

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



Université Abderrahmane Mira Bejaia  
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique

*Mémoire en vue de l'obtention du titre de  
Master en Biologie  
Option : Pharmacologie moléculaire*

### *Thème*

*L'activité anti-oxydante et hépato-  
protective de l'extrait éthanolique de  
Rhamnus alaternus sur la toxicité  
hépatique induite par Klipal chez les rats  
wistar albinos*

Réalisé par :  
M<sup>lle</sup> BENSIDHOUM Charihane  
M<sup>lle</sup> BRAHMI Fatima

Membres du jury :

Présidente : M<sup>me</sup> TALBLA

Promotrice : M<sup>me</sup> BAKDI.H

Examineurs : M<sup>me</sup> ADRAR .S

M<sup>r</sup> BELKACEM .N

Grade et lieu:

M.A.A (U.A.M.B)

M.A.A (U.A.M.B)

M.A.B (U.A.M.B)

M.A.B (U.A.M.B)

*Promotion 2013/ 2014*



# Remerciements

☞ *Au terme de notre travail nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.*

☞ *Nous tenons tous particulièrement à adresser nos remerciements les plus vifs d'abord à notre promotrice M<sup>me</sup> BAKDI qui nous a fait l'honneur de nous inspirer ce sujet et nous guider tout au long de son élaboration, pour ses conseils, son sérieux dans le travail et surtout sa patience.*

☞ *Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres de jury : M<sup>me</sup> TALBI qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de présidente de jury, M<sup>me</sup> ADRAR et M<sup>r</sup> BELKACEM qui ont accepté d'examiner ce travail et de consacrer de leurs temps pour leur évaluation.*

☞ *A l'ensemble du personnel de Laboratoire MOUALEK Fares en particulier les payasses microbiologie et biochimie qui n'ont pas hésité de mettre toute le conforme à notre disposition.*

☞ *A l'ensemble du personnel administratif du parc national du Gouraya (PNG) pour leurs qualités humaines, leurs grandes compétences, leurs disponibilités, leurs gentillesse et leurs attentions.*

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

☞ *Charihane et Fatima* ☞

# Dédicaces

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :*

*☞ À ceux qui sont mon exemple de la réussite, que j'ai tant aimée et respectée, qui m'ont donné de l'amour ; de la tendresse et de la force, ma très chères grande mère et ma mère ; que Dieu vous protègent et vous prêtent une longue et heureuse vie.*

*☞ Mes dédicaces sont adressées*

*☞ À mes chers frères : Riad, Yacine et Fayçal*

*☞ À mes chères sœurs : Hassiba, Fahima et Fatima*

*☞ À mes beaux frères : Zahir et Fateh*

*☞ À mes très très chère nièces: Fatima manel et Ryma*

*☞ À toute ma famille, mes voisins, et tous mes amis (es) qui m'ont toujours encouragés et souhaités la réussite.*

*☞ À mes adorables copines : Dihia, Nadia, Souad, Hanane, Salima, Kahina, Nora et biensûr Naima que j'oublierai jamais son aides.*

*☞ À mes chers amis : Halim, Khalel, Bidji, Fouzi, Lounes, Amirouch, Foudil qui m'ont donné de la force ; leur soutient, leur aide et leur présence*

*☞ À ma binôme Fatima, ensemble nous avons pu faire et achevé ce travail, nous avons partagé d'agréables moments tout au long de notre cursus universitaire et sa famille*

*☞ À Toute la promotion de pharmacologie moléculaire et Biochimie appliquée, promotion 2013-2014.*

*☞ Charifane ☞*

# Dédicaces

✎ Je dédie cette thèse à mes chers parents qui tiennent une place immense dans mon cœur. **Papa**, tu es une vraie école de la vie, je ne cesse d'apprendre tous les jours avec toi. **Maman**, une femme aussi adorable que toi je n'en connais pas, tu as toujours été là pour moi, et à aucun moment tu n'as cessé de me couvrir de ta tendresse. C'est grâce à vous que je suis ce que je suis maintenant. Je ne pourrais vous remercier assez... que Dieu vous protège.

✎ A mes sœurs et frères et leurs conjoints pour leurs aide et conseils si précieux,

✎ A mes nièces : **Amel, Yousra, Aïda et Nour-el-imén**

✎ A mes neveux : **Fares, Chérif, Adam et Adnane**

Vous êtes ma joie de vivre je remercie Dieu de vous avoir.

✎ A tout ceux qui m'ont appris un bout de la médecine et de la pharmacie particulièrement la pharmacienne **Amel LAOUAR, Lamia HAMACHE et Samira HADJAR**

✎ Un remerciement spéciale pour : la famille **BOUZANTOUTA** de Jijel surtout pour **Charaf-addine** et à mon amie **Fatima** de Constantine et à ma tante **Nadra.G**

✎ A ma très chère binôme **Chachou** qui ma laissé de voir mes défaut

✎ A ma promotion **Pharmacologie moléculaire 2013/2014**

✎ A tous mes ami(e)s et proche qui occupe une place au fond de mon cœur.

✎ *Fatima.* B ✎

# *Sommaire*

---

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Liste des Abréviations	
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I: Généralité sur le foie</b>	
<b>I.1. Rappels sur le foie .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Fonctions du foie .....</b>	<b>4</b>
<b>I.3. Les cellules hépatiques.....</b>	<b>5</b>
<b>I.3.1. Les cellules non parenchymateuses.....</b>	<b>5</b>
<b>I.3.2. Les hépatocytes.....</b>	<b>6</b>
<b>I.4. Rôle du cytochrome P450 dans la métabolisation des xéno-biotique et dans l'élimination des toxiques .....</b>	<b>7</b>
<b>Chapitre II: Klipal</b>	
<b>II.1 .Définition et denomination de Klipal .....</b>	<b>8</b>
<b>II.2. Pathologie liée à la prise de Klipal .....</b>	<b>8</b>
<b>II.3. Le Paracétamol .....</b>	<b>8</b>
<b>II.3.1. structure et nomenclature de Paracétamol .....</b>	<b>9</b>
<b>II.3.2. Métabolisme de paracétamol .....</b>	<b>9</b>
<b>II.3.3. Mécanisme d'action toxique de paracétamol .....</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre III : Stress oxydatif et antioxydants</b>	
<b>III.1. Stress oxydatif :.....</b>	<b>11</b>
<b>III.2. Les radicaux libres.....</b>	<b>12</b>
<b>III.2.1. Propriétés et origine.....</b>	<b>13</b>
<b>III.2.1.1.propriétés.....</b>	<b>13</b>
<b>III.2.1.2. Origines .....</b>	<b>14</b>
<b>III.2.2. Dommages macromoléculaires occasionnés par les ERO .....</b>	<b>15</b>
<b>III.2.2.1. Altérations de l'ADN .....</b>	<b>15</b>
<b>III.2.2.2.Altérations des lipides .....</b>	<b>16</b>
<b>III.2.2.3. Altérations des protéines .....</b>	<b>16</b>
<b>III.2.2.4. Altérations des polysaccharides .....</b>	<b>17</b>

III.3. Les antioxydants .....	18
III.3.1 .Mécanismes d'action des antioxydants .....	18
III.3.1.1. Mécanisme d'action des antioxydants enzymatiques .....	19
III.3.1.2. Mécanisme d'action des antioxydants non enzymatiques ..	21
<b>Chapitre IV : <i>Rhamnus alaternus</i> L</b>	
IV.1. Description de <i>Rhamnus alaternus</i> L .....	26
IV.2. Les noms vernaculaires de <i>Rhamnus alaternus</i> L .....	27
IV.3. La classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	27
IV.4.Composition chimique de <i>Rhamnus alaternus</i> L .....	28
<b>Chapitre V: Matériels et methodes</b>	
V.1. Matériel végétal .....	29
V.1.1. Récolte et séchage.....	29
V.1.2.Extrait éthanolique de la partie aérienne .....	29
V.1.3. Choix de la dose .....	30
V.2. Matériel animal .....	30
V.2.1 Elevage des animaux .....	30
V.2.2. traitements des animaux .....	31
V.2.3. Administration des extraits de plantes .....	32
V.2.4. Induction de l'hépatotoxicité .....	32
V.2.5. Prélèvement du sang et des organes .....	33
V.3. Etude <i>In vitro</i> sur l'extrait éthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> L ...	34
V.3.1. Analyses phytochimiques .....	34
V.3.1.1.Dosage des poly-phénols totaux .....	34
V.3.1.2. Dosage des flavonoïdes.....	36
V.3.2. Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH.....	36
V.4. Etude <i>In vivo</i> de l'extrait éthanolique de <i>Rhamnus alaternus</i> L .....	38
V.4.1. Evaluation des taux de malondialdéhyde (MDA) .....	38
V.4.2. Evaluation des taux de la catalase .....	40
V.4.3. Evaluation des taux de la bilirubine .....	42
V.4.4. Evaluation des taux des protéines totales (Prs T).....	43

**Chapitre VI Résultats et Discussion :**

<b>VI.1. Résultats de l'étude <i>In vitro</i> de l'extrait éthanolique de <i>R. alaternus</i> L....</b>	<b>44</b>
<b>VI.1.1. Taux d'extraction .....</b>	<b>44</b>
<b>VI.1.2. Evolution d'analyses phytochimiques .....</b>	<b>44</b>
<b>VI.1.2.1. Taux des poly-phénols totaux .....</b>	<b>44</b>
<b>VI.1.2.2. Taux des flavonoïdes .....</b>	<b>45</b>
<b>VI.1.3. Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH .....</b>	<b>46</b>
<b>VI.2. Résultats de l'étude <i>In vivo</i> de l'extrait éthanolique sur l'animal .....</b>	<b>47</b>
<b>VI.2.1. Evolution des symptômes cliniques .....</b>	<b>47</b>
<b>VI.2.2. Evolution des effets de klipal et de l'extrait éthanolique de <i>R.alaternus</i> sur le poids relatif du foie pour les différents lots .....</b>	<b>48</b>
<b>VI.2.3. Evolution des taux de malonedialdéhyde (MDA) des tissus hépatique .....</b>	<b>49</b>
<b>VI.2.4. Evolution de l'activité de la catalase .....</b>	<b>50</b>
<b>VI.2.5. Evolution du taux de la Bilirubine .....</b>	<b>51</b>
<b>VI.2.6. Evolution du taux des protéines totales .....</b>	<b>51</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>52</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>56</b>
<b>Références.....</b>	<b>57</b>
<b>Annexe</b>	

Liste des figures :

- **Figure 1:** situation du foie dans le tronc humain.....3
- **Figure 2 :** Anatomie hépatique .....3
- **Figure 3 :** Les fonctions du foie .....4
- **Figure 4 :** Les cellules hépatiques .....6
- **Figure 5 :** Métabolisme des xenobiotiques .....7
- **Figure 6 :** La structure chimique de paracétamol .....9.
- **Figure 7 :** différents métabolisme de paracétamol.....9
- **Figure 8:** Mécanisme toxique de paracétamol.....10
- **Figure 9 :**Représentation schématique de la modification du statut redox .....11
- **Figure 10:** Exemples d'affections rencontrées chez l'homme causées par les ERO, classées par organe cible .....12
- **Figure 11:** Cascade de production des principales ERO.....13
- **Figure 12:** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène .....14
- **Figure 13:** Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....15
- **Figure 14:** Le mécanisme de la peroxydation lipidique .....16
- **Figure 15:** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire . .....17
- **Figure 16:** Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation »..... 17
- **Figure 17:** Les systèmes de défense contre les radicaux libres .....18
- **Figure 18:** Enzymes impliquées dans l'élimination des hydroperoxydes.....20
- **Figure 19 :**Enzyme impliquées dans l'élimination des hydroperoxydes et le peroxyde d'hydrogène .....20
- **Figure 20:** Mécanisme d'action d'un anti-oxydant donneur d'hydrogène comme le tocophérol .....21
- **Figure 21:** Exemple de réaction antioxydantes en chaîne mettant en jeu le vit E et.....22
- **Figure 22:** squelette de base des flavonoïdes .....23
- **Figure 23:** Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoides.....24
- **Figure 24 :** Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des Flavonoides.....25
- **Figure 25 :** l'arbuste de *Rhamnus alaternus* .....26

- **Figure 26:** fleurs et fruits de *Rhamnus alaternus* .....26
- **Figure 27:** Structures chimiques de quelques anthraquinones et flavonoïdes de *R.alaternus L* .....28
- **Figure 28:** les feuilles de *Rhamnus alaternus L*.....29
- **Figure 29 :** Protocole de préparation de l'extrait éthanolique de la partie aérienne par macération .....30
- **Figure 30:** Répartition des lots.....32
- **Figure 31:** Contention de base et gavage.....32
- **Figure 32:** les différentes étapes de sacrifice de l'animale.....33
- **Figure 33:** Protocole expérimental de dosage des poly-phénols totaux .....35
- **Figure 34:** Protocole de test DPPH .....37
- **Figure 35:** Réaction de l'MDA avec le TBA .....38
- **Figure 36:** Protocole expérimental de test de la catalase selon .....41
- **Figure 37:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique.....44
- **Figure 38 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.....45
- **Figure 39:** Effets Scavenger contre le radical DPPH de l'extrait éthanolique de *R. alaternus* à différentes concentrations.....46
- **Figure 40:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration en acide gallique et quercétine.....47
- **Figure 41 :** représentation graphique des pourcentages de poids relatif des différents lots.....49
- **Figure 42:** Représentation graphique d'MDA pour les différents lots .....50
- **Figure 43:** représentation graphique de la catalase .....50
- **Figure 44:** Représentation graphique des résultats de la Bilirubine pour les différents lots exprimés en mg/dl du sang.....51
- **Figure 45:** Représentation graphique des résultats de la protéines totales pour les différents lots exprimés en g/dl du sang.....52

- **Tableau I** : Abondances des différents types cellulaires hépatiques .....5
- **Tableau II**: Principales sources de production des radicaux libres. ....15
- **Tableau III**: Les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus*.....27
- **Tableau IV** : classification botanique de *R alaternus*Tableau.....27
- **Tableau V**: les étapes de protocole de l'MDA ..... 39
- **Tableau VI**: la bilirubine totale .....42
- **Tableau VII** : la Protéine totale .....43
- **Tableau VIII**: la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait éthanolique de *R. alaternus* exprimée en mg équivalent en acide gallique.....44
- **Tableau IX**: changements comportementaux et symptômes cliniques :.....48

- **Annexe 1** : Evaluation des effets toxiques après l'administration de l'extraits éthanolique aux animaux
- **Annexe 2** : la Bilirubine
- **Annexe 3** : la protéine totale

- $^1\text{O}_2$  : l'oxygène singulet .
- Abs : absorbance.
- ADN : acide désoxyribonucléique .
- AGPI : acides gras polyinsaturés.
- $\text{AlCl}_3$  : chlorure d'aluminium(III).
- Asc : l'ascorbateradical .
- $\text{Asc}^{\cdot -}$  : ascorbyle .
- BC :  $\beta$ -carotène .
- BHT : hydroxytoluène butylé.
- BIL : Bilirubine.
- CAT : catalase .
- cCu-ZnSOD : superoxydes dismutase à cuivre zinc .
- CFCs : chlorofluoroalcane.
- Cyt P450 : cytochrome P450.
- D BIL : Bilirubine directe .
- DMSO : diméthyl sulfoxyde.
- DPPH : 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
- DROs : dérivés oxygénés des radicaux libres .
- EOA : espèces oxygénées activées .
- EQ /mg : Equivalents en mg de quercétine.
- ERO : espèce réactif de l'oxygène .
- F : facteur de dilution.
- $\text{g/cm}^2/\text{min}$  : gramme par centimètre carré par minute.
- $\text{GP}_X$  : glutathion peroxydase.
- GSH : glutathion réduit .
- GSSG : glutathion oxydé.
- $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène .
- $\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_{40}$  : acide phosphomolybdique.
- $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$  : acide phosphotungstique .
- I BIL : Bilirubine indirecte .
- IC50 : Concentration inhibitrice a 50 %.
- KCl : Chlorure de potassium.

- $LO^{\bullet}$  : radical lipidique .
- MDA :malonedialdéhyde .
- Mn-SOD : superoxydes dismutase à manganèse.
- NaCl : Chlorure de sodium.
- NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucléotide phosphate .
- $NO^{\bullet}$  : monoxyde d'azote .
- $O_2^{\bullet -}$  : anion superoxyde.
- OCDE:Organisation de Coopération et de Développement Economiques.
- $OH^{\bullet}$  : radical hydroxyl .
- $OH^{\bullet}$  : radical hydroxyle .
- ONAB : Office National Alimentation Bétail.
- $ONOO^-$  : anion peroxydinitrite .
- PFG : produits finaux de glycosylation .
- PgP : pompes glycoprotéine .
- PNG : Parc National de Gouraya .
- *R. alaternus.L : Rhamnus alaternus L .*
- $RO^{\bullet}$  : radical alkoxyde .
- $ROO^{\bullet}$  : radical peroxyde .
- SNC : système nerveux centrale.
- SOD : superoxydes dismutase .
- T BIL : Bilirubine total .
- TBA :acide thiobarbiturique.
- TCA :Acide trichloroacétique .
- U.I :unité internationale .
- $\alpha$ -TH :  $\alpha$ -tocophérol .

# *Introduction*

Les pathologies hépatiques constituent un problème de santé publique à l'échelon mondiale, il est important que des travaux soient entrepris afin d'apporter une base scientifique à l'utilisation des remèdes traditionnels par les populations pour le soin des troubles hépatobiliaires. Cela est nécessaire, puisque parmi les nombreux maux que se propose de soigner la médecine traditionnelle, les pathologies hépatiques constituent les maladies pour lesquelles elle semble avoir le plus de succès (**Outtara et al, 2003**).

Effectivement, Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres en général et les espèces réactives de l'oxygène en particulier. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que traumatisme ou ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires (**Lehucher-Michel, 2002., Young, 2001**). Un déséquilibre entre la production et l'élimination de ces ROS par des antioxydants qui peut avoir une origine exogène (toxine, molécule oxydante comme l'O<sub>3</sub>) ou une origine endogène (dysfonctionnement de certaines sources de production ou d'élimination de ROS) conduit à un stress oxydant entraînant ainsi une oxydation accrue des composants cellulaires (**Servais, 2004**). De ce fait les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources anti-oxydantes (**Pelli et Lyly, 2003**).

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques (**Djemai, 2009**) sachant qu'une plante peut contenir plusieurs milliers de substances et différents principes actifs qui représentent 25% des médicaments prescrits, soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes (**Bruneton, 1999**). Et récemment le développement de la toxicité des antioxydants synthétiques, a conduit à chercher des substances naturelles dotées d'activité antioxydantes (**Djemai, 2009**).

Cependant, *Rhamnus alaternus* L , est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en phytothérapie dans les pays de bassin méditerranéen ; dans le nord africain elle est utilisée comme purgative, laxative, diurétique, anti-hypertensive et dépurative. En Algérie, cette espèce est utilisée en générale pour le traitement des complications hépatique et dermatologiques, et comme puissant antioxydant (**Boussahel et al., 2013**). La richesse de cette plante en métabolites secondaires lui confère un pouvoir thérapeutique d'une large gamme.

Notre travail se divise en deux parties, la première partie est une synthèse bibliographique de quelques rappels sur le foie, la molécule toxique (klipal) avec laquelle on a provoqué la toxicité hépatique et bien sûr notre plante choisie *Rhamnus alaternus*, La deuxième partie est la partie expérimentale qui traite l'étude des effets antioxydants de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus*, Suivie de l'étude de l'effet de cet extrait sur une intoxication hépatique induite par le klipal sur des rats Wistar. Enfin, complétée par une étude biochimique réalisée sur le foie et le sang des rats.

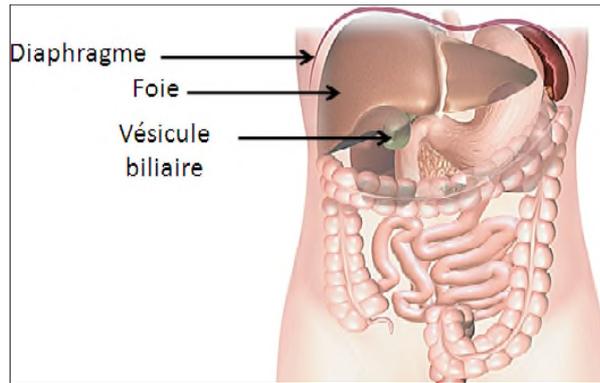
# *Chapitre I*

*Généralités sur le foie*

**I.1. Rappelle sur le foie :**

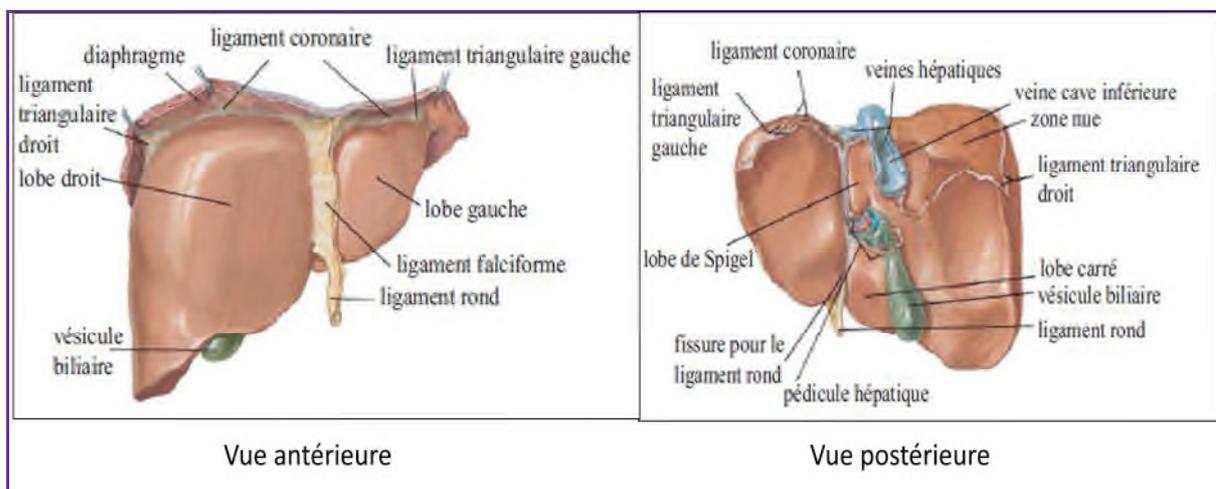
Le foie est une glande volumineuse (Wigfull et Bellamy, 2000 ; Bouchet et Cillert ,1983). C'est un organe noble qui peut faire l'objet de transplantation totale ou partielle ; Il est divisé en deux lobes, droit et gauche (Bastiani, 2013).

Le foie est localisé dans la région abdominale (figure 1) droite sous le diaphragme, remplit tout l'hypochondre (droit) et une partie de l'épigastre et l'hypochondre gauche (De Bari et al. 2010).



**Figure 1:** situation du foie dans le tronc humain (Nguyen et Bourouina,2008)

Il est de couleur rouge brun et de forme : ovoïde (Casting et Smail, 1999). Le foie peut mesurer 28cm de longueur et 17cm de largeur et son épaisseur ne dépasse pas 8cm sauf dans des cas de pathologie (Drake et al. 2006). Son poids varie entre : 1.4 à 1.6 kg chez l'homme (Wigfull et Bellamy, 2000) et de 1.2 et 1.4 chez la femme. (figure 2) (Rouvière et Dalmas, 2002)



**Figure 2 :** Anatomie hépatique (Natter ,2004)

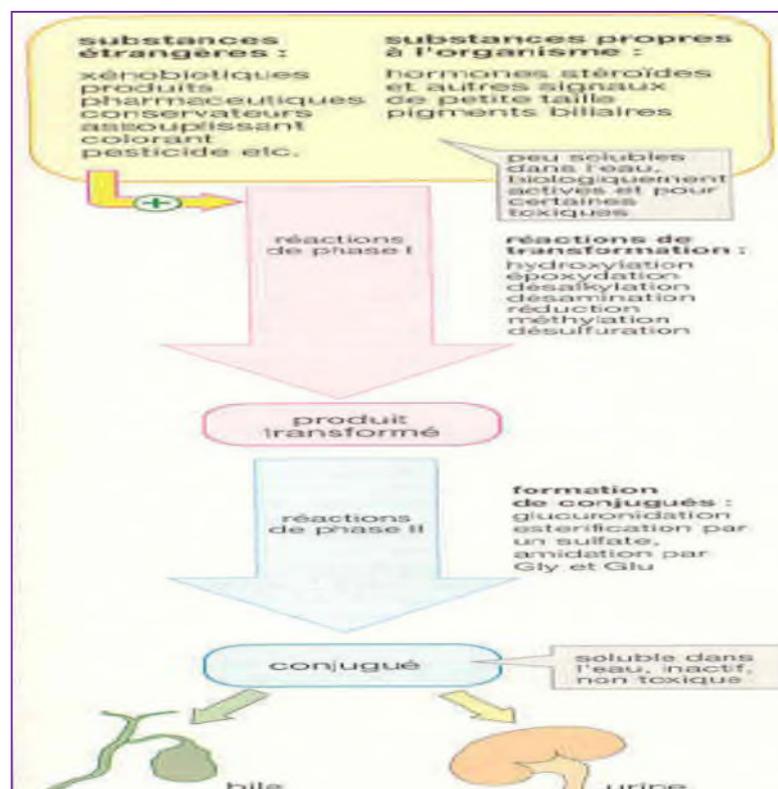
## I.2. Les Fonctions du foie :

Le foie effectue près de 500 fonctions vitales (Mornex *et al.* 1997) à savoir :

- fonction de synthèse (Denninger,2008;Highleyman et Franciscus,2004 ;Nguyen et Bourouina,2008 ; Plaa et Hewitt, 1997 ; Racine,2009 ) ;
- fonction d'épuration et de détoxification plasmatique (Campbell *et al.* ,2004 ;Highleyman et Franciscus,2004 ; Racine,2009 ; Valdiguié .2001;Wigfull et Bellamy,2000 ) ;
- fonction de sécrétion biliaire (Alberts *et al.*,1991;Bastiani,2013 ; Suckow *et al.*, 2005 ; Valdiguié,2001;Wigfull et Bellamy,2000)
- Fonction immunitaire (Sanhadji, 2013) .

Son rôle essentiel est dans le métabolisme intermédiaire (figure 3) entre le sang et l'hépatocyte ; on peut citer :

- Métabolisme des glucides (Arias *et al.*,2009 ; Valdiguié ,2001) ;
- Métabolisme des lipides ( Racine,2009 ) ;
- Métabolismes des protéines ( Wigfull et Bellamy,2000) ;
- Métabolisme des vitaminique (Campbell *et al.*,2004 ) ;
- Métabolisme du fer et des oligoéléments ( Alberts *et al.*,1991) .



**Figure 3 : Les fonctions du foie**  
( Koolman et Röhm, 1994)

### I.3. Les cellules hépatiques :

Le foie est doté de cellules parenchymateuses (les hépatocytes) et de quatre types cellulaires non parenchymateux lui conférant une hétérogénéité cellulaire (**Tableau I**).

Type cellulaire	Nombre (%)	Volume (%)
Hépatocytes	60-65	78
Cellule endothéliales	15-20	2,8
Cellules de Kuppfer	8-12	2,1
Cellule d'Ito	3-8	1,4
<i>Pit cell</i>	<2	-

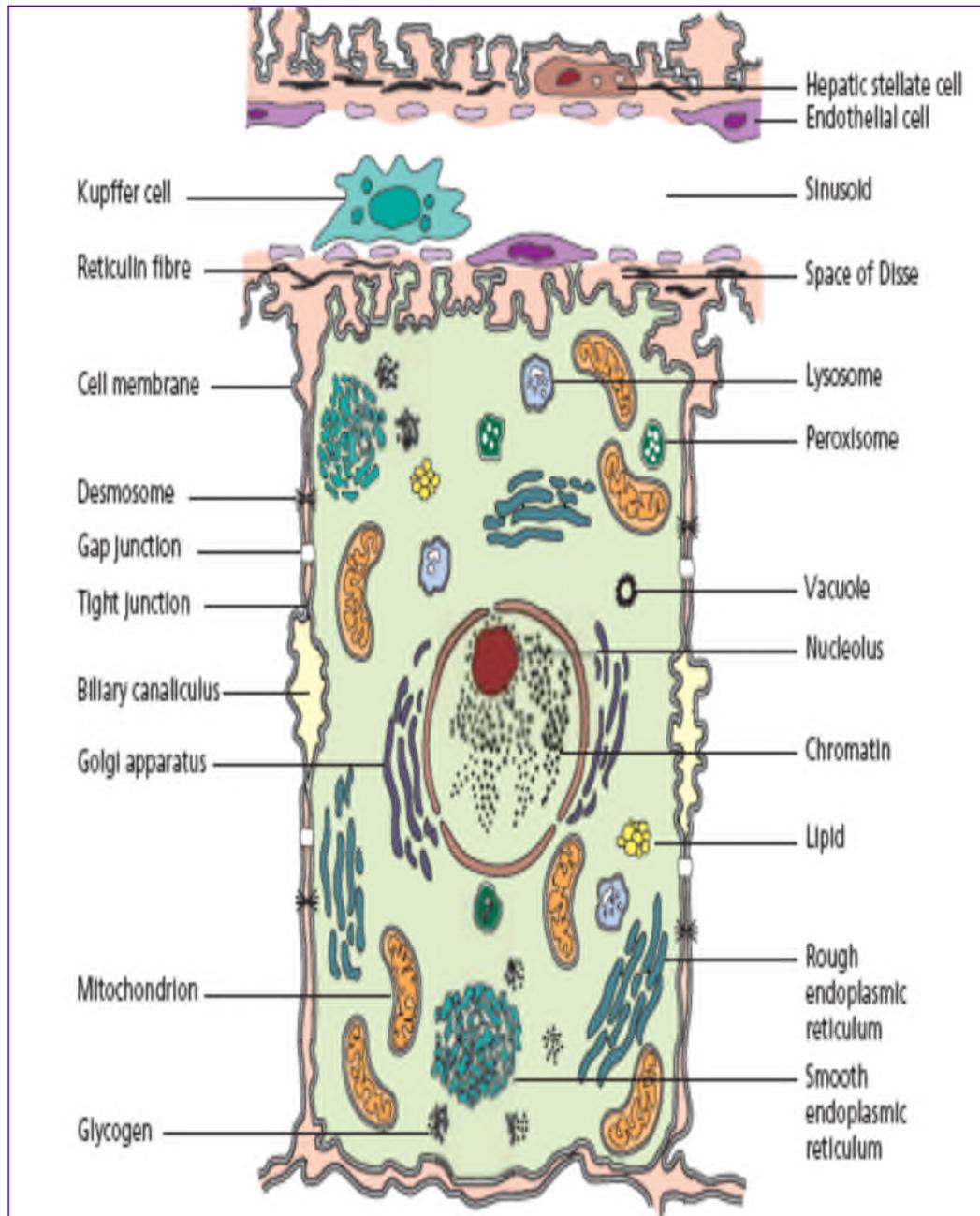
#### I.3.1. Les cellules non parenchymateuses :

Différents types de cellules hépatiques contribuant à la régulation des fonctions hépatocytaires et réparent les lésions tissulaires.

- **Cellules endothéliales sinusoidales** : ces cellules bordent la sinusoïde et permettant les échanges de petites molécules entre le sang et les hépatocytes.
- **Cellules kupffer (macrophage)** : ces cellules sécrètent des cytokines, des enzymes lysosomiales et génèrent des espèces activées de l'oxygène.
- **Cellules étoilées ou Ito**: les vacuoles lipidique du cytoplasme sont riche en vitamines A, 80% de vit A ; différent constituants de la matrice extracellulaire sont synthétisés par ces cellules.
- **Cellules lymphocytes granulaires**: Elles sont impliquées dans la défense antivirale et antitumorale.
- **Les cellules épithéliales biliaires** : ce sont les cellules polarisées qui constituent le canal biliaire elles concourent à la sécrétion de la bile. (**Benhamou et Erlinger ,2008 ; Rosenbaum et al ., 1991 ; Alberts et al.,1991**).

### I. 3.2. Les hépatocytes :

Les cellules principales fonctionnelles du foie. Ils sont en lieu étroit soit avec les sinusoides permettant des échanges avec le sang par l'espace de disse et forment à une de leurs pôles avec un hépatocytes (**figure 4**) adjacent le canalicule biliaire (**Rosenbaum et al .,1991 ;Stevens et Lowe ,2006**). Ils sont responsables de la synthèse, de la dégradation et du stockage d'un grande nombre de substances ( **Racine,2009 ; Valdiguié,2001** )



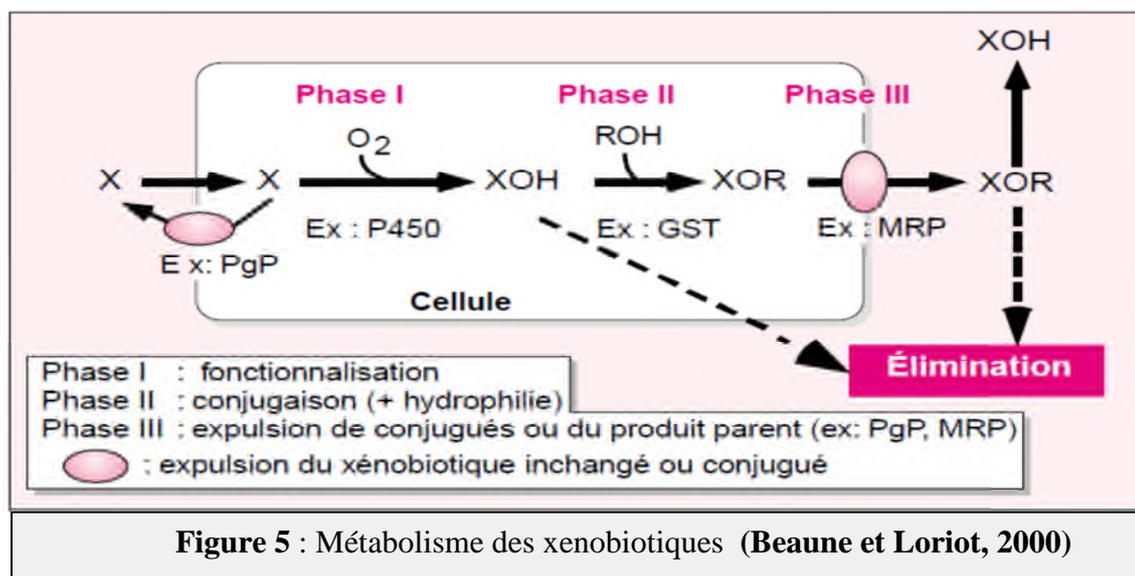
**Figure 4** : Les cellules hépatiques (Sherlock et Dooley, 2002).

#### I.4. Rôle du cytochrome P450 dans la métabolisation des xéno-biotique et dans l'élimination des toxiques :

L'organisme humain comme celui des autres espèces animales est fréquemment exposé à des composés potentiellement toxiques et est capable de métaboliser activement de nombreuses substances étrangères à l'organisme, polluants chimiques, médicaments et autres xénobiotiques. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, dont les cytochromes P450 (Cyt P450), jouent un rôle central dans la biotransformation, le métabolisme et/ou la détoxification de composés étrangers à l'organisme (**Gueguen *et al.*, 2006**).

Les xénobiotiques pénètrent facilement dans la cellule s'ils sont hydrophobes, mais ils peuvent également en être expulsés via des pompes telle la pompe glycoprotéine (PgP) produit du gène multi drug resistance (mdr). Les xénobiotiques sont alors pris en charge par des enzymes de phase I, dits de fonctionnalisation, dont les plus importants sont les Cyt P450 qui catalysent une réaction de monooxygénation (**Beaune,2008**) (**figure 5**)

Les enzymes de phase II conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement (glutathion, acide glucuronique, méthyle, acétyl...), dont le rôle est soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, amine, aldéhyde), soit de rendre le xénobiotique hydrophile afin de faciliter son élimination par l'organisme. Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté à travers la membrane cellulaire par des protéines de phase III, telles que le transporteur multidrug related protein ( mrp) (**Beaune et Lorient, 2000 ; Keppler,1999**). Le métabolite ainsi produit pourra soit être éliminé dans la bile ou les urines, soit, après transport dans le sang ou dans la bile, être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus (phase IV) (**Badawi *et al.* ,1996**). Cette classification est destinée à clarifier la compréhension du métabolisme complexe des xénobiotiques. Toutes les étapes ne sont pas obligatoires et le métabolisme de chaque composé est particulier. (**Beaune et Lorient, 2000** )



# *Chapitre II*

*Klipal*

Les xenobiotiques les plus couramment décrits comme hépatotoxiques sont les médicaments. Plus de 1100 médicaments sont susceptibles d'être hepatotoxiques. La majorité des hepatopathies medicamenteuses sont liées à la transformation du médicament en un métabolite réactif. Le klipal en est le parfait exemple (**Rouas, 2010**), il suffit simplement d'ouvrir les pharmacies de nos concitoyens pour se rendre compte que le dernier ressortissant de la classe des anilines, le paracétamol (Klipal), est devenu l'antalgique et l'antipyrétique le plus utilisé (**David et al., 2010**).

### **II.1. Définition et dénomination de Klipal :**

Klipal codéine 300mg/25 mg, comprimé contient : Paracétamol (300 mg), Phosphate de codéine h mihydrat  (25mg), de magnésium, métabisulfite de sodium (E 223), pour un comprimé. Est un antalgique p rifirique, utilisé pour des douleurs d'intensité faible à modérée (**Bich et Dang, 2009**) Selon les données IMS (**2009**): La spécialité KLIPAL CODEINE 300 mg/25 mg a fait l'objet de 53 000 prescriptions.

### **II.2. Pathologies liées à la prise de Klipal :**

Le paracétamol est à l'origine d'une hépatite cytolytique dose-dépendante bien connue. Celle-ci s'associe dans certains cas à des atteintes moins bien connues, comme une insuffisance rénale, une pancréatite aiguë, une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou une thrombopénie (**Mégarbane et al., 2007**)

### **II.3. Le paracétamol :**

Le paracétamol, aussi appelé acétaminophène, est la substance active de nombreuses spécialités medicamenteuses de la classe des antalgiques antipyrétiques non salicylés. Il est indiqué dans le traitement symptomatique de la fièvre et des douleurs d'intensité faible à modérée, seul ou en association à d'autres analgésiques, il est dépourvu de propriétés anti-inflammatoires et n'agit pas sur l'agrégation plaquettaire (**Bich et Dang, 2009**) .

### II.3.1. Structure et nomenclature de paracétamol :

La molécule est constituée d'un cycle benzénique, substitué par un groupement hydroxyle et par un groupement amide en position *para* (Figure6) (Rouas, 2010).

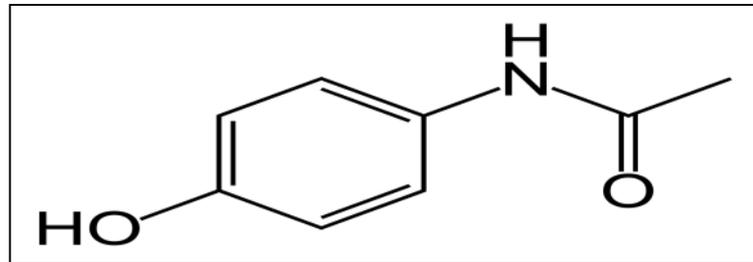


Figure 6 : La structure chimique de paracétamol (Rouas, 2010)

### II.3.2. Métabolisme de paracétamol :

une très faible quantité de paracétamol reste sous forme inchangé, 90% seront métabolisés dans le foie en glucuro et sulfo conjugué et moins de 10% métabolisme oxydative par cypt450 en N-acetyl-benzoquinoneimine (NAPBQI) ( Figure7).

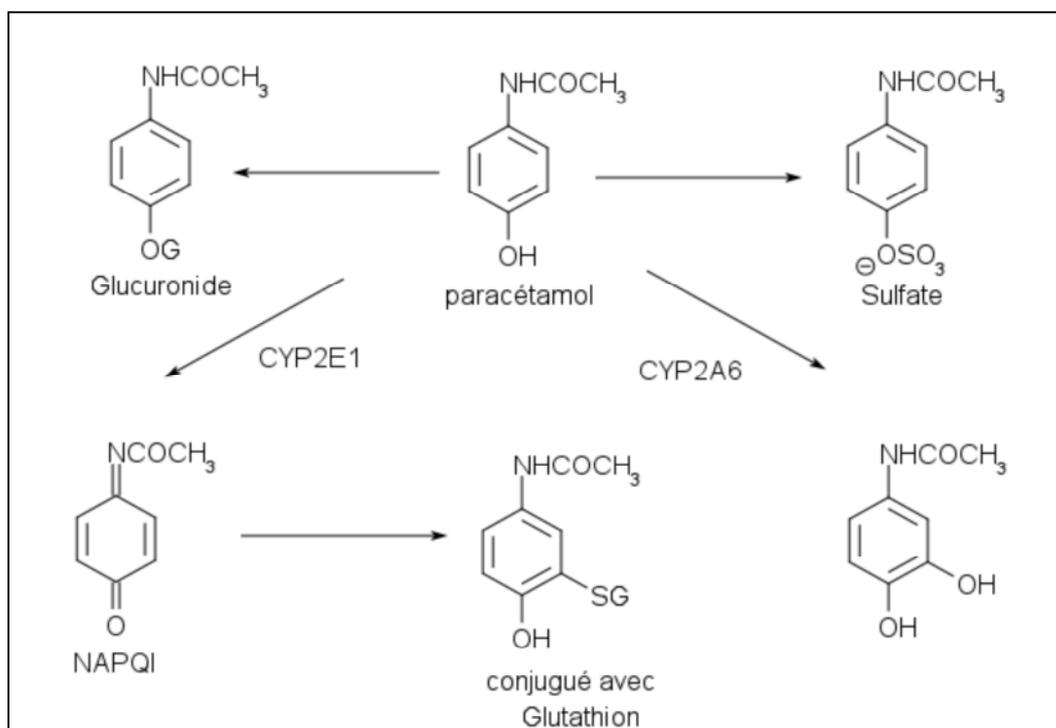


Figure 7 : différents métabolisme de paracétamol (Anonyme1 , 2009)

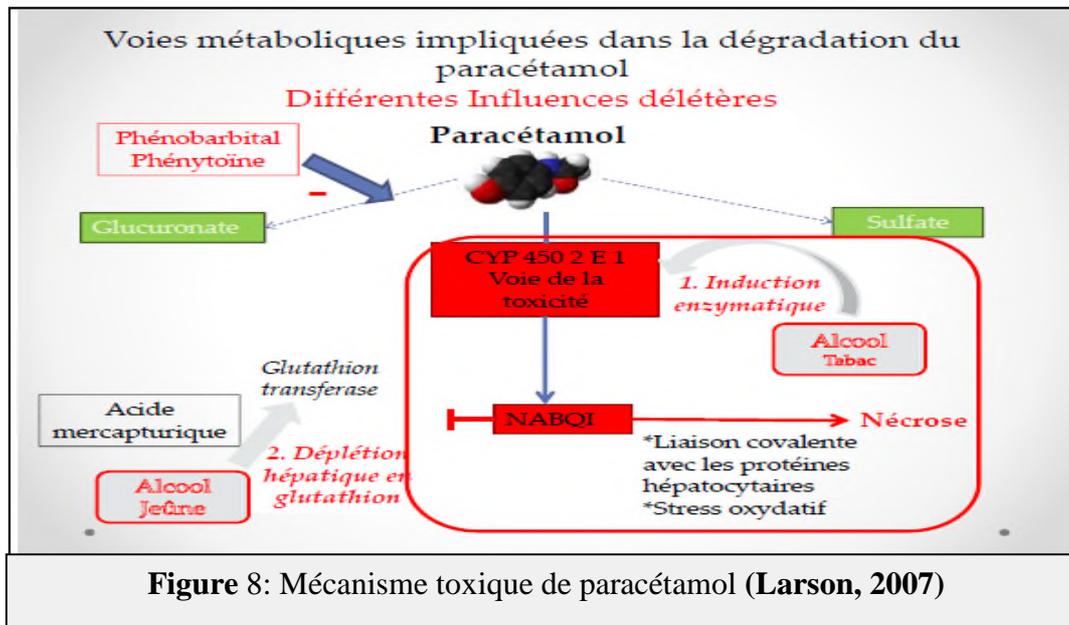
### II.3.3. Mécanisme d'action toxique de paracétamol :

Le métabolisme du paracétamol est hépatique : glucuroconjugaison (60 à 80 %) et sulfoconjugaison (20 à 30 %) ;

Moins de 5 % sont éliminés sous forme inchangée dans les urines ;

Une très faible proportion subit une oxydation microsomale impliquant le cytochrome P450, produisant la N-acétyl-benzo-quinone-imine qui va être détoxifiée par le glutathion réduit et en cas d'intoxication par le paracétamol (**Figure 8**), la sulfoconjugaison est saturée au-delà de 3 à 5g, la glucuroconjugaison au-delà de 10g, l'oxydation microsomale et la détoxification par le glutathion au-delà de 15g .

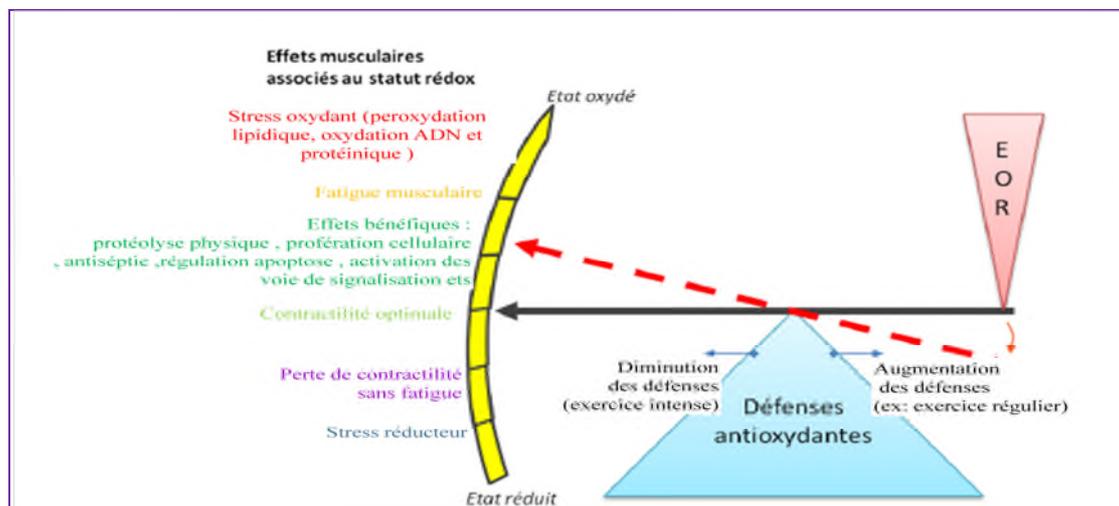
La N-acétyl-benzo-quinone-imine est alors formée en excès, se fixe sur les protéines cellulaires et entraîne une nécrose hépatique (**Larson, 2007**).



*Chapitre III*  
*Stress oxydatif et*  
*antioxydant*

### III.1. Stress oxydatif :

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques (**figure 10**) associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (**Guinebert et al., 2005**). défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées (EOA) ou espèce réactif de l'oxygène (ERO), suite à un déséquilibre (**Figure 9**) lié soit à une production accrue de ces dernières soit à une diminution de la capacité de défense antioxydant (**Sies, 1991**).



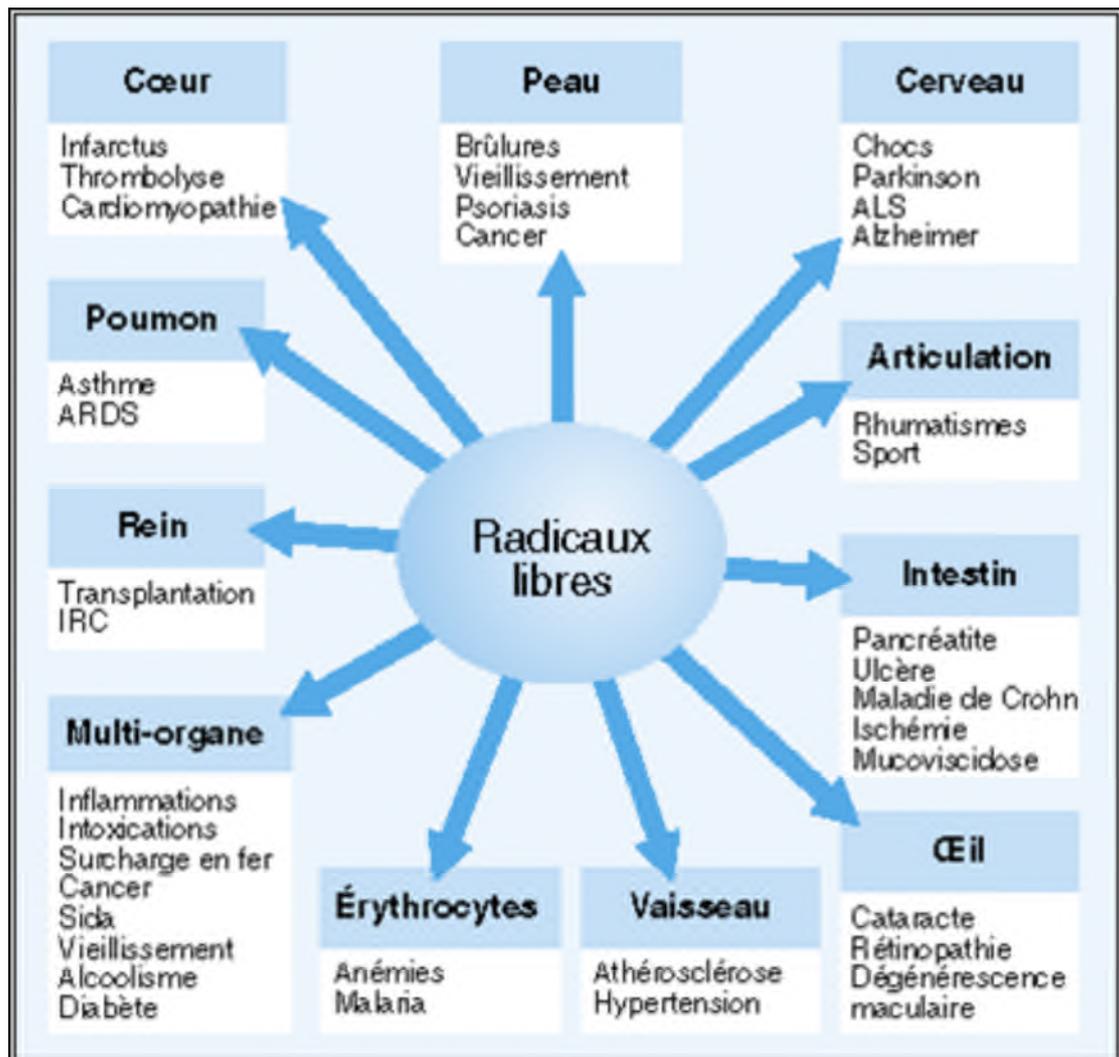
**Figure 9** :Représentation schématique de la modification du statut redox (**Niess et Simon, 2007**).

Dès lors le stress oxydant cellulaire apparaît comme une sorte de syndrome biochimique commun à toutes les cellules, correspondant à un dépassement des défenses antioxydantes par des molécules pro oxydantes (**Grandjean, 2005a.,Brigelius-Flohé, 2009**).

Le stress oxydatif a été impliqué dans un certain nombre de maladies chroniques, dont les maladies coronariennes et le cancer, et les études ont établi un lien entre un faible taux sanguin de nutriments antioxydants (par exemple, le bêta-carotène, la vitamine E) et un risque plus élevé d'avoir ces maladies. (**Pelli et Lyly, 2003**).

**Powers et Jackson (2008)** reprend dans son article de synthèse les 4 aspects nécessaires à la caractérisation d'un état de stress oxydant dans la cellule:

- 1) formation de molécules réactives, oxydantes ;
- 2) dommages oxydants aux composants macromoléculaires de la cellule supprimer ;
- 3) diminution des espèces antioxydantes ;
- 4) déséquilibre dans le statut redox.



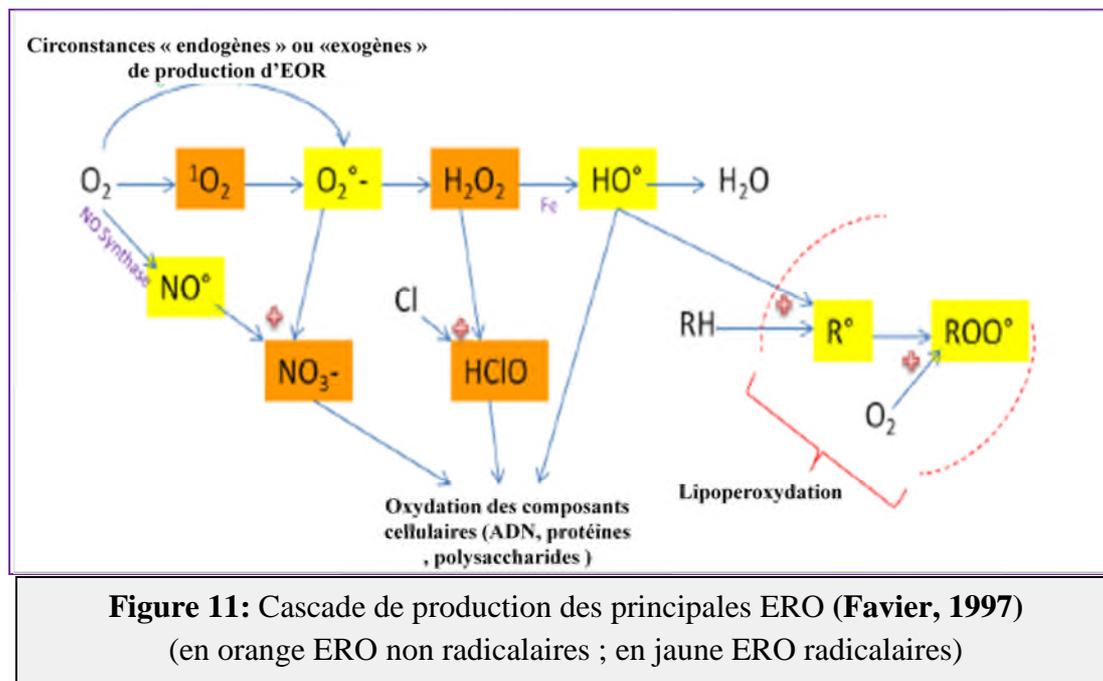
**Figure 10:** Exemples d'affections rencontrées chez l'homme causées par les ERO, classées par organe cible (Favier, 1997)

### III.2. Les radicaux libres :

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié sur leurs orbites externes (Afonso *et al.*, 2007). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. (Dacosta, 2003).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie (Pham-Huy *et al.*, 2006) et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxy  $\text{ROO}\cdot$ , radical alkoxy  $\text{RO}\cdot$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ERO). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut (**Figure 11**) les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ , monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singlet  $^1O_2$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , peroxyde nitrite  $ONOO^-$  (**Favier, 2003**).

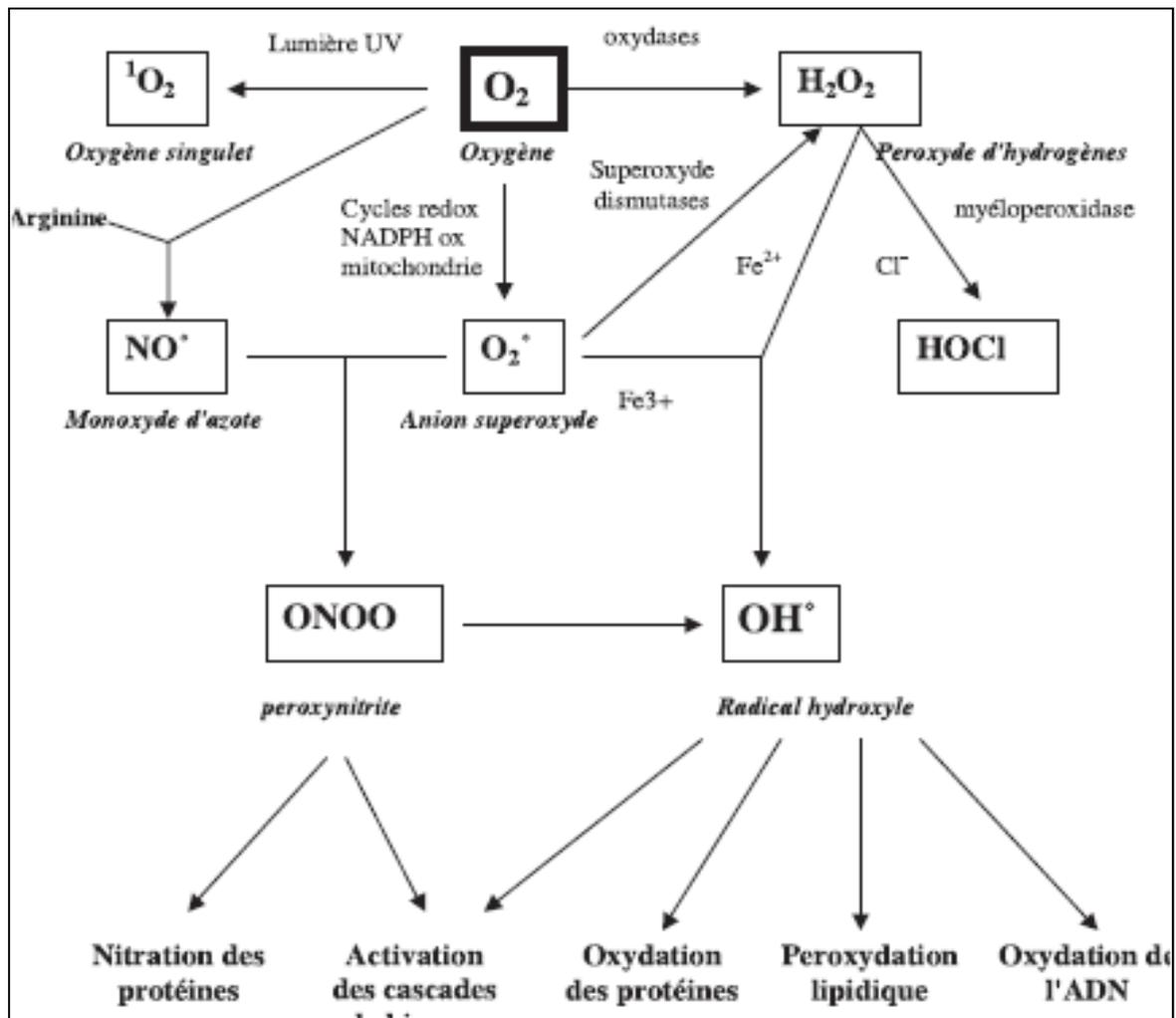


### II.2.1. Propriétés et origine :

#### a-propriétés:

Toutes ces espèces réactives partagent la même propriété : elles sont relativement instables et ont de fait une durée de vie généralement très courte : leur demi-vie est de  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  sec pour les plus instables jusqu'à quelques dizaines de secondes pour  $O_2^{\bullet-}$  et  $H_2O_2$ . Leur courte durée de vie ne devrait pas permettre aux ERO d'avoir une action majeure sur la cellule. Or cela est contrecarré par leur forte réactivité et leur capacité à produire des réactions en chaîne (**Tessier et Marconnet, 1995**).

En effet chaque espèce pourra générer à son tour une nouvelle espèce Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux (**Figure 12**); ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (**Garait, 2006**).



**Figure 12:** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie. (Favier, 2003)

La théorie des radicaux libres propose que les dérivés oxygénés des radicaux libres (DROs) soient responsables de dommages cellulaires et tissulaires qui s'accumulent avec l'âge (Fusco et coll., 2007). L'espérance de vie est déterminée par des dommages mitochondriaux causés par ces radicaux libres (Harman, 2001).

### B-origines :

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres (Hadi, 2004), tels que les rayonnements UV, les polluants, les produits chimiques (Hadi, 2004 ; Kumar et al., 2008), l'ingestion d'alcool (Hadi, 2004), mais également produit naturellement par l'organisme au cours de processus biologique comme la réponse immunitaire, la respiration mitochondriale (Edeas, 2005), au niveau de certains organites cellulaires tel que le peroxysome et par diverses oxydase cellulaires (Hadi, 2004) (elles peuvent se résumer selon Pastre dans le Tableau II).

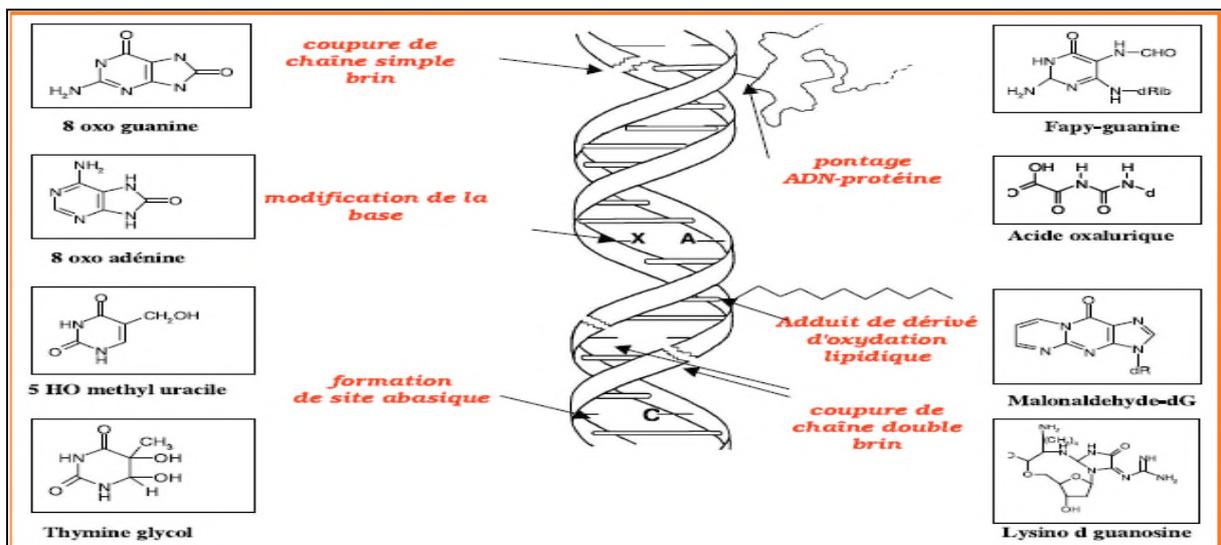
Tableau II: Principales sources de production des radicaux libres. (Pastre, 2005)	
Sources endogènes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries)</li> <li>• Cellules phagocytaires</li> <li>• Métabolisme de l'acide arachidonique</li> <li>• Système xanthine/Xanthine oxydase</li> </ul>
Sources exogènes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rayonnement électromagnétique</li> <li>• Métaux de transition</li> <li>• Pesticides</li> <li>• Médicaments...</li> </ul>

**III.2.2. Dommages macromoléculaires occasionnés par les ERO :**

Les cibles principales sont l'ADN et les lipides membranaires, et de manière moins importante les protéines et les glucides. (Lenzi, 2011).

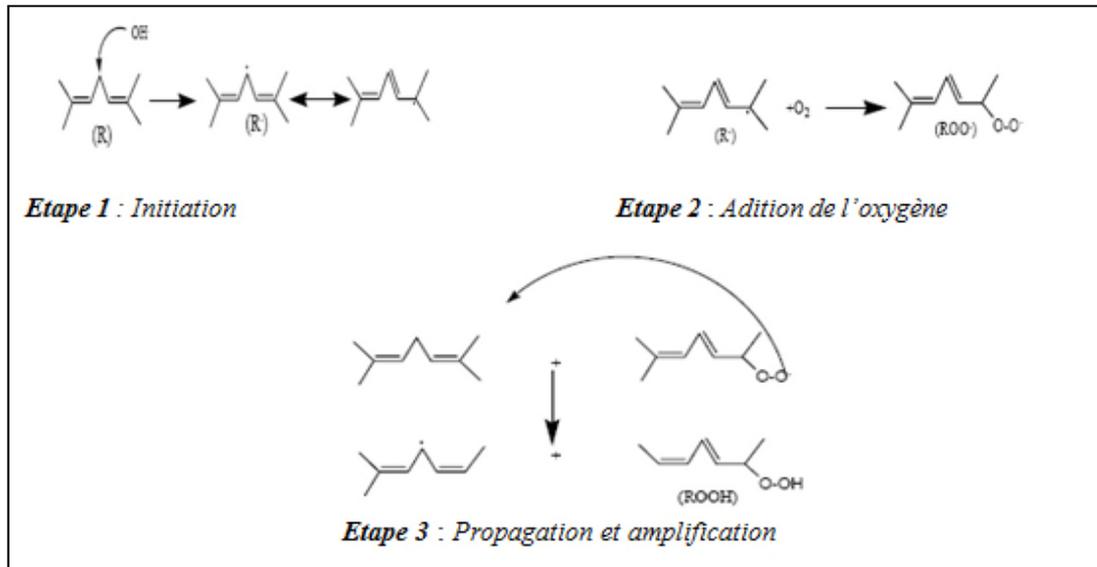
**a. Altérations de l'ADN :**

Ces attaques sont essentiellement causées par le radical hydroxyle HO<sup>•</sup> (Grandjean, 2005a), Parmi ces dommages, on peut citer les lésions des bases purines et pyrimidines, et la plus abondante des bases oxydés est la 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxodGuo) (Helbock , 1999), les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Favier, 2003) (figure 13 ).



**Figure 13:** Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003)

Correspond à une réaction en chaîne de peroxydation des lipides (**Figure 14**) cette peroxydation touche essentiellement les acides gras polyinsaturés (AGPI) constitutifs des phospholipides membranaires. Elle fragilise la chaîne carbonée, qui finit par casser (**Grandjean, 1997**).

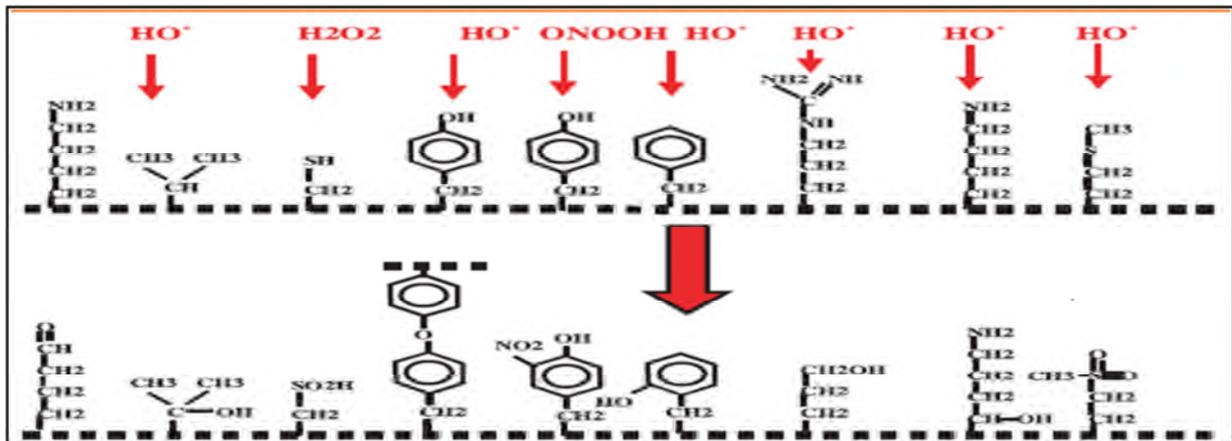


**Figure 14:** Le mécanisme de la peroxydation lipidique (**Gardès et al., 2003**)

### c. Altérations des protéines :

Les ERO provoquent une dénaturation des protéines : altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe d'où agrégation des protéines qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique (**Grandjean, 2005a**). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent une fonction thiol (SH) (**Favier, 2003**). Comme les protéines de transport qui deviennent inactivées suite à leur oxydation (**Avissar et al., 1989 ; Favier, 2003**).

Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (**Halliwell et Gutteridge, 2007**) (**Figure 15**). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, antienzyme, transporteurs, récepteurs...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (**Favier, 2003**).

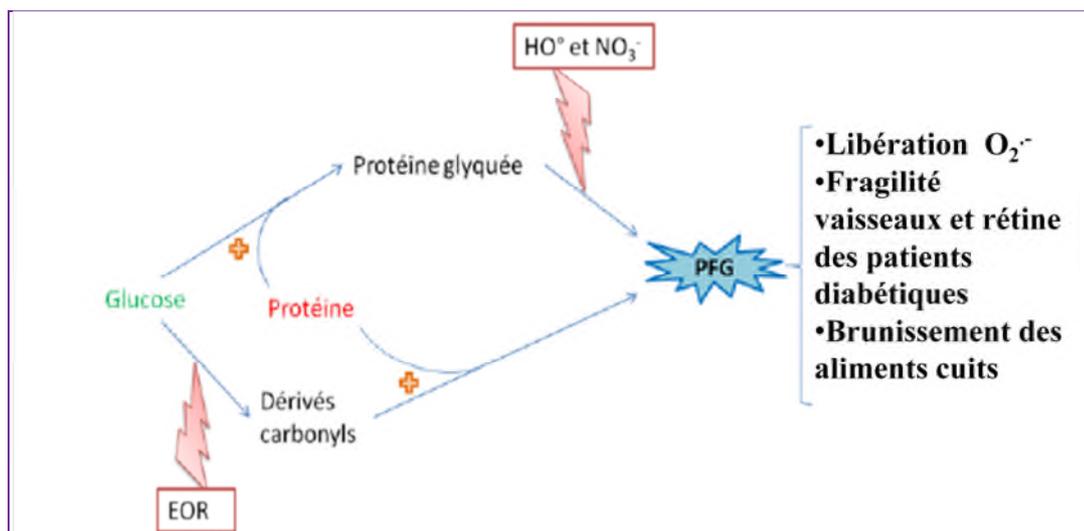


**Figure 15:** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

#### d. Altérations des polysaccharides :

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » (Figure 16) selon les deux voies :

- ✓ Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « **produits finaux de glycosylation** » ou PFG ;
- ✓ Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que  $\text{HO}^\circ$  ou  $\text{NO}_3^-$  pour former des PFG. (Halliwell et Gutteridge, 2007).



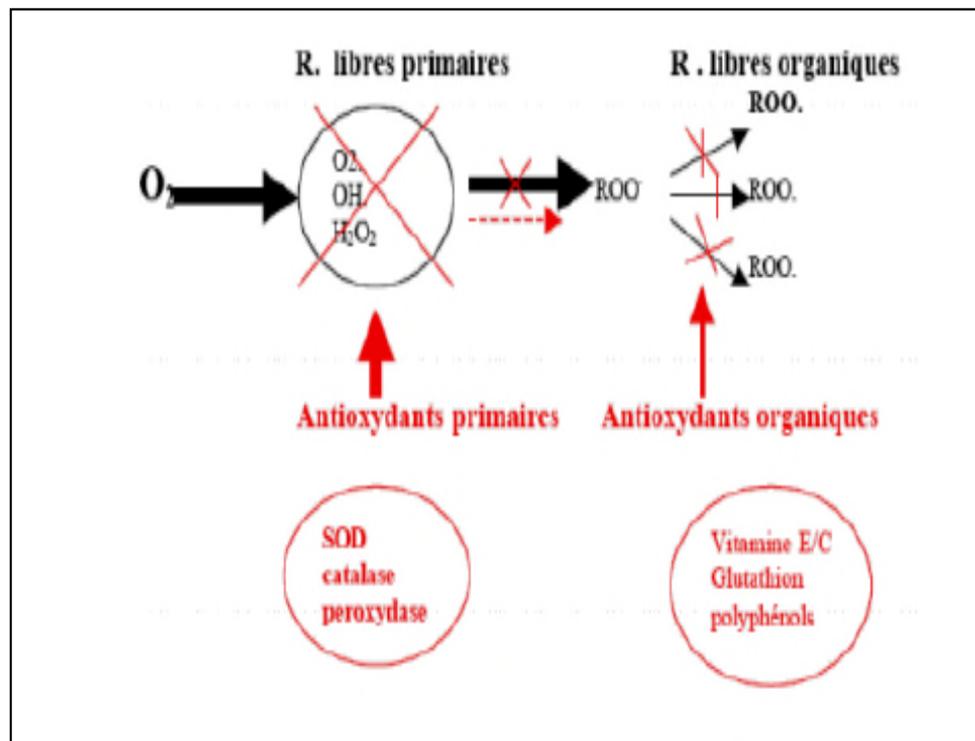
**Figure 16:** Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales (Halliwell et Gutteridge 2007).

### III.3. Les antioxydants :

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO (Favier, 2003), retarder ou prévenir l'oxydation de substrat (Van Antwerpen, 2006).

Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

Les mécanismes de défense anti-oxydante du corps humain peuvent être divisés en deux catégories différentes (Pelli et Lyly, 2003) ; système endogène ou les antioxydants primaires et le système exogène ou les antioxydants secondaires. (Figure 17).



**Figure 17 :** Les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska, 2002)

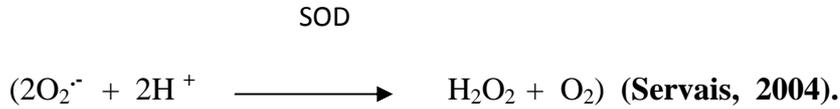
#### III.3.1. Mécanismes d'action des antioxydants :

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

**a. Mécanisme d'action des antioxydants enzymatiques :**

❖ **les superoxydes dismutase (SOD) :**

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène (**Mates et al., 1999 ; Milane, 2004**). donc elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction :



Elle assure, ainsi, la première ligne de défense contre le stress oxydant, et le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera les superoxyde-dismutases (**Mates et al., 1999 ; Milane, 2004**):

- SOD à manganèse (Mn-SOD) : protège la mitochondrie.
- SOD à cuivre zinc, protège le cytosol (cCu-ZnSOD)
- La face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD).
- Le plasma sanguin (pCu-ZnSOD).

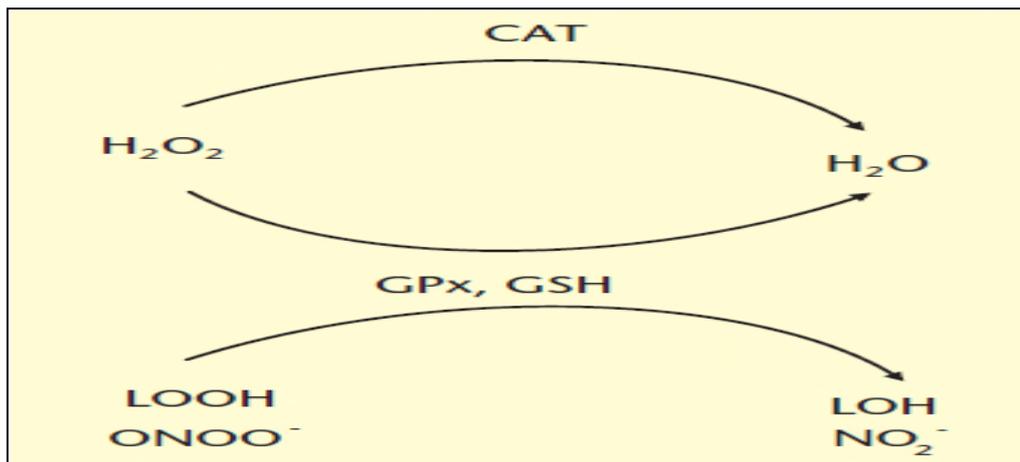
❖ **les catalase (CAT) :**

La catalase est une enzyme répartie dans les tissus (**Milane,2004 ; Borg et Reeber, 2008**). Elle catalyse la décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction suivante :



Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'a pas de charge à sa surface ce qui le rend très lipophile et peu réactif en milieu aqueux. Le peroxyde d'hydrogène peut néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité, associée à sa capacité à traverser les membranes biologiques, fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse (**Marfak, 2003**). La CAT est localisée principalement dans le peroxysome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme, la GP<sub>X</sub> et la CAT permettent ainsi l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (**Servais, 2004**).

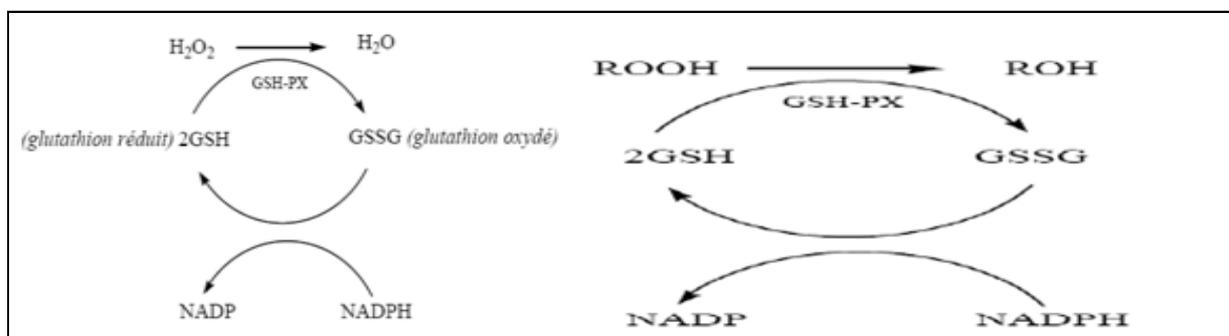
Toute fois la CAT semble jouer un rôle plus important en présence de forte concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alors que la GP<sub>X</sub> prend en charge le hydroperoxydes et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> même en faible quantité, pour lesquels elle est considérée la source majeure de protection (**Avissar et al., 1989 ; Borg et Reeber, 2008 ; Milane,2004**).



**Figure 18 :** Enzymes impliquées dans l'élimination des hydroperoxydes (Cillard, 2006)

- ❖ **peroxydase (GSH-Px) :** Ses enzymes sont sélénio-dépendantes contenant 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine (Milane, 2004). Elles se trouvent dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau. Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure (Favier, 2003 ; Servais, 2004). Détruisent non seulement  $H_2O_2$ , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol (Favier, 2003).

L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase qui utilise le NADPH comme donneur d'électron, c'est pourquoi le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule (Mates *et al.*, 1999 ; Servais, 2004).



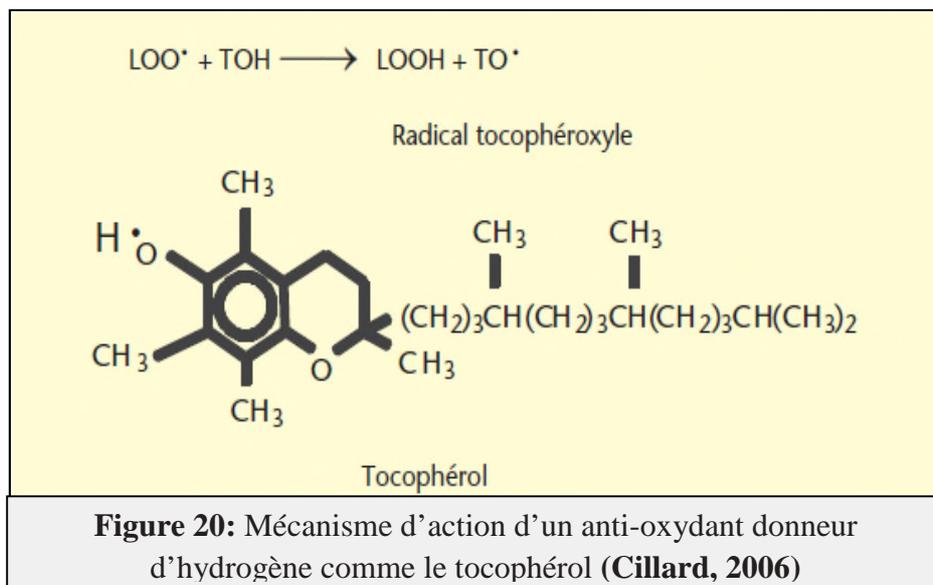
**Figure 19 :** Enzymes impliquées dans l'élimination des hydroperoxydes et le peroxyde d'hydrogène (Favier, 2003)

### b. Mécanisme d'action des antioxydants non enzymatiques :

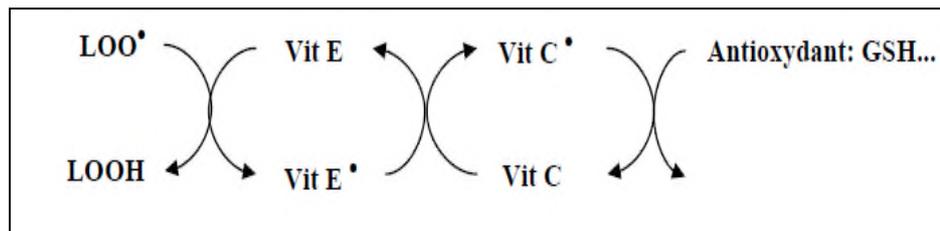
Les antioxydants non enzymatiques réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent (Servais, 2004).

#### ❖ La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) :

$\alpha$ -tocophérol est fixée aux membranes et stoppe la chaîne de réaction de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique ( $\text{LOO}\cdot$ ). La vitamine E devienne alors à son tour un radical moins réactif que  $\text{LOO}\cdot$  Et peut être prise en charge facilement par une autre molécule antioxydant (Servais, 2004) (Figure 20).



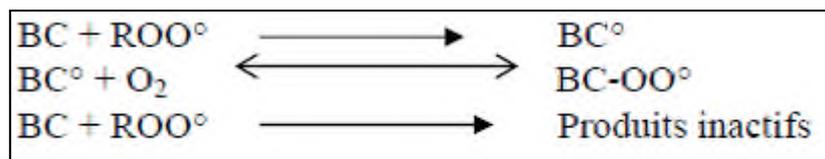
- ❖ **La vitamine C (acide ascorbique) :** La molécule d'acide ascorbique et sa forme déprotonée, l'ascorbate (présent majoritairement à pH physiologique), est agent réducteur. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles  $\text{OH}\cdot$  mais aussi avec l'anion superoxyde  $\text{O}_2\cdot^-$  et les radicaux peroxydes  $\text{RO}_2\cdot$  en réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate ( $\text{AscH}^-$ ) est oxydé en radical ascorbyle ( $\text{Asc}\cdot^-$ ) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques (Favier, 2003). Par conséquent, à l'opposé du radical thiyle  $\text{GS}\cdot$  susceptible d'initier de nombreuses réactions secondaires, le radical ascorbyle  $\text{Asc}\cdot^-$  ne développe pas de réactions ultérieures dommageables (Gardès et al., 2003). Une propriété importante de l'ascorbate est la « réparation » possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TH) à partir de leurs formes radicalaires. L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (Halliwell et Gutteridge, 2007) (Figure 21).



**Figure 21:** Exemple de réaction antioxydantes en chaîne mettant en jeu le vit E et C (Servais, 2004)

❖ **Caroténoïdes :** Les caroténoïdes sont de grande famille qui regroupe plus de 600 molécules, et la molécule la plus importante et la plus connue des caroténoïdes est la  $\beta$ -carotène (Pastre, 2005). Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes:

- Ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :



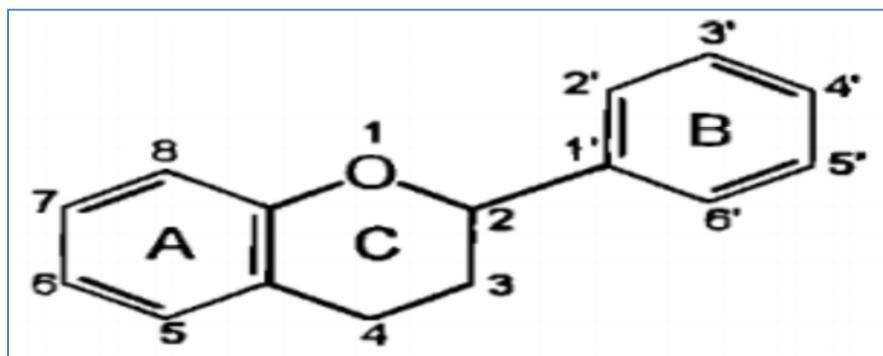
- Ils empêchent l'initiation des réactions radicalaires en neutralisant l'oxygène singulet. (Pastre, 2005).

❖ **Les composés phénoliques :** Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement ( Xu et al., 2007 ; Milde et al., 2004).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles libre ou engagées dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Kasote, 2013). Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix et al., 2005).

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000). Et cette classification des composés phénoliques se base sur la complexité de leur squelette carboné de base (Dai et Mumper, 2010; Mamoudou et al., 2006)

- **Phénols simples** : Les phénols simples désignent les composés ayant un seul cycle phénolique monosubstitué (Bruneton, 1993).
- **Acides phénoliques** : Les acides phénoliques sont des composés possédant une fonction acide carboxylique en plus de la fonction phénols (Shahriar, 2010).
- **Les flavonoïdes** : Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels, ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir deux noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocyte oxygéné (C) (Balasundram et al., 2006 ; Tsao et deng, 2004) (Figure 22) .



**Figure 22:** squelette de base des flavonoïdes (Saraf et al., 2007)

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo-γ-pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Krishna et al., 2001).

La classe des flavonoïdes ont été isolées et identifiées à partir des milliers des plante (Forkmann et Martens, 2001), qu'en divise en plusieurs catégories : Les flavones, les flavonols et les dihydroflavonols, les isoflavonoides, les biflavonoides, les flavanones, les





*Chapitre IV*

*Rhamnus alaternus L*

**IV.1. Description de *Rhamnus alaternus L*:**

*Rhamnus alaternus L* appelé localement « meliless » est un arbuste toujours vert (**Figure25**), Ces feuilles alternes ovoïdes-lancéolées, longue de 1 à 6m sur 3cm de large (**Belouad, 2001**).



**Figure 25** : l'arbuste de *Rhamnus alaternus*

Fleurit pendant la fin de l'hiver et les débuts du printemps (**Gulias et al., 2004**) fleurs petites d'un jaune verdâtre, en grappes axillaires, plus longue que le pétiole ,un calice à 5 lobes lancéolés, pétales nuls, baies petites, rouge puis noires à maturité et des Pulpes brunâtre renferment 4 noyaux (**Belouad,2001 ; Lucienne,2013**) .ses fruits charnus mûrissent à la fin du printemps et début de l'été. (**Gulias et al., 2004**). Il s'agit d'une plante rustique qui pousse dans une variété de types de sols, y compris les dunes de sable, escarpements et les milieux riverains et généralement trouvé dans les zones de réception supérieure à 500 mm de pluie (**Further Information, 2006**). D'origine méditerranéenne (**Bas et al., 2005 ; Passalacqua et al.,2006**)



**Figure 26** : fleures et fruits de *Rhamnus alaternus*

C'est une espèce adaptable difficile, qui tolère le froid, le plein soleil et les périodes de sécheresse saisonnière (**Further Information, 2006**). quand elle est séchée, elle se conserve à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la poussière (**Lucienne, 2013**).

#### IV.2. Les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus* :

Les noms vernaculaires de nerprun sont indiqués dans le **tableau III**

**Tableau III** : Les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus L* :

	Noms (références)
Noms communs	Nerprun, bourge épine ( <b>Lucienne, 2013</b> )
Noms targui et kabyle	Ajroutdj, Khalis n'imidekh Amliles ( <b>Belouad, 2001</b> ).
Noms arabe	Mliless ( <b>Belouad, 2001</b> ).
	Ouchbat el safar ( <b>Said et al., 2002</b> )
	Oud el khir ( <b>Ben ammar et al., 2008 ; Ben ammar et al., 2009</b> )
Noms français	Alaterne (sanguin blanc) ( <b>Anonyme, 2008</b> )
	Nerprun méditerranéen ( <b>Izhaki et al. 2002</b> )
Noms anglais	Evergreen buckthorn ( <b>Bas et al., 2005b ; Affek et Yakir, 2003</b> )
	Italian buckthorn, Mediterranean buckthorn ( <b>Anonym, 2008</b> )

#### IV.3. La classification botanique de *Rhamnus alaternus L*:

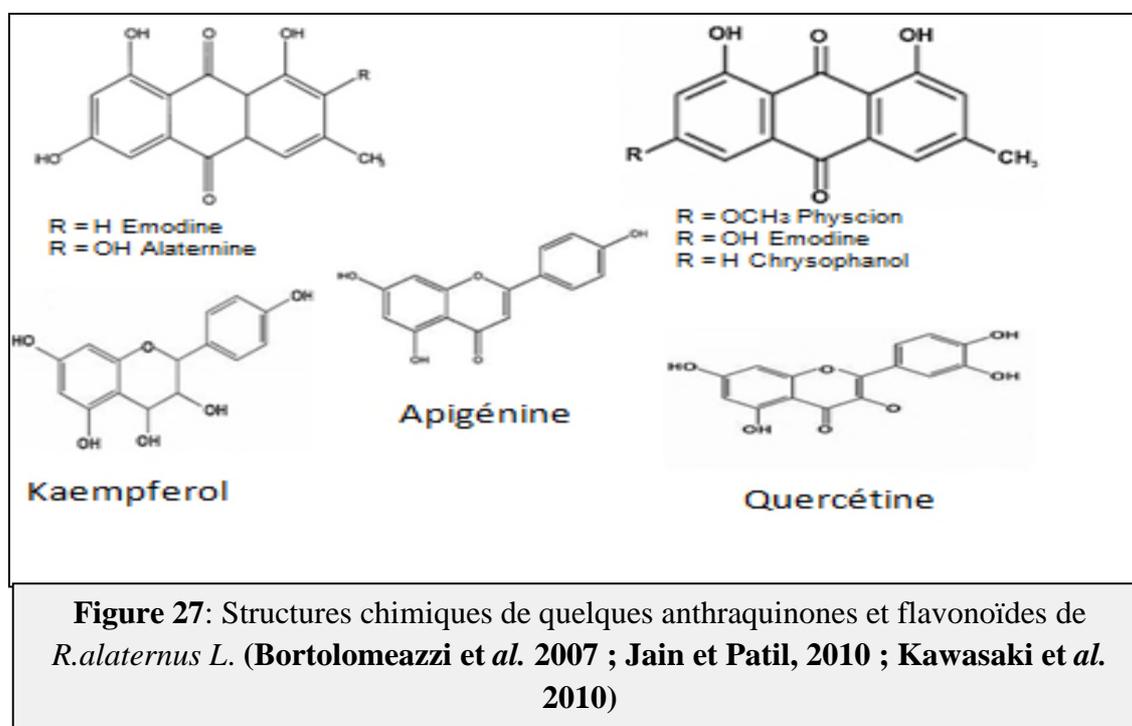
La classification botanique de *Rhamnus alaternus L* est résumée dans le **tableau IV**

**Tableau IV**: Classification botanique de *R alaternus* (**anonyme 2, 2008 ; Yi-ling et pan-kai, 1982**).

domaine	Eukariota=eucaryote
Règne	Plantae=végétal
Sous règne	Viridiaeplantae=plante verte
division	Magnoliophyta=plante à fleur
Classe	Magnoliopsida=dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Super ordre	rhamnanae
ordre	Rhamnales
famille	Rhamnaceae
genre	Reynosia
Sous genre	Rhamnus
espèce	<i>Rhmanus alaternus L</i>

IV.4. Composition chimiques de *Rhamnus alaternus L* :

L'étude phytochimique sur les extraits de la partie aérienne et les racines de *R. alaternus L* a révélé La présence de diverses quantités d'anthraquinones, de coumarines, de tannins et en particulier des flavonoïdes (**Ben Ammar et al., 2008 ;Izhaki et al,2002**).comme l'émodyne, Chrysophanol, Alaternin et le Physcion qui sont les quatre anthraquinones aglycone isolés à partir des partis aérienne de *R alaternus L* (**Izhaki et al.,2002**). Et elle contient aussi des flavonoïdes glycosylés tel que kaempferol 3-O-β-isorhamminoside, rhamnocitrin 3-O-β-isorhamminoside et rhamnetin 3-O-β-isorhamminoside (**Ben Ammar et al., 2009**) et des flavonoïde aglycones comme le kaempferol,quercétine et l'apigénine (**Ben Ammar et al., 2008 ;Ben Ammar et al., 2009**).Elle est aussi riche en flavones hétérosides (**Stocker et al.,2004**) et les coumarines (**Ben Ammar et al., 2005**) (**Figure 27**).



La pulpe de *R.alaternus* est composé principalement d'eau (68%), des minéraux (Fe,Zn, Mn, K, Ca, Mg , P, Cu) dont le plus abondant est le K (12.90%), des lipides, protéines et les fibres (cellulose, hémicellulose et lignine).Les fruits relativement volumineux de *R alaternus* contiennent plus d'eau et de P, les fruit de taille intermédiaire contiennent de lipides , Mg et de Ca et les fruits les plus petites contiennent plus de protéines, K et Zn (**Izhaki et al,2002**).

*Chapitre V*  
*Materiel et Méthode*

## V.1. Matériel végétal :

### V.1.1. Récolte et séchage :

L'étude a été réalisée sur la partie aérienne de *Rhamnus alaternus* L, que nous avons récolté au niveau du Parc National du Gouraya (PNG) la où a été faites leurs identifications. La collecte a été faite entre 7H et 11H pendant le mois de décembre 2013 et le mois de janvier 2014. Une fois récoltés (les feuilles de la plante étaient déjà nettoyées par les eaux des pluies), les feuilles fraîches de *Rhamnus alaternus* ont été séchées à l'air libre pendant 3 semaines, puis transférées à l'étuve à 40 °C pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et une meilleure extraction .

Après séchage, les feuilles et les fleurs sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique à café jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les particules ainsi obtenues après broyage sont tamisées sur un tamis de farine puis sur un tamis de diamètre de 250µm pour être sûr d'avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stocké à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à extraction (**Figure 28**).



**Figure 28** : les feuilles de *Rhamnus alaternus*.L

### V.1.2.Extrait éthanolique de la partie aérienne :

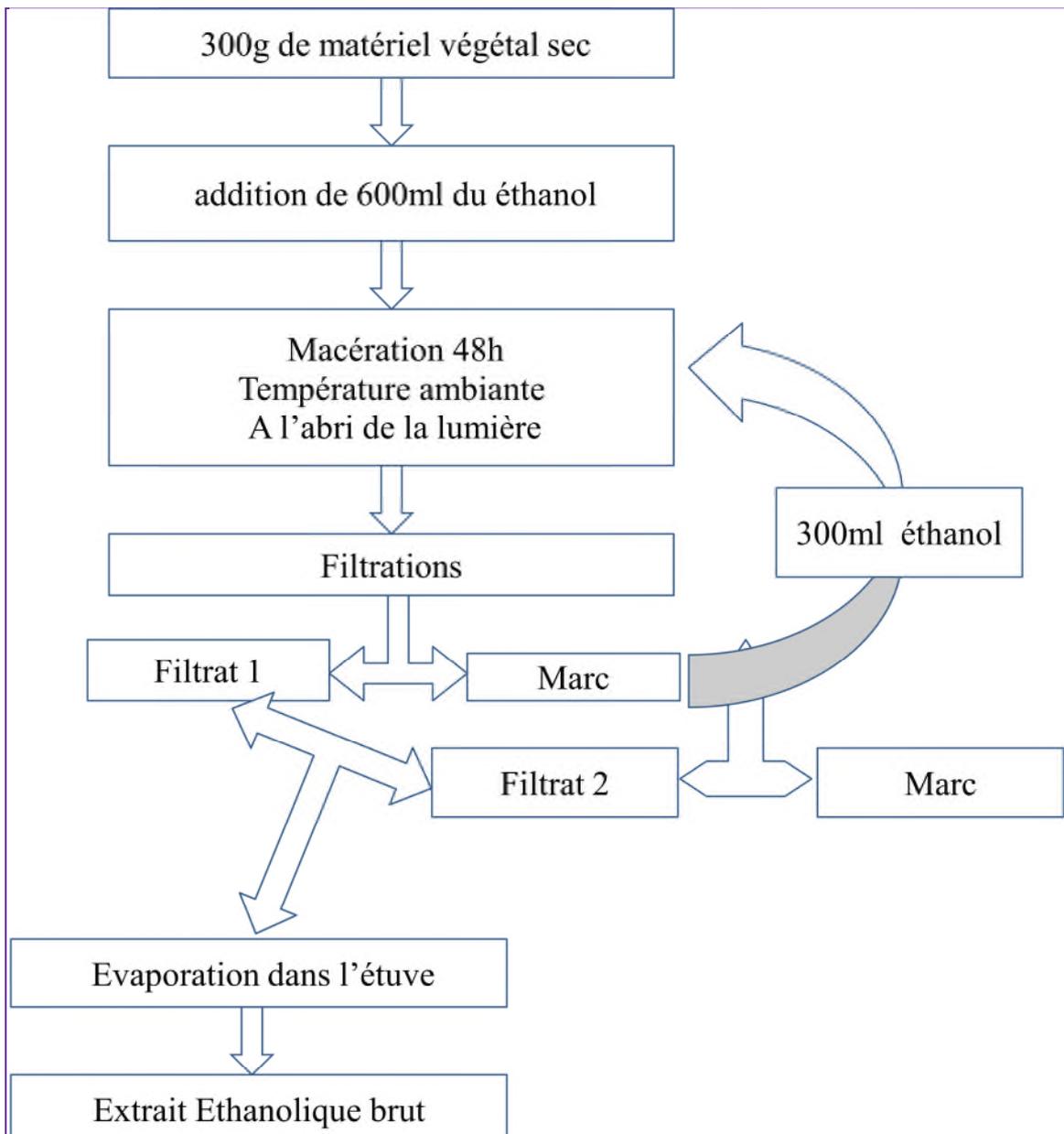
L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal selon le protocole préconisé par **Belhattab et al., (2004)** Avec de légères modifications. L'extrait éthanolique de la partie aérienne de *R. alaternus* a été préparé à partir de 300g de poudre (broyat) des fleurs et des feuilles, qui ont été mises à macérer dans 600 ml d'éthanol à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 48heures, avec un maximum d'agitation. La solution obtenue est filtré 4 fois : une fois sur la gaze, deux fois sur papier Whatman (N°3) et une fois sur du coton, le filtrat est récupéré (**extrait 1**). Ensuite, 300 ml d'éthanol ont été ajoutée pour le précipité, et le mélange a été laissé sous agitation pendant une journée (afin d'avoir une extraction exhaustive) et ensuite filtré dans les même conditions, le filtrat (**extrait 2**) est récupéré. Les deux filtrats ont été mélangés et laissés pour évaporation dans une haute à vapeur jusqu'à ce

que le poids de l'extrait reste constant et le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

$P_0$  : poids de la poudre avant extraction.

$P_1$  : poids de l'extrait sec après extraction



**Figure 29** : Protocole de préparation de l'extrait éthanolique de la partie aérienne par macération ( **Belhattab et al., 2004**).

**V.1.3. Choix de la dose :**

Les étapes de cette étude ont été menées conformément à la directive de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), Guideline-407, adopté le 03 octobre 2008. Les essais de la toxicité aiguë permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court (de 01 à 14 jours) après l'administration d'une substance. Afin d'étudier ses effets toxiques possibles ou changement du comportement ainsi que la mortalité.(Annexe 1 )

**V.2. Matériel animal :****V.2.1 Elevage des animaux :**

L'étude a été menée sur des rats wistar albinos, pesant en moyenne 250g et obtenues auprès de l'animalerie de l'Université Mentouri de Constantine. Ces rats sont installés dans les conditions standards d'alimentation (aliment granulé standard provenant de L'ONAB (Office National Alimentation Bétail),El-Kseur de Bejaïa), de l'eau de robinet, d'éclairage et de température de l'animalerie (température moyenne de 22 à 25°C) ; le temps de l'adaptation est de 17 jours.

**V.2.2. Traitement des animaux :**

Pour l'étude de l'effet hépato protectif et antioxydant de l'extrait éthanolique de *R.alaternus* sur la toxicité de Klipal, quatre lots de 5 rats ont été utilisés (**Figure 30**)

- Les animaux de premier lot reçoivent l'eau distillée par voie orale, ces animaux servent de témoin ;
- Les animaux du deuxième lot reçoivent Klipal par voie orale à une dose unique de 500mg/Kg ;
- Le troisième lot d'animaux est traité par l'extrait éthanolique de *R.alaternus* à une dose de 500mg/Kg pendant 15jours ;
- Le quatrième lot d'animaux prétraité par l'extrait éthanolique de *R.alaternus* à la dose de 500mg/Kg par voie orale durant 15 jours, reçoit le Klipal au 16<sup>ème</sup> jour à une dose unique de 500mg/Kg p.c par voie orale .



Figure 30 : Répartition des lots

### V.2.3. Administration des extraits de plantes :

Les traitements sont réalisés avec des extraits éthanolique obtenus 24 heures au plus au paravent. Les administrations se font par gavage en utilisant une sonde gastrique orale (Figure 31). Les extraits sont de ce fait on était dissous dans l'eau distillée (500mg d'extraits /kg p.c) (CCPA ,2013). Le comportement et les symptômes cliniques des rats sont notés pendant toute la durée de l'expérience.



Contention de base

Gavage

Figure 31 : Contention de base et gavage

### V.2.4. Induction de l'hépatotoxicité :

L'induction de l'hépatotoxicité a été faite par gavage d'une dose massive (500 mg/Kg) d'un médicament qui se nome Klipal. Après avoir écrasé le médicament qui se présente sous forme d'un comprimé, la poudre obtenue a été dissoute dans de l'eau distillée. Le mélange a été rapporté sur un agitateur pendant 10min puis laissé au moins une nuit avant de l'administrer à l'animal par gavage (pour avoir une bonne dilution de la poudre).

### V.2.5. Prélèvement du sang et des organes :

#### ❖ Prélèvement du sang :

Le sang a été prélevé par une ponction cardiaque ; ce prélèvement peut être effectué seulement sur un animal que l'on euthanase. Il permet de prélever la dose maximum de sang.

Les étapes (**Figure 32**) sont comme suit :

- Anesthésier le rat par le chloroforme ;
- Bien fixer sur la surface de travail ;
- Ouvrir l'animal, en allant de la ligne médiane en bas de l'abdomen où se situe la vessie vers la jugulaire ;
- Insérer l'aiguille dans le cœur de l'animal avec un angle de 30° puis tirer doucement le piston et retirer tout le sang (environ 4.5 ml) de l'animal.
- le sang a été centrifugé au niveau de l'animalerie de l'université A/mira ; le surnageant est récupéré dans des eppendorfs et transféré au laboratoire d'analyses médicales **MOUALEK .F** là où ont été réalisées les analyses biochimiques du sang.



**Figure 32** : les différentes étapes de sacrifice de l'animal

❖ **Prélèvement des organes (Foie) :**

- Après l'euthanasie de l'animal ;
- Prélèvements des organes (le foie) ;
- Rinçage des organes trois (3) fois dans l'eau physiologique (0.9% NaCl)
- Epuration des organes d'excès d'eau en utilisant un papier absorbant
- Pesée des organes (foie)
- Calcul du poids relatif (Pr) du foie pour chaque lot exprimé en pourcentage selon la relation suivante :

$$\text{Pr \%} = \frac{\text{Pf}}{\text{Prat}} \times 100$$

**Pr** : poids relatif

**Pf** : poids du foie

**P rat** : poids du rat

- Conservation des organes dans le congélateur (- 4°C)

❖ **Préparation de l'homogénats :**

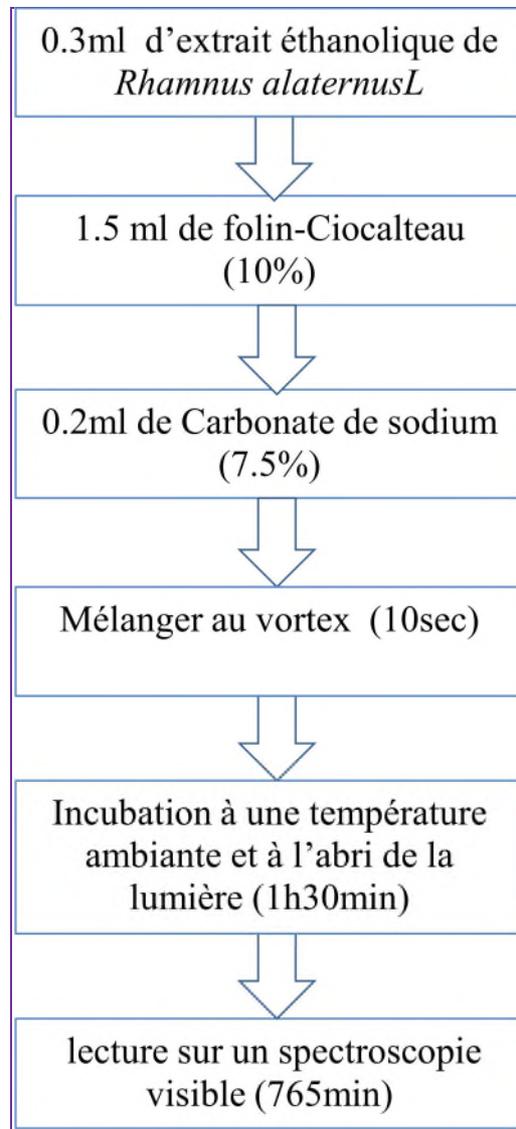
- 1g de foie de l'animal broyée à l'aide d'un mortier en présence des glaçons pour maintenir la température froide (-4°C) ;
- Rajouté 9ml de KCl (1.17%) ;
- Filtration sur une bonde à gaz ;
- Récupération de l'homogénats.

**V.3. Etudes *In vitro* sur l'extrait éthanolique de *R.alaternus L*:****V.3.1. Analyses phytochimiques :****V.3.1.1. Dosage des poly-phénols totaux :**

- **Principe** : Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Follain-Ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange jaune d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_{40}$ ) qui se réduit (**Gervaise.2004**). Dans un milieu alcalin le Follin-Ciocalteu réagit avec les composés phénoliques cette réaction est basée sur l'oxydation des phénols et la réduction des hétérocycles et la formation d'un complexe molybdène-tungstène. (**Socha et al ., 2008**) .

- **Mode opératoire :**

Afin d'estimer la quantité des polyphénols totaux contenue dans l'extrait de *R.alaternus* notre choix s'est porté sur le protocole de **Yap et al.,2009** illustré dans la **figure 33**.



**Figure 33** : Protocole expérimental de dosage des poly-phénols totaux (**Yap et al.,2009**)

### V.3.1.2. Dosage des flavonoïdes:

- **Principe :** Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres en présence du chlorure d'aluminium, grâce aux groupements hydroxyles libres (**Ribéreau-Gayon, 1968**)  
Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait (**Berset, 2006**).

- **Mode opératoire :** Le contenu en flavonoïde des extraits a été déterminé en suivant le protocole de **Quettier-Deleu et al. (2000)**, avec quelques modifications. A température ambiante, 1 ml de la solution d'extrait est ajouté à 1 ml d'une solution de chlorure d'aluminium (2%), le tout bien mélanger. Après incubation pendant 15 min, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 410 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.

### V.3.2. Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH :

- **Principe :** Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH<sup>°</sup>) est réalisé par la méthode décrite par **Ammar et al., (2009)** qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la Concentration inhibitrice à 50 % (CI50) des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H<sup>+</sup>.



Où AH est un composé capable de céder un H<sup>+</sup> au radical DPPH.

- **Mode opératoire :**

La mesure de l'activité scavenging du radical DPPH a été effectuée en suivant le protocole **de Ammar et al.,(2009) (figure 34)** avec quelques modifications.

La solution de DPPH est réalisé en ajoutant 4mg de DPPH avec 100ml de méthanol, 5ml de la solution de DPPH est mélangée avec 50µl de chaque dilution de différentes concentrations de l'extrait de *R.alaternus*. Le mélange est incubé 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm sur un spectrophotomètre contre un contrôle qui contient la solution de DPPH seul.

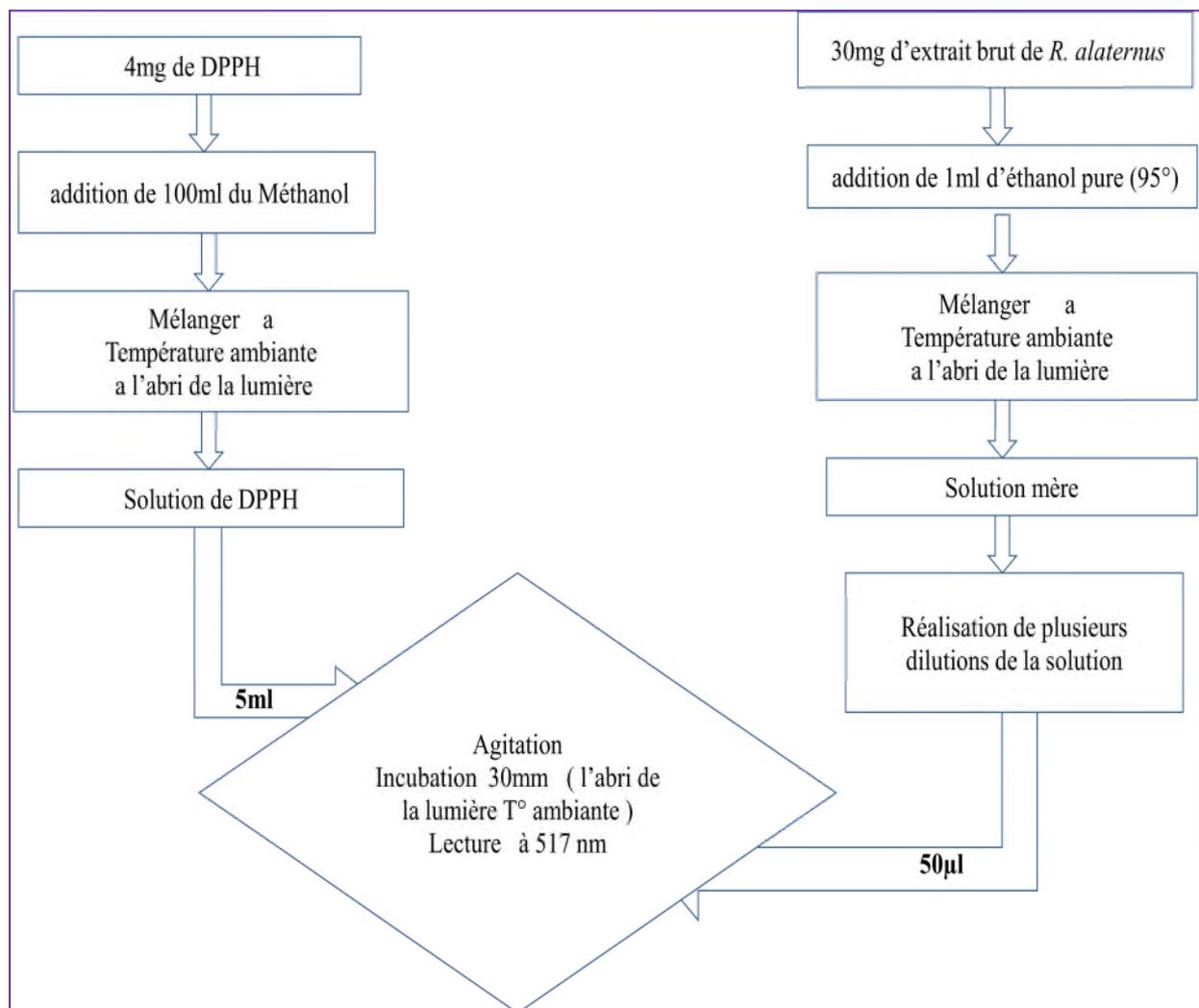
Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait de *R. alaternus.L* par le BHT comme substance de référence.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(Abs \text{ Control} - Abs \text{ Extrait}) / Abs \text{ Control}] \times 100$$

Abs : absorbance

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la CI50, sachant que la CI50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH°.



**Figure 34** : Protocole de test DPPH (Ammar *et al.*, 2009)

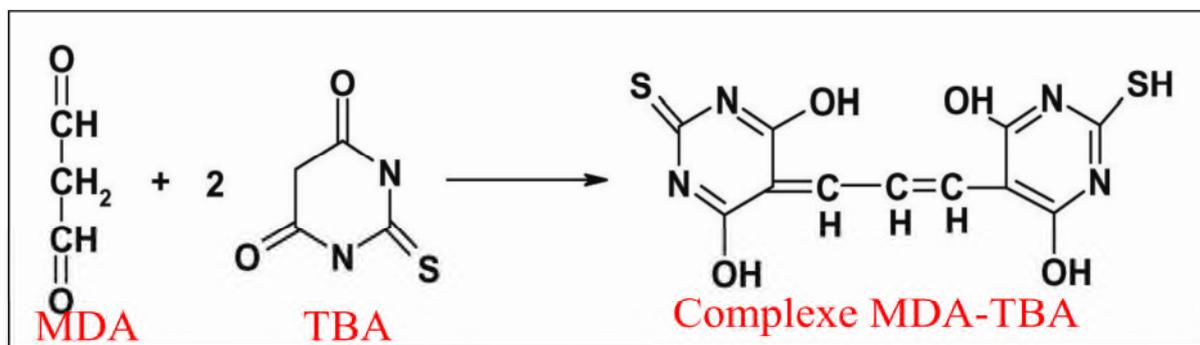
#### V.4. Etude *In vivo* de l'extrait éthanolique de *R.alaternus L* :

##### V.4.1. Evaluation des taux de malondialdéhyde (MDA) :

- **Le principe :**

La méthode la plus utilisée pour l'estimation *in vivo* de la peroxydation des lipides dans les systèmes biologiques est le dosage du malonyldialdéhyde (MDA) par la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA).

Le principe de ce test c'est la détection d'une réaction chimique secondaire d'une molécule de MDA (un radicale libre A°) avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner un pigment de couleur rose (**Figure 35**). (Okhawa *et al.*, 1979).



**Figure 35 : Réaction de MDA avec le TBA (Okhawa *et al.*, 1979)**

- **Mode opératoire :**

La mesure de l'MDA a été effectuée en suivant le protocole **Okhawa *et al.*, (1979)** .

**Les réactifs utilisés dans ce test sont :**

- |                                |                      |
|--------------------------------|----------------------|
| • Acide thiobarbiturique (TBA) | 0.67%                |
| • Acid trichloroacétique (TCA) | 20%                  |
| • n- Butanol                   | 4 ml / tube          |
| • Homogenat (foie)             | 0.5 ml / Echantillon |
| • KCl                          | 1.17%                |

Les étapes de ce test sont résumées dans le **tableau V**

Tableau V: les étapes de protocole de l'MDA selon Okhawa *et al.*, (1979).

Les réactifs	blanc	Echantillon
Homogénats	-	0.5ml
TCA (20%)	0.5ml	0.5ml
TBA (0.67%)	1ml	1ml
Eau distillé	0.5ml	-
<b>Bain mari pendant 15min puis refroidissement</b>		
n-Butanol	4ml	4ml
<b>Centrifugation 3000 tours pendant 15 min</b>		
<b>Récupération de surnagent</b>		
<b>Lecture sur spectrophotomètre visible à 530nm</b>		

Le MDA est calculé selon la règle suivante :

$$\text{Tissu MDA (n mol/g poids de tissu)} = \frac{\text{MDA (nmol/ml)} \times F}{P \text{ (poids de tissu)}}$$

**F** : facteur de dilution

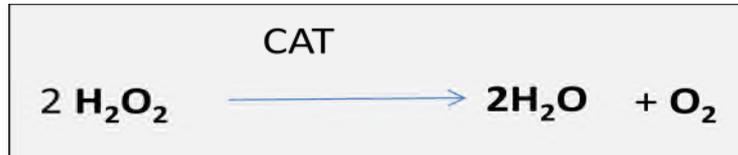
**P** : poids de tissu

**Tissu** : le foie

#### V.4.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique :

- **Le principe :**

Le principe de cette évaluation c'est la dégradation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour donner le  $\text{H}_2\text{O}$  en présence de la catalase dans une température de  $25^\circ\text{C}$  selon le mode d'action qui suit (Clairborne, 1985)



La catalase est localisée principalement dans les peroxysomes ; mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme (Sandalio et al., 2001)

- **Mode opératoire :**

La mesure de la catalase (CAT) a été effectuée en suivant le protocole de Clairborne (1985)

**Les réactifs utilisés dans ce test sont :**

- Hydrogen Peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 19 m mol / l
- Homogénat (foie) 50  $\mu\text{l}$  / Simple

La mesure de l'absorbance (Abs) de la CAT a été effectuée en suivant le protocole Clairborne (1985) (figure 36) avec quelques modifications.

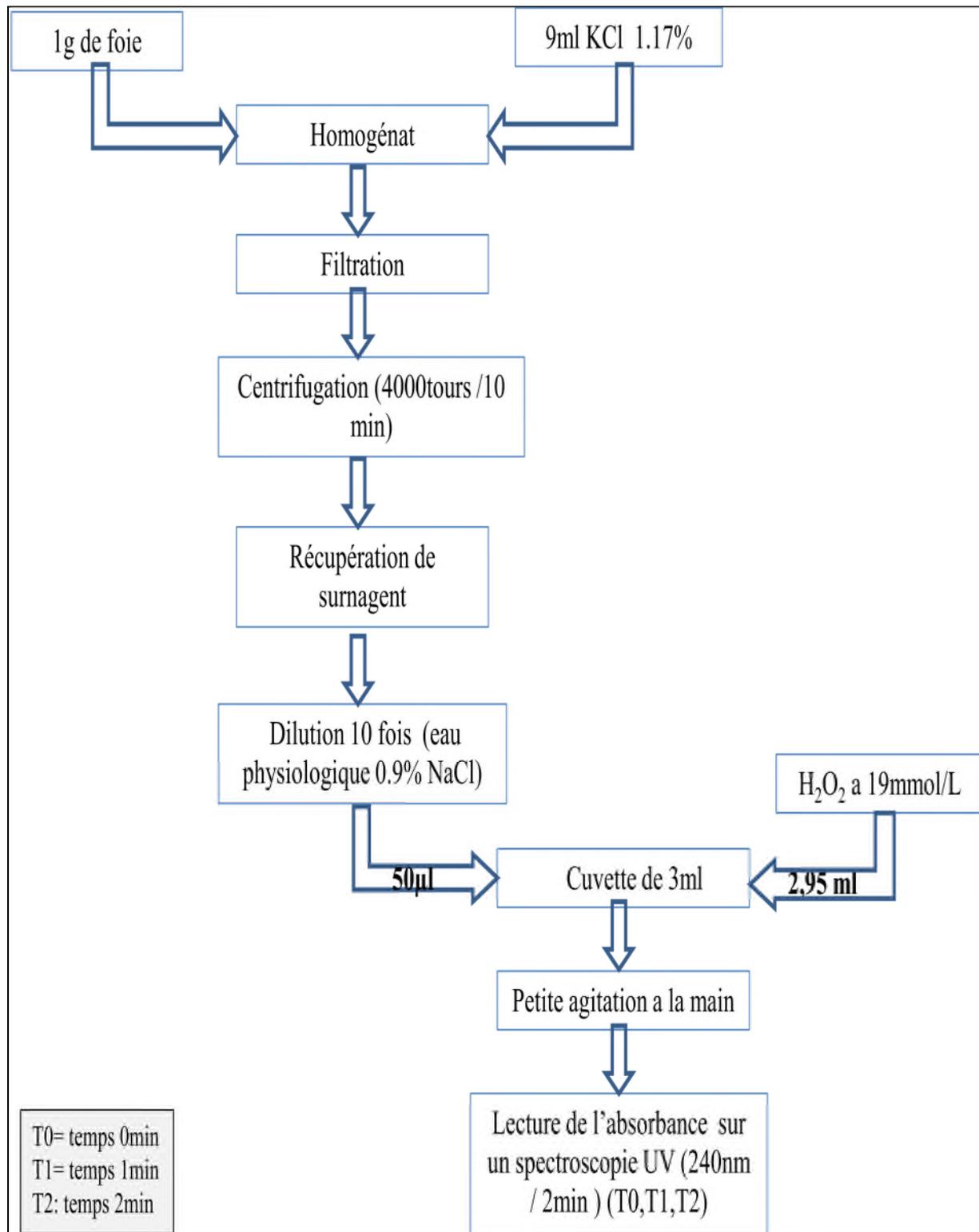
Après avoir mesuré l'Abs nous avons mesuré l'activité de la CAT avec la formule suivante :

$$\text{CAT} = \frac{2.303}{T} \text{Log} \frac{\text{Abs1}}{\text{Abs2}}$$

**T** : constance du temps

**Abs1** : absorbance à temps 1

**Abs2** : absorbance à temps 2



**Figure 36:** Protocole expérimental du test de la catalase selon **Clairborne (1985)**

### V.4.3. Evaluation des taux de la bilirubine :

Méthode colométrique décrite pour la première fois par **Jendrassik et Grof** en **1938** la première fois.

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfanilique diazoté. En présence de diméthyl sulfoxyde (DMSO), la bilirubine totale (TBIL) se couple avec l'acide sulfanilique diazoté pour donner l'azobilirubine. Le dosage de la bilirubine directe (DBIL) se fait en l'absence de DMSO (**Biomagrébe.2003**).

La bilirubine totale (T BIL) , autrement dit la somme de la bilirubine indirecte (I BIL) et de la directe (D BIL), se situe entre 3 et 11mg/l. . L'indirecte est comprise entre 2 et 7 mg/ l et la directe, entre 1 et 3 mg/l A priori. (**Gloaguen, 2005**).

- **Mode opératoire :**

La mesure de T BIL a été effectuée en suivant le protocole proposé par laboratoire **RANDOX(2013)** avec quelques modifications sur la quantité des réactifs ; les différentes étapes de ce protocole sont résumées dans **tableaux VI** .

- **Matériels utilisée :**

- Micropipettes : 50µl, 200µl, 1ml et 2ml ;
- Chronomètre pour calculer le temps ;
- Bain marie et un thermomètre pour maintenir la température souhaitable ;
- Randox Bilirubine réactives (**Annexe II**) .

**Tableau VI : la bilirubine totale (RANDOX ,2013)**

	Blanc	Echantillon
Réactif 1	200µl	200µl
Réactif 2	-	50µl
Réactif 3	1000µl	1000µl
Simple	200µl	200µl
<b>Mélange et incubation 10min / 20-25°C</b>		
Réactif 4	1000µl	1000µl
<b>Incubation 5-30min</b>		
<b>Lecture 560-600nm</b>		

- **La T BIL est calculé selon la formule suivante :**

$$T \text{ BIL } (\mu\text{mol/l}) = 185 \times \text{Abs } (578\text{nm})$$

$$T \text{ BIL } (\text{mg/dl}) = 10.8 \times \text{Abs } (578\text{nm})$$

#### V.4.4. Evaluation des taux des protéines totales (Prs T) :

- **le principe :**

La protéine présente dans l'échantillon réagit avec les ions cuivre en milieu alcalin, pour donner un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie.

- **Mode opératoire :**

La mesure de Prs T a été effectuée en suivant le protocole proposé par le laboratoire **Spinreact (2008) (Annexe III)** avec quelque modification ; les différentes étapes de ce protocole sont résumées dans le **tableau VII**.

**Tableau VII : Protéines totales (Spinreact,2008)**

	<b>Blanc</b>	<b>Standard</b>	<b>Simple</b>
<b>R (ml)</b>	1	1	1
<b>Standard (μl)</b>	-	25	-
<b>Simple (μl)</b>	-	-	25
<b>Mélange et incubation 5-10min / 37°C</b>			
<b>Lecture 540 nm</b>			

- ❖ La protéine totale est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Prs T g/dl} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs standard}} \times 7 \text{ (constante de standard)}$$

*Chapitre VI*  
*Résultats et discussions*

## VI.1. Résultats de l'étude *In vitro* de l'extrait éthanolique de *R.alatrnus L*:

### VI.1.1. Taux d'extraction :

Une macération a été réalisée sur la poudre des parties aériennes (fleurs et feuilles) de *Rhamnus alaternus* avec l'éthanol, après extraction de 300g de l'échantillon et évaporation du solvant du filtrat, nous avons obtenu un extrait qui correspond à un rendement de 13,22%. Ce rendement est moyennement élevé par rapport à celui obtenu par **Ljubuncic et ses collaborateurs (2005)** en utilisant comme solvant l'eau distillée qui est de l'ordre de 8%.

### VI.1.2. Evolution d'analyses phytochimiques :

#### VI.1.2.1. Taux des poly-phénols totaux :

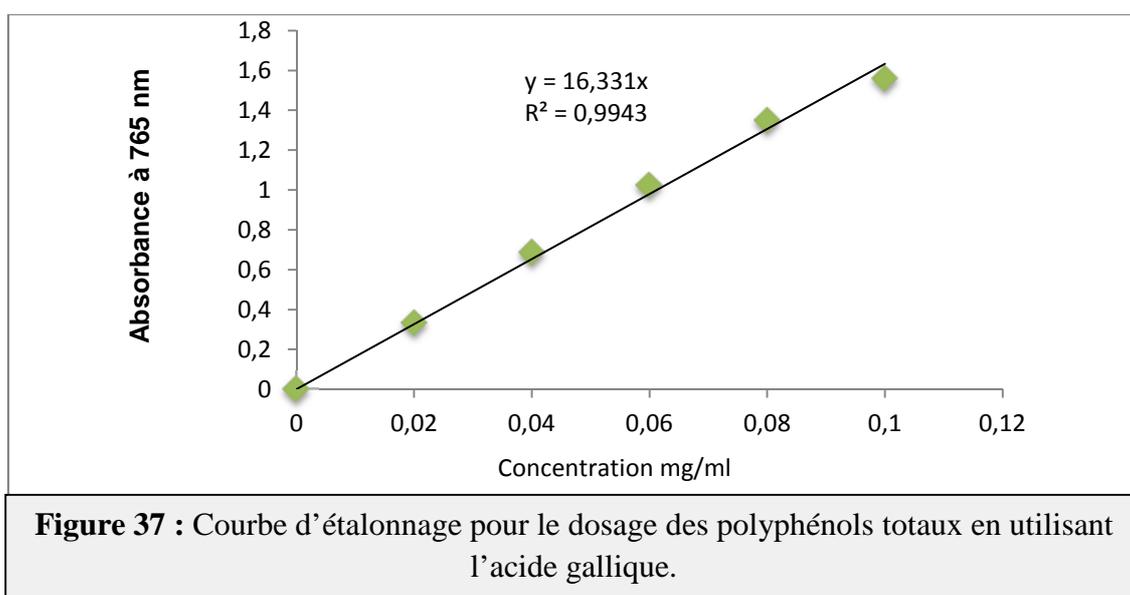
Les composés phénoliques constituent une classe principale des antioxydants présents dans les plantes et sont généralement quantifiés par une méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (**Kanatt et al., 2007**).

Le **Tableau VIII** montre la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait éthanolique de *R. alaternus* exprimée en mg équivalent d'acide gallique en se référant à la courbe d'étalonnage **figure 37**

**Tableau VIII:** la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait éthanolique de *R. alaternus* exprimée en mg équivalent en acide gallique.

Equivalents en mg d'acide gallique /g d'extrait sec	<b>0.585</b>	<b>0.585</b>	<b>0.614</b>
Moyenne d'équivalent en acide gallique (mg/ml)	0.594 ±0.013		

La teneur en composés phénoliques totaux montre que l'extrait éthanolique de *R. alaternus* contient environ 59.46 ±0.013% d'extrait sec.

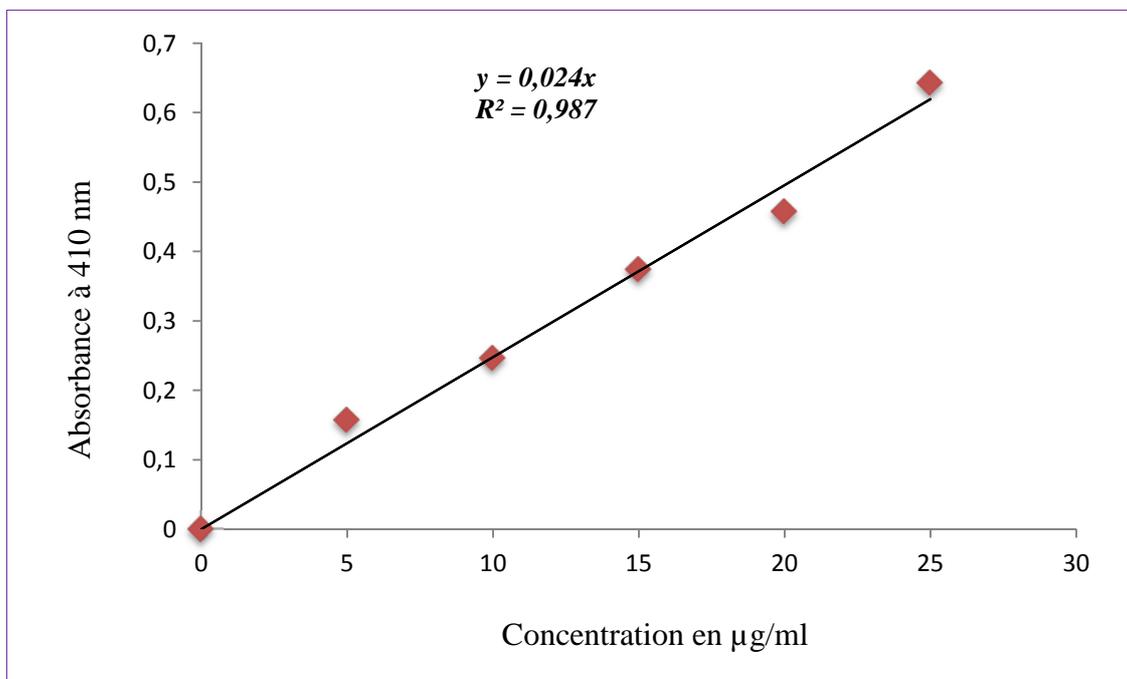


### VI.1.2.2. Taux des flavonoïdes :

Lors du dosage des flavonoïdes, après l'addition d' $\text{AlCl}_3$  et après incubation une couleur jaunâtre est obtenue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait éthanolique de la plante, ce qui confirme la présence des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *R. alaternus* L.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique exprimée en mg équivalent de quercétine obtenue à partir de la courbe d'étalonnage **Figure 38**.

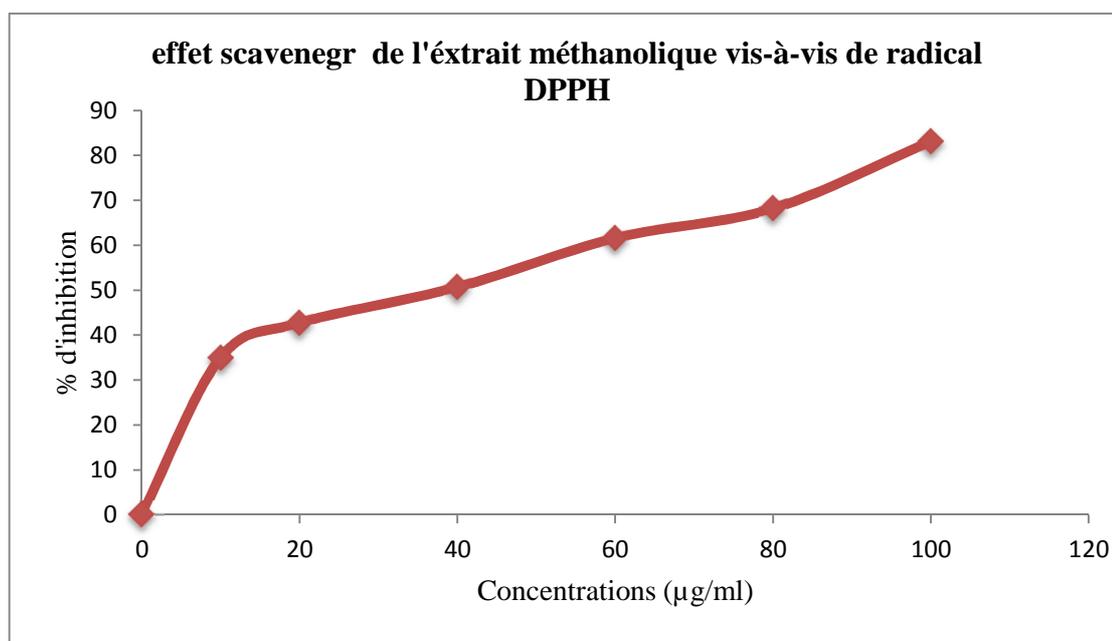
La teneur en composés flavonoïde montre que l'extrait éthanolique de *R. alaternus* contient environ  $48.38 \pm 0.58 \text{ mgEQ/g}$  d'extrait sec. Donc, les feuilles de *R. alaternus* sont très riches en flavonoïdes polaires, ce taux est même très inférieur à celui rapporté par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** qui ont démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ  $283 \pm 11 \text{ mg EQ/g}$ .



**Figure 38** : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.

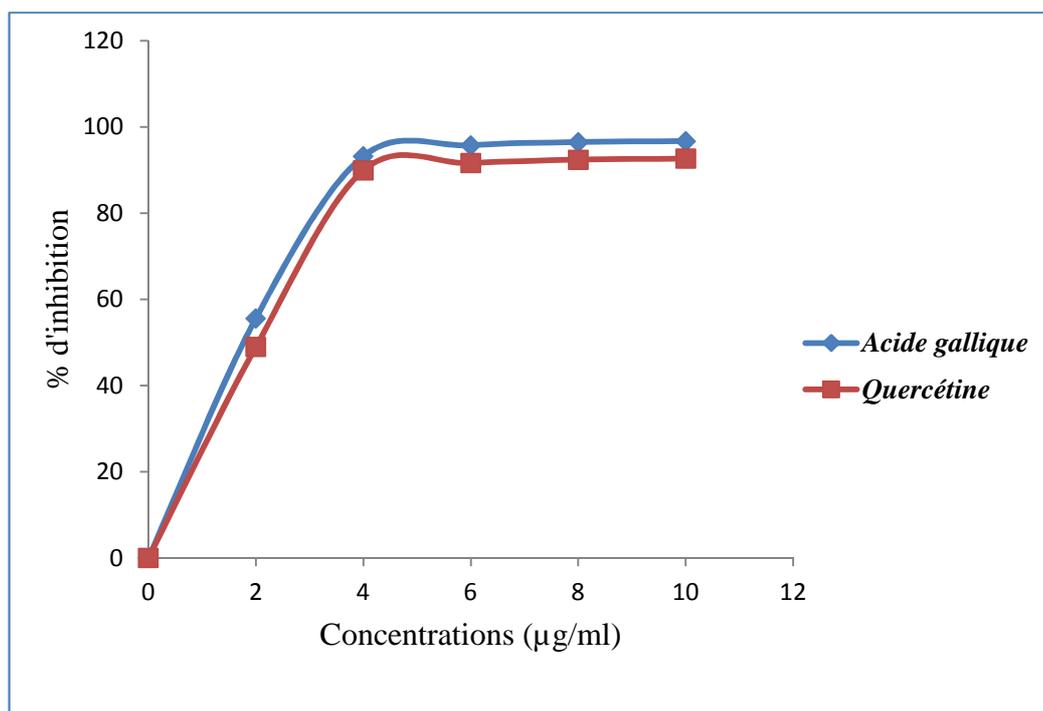
### VI.1.3. Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH :

L'extrait éthanolique de la plante *R. alaternus L* a montré une activité anti radicalaire contre le radical DPPH dépendante de la concentration de l'extrait éthanolique, par diminution de couleur violette de la solution DPPH. (Figure 39) La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH de l'extrait et des standards (acide gallique et quercétine) (montre une activité anti-radicalaire dépendante de la concentration. A chaque fois que la concentration augmente, le pourcentage d'inhibition augmente. Par exemple, à la concentration de 40 $\mu$ g /ml, on a un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 61.68% et à 100 $\mu$ g/ml, le pourcentage atteint 83.09%. On remarque que même à des faibles concentrations, l'extrait montre un pourcentage d'inhibition important, ce qui nous permis de déduire que les composés phénoliques contenu dans l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* sont très efficace comme antioxydants



**Figure 39 :** Effets Scavenger contre le radical DPPH de l'extrait éthanolique de *R.alaternus L* à différentes concentrations

Les CI50 de l'acide gallique et de la quercétine (Figure 40) sont respectivement de l'ordre 1,79 $\mu$ g/ml et 2,04 $\mu$ g/ml. Ils sont largement inférieurs à celui de l'extrait méthanolique (37,97 $\mu$ g/ml), donc l'acide gallique et la quercétine présentent une grande activité antiradicalaire. De même, l'extrait présente une bonne activité antiradicalaire contre le DPPH.



**Figure 40:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration en acide gallique et quercétine.

## VI.2. Résultats de l'étude *In vivo* de l'extrait éthanolique sur l'animal (foie et sang):

### VI.2.1. Evolution des symptômes cliniques :

Durant les 15 jours de cette expérience, des changements comportementaux et des symptômes cliniques ont été observés; **le tableau IX** les résume .

D'après le tableau IX , on constate que notre plante a un effet sur le système nerveux (somnolence et relaxation de l'animal) et sur l'appareil digestives cela a été constaté lors de l'augmentation de la quantité de la nourriture, la couleur des urines et sur la consistance des selles.

D'un autre côté, la couleur et la densité du sang qui a augmenté dans les lots 2 et 4 (traité ; traité et intoxiqué) signifie que peut être il y a une augmentation des globules rouges (pour la couleur) et une augmentation des protéines (pour la densité).

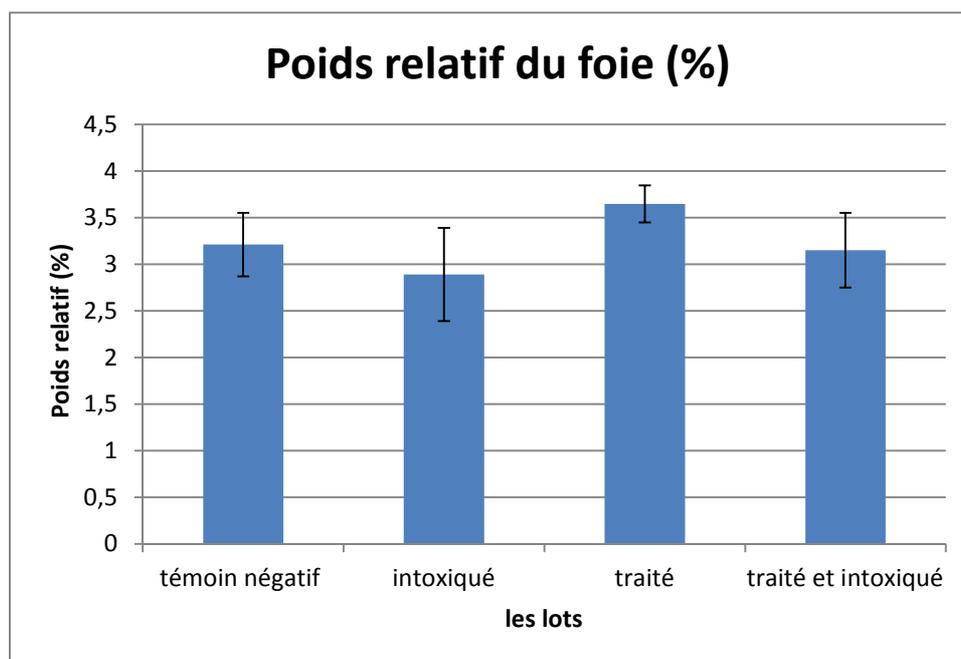
**Tableau IX:** changements comportementaux et symptômes cliniques :

Caractéristique	Lot Négative	Lot traité	Lot intoxiqué	Lot traité et intoxiqué
La nourriture	+	+++	+	++
Les selles	Ferme	Pâteuses/diarhées	Ferme	Pâteuses/diarhées
Les urines	Jaune	Rouge brun	Jaune	Rouge brun
Le poids	+	++	+	++
Comportement différent	-	+	-	+
Salivation	-	-	-	-
Léthargie	-	-	++	+
Somnolence	+	+++	+	++
Densité du sang	+	+++	+	+++
Couleurs du sang	+	+++	+	+++

### VI.2.2. Evolution des effets de klipal et de l'extrait éthanolique de *R alaternus L* sur le poids relatif du foie pour les différents lots :

Les résultats obtenus lors du calcul des poids relatifs du foie pour les lots, représentés sur histogramme (**figure 41**) ; sont significativement différents. Grasse à cette histogramme on peut déduire :

- Il y a eu une intoxication du foie par Klipal et cela est exprimé par la diminution du % poids relatif du foie (Pr) dans le lot intoxiqué ( $2.89\% \pm 0.5$ ) comparant au lot témoin ( $3.21\% \pm 0.34$ ).
- Un bien-être hépatique par l'extrait éthanolique exprimé par l'augmentation du % Pr dans le lot traité ( $3.65\% \pm 0.2$ ) comparant au lot témoin ( $3.21\% \pm 0.34$ ).
- Une protection hépatique (effet anti-intoxication) est survenue grâce à l'extrait éthanolique de *R. alaternus* et cela est exprimé par l'augmentation du % Pr dans le lot traité et intoxiqué ( $3.15\% \pm 0.4$ ) comparant au lot intoxiqué ( $2.89\% \pm 0.5$ ).



**Figure 41** : représentation graphique des pourcentages de poids relatif des différents lots

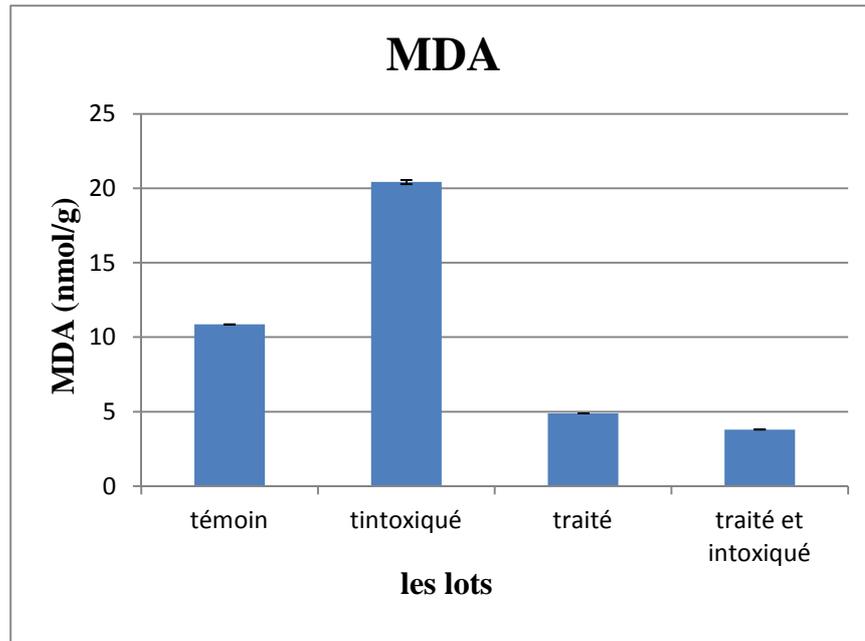
### VI.2.3. Evolution des taux de malonyldialdéhyde (MDA) des tissus hépatiques:

Les résultats représentés sur la **figure 42** montrent que le taux de l'MDA des rats du lot intoxiqué est nettement élevé ( $20.43 \text{ nmol/g} \pm 0.04$ ) comparé aux taux de l'MDA des rats du lot témoin ( $10.86 \pm 0.005$ ). Cette augmentation ne peut s'exprimer que par l'intoxication de ces différents lots par le paracétamol qui a poussé à l'apparition de phénomènes de l'oxydation lipidique.

Ces résultats montrent aussi une diminution significative du taux de l'MDA chez les rats du lot traité ( $4.89 \text{ nmol/g} \pm 0.005$ ) et une diminution chez les rats du lot traité et intoxiqué qui égale à  $3.80 \text{ nmol/g} \pm 0.01$ .

De cela on peut déduire que l'extrait éthanolique de la plante *R.alaternus* a un effet principal sur la diminution du taux de l'MDA dans le tissu où il a un rôle d'un anti oxydant

Si on considère le taux de l'MDA des rats du lot témoin comme référence, on peut estimer la diminution du l'MDA chez les rats du lot traité de 55% et de 65% pour les rats du lot traité et intoxiqué par rapport au lot témoin ; l'augmentation de ce taux chez les rats du lot intoxiqué est arrivée à 88.12% presque le double du taux de l'MDA chez les rats du lot témoin.

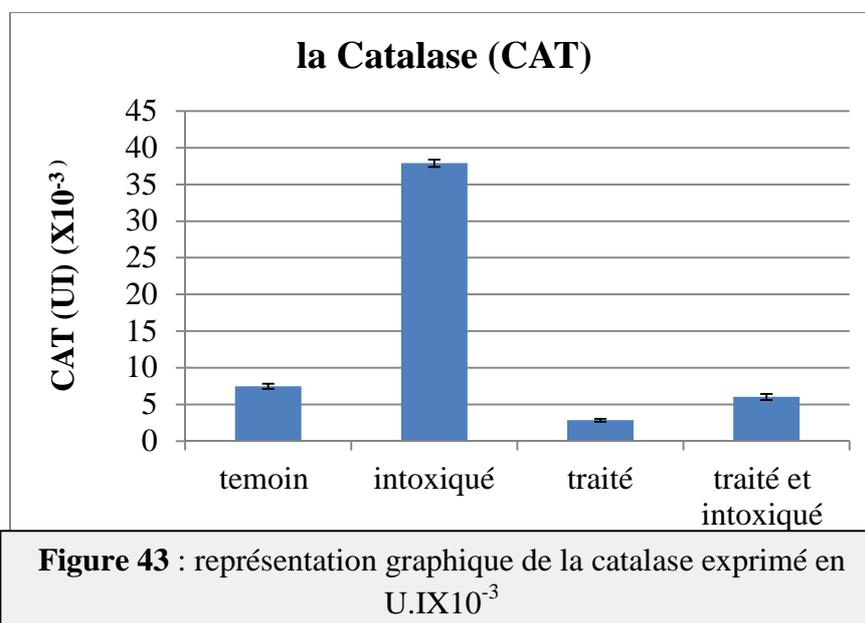


**Figure 42** : Représentation graphique d'MDA pour les différents lots

#### VI.2.4. Evaluation de l'activité de la catalase (CAT):

Les résultats des absorbances obtenue après avoir testé les différents foies de chaque lots nous a permis de calculer la CAT exprimer en unité international (U.I). (**figure 43**)

Ces résultats de l'analyse statistique des effets d'activité de cette enzyme chez les rats montre une forte activité chez les rats du lot intoxiqué ( $37.9 \times 10^{-3}$  U.I  $\pm 0.5$ ) comparants aux rats des lots : témoin et lot traité et intoxiqué qui égale respectivement :  $7.46 \times 10^{-3}$  U.I  $\pm 0.34$  et de  $6.02 \times 10^{-3}$  U.I  $\pm 0.4$ . Contrairement aux rats du lot traité cette activité est très basse elle ne dépasse pas  $2.85 \times 10^{-3}$  U.I  $\pm 0.2$ .



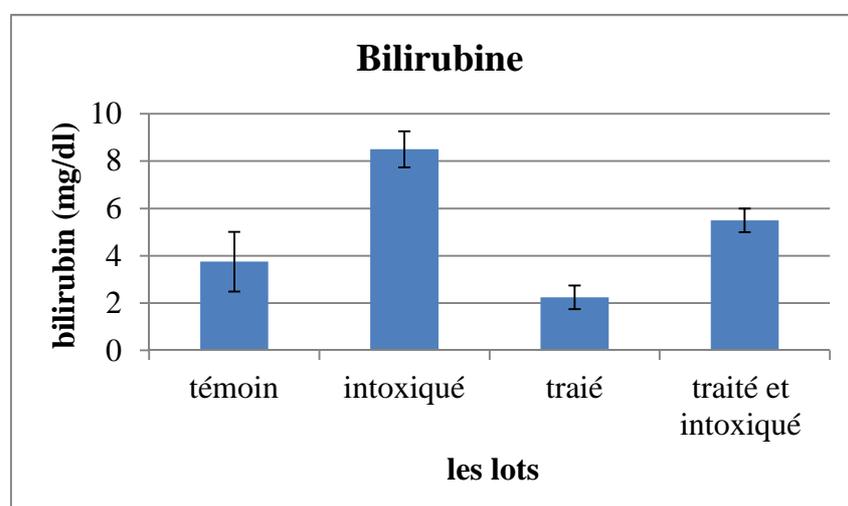
**Figure 43** : représentation graphique de la catalase exprimé en U.IX10<sup>-3</sup>

### VI.2.5. Evolution du taux de la Bilirubine :

Les résultats de dosage de la bilirubine sont représentés dans la **figure 44** exprimée en mg/dl du sang de l'animal .

L'étude montre qu'il y a une diminution remarquable dans les concentrations plasmatiques de la BIL chez les rats du lot traité avec l'extrait éthanolique ( $2.25 \text{ mg/dl} \pm 0.5$ ) comparant aux rat du lot témoin qui est de  $3.75 \text{ mg/dl} \pm 1.25$ .d'un autre coté aussi il y a aussi une augmentation chez les rats du lot intoxiqué ( $8.5 \text{ mg/dl} \pm 0.76$ ) comparant aux rats du lot intoxiqué et traité ( $5.5 \text{ mg/dl} \pm 0.5$ ).

Cette élévation du taux de la bilirubine est causé peut être par hémolyse ou bien par une pathologie du foie ou lors d'une obstruction biliaire (calcul, cancer du pancréas, inflammation de la vésicule biliaire...) dû à notre substance toxique (Klipale )



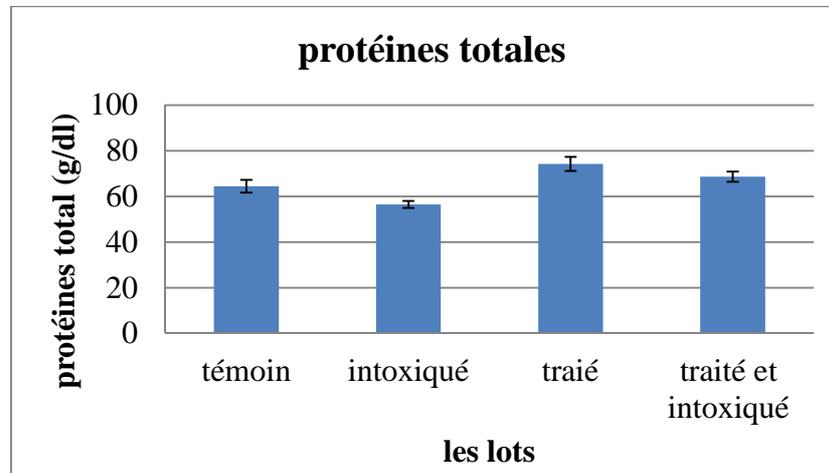
**Figure 44:** Représentation graphique des résultats de la Bilirubine pour les différents lots exprimés en mg/dl du sang

### VIII.2.6. Evolution du taux des protéines totales :

Les résultats obtenus lors du dosage des PrsT de plasma sanguine de différents rats de chaque lots, représenté sur histogramme (**figure 45**) ; sont significativement différents. Grasse à cette histogramme on peu déduire :

- Il y a eu une intoxication du foie par Klipal et cela est exprimé par la diminution du taus de PrsT dans le lot intoxiqué ( $56.5 \text{ g/dl} \pm 1.5$ ) comparant au lot témoin ( $64.5 \text{ g/dl} \pm 2.82$ ).
- Un bien fait hépatique par l'extrait éthanolique exprimé par l'augmentation du PrsT dans le lot traité ( $74.25 \text{ g/dl} \pm 3.05$ ) comparant au lot témoin ( $64.5 \text{ g/dl} \pm 2.82$ ).

- Une protection hépatique est survenue grâce à l'extrait éthanolique de *R. alaternus* et cela est exprimé par l'augmentation du PrsT dans le plasma des rats de ce lot traité et intoxiqué ( $68.66\text{g/dl} \pm 2.19$ ) comparant au lot intoxiqué ( $56.5\text{g/dl} \pm 1.5$ ).



**Figure 45** : Représentation graphique des résultats de la protéines totales pour les différents lots exprimés en g/dl du sang

### Discussion

*R. alaternus* est une plante très répandue dans le nord de l'Algérie et vu son utilisation local comme plante médicinale, elle présente un grand intérêt pharmacologique. Elle est caractérisée par l'abondance de nombreuses substances, doués d'activités biologiques et joue un rôle clé dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies.

Notre présent travail est consacré à l'étude de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Rhamnus alaternus*, d'une part, caractérisation physico-chimique et étude de la capacité antioxydante et anti-radicalaire. D'autre part, l'étude de l'effet sur la toxicité hépatique induite par le Klipal. Ainsi, notre étude nous a permis d'émettre les résultats suivant :

Le protocole d'extraction appliqué est de type liquide-solide, par l'éthanol. Le taux d'extraction est de 13,22%. Ce rendement est moyennement élevé par rapport à celui obtenu par **Ljubuncic et ses collaborateurs (2005)** en utilisant comme solvant l'eau distillé qui est de l'ordre de 8%.

L'évaluation du contenu en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a montré que l'extrait contient environ  $59.46 \pm 0.013\%$  d'extrait sec. Le dosage des flavonoïdes par la méthode de réduction de chlorure d'aluminium a donné un taux  $44.5 \pm 0.016\%$  d'extrait sec. Ce taux est même très inférieur à celui rapporté par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** qui ont démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ  $283 \pm 11 \text{ mg EQ /mg}$ .

L'extrait éthanolique de la plante *R. alaternus* a montré une activité anti radicalaire contre le radical DPPH. La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH de l'extrait et des standards (acide gallique et quercétine) montre une activité anti-radicalaire dépendante de la concentration. Par exemple, à la concentration de  $40 \mu\text{g /ml}$ , on a un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 61.68% et à  $100 \mu\text{g/ml}$ , le pourcentage atteint 83.09%. On remarque que même à des faibles concentrations, l'extrait montre un pourcentage d'inhibition important, ce qui nous permis de déduire que les composés phénoliques contenu dans l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* sont très efficace comme antioxydants. La valeur de CI50 calculé pour l'extrait de *R. alaternus* est de l'ordre de  $37,97 \mu\text{g/ml}$ . Cette valeur obtenue est élevée par rapport à celles rapportées dans les études réalisées sur l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie qui est de l'ordre de  $25,38 \mu\text{g/ml}$  (**Ben Ammar et al.,2005**). Cette différence pourrait s'expliquer par la nature des composés phénoliques

contenus dans l'extrait qui est influencé par la période de récolte (mai - juin), sachant que notre échantillon a été récolté au mois de mars. Comme elle pourrait s'expliquer aussi par la différence des conditions climatique et celles du sol ou la plante est cultivée.

L'étude de l'effet de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* sur la toxicité hépatique induite par le Klipal chez les rats Wistar à une dose de 500mg/kg a montré que cet extrait a un bien fait hépatique exprimé par l'augmentation du pourcentage relatif de foie dans le lot traité  $3.65\% \pm 0.2$  comparant au lot témoin  $3.21\% \pm 0.34$ , et un effet protecteur hépatique exprimé par l'augmentation du pourcentage relatif de foie dans le lot traité et intoxiqué  $3.15\% \pm 0.4$  comparant au lot intoxiqué  $2.89\% \pm 0.5$ .

En effet, dans la médecine traditionnelle, *R. alaternus* a été employée en tant que digestive, diurétique, laxative, hypotenseur et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (**Ben Ammar et al., 2007 ; Ben Ammar et al., 2009 ,Bhourri et al., 2012 ; Izhaki et al., 2002** ). Efficace contre l'ictère hépatique, les maladies du foie et du pancréas (**Lucienne , 2013**). L'écorce de la racine ou du tronc de *R.alaternus* sont utilisés avantageusement contre la jaunisse (**Belouad,2001**). Les fruits de *R.alaternus* renferme un principe actif, la rhamnine, qui leur donne des vertus purgatives, elles constituent en effet, un purgatif très énergique et d'un emploi sûr (**Belouad,2001**).

Dans les analyses sanguines effectués, Les résultats de dosage de la bilirubine sont exprimées en mg/dl du sang de l'animal montre qu'il y a une diminution remarquable dans les concentrations plasmatiques chez les rats du lot traité avec l'extrait éthanolique de  $2.25\text{mg/dl} \pm 0.5$  comparent aux rats du lot témoin qui est de  $3.75 \text{ mg/dl} \pm 1.25$ , d'un autre coté une augmentation chez les rats du lot intoxiqué  $8.5\text{mg/dl} \pm 0.76$  comparant aux rats du lot intoxiqué et traité  $5.5\text{mg/dl} \pm 0.5$  donc cet extrait a diminué la toxicité provoqué par le klipal et pour les résultats de dosage des protéines totales montre une augmentation dans les concentrations plasmatiques chez les rats du lot traité avec l'extrait éthanolique de  $74.25\text{mg/dl} \pm 0.5$  comparent aux rat du lot témoin qui est de  $65.5 \text{ mg/dl} \pm 2.82$ , d'un autre coté une diminution chez les rats du lot intoxiqué  $56.8\text{mg/dl} \pm 1.5$  comparent aux rats du lot intoxiqué et traité  $68.66\text{mg/dl} \pm 2.19$  donc notre extrait éthanolique a un effet sur l'augmentation des protéines totales plasmatique ce qui facilite l'élimination de la toxique.

La peroxydation lipidique, est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires ce qui entraine la génération de nombreux produits de

dégradation. L'MDA, l'un de ces produits, qui a été étudié largement comme un indice de la peroxydation lipidique et en tant que marqueur de stress oxydatif. La mesure de l'acide thiobarbiturique des substances réactives (TBARS) a été largement utilisée dans les études de l'activité de la peroxydation lipidique. Les résultats de notre étude ont montrés que l'extrait éthanolique de *R. alaternus* possède une activité antilipoperoxydative. Ces résultats sont conformes aux résultats *in vitro* de **Ben Ammar et al., 2009**.

Notre extrait a montré aussi une diminution de l'activité de l'enzyme de la catalase ; dans le lot intoxiqué  $37.9 \cdot 10^{-3}$  U.I  $\pm 0.5$ , dans le lot traité et intoxiqué  $6.02 \cdot 10^{-3}$  U.I  $\pm 0.4$  contrairement aux rats du lot traité, cette activité est très basse elle ne dépasse pas  $2.85 \cdot 10^{-3}$  U.I  $\pm 0.2$ , cette baisse explique que notre plante peut être a une capacité de saccager et vulnérabiliser cette enzyme. une déficience en Fer qui est un constituant du site actif de cette enzyme (**Jurcsuk et al., 2004**) soit à sa photo-inactivation (**Sandalio et al., 2001**).

*Conclusion et perspectives*

La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux. Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir ; une grande partie de cette flore est constitué par des espèces médicinales.

Ce document à porté :

- Dans un premier, à l'identification *in vitro* des groupes phytochimiques et à l'évaluation de l'activité anti-radicalaire qui caractérisent l'extrait éthanolique de la partie aérienne de notre plante a savoir : un rendement de 13.22% , composants phénolique  $59.46 \pm 0.013\%$  ; taux flavonoïdes  $48.38 \pm 0.58 \text{mgEQ /g}$  d'extrait sec ; IC50  $37,97 \mu\text{g/ml}$  ;
- Dans un deuxièmes temps la recherche d'activité biologique et les potentialités que peut avoir cet extrait *in vivo* à savoir les capacités : anti-hépto-toxique, anti-oxydantes et anti-lipoperoxydative .

En fin, les antioxydants naturelles des espèces végétales locales et particulièrement ceux provenant de *Rhamnus alaternus* L peuvent être très utiles pour renforcer l'organisme dans le cas de situation de stress oxydatif et de prévenir les différentes pathologies hépatique survenues suite à une attaque radicalaire. Par ailleurs, Il serait nécessaire :

1. D'isoler et de caractériser la ou les molécules potentiellement anti-hépto-toxique et antioxydantes des fractions les plus actives.
2. D'étudier les autres activités biologiques (*in vivo*) de l'extrait à savoir : effet anti-inflammatoire, antimutagène, anti-cancérigène....etc.
3. De déterminer la toxicité et de préciser les doses LD50 sur des modèles animaux.
4. D'avoir une animalerie équipée et des techniciens formés dans l'élevage des animaux de laboratoire.

# *Liste bibliographique*



- **Affek HP, Yakir D.(2003)** .Natural Abundance Carbon Isotope Composition of isoprene Reflects Incomplete Coupling between isoprene synthetis and photosynthetic carbon Flow.plant phsiology.**131**:1727-1736.
- **Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. (2007)**.Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : Rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue de rhumatisme*, **74**(7) :636-643.
- **Alberts B,Bray D,Lewis J,Raff M,Roberts K, D.Watson J.(1991)**.Les cellules différenciées et la conservation des tissus. *In Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine-Sciences.Paris.pp951-1000.
- **Ammar RB, Bhourri W, Sghaier MB, Boubaker J, Skandrani I, Neffati A, Bouhlel I, Kilani S, Mariotte AM, Chekir-Ghedira L, Dijoux-Franca MGD,Ghedira K.(2009)**.Antioxydant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem.***116**: 258-264.
- **Ammar RB, Kilani S, Abdelwahed A, Hayder N, Mahmoud A, Chibani J, Chekir-Ghedira L, Ghedira k. (2005)**. *In vitro* mutagenicity, antimutagenicity and free radical scavenging activities of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae) Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences.***8** (3): 439-445.
- **Anonyme .(2008)**.Tela Botanica.v4.02
- **Anonyme 1 : HAS (Haut Autorité de Santé).( 2009)**.commission de la transparence.
- **Anonyme2: Mobile Reference.(2008)**.The Illustrated Encyclopedia of Trees and Shrubs: An Essential Guide To Trees and Shrubs of the World. Ed. MobileReference, p. 5205.
- **Arias IM,Harvey JA ,James LB,David EC ,Nelson FA ,David AS ,Allan WW. (2009)**. The Liver Biology and Pathobiology.Fifth Edition.ISBN: 978-0-470-72313-5.
- **Athamena S, Chalghem I, Laouar AK, Laroui S , Khebri S. (2010)**. Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal.* **11** (1) : 69-81
- **Avissar N, Whitin J C, Allen P Z.(1989)**.Plasma selenium-dependent glutathioneperoxidase. *J.Biol. Chem.* **2**: 15850-15855.



- **Badawi AF, Stern SJ, Lang NP, Kadlubar FF.(1996)**. Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog Clin Biol Res.***395** :109-140.
- **Bas JM,Gomez C, Pons P.(2005)**. Fruit production and predispersal seed fall and predatin in *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Acta Oecologica.* **27**:115-123.

- **Bastiani C.(2013).**Mesure de protection du tube digestif au cours de thermodestructions de tumeurs hépatique primitives et secondaires : étude rétrospective de 53 procédures consécutives .Thèse de doctorat en médecine. Université de Nice.120p
- **Beaune PH ,Loriot MA.(2000)** .Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques . médecine/sciences. **16(10)** : 1051-1056
- **Beaune PH.(2008).**Qu'est-ce que la Pharmacogénétique?.laboratoire INSERM U490.Paris .France.
- **Belhattab R, Larous L, Kalantzakis G, Bouskou D, Exarchou V,Antifungal .(2004).**properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Food, Agricul. & Envir.* **2**: 63-69.
- **Beloued A. (2001).** Les plantes médicinales d'Algérie. Ed. OPU, Ben Aknoun, Alger.
- **Ben Ammar R, Bhourri W, Ben Sghaier M, Boubaker J, Skandrani I, Neffati A, Bouhlel I, kilani S, Mariotte AM, Chekir-Ghedira L, Dijoux- Franca MG, Ghedira K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, **116 (1)**: 258–264
- **Ben Ammar R, Bouhlel I, Valenti K, Ben Sghaier M, Kilani S, Mariotte AM, Dijoux-Franca M-G, Laporte F, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. (2007).** Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pre- treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays .*Chemico-Biological Interactio.***168**: 171-183.
- **Ben Ammar R, Kilani S, Bouhlel I, Ezzi L, Skandrani I, Boubaker J, Ben Sghaier M, Naffeti A, Mahmoud A, Chekir-Ghedira L,Ghedira K.(2008).** Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol.* **31**: 61-80.
- **Ben Ammar R, Kilani S, Bouhlel I, Skandrani I, Naffeti A, Boubaker J, Ben Sghaier M, Bhourri W, Mahmoud A, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. (2007).** Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Ann. Microbiol*; **57**: 453-460.
- **Benhamou JP, Erlinger S.(2008).** Maladie du foie et des voies biliaires. 5ème édition. Flammarion médecine science .Paris .220p.
- **Berset C.( 2006)** .Pigments phénoliques : structures, stabilité, marche des colorants naturels et effets sur la sante. *In Les polyphenols en agroalimentaire* eds Sarni-Manchado P, Cheynier v . Paris .
- **Bhourri W, Boubaker J, Kilani S, Ghedira K,Chekir-Ghedira L.(2012).** Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-B-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside. *S. Afr. J. Boot.* **80**: 57-62.
- **Bich H ,Dang VU.(2009).** Douleurs et santé montal. Maniement des antalgiques en pratique quotidienne. Institu upsa de la douleur thérapeutiques. These de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I.155p

- **Biomagrébe.(2003).Billirubine totale et directe.**24,avenue Ibn Khaldoun ,ARIANA.2080. Tunisia.
- **Blasundram N, Sundram K, Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products:antioxidant activity, occurrence, and potential uses.*Food Chemistry*,**99**(1):191-203.
- **Borg J M, Reeber A.(2008).** Biochimie métabolique, *Ellipses*, France, pp: 257-269.
- **Bors W,Michel C, Stettmaier K.(1997).** Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* **6**: 399-402.
- **Bouchet A,Cillert J.(1983).**Anatomie topographique, descriptive et fonctionnelle. Lyon . SIMEP.
- **Boussahel S,Dahamna S,Ruberto G,Siracusa L,Harzallah D.(2013).** Phytochemical study and antioxidant activities of leaves extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Pharmacognosy Communications* **3**: 46-47.
- **Brigelius-Flohé R. (2009).** "Commentary: oxidative stress reconsidered." *Genes Nutr* **4**: 161-163.
- **Broom DM. (1983).** "The stress concept and ways of assessing the effects of stress in farm animals. 1, 79." *Applied Animal Ethology* **11**(1): 79.
- **Bruneto J.(1993).**Coposises phenoliques:Shikimate-acétates. In :«pharmacognosie: phytochimie, plante médicinales».Paris :Tec & Doc.Lavoisier edition.Chap.3 :pp199-383
- **Bruneton J. (1999).**Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3<sup>ème</sup> éd).Tec et Doc (Ed).Paris.1120p.



- **Campbell NA,Reece JB.(2004).**Structure et fonction chez les animaux *in Biologie*. **2** :903-920.
- **Cao G, Sofic E, Prior RL. (1997).** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* **22**:749-60.
- **Casting A,Smail A.(1999).**Anatomie du foie et des voies biliaires.*Encyclopédie médico-chirurgicale.Hépatologie* :7-001-A-10.p12
- **CCPA(Conseil canadien de protection des animaux).(2013).** Promouvoir le bien-être des animaux et leur utilisation éthique en science au Canada.130, rue Albert, bureau 1510 .Ottawa (Ontario) Canada K1P 5G4.
- **Cillard J, Cillard P.(2006).**Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *UPRESS EA 3891*, **25**(1),v 13
- **Clairborne A.(1985).** Catalase activity. In: *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. Ed. Greenwald. R.A. CRC Press. Boca. Raton. 283-284.



- **Dacosta Y.(2003).**Les phytonutriments bioactifs : 669 réféérences bibliographiques. Ed. Yves.Paris, p. 317.

- **Dai J, Mumper R J.(2010).** Plant phenolics: Extraction, Analysis and Their ntioxydant and Anticancer Properties. *Molecules*,**15**(10):7313-7352.
- **David B, Christophe M, Alain E.(2010).** Le paracétamol de nouvelles cibles pour un vieux médicament.Université d’Auvergne, Faculté de médecine, 63001 Clermont-Ferrand.
- **De Bari B, Pointeau Y, Rio E , Mirabel X , Mornex F. (2010).** Dose tolérance à l’irradiation des tissus sains : le foie. *EMC –Radiothérapie- cancer*.**14** :344-349
- **Denninger MH.(2008).**Exploration de l’hémostase dans les maladies du foie. *Biologie hépatique*. **387**:37-47.
- **DJEMAI Z S. (2009).** Etude de l’activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. BATNA.
- **Drake RL,Vogl W, Mitchell AWM.(2006).** Gray’s anatomie pour les étudiants. Elsevier. 1111 p.

## E

- **Edeas M.( 2005).**Citroflavonoides. *Phytothérapie*. **5**:210-211.

## F

- **Favier A.(1997).** "Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur " *Annales de Biologie Clinique* **55**(1): 9-16.
- **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
- **Forkmann J, Martens S.(2001).** Metabolic engineering and application of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:155-160.
- **Fusco D, Colloca G.(2007).** Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*; **2**(3):377-387.

## G

- **Garait B.(2006).**Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®.Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée .EMI0221. ver 2
- **Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D.(2003).** Espèce réactive de l’oxygène. *L’actualité chimique*, 91-96.
- **Gervaise Y.(2004).**Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits.Euroforum.SGS Multilab.Rouen .Paris, France.

- **Gloaguen.(2005).**La bilirubine indicateur de la jaunisse *in examens médicaux*.**78**:62-63
- **Grandjean D. (1997).** "Conséquences biologiques et nutritionnelles du travail en haute altitude chez le chien de recherche, Expédition scientifique "Chiens des Cimes - Licancabur 1996"." *Rec Méd Vét* **172**(11/12): 601-621.
- **Grandjean D. (2005a.)** "Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien." *Le Nouv Prat Vét* **22**: 11-15
- **Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M .(2006)** .Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann Biol Clin (Paris)* **64**:535-548.
- **Guinebert E, Durand P, Prost M, Grinand R, Bernigault R.(2005).** Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*. 554-558.
- **Gulias J, Traveset A, Riera N, Mus M. (2004).** Critical Stages in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany*, **93**: 723-731.

## H

- **Hadi M.(2004).** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres ; études et application thérapeutiques. Université Luis pasteur (.Strasbourg). Thèse de doctorat
- **Halliwell B, Gutteridge J M. (2007).**Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University press.
- **Helbock HJ, Beckman KB, AmesB N.(1999)** 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8 Hydroxyguanine as Biomarkers of Oxidative DNA Damage. In *Oxidants and Antioxidants -Methods in Enzymology*, L. Packer, ed. (Academic Press, San Diego, CA), vol. 300, pp. 156-166.
- **Highleyman L , Franciscus A.(2004 )**. Une introduction au foie. HCSP.version 1.0.

## I

- **IMS .(2009).**Cumul mobile annuel.
- **Izhaki I, Tsahar E, Irena P, Jacob F. (2002).** Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits .*New Phytologist*.**156**: 217-223.
- **Izhaki I, Tsahar E, Irena P, Jacob F.(2002).** Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits .*New Phytologist*, **156**: 217-223

## J

- **Jendrassik L,Grof P(1938).** *Biochem*. **297**: 81.
- **Jurcsuk, MM, Brzóška M, Moniuszko-Jakoniuk J, Gałżyn-Sidorczuk M, Kulikowska-Karpińska E. (2004)** Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol.* **42** : 429–438.

## K

- **Kanatt SR, Chander R, Sharma A. (2007):** Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata L*) in radiation-processed lamb meat *food chemistry*.**100**:451-458
- **Kasot DM.(2013).** Flaxeed phenolics as natural antioxydants. *International Food Research Journal* , **20**(1):27-34.
- **Keppler D.(1999).** Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol Med.* **27** : 985-991.
- **Kohen R, Nyska A.(2002).**Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.*; **30**: 620-650.
- **Koolman J, Röhm KH. (1994).** Atlas de Poche de Biochimie. *Paris: Médecine-Sciences Flammarion.* 426 p.
- **Krishna D, Chaluvadi M, Raj N, Sripal R.(2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.***33**: 2-16.
- **Kumar AS, Mazumder A, Vanitha J, Venkateshwaran K, Kamalakannan K, Sivakumar T.(2008).**Evaluation of antioxidant Activity, phenol and flavonoid contents of some selected Indian medicinal plants. *Pharmacognosy Magazine.***4**:0973-1296.

## L

- **Lai TNH, Herent MF, Quetin-Leclercq J, Nguyen TBT, Rogez H, Larondellea Y, André CM.(2013).** Piceatannol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in *Rhodomyrtustomentosa*. *Food Chemistry*, **138**:1421-1430.
- **Larson AM. (2007).**Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver* **11**(3):525-48.
- **Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2002).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.* **30** :1076-1081.
- **Ljubuncic P, Azaizeh H , Portnaya I, Coganc U, Said O, Saleh KA, Bomzon A.(2005).**Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel, *Journal of Ethnopharmacology* .**99** :43–47
- **Lucienne AD.(2013).** Les plantes médicinales d'Algérie.3<sup>eme</sup> édition. BERTI edition.Alger .p32.

## M

- **Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-manchado P.(2006).** Composés phénolique dans la plante, structure, biosynthese reparation et rôle in les polyphénols en agroalimentaire. *Edition thechnologie et document.* Paris :pp380-398.

- **Mamoudou HD, Gruppen H, Afred ST, Voragen AGJ, Willem JHB.(2006).** Phenolic compounds and related enzyme as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and molecular Biology Review.* **1** (1):21-38.
- **Marfak A.(2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 187 p
- **Matés JM, Gomez PF.(1999).** Antioxydant Enzymes and their Implication in pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience*, **4**:339-345.
- **Mégarbane B, Deye N, Baud F.(2007).** Foie toxique: mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques in *Réanimation médicale et toxicologique*. Paris .
- **Milan H.(2004).** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; étude et application thérapeutique. *Thèse de doctorat*.
- **Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou
- **Milde J, Elstner EF, grabmann J.(2004).** Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, “-terpinene, and ascorbic. *Phytomedicine*, **11**:105-113.
- **Mornex F, Gérard FG, Ramuz O, Van Houtte P.(1997).** Effets tardifs des radiations sur le foie. *Cancer/Radiother.* **1**: 753-759.



- **Natter FH. (2004).** Atlas d'anatomie humaines 3ème édition. Masson. .Paris .pp542.
- **Nguyen S, Bourouina R.(2008).** Manuel d'anatomie et de physiologie. 4ème. Lamarre. France. 421p. ISBN :978-2-7573-0183-8.
- **Niess A M et Simon p. (2007).** "Response and adaptation of skeletal muscle to exercise: the role of reactive oxygen species." *Front Biosci* **1**(12): 4826-38.
- **Novelli G P.(1997).** Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.* **48**: 517-527.



- **Okhawa H, Ohishi N, Yagi K.(1979).** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Add. Biochem.* **95**: 351-358.
- **Ouattara Y, Sakandé B, Simporé J, Issiaka ZK, Innocent P. Guissou, Laya Sawadogo1.(2003).** Evaluation de l'activité hépatoprotéctrice des extraits aqueux de plantes médicinales face à une hépatotoxicité létale induit chez la souris. Université de Ouagadougou .



- **Passalacqua NG, Defin G, Guarrera PM.(2006).** Contribution to the knowledge of the veterinary science and of the ethnobotany in Calabria region. *Jurnal Of Ethnobiology and Ethnomedicine*. Southern Italy. **2**:52:1-14.

- **Pastre JOC.(2005).**Intérêt de la supplémentation en antioxydant dans l'alimentation des carnivores domestique .Université Paul-Sabatier de Toulouse. Thèse de doctorat.
- **Pelli K, Lyly M.(2003).**Les antioxydants dans l'alimentation.Finlande.28p.
- **Plaa GL,Hewitt WR. (1997).**Toxicology of the liver.2ed edition. p 444.
- **Powers S, Jackson M.(2008).** "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." *Physiol Rev* .**88**: 1243-1276.



- **Quettier-deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin J C, Bailleul F, Trotin F. (2000) :** Phenolic compounds and antioxidants activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, **72**: 35-42.



- **Racine R.(2009).**Etude des effets d'une ingestion chronique de radionucléides sur le métabolisme du cholestérol chez le rat :exemples de l'uranium appauvri et du césium 137.Thèse de doctorat.Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Sante de Clermont-Ferrand.337p.
- **RANDOX.(2013).**Manuel /RX monza BR 411.55 Diamond Road, Crumlin , County Antrim. BT29 4QY, United Kingdom .
- **Ribéreau-Gayon P.(1968).**Notion générales sur les composés phénoliques. *In Composées phénoliques des végétaux*. Edition Dunod, Paris.pp. 105-133.
- **Rosenbaum J,Mavier P,Dhumeaux D.(1991).** Interactions cellulaires dans le foie. *médecine/sciences*.**7**:110-117.
- **Rouas C.(2010).** Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition à l'uranium appauvri sur le système de detoxification *in vivo* et *in vitro*. Université de paris. Thèse de doctorat.
- **Rouibah H .(2006).**Etude comparative *in vivo* et *in vitro* des effets d'un traitement prolongé par les flavonoïdes de la propolis algérienne sur les fonctions des mitochondries isolé à partir de foie de rat wistar.Diplôme de magister. Jijel
- **Rouvière H,Dalmas A.(2002).**Anatomie humaine descriptive topographie et fonctionnelle .Tome 2.15ème édition Elsevier Masson .p 550.



- **Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H.(2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the west bank region. *Jurnal of Ethnopharmacology*.**83**:251-265.

- **Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, Del Rio LA.(2001).** Cadmium induces changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **52(364)** : 2115-2126.
- **Sanhadji K.(2013).** La prise en charge des sidéens algériens n'est pas aux normes. *Santé-MAG* .N°25 .p30.
- **Saraf S, Ashawat, MS.(2007).** Flavonoids: A nutritional against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy Reviews.***1(1):**30-40.
- **Sarni-Manchado P, Cheynier V. (2006).**Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 2-10.
- **Servais S.(2004).**Alteration mitochondriale et stress oxydant pulmonaire et réponse à l'ozone: Effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3.Thèse de doctorat :Université Claude Bernard .Lyon.
- **Shahriar KRJ.(2010).**Marles Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity studies. *Molecules.* **15:**7985-8005.
- **Sherlock S, Dooley J. (2002).** Diseases of the liver and biliary system.. *Blackwell Science. 11ed.pp:*1-17.
- **Sies H.(1991).** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med,* **91** :31S-38S.
- **Socha M, Sokolowska-Mikolajczyk M, Szczerbik P, Chyb J, Dietrich G, Kowalski R, Grabic R, Epler P.(2008).** The influence of polychlorinated biphenyls (PCBs) on computer analysed sperm motility of common carp (*Cyprinus carpio* L.) *in vitro*. *Cybio* **32** (Suppl. 2): 197.
- **Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC.(2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med.***33:** 575-586.
- **Spinreact.(2008).**Total Protein.BSIS30-1. Ed2008.Spain.
- **Stevens A, Lowe J. (2006).** Histologie humaine. 3ème édition. Elsevier. Paris. p459.
- **Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. (2005).** The laboratory RAT. SBN 13: 978-0-12-074903-3.p 106.



- **Tessier F , Marconnet P.(1995).** "Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice." *Science & Sports* **10:** 1-13.
- **Tsao R , Deng Z.(2004).** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemical. *Journal of Chromatography,* **812:**85-99.



- **Urquiaga INES, Leighton FEDE.(2000).**Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.* **33:** 55-64.

## V

- **Valdigué P.(2001).** Exploration fonctionnelle hépatique *in* biochimie clinique.2ème édition .pp294-302.
- **Van Antwerpen P.(2006).**Contribution à l'étude de pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : ciblage du système myeloperoydase / peroxyde d'hydrogène/ chlorure. Institut de pharmacie (Bruxelles). Thèse de doctorat.

## W

- **Wigfull , Bellamy.(2000).**Physiology and pharmacology of the liver (Part2). Bulletin of the RCoA. **4**:152-154.

## X

- **Xu YC,Leung SWS, Yeung DKY, Hu LH, Chen GH, Che CM, Man RYK.(2007).**structur-activity relationships of flavonoid for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*, **68**(8):1179-88

## Y

- **Yang JH, Lin HC, Mau JL. (2001).** Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food chem.*, **77**:229-235.
- **Yap CF, Ho CW, Aida WM, Chan SW, Lee CY , Leong YS.(2009).**Optimizazion of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola L*) residues.*Sains malaysiana*.**38**(4) :511-520.
- **Yi-ling C, Pank –kai C.(1982)** .Rhamnaceae .*in*: chen Yi-ling, ed .,FI.Reipubl

# *Annexes*

**Annexe I :** Taux et latence de mortalité après une dose unique de l'extrait éthanolique de *R.alaternus L* :

<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Nombre d'animaux par lot</b>	<b>Mortalité</b>	<b>Latence de mortalité</b>
<b>0</b>	5	0	0
<b>1000</b>	5	0	0
<b>2000</b>	5	0	0
<b>5000</b>	5	0	0

## Résumé :

*Rhamnus alaternus L* (Nerprun méditerranéen) appelée localement (Melilésse) est une plante herbacée distribuée le long du bassin méditerranéen, L'efficacité de cette plante a été prouvée en médecine traditionnelle, elle est utilisée comme purgative, laxative, diurétique, anti hypertensive, dépurative, et pour des maladies de foie ...ect. Ces différentes applications nous a conduit à identifier ses composantes phytochimiques comme l'évaluation du contenu des polyphénols totaux, de ce là en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu qui révèle une présence des quantités moyennement importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode de d'AlCl<sub>3</sub> qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes .Le potentiel antiradicalaire de l'extrait éthanolique a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que notre plante possède une bonne activité antiradicalaire. L'étude de l'effet de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus L* sur la toxicité hépatique induite par le Klipal chez les rats Wistar par une dose de 500mg/kg a montré que cet extrait a un bon effet protecteur hépatique. Au cours de cette étude nous avons réalisé également analyses sanguines sur les rats wistar albinos et par une comparaison entre eux on a révélé que l'extrait éthanolique a diminué la toxicité provoqué par le klipal et une augmentation des protéines totales plasmatique ce qui facilite l'élimination de la toxique.

**Mots clés :** *Rhamnus alaternus L*, activité antiradicalaire, toxicité hépatique, Klipal.

## Abstract:

*Alaternus Rhamnus* (buckthorn Mediterranean) called locally (Melilésse) is a herbaceous plant distributed along the Mediterranean basin, the effectiveness of this plant has been proven in traditional medicine, it is used as purgative, laxative, diuretic, anti hypertensive, depurative ... ect. These applications has led us to identify its phytochemicals as evaluating the content of total polyphenols, this here by adopting the method of Folin-Ciocalteu which reveals the presence of moderately large quantities of polyphenols. Similarly we assayed flavonoids by the AlCl<sub>3</sub> method that leads us to conclude that this plant contains a considerable amount of flavonoids. Antiradical potential of the ethanolic extract was determined by the DPPH method, the results show that our plant has good anti-radical activity. The study of the effect of the ethanol extract of *Rhamnus alaternus* on hepatotoxicity induced by Klipal in Wistar rats with a dose of 500mg/kg showed that this sample has a good protective effect hepatic. In this study we also conducted blood tests on Wistar albino rats and compared them it was revealed that the ethanol extract decreased the toxicity caused by Klipal and an increase in total plasma protein that facilitates the elimination of toxic.

**Key words:** *Rhamnus alaternus L*, antiradical activity, liver toxicity, Klipal.