

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : génétique appliqué
Option : génétique appliqué



Réf :

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

MASTER

Thème

**Etude du pouvoir antioxydant *in vivo* de
l'extrait de feuilles de *Clematis flammula***

Présenté par :
BEDJEGHAL Fatima & BOUYAHMED Mouloud

Soutenu le : **9 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M ^{me} OUAHMED H.	MAA	President
M ^{elle} TAHIRI W.	MAA	Promotrice
M ^r TACHERFIOUT M.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciement

Nous remercions tous d'abord Dieu le tous puissant qui nous à donné la force et le courage tout en long de nos études.

Nos remerciements les plus profonds s'adressent exceptionnellement à notre promotrice M^{elle} TAHIRI Wahiba qui a fait tout son possible pour nous aider à réaliser ce travail et pour sa constante disponibilité.

Nous remercions également M^{me} OUAHMED Hania qui a accepté de présider cette soutenance ainsi que M^r TACHERFIOUT Mustapha

Pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons à remercier tout le personnel du laboratoire de génétique, ainsi que Fareh pour leur aide, conseils, gentillesse et leurs disponibilités. Merci à vous tous.

Enfin, mes remerciements s'adressent à tous les enseignants et à tous les étudiants fin de cycle.

Merci encore et encore...

FATIMA

Dédicaces

À mon père

À ma chère maman

À mes frères Mourad, Karim, Slimane et Djilali

À mes Sœurs Malika et Kahina ainsi a leurs maris

À ma petite sœur Nouria

À mes adorable neveux Houcine et Mehdi

À ma très chère nièce Aya

À mes beaux parents

À mes beaux frères et sœur

À mon fiancé «Yannis»

À tous mes amis

Fatima

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION.....	01
CHAPITRE I : Le stress oxydant	
I Généralité.....	02
I-1 Le stress oxydant.....	02
I-2 les radicaux libres.....	02
I-2-1 Définition.....	02
I-2-2 Les espèces réactives de l'oxygène.....	02
I-3 La source des radicaux libres.....	04
I-3-1 Sources exogène.....	04
A-exemple de médicament le paracétamol.....	04
B-Mécanisme cellulaire de la toxicité de paracétamol.....	05
I-3-2 Sources endogène.....	07
A- Chaîne respiratoire.....	07
I-4 Les conséquences biologiques de stress oxydant.....	07
I-4-1La peroxydation lipidique.....	07
I-4-1-1Mécanisme générale de la peroxydation lipidique.....	07
I-4-2 L'oxydation des protéines.....	08
I-4-3 L'oxydation d'ADN.....	09
CHAPITRE II Systèmes de défenses antioxydant	
II- Systèmes de défenses antioxydant.....	10
II-1Les antioxydants enzymatiques.....	10
II-1-1 La super oxyde dismutase (SOD).....	11
II-1-2 La catalase.....	11
II-1-3 La glutathion réductase / peroxydases.....	11
II-2 Les antioxydants non enzymatiques.....	12
II-2-1Les vitamine.....	13
II-2-2 Les oligoéléments.....	13
II-2-3 Le glutathion.....	13
II-2-3-1 Définition.....	13
II-2-3-2 Structure de glutathion.....	14
II-2-3-3 Biosynthèse de glutathion.....	14
II-2-3-4 La régulation de la biosynthèse de glutathion.....	15
II-3 Généralité sue les composés phénoliques.....	15
II-3-1 Les acides phénoliques.....	16

II-3-2 Les flavonoïdes.....	16
II-3-3 Les tannins.....	16
II-4 La silymarine.....	17
II-4-1 Structure et principaux caractères physico-chimiques.....	17
CHAPITRE III : Matériels et méthodes	
III matériels et méthodes.....	18
III-1 Matériels de laboratoire.....	18
III-2 Matériels végétal.....	18
III-2-1 Description botanique.....	19
III-2-2 Usage et propriété.....	20
III.3.Méthodes	20
III-4 Matériel animal et condition d'élevage.....	21
III-4-1 Traitement.....	21
III-5 Evaluation de l'activité glutathion <i>in vivo</i> sur des souris.....	24
III-4-1 Préparation de la courbe d'talonnage.....	25
III-4-2 Evaluation de la teneur des protéines dans l'homogénats des foies.....	25
III-4-3 Analyse statistique.....	25
CHAPITRE IV : Résultats et discussion	
VI- Evaluation de taux de glutathion hépatique réduit.....	26
CONCLUSION.....	31
Références bibliographiques	
Annexe	

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : Le stress oxydant	
I Généralité	
I-1 Le stress oxydant.....	2
I-2 les radicaux libres.	2
I-2-1 Définition.....	2
I-2-2 Les espèces réactives de l'oxygène.....	2
I-3 La source des radicaux libres.....	4
I-3-1 Sources exogène.....	4
A-exemple de médicament le paracétamol.....	4
B-Mécanisme cellulaire de la toxicité de paracétamol.....	5
I-3-2 Sources endogène.....	7
A- Chaîne respiratoire	7
I-4 Les conséquences biologiques de stress oxydant.....	7
I-4-1La peroxydation lipidique.....	7
I-4-1-1Mécanisme générale de la peroxydation lipidique.....	7
I-4-2 L'oxydation des protéines.....	8
CHAPITRE II Systèmes de défenses antioxydant	
II- Systèmes de défenses antioxydant.....	10
II-1Les antioxydants enzymatiques.....	10
II-1-1 La super oxyde dismutase (SOD)	11
II-1-2 La catalase.....	11
II-1-3 La glutathion réductase / peroxydases.....	11
II-2 Les antioxydants non enzymatiques.....	12
II-2-1Les vitamine	12
II-2-2 Les oligoéléments	13

II-2-3 Le glutathion.....	13
II-2-3-1 Définition	13
II-2-3-2 Structure de glutathion.....	14
II-2-3-3 Biosynthèse de glutathion.....	14
II-2-3-4 La régulation de la biosynthèse de glutathion.....	15
II-3 Généralité sue les composés phénoliques.....	15
II-3-1 Les acides phénoliques.....	
II-3-2 Les flavonoïdes.....	16
II-3-3 Les tannins.....	16
II-4 La silymarine.....	16
II-4-1 Structure et principaux caractères physico-chimiques.....	16
CHAPITRE III : Matériels et méthodes	
III matériels et méthodes.....	19
III-1 Matériels de laboratoire.....	19
III-2 Matériels végétal.....	19
III-2-1 Description botanique	19
III-2-2 Usage et propriété	20
III-3 Matériel animal et condition d'élevage.....	20
III-3-1 Traitement.....	21
III-4 Evaluation de l'activité glutathion <i>in vivo</i> sur des souris	23
III-4-1 Préparation de la courbe d'talonnage.....	24
III-4-2 Evaluation de la teneur des protéines dans l'homogénat des foies	24
III-4-3 Analyse statistique.....	25
CHAPITRE IV : Résultats et discussion	
VI- Evaluation de taux de glutathion hépatique réduit.....	26
CONCLUSION.....	31

Références bibliographiques

Annexe

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ADP :	adénosine double phosphate
AGPI :	Acides Gras Polyinsaturés
ANOVA :	Analyse des variances
AOX :	Antioxydant.
APAP :	acétyl amino phénol
ATP :	adénosine triple phosphate
BSA :	sérum d'albumine bovin
BSA :	sérum d'albumine bovin
BSA :	sérum d'albumine bovin.
CAT :	Catalase
CMC :	carboxy méthyle cellulose
C° :	Degré celsius
Cyt :	Cytochrome P450
DL50 :	dose létale 50
DO :	densité optique
DTNB :	l'acide 5, 5' - Dithiobis 2-nitrobenzoïque
EDTA :	acide éthylène diamine tétra acétique
ERO :	Espèces Réactive de l'oxygène.
GPxp :	glutathion peroxydase.
GSH:	glutathion réduit.
GSH1	glutamate-cystéine ligase
GSH2	glutathion synthétase
GSHrx :	glutathion réductase
GSSH :	Glutathion disulfure
H₂O₂ :	Péroxyde d'hydrogène
HIV :	virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES ABREVIATIONS

IG :	intra-gastrique
IP :	intra-péritonéale
KCl :	Chlorure de potassium.
L· :	radical libre lipidique
LH :	lipides insaturés
LOO· :	radicaux libres peroxydes instables
LOOH :	Hydroperoxydes
NADH :	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAPBQI :	N-acétyl p-benzoquinone imine
nm :	nanomètre
O₂^{·-} :	l'anion superoxyde
¹O₂ :	Oxygène singulet
OH· :	Radical hydroxyle
P450 :	Cytochrome P450
Pi :	phosphate inorganique
RL :	Radicaux libres
RO· :	le radical alcoxyle
ROO· :	le radical hydroxyle
ROOH :	Hydro peroxydes lipidiques.
SH :	groupement sulfhydryle
SOD :	superoxydes dismutases
TNB :	thionitrobenzoïque
UVA :	ultraviolets A

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
I	Les différentes espèces réactives de l'oxygène.	03
II	Caractéristiques Physicochimiques du Paracétamol	04
III	Différentes caractéristiques des glutathion peroxydase	12
IV	Classification taxonomique de <i>Clematis flammula</i>	20
V	Répartition des lots selon le traitement effectués.	22

LISTE DES FIGURES

	Titres	pages
01	Métabolisme hépatique du paracétamol.	06
02	schéma général de l'oxydation des lipides	08
03	Le mécanisme réactionnel des trois enzymes impliquées dans la détoxification active	10
05	Elimination du H ₂ O ₂ par les réactions enzymatiques combinées de la GR et GPx.	11
06	La structure chimique glutathion	14
07	la synthèse du glutathion.	15
08	Diagramme récapitulatif des effets favorables de la silibinine chez les patients présentant une affection hépatobiliaire	18
09	Les feuilles de <i>Clématis flammula</i> .	19
10	schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction	20
11	Image d'une souris albinos.	21
12	. Traitement des souris (A) par voie intra-gastrique, (B) par voie (IP).	21
13	Les étapes de l'isolement et de traitement des différents foies.	23
14	Réaction d'Ellman entre le Glutathion et le DTNB	24
15	Représentation graphique des différentes concentrations de glutathion du foie exprimé en µmol/mg de protéine.	26

INTRODUCTION

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible sous certaines conditions d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (ERO) (**Haleng et al., 2007**). Aux doses faibles, ces ERO sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques. Aux doses excessives, les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme. La surproduction des ERO au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne naissance au stress oxydant.

Le phénomène de stress oxydant est considéré comme la cause principale de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Adil et al., 2007**).

Des molécules dites anti-oxydantes interviennent selon différents modes d'action afin de limiter la production des radicaux libres.

Bien qu'il soit admis que parmi les défenses antioxydantes les plus importantes de l'organisme figurent la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), le système glutathion reste un acteur majeur dans la défense antioxydante (**Mercy et al., 2014**).

Malgré d'énormes progrès de la médecine moderne aucun traitement efficace n'est encore disponible, qui stimulerait à la fois les fonctions du foie et offrirait une protection contre les dommages oxydatifs ou l'aiderait à régénérer les cellules hépatiques. Seulement des défenses naturelles peuvent exister contre la peroxydation lipidique, parmi eux, les antioxydants naturels (**Havasteen et al., 2002**).

De nos jours, un grand nombre de préparations médicinales de fines herbes traditionnelles connaissent un succès accru et sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique et sont recommandées pour le traitement des désordres hépatiques, et qui sont susceptibles d'offrir le soulagement significatif.

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est d'évaluer *in vivo* l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique de feuilles de *clematis flammula* et ceci par l'évaluation de son pouvoir antioxydant.

I. Le stress oxydant

Dans des circonstances physiologiques normales, les cellules produisent en permanence des espèces réactives oxygénées (ERO). Le contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination de ces ERO est parfaitement maîtrisé par le système de défense. Lorsque cet équilibre est rompu en faveur des radicaux libres, il survient un stress oxydant (**Christophe, 2011**). Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production excessive des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydants (**Valko et al., 2007**).

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant, ce dernier survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (figure 1) et cela par une production excessive de ces molécules réactifs ou une insuffisance des mécanismes antioxydants (**Christophe, 2011**), ce qui conduit à l'altération des biomolécules comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques (ADN) et glucides. Toutes ces altérations est à l'origine de déclencher plusieurs maladies tels que le cancer (**Rahman, 2000**).

I.1. Les radicaux libres

I.1.1. Définition

Les radicaux libres (RL) sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction d'oxydoréduction ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (**Asmus et Bofacic, 2000**).

I.1.2 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'appellation espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène et certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante. (**Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman, 2004**)

Le tableau suivant montre quelques ERO, leurs structures et leurs cibles :

Tableau N° 01 : Les différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	Structure chimiques	Rôles physiologique	Cibles biologique
$^1\text{O}_2$ (oxygène singulet)	$\overset{\cdot}{\text{O}} :$	Limite l'induction de l'expression des gènes dans les fibroblastes dermiques humains par les rayons ultraviolets A (UVA) (Klotz et al., 1999)	Les lipides dans la peroxydation lipidique L'ADN (Flourie et al., 2006).
$\text{O}_2^{\cdot -}$ (l'anion superoxyde)	$\cdot\text{O}-\text{O} :$	Intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions (Milane et al., 2005)	Attaquent l'ADN, protéines et lipids (Flourie et al., 2006).
H_2O_2 (le peroxyde d'hydrogène)	$\text{H} : \text{O}-\text{O} : \text{H}$	Utilisé par la myéloperoxydase pour produire de l'hypochlorite qui permet de tuer les micro-organismes pathogènes (Goudable et al., 1997)	Il cible toutes les molécules biologiques (Halliwell., 2006)
OH^{\cdot} (le radical hydroxyle)	$\text{H} : \text{O}^{\cdot}$	Initiateur dans l'auto-oxydation lipidique (Milane et al., 2005).	Attaquent toutes les molécules biologiques (Valko et al., 2007)
ROO^{\cdot} (le radical hydroxyle)	$\text{R}-\text{O}-\text{O}^{\cdot}$	Produit de la deuxième étape de la peroxydation lipidique (Rock, 2003).	Attaque les protéines (Halliwell., (2006). Action sur les lipides (Valko et al., 2006).
RO^{\cdot} (le radical alcoxyle)	$\text{R}-\text{O}^{\cdot}$	Provoque la peroxydation lipidique (Rock, 2003)	Alter les lipides (Valko et al., 2007)

I.2. La source des radicaux libres

I.2.1. Sources exogènes

Les radicaux libres peuvent être produit en excès a cause des agents externes environnementaux, comme des pollutions diverses, contaminations par des métaux lourds, des produits chimiques tel que les xénobiotiques (toxiques, médicaments) ou certaine carences nutritionnelles (**Priyadarsini, 2005**).

De nombreux médicaments peuvent induire des atteintes hépatiques de présentations cliniques très variables, qui dans les cas les plus sévères peuvent conduire a une destruction totale ou entraîner le décès du patient (**Bannwarth et al., 2000**).

a/ Exemple de médicament Le paracétamol

Les médicaments, comme tout xénobiotique, produisent après leur métabolisme des métabolites actifs qui sont normalement neutralisés et éliminés par l'organisme sous forme soluble dans les urines et la bile. (**Aouacheri et al., 2009**)

Le paracétamol (ou acétaminophène) est le N-acétyl amino phénol (APAP), découvert il y a plus d'un siècle, est l'antalgique et l'antipyrétique le plus utilisé au monde. Il est sans danger lorsqu'il est pris à des doses thérapeutiques, mais un surdosage peut entraîner une grave voire mortelle hépatotoxicité (**Bannwarth et al., 2000**).

Tableau N°02 : Caractéristiques Physicochimiques du Paracétamol (Mac Kellar, 1991).

Formule brute	Masse molaire	PKa	Solubilité	DL50
C ₈ H ₉ NO ₂	151,1626 ± 0,0078 g/mol	9,5	Soluble dans l'acétone, l'éthanol, le méthanol. Beaucoup plus soluble dans l'eau chaude	2 400 mg/kg Rat oral. 800 mg/kg Souris 825 mg/kg Chien

L'intoxication par le paracétamol est devenue la plus fréquente des intoxications accidentelles et représente l'une des formes les plus courantes d'intoxication par les produits pharmaceutiques, pouvant conduire à une nécrose hépatique (Aouacheri, 2009).

b/ Mécanismes cellulaires de la toxicité hépatique du paracétamol

En cas d'administration de faibles quantités de paracétamol, plus de 90% du médicament sont conjugués en composés non toxiques par sulfo-et glucoro-conjugaison qui sont ensuite éliminés par le rein (Zimmerman et Maddrey, 1995).

La fraction du paracétamol non conjuguée va être métabolisée par différents systèmes enzymatiques hépatiques oxydatifs, principalement le cytochrome P 450, cytochrome majeur du métabolisme de l'éthanol. Le résultat de cette oxydation est la formation de métabolites intermédiaires hautement réactifs au premier rang desquels figure la N-acétyl p-benzoquinone imine (NAPBQI). En cas de surdosage en paracétamol, on assiste à une production accrue et rapide de NAPBQI qui dépasse les capacités de conjugaison au glutathion (Iouvet et al., 2006). Conduisant à la formation de liaisons covalentes entre ce réactif électrophile (NAPBQI) et les protéines hépatocytaires ainsi qu'à un stress oxydatif et une nécrose hépatocellulaire. L'attaque de la mitochondrie par la NAPBQI et la déplétion du glutathion réduit mitochondrial sont des événements précoces de l'hépatotoxicité du paracétamol (Jones, 1998).

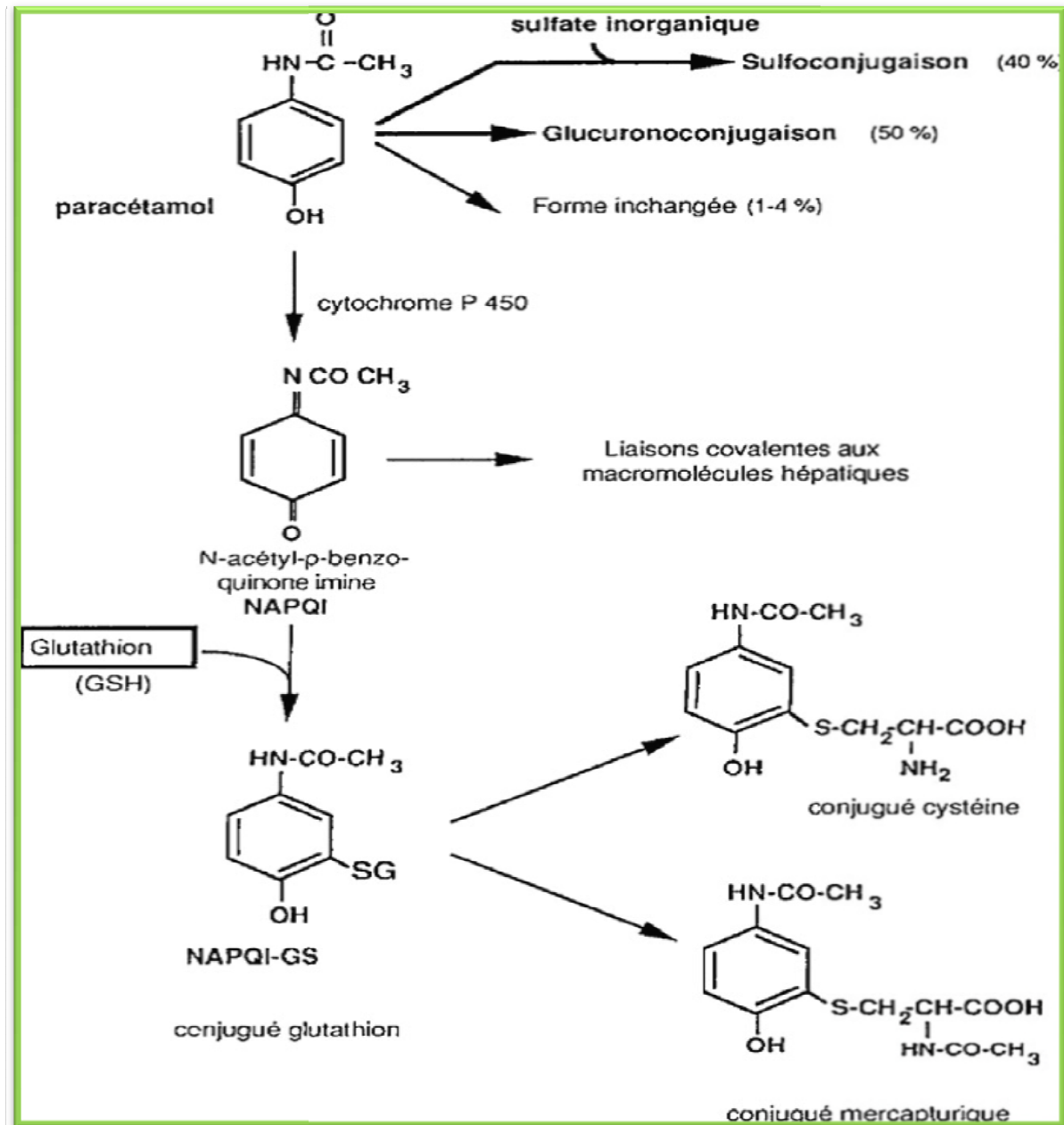


Figure N° 01: Métabolisme du paracétamol (Jones, 1998).

Par ailleurs, des phénomènes autres que la production de métabolites réactifs ont été identifiés dans la survenue de la toxicité hépatique du paracétamol. L'oxydation du paracétamol produit en effet des espèces réactives de l'oxygène pouvant entraîner une carbonylation des protéines à l'origine de leur dégradation. Le rôle des espèces réactives de l'oxygène est souligné par le fait que la surexpression chez la souris d'enzymes protégeant contre ces espèces réactives de l'oxygène entraîne une protection presque totale contre les lésions hépatiques du paracétamol (Durairaj *et al.*, 2007).

I.2.2. Sources endogènes

a/ Chaîne respiration de la mitochondrie

La mitochondrie est la source majeure de la production cellulaire de l'anion superoxyde, principalement du à la réduction partielle de NADH par le complexe I et III (Roede et Jones., 2010). Elle produirait en effet 90% des ERO cellulaires (Balaban et al., 2005).

b/ Les enzymes impliquées dans les réactions redox

Plusieurs systèmes enzymatiques produisent les ERO au cours des réactions biochimiques, Le cytochrome P450 peut réduire directement O₂ en O₂^{•-} en causant le stress oxydatif (Goeptar et al., 1995).

Le cytochrome P450 peut aussi prendre une voie alternative appelée "cycles redox" dans lequel un substrat accepte un électron du cytochrome P450 et le transfère à l'oxygène générant l'anion superoxyde (Beckman et Ames, 1998).

I.3. Les conséquences moléculaires de stress oxydant

La formation des ERO entraîne l'oxydation des lipides membranaires, la dégradation de macromolécules telles que l'ADN, les protéines et la diminution de performance de système immunitaire (Jacques., 2003).

I.3.1. La peroxydation lipidique

Les membranes cellulaires constituent les premières cibles pour les radicaux libres circulants. Elles y sont particulièrement sensibles à cause de leur richesse en acides gras et la susceptibilité est proportionnelle à leur degré d'insaturation. (Jacques et al., 2008)

I.3.1.1. Mécanisme général de la peroxydation des lipides

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enclenchement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes. (Genot et al., 2010)

➤ **Initiation**

En présence d'un initiateur comme le radical OH, les lipides insaturés (LH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre lipidique (L[•]) ou radical alkyl (figure) (Fagali et al., 2009).

➤ **Propagation**

Radicaux libres formés dans la première étape (L[•]) fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxy instables (LOO[•]) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes (figure) (Fagali et al., 2009).

➤ **Terminaison**

Tous les radicaux formés dans les étapes précédentes réagissent entre eux et donnent un produit non radicalaire (figure) (Galleano et al., 2010).

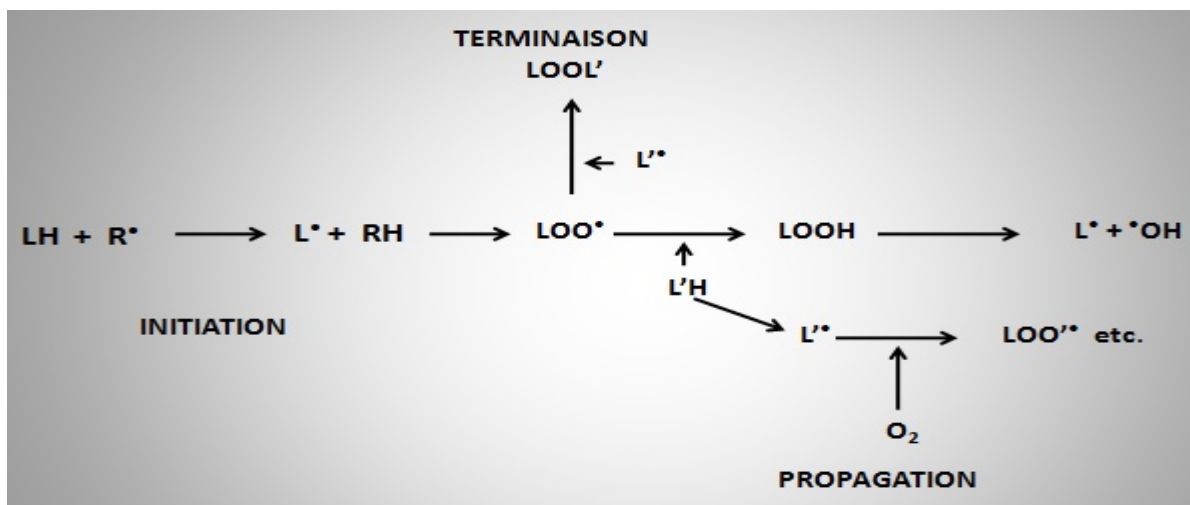


Figure N° 02 : schéma général de l'oxydation des lipides (Michel et al., 2008).

I.3.2. L'oxydation des protéines

Les protéines sont sensibles aux attaques radicalaires surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) et des ponts disulfures. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leur propriétés et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Friguet, 2003 ; Jung et al., 2007).

I.3.3. L'oxydation de l'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les ERO (**Pasquier, 1995**). Les dommages oxydatifs de l'ADN résultent de l'interaction de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et du radical hydroxyle (OH). Cinq classes principales de dommages oxydatifs par (OH \cdot) peuvent être générées ; les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Baudin, 2006 ; Therond, 2006 ; Valko et al., 2007**).

II. Système de défense antioxydant

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ERO est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autre substrat oxydables et ainsi retarder ou empêcher leur oxydation (Comhair et Erzurum, 2000) (Droge, 2002) (Adil *et al.*, 2007, Nagababu *et al.*, 2010).

Pour piéger ces ERO, la cellule dispose d'un arsenal de défenses antioxydants, à la fois endogène par le biais de système enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase,...), et exogènes en utilisant des composés alimentaires (vitamine C, vitamine E, flavonoides, caroténoïdes,...etc.)(Friguet, 2003).

II.1. Les antioxydants enzymatiques

Le système enzymatique (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) qui intervient dans les mécanismes individuels de défense de l'organisme contre les radicaux libres présente un fonctionnement en chaîne, est considéré comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Aurousseau, 2002).

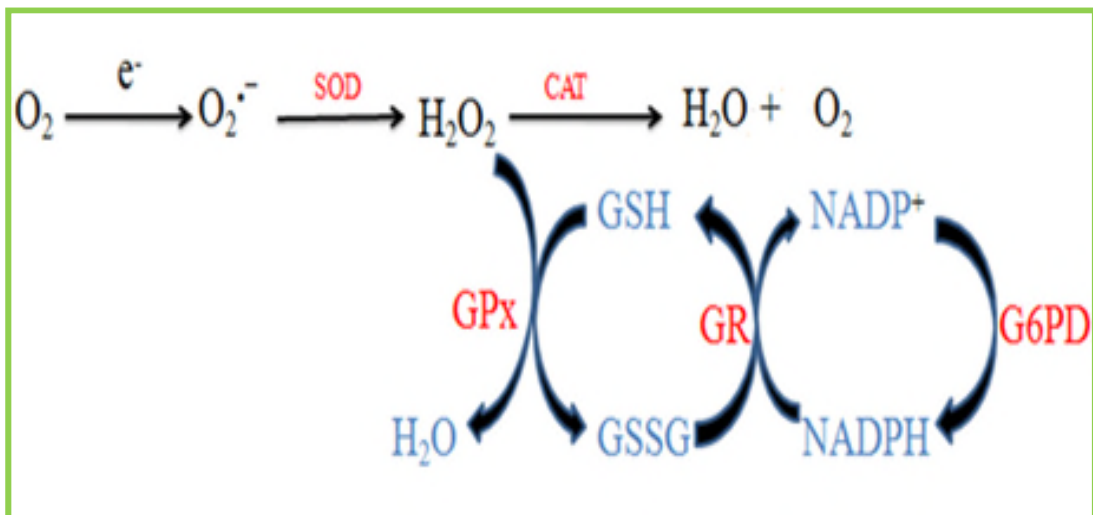
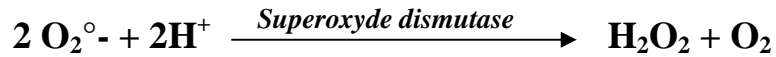


Figure N°03 : Le mécanisme réactionnel des trois enzymes impliquées dans la détoxification active (Marfak, 2003).

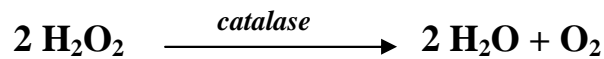
II.1.1. superoxyde dismutase

Sont des métalloprotéines, qui assurent l'élimination de l'anion super-oxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (El-Beshbishy et al., 2011).



II.1.2. La catalase

C'est une enzyme qui agit en synergie avec la superoxyde dismutase (SOD) en éliminant le H_2O_2 le transformant en eau et oxygène (El-Beshbishy et al., 2011).



II.1.3. La glutathion réductase/ peroxydase

La glutathion réductase est très largement distribuée dans les tissus, lorsqu'elle est activée, elle catalyse la réduction du glutathion disulfure (GSSG) en glutathion réduit (GSH) avec le NADPH comme donneur de protons (Alpert, 2005).

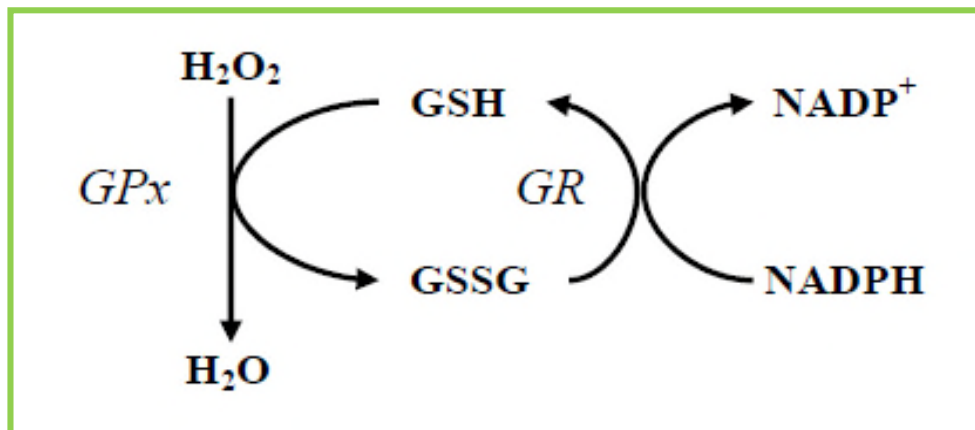
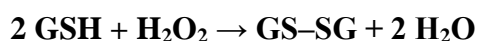


Figure N°04 : Elimination du H_2O_2 par les réactions enzymatiques combinées de la GR et GPx.

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine ayant fonction d'enzyme impliqué dans l'élimination d'une grande variété d'hydroperoxydes (R-OOH) en plus de l'H₂O₂ (Deng et al., 2009). GSH représente le monomère réduit du glutathion, et GS-SG représente le disulfure de glutathion oxydé. La GPx favorise et accélère grandement la réaction suivante :



Ce qui forme finalement un pont entre deux cystéines, appelé pont cystine ou pont disulfure et une molécule d'eau. cela permet de lutter contre les peroxydes organiques (Lee et al., 2006). Il existe différents GPxs séléno-dépendantes et indépendantes qui sont montrés dans le tableau suivant :

	<i>GPX₁</i>	<i>GPX₂</i>	<i>GPX₃</i>	<i>GPX₄</i>	<i>GPX₅</i>	<i>GPX₆</i>
Nom	GSH-Px	GSH-Px-GI	GSH-PX	PH-GSH-Px	Ep-GSH-Px	
Expression	Ubiquiste	Estomac Intestin Foie	Rein Poumon Epididyme	Testicule Spermatozoïde Foie Rein	Epididyme Spermatozoïde	Corps ciliaire
Localisation	Cytosol Mitochondrie	Cytosol	Sécrétée Cytosol	Mitochondrie nucléaire	Sécrétée	
Mass Moléculaire (kDa)	21	22	22	19	24	
Polymérisation	4	4	4	1	ND	
Séléno-cystéine	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON

Tableau N°03 : Différentes caractéristiques des GPxs. ND : non déterminée

II.2. Les antioxydants non enzymatiques

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apporté par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toutes atteintes de l'intégrité cellulaire (Koechlin-Ramonatsco, 2006).

II.2.1. Les vitamines

Les vitamines tel que la vitamine E et C, sont des molécules organiques requises en faible quantité indispensable pour le fonctionnement des voies métaboliques des êtres vivants. Elles agissent sous forme de coenzyme (**Barati et Marechal., 2008**).

II.2.2. Les oligoéléments

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydants. D'autres constituants de l'alimentation, comme le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium). La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en acides aminés tels que la méthionine (**Roussel, 2009**).

II.2.3. Le glutathion

II.2.3.1. Définition

Le glutathion est un tripeptide non protéique formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine présent chez tous les eucaryotes et restreint aux cyanobactéries et protéobactéries chez les procaryotes. Il est le principal antioxydant intracellulaire ou il est présent essentiellement sous forme réduite (GSH) (**Alpert, 2005**).

Cette molécule ubiquitaire joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques grâce à la présence d'un groupement thiol qui, *via* son oxydation ou réduction, concourt à son activité biologique (**Parisy et al., 2007**). Bien que le glutathion ait été initialement décrit comme molécule antioxydant majeure, d'autres rôles ont été découverts dans divers processus cellulaires. Chez les animaux, plus particulièrement chez l'homme, le glutathion est impliqué, en plus de la détoxification de molécules au niveau du foie, dans la modulation de l'inflammation, de l'immunité et son administration est utilisée dans le

traitement de certaines maladies comme le diabète, la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (Alpert, 2005).

II.2.3.2. Structure de glutathion

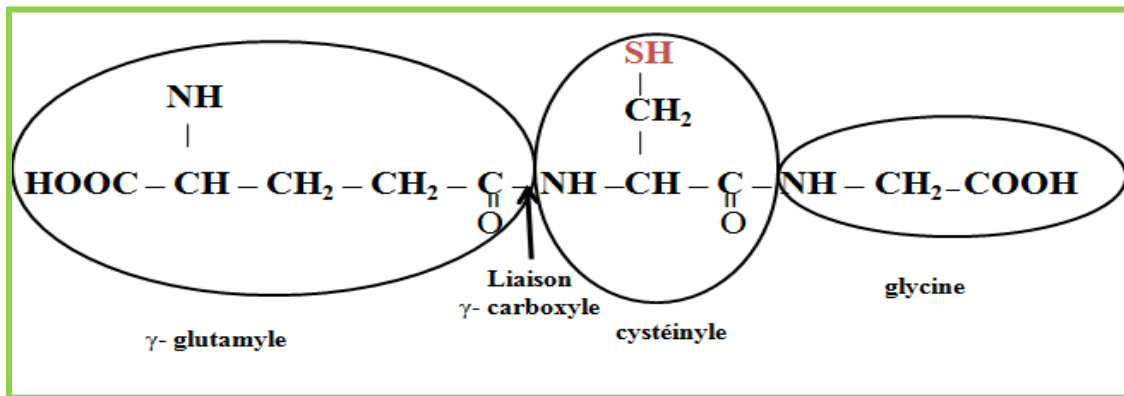


Figure N°05 : La structure chimique du glutathion (Meuwly *et al.*, 1993)

II.2.3.2. Biosynthèse du glutathion

La formation du glutathion n'emprunte pas la voie classique de la synthèse protéique. Chez les animaux comme chez les végétaux, sa biosynthèse est régie par deux étapes enzymatiques ATP-dépendantes. Premièrement, la glutamate-cystéine ligase (GSH1) catalyse la formation de la liaison peptidique entre le groupement γ -carboxyle du glutamate et la cystéine. Puis, la glutathion synthétase (GSH2) forme le glutathion par addition de la glycine sur la γ -glutamyl-cystéine (γ -EC) (Meister et Lester (1995).

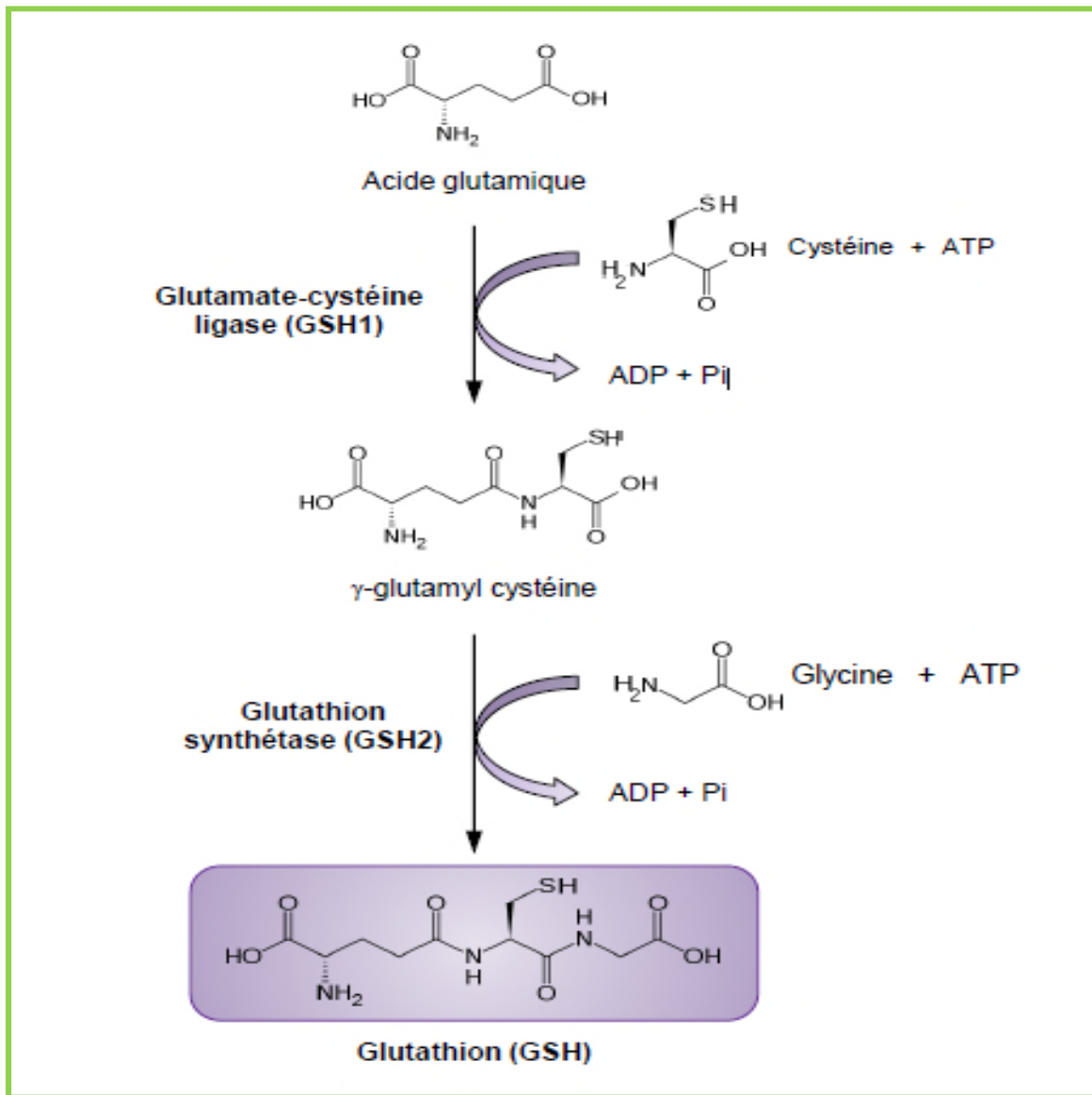


Figure N°06 : Biosynthèse du glutathion (Meister et Lester, 1995).

II.2.3.4. La régulation de biosynthèse de glutathion

Bien que le glutamate et la cystéine régulent la biosynthèse du glutathion de part leur disponibilité, la régulation de la biosynthèse se fait préférentiellement par feedback négatif au niveau de la première étape grâce à une inhibition compétitive du glutathion vis-à-vis de GSH1 (Meister et Lester, 1995). De plus, il a été montré que GSH1 était régulée à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Parisy *et al.*, 2007).

II.3. Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites végétaux secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements

hydroxyles. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines ou la maturation des fruits (Tsao., 2010).

L'intérêt de ces composés pour l'organisme est du à leurs propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, antimutagènes et anticancéreuses (Singh et al., 2007). Selon Bruneton (2008), les polyphénols sont divisés en plusieurs classes les plus représentés étant les acides phénols, les flavonoïdes, et les tannins.

II.3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone et un groupement carboxylique. Ils sont divisés en deux sous-classes les acides benzoïques et les acides cinnamiques (Bahorun, 1997).

II.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus, jeune*) sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux (D'archivio et al., 2007). Ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Gomez et al., 2006; Xiuzhen., 2007). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Greenberg et Yao, 2004)

II.3.4. Les tannins

Les tannins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique ainsi que leur degré d'oxydation (Bruneton, 2008).

II.4. La silymarine

La silymarine est un flavonolignan extrait de la plante chardon-marie (ou chardon argente). La concentration de la silymarine est plus élevée dans le fruit, les graines et les feuilles (**Flatland 2003**).

II.4.1. Structure et principaux caractères physico-chimiques

La silymarine contient quatre isomères flavonolignans : la silibinine (50-60%), l'isosilibinine (5%), la silydianine (10%), et la silycristine (20%). Parmi ceux-ci, l'isomère le plus biologiquement actif est la silibinine.

Les propriétés hépatoprotectrices de la silymarine sont bien documentées bien que ses mécanismes d'actions ne soient pas encore clairement explicités. Elle agit de façon directe sur les hépatocytes, rendant plus difficile l'absorption de toxines, stimulant leur élimination et favorisant la régénération du tissu hépatique (**Flatland 2003**). Tout comme d'autres flavonoïdes, la silymarine a également de puissantes propriétés anti-radicalaires, empêchant ainsi certains produits toxiques de causer des lésions au foie par l'accélération de la dégradation des produits, ou le blocage direct des sites de liaison de la toxine ou des récepteurs (**Willard 2005**). La silybine neutralise efficacement différents radicaux libres incluant les radicaux hydroxyle et peroxyde ainsi, elle augmente la superoxyde dismutase et les concentrations sériques en glutathion et glutathion peroxydase dans les cellules et prévient l'oxydation des membranes hépatiques et maintient la fluidité membranaire (**Center 2004**).

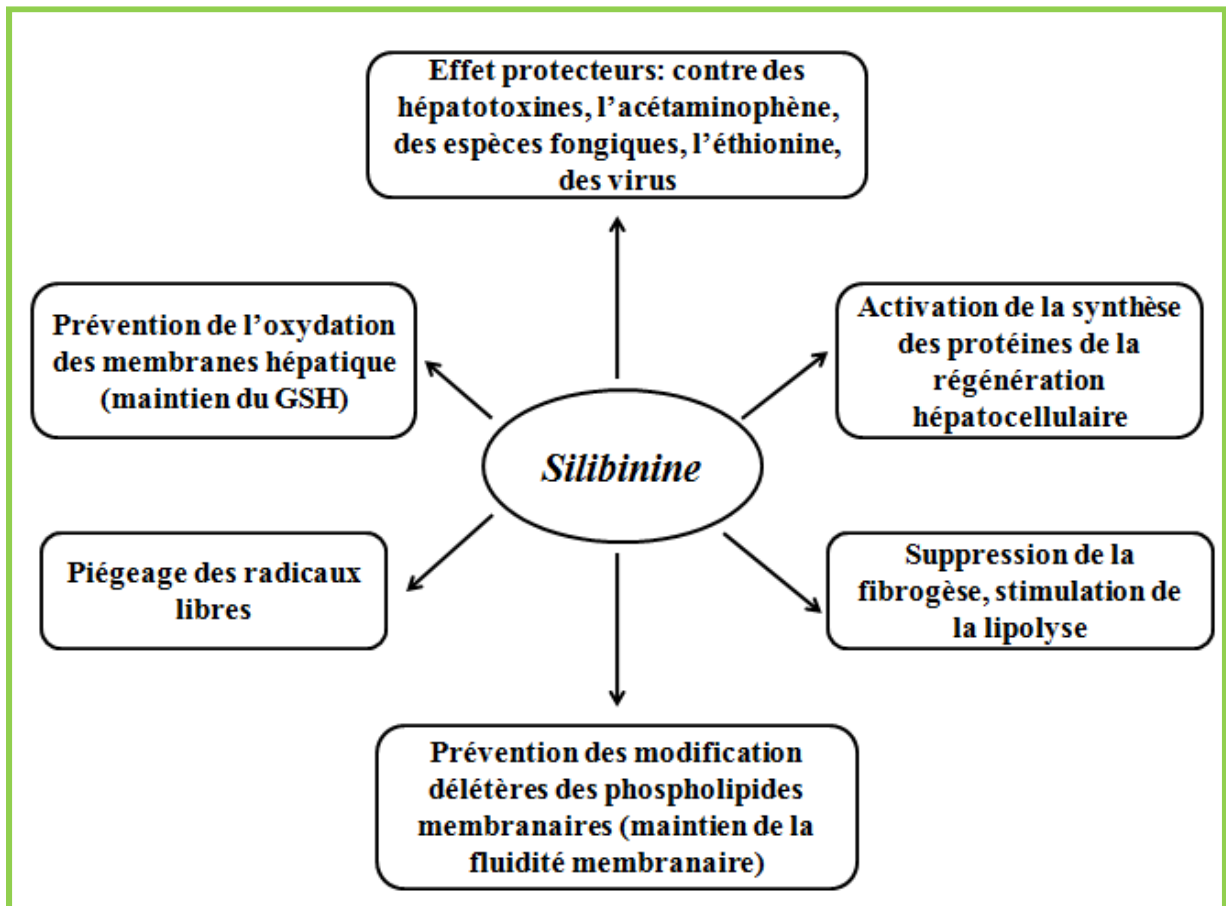


Figure N°08 : Diagramme récapitulatif des effets favorables de la silibinine chez les patients Présentant une affection hépatobiliaire (Center 2000).

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel de laboratoire

- Centrifugeuse (SIGMA 2-16PK)
- La balance (RADWAG AS220/C/2)
- Agitateur et voltex (VELP SCIENTIFICA)
- Spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1800)
- Broyeur (KIKA laborotechnik M20)
- PH mètre (HANNA instruments pH 209)

III.2. Matériel végétales

Notre étude a été réalisée sur l'extrait éthanolique d'une plante largement utilisée en médecine traditionnelle, dont nous avons utilisé les feuilles, il s'agit de *Clematis flammula*.



Figure N°09 : Les feuilles de *Clematis flammula* (Originale)

III.2.1. Description botanique

Clematis flammula est une plante vivace à tige ligneuse grimpant dans les buissons et arbrisseaux des garrigues et des maquis des régions méditerranéennes, possèdent des feuilles à saveur brûlante (Baba Aissa, 2000). Cette plante est d'une taille qui varie entre 2 à 3 mètre de longueur, ses feuilles sont bipennées 3 à 7 folioles assez petits, ovale ou lancéolées, fleurs blanches à panicules lâche (Bernard, 1997).

Tableau N°04 : Classification taxonomique de *Clematis flammula* (Bernard, 1997)

Rang taxonomique	Nomenclature
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Ranunculales
Famille	Ranunculaceae
Genre	Clematis
Espèce	<i>Clematis flammula</i>
Nom commun	Clématite brûlante
Nom vernaculaire berbère	Azenzu ; Zenzou
Nom vernaculaire arabe	Nard barda ; Yasmine bari ; Sebenq

III.2.2. Usage et propriétés

Clematis flammula appelé clématite odorante (Marc et al., 2008) est utilisées pour traiter beaucoup de maux spécifiquement les arthrites et les brûlures superficielles et même le cancer. (Atmani et al., 2011). Le genre clematis est aussi utilisé comme diurétique, diaphorétique, stimulant, rubéfiant et analgésique. Cette plante sert aussi à soigner en application externe les furoncles et les mauvaises plaies (chawla et al., 2012).

III.3.Méthodes

- **La récolte**

Les feuilles de *C. flammula* ont été récoltées en mai- juin de l'année 2014 dans la forêt de Tizi Neftah, commune d'Amizour situé à l'est de Bejaia. La plante est préalablement identifiée dans le département de botanique à l'université de Bejaia (Atmani et al., 2009).

- **Broyage et tamisage**

Les feuilles de *C. flammula* ont été séchées à une température ambiante dans un endroit ombragé et aéré, par la suite, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre $<63\mu\text{m}$.

- **Extraction**

Dans l'expérience présente, l'extraction des feuilles de *clématis flammula* a été évaluée selon le protocole d'extraction d'Atmani et al (2009).

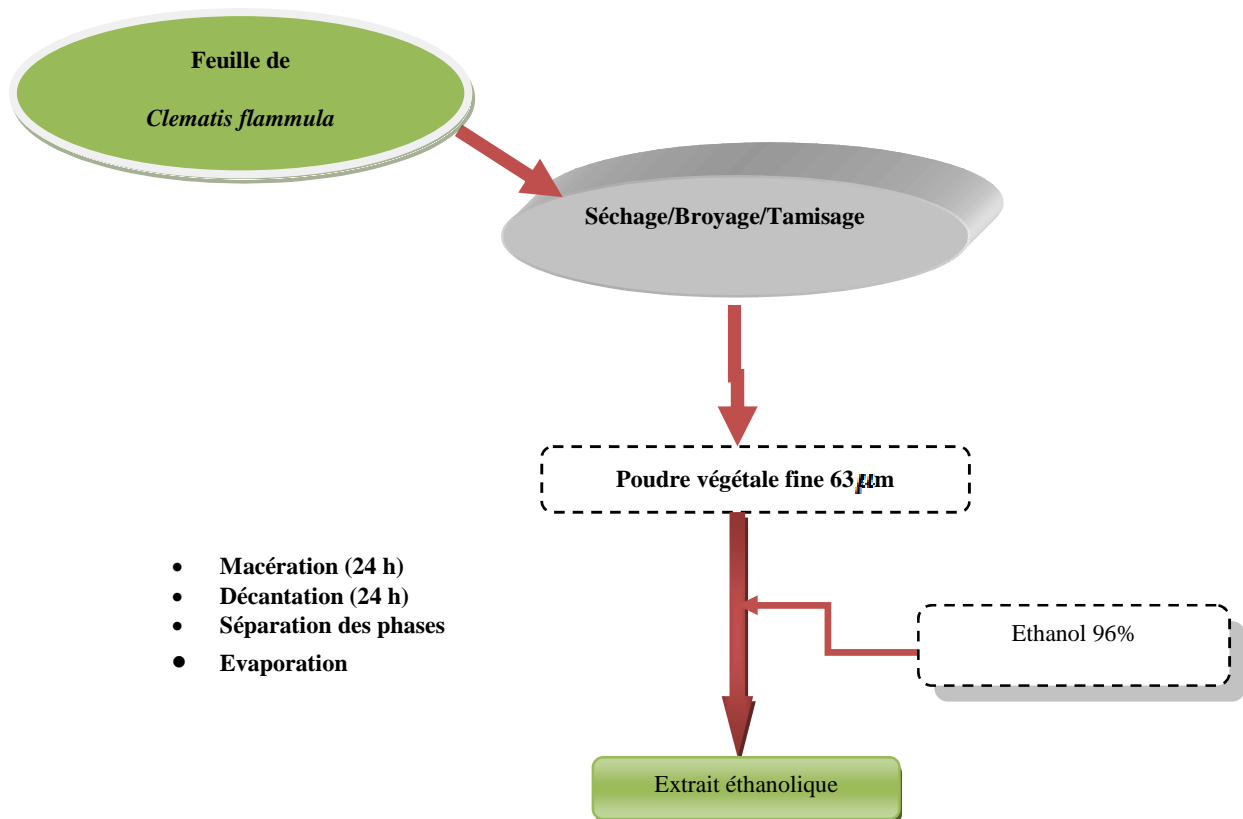


Figure N° 10 : schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Atmani et al., 2009).

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

P₁ : Poids d'extrait après évaporation (g).

P₀ : Poids vide du cristalliseur ou la boîte de pétri (g).

E : Poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).

III.4. Matériel animal et conditions d'élevage

Pour l'évaluation de l'activité antioxydant de l'extrait *Clematis flammula*, des souris males de type swiss albinos de poids corporel variant entre (20-30g), âgés de 5 semaines ont été utilisées. Ces souris proviennent du centre d'élevage de l'Institut Pasteur d'Alger (**Figure1**).

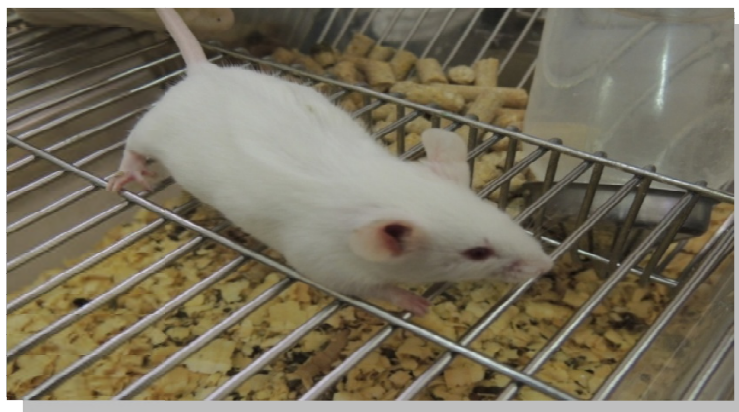


Figure N° 11 : Photographie d'une souris albinos (Originale)

Les animaux ont été repartis en sept groupes. Ils ont accès libre à l'eau et à la nourriture (aliment bouchon), à température ambiante variant entre (23 ± 2 C°), avec une photopériode de 12 heures/24. Les différents tests ont été réalisés au sein de laboratoire d'expérimentation animale de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa.

III.4.1. Traitement

Après une période d'adaptation, un effectif de Soixante souris à été aléatoirement réparti en sept groupes de 8 animaux chacun et les différents traitements ont été administrés après un jeun de 2heures pendant 5 jours consécutifs par voie intra-gastrique (figure A). La toxicité à été induite par une administration intra-péritonéale (IP) (figure B)

d'une dose unique de paracétamol (500 mg/kg). Le tableau 1 décrit les différents traitements effectués.

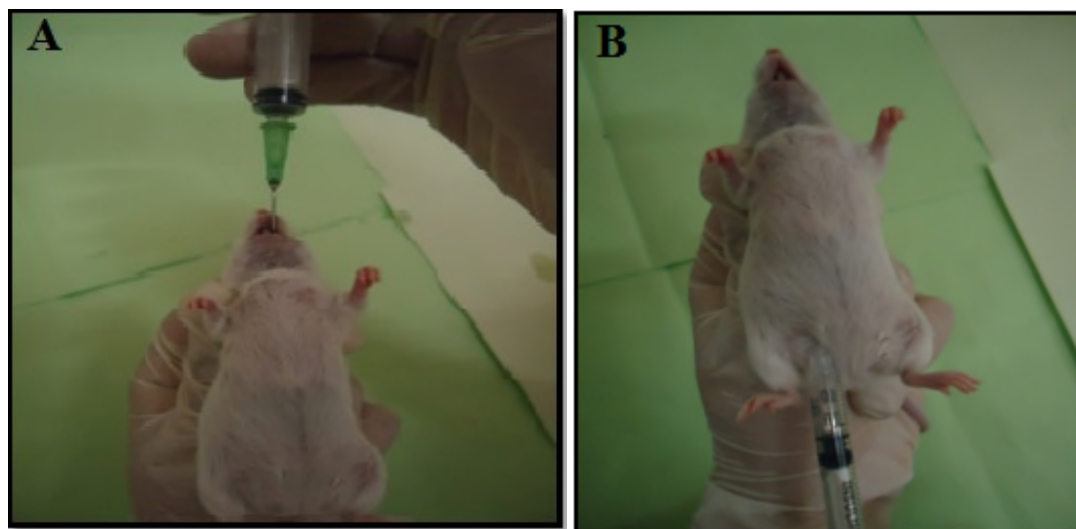


Figure N°12 : Traitement des souris (A) par voie intra-gastrique, (B) par voie (IP).

Tableau N°05: Répartition des lots selon le traitement effectués.

N° de lots	Lots	Traitements
1	Control(-) (eau+CMC)	Eau + CMC par gavage (IG)
2	Control(+)(CMC+paracétamol 500mg/kg)	CMC par gavage et paracétamol par (IP)
3	Control 100 (Eau+extrait éthanolique 100mg/kg)	Eau + extrait par gavage
4	Contro 1200 (Eau+ extrait éthanolique 200mg/kg)	Eau + extrait par gavage
5	Test 100 (Paracétamol 500mg/kg+extrait éthanolique 100mg/kg)	Paracétamol par (IP) + extrait par gavage
6	Test 200 (Paracetamol500mg/kg + Extrait éthanolique 200mg/kg)	Paracétamol par (IP) + extrait par gavage
7	Standard(sylimarine100mg/kg+ Paracetamol 500mg/kg)	Sylimarine par gavage+ paracétamol par (IP)

Protocole

24 heures après le dernier gavage, les souris ont été disséquées et les foies ont été rapidement prélevés, rincés soigneusement dans de l'eau physiologique puis ont été pesés et coupés.

Une fois les foies récupérés, pesés et broyer avec du tampon KCL-EDTA à PH=7.4 avec un rapport de 1g pour 10 ml à chaque homogénat de foie, ils ont été centrifugés à 10000 tours pendant 20 minutes à 4°C afin de récupérer les surnageant.

Les surnageants ont été maintenue à -80°C pour l'utilisation lors d'évaluation des tests biochimique.

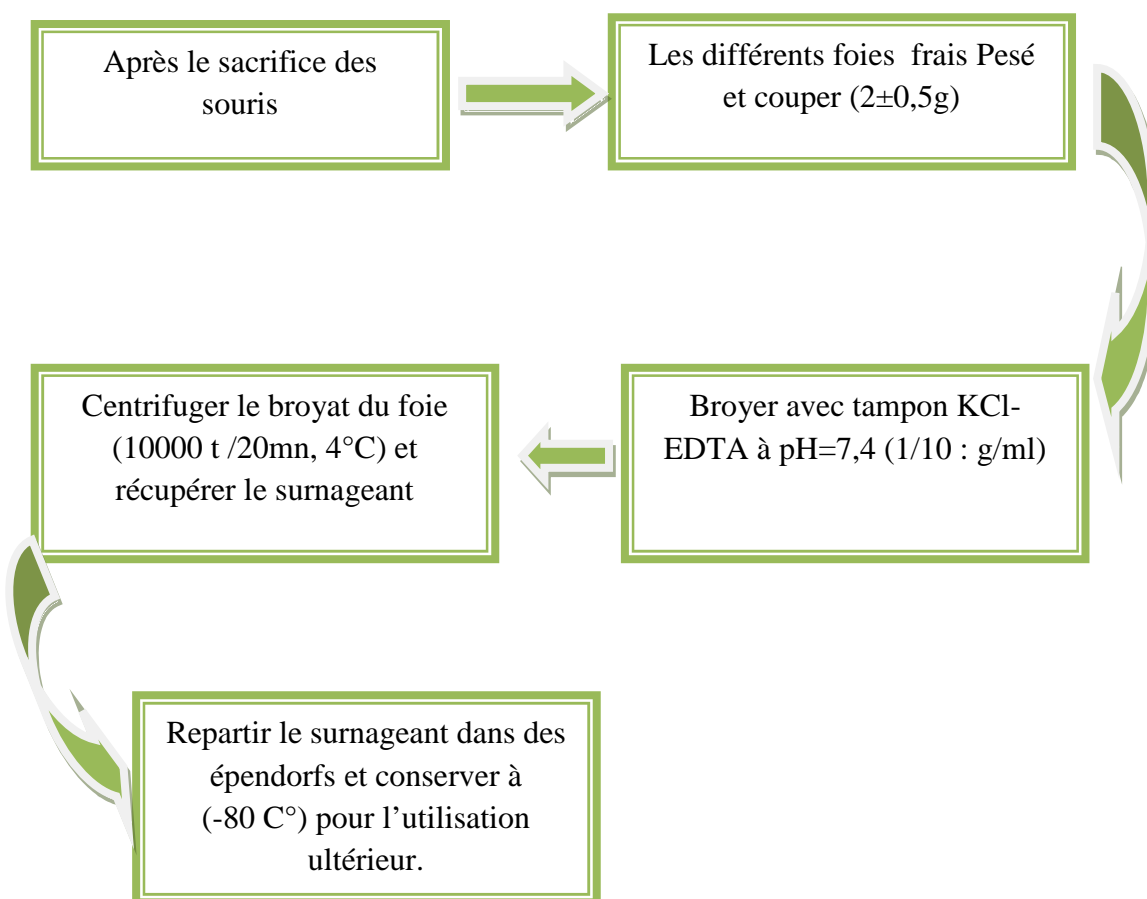


Figure N° 13: Les étapes de l'isolement et de traitement des différents foies

III.5. Evaluation de l'activité de glutathion (GSH) *in vivo* sur des souris albinos

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) qui repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH). Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm, selon la réaction suivante :

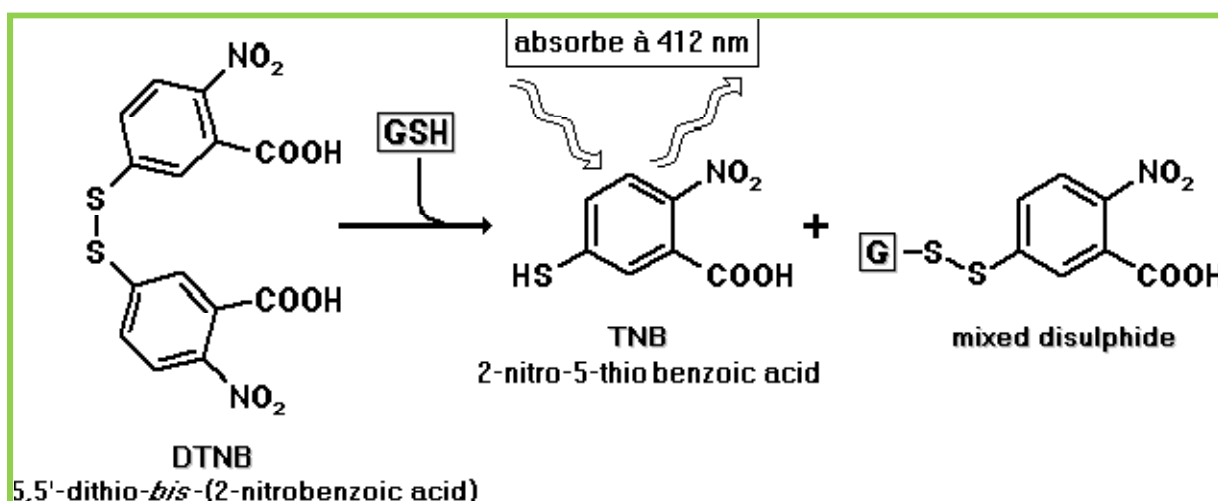


Figure N°14: Réaction d'Ellman entre le Glutathion et le DTNB (Aouacheri et *al.*, 2009).

Pour ce dosage, 10 µl de surnageant (fois) sont mélangés avec 1840 µl de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0,2 M, pH 8) et 250 µl de DTNB (0,01 M).

L'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec 10 µl de tampon KCL-EDTA au lieu de 10 µl de surnageant (foie).

Les concentrations sont exprimées en µmol/mg de protéine. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec le glutathion réduit (Aouacheri et *al.*, 2009).

III.5.1. Préparation de la courbe (gamme) d'étalonnage

Afin de réaliser la courbe d'étalonnage, des quantités croissantes de glutathion (0 → 100 µl) à partir d'une solution de GSH/ KCL-EDTA 2 mg/ml (glutathion 2mg/ml dans KCL-EDTA) à été répartie dans 7microtubes.

- Ajouter du tampon KCL-EDTA pour obtenir un volume final de 100 μ l.
- Mélanger et mesurer la DO à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

III.5.2. Évaluation de la teneur des protéines dans l'homogénat du foie

La mesure de la concentration des protéines dans l'homogénat a été réalisée par un dosage spectroscopique suivant la méthode de **Bradford et al (1976)**. Le principe de cette méthode est basé sur la liaison du Bleu de Coomassie G-250 avec les liaisons peptidiques; ce qui entraîne un changement du maximum d'absorption du colorant de 465 nm à 595 nm. Une aliquote de l'extrait est additionnée à 5mL de la solution de Bradford. La coloration se développe dans un temps minimum de 5 min mais ne dépassant pas 30 min. L'absorbance est lue à 595 nm contre un blanc. La gamme étalon a été réalisée avec des concentrations croissantes de la protéine (BSA : sérum d'albumine bovin), les résultats ont été exprimés en mmol/mg de protéines.

III.5.3. Analyse statistique

Les résultats des tests *in vivo* ont été exprimés en tant que des moyennes \pm SEM (n=8). Les données expérimentales ont été analysées avec un logiciel Graph Prism version 5. One -way ANOVA, a été utilisé comme traitement statistique. Les différences sont considérées comme significatives si p est inférieur à 0.05, très significatives si $p < 0,01$ et hautement significatives si $p < 0,001$ comparativement au témoin.

Résultats

Evaluation du taux du glutathion hépatique réduit

Le taux de glutathion des foies des souris des différents lots sont représentés dans la figure suivant :

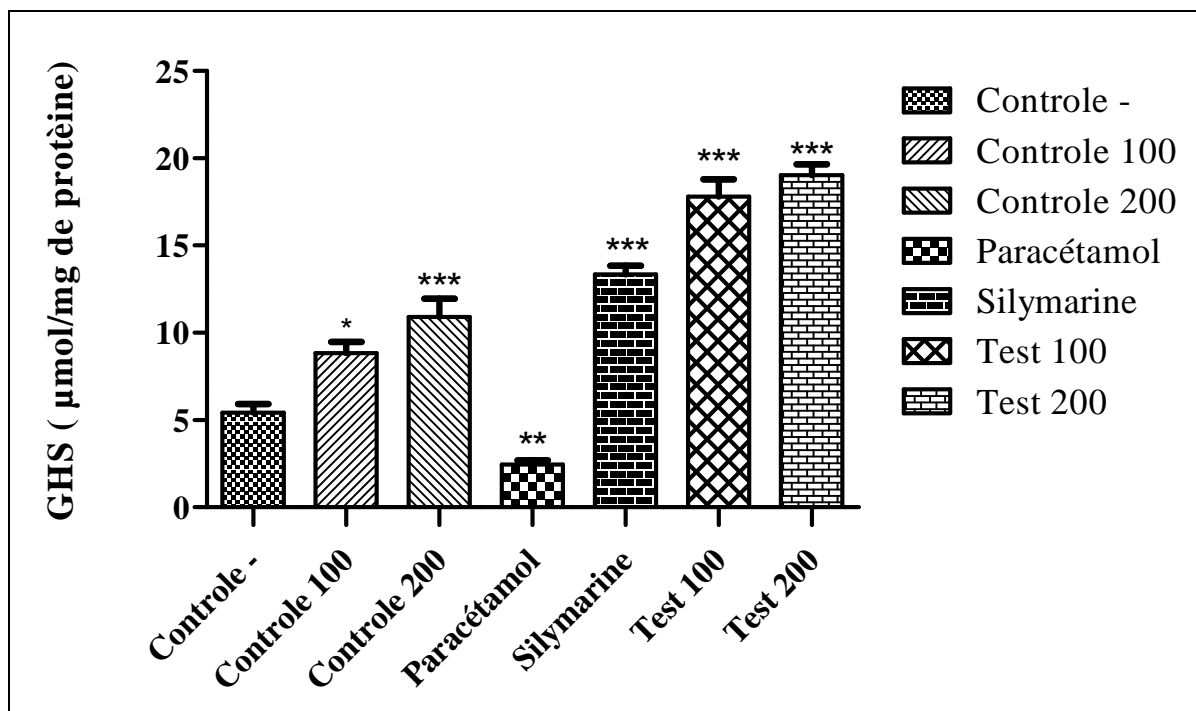


Figure N°15 : Représentation graphique des différentes concentrations du glutathion des foies. Control- : Contrôle négatif (CMC), Contrôle 100 : Extrait de *Clematis Flamula* à 100mg/kg, Contrôle 200: Extrait de *Clematis Flamula* à, 200mg/kg. Paracétamol : Paracétamol 500mg/kg. Test 100 et Test 200 : Extrait de *Clematis Flamula* à 100et 200 respectivement et paracétamol. Silymarine : Silymarine à 100mg/kg. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/mg}$ de protéine. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n=8).

Comme on peut le constater sur la figure (N°13) le traitement des souris par la dose toxique du paracétamol 500mg/kg a entraîné une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration du glutathion réduit dans le foie ($2,45 \pm 0,60 \mu\text{mol/mg}$ de protéine) comparativement au lot témoin.

Un changement très significatif du taux du glutathion hépatique réduit est signalé au niveau des lots intoxiqués par le paracétamol et traités avec la silymarine et les différentes doses de l'extrait éthanolique de *Clematis Flammula* pour les quelles des valeurs de $13,35 \pm 1,18$ et $17,80 \pm 2,42$ et $19,02 \pm 1,54 \mu\text{mol/mg}$ de protéine ont été enregistré respectivement comparativement au lot intoxiqué par le paracétamol et non traité dont le taux été de $2,45 \pm 0,60 \mu\text{mol/mg}$ de protéine.

Discussion :

La protection contre les effets délétères induits par la peroxydation lipidique s'effectue grâce aux systèmes de défense antioxydant enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, glutathion réductase) et non enzymatiques (glutathion, vitamines C et E) (Cacciatore et al., 2010 ; Djordjevi et al., 2009).

Le glutathion (GSH) est considéré comme la molécule non protéique, possédant un groupement thiol, la plus abondante dans les cellules des mammifères. Le GSH joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose, en plus d'un rôle protecteur contre les effets toxiques de la peroxydation lipidique, il est connu pour son puissant pouvoir antioxydant. Le glutathion représente le premier système de défense antioxydant non enzymatique (Yue et al., 2003), au cours d'un stress oxydatif, les concentrations en GSH sont diminuées au niveau des cellules (Cacciatore et al., 2010).

Le paracétamol est un agent antipyrétique et analgésique bien connu. qui à dose thérapeutique est sans effets néfastes, mais peut produire des nécroses hépatiques qui peuvent être mortelles chez les animaux et les humains en cas de surdosage, ainsi il est employé comme agent hépatotoxique expérimental chez les animaux d'expérience (Schidt et al., 1997 ; Amar et Schiff, 2007).

Les études de **Yousef et al (2010)**, ont déjà rapporté que le paracétamol déclenche le processus de la peroxydation lipidique, **Louvet et al (2006)**, ont mis en évidence la toxicité hépatique dose dépendante du paracétamol, le seuil de la toxicité est de 10g en une prise pour un adulte. Un signe évident des dommages hépatiques est la fuite des enzymes cellulaires dans le plasma dû à la perturbation causée dans les fonctions de transport des hépatocytes (**Zimmerman et Seeff, 1970**).

L'administration de dose toxique de paracétamol a entraîné une déplétion significative du taux de GSH ($2,45 \pm 0,60$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine) au niveau du foie des souris et qui n'ont pas été traités par *Clematis flammula* (lot témoins positif) Une tendance similaire de diminution du taux de Glutathion a été observée par Lahouel et al. (2004). Cette diminution est expliquée par la participation de cet organe à l'élimination des différents métabolites toxiques résultant de la dégradation du xénobiotique tels que les peroxydes lipidiques et les électrophiles responsables des dommages hépatiques. Le glutathion à une forte capacité de donneur d'électrons, c'est le principal antioxydant dans les cellules, en se liant par son groupe SH aux métabolites toxiques.

Lors d'une intoxication aiguë, la diminution du glutathion hépatique est expliquée par l'afflux massif de paracétamol qui sature la sulfoconjugaison. Par augmentation de son substrat, la voie de détoxification par conjugaison au glutathion prend de l'importance et va conduire à une formation accrue du NAPQI toxique. La conjugaison au glutathion inactive normalement ce métabolite réactif, mais une baisse de ses réserves en dessous du seuil critique de 20 à 30 % de la normale entraîne une augmentation du toxique libre, la cellule devient de ce fait en état de stress oxydatif (**Aouacheri., 2009**).

L'étude de l'effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis Flamula* sur la toxicité hépatique induite par le paracétamol à une dose de 500mg/kg à montré un effet hépatoprotecteur exprimé par une augmentation significative du taux du glutathion hépatique réduit. Des résultats similaires ont été rapporté avec d'autres extraits de plantes chez le souris soumises à une toxicité du paracétamol (**Avijeet et al., 2008**). D'où ses résultats en dévoiler que cet extrait exerce donc un effet bénéfique sur le stress oxydant Il pourrait protéger le foie des attaques radicalaires, en stimulant la production d'une importante quantité de GSH, ce qui explique l'augmentation de la concentration de GSH au niveau hépatique.

Le glutathion réduit (GSH) jouent un rôle clé dans la protection des cellules. Ces résultats concordent avec plusieurs travaux réalisés avec d'autres extraits de plantes tels que *Chamomile capitula* (Ajay et Neelam, 2006) et *Moringa oleifera* (Sharida et al., 2012).

L'administration de la Silymarine qui est un constituant actif du fruit du chardon-marie (marianum de Silybum) a induit une augmentation de la concentration du glutathion dans le foie. La Silymarine est connue pour avoir les propriétés antioxydants et hépatoprotectrices, elle est employé dans le traitement des diverses affections hépatiques.

Diverses études indiquent que le fort pouvoir antioxydant de la Silymarine est du a sa richesse en phénols, à l'origine des effets hépatoprotecteur observés vis-à-vis de la toxicité hépatique induite par une large variété d'agents en empêchant la peroxydation lipidique (Freitag et al., 2015)

Chez les souris intoxiquées par le paracétamol et traitées par 100 et 200mg/kg d'extrait les teneurs en glutathion ont significativement augmentées par rapport à leurs témoins (lots traités avec l'extrait mais non intoxiqué) ce qui suggéré l'activité antioxydant de l'extrait éthanolique de feuilles de *Clematis flammula*, qui pourrait être dû à la capacité de l'extrait à neutraliser l'augmentation des radicaux libres provoqués par le paracétamol, étant donné que cette plante à exhibé *in vitro* et *in vivo* des activités antioxydants important, d'après les travaux (Atmani et al ;2009) et (Atmani et al ; 2011) Cet effet pourrait également être dû à la capacité de l'extrait a régénéré et a augmenté la synthèse de GSH.

Ces résultats serait probablement dû aux composés bioactifs présents dans la plante, tels que les flavonoïdes et leurs pouvoirs antioxydant. D'autre part, les composé phénoliques sont connue par leurs capacités de recycler la vitamine E et de piéger les radicaux libres, ceci peut donc participer directement à une réduction de l'utilisation de GSH (Chawla et al., 2012).

En effet la bibliographie rapporte la richesse de feuilles de *Clematis flammula* en différentes métabolites secondaires tel que les triterpènes, les lignanes, coumarines, alcaloïdes, huiles volatiles, stéroïdes, acides organiques, composés macrocycliques, les

flavonoïdes et polyphénols (**Chawla et al., 2012**) ces derniers ont considérés comme des bons agents antioxydants et hépatoprotecteurs, (**Mahesh et al 2014**).

Clématis flammula pourrait jouer un rôle très important dans la protection hépatique lors des intoxications provoquées par le paracétamol. C'est particulièrement important étant donné que les traitements des intoxications humaines aiguës avec au paracétamol sont limités et fréquemment non efficaces et se fonde fondamentalement sur l'utilisation de la *N-N-acetylcysteine* (**Groote et Steenbergen, 1995 ; Angela et al, 2005**). *N-N-acetylcysteine* qui est un précurseur du glutathion réduit (GSH), il a été employé intensivement dans la gestion de l'empoisonnement au paracétamol (**Yousef et al., 2010**).

Les résultats obtenus ainsi indiquent que l'extrait éthanolique du *C .flammula* à une activité antioxydant efficace dans le système *in vivo*, ce qui peut être révélé par les molécules phytochimiques et l'effet synergétique entre différentes molécules qui sont présentes dans l'extrait brut, cela pourraient être la raison d'évoquer le niveau de glutathion dans le groupe de traitement.

Dans cette présente étude, la plante *Clematis flammula* connue pour leur effet pharmacologique, est très utilisée dans le traitement de diverses pathologies en médecine traditionnelle. L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet hépatoprotectif de l'extrait éthanolique de cette plante contre des dommages de foie induits par le paracétamol.

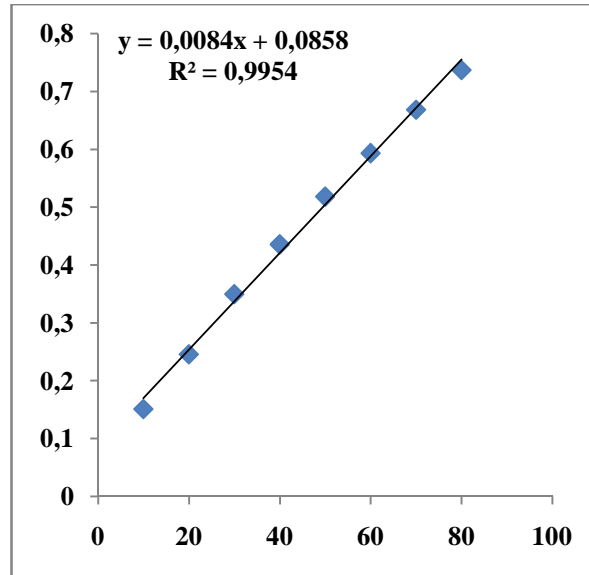
L'effet antioxydant de l'extrait éthanolique de feuilles de *Clematis flammula*, est mesuré en évaluant l'activité de glutathion réduit ; l'antioxydant à faible poids moléculaire le plus important synthétisé par la cellule. Le test a été effectué sur des souris traitées par une dose de 500mg/kg de paracétamol, ce dernier induit une intoxication au niveau hépatique. Nos résultats indiquent que l'extrait éthanolique de feuilles de notre plante à une dose de 100 et 200mg/kg a un bon effet hépatique montré par l'augmentation de taux de GSH de foie ($17,80 \pm 2,42$; $19,02 \pm 1,54$) respectivement similaire à celle montrée par la silymarine, molécule de référence qui a montré une activité hépatoprotective, capable de régénérer les cellules hépatiques endommagées, comparées à celle de paracétamol qui a exhibé une valeur très faible ($2,45 \pm 0,60$ µg/mg de protéine).

Au regard de ces résultats, une conclusion a été déduite et que l'extrait de *clematis flammula* est un agent hépatoprotectif prometteur. L'action hépatoprotective combinée avec l'activité antioxydante a un effet synergique pour empêcher le processus du déclenchement et le progrès des dommages hépatocellulaires.

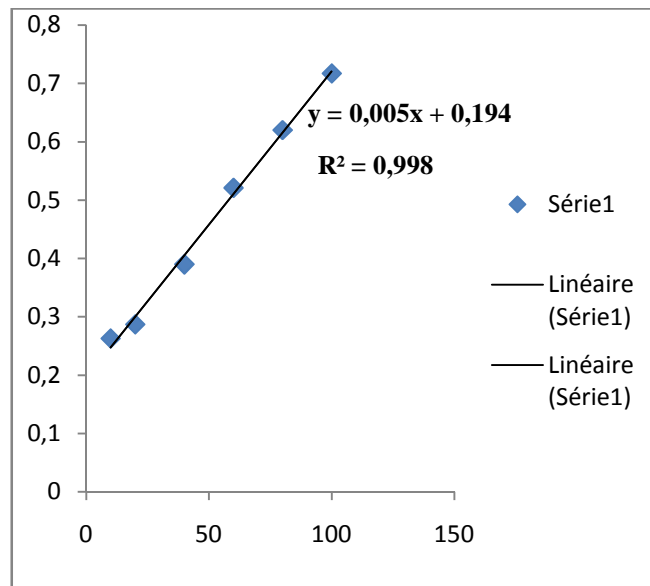
Cette activité pharmacologique de *C. flammula* pourrait être due à sa richesse et à la présence des composés actifs, tels que les polyphénols, les flavonoïdes.

En perspectives, il serait intéressant d'approfondir cette étude en vue de caractériser et identifier les structures de ses substances actives qui sont responsables de cet effet (antioxydant), mais aussi d'évaluer l'effet de cet extrait sur l'activité d'autres enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase et la catalase.

Annexes



Annexe 1 : Courbe d'étalonnage en utilisant la BSA comme standard.



Annexe 2 : Courbes d'étalonnage de glutathion réduit

A

- Asmus K.D. and Bonifacic M., (2000). Free radical chemistry. Handbook of oxidants and antioxidants in Exercise, *Elsevier, Amsterdam* pp: 3-53.
- Arousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage, conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim*, 15 (1): 67-82.
- Angela, B.R., Richard, C.K., Sandra, S.M., Robert, W.B. and Jack, A. (2005). Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312, 509–516.
- Alpert, M. (2005). The diverse benefits of glutathione: a key antioxidant for reversing chronic illness. *Alternative and Complementary Therapies*. 11 (5): 241-245.
- Ajay, K. and Neelam, M. (2006). Hepatoprotective Activity of Aqueous Ethanolic Extract of *Chamomile capitula* in Paracetamol Intoxicated Albino Rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 1 (1): 17-20 ISSN 1557-4962.
- Adil H.I., Cetin I.H., Yener, M. and Bayindirli, A. (2007). Lang inducible bilirubin oxidase: A novel function for the mouse cytochrome P450 2A5. *Tox & App Pha* p257.
- Amar, P. J. et Schiff, E. R. (2007). Acetaminophen safety and hepatotoxicity where do we go from here? *Expert Opinion on Drug Safety*, 6, 341–355.
- Aouacheri, W., Saka, S. et Djafer R. (2009). L'effet toxique d'un insecticide (alphaméthrine) sur l'activité du système enzymatique de détoxification du glutathion. *Ann Toxicol Anal*; 21: 125-9.

- Avijeet, J., Manish, S., Lokesh, D., Anurekha, J., Rout, S., Gupta, V. and Krishna, K. (2008). Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* Roxb. Leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 115; 61–66.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debache, N. and Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food chemistry*, 112: 303-309.
- Atmani, D., Ruiz-Larrea, B., Sanz, R., Lizsano, L., Bakkali, F. and atmani, DJ. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *clematis flammula* lef extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4):589-598.

B

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*, 7: 248-254.
- Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d’approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council Mauritian*, 83-94.
- Bernard, B. (1997). Dictionnaire : plante et champignons. Edition ESTEM, P : 190-345.
- Beckman, K.B. and Ames, B. (1998). The Free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2) :547-581.
- Baba Aissa, F. (2000). Encyclopedie de plantes utiles: flore d’Algerie et du maghrels, substances végétales d’Afrique d’orient et d’occident. *Librairie moderne. Louiba. Dépôt leyal*, 91 : 1-294.

- Bannwarth, B. and Pehourcq, F. (2000). Pharmacologic basis for using paracetamol: pharmacokinetic and pharmacodynamic issues. *Drugs, 63 Spec No 2*: p. 5-13.
- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on toxicology. 9*: 5-21.
- Balaban, S., Nemoto, S. and Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell 120*: 483-495.
- Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardiology, 2 (1)*: 43-52.
- Berger, M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme, 20*: 48-53.
- Barati Elbaz, C. et Marechal, P. (2008). Biochimie en 23 fichiers. *Dunod, Paris*: 62 : 135p.
- Bruneton, J. (2008). pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2-7430-031-4, 3^{ème} édition.

C

- Center, S.A. (2000). Traitement de l'insuffisance hépatique chronique. *WALTHAM Focus. 10, (4)*, 29-31.
- Comhair, S. and Erzurum, C. (2000). Antioxidant responses to oxidant-mediated comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene.
- Center, S. A. (2004). Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. *Vet. Clin. Small Anim. 34*, 67-172.

- Cacciatore, I., Cornacchia, C., Pinnen, F., Mollica, A. and Stefano, A. (2010). Prodrug Approach for Increasing Cellular Glutathione Levels. *Molecules*. 15: 1242-1264.
- Christophe, P. et Christophe, S. (2011). Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *Edition Springer*, p 84.
- Chawla, R., Kumur, S. and Sharma, A. (2012). The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemecal and Pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 116-150.

D

- Droge, K.S. (2002). Free radicals in physiological control of cellfunction. *PhysiolRev*, 82: 47-95.
- D'archivio, M., Filesi, C., Benedetto, R., Gargiulo, R. and Roberta, M. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*. 43: 348-361.
- Durairaj, A., Vaiyapuri, T., Mazumder, U. and Gupta, M. (2007). Hepatoprotective and inhibition of oxidative stress in liver tissue of *Oxytelmaesculentum* on paracetamolinducedhepatic damage in rat. *Pharmacol Online*, 3: 52-72.
- Deng, X., Luyendyk, J. and Ganey, P. (2009). Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: Hintsfrom animal models. *Pharmacol Rev*, 61(3): 262-282.
- Djordjevi, J., Niforovi, A. and Radoj, M. (2009). Antioxidant Enzymes Expression and Activity in Liver of Stressed Wistar Rat. *Russian Journal of Physical Chemistry*. (83)9: 1617-1620.

E

- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- EL-Beshbishy, H., Ola, M., Tork, M. and El-Bab, M. (2011). Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats. *Path* 18: 125-135.

F

- Favier, A. (2003). Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Fatland, B. (2003). Botanicals, vitamins, and minerals and the liver: therapeutic applications and potential toxicities. *Compendium*. 25, (7), 514-524.
- Friguet, B. (2003). Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *L'actualité chimique*, 103-107.
- Flourie, F., Arab, K., Rossary, A et Steghens, J.P. (2006). Effets de différent antioxydant sur la lipoperoxydation in vitro initiée par le OH[•]. *Imm-anal et biospéc* 21: 229-233.
-
- Fagali, N. and Català, A. (2009). Fe²⁺ and Fe³⁺ initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem and Phys of Lip*: 159, 88-94.
- Freitag, A., Cardia, G., Rocha, B., Aguiar, R., Comar, F., Spironello, R., Grespan, R., Assef, S., Amado, C. and Cuman, R. (2015). Hepatoprotective Effect of Silymarin (*Silybum marianum*) on Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 317- 538.

G

- Goeptar, A.R., Scheerens, H. and Vermeulen, N. P. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology*, 25: 25-65.
- Groote, D. J. et Steenbergen, V. (1995). Paracétamol intoxication and N-acetyl cysteine treatment. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, 58, 326–334.
- Goudable, J., et favier, A. (1997). Radicaux libre oxygénées et antioxydants, *Nutr Clin Mdtabol* ; 11 :115-20.
- Greenberg, J.T. and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6: 201-211.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. and Fernandez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomédical Analysis*, 41: 1220-1234.
- Galleano, M., Sandra, V., Verstraeten, B., Patricia, I., Oteiza, C. and Fraga, G. (2010). Antioxidant action of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Arc of Bio and Bio*.
- Genot, C. et Michalski, M. (2010). impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments, *Inn Agro* : 10, 43-67.

H

- Havasteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutiquis*, 96: 67-72.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you what do the results mean? *British journal of pharmacology*. 142: 31-2.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology is a fundamental Theme of Aerobic Life. Pla Phy*, VOL. 141, pp. 312-322.

- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C. and Chapelle, J.P. (2007). Stress oxydatif. *Rev Med Liege*; 62: 10: 628-638.
- Hwang, E. and Kim, H. (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxology*, 229: 1-10.

J

- Jones, A.L. (1998). Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *J Toxicol Clin Toxicol*, 36: 277-85.
- Jacques, R.P. et Nathalie, B. (2003). *biochimie des activités physiques*. Rue des Minimes 39. B-1000 Bruxelles : Boeck Université. ISBN 2-8041-4442-9.
- Jung, T., Bader, N. and Grune, T. (2007). Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.462: 231-237.
- Jacques, B. et André, R. (2008). *Biochimie métabolique : marqueurs actuels et perspective*.11, rue lavoisier, 75008 paris : Chantal Arpino. ISBN: 978-2-257-20472-1.

K

- Klotz, L., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J. And Sies, H. (1999). Mitogen-activated protein kinas (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur. J. Biochem*, 260: 917-922.
- Koechlin, C. (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et metabolism*, 20: 165-177.

L

- Louvet, A., Boitard, J., Dharancy, S., Duriez, A. and Delterne, P. (2006). La mésaventure thérapeutique de paracétamol chez le buveur excessif. *Gastroenterol Clin Biol*, 30 : 769-774.
- Lee, D. H., Esworthy, C., Chu, G., Pfeifer, P. and Chu, F. (2006). "Mutation accumulation in the intestine and colon of mice deficient in two intracellular glutathione peroxidases." *Cancer Res*, 66(20): 9845-51.

M

- Meuwly, P., Thibault, P. and Rauser, W. (1993) gamma-glutamylcysteinylglutamic acid-a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.* 336 (3): 472-476.
- Meister, A. and Lester, P. (1995). Glutathione biosynthesis and its inhibition. In *Method Enzymol.* Vol. 252, pp 26-30.
- Milane, H., Vandamme, T., Zhao, M., Kessler, M., Ubeaud, G., Ochandio, B. and Jung, L. (2005). Free Radical Scavenging Activity of Hydroxyflavone Sodium Salts Compared to the Activity of Hydroxyflavones Themselves. *Croatica Chem. Acta*; 78 (1) 35, 41.
- Marc, E., Nelly, A., Annick, D. and Frederic, D. (2008). Plants used as remedisantirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Jornal of ethnopharmacology*, 120(3): 315-334.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J. et Therond, P. (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques Biomarkers of lipid peroxidation. *revue générale, Ann Biol Clin* ; 66(6) : 605-20.

- Mahesh, B.U., Shrivastava, S., Pragada, R., Naidu, V.G.M. and Sistla, R. (2014). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Boswellia ovalifoliolata* bark extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(9): 0663-0671.
- Mercy, B., Obogwu, Abidemi, J., Akindele., Olufunmilayo, O. and Adeyemi. (2014). Hepatoprotective and *in vivo* antioxidant activities of the hydroethanolic leaf extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) in antitubercular drugs and alcohol models. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(4): 0273–0283.

N

- Nagababu, E., Rifkind, J., Sesikeran, B. and Lakshmaiah, N. (2010). Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by *in vitro* and *in vivo* Methods. *Met Mol Biol*; 610: 165-180. Doi: 10. 1007/978-1-60327-029-8-10.

P

- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des laboratoires*, 276: 87-96.
- Pinsmil, J., Meuriss, M., Limet, R. and Defraigne, J. (1999). Méthodes d'évaluation de stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *MEDI SPHERE*.
- Priyadarsini, K.I. (2005). Molecular Mechanisms Involving Free Radical Reactions of Antioxidants and Radioprotectors. *Founder's Day Special Issue*: 1-6.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J. and Mauch, F. (2007). Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *Plant J.* 49 (1): 159-172.

R

- Rahman, I. (2000). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug TargetsInflamm Allergy*, 1(3): 291-315.
- Ré, D., Nafia, I., Nieoullon, A., Goff, I. and Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? implication sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502-509.
- Roede, J. R. and Jones, D. (2010). Reactivespecies and mitochondrial dysfunction:mechanisticsignificance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and MolecularMutagenesis*, 51:380-390.
- Roussel, A. M. (2009). Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, p 7.
- Rock, E. (2003). Stress oxydant, micronutriments et santé. *INRA-CRNH*, 63: 37-42.

S

- Schidt, F.V., Rochling, F.V., Cassey, D.L. and Lee, W.M. (1997). Acetaminophen toxicity in an urban country hospital. *Journal of Medicine New England* 337, 1112–1117.
- Seifreid, H., Anderson, D., Fisher,I. and Milner, J. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18: 576-579.

- Singh, R., Singh, S., Kumar, S. and Arona, S. (2007). Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Fd and Chem Tox* 45. 1216-1223.
- Sharida, F., Syazana, A. and Palanisamy, A. (2012). *Moringa oleifera* Hydroethanolic Extracts Effectively Alleviate Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Experimental Rats through Their Antioxidant Nature. *molecules* ISSN 1420-3049.

T

- Tsao, R. and Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of chromatography B*, 812: 85-99.
- Therond, P. (2006). Stress oxydant : Dommage créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64 : 383-389.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. ISSN 2072-6643.

V

- Vogel, G. et Tuchweber, B. (1984). Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicology and applied pharmacology*. 73, 355-362.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chim-bio inte*, 160: 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.; Mazur, M. and Telcer, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84.

W

- Willard, M., Ettinger, S., Feldman, E. and Louis, C. (2005). Inflammatory canine hepatic disease. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th edition.

X

- Xiuzhen, H., Tao, S. and Hongxiang, L. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8 : 950-988.

Y

- Yue, K., Chung, W., Leung, A. and Cheng, C. (2003). Redox changes precede the occurrence of oxidative stress in eyes and aorta, but not in kidneys of diabetic rats. *Life*. 73: 2557–2570.
- Yousef, M.I., Omar, S., El-Guendi, M. and Abdelmegid, L. (2010). Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*: 3246–3261.

Z

- Zimmerman, H.J. and Seeff, L.B., (1970). Enzymes in hepatic disease. In: Goodly, E.L. (Ed.), *Diagnostic Enzymology*. Philadelphia, USA, pp. 1–38.
- Zimmerman, H. and Maddrey, WC. (1995). Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology* 1995; 22: 767-73.

Chapitre I
Stress oxydant

Chapitre II
Systèmes antioxydants

Chapitre III
Matériel et méthode

Partie
expérimentale

Annexe

Introduction

Conclusion

Références
Bibliographiques

*Résultats et
discussion*

Synthèse
Bibliographique

*Matériel et
Méthodes*

Sommaire

Résumé

Clematis flammula, appelée aussi *Clematite*, est une plante médicinale largement utilisée par la population locale pour le traitement des rhumatismes articulaires, des brûlures et des blessures superficielles. La présente étude démontre l'activité antioxydant et hépatoprotectrice de l'extrait éthanolique de feuilles du *Clematis flammula*, qui ont été évaluées contre des dommages hépatiques induits par une dose de 500 mg/kg de paracétamol chez des souris albinos. L'hépatotoxicité de paracétamol se manifeste par l'épuisement du glutathion réduit (GSH) de foie ($2,45 \pm 0,60 \mu\text{g/mg}$ de protéine). L'administration intra-gastrique de l'extrait à dose 100 et 200mg/kg, à entraîné une augmentation hautement significatif de la concentration de glutathion réduit ($17,80 \pm 2,42$; $19,02 \pm 1,54$) dans les lots traités et intoxiqués (teste 100et 200mg/kg) respectivement comparant au lot intoxiqué ($2,45 \pm 0,60 \mu\text{g/mg}$ de protéine). La Silymarine a été employé comme référence standard et a montré une activité hépatoprotectrice significative avec une augmentation de la teneur en glutathion réduit ($13,35 \pm 1,18$) comparant au lot intoxiqué ($2,45 \pm 0,60 \mu\text{g/mg}$ de protéine), contre l'hépatotoxicité induit par le paracétamol chez les souris. Les résultats de cette étude indiquent fortement l'action hépatoprotectrice de *Clematis flammula* contre la toxicité hépatique. Cette étude suggère que cette activité antioxydant puisse être due à la richesse de l'extrait en flavonoïdes. Par conséquent cette étude fournie un support pour l'utilisation de *Clematis flammula* dans traitement des désordres hépatique.

Mots clef : *Clematis flammula*, glutathion réduit(GSH), activité hépatoprotectrice, Paracétamol.

Abstract

Clematis flammula, also called *Clematite*, is a medicinal plant largely used by the local population in order to treat the rheumatoid arthritis, the burns and the surfacial wounds(injuries).The present study shows that the antioxydant activity and ethanolic hepatoprotectrice of the extract of sheets of *Clematis flammula*, which were evaluated against hepatic damage induced by an amount of 500 paracetamol mg/kg in albino mice.The paracetamol hepatotoxicity appears by the exhaustion of the reduced glutathion (GSH) of liver ($2,45 \pm 0,60$ protein $\mu\text{g/mg}$).Intra-gastric administration of the extract with amount 100 and 200mg/kg, with entraîné an increase highly significant in the concentration of glutathion reduced ($17,80 \pm 2,42$; $19,02 \pm 1,54$) in treated and poisoned batches (100et 200mg/kg tests) respectively compares with the poisoned batch ($2,45 \pm 0,60$ protein $\mu\text{g/mg}$). Silymarine was employed as a standard reference and showed significant a hepatoprotectrice activity with an increase in the content of glutathion reduced ($13,35 \pm 1,18$) compare with the poisoned batch ($2,45 \pm 0,60$ protein $\mu\text{g/mg}$), against the hepatotoxicity induced by paracetamol in the mice. The results of this study strongly indicate the hépatoprotectrice action of *Clematis flammula* against hepatic toxicity.This study suggests that this antioxydant activity can be due to the richness of the extract in flavonoïdes.Consequently this provided study a support for the use of *Clematis flammula* in treatment of the liver disorders.

Key words: *Clematis flammula*, glutathione reduced (GSH), hepatoprotective activity, Paracétamol.