospholipides membranaires, sont actuellement connus (alkanal, 4 hydroxy alka-2- Enal, alka-2, 4 diénals, 4 hydroxy nonéal, malondialdéhyde ou MDA, diènes conjugués, hydroperoxydes et peroxydes). La plus part de ces substances réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) et constituent les substances réactives à l'acide Thiobarbituriques « TBARS », mesurables par spectrophotométrie. (Sess et al., 1998).

Les malondialdéhydes ou MDA peuvent être dosés dans les tissus du foie ou ils sont formés lors d'une hépatotoxicité (Naskar et al., 2010), une molécule d'MDA se lie à deux molécules de TBA pour former un complexe MDA/TBA (Atasayar et al., 2004). Les MDA peuvent être synthétisés par le clivage de l'anneau endoperoxyde ou à partir de prostaglandine comme substrat d'un processus enzymatique (Devasagayam et al., 2003).

Un marqueur récent de la peroxydation des lipides est représenté par les isoprostanes (figure 04), dont la structure est très proche de celle des prostaglandines ; il résulte de l'attaque radicalaire de l'acide arachidonique et constituent des marqueurs terminaux stables de la peroxydation lipidique. Ils se forment au sein des membranes et des lipoprotéines et en sont libérés par une phospholipase, puis sont éliminés dans l'urine où il est donc possible de les doser par une GC/MS (Gaze chromatographie, Masse spectrophotométrie) (Bonnefont-Rousselot, 2007).

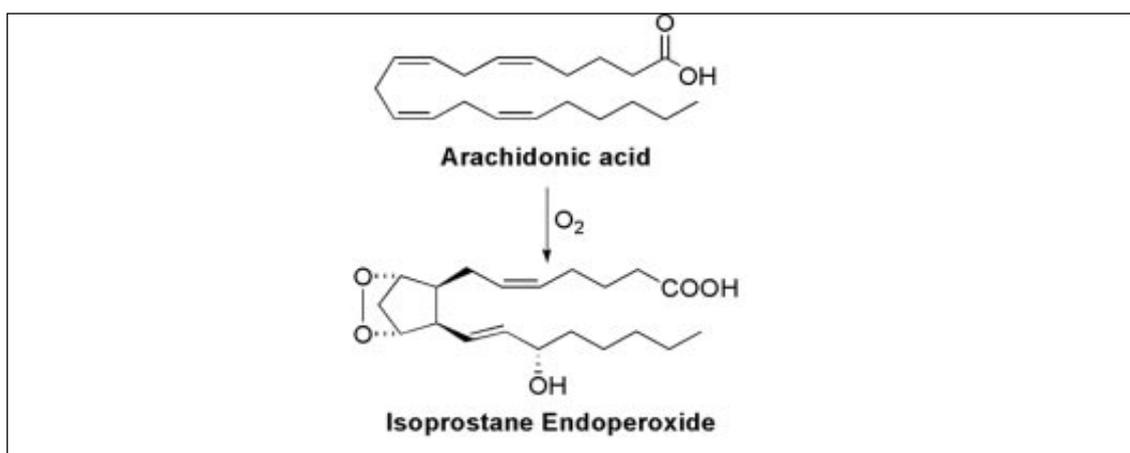


Figure 04 : La production des isoprostanes (Milne et al., 2008).

Le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) est un produit électrophile de la peroxydation lipidique (Selley et *al.*, 1998), il peut être formé par la peroxydation d'un acide gras insaturé tel que l'acide linoléique ou l'acide arachidonique (Hu et *al.*, 2002). Le 4-HNE peut être conjugué au glutathion et sera métabolisé dans le foie et les reins où il y'aura production d'autres métabolites de 4-HNE. Il est possible de doser les 4-HNE dans les urines via le test LC-MS (liquide chromatographie, mass spectrophotométrie) (Kuiper et *al.*, 2008).

Le 4-HNE peut être lié à plusieurs cytopathologies (inhibition enzymatique, de l'ADN, ARN...) (Toyokuni et *al.*, 1994). Ce qui contribue au développement de certaines maladies liées au vieillissement comme l'Alzheimer et l'athérosclérose (Kuiper et *al.*, 2008)

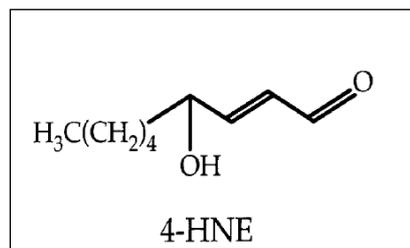


Figure 05 : structure du 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) (W.Hu et *al.*, 2002).

Pour lutter contre la peroxydation lipidique, l'organisme fait appels aux systèmes antioxydants endogènes ou exogènes.

Chapitre III

Système antioxydant

Les cellules et les tissus sont protégés contre les ERO par une matrice de systèmes non enzymatiques comme les antioxydants ou piègeurs de radicaux libres et des systèmes de défense enzymatiques, comme le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Hadjaz et *al.*, 2011).

III.1. Antioxydants enzymatiques

Les trois principaux représentants de la machinerie enzymatique antioxydante sont la catalase, le superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase. Leurs mécanismes d'action sont résumés dans la figure 06 (Tessier & Marconnet, 1995).

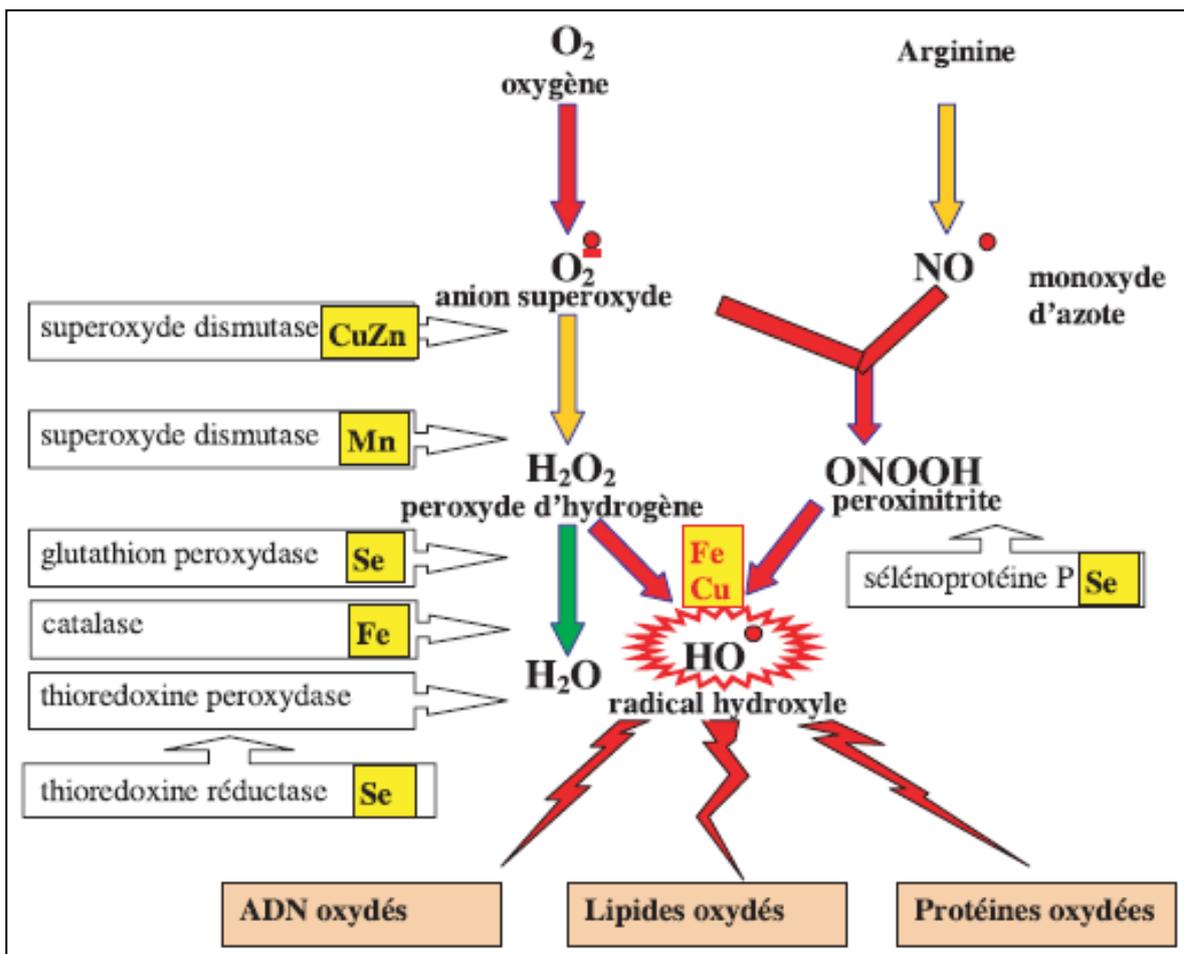


Figure 06 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Favier, 2003).

III.1.1 La catalase

La catalase (CAT) est localisée uniquement dans les peroxysomes. Cette enzyme contenant du fer, est particulièrement concentrée dans le foie et les érythrocytes (Tessier & Marconnet, 1995). Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau (figure 06) (Nicholls, 2012).

III.1.2. Le glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases (GPx) appartiennent à une famille de séléno-enzymes qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (Figure 07) (Rush *et al.*, 2003).

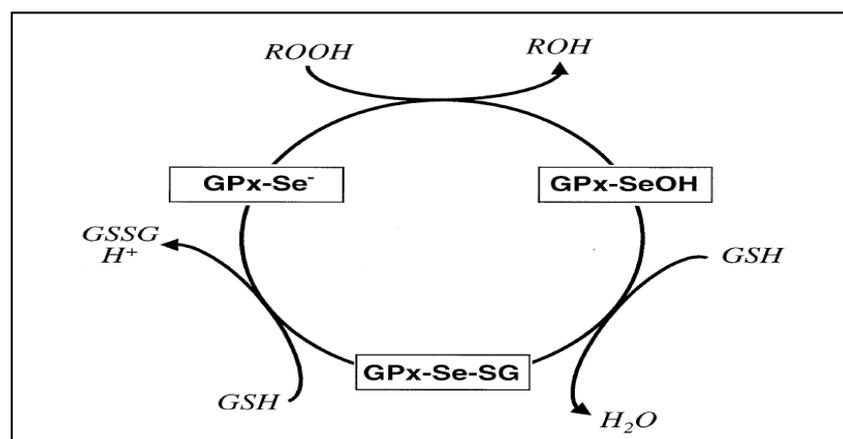


Figure07 : Cycle catalytique proposé pour les GPx dépendante du sélénium (Kühn & Borchert, 2002).

III.1.3. Le superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme constitue la première ligne de défense contre le stress oxydatif, un groupe de métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (figure 06) (Scheilbelt *et al.*, 2007).

III.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydants et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), les caroténoïdes et les polyphénols apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons) (Favier

2003). Notre intérêt se porte sur ceux qui agissent spécifiquement sur la peroxydation lipidique.

III.2.1. Les inhibiteurs de la peroxydation lipidique

Les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être répartis en deux types : les antioxydants préventifs qui empêchent la formation des espèces réactives de l'oxygène ou les antioxydants «chain breaking» qui interceptent les espèces responsables de l'initiation et de la propagation de la lipoperoxydation (Cillard & Cillard, 2006).

III.2.1.1. Les antioxydants chain-breaking

III.2.1.1.1. La vitamine E

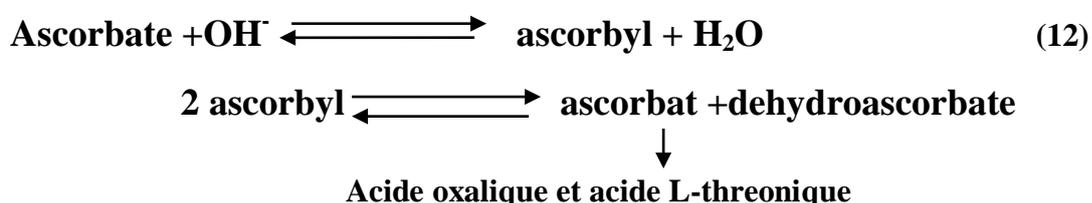
Ce composé fait partie de la famille des tocophérols, des antioxydants liposolubles, qui sont considérés comme des piègeurs potentiels d'ERO et les radicaux lipidiques. Il constitue un antioxydant majeur des biomembranes et dont le rôle principal consiste à maintenir leur protection et leur stabilité en empêchant l'étape de propagation en chaîne dans la peroxydation lipidique qui est en fait un piège efficace pour les radicaux libres (réaction 11) (Gill & Tuteja, 2010).



Le déterminant majeur de la longueur des chaînes radicalaires *in vivo* est la concentration la vitamine E dans la double couche de phospholipides, elle réduit les radicaux peroxydes ralentissant ainsi la vitesse de la peroxydation lipidique.

III.2.1.1.2. La vitamine C

L'acide ascorbique est un puissant antioxydant soluble dans l'eau et capable de prévenir ou minimiser les dommages causés par les ERO dans les plantes en les piégeant en raison de sa capacité à donner des électrons dans un certain nombre de réactions enzymatiques et non enzymatiques (réaction 12).



III.2.1.1.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont impliquées dans le piégeage de deux des espèces réactives de l'oxygène les plus dangereuses, l'oxygène singulet (1O_2), et le radical peroxy. En outre, ils sont d'efficaces désactivateurs de molécules électroniquement excités qui sont impliquées dans la génération d'espèces réactives en particulier l'oxygène singulet (Stahl & Sies, 2005).

III.2.1.1.4. La bilirubine

Elle est également considérée comme un membre de la famille des antioxydants, possédant un potentiel antioxydant puissant contre les radicaux peroxy. Dans des conditions physiologiques, la bilirubine dépasse l' α -tocophérol en tant que protecteur le plus puissant contre la peroxydation lipidique. Dans le plasma, il peut agir en synergie avec la vitamine E pour protéger les membranes lipidiques de la peroxydation initiée dans la phase lipidique (Berrahal *et al.*, 2007).

Il a été proposé que l'induction spécifique de HO-1 (hème oxygénase 1) par diverses formes de stress oxydatif est une partie du mécanisme de défense, afin de diminuer les niveaux de potentiels pro-oxydants et d'augmenter les concentrations de pigments biliaires actifs qui peuvent agir comme des antioxydants. Donc, l'activation de la HO-1 est suivie par l'augmentation de la production la bilirubine, déterminant ainsi une réponse adaptative des cellules au stress oxydatif (Tomaro, 2002).

III.2.1.2. Les antioxydants chélateurs de fer et Chain-breaking

III.2.1.2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont en même temps des chélateurs de métaux et des antioxydants « chain-breaking ».

III.2.1.2.2. Définition

Les composés phénoliques représentent le plus grand groupe de métabolites trouvés dans le règne végétal, où plus de 4000 structures ont été identifiés (Heim *et al.*, 2002).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires aromatiques (Boizot *et al.*, 2006) comportant un noyau benzénique conjugué à un ou plusieurs groupes hydroxyles (Bhattacharya *et al.*, 2010). Cette structure leur permet d'être des donateurs d'hydrogène ainsi ce sont des antioxydants « Chain-breaking » puissants. D'autre part, ce sont des chélateurs de métaux qui empêchent la formation du radical OH par la réaction de Fenton interrompant

ainsi l'initiation de la peroxydation lipidique. Ces composés suscitent beaucoup l'intérêt des chercheurs car étant des antioxydants, ils peuvent protéger les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et, par conséquent, limiter le risque de diverses maladies associées au stress oxydatif (Scalbert *et al.*, 2005).

III.2.1.2.3. Classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont divisés en plusieurs catégories suivant le nombre de cycles benzéniques et ses éléments structuraux (D'Archivio *et al.*, 2007).

III.2.1.2.3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles médicinales (Psotová *et al.*, 2003), on cite : l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide ferulique, l'acide sinapique et l'acide gallique (Shahidi *et al.*, 2005). Ils sont considérés comme des substances phytochimiques avec des effets antioxydants et anti-inflammatoires, ils sont considérés comme non toxiques (Psotová *et al.*, 2003).

III.2.1.2.3.2. Les tannins

Les tannins sont aussi appelés polyphénols des végétaux, les caractéristiques qui distinguent les tannins des autres polyphénols des végétaux sont essentiellement structurales: liaison aux protéines et autres composés de base, pigments et ions métalliques (Takuo & Hideyuki, 2011).

Selon leur structure, les tannins peuvent être divisés en deux classes qui sont les tannins hydrolysables (figure 8) et les tannins condensés (figure9).

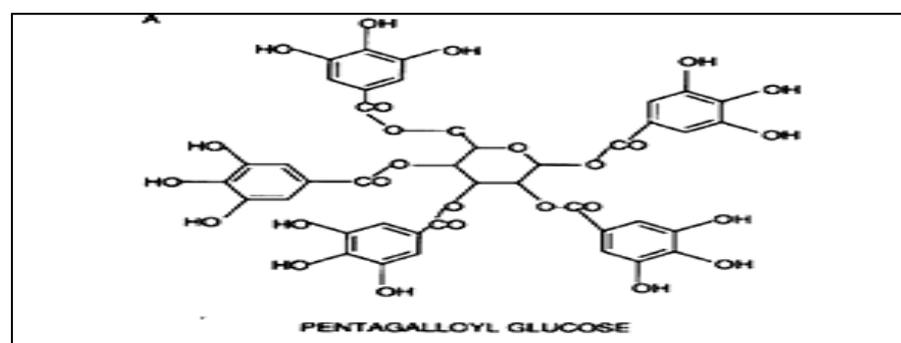


Figure 8 : Structure du tannin hydrolysable (Anders Bennick, 2002)

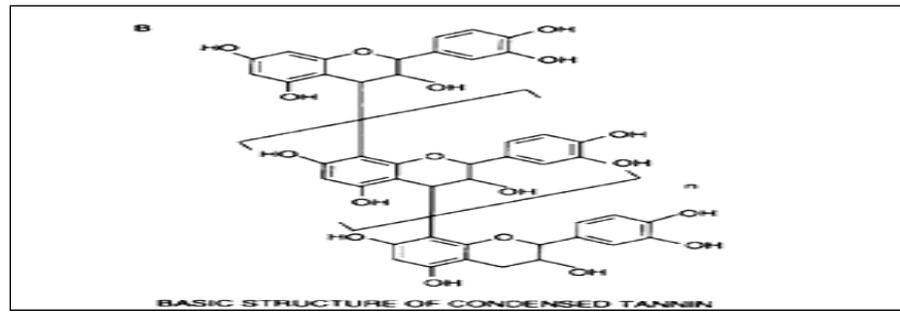


Figure 9: Structure du tannin condensé (Anders Bennick, 2002).

III.2.1.2.3.2.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes sont eux même divisés en sept groupes : flavones, flavanones, flavonols, flavanonols, isoflavones, flavanols (catéchines) et anthocyanidines (Shahidi et *al.*, 2005).

III.2.1.2.3.2.4. Les stilbènes

Ils sont représentés principalement par le Resveratrol, ils sont produits par la plante en réponse à une infection par un pathogène ou stress extérieure (D'Archivio et *al.*, 2007). Ils existent sous forme monomérique ou oligomérique (figure11) (Xiuzhen et *al.*, 2007).

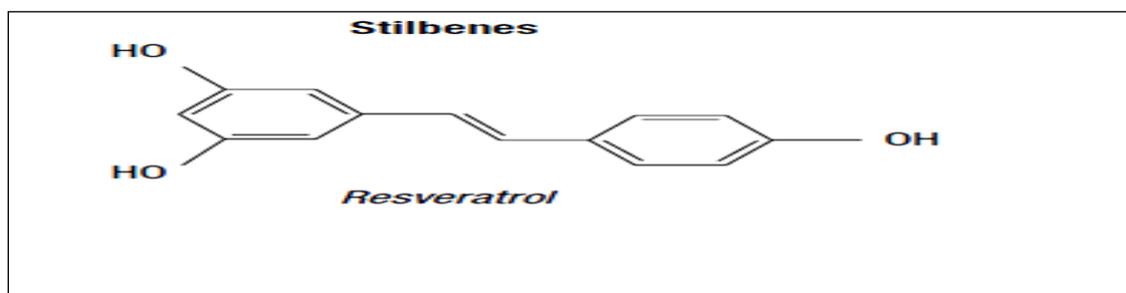


Figure 10: Structure du stilbene (Resveratrol) (D'Archivio et *al.*, 2007)

III.2.1.2.3.2.5. Les lignines

Ils sont produits par la dimérisation oxydative de deux unités phénylpropanes, et sont présents dans la nature sous forme libre, tandis que leur dérivé glycoside ne sont qu'une forme mineure (D'Archivio et al., 2007)

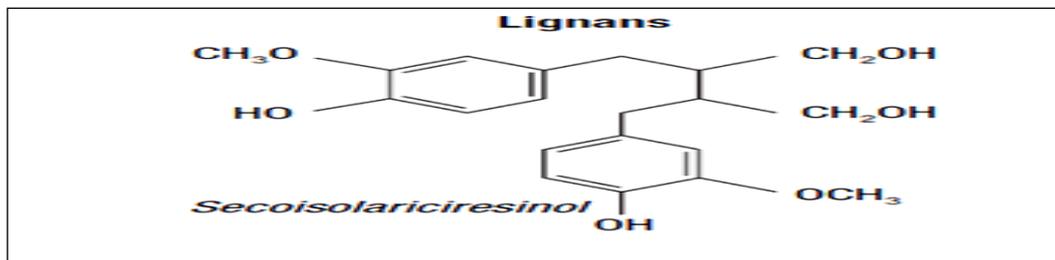


Figure 11: Structure de la lignine (D'Archivio et al., 2007)

III.2.1.2.2. Les saponines

Les saponines représentent un vaste groupe de glycosides, largement distribué dans les plantes supérieures. Leurs propriétés tensio-actives sont ce qui distingue ces composés à partir d'autres glycosides.. (Sparg., et al 2004), Ils ont un large éventail de propriétés, qui comprennent propriétés moussantes et émulsifiantes. Les propriétés pharmacologiques et pharmaceutiques les propriétés hémolytiques, ainsi que des activités antimicrobiennes, insecticides (Baumann et al., 2000). Il sont considérés parmi les ingrédients clés de certaines plantes connues pour leurs forts effets biologiques dans la médecine traditionnelle, telle que la racine de ginseng (*Panax ginseng* CAMEyer, Araliaceae) (Sparg et al., 2004).

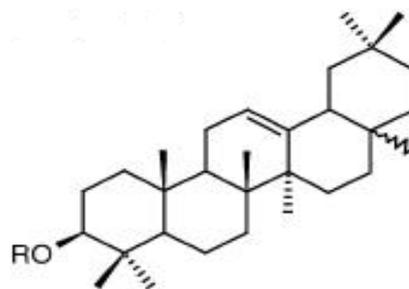


Figure 12 : Structure d'un saponine de type terpénoïde (Sparg et al., 2004).

Partie pratique

Chapitre IV

Matériels et méthodes

IV.1. Matériel végétal

IV.1.1. Description botanique de *Clematis flammula*

La tige de est sarmenteuse, grimpante, les feuilles bipennées, à 3-7 folioles assez petites, ovales ou lancéolées, entières ou rarement trilobées, à saveur brûlante (figure13); les fleurs sont blanches, en panicule lâche.

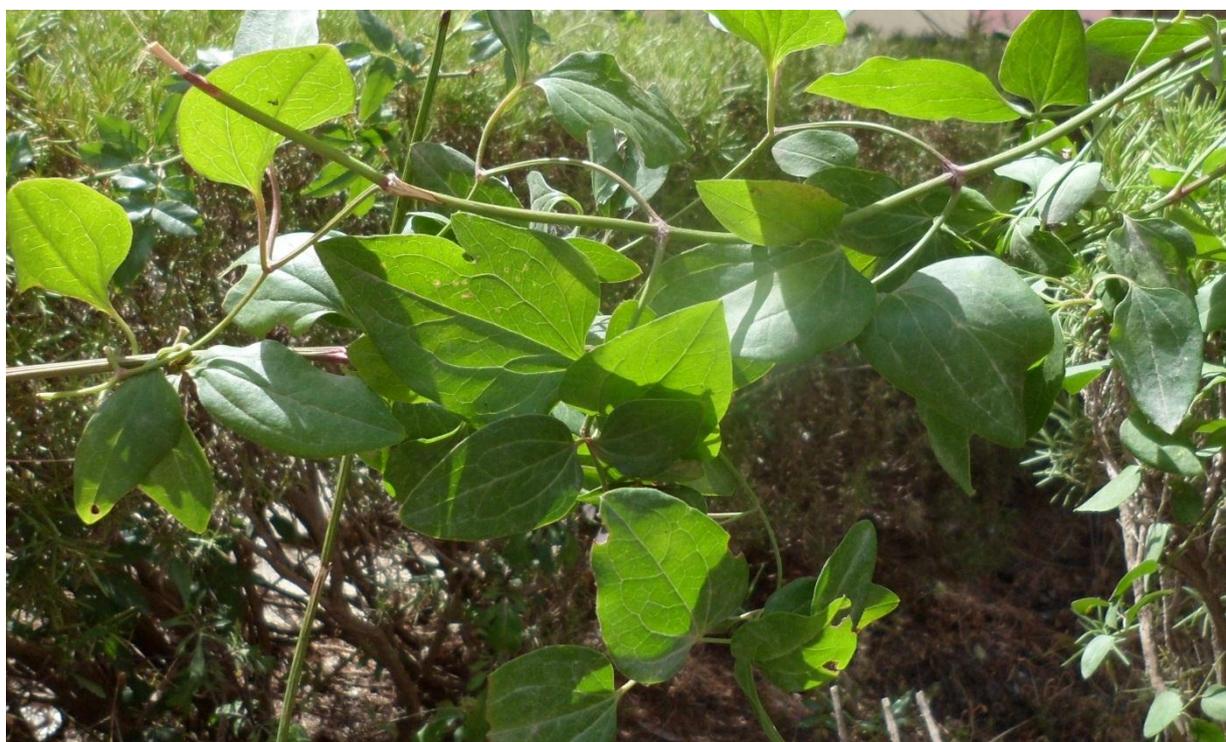


Figure 13: Photographie des feuilles de *Clematis flammula*

Tableau I : Classification de *Clematis flammula*.

Nom scientifique	Partie utilisé et localisation	Nom local	classification
<i>Clematis flammula</i>	Feuilles : régions de la méditerrané	Nom Berbère: Azenzu Nom Arabe: Yasmine Berri	Division : Magnoliophyta Ordre : Ranunculales Famille : Ranunculaceae Genre : Clematis

IV.1.2. Usage et effet thérapeutique

Les espèces du genre *Clematis* ont été largement utilisées dans la médecine traditionnelle dans le monde entier en raison de leur distribution à grande échelle à l'hémisphère nord. Les parties aériennes de ces espèces ont servi de remède en particulier en Europe et l'Asie orientale contre la douleur et la fièvre, les douleurs rhumatismales, les infections oculaires, les symptômes blennorrhagiques, les troubles chroniques de la peau, la goutte et varicosité et comme diurétique (Yesilada et *al.*, 2006).

Selon les études épidémiologiques, les infusions préparées à partir de feuilles séchées sont utilisées pour traiter de nombreuses affections spécifiquement l'arthrite et les brûlures superficielles (Atmani et *al.*, 2011), mais les feuilles vertes sont supposés être toxiques provoquant des lésions au niveau de la peau en doses excessives ou pendant une longue durée d'où elle tire son nom de (*Clematis brûlante*) (Atmani et *al.*, 2011). Les gens de la région kabyle utilisent souvent les feuilles de cette plante comme insectifuge pour empêcher la détérioration du blé et du maïs stockés (Atmani et *al.*, 2009)

IV.1.3. Récolte et identification

La plante a été récoltée en mai – juin de l'année 2011 dans la forêt à proximité du village de Tizi Neftah, commune d'Amizour (Bejaia) et a été identifiée au laboratoire de botanique de l'Université de Bejaia comme étant la clématite, *Clematis flammula*.

IV.1.4. Broyage et tamisage

Après séchage des feuilles de *Clematis flammula* dans un endroit ombragé et aéré, elles ont été broyées avec un broyeur éclectique (IKA) et le broyat obtenu a été tamisé jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre 63µm (Atmani et *al.*, 2011).

IV.1.5. Extraction

La poudre fine de la plante a été macérée dans de l'éthanol à 96% pendant 24 heures avec un rapport de 1gramme de poudre pour 4ml d'éthanol. Après une décantation de 12 heures de cette solution, une centrifugation de 10 min à une vitesse de 1500g/min a été effectuée à la suite de laquelle le surnageant a été ensuite collecté et laissé sécher à une température ambiante. Après l'évaporation totale de l'éthanol, la pesée des extrais a été prise après stabilisation du poids sec. L'extrait obtenu a été stocké à une température de -20°C

jusqu'au moment de l'utilisation. Le taux d'extraction a été calculé suivant la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P_1 - P_0)/E] * 100$$

P₁ : poids de l'extrait après évaporation

P₀ : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri

E : poids de la poudre

IV.1.6. Préparation de l'extrait

L'extrait a été dissous dans de l'eau physiologique + tween 80 de façon à obtenir une concentration de 50mg/kg de souris.

IV.2. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula*

IV.2.1. Les animaux

Les souris mâles albinos ont été achetées de l'Institut Pasteur d'Alger, elles ont subi une période d'adaptation d'une semaine au sein du laboratoire d'expérimentation animale à l'Université de Bejaïa, sous des conditions standards de température (25°C) avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12h. L'éthique a été respectée durant la durée de toutes les expériences.

IV.2.2. Test de toxicité

Le test de toxicité de l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* a été réalisé sur des souris albinos (27-34 g), réparties en 2 groupes (n=4). , 0.3ml l'extrait leur a été administrée avec une sonde par voie intra-gastrique a une dose de 50mg /kg chaque jour pendant 3 jours suivant le protocole modifié de Singh et Kumar (2011). Les écarts de comportement normal, mouvements la mortalité, ainsi que les changements de poids corporel ont été suivis quotidiennement pendant l'expérience.

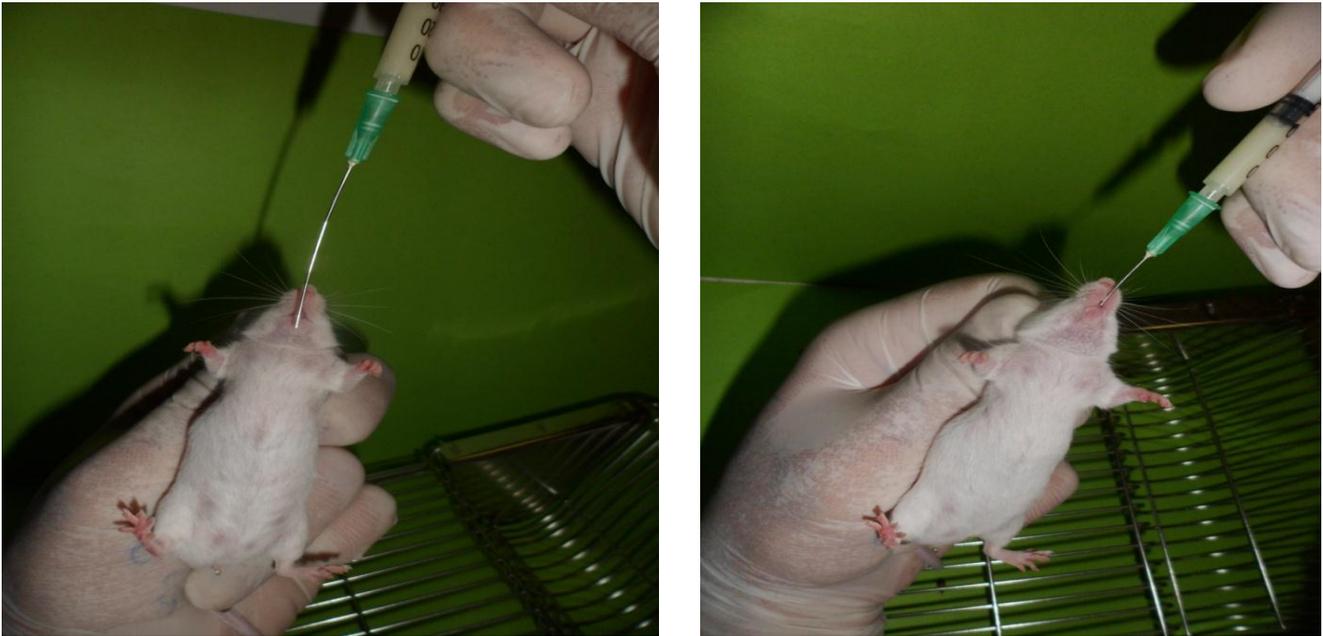


Figure 14: Administration par voie intragastrique

IV.2.3. Plan expérimental

L'expérimentation a été faite selon Naskar et *al.* (2010) pendant une durée de sept jours. Après sept jours d'acclimatation, les souris ont été divisées en quatre groupes (n=5).

- Groupe I : Control négatif (eau physiologique 0.9% : tween 80; 1ml/ kg).
- Groupe II : Control positif (CCl₄ : paraffine liquide (1 :2); 1ml/kg).
- Groupe III : Standard (alpha tocophérol; 50mg/kg; 1ml/kg).
- Groupe IV : Extrait (*C. flammula*; 50mg/kg; 1ml/kg).

Les groupes II -IV ont reçu (CCl₄ : paraffine liquide (1 :2); 1ml/kg) le premier jour et chaque 72 heures après, et avec un intervalle de deux heures après l'administration de l'extrait.

Après 24 h de la dernière dose de CCl₄, toutes les souris ont été anesthésiées avec le chloroforme et sacrifiées, le sang a été collecté pour des tests biochimiques. Les foies des souris ont été ensuite excisés après dissection et ensuite utilisés pour l'évaluation de la peroxydation lipidique.

IV.2.4. Test de l'acide thiobarbiturique (TBA)

La détermination du taux de MDA comme indice de la peroxydation lipidique par la méthode de TBA a été effectuée suivant la méthode modifiée de Harish et Shivanandappa (2006). Le foie excisé a été lavé avec une solution saline froide (4°C) à 0,9% NaCl suite à laquelle une homogénéisation manuelle a été réalisée. L'homogénat obtenu est ensuite mis à 10% (p /v) dans une solution de tampon phosphate (pH 7,2). Les étapes suivantes sont résumées dans la figure ci-dessous.

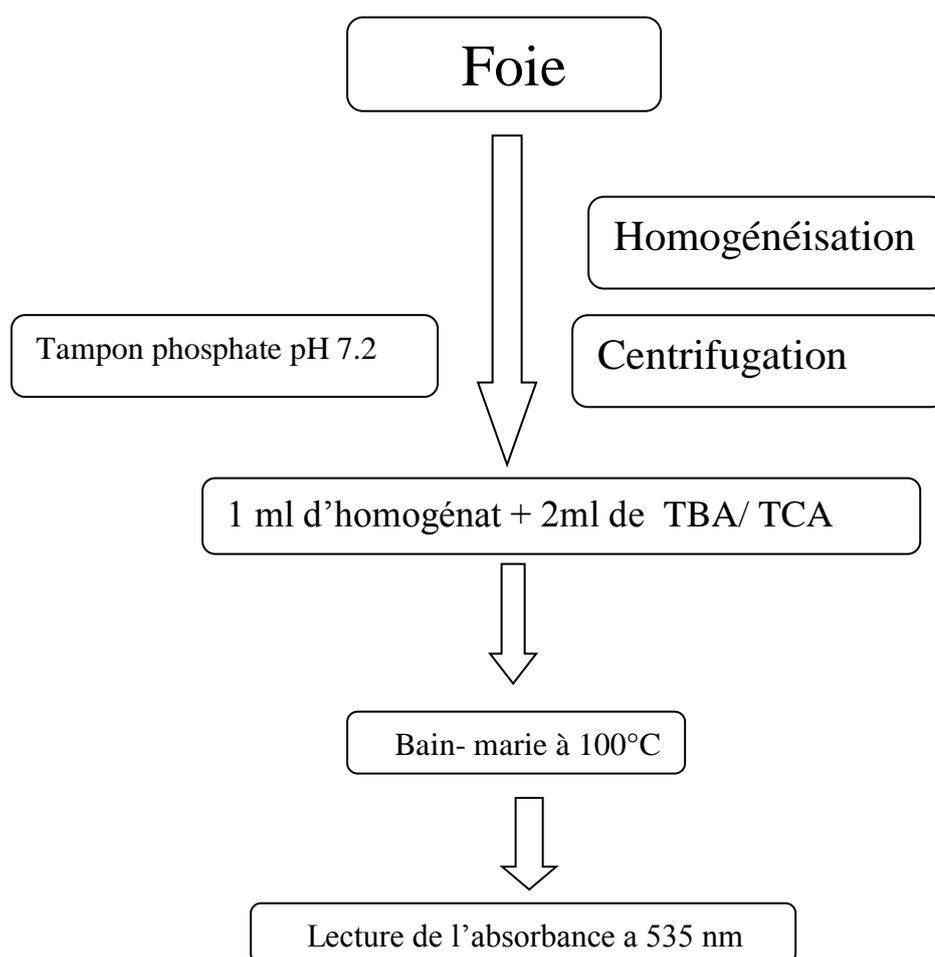


Figure15 : Protocole d'estimation de la peroxydation lipidique (Harish & Shivanandappa, 2006)

Le taux de MDA a été calculé en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA/TBA 1.56×10^5 et est exprimé en nmol/mg de protéines. La concentration en protéines a été déterminée suivant la méthode de Bradford (1976), (voir annexe 1).

IV.2.5. Estimation de la bilirubine totale

Après la collecte du sang, celui-ci a subi une centrifugation pendant 10 minutes, le sérum prélevé a servi à mesurer le taux de bilirubine totale avec un kit commercialisé. Les résultats obtenus sont exprimés en mg/dl de bilirubine totale dans chaque échantillon.

IV.2.6. Corrélation des poids

Pendant l'expérimentation, les souris ont été pesées régulièrement pour observer l'évolution du poids corporel et établir une corrélation avec le taux de MDA mesuré.

IV.2.7. poids relatif des foies

Dans le but de déduire s'il y a eu une inflammation ou une nécrose du foie une observation à l'œil nu a été effectuée et les poids relatifs entre les poids des foies et ceux des souris ont été calculés. Suivant la formule suivante :

Poids relatifs = poids du foie / poids des souris.

IV.2.7. Analyse statistique

Le logiciel Statistica a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats (n=5) par le test Anova et $p < 0.05$ a été considéré significatif.

Chapitre V

Résultats et discussions

V.1. Taux d'extraction:

Il a été postulé que le rendement et l'activité antioxydante d'extraits de plantes dépendent de la température et du solvant utilisé pour l'extraction (Gironi, 2011).

Dans notre étude, nous avons effectué une extraction en utilisant l'éthanol, le considérant comme le solvant le plus approprié pour extraire une quantité maximale de composés phénoliques (Cowan, 1999).

D'autres facteurs exercent une influence sur l'efficacité de l'extraction comme le pH et la taille de la poudre (Gironi, 2011). Aussi, dans le but d'optimiser l'extraction, le broyage et le tamisage ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer le maximum de poudre fine ayant un diamètre inférieur à 63 μ m (Juntachot, 2006).

Le taux d'extraction obtenu est de 14.65%, qui est un taux inférieur à celui des deux années précédentes (20.32% et 16.5% en 2009 et 2010, respectivement). La différence observée dans les taux d'extraction peut être due aux variations saisonnières qui peuvent augmenter ou diminuer le taux de polyphénols présents dans l'extrait cru (Nasz & Shahidi, 2006).

V.2. Test de toxicité

L'observation des souris nourries par administration intragastrique pendant trois jours par l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* (50mg/Kg) n'a révélé aucun changement significatif dans le comportement général comparé aux souris du lot témoin, la réduction de la locomotion, l'agressivité, la réaction à des stimuli (pincement de la queue, le bruit) et les interactions sociales ont été aussi observées sans aucun changement. Aussi, aucun cas de mortalité n'a été recensé. Même en ce qui concerne les poids corporels, aucun changements significatifs n'a été enregistrés chez les souris traitées et les témoins (tableau II). Puisque les souris du groupe témoin et celles traitées avec l'extrait sont restées saines tout au long de la période du test, les résultats de la présente étude indiquent que l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* a été tolérée chez les souris.

Il est connu dans la population locale que les feuilles de *Clematis flammula* causent des problèmes gastriques (diarrhée et brûlure) quand elles sont ingérées vertes, ce qui lui a valu l'appellation de « clématite brûlante ». Ceci est dû à la présence d'une substance appelée anémone qui s'évapore quand les feuilles sont séchées (Atmani, 2011).

Les résultats obtenu test de toxicité nous a permis de vérifier l'absence d'effets néfastes sur la santé quand les feuilles de *Clematis flammula* sont séchées.

Tableau II : Mesures du poids corporel.

	Souris 1		Souris 2		Souris 3		Souris 4	
	Témoin	Clematis 50mg/kg	Témoin	Clematis 50mg/kg	Témoin	Clematis 50mg/kg	Témoin	Clematis 50mg/kg
Jour avant	26g	34g	29g	32g	27g	32g	27g	34g
Jours 1	26g	31.40g	28.84	30.72	26.56g	31.20	27g	31.34g
Jours 2	24g	32.09g	29	31.27	26.50g	31.37g	27g	31.60g
Jours 3	24g	34.67g	30	33	27.66g	32.80	28.40g	34.90g

V.3. Test de TBA

Le foie, un organe important qui participe activement à de nombreuses fonctions métaboliques et joue un rôle majeur dans la détoxification, est la cible fréquente d'un certain nombre de substances toxiques (Gayatri et *al.*, 2011). Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est souvent utilisé dans les études expérimentales sur des animaux pour induire la peroxydation lipidique. En fait, cette substance hépatotoxique cible spécifiquement le foie en causant des lésions hépatiques et une nécrose dans la phase finale car le CCl₄ est transformé par le cytochrome p450 en un métabolite actif le trichlorométhyle (Vuda et *al.*, 2011). Ce radical réagit avec les acides gras insaturés des phospholipides présents dans les membranes cellulaires, induisant la peroxydation des lipides dans les cellules hépatiques (Sachdev & Davies, 2008), formant ainsi des produits appelés les malondialdéhydes (MDA) (Feng et *al.*, 2006).

La peroxydation lipidique est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, l'Alzheimer et le cancer (Berger, 1997). Pour cela, il est impératif de la contrer ou de la prévenir par l'utilisation de molécules antioxydantes présentes dans les plantes.

L'activité antioxydante des extraits de *Clematis flammula* issus d'une extraction sélective a fait l'objet d'une étude *in vitro* dans laquelle il a été trouvé que l'extrait brut éthanolique possède une activité antioxydante élevée contre la peroxydation lipidique de l'acide linoléique à 100µg/m (77.6%) (Atmani et al., 2009). Cependant, une activité faible a été constatée en ce qui concerne le 2,2 diphenyl-1picryl-hydrazyl (DPPH) (23%) ainsi que le H₂O₂ (9%) en comparaison avec les extraits éthanoliques des feuilles de *Pistacia lentiscus* (90%) pour le (DPPH) et (50%) pour le H₂O₂ (Atmani et al., 2009). De plus, l'extrait éthanolique a démontré une activité scavenging de 34% contre le superoxyde (Atmani, 2011) et a été très efficace contre le radical hydroxyle (61 %) à 100ug/ml, tous les deux considérés comme des initiateurs importants de la LPO (Atmani et al 2011). Cependant, cette même étude a indiqué que l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* a exprimé une capacité faible d'inhibition de (80%) à 1mg/ml, contre la lipoperoxydation des microsomes en comparaison avec l'acide caféique (Atmani et al., 2011).

Puisque l'objectif des essais *in vitro* est de prédire l'efficacité biologique d'antioxydants, une méthode n'est valable que si les résultats sont vérifiés par l'expérimentation *in vivo*.

La présente étude a pour but de tester l'effet hépatoprotecteur et antioxydant de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula* à une concentration de 50 mg/kg contre les dommages induits au foie par une administration de CCl₄ sur des souris. Le taux de MDA, révélé par le test de TBA est une mesure des dommages de la structure membranaire, et est considéré comme un indice de la lipoperoxydation (Naskar et al., 2010). Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 16.

D'après la figure 16 ci-dessous, on peut observer une élévation importante des taux de MDA dans le groupe II du contrôle positif (C+) traité par le CCl₄ (1488 ± 138.3 nmol/mg) qui représente presque le double du taux de MDA du contrôle négatif (C-) (763.1 ± 92 nmole/mg) à qui on n'a administré que de l'eau physiologique, ce qui implique une peroxydation lipidique accrue.

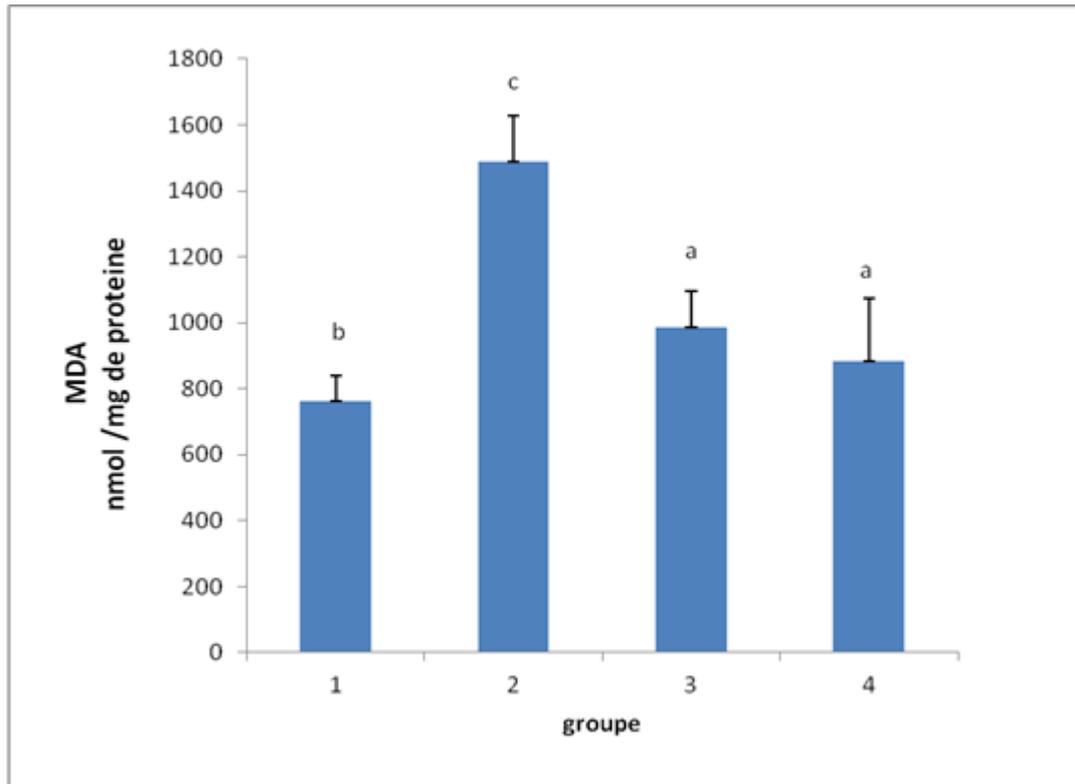


Figure 16 : Taux de MDA (nmoles /mg de proteines) après induction avec le CCl_4

(1) contrôle négatif (2) contrôle positif (3) α -tocophérol 50mg/kg (4) extrait ethanologique *Clematis flammula* 50mg/kg Toutes les valeurs ont été exprimés en tant que moyennes \pm SEM de (n=5), significative $p < 0,05$.

D'autre part, l'extrait et le standard (α -tocophérol) ont donné des taux de MDA de (882.74 ± 190 nmol/mg et $985. \pm 555$ nmol/mg), respectivement, montrant une réduction significative ($p < 0.05$) par rapport aux souris du contrôle positif (C^+).

Ces résultats montrent que l'extrait testé possède un effet hépato-protecteur considérable, équivalent à celui du standard l' α -tocophérol ($p < 0,05$). Ce dernier est un important antioxydant endogène liposoluble qui joue un rôle majeur dans la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique (Tirmenstein et *al.*, 1997). Les résultats de cette étude concernant cet agent administré à 50mg/Kg aux souris sont prévisibles vu qu'il a été rapporté une réduction plus importante de la peroxydation lipidique chez des rats traités avec une concentration plus élevée de α - tocophérol (110mg/kg) (Joshi et *al.*, 1995).

Il a été établi que les activités hépatoprotectrices peuvent être associées avec une capacité antioxydante de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Chang et *al.*, 2007).Ce qui est en accord avec les travaux de Teselkin et *al.*(2000), qui ont démontré que

les antioxydants issus de plantes peuvent prévenir la toxicité du CCl₄, par inhibition de la peroxydation lipidique. Ceci a été confirmé par certaines études sur les effets hépatoprotecteurs de plantes médicinales dans des conditions similaires à la présente étude. En effet, Harish *et al.* (2006) qui ont effectués un test de TBA sur *P. niiruri in vivo* et ont démontré une grand habilité de cette plante à inhiber la peroxydation lipidique qui est d'environ de 50%, alors que dans l'expérience menée par Naskar *et al* (2010) l'extrait hydromethanolique des fruits de *Phoenix dactylifera* a démontré un pouvoir inhibiteur de 24% uniquement. En comparant avec les résultats de *Clematis flammula* ceci témoigne du grand potentiel hépatoprotecteur de cette dernière.

Il est évident que l'efficacité des plantes à contrôler la toxicité du CCl₄ est attribué à ses constituant soit par la capacité d'induire les enzymes microsomales, soit par l'accélération du l'élimination du CCl₄ ou par inhibition de la peroxydation lipidique (Qureshi *et. al* 2010).

En effet, les flavonoïdes, les triterpénoïdes et les saponines pourraient être responsables de la protection des cellules du foie en inhibant l'activité des radicaux, y compris à la fois les radicaux superoxyde et hydroxyles (Dugas *et al.*, 2000).

Il a été démontré que certaines plantes du genre *Clematis* possèdent des saponines (Mimaki, 2004), l'acide caféique (Lee *et al* 2008) et des triterpénoïdes tannin qui sont des composés phénoliques à grand potentiel antioxydant et qui inhibent la peroxydation *in vitro* (Marinova *et al.*, 2009). Aussi, certaines saponines dérivés de plantes (ginseng) exercent un effet inhibiteur sur le cytochrome p 450 qui est le centre activateur du CCl₄ (kim *et al.*, 1997) ce qui peut expliquer la réduction conséquente du taux de MDA dans le lot prétraité par *Clematis flammula* et qui équivalent à celui du standard.

Cependant, deux plantes appartenant au genre *Clematis*, natives de la Corée ont été testées pour leur activité hépato-protectrice : *Clematis apiifolia* et *Clematis heracleifolia* qui ont montré un pourcentage d'inhibition de la peroxydation de 18,5% et 40% respectivement (Minkyun *et al.*,2003) beaucoup plus faibles que celui trouvé dans la présente étude pour *Clematis flammula*, puisque l'extrait éthanolique de cette dernière a réduit le taux de MDA de 80%.

Une autre étude menée par Alquasoumi *et al* (2008) sur l'évaluation des effets hépato-protecteurs *Aloe vera*, *Clematis hirsute* et *Cucumis prophetarum* a révélé que *Clematis hirsute* n'a démontrée aucun effet hépato-protecteur comparé à *Clematis flammula*. Etant

donné que *Clematis hirsute* est une plante native de l'Arabie Saoudite, ceci démontre que les conditions climatiques peuvent affecter énormément la teneur en phénols et flavonoïdes et diminuer par ce fait ses capacités antioxydantes (Naszki & Shahidi, 2006).

A notre connaissance aucune étude ne s'est intéressée à identifier les constituents de *C. flammula* mais en général, les plantes du même genre possèdent des phytoconstituents en commun. Des analyses préliminaires effectuées par l'équipe de recherche du laboratoire de Biochimie appliquée (non publiées) mènent à supposer que les feuilles de *Clematis flammula* possèdent des saponines et un dérivé de l'acide cafeïque qui seraient responsables de ses activités hépatoprotectrices du foie.

V.4. Mesure de la bilirubine totale

La bilirubine est un métabolite des protéines hème provenant pour la plupart (80-85%) de la dégradation des érythrocytes sénescents, mais aussi de la destruction des précurseurs d'érythrocyte dans la moelle osseuse, et du métabolisme de la myoglobine et de quelques cytochromes. L'hème est métabolisé par une oxygénase en biliverdin. La bilirubine non-conjuguée est insoluble dans l'eau, et une fois libérée dans l'espace vasculaire, elle se lie à l'albumine qui la transporte dans le foie où elle sera conjuguée (Sofronescu et al., 2012)

La mesure de la bilirubine totale dans le sérum des souris est souvent utilisée comme un paramètre important dont l'augmentation est un signe de lésions hépatiques (M. Alexandra Brito et al., 2006).

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus du test de bilirubine effectué sur le sérum sanguin d'au moins deux souris de chaque lot.

Tableau III : Dosage de la bilirubine totale

	Contrôle -	Contrôle +	α - tocophérol	<i>C. flammula</i>
Bilirubine totale mg/dl	0.096	0.468	0.847	0.697

Les valeurs sont une moyenne de deux souris (n=2)

Les résultats du tableau III révèlent que l'administration du CCl_4 a provoqué une élévation significative ($p < 0,05$) de la bilirubine totale dans le sérum des souris du contrôle

positif (0.468mg/dl) par rapport à celle trouvée chez le contrôle négatif (0.095 mg/dl) dont le taux de bilirubine totale est supposé normal. Ce résultat suggère une augmentation de la peroxydation lipidique à la suite de l'administration du CCl₄, qui corrobore l'augmentation dans le taux des MDA trouvée ci-dessus. Cependant, on observe aussi une augmentation significative ($p < 0,05$) des taux de la bilirubine totale dans les lots III et IV (standard et expérimental) (0.847 et 0.697mg/dl, respectivement) comparés à ceux des lots I et II (témoins négatifs et positifs).

L'explication pour cette élévation a été recherchée dans la bibliographie. Plusieurs possibilités ont été trouvées :

-Cette élévation peut être due au blocage de la dégradation de la bilirubine au niveau hépatique par l'activation du superoxyde dismutase (SOD) par l'extrait par un mécanisme encore inconnu (Joshi *et al.*, 1995). En effet, plusieurs études ont rapportées une stimulation de l'activité antioxydante par les polyphénols (Naskar *et al.*, 2010). Dans le cas du standard, le taux élevé de la bilirubine enregistrée peut être interprété comme une lenteur de l'action de la vitamine E dans la protection du foie (Joshi *et al.*, 1995). En effet, il a été noté qu'après l'administration du CCl₄ et une dose unique de vitamine E le taux de bilirubine a augmenté trois jours après, suivi par une diminution significative le septième jour de l'expérimentation (Joshi *et al.*, 1995).

-Il a été rapporté que certains polyphénols comme le résveratrol agissent sur les plaquettes sanguines en provoquant une hémolyse et la libération de la bilirubine dans le sang (Cottart, 2010). Les saponines contenues dans la plupart d'espèces du genre *Clematis* (Mimaki *et al.*, 2004) sont connues pour avoir un effet hémolytique ce qui expliquerait la hausse de la bilirubine chez les souris traitées avec l'extrait, L'étude menée sur *Clematis hirsute* (Alquasoumi, 2008) testé à une concentration de 250 mg/kg a démontré un taux de bilirubine équivalent (2.79mg/dl) à celui du groupe du contrôle positif qui n'a reçu que le CCl₄ (2.75 mg/dl) même si pour autant cette plante n'a causé aucune hausse du taux de MDA. Ceci peut indiquer que les plantes du genre *Clematis* induisent une augmentation de la bilirubine à cause de la forte teneur en saponines de leur extrais.

-Il a été également démontré que les concentrations intracellulaires de la bilirubine peuvent être localement et temporairement augmenté par induction de HO-1 (isoforme inductible de l'hème oxygénase) ou de l'activation rapide de HO-2, pour contrer à court et à long terme le stress oxydatif (Berrahal *et al.*, 2007). Ainsi, l'augmentation des concentrations des pigments

biliaires actifs qui peuvent agir comme antioxydants est un système de défense et une réponse adaptative des cellules au stress oxydatif (Berrahal et *al.*, 2007).

-Aussi, les rapports sur la bilirubine sont contradictoires. Alors que des études antérieures menées sur les cellules souches des rats Gunn ont montré *in vitro*, qu'il y a une association étroite entre la peroxydation lipidique (LPO) et la dégradation de la bilirubine dans les microsomes de foie, ceci n'a pas été prouvé *in vivo*. Bien que le catabolisme de la bilirubine soit un processus oxydatif qui dépend de la peroxydation lipidique, néanmoins aucune étude n'a établi qu'il y a une relation causale entre LPO et le niveau de bilirubine plasmatique *in vivo* (Joshi et *al.*, 1995).

V.5. Corrélation entre la lipoperoxydation et le poids corporel

La peroxydation lipidique peut, dans certains cas, affecter les poids des souris. Pour vérifier s'il y a un lien entre les deux paramètres, on a réalisé des courbes de corrélation (annexe). Il a été noté une corrélation négative entre les taux de MDA et les poids des souris de tous les groupes étudiés sauf pour le groupe du contrôle positif traité au CCl₄ où une faible corrélation positive a été observée ($r = 0,31$) (Annexe N° 5).

Dans le groupe du contrôle négatif, une corrélation négative ($r = -0,96$) (Annexe N°3) indiquant que les souris de poids corporel faible possèdent un taux de MDA élevé. Le CCl₄ a perturbé cette corrélation dans le groupe du contrôle positif mais qui a été rétablie en partie par le standard ($r = -0,81$) (Annexe N° 4) ou la plante ($r = -0,79$) (Annexe N°6).

Notre interprétation de ces résultats est que les souris de grande taille ont en général une plus grande résistance à la peroxydation lipidique. Cette résistance a été diminuée par le CCl₄ qui a créé un stress oxydatif et a perturbé ainsi le métabolisme des animaux. Cette interprétation est supportée par certaines études qui affirment que les cytokines activent le métabolisme de l'organisme et causent ainsi une perte de poids involontaire (Dumas, 2004). Une baisse des poids des souris pré-traitées avec l'extrait a été enregistrée soulignant qu'il y a peut-être une activation du métabolisme.

V.6. Poids relatifs du foie

Les foies des souris ont été pesés après leur excision pour vérifier s'il y a une augmentation de leur taille ou une diminution due à une inflammation ou une nécrose. Les poids relatifs des foies de toutes les souris sont montrés dans le tableau IV qui montre qu'il n'y avait pas de changement significatif dans les poids du foie de toutes les souris par rapport

au groupe témoin, le poids du foie a été proportionnel au poids de la souris. Ceci veut dire que le CCl₄ n'a pas causé des dommages significatifs aux foies des souris dû à la courte durée de l'expérimentation (7 jours). Aussi, aucune anomalie n'a été relevée après observation des foies à l'œil nu sauf pour le foie de la souris 5 traitée par l'extrait éthanolique de *Clematis* qui peut être justifié par d'autres causes pathologiques spécifiquement chez cette souris. Des parties de foie ont été prélevées pour la réalisation ultérieure de coupes histologiques.

Tableau IV : Poids relatifs des foies

Souris	Contrôle -	Control +	Standard	Clematis
Poids relatif *	0.059	0.062	0.066	0.0661

*Poids relatif = poids du foie / poids des souris ,Les valeurs sont une moyenne de n=5.

En conclusion, l'extrait éthanolique de *Clematis flammula* a pu atténuer le stress oxydatif et la peroxydation lipidique causé par le CCl₄ de manière équivalente au standard l'alpha-tocophérol.

*Conclusion
et perspectives*

La recherche scientifique de ces dernières années a vu un essor considérable sur l'utilisation de matières végétales telles que les fruits, feuilles, racines et écorce dans la médecine traditionnelle. L'intérêt de cette recherche se porte sur la découverte d'antioxydants naturels qui peuvent remplacer les antioxydants synthétiques, connus pour leur toxicité. Les feuilles de *Clematis flammula* sont utilisées dans la médecine traditionnelle locale pour traiter divers états pathologiques notamment les rhumatismes articulaires et les brûlures superficielles. Cette étude a visé à tester l'efficacité de cette plante contre la peroxydation lipidique *in vivo*.

Les résultats ont révélé un fort pouvoir hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique des feuilles de *C. flammula*, confirmant ainsi les résultats des tests *in vitro* précédents (Atmani et al., 2009). Cet effet est équivalent à celui du standard utilisé (α -tocophérol) considéré comme un puissant antioxydant contre la peroxydation lipidique.

Les tests effectués dans la présente étude sur *Clematis flammula* sont les premiers dans leur genre sur cette plante. Les résultats obtenus sont donc préliminaires, et il est prévu de les compléter en menant des expériences sur les extraits acétate d'éthyle et chloroforme qui ont exhibé les taux d'inhibition de la peroxydation les plus forts *in vitro*.

Aussi, des tests sur les activités des enzymes antioxydantes comme la catalase, le superoxyde dismutase et le glutathion peroxydase sont nécessaires pour confirmer les résultats de la présente étude. Les mécanismes moléculaires qui régissent les vertus médicinales de cette plante sont inconnus. Donc, il serait intéressant d'explorer les effets des extraits de *Clematis flammula* sur les voies de défense antioxydantes de l'organisme et d'isoler et identifier les composés responsables de l'effet hépatoprotecteur. Les feuilles de *C. flammula* sont en général utilisées par la population locale contre des maladies inflammatoires. Les résultats de cette étude sont prometteurs et permettent de considérer l'utilisation des feuilles de cette plante contre les maladies hépatiques.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Akyol, O., Isçi, N., Temel, I., Özgöçme, S., Uz, E., Murat, M., Büyükberbe, S. (2001). Relations entre les enzymes anti-oxydantes plasmatiques et érythrocytaires et la peroxydation des lipides chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum*, 68 : 601-8.
- Alagumanivasagam, G., Muthu, A. K., Kumar, D.S., Suresh, K., Manalavan, R. (2010). *In Vivo* antioxidant and lipid peroxidation effect of methanolic extract of tuberous root of *Ipomoea digitata* (Linn) in rat fed with high fat diet. *Inter J of Apl Biol and Pharma Techno*, 1: 214-220.
- Alquasoumi, S.I., Alhowirini, T.A., Abdel-kader, M. (2008). Evaluation of hepatoprotective effect of *Aloe vera*, *clematis hirsute*, *Curcumis prophetarum* and Bee Propolis against experimentally induced liver injury in rats. *Int J of Pharm*, 4(3): 213-217.
- Artmüt, H., Uhn, K., Strid, A., Orcher, B. (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Fr Rad Biol & Med*, Vol. 33, No. 2, pp.154 –172.
- Atasayar, S., Orhan, H., Özgünefi, H. (2004). Malondialdehyde Quantification in Blood Plasma of Tobacco Smokers and Non Smokers, *Fabadj. Pharm. Sci*, 29:15-19.
- Atmani, D., Chaher, N., Atmani D., Berboucha, M., Debbache, N., Boudaoud, H. (2009). Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity. *Cur Nutr & Fd Sci*, 5:225-237.
- Atmani, D., Ruiz-Larrea B M., Ruiz-Sanz J I, Leandro J. Lizcano, Fadil Bakkali and D. Atmani (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts, *J of Med Pl Res*, 5(4): 589-598.
- Atmani-Kilani D., (2011) Effet antioxidant et cytotoxique des extraits d'une plante medicinale locale; la clématite, *Clematis flammula*. thèse doctorat, université de Bejaia, pp40-45.
- Balaji, M., Reddy, B.K., Rao, K.R., Reddy, L.A., P. B., Kishor, K. (2004) Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *J Pl Phys*, 161, 63–68.
- Barber, S.C., Mead R.J., Shaw, P. J. (2006). Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Bioch et Bioph Acta*, 1762:1051 – 1067.

Références bibliographiques

- Baumann, E., Stoya, G., Volkner, A., Richter, W., Lemke, C., Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponinaffects the membrane structure. *acta histo*, 102 : 21-35.
- Beaudoux, J. L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immunanal & Biol spéc*, 21: 144-150.
- Belkheiri, N. (2010). Derives Phenoliques a Activites Antiatherogenes. Thèse de doctorat. *Université de Toulouse*, pp.7-10.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant Polyphenols with Salivary Proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(2):184-196.
- Berard, E. (1997). Metabolisme et régulation du monoxyde d'azote : un médiateur de contrôle difficile. *Arch Pédi*. 4 :1004-1011.
- Berger, M. M. (1997). Rôle antioxydant des micronutriments: pertinence en épidémiologie et en réanimation. *Nutr Clin Métabol*. 11:125-32.
- Berrahal, A.A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., El-Fazâa, S. (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *C R Biol*, 330: 581-588.
- Bhattacharya, A., Sood, P., Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. *Mol Pl Path*, 11(5): 705–719.
- Biswas, G., Sarkar, S., Acharya, K. (2011). Hepatoprotective of the ethanolic extract of *Astaraeus Hygrometricus* (Pers.) Morg. *Dig J of Nanomat & Biostru*, 6: 2637-647.
- Boizot, N., Charpentier, J.P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *l'Inra*, 97 :82.
- Bonnefont-Rousselot, D., (2007). Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biol*. No 175. 23-26.
- Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudoux, J.L., Théron, P., Legrand, A., Delattre, J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutr clin et métabol*, 16 :2 60–267.
- Bouzid, W., Yahia, M., abdeddaim, M., Aberkan, M. C., Ayachi, A. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'*Aubepine Monogyne*. *Leban sci J*, 2(1).

- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Bioch*, 72: 248-254.
- Brito.A M., Silva. F.M, Brites D. (2006) Bilirubin toxicity to human erythrocytes: A review .*Clinica Chimica Acta* 374 (2006) 46 – 56.
- Bruneton, J. (1999). Les composés Phénoliques in « pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 3^{ème} édition. *Tec et Doc. Lavoisier*. Paris. pp310.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L. (2010) . Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fet & Neon Med*, 15:186-190.
- Çakatay U. (2005). Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab*, 31:551-557.
- Chang H Y., Peng W H., Sheu M J., Huang G J., Tseng MC., Lai M T., Ho Y L., Yuan Shiun Chang. (2007). Hepatoprotective and Antioxidant Effects of Ethanol Extract from *Phellinus merrillii* on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage. *Americ J of Chin Med*, Vol. 35, No. 5, 793–804.
- Christopher, J., Morris, R. E., Trenam, W., Black, D. R. (1995). Reactive oxygene species and iron-a Dangerous partnership in inflalammation. *Inter J Bioch cell Biol*, 27: 109: 122.
- Cillard J., Cillard P.(2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*, 13.(1).
- Cottard C H. (2010). Resveratrol bioavailability in humans. *Mol Nutr f Res*, 54(1): 7-16.
- Coulon L. (2004). Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique des phospholipides plaquettaires. *Thèse de doctorat université de lyon*, p61-64.
- Cowan M.M.(1999) plant Product as antimicrobial agents ,clinical microbiologie review 12(4) :564-582.

Références bibliographiques

- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4): 348-361.
- Devasagayam, T.P.A., Bloor, K.K., Ramasrama, T. (2003). Methods for estimating lipide peroxidation: An analysis for merits and demerits. *Ind J of Bioch & Bioph*, 40: 300-308.
- Dugas, A.J, Jr., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K. L., Fischer, N.H., Winston, G.W. (2000). Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids Structure - Activity Relationships. *J Nat Prod*, 63:327 – 331.
- Dumas, J. F., (2004). Metabolisme energetique mitochondrial dans des situations de perte de poids .thèse de doctorat. *université D'ANGERS*, Pp. 31-32
- Durre, S., Muhammad, A.R. (2012). Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *As Pac J of Trop Biomed*, 547-550.
- Edson, A. R., Piccoli, J. C. E., Cruz, I. B. M., Rocha, B. T. J., Veronica, V.R Andrade., González, P., Bauermann, L. F., Barrio, J. P. (2009). Effect Of Black Grape Juice Intake On Liver Lipoperoxidation And Body Weight Loss In Whole Body X-Irradiated Rats. *J Med CBR Def*, 7.
- Etsuo Niki. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *F Rad Biol & Med*, 47:469–484.
- Farhoudi, M., Ghodrati Zadeh, S., Ghodrati Zadeh, S. (2011). Effects of *Salvia officinalis* extract on Carbon Tetrachloride induced hepatotoxicity. *Glob Vet*, 7 (4): 353-357.
- Favier A., (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'act chim*, 108-115.
- Feng, Z., Wenwei, H., Marnett, L. J., Tang, M. S. (2006). Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mut Res*. 601:125–136.
- Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., Leverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réan*. 11 : 411-20.
- Foucaud, L., Goulaouic, S., Bennisroune, A., Laval-Gilly, P., Brown, D., Stone, V., Falla, J. (2010). Oxidative stress induction by nanoparticles in THP-1 cells with 4-HNE

- production: Stress biomarker or oxidative stress signalling molecule. *Tox in Vitro*. 24:1512–1520.
- Gayatri, G., Babu, J.R., Sumalatha, N., Venkateswarao, J., Vidyadhara, S. (2011). Hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Stachytarpheta Indica* on Wistar rats. *Pharm Glob (IJCP)*, 2. 1(04).
 - Ghisolfi-Marque, A., Boyer, M.J., Vellas, B., Thouvenot, JP., Albarède, JL., Ghisolfi, J., (1995). Activité anti-oxydante, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme . *Nutr. Clin. M~tabol.* 10: 151-160.
 - Gill, S. S., Tuteja, N., (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Pl Phys & Bioch.* 48:909-930.
 - Gironi, F., Piemonte, V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *mical engin res & D*, 89: 857–862.
 - Goudable, J., Favier, A. (1997). . Radicaux libres oxygénés et antioxydants, *Nutr Clin Mdtabol.*, 11:115-20.
 - Hadjaz, F., Besret, S., Martin-Nizard, F., Yous, S., Dilly, S., Lebegue, N., Chavatte, P., Duriez, P., Berthelot, P., Carato, P. (2011). Antioxydant activity of b-carboline derivatives in the LDL oxidation model. *Eur J of Med Chem*, 46: 2575-2585.
 - Harish, R., Shivanandappa, S. (2006). Antioxidant activity and hépatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*, *F Chem*, 95:180–185.
 - Heim, E. K., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J of Nutr Biochem.* 13: 572-584.
 - Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl₄ -iduced oxidative damage in rats. *Chem-Biol Inter*, 171:283–293.
 - Hundekari, G. I., Shahana, S., Shookur, Shaikh, R, Farooqui, Z.S. (2012). Hepatoprotective Activity of Leaves of *Parkinsonia Aculeata* Linn Against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats. *Res J of Pharm, Biol & Chem Sci*, ISSN: 0975-8585.
 - James, W., Rush, E., Shelley, D. S. (2003). Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin Bioch*, 36:345–351.
 - Jaruga, P., Dizdaroglu, M. (2008). 8,5-Cyclopurine-2-deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects . *DNA Rep*, 7:1413–1425.

- Jeon, T. I., Hwang, S. G., Park, N. G., Jung, W. R., Shin, S. I., Choi, S. D., Park, D. K. (2003). Antioxidative effect of chitosane on chronique carbone tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Tox*, 187: 67-73.
- Johnson, F., Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Asp of Med*, 26:340–352.
- Joshi, M., Billig, B. H., Hallinan. T. (1995). Investigation of the role of reactive oxygene spices in bilirubine metabolism of Gunn rat. *Bioph et bioch Acta*, 1244:244-250.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F., Siebenhandl, S. (2006). The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *Inter J of F Sci & Tech*, 41:121–133.
- Khan, R.A., Khan M.R,Sahreen, S., Jan,S., Bokhari, J., Rashid, U. (2011)Prevention of CCl 4 induced adrenal oxidative stress in rat by Sonchus asper. *J of Med Pl Res*, 5(15): 3347-3350.
- Kim, H. J., Chun, Y. J., Park, J. D., Kim, S. I., Roh, J.K., Jeong, T.C. (1997). Protection of Rat Liver Microsomes against Carbon Tetrachloride-Induced Lipid Peroxidation by Red Ginseng Saponin through Cytochrome P450 Inhibition. *Pl med*, 63(5): 415-8.
- Kuhn, H., Aborchert, A. (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *F R Biol & Med*, 33 (2): 154–172.
- Kuiper, H. C, Cristobal, L. M., Sowell, J. D., Stevens, J. F. (2008). Mercapturic Acid Conjugates of 4-Hydroxy-2-nonenal and 4-Oxo-2-nonenal Metabolites Are *in Vivo* Markers of Oxidative Stress. *J of Biol Chem*, 283 (25): 17131–17138.
- Kumar, A.P., Ryan, C., Cordy, V., Reynolds, W. F. (2005). Inducible nitric oxide synthase expression is inhibited by myeloperoxidase. *Nitric Oxide*, 13: (1)42–53.
- Lee, T. A., Huang, N. K., Lai, T. C., Yang, A. T. Y., Wang, G. J. (2008). Anemonine, from *Clematis crassifolia*, potent and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor. *J of Ethnop*, 116: 518-527.
- Leelaprakash, G., Mohan Dass, S ., Sivajothi, V.(2011). Antioxidant and hepatoprotective activities of *Vernonia cinerea* extract against CCl₄ induced hepatotoxicity in albino rats. *Intern J of Pharm Sci Rev & Res*, 10(2) :30-34.

Références bibliographiques

- Lin, H.M., Tseng, H.C., Wang, C.J., Li, J.J., Lo, C.W., Chou, F.P. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, 8 : 634–646.
- Long, E. K., Picklo, Sr. M. J. (2010). Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: Make some room HNE Free Radical. *Biol & Med*, 49:18.
- Marinova, E.M., Toneva A., Yanishlieva N. (2009). Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *F Chem*, 114:1498–1502.
- Marnette, L. J., (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mut Res*. 424: 83–95.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *An Card et Ang*, 51 :304-315.
- McCord, J. M, Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocypreïn). *J. Biol. Chem*, 244:6049-55.
- Milne, G. L, Huiyong Yin., Morrow, J.d. (2008). Human Biochemistry of the Isoprostane Pathway. *J of Biol Chem*, 283 (23).15533–15537.
- Mimaki, Y., Yokosuka, A., Hamanaka, M., Sakuma, C., Yamori, T., Sashida, Y. (2004). Triterpene Saponins from the Roots of *Clematis chinensis*. *J. Nat. Prod*, 67. 1511 - 1516.
- Min, B., Ahn, D. U. (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products. *A Review F Sci. Biot*, 14. 1: 152 - 163.
- Minkyun, N., Renbo, A., Wenyi, J., Byung, S. M., Jae, K.Y., Young, H. K., Kihwan, Bae. (2003). Antioxidant effect of plant on free radicals and lipid peroxidation. *Natur Prod Sci*, 9(4): 226-231.
- Joshi, M., Billing, B. H., Hallinan, T. (1995). Investigation of the role of reactive oxygen species in bilirubin metabolism in the Gunn rat. *Bioch et Bioph Acta*, 1243: 244-250.
- Mohieldin, O., Mahgoub, A., Mahfouz, S., Elaby, S. (2011). Biochemical Studies on The Hepatoprotective Effects of Pomegranate and Guava Ethanol Extracts. *N Y Sci J*, 4(3).
- Montalbini, P., (2000). Xanthine Dehydrogenase from Leaves of Leguminous Plants: Purification, Characterization and Properties of the Enzyme. *J Pl Physiol*, 156: 3-16.

Références bibliographiques

- Mueller, I. A., O'Brien, K. M. (2011). Nitric oxide synthase is not expressed, nor up-regulated in response to cold acclimation in liver or muscle of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) . *Nitric Oxide*, 25:416–422.
- Mukinda J T., Peter F K. (2010). Eagles Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *J of Ethnoph*, 128:236–240.
- Naszk, M., Shahidi, F. (2006). Phenolic in cereals, fruit and vegetable: occurrence, extraction and analysis. *J of pharm & Biomed Anal*, 41: 1532-1542.
- Naskar, S., Islam,A., Mazumder, U.K., Saha,N., Halder, P.K., Gupta, M. (2010). *In vivo* and *In vitro* Antioxydant Potentiel of Hydromethanolic Extract of *Phoenix dactylifera* Fruits. *J of Sci Res*, 2(10): 144-157.
- Nicholls P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Arch of Bioch and Bioph*.
- Okuda T., and Ito H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Mol*, 16 : 2191-2217.
- Pepe H., Balci S S., Revan S., Akalin P P., Kurtoğlu F.(2009). of Oxidative Stress and Antioxidant Capacity Before and After Running Exercises in Both Sexes. *Gend Med*, 6 (4).
- Pritsos, chris A. (2000) .Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chem-Biol Inter*, 129:195–208.
- Psotová,J., Lasovský, J., Vičar, J. (2003). Metal Chelating Properties, Electricchemical Behavior, Scarvening, and Cytoprotective of Six Natural Phenolics.*Biomed Papers*, 147(2): 147-153.
- Qureshi, M. N., Kuchekar,B. S , Logade, N. A., Haleem,M. A In-vitro Antioxidant and In-vivo Hepatoprotective activity of *Leucas ciliata* leaves. *Rec Nat Prod*, 4:2 (2010) 124-130.
- Rush, J, W, E., Sandiford, S, D. (2003). Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin Biochem*, 36: 345–351.
- Sachdev, S., Kelvin, J., Davies, A. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *F R Biol & Med*, 44: 215 – 223.
- Sadeghi, H., Nikbakht, M.R., Ghaitasi, I., Sabzali, S. (2008). Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* on CCl₄ -induced liver damage in rats. *Afr J of Biochem Research*, 2 (6): 141-144.

Références bibliographiques

- Samudram, P., Rajeshwari, H., Vasuki, R., Geetha, A., Sathiya, M. P. (2008). Hepatoprotective activity of Bi- herbal ethanolic extract on CCl₄ induced hepatic damage in rats. *African J of Biochem*, 2(2).
- Sarmishtha, De., Chakraborty, J., Das, S. (2000). Oral Consumption of Bitter Gourd and Tomato Prevents Lipid Peroxidation in Liver Associated with DMBA Induced Skin Carcinogenesis in Mice. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 1: 205-208.
- Scalbert, A., Claudine M., Morand C., Rémésy C. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit Rev in F Sci & Nutr*. 45:287–306.
- Schreibelta, G., Horsena, V.H., Rossuma, S.V., Dijkstra, C, D. Drukarch B, de Vriesa. (2007). Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res views*, 56: 322-330.
- Selley, M. L., Bartlett, M. R., Czeti, A. L., Ardlie, N. G. (1998). The role of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in platelet activation by low density lipoprotein and iron. *Atheroscl*, 140: 105–112.
- Selvam, R., Kurien T.B. (1987). Induction of lipid peroxidation by oxalate in experimental rat urolithiasis. *J. Biosci*, 12(4) :367–373.
- Sess, E.D., Carbonneau, M. A., Meité, M., Peuchant, E., Dumont, M.F., Receveur M C., Thomas M J., A. Per romat , A. Sangaré. (1998). M. Le Bras & M. Clerc, , Marqueurs de la lipoperoxydation (LPO), protéines inflammatoires et tocophérols plasmatiques dans les drépanocytoses homozygote et hétérozygote. *Biol méd*, No 145.
- Shahidi, F., Ho, C.T. (2005), Phenolics in Food and Natural Health Products: An Overview. *Americ Chem Soci*.
- Shahwar D, Muhammad Asam Raza. (2012). Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *Asi Pacif J of Trop Biomed*. 547-550.
- Singh B K, Sharma S R, Singh B. (2009). Combining ability for superoxide dismutase, peroxidase and catalase enzymes in cabbage head *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *Sci Horticult*. 122:195–199.
- Singh,G K, Kuma V(2011). Acute and sub-chronic toxicity study of standardized extract of *Fumaria indica* in rodents. *J of Ethnopharm*, 134 : 992–995

Références bibliographiques

- Sofronescu A G., Loebis T., Zhu T. (2012). Effect of temperature and light on the stability of bilirubine in plasma samples. *Clin Chim Acta*.413:463-466.
- Sparg, S. G., Light, M. E., Staden, V. J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J of Ethnopharm*, 94 : 219–243.
- Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Asp of Med*. 24: 345–351.
- Sumitha P., Thirunalasundari T. (2011). Hepatoprotective Activity of Aegle marmelos in CCl4 Induced Toxicity - An *In vivo* Study. *J of Phytol*, 3(9): 05-09.
- Tapia G, Pamela Cornejo, Virginia Fernándeiz, Luis A. Videla. (1999). Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation *Toxic Let*. 106: 209–214.
- Tavadyan, L., Khachoyan, A., Martoyan, G., Kamal-Eldin, A. (2007). Numerical revelation of the kinetic significance of individual steps in the reaction mechanism of methyl linoleate peroxidation inhibited by α -tocopherol. *Chem & Phys of Lip*, 147-30.
- Teselkin, Y.O., Babenkova, I.V., Kolhir, V.K., Baginskaya, A.I., Tjukavkina, N.A., Kolesnik, Y.A., Selivanova, I.A., Eichholz, A.A., 2000. Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis. *Phytother Res*, 14, 160-162.
- Tessier F., Marconnet P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Sc & Sp*, 10 :1-13.
- Thirumalai T., Therasa, S.V., Elumalai, E.K., David, E.(2011). Intense and exhaustive exercise induces oxidative stress in skeletal muscle. *Asi Pacif J of Trop Dis*. 63-66.
- Tirmenstein M A, Tammy L. Leraas, Marc W. Fariss. (1997). α -Tocopheryl hemisuccinate administration increases rat liver subcellular α -tocopherol levels and protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Toxic Let*, 92: 67–77.
- Tomaro,M. L., Alcira,M., Battle,D. C. (2002). Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Inter J of Biochem & Cell Biol*, 34:216–220.
- Toyokuni S, Miyak N, Hiai H, Hagiwara M, Kawakishi S, Tushihiko O, Uchida K.(1994). The monoclonal antibody specific for the 4 hydroxy-2-nonenal histidine adduct. *FEBS let*, 359: 189-191.

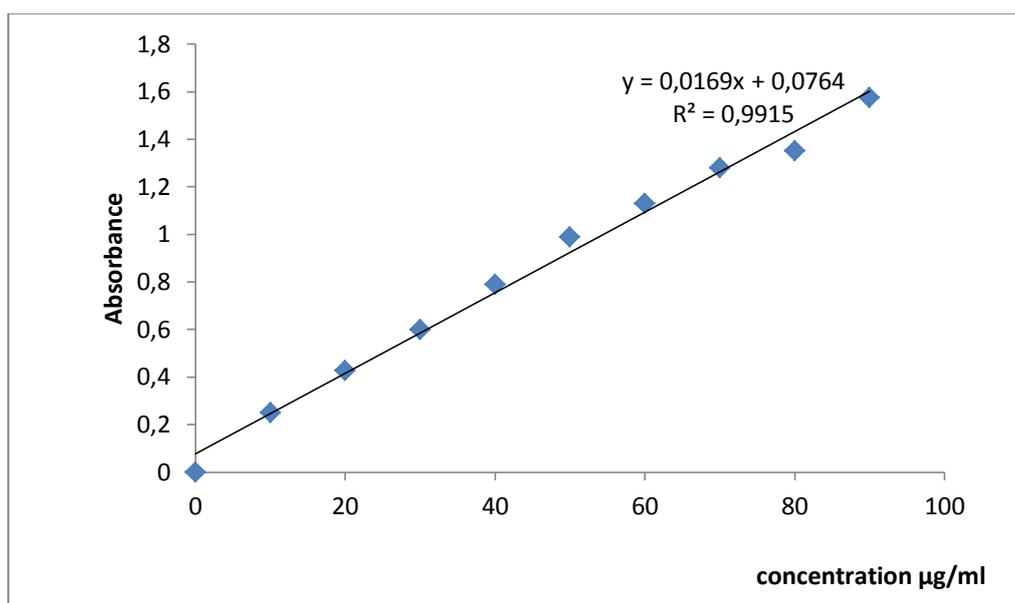
Références bibliographiques

- Truglio J J., Theis K., Leimkühler S., Rappa R., Rajagopalan K V., Kisker C. (2002). Crystal Structures of the Active and Alloxanthine-Inhibited Forms of Xanthine Dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Struct*, 10: 115–125.
- Vuda, M., D'Souza, R., Upadhya, S., Kumar, V., Rao, N., Kumar, V., Boillat, C., Mungli, P. (2011). Hepatoprotective and antioxidant activity of aqueous extract of *Hybanthus enneaspermus* against CCl₄-induced liver injury in rats. *Exper and Toxic Path.*
- Wenwei, H, Zhaohui Feng, Jamie Eveleigh, Ganesh Iyer, Jishen Pan, Shantu Amin, Fung-Lung Chung and Moon-shong Tang. (2002). The major lipid peroxidation product, *trans*-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human *p53* gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcin*, 23(11)1781–1789.
- Whitsett J, Matthew J. Picklo, Sr and Jeannette Vasquez-Vivar.(2007). 4-Hydroxy-2-Nonenal Increases Superoxide Anion Radical in Endothelial Cells via Stimulated GTP Cyclohydrolase Proteasomal Degradation, *Arter Thromb & Vascul Biol.* 27:2340-2347.
- Xiuzhen Han, Tao Shen and Hongxiang Lou. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Inter J of Molecular sci*, 8: 950-988.
- Yesilada, E., Küpeli, E. (2007). *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. *J of Ethnopharm*, 110: 504–515.

Annexe

Annexe

Annexe N°1 : Courbe d'étalonnage réalisé avec la BSA pour le dosage des protéines

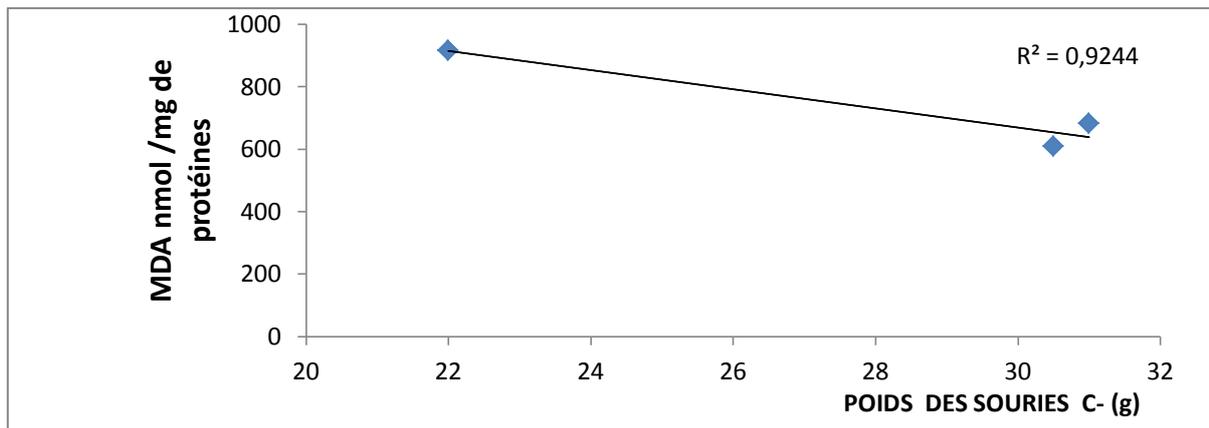


Annexe N°2 : Concentration des protéines en fonction de l'absorbance

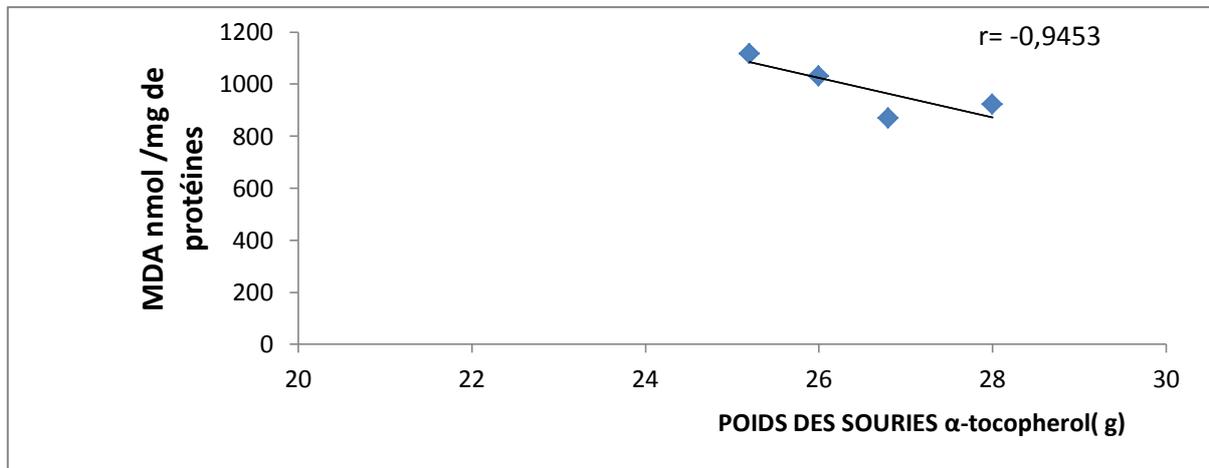
	Absorbance	Concentration
C-1	0,12	49,79
C-2	0,48	52,92
C-4	0,90	39,17
C-5	0,43	38,69
C+1	0,21	70,35
C+2	0,44	61,41
C+3	0,24	50,85
C+4	0,44	56,65
C+5	0,28	28,37
ST1	0,52	71,24
ST2	0,79	54,34
ST3	0,43	41,65
ST4	0,11	45,53
ST5	0,85	38,99
CLE2	0,61	63,19
CLE3	0,55	51,71
CLE4	0,54	45,38
CLE5	0,69	93,17

Annexe

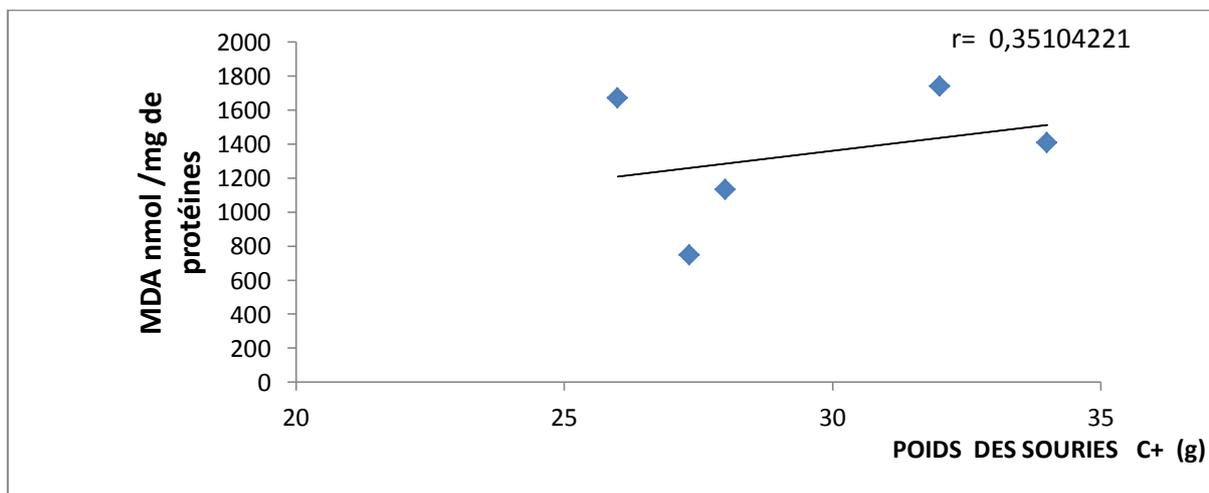
Annexe N°3 : Corrélation entre les MDA et le poids du contrôle négatif



Annexe N° 4 :Corrélations entre les MDA et le poids du contrôle négatif

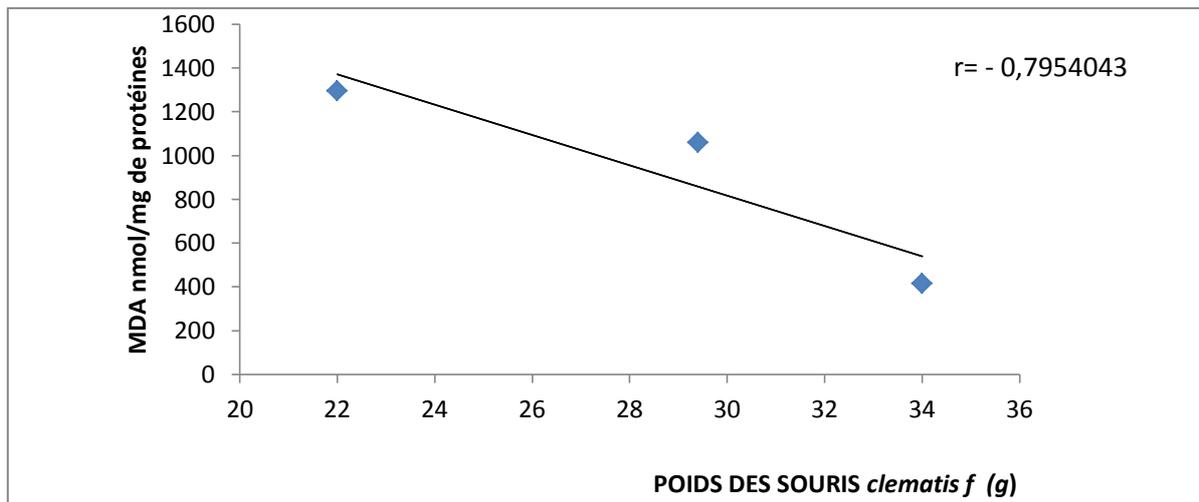


Annexe N° 5 : Corrélations entre les MDA et le poids du contrôle positif



Annexe

Annexe N°6 : Corrélations entre les MDA et le poids du lot prétraité par *clematis flammula*



Résumé

Les feuilles de *Clematis flammula* sont utilisées en médecine traditionnelle locale contre le rhumatisme articulaire et les brûlures artificielles. L'extrait éthanolique des feuilles de cette plante a été testé *in vivo* sur l'inhibition de la peroxydation lipidique, induite par le CCl₄ et mesurée par le test de TBA (thiobarbituric acid) qui détecte la présence des malondialdéhydes (MDA) produit final de la lipopéroxydation (LPO).

Administrés par voie orale à des souris albinos à une concentration de 50 mg/kg, l'extrait testé a donné un taux de MDA (882±190 mol/mg de protéines) comparable à celui du α -tocophérol (985± 55 nmol/mg protéines), connu pour son activité hépatoprotectrice. De plus, les tests biochimiques sur le sérum du sang des souris ont révélé un taux de bilirubine plus élevé que la normale chez les souris pré-traitées avec le standard et l'extrait (0.847 mg/dl et 0,697 mg/dl, respectivement). Toutefois, comme le taux de MDA a été réduit dans les deux cas, ces données ont été interprétées comme une activation des systèmes de défense antioxydant. Le test de toxicité n'a révélé aucune anomalie de comportement, indiquant que l'extrait à 50mg/kg est normalement métabolisé. Cette étude contribue à valider le potentiel antioxydant des feuilles de *Clematis flammula* qui a été déjà démontré *in vitro*.

Mots clés : *Clematis flammula*, Lipopéroxydation, Hepato-protecteur, MDA

Abstract

The leaves of *Clematis flammula* are used in local traditional medicine against rheumatoid arthritis and artificial burns. The ethanolic extract of the leaves of this plant was tested *in vivo* on the inhibition of lipid peroxidation, induced by CCl₄ and measured by the test of TBA (thiobarbituric acid) which detects the presence of malondialdehydes (MDA) the end products of lipoperoxydation (LPO).

Oral administration of the extract to albino mice at a concentration of 50mg/kg gave a rate of MDA (882±190 mol/mg of proteins) comparable with that of α -tocopherol (985± 55 nmol/mg proteins), known for its hepatoprotectrice activity. Moreover, biochemical tests on the serum of the blood of the mice revealed a rate of bilirubine higher than the normal in the mice pre-treated with the standard and the extract (0.847 mg/dl and 0,697 mg/dl, respectively). However, as the rate of MDA was reduced in both cases, this data was interpreted as an activation of the antioxidant defense systems. The test of toxicity did not reveal any abnormal behavior, indicating that the extract at 50mg/kg is normally metabolized. This study contributes to the validation the antioxidant potential of the leaves of *Clematis flammula* which was already shown *in vitro*.

Key words: *Clematis flammula*, Lipoperoxydation, Hepato-protecteur, MDA.